

Transgenske živali

V živinoreji so dosegli velike uspehe s križanjem živali in selekcijo. Postopek je dolgotrajen in pogosto prihaja pri križanju ob oplemenitenju enih lastnosti do poslabšanja drugih. S tehnikami rDNA lahko v genome vključimo želenne zapise in z jedrnim kloniranjem ustvarjamo živali z identičnimi genomi.

Kloniranje gena v živalih (splošno):

- Klonirani gen injiciramo v jedro oplojene jajčne celice.
- Jajčne celice implantiramo v pripravljeno samico.
- Nekateri potomci bodo v vseh svojih celicah nosili injicirani gen.
- Potomce z želenimi geni v spolnih celicah množimo dalje.

Pri živini izboljšujemo proizvodnjo mleka, značilnosti volne, hitrost pridobivanja teže, nesnost. Z vnosom genov, ki stimulirajo rast, bo žival zrasla hitreje in do zakola pojedla manj krme kot izhodna žival. Pri raziskavah in razvoju pa enako tehnologijo izkoriščamo pri študiju izražanja genov, pripravi živalskih modelov bolezni pri ljudeh ter za pridobivanje farmacevtsko pomembnih proteinov v mleku (*pharming*).

Transgenske miši: priprava

Priprava transgenskih miši:

Tehnologijo priprave so obvladovali že v začetku 80-tih let.

DNA lahko vnesejo v žival na več načinov:

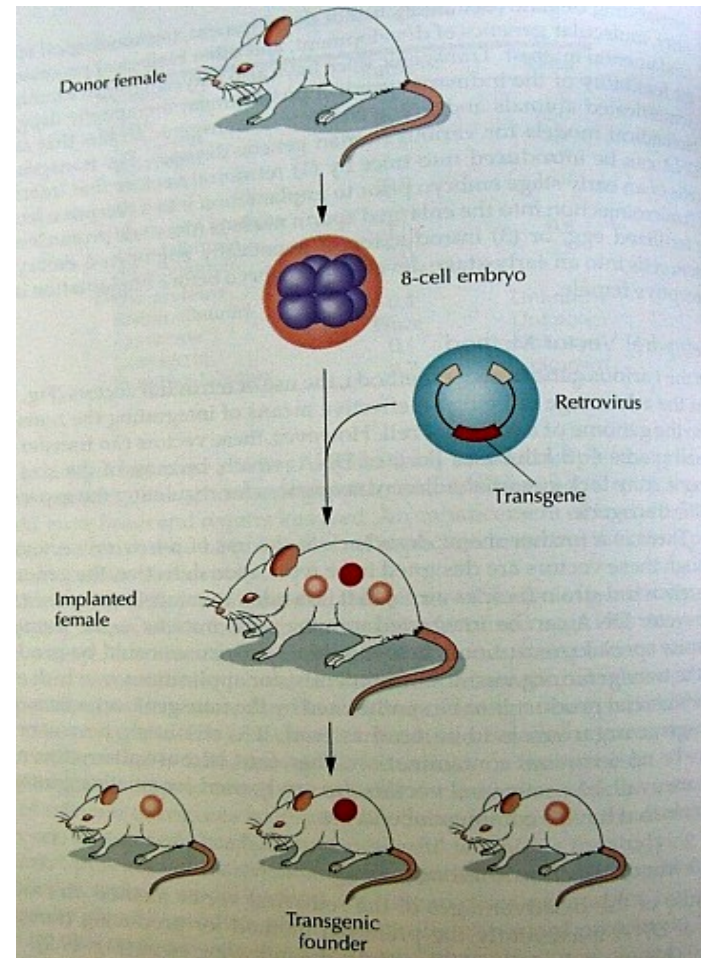
- s pomočjo retrovirusov
(inficirajo zgodnji embrij pred vnosom v samico)
- z mikroinjiciranjem gena v moško projedro oplojenega jajčeca
- z vnosom genetsko spremenjenih embrionalnih izvornih celic v embrio pred implantacijo v samico

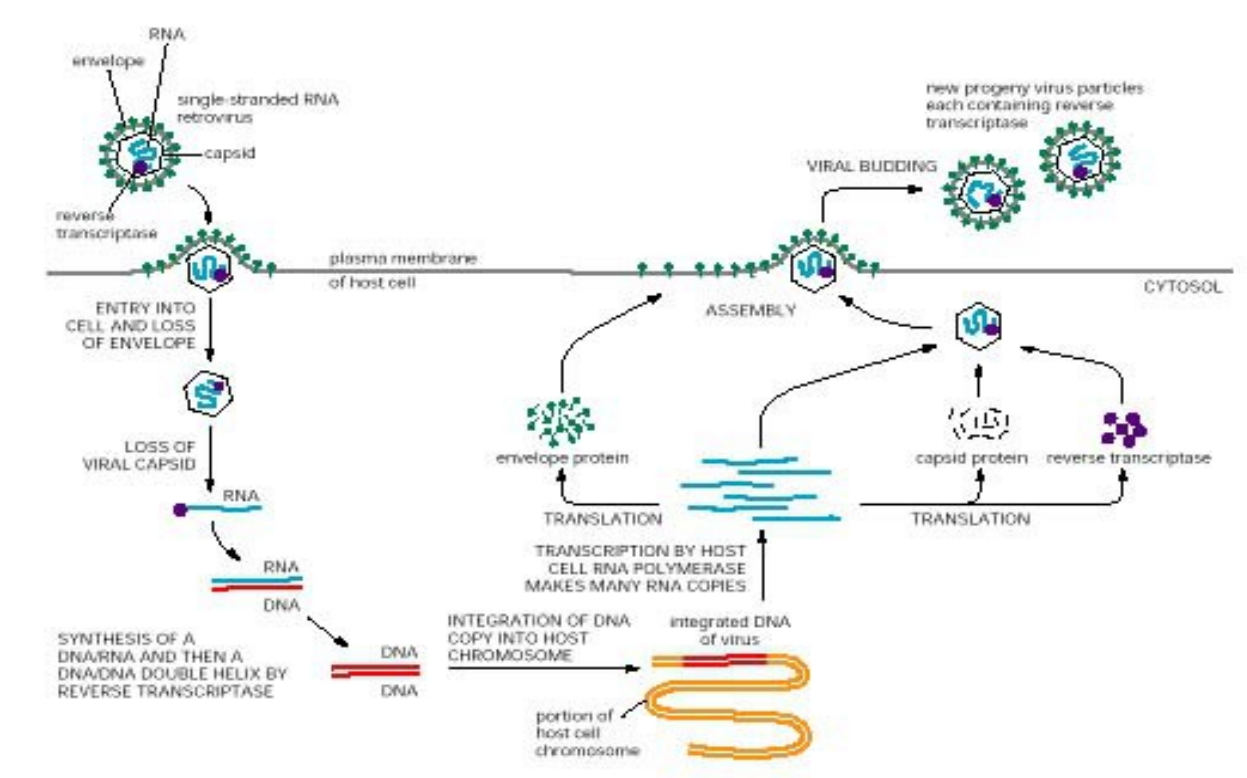
Transgenske miši: retrovirusi

Retrovirusi učinkovito integrirajo vnesene gene v genom, vendar lahko prenašajo **le do ~8 kb** DNA.

Razen tega ni mogoče v celoti izključiti možnosti okužb, čeprav je sistem pripravljen tako, da se virusi ne morejo razmnoževati brez pomožnega virusa, ki pa teoretično vseeno lahko zaide v isto jedro in povzroči namnoževanje virusov. To pa bi bilo nesprejemljivo pri proizvodnji reagentov ali hrane.

Metode ne uporabljamo v postopkih za pripravo komercialno uporabnih transgenskih živali.

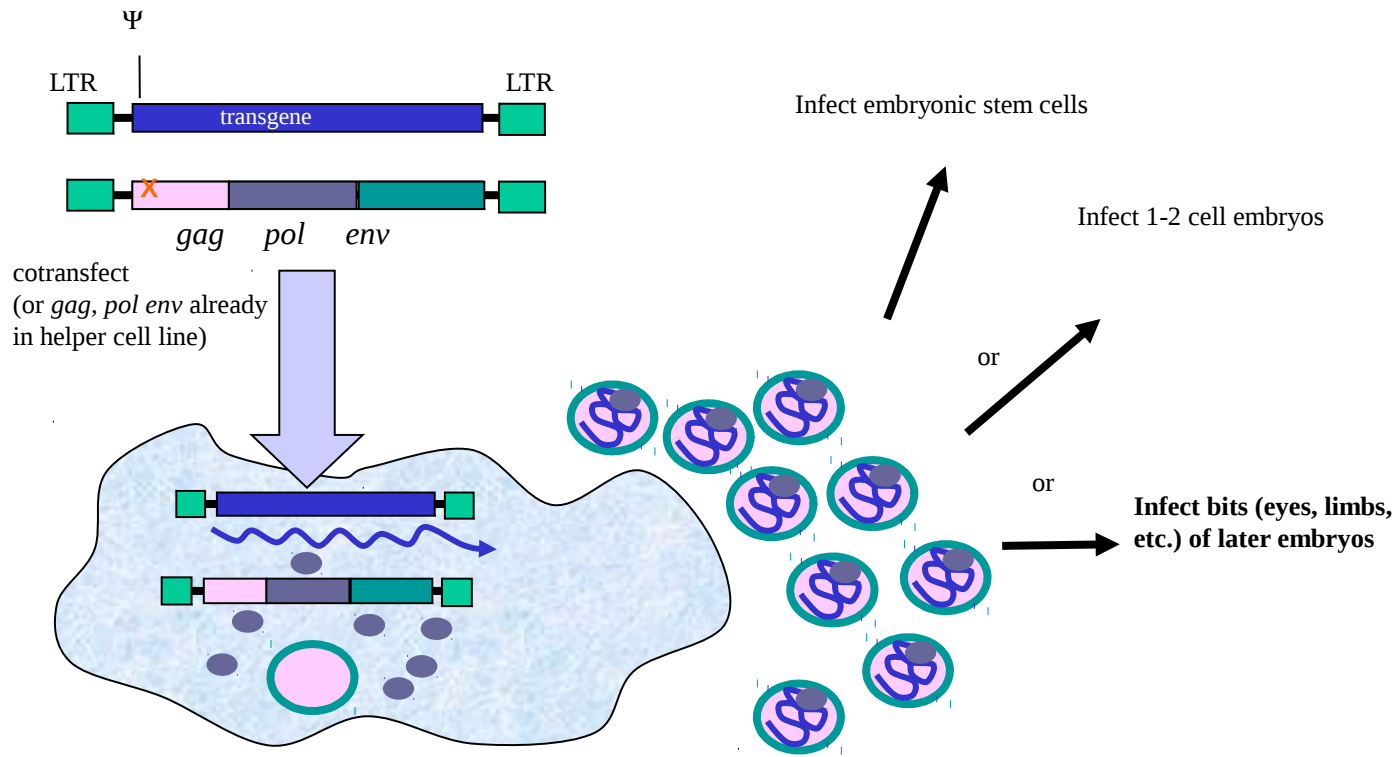




življenjski cikel wt retrovirusa

- gag* - encodes proteins of nucleoprotein core of virion.
- pol* - encodes reverse transcriptase, integrase etc functions.
- env* - encodes surface protein components of virion.
- Ψ - packaging signal.





Transgenske miši: mikroinjiciranje

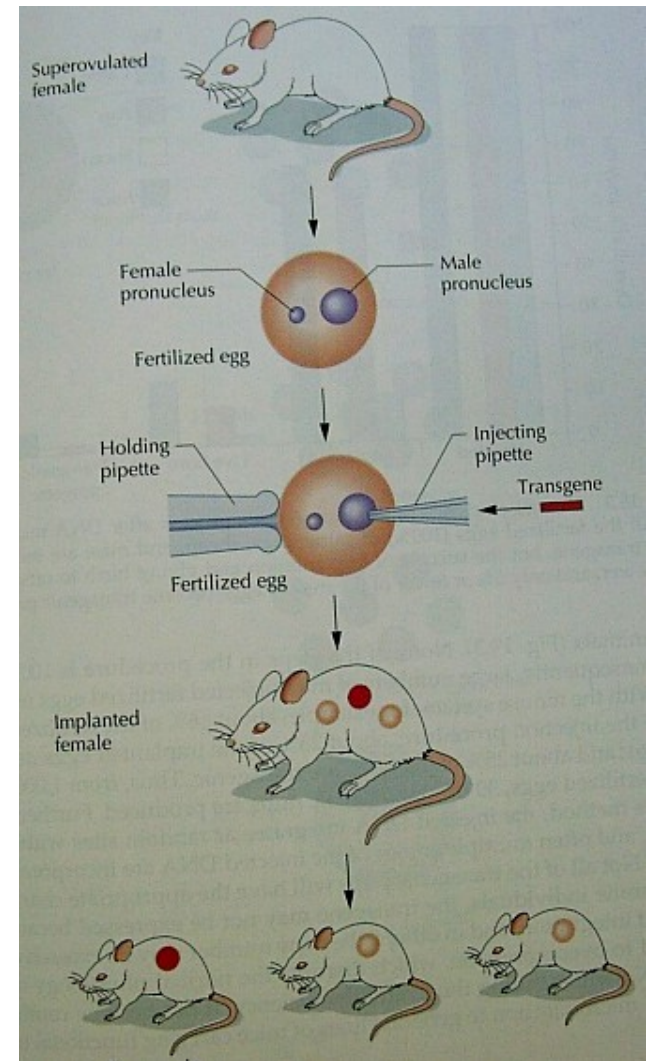
Ta metoda se uporablja najpogosteje.

1. Samicam injicirajo serum breje kobile in človeški horionski gonadotropin; zaradi hormonov taka miš proizvede ~35 zrelih jajčnih celic namesto običajnih 5-10
2. Superovulirane samice se parijo, potem pa jih žrtvujejo in jim iz jajcevodov sperejo oplojene jajčne celice.
3. Takoj nato injicirajo linearizirano DNA (brez prokariontskih vektorskih zaporedij) v moška projedra.

[Po oploditvi spermijско jedro in jedro jajčne celice ostajata ločeni. Šele ko žensko jedro konča z meiozo, pride do jedrne fuzije (kariogamije).]

Po inokulaciji prenesejo 25-40 jajčnih celic v nadomestno mati, ki so jo prej naredili navidezno brejo s tem, da so jo parili s steriliziranim samcem. Mladiči se skotijo po ~3 tednih.

Transgenske miši identificirajo s PCR ali hibridizacijo po prenosu Southern, nato pa jih parijo, da dobijo homozigotne transgenske potomce. Skotijo se mladiči iz največ 5 % inokuliranih jajčec. Razen tega ne moremo kontrolirati mesta vgraditve v genom niti števila kopij - pogosto pride do neželenega fenotipa.



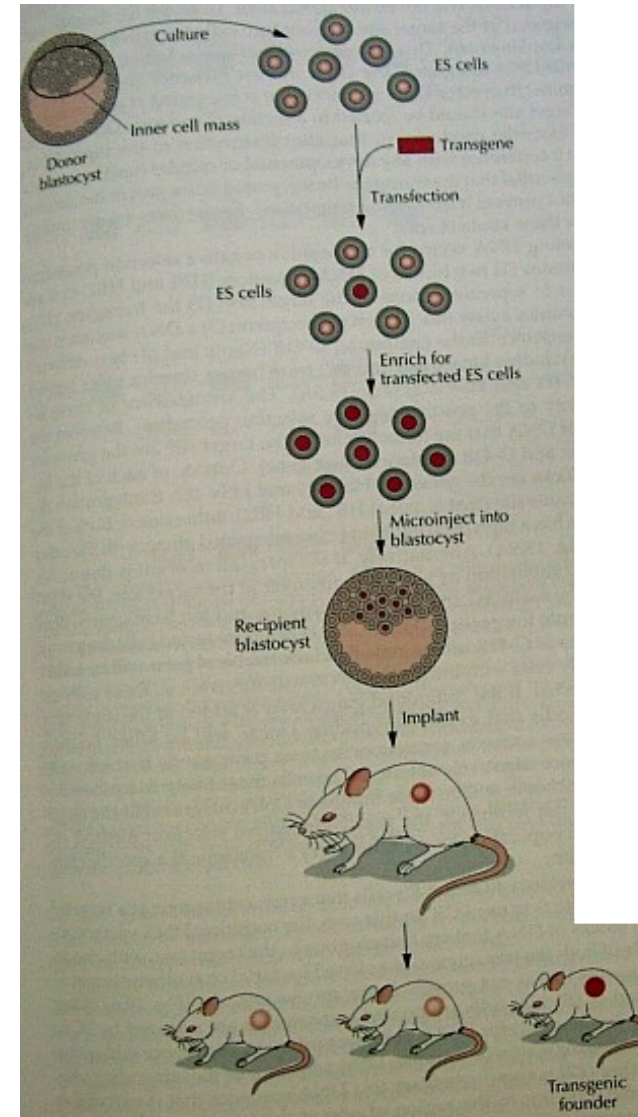
Transgenske miši: embrionalne izvorne celice

Celice iz stopnje blastociste lahko gojimo v kulturi, pri čemer ostanejo sposobne razvoja v vse različne tipe celic (vključno s kličnimi celicami). Take pluripotentne celice so embrionalne izvorne celice (ES - embryonic stem). Po vnosu v drugo blastocisto se lahko normalno delijo naprej in diferencirajo.

Ko ES-celice rastejo v kulturi, jih lahko genetsko spremenimo in pri tem načrtno vgrajujemo DNA na želena mesta. Vseeno ostane veliko celic, ki niso sprejele tuje DNA, nekaj pa jih je DNA vgradilo v netarčna mesta. Celice s pravilno vgrajeno tujo DNA izberemo s PCR ali s pozitivno-negativno selekcijo.

Obogatene ES-celice mikroinjiciramo v prejemniško blastocisto, te pa implantiramo v samico. Med mladiči določimo tiste, ki izražajo vneseni gen in ga imajo vključenega v genom v spolnih celicah. S križanjem potomcev ustvarimo homozigote.

Tako kot lahko načrtno vgrajujemo inserte v tarčna zaporedja, lahko tarčna zaporedja tudi prekinjamo (s selekcijskimi markerji) in s tem inaktiviramo gene – **tehnologija izbijanja genov** (*knockout*). S tem postopkom lahko pripravimo mišji model tistih človeških bolezni, za katere vemo, kateri gen je prizadet.



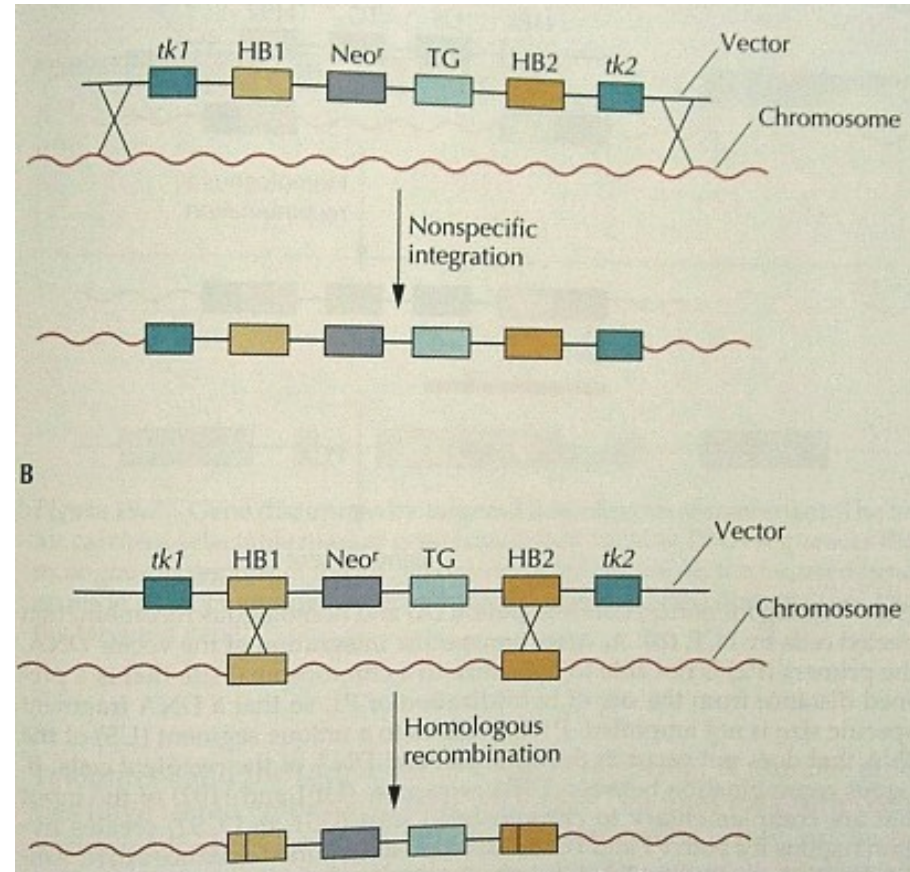
Pozitivno-negativna selekcija ES-celic

Pri pozitivno-negativni selekciji gre za **pozitivno** selekcijo celic, ki imajo vektorsko DNA vgrajeno kjerkoli v genomu in **negativno** selekcijo celic, ki so vektor vgradile na neželena mesta.

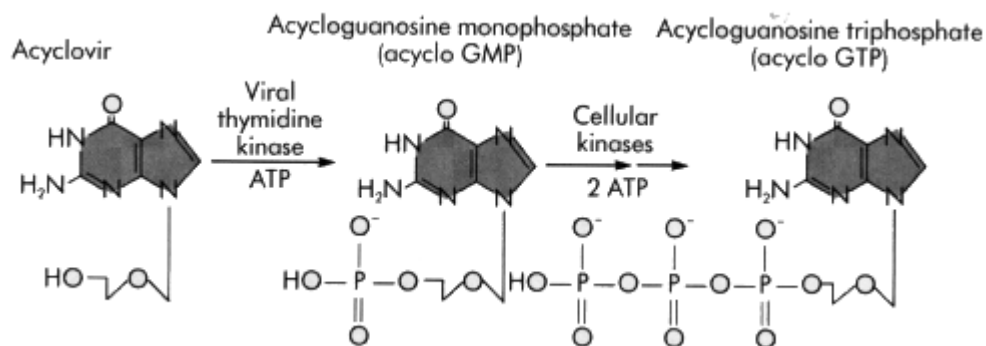
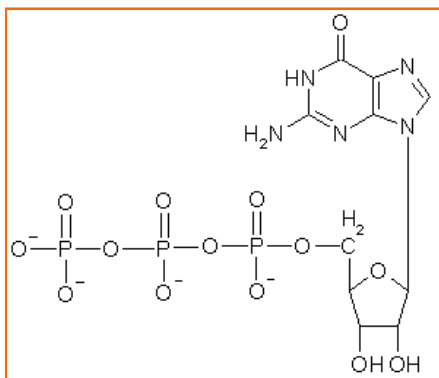
Tako identificiramo klonе ES, ki nosijo novi gen vključen v mesta, ki smo jih izbrali kot tarčna. To so običajno mesta, ki ne zapisujejo za pomembne sestavine celic, hkrati pa je transkripcija na teh mestih neovirana.

Vektorji za prenos vsebujejo dva bloka zaporedij (HB), ki sta homologni regijam na ciljanem mestu vnosa, transgen (TG) = DNA, ki jo želimo vgraditi, rezistenčni marker (NeoR, odpornost proti G-418) in dva različna gena za timidin-kinazo virusa Herpes simplex (HSV-*tk*), ki sta izven regije med dvema HB. Če pride do integracije v genom izven načrtovanih blokov HB, je velika verjetnost, da se bo preneslo tudi vsaj 1 zaporedje za *tk*. Če pride do želenega vnosa, pa se preneseta samo TG in NeoR.

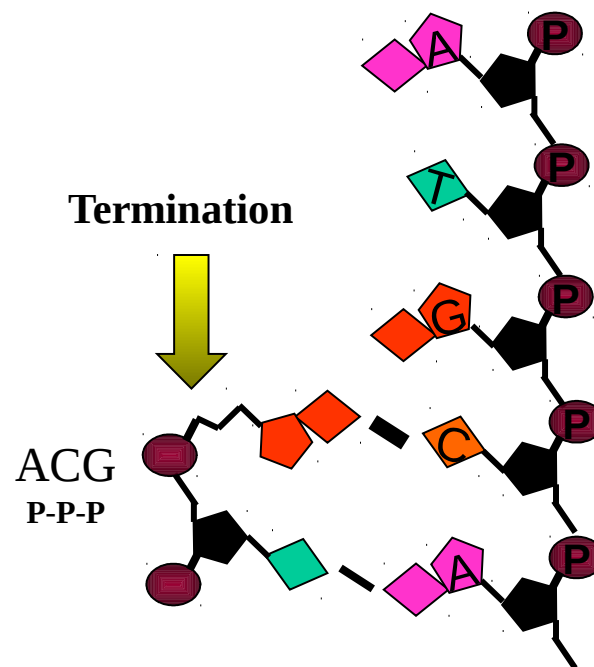
Celice po prenosu gojimo v prisotnosti G-418. Rastejo le tiste, pri katerih je prišlo do vnosa vektorja (pozitivna selekcija). Če celicam hkrati dodamo še ganciklovir, bodo celice s *tk* odmrle, saj kinaza pretvori ganciklovir v toksično snov (negativna selekcija).



Selekcija s tk/ganciklovirom



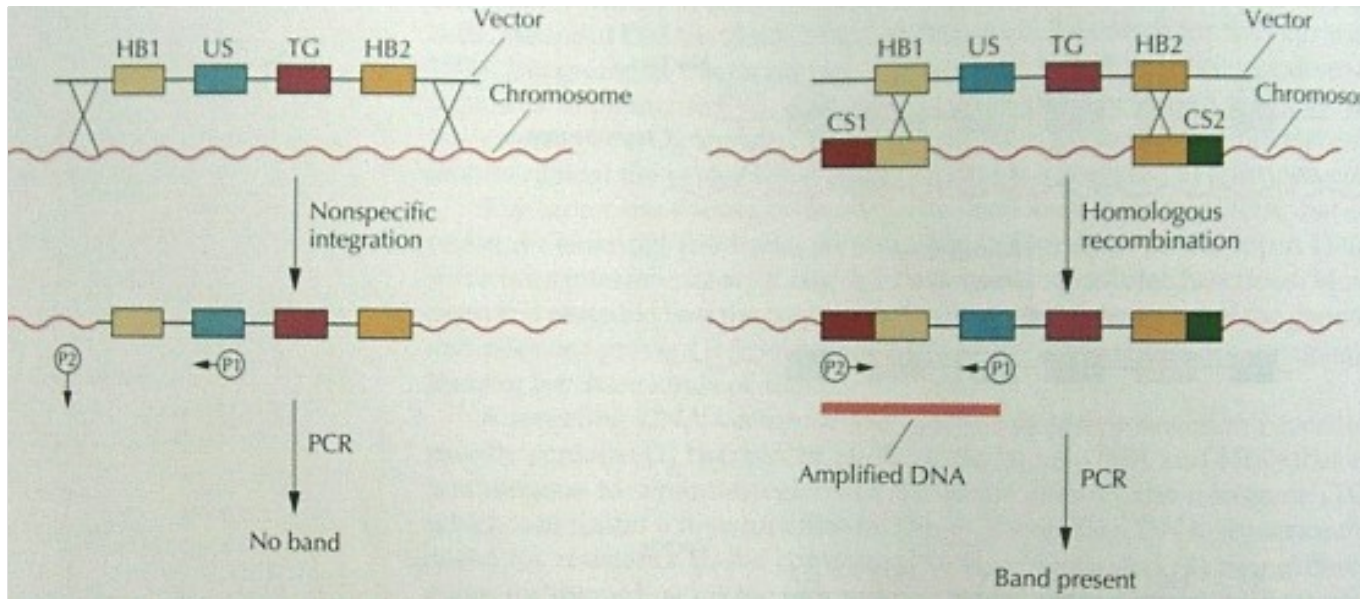
- ganciklovir (pa tudi aciklovir=aciklogvanozin - prvo pravo protivirusno zdravilo (1983)): analog purina - sam po sebi za celico ni toksičen
- virusna timidin kinaza (tk) fosforilira ganciklovir v ganciklovir-monofosfat (*torej je v deoksinukleozid kinaza*)
- celične kinaze ga pretvorijo v trifosfat
- DNA-polimeraza vgrajuje ganciklovir-trifosfat kot da bi bil naravni nukleotid
- po vgraditvi ganciklovira pride do predčasnega zaključevanja sinteze hčerinske verige DNA

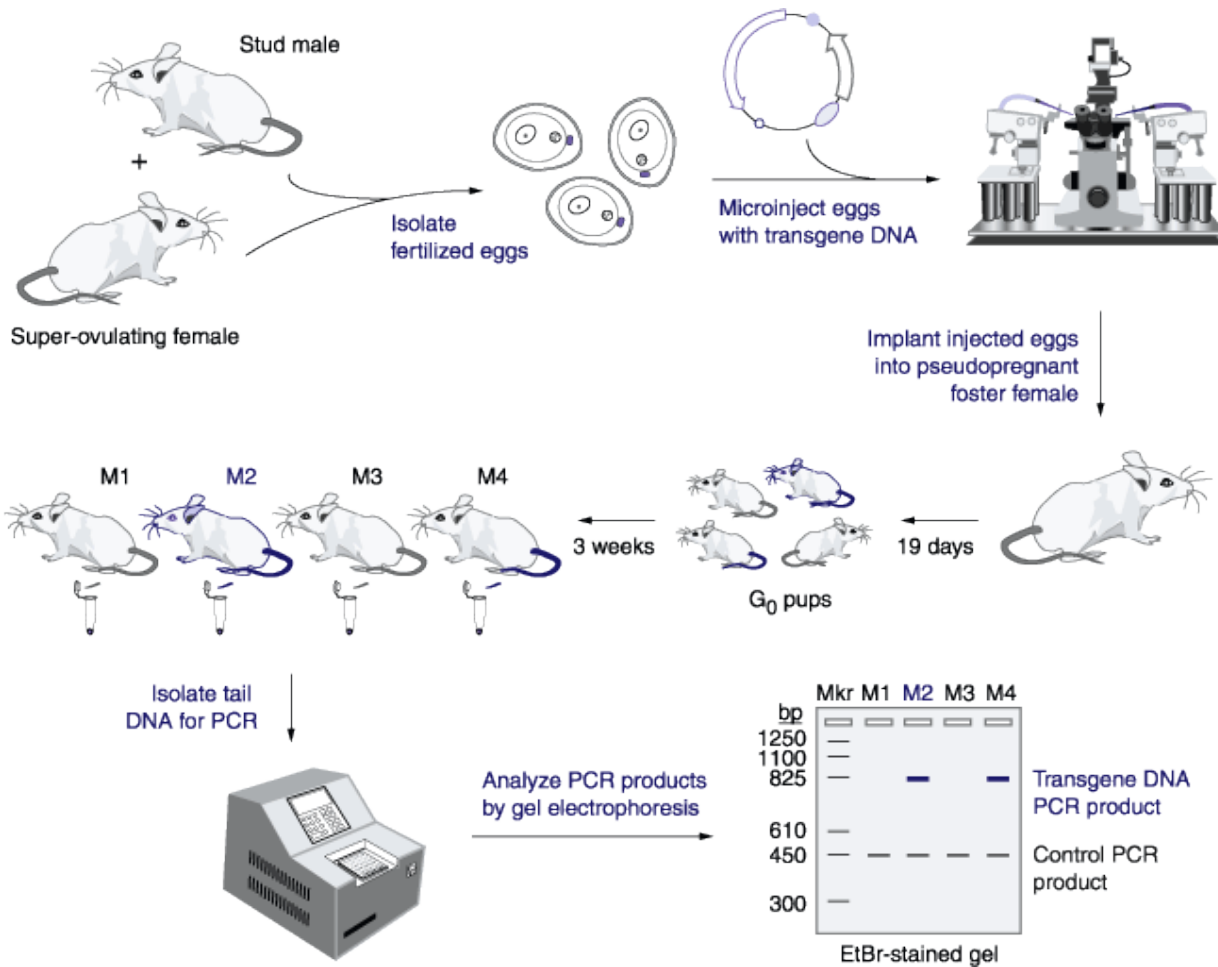


Selekcija ES s PCR

Za selekcijo s PCR moramo uporabiti vektorje, ki imajo med obema blokoma HB transgen in zaporedje, ki je sintetično ali bakterijsko in se ne pojavlja v mišjem genomu (US). Oligonukleotida za pomnoževanje izberemo tako, da se prvi veže na nemišje zaporedje, drugi pa na regijo na mišjem kromosomu v bližini regije HB (CS).

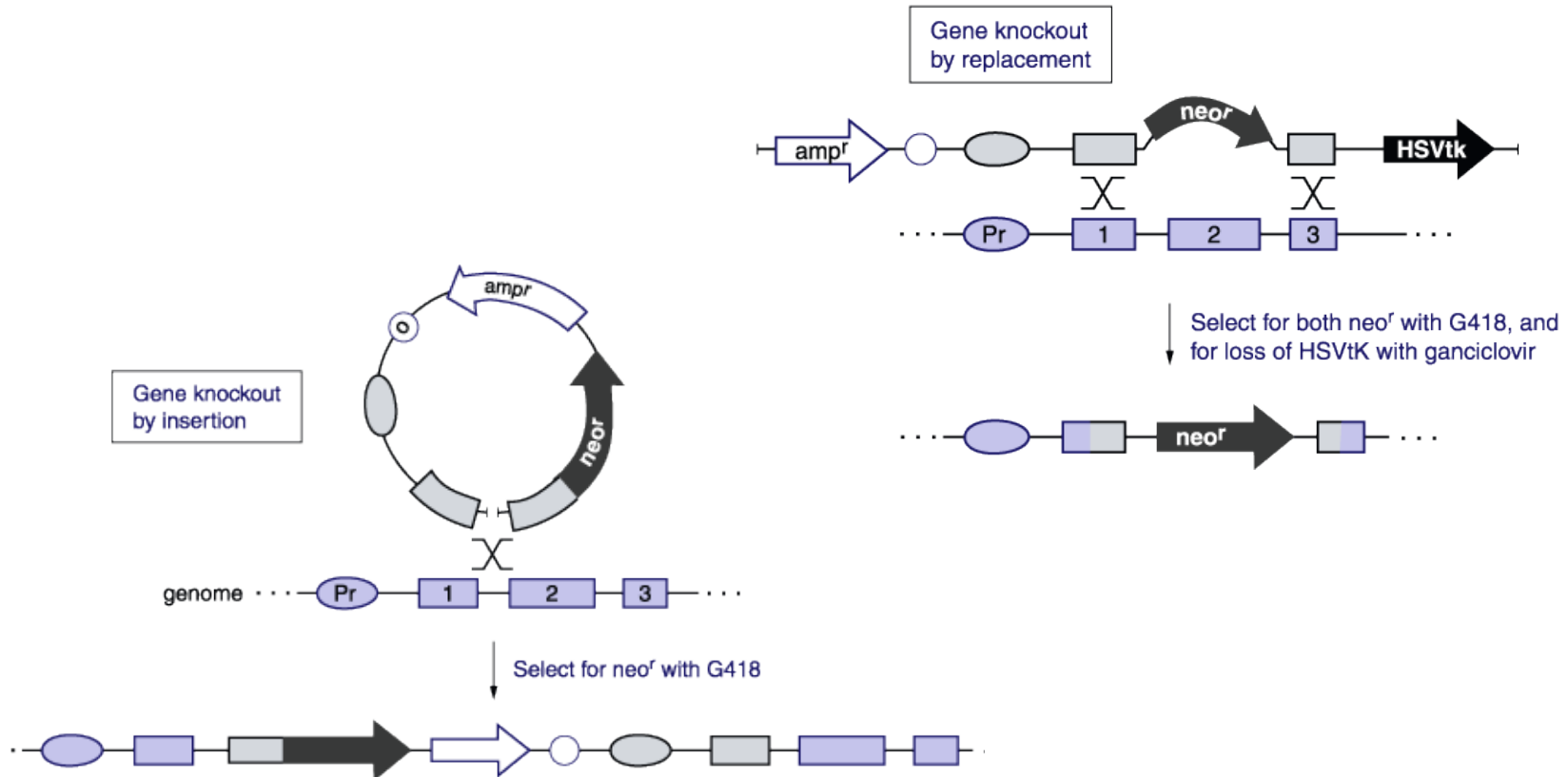
Pri integraciji izven želene regije do pomnoževanja ne pride, ker se drugi oligonukleotid ne veže, pri usmerjeni integraciji pa dobimo produkt PCR pričakovane velikosti.





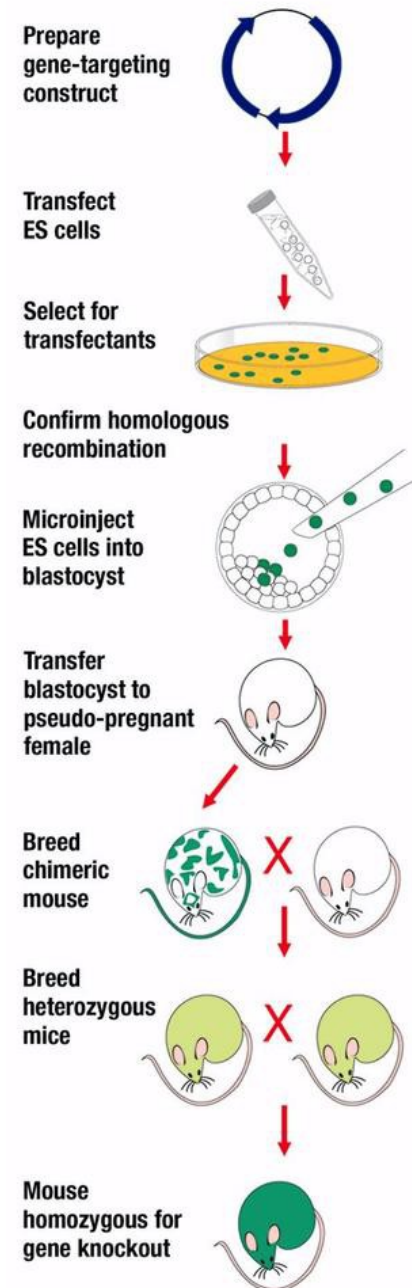
Tehnologija izbivanja genov

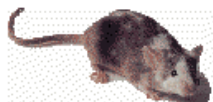
Doslej so pripravili že več 100 različnih transgenskih miši. Transgenskim organizmom inaktiviramo nek gen z insercijo nekega drugega gena znotraj zaporedja prvega ali pa z nadomestitvijo enega gena z drugim.



Transgenske miši z izbitimi geni: pregled postopka z ES-celicami

Type of disorder	Human disease	Altered mouse gene	Gene locus
metabolic diseases	Familial hypercholesterolemia	Low density lipoprotein receptor	Ldlr
	Hyperlipoproteinemia	Apolipoprotein E	ApoE
	Tay-Sachs disease	Hexokinase A	HexA
	Gaucher disease	Glucocerebrosidase	Gba
	Gout	Urate oxidase	Uox
hematological diseases	a-thalassemia	α -globin gene cluster OLE	Hba
	Chronic granulomatous	Cytochrome b-245	Cybb
neurological diseases	Huntington disease	Huntington disease gene homologue	Hdh
	Ataxia telangiectasia	Ataxia telangiectasia	Atm
oncological diseases	Li-Fraumeni syndrome	Protein 53	Trp53
	Familial retinoblastoma	Retinoblastoma-1	Rb1





GENE KNOCKOUTS LISTED ALPHABETICALLY ACCORDING TO THE NAME OF THE GENE

The list can be scrolled through sequentially, or accessed by clicking any of the following letters:

[A](#) [B](#) [C](#) [D](#) [E](#) [F](#) [G](#) [H](#) [I](#) [J](#) [K](#) [L](#) [M](#) [N](#) [O](#) [P](#) [Q](#) [R](#) [S](#) [T](#) [U](#) [V](#) [W](#) [X](#) [Y](#) [Z](#)

- 5-Lipoxygenase
- 5-Lipoxygenase-activating protein (FLAP)
- Acid Alpha-glucosidase gene (Gaa)
- Acrosin
- Acute Regulatory Protein (StAR)
- Adenosine A2a receptor
- Adenosine deaminase (ADA)
- alpha 1 (IX) collagen
- alpha calcium-calmodulin kinase II (alpha CaMKII)
- Alpha1b-adrenergic
- Alpha-Galactosidase A
- Apc(delta716)
- Amyloid precursor protein (APP)
- Angiotensin-converting enzyme (ACE)
- Angiotensinogen
- aP2
- ApoA-I
- Apo B
- ApoC-III
- Apo E
- Apolipoprotein A-IV
- Atm
- B7
- Bax
- Bc16

<http://www.bioscience.org/knockout/alphabet.htm>

Low density lipoprotein receptor

- Normal fertility
- Normal triglyceride concentrations
- Increased susceptibility to gross atheromata in aorta and coronary ostia
- Increased susceptibility to thickening of aortic valve leaflets
- Increased susceptibility to increased plasma VLDL, IDL, and LDL cholesterol
- Increased total plasma cholesterol concentration
- Increased susceptibility to develop massive xanthomatous infiltration of skin and subcutaneous tissues

Ishibashi *et al.*, 1993

Ishibashi *et al.*, 1994

METHODOLOGY (FROM T-BASE)

((Idlr))

	Line Name	DNA Construct
1.	LDLR (+/-)	Mouse LDL (low density lipoprotein) receptor cDNA was amplified by PCR from mouse liver first strand cDNA using polyA+ RNA and the following primers: Primer A (5'-ATTCT....
2.	LDLR (-/-)	Mouse LDL (low density lipoprotein) receptor cDNA was amplified by PCR from mouse liver first strand cDNA using polyA+ RNA and the following primers: Primer A (5'-ATTCT....

Mišji modeli za bolezni

amiotrofna lateralna skleroza (ALS)

“bolezen Louja Gehriga”

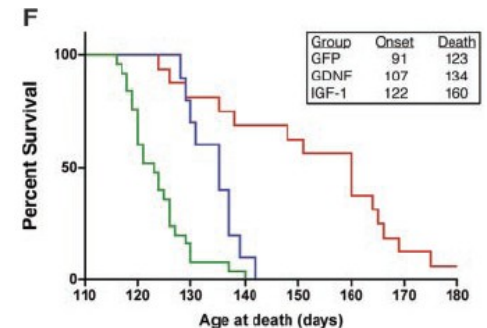
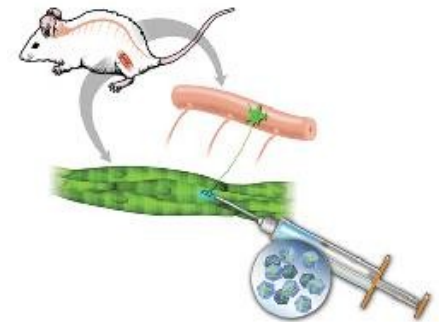
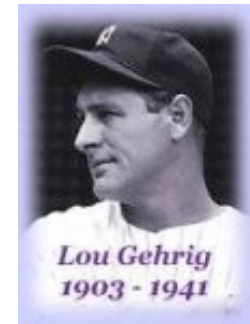
Napredujoča smrtna živčno-mišična bolezen; degeneracija motoričnih nevronov hrbtenjače in možganskega debla ⇒ atrofija mišic, vključno z dihalnimi. Vzrok za razvoj bolezni ni znan; zdravil ni.

Simptomi so enaki kot pri poskusnih miših ali podganah z mutacijami v genu za superoksid-dismutazo 1 (SOD-1). Snovi, ki zavirajo razvoj simptomov pri poskusnih živalih, so učinkovite tudi pri obolelem človeku. Problem je vnos aktivnih snovi v motorične nevrone.

Raziskave na miših so pokazale, da so se z adenovirusi povezani virusi (AAV) sposobni širiti navzgor od presinaptičnih končičev po aksonu do jeder živčnih celic. AAV z vnesenim genom za nevrotrofni faktor so vbrizgali v mišice in zasledovali njegovo izražanje v živčnih celicah.

Transgenske miši so vsebovale gen za G93A SOD-1. Brez zdravljenja razvijejo bolezen, ko so stare 90 dni in poginejo po ~30 dneh. Ob zdravljenju z rekombin. AAV se je bolezen pojavila po ~120 dneh, miši pa so poginile po ~40 dneh.

<http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/301/5634/839>
Science 301, 839-843 (2003)



GS živali

Guidance for Industry

Regulation of Genetically Engineered Animals

Containing Heritable rDNA Constructs

Draft Guidance

U.S. Department of Health and Human Services

Food and Drug Administration

Center for Veterinary Medicine (CVM)

September 18, 2008

Za GS živali je po ameriški zakonodaji pred dajanjem na trg treba dobiti dovoljenje.

Trenutno razvijajo živali za naslednje namene uporabe:

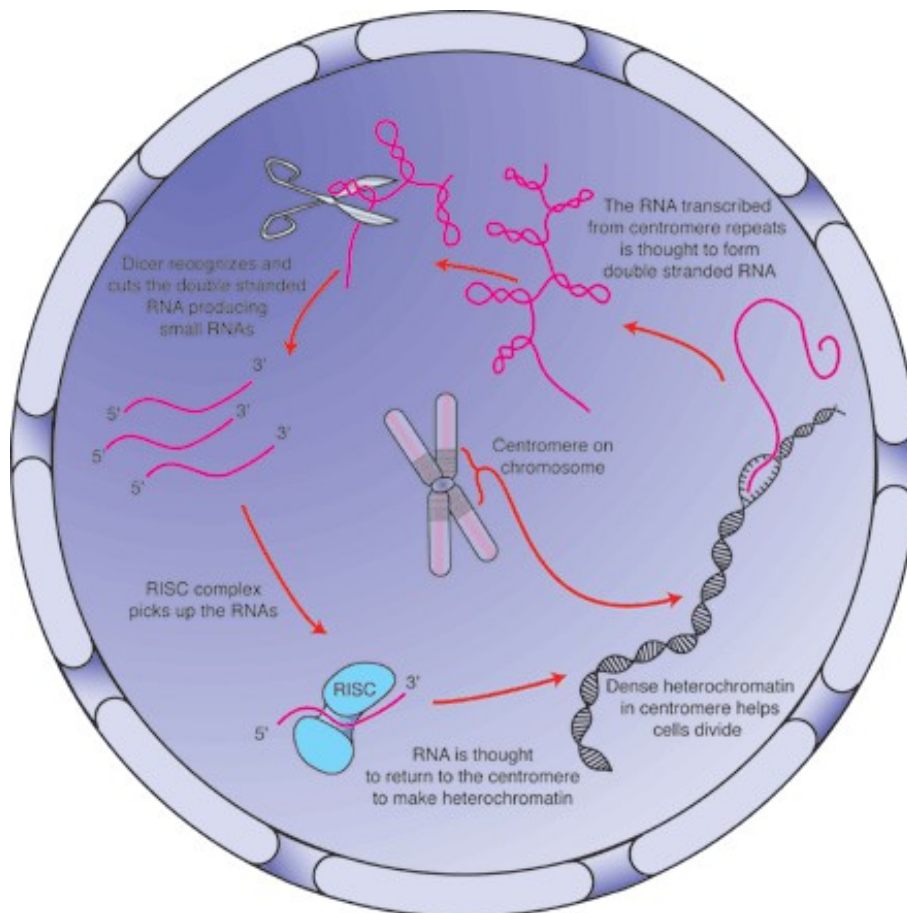
- izboljšana kakovost hrane
- boljše okoljske lastnosti (manjša obremenitev z odpadki, hitrejša rast)
- boljše zdravstveno stanje živali (odpornost proti boleznim)
- izdelki za zdravljenje človeka (zdravila ali nadomestni organi)
- prijaznejša interakcija živali s človekom (hipoalergene mačke)
- modeli za bolezni človeka
- proizvodnja industrijskih ali potrošnih izdelkov (biovlakna)

male RNA (small RNAs)

BREAKTHROUGH OF THE YEAR 2002: Small RNAs Make Big Splash
(Science, 20.12.2002)

miRNA, siRNA: uravnavačo izražanje genov;

siRNA lahko uporabimo za utišanje genov namesto izbivanja genov.

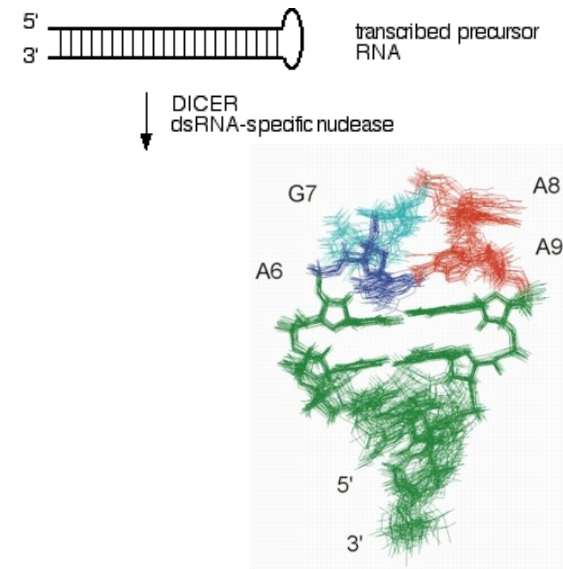
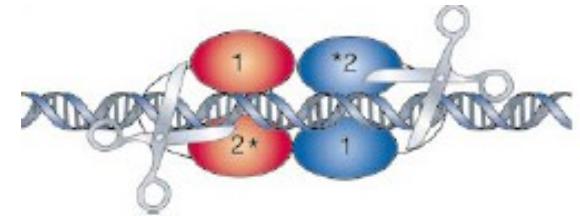


Nastanek siRNA v celici

Dicer-encimov je več vrst. Po njihovem delovanju nastaneta dve vrsti siRNA: kratke (~21 nt) in dolge (~25 nt). Kratke siRNA naj bi sodelovale pri razgradnji mRNA, dolge siRNA pa pri sistemskem utišanju in metilaciji DNA.

Razen siRNA pa nastajajo po delovanju encima dicer še drugi tipi RNA, kakršni sta nekodirajoči mali RNA *let-7* in *lin-4*. Skupno ime za te preostale ss produkte je mikro-RNA (miRNA). Njihova naloga je, da se vežejo na 3'-UTR tarčne mRNA (prileganje ni popolno) in s tem uravnavajo izražanje genov na ravni sinteze proteinov.

miRNA nastajajo po posttranskripcijskem procesiranju ~70 bp dolgih prekurzorjev, ki imajo strukturo steblo-zanka. Nastale miRNA so dolge ~21 nt.



Animacija QT: rnai_Nature_500x280

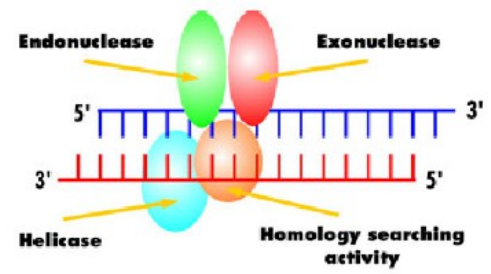
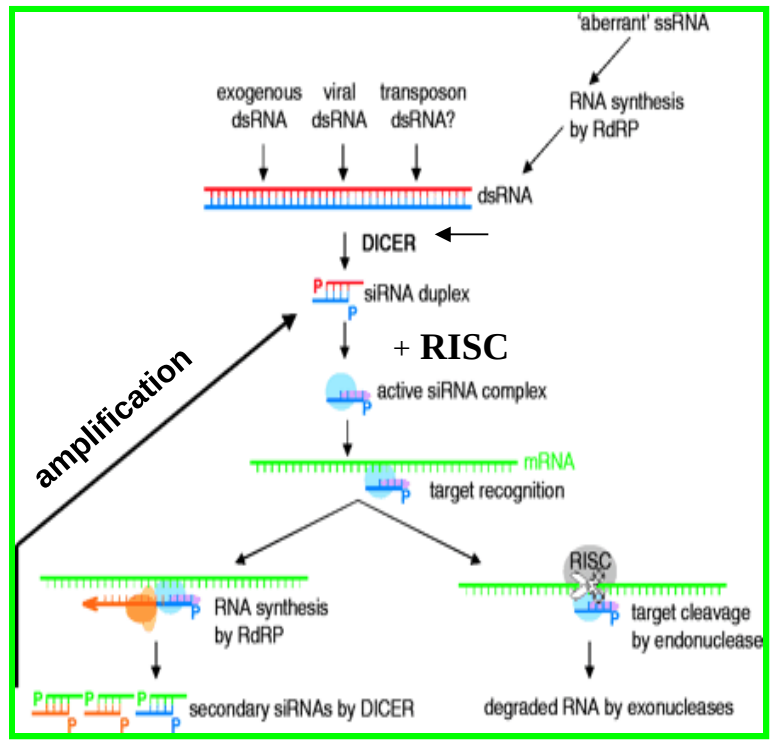
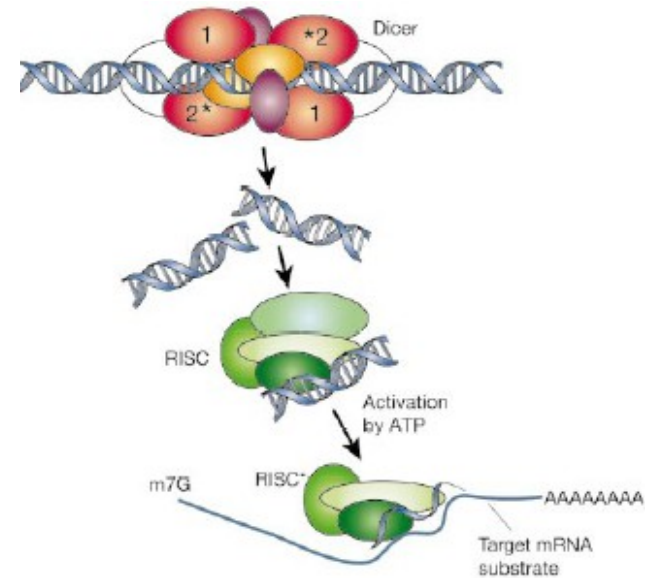
<http://www.nature.com//focus/rnai/animations/>

Delovanje z RNA-induciranega utiševalnega kompleksa (RISC)

RISC je encimski kompleks (~500 kDa), ki vključuje siRNA, RNazo idr.

ds siRNA se znotraj kompleksa razvije v ss obliko in nato veže na (komplementarno) tarčno zaporedje, ki ga cepi 12 nt od 3'-konca siRNA.

Mehanizem ni povsem jasen. V celici se utišanje, ki je posledica siRNA, ojača in širi na sosednje celice.



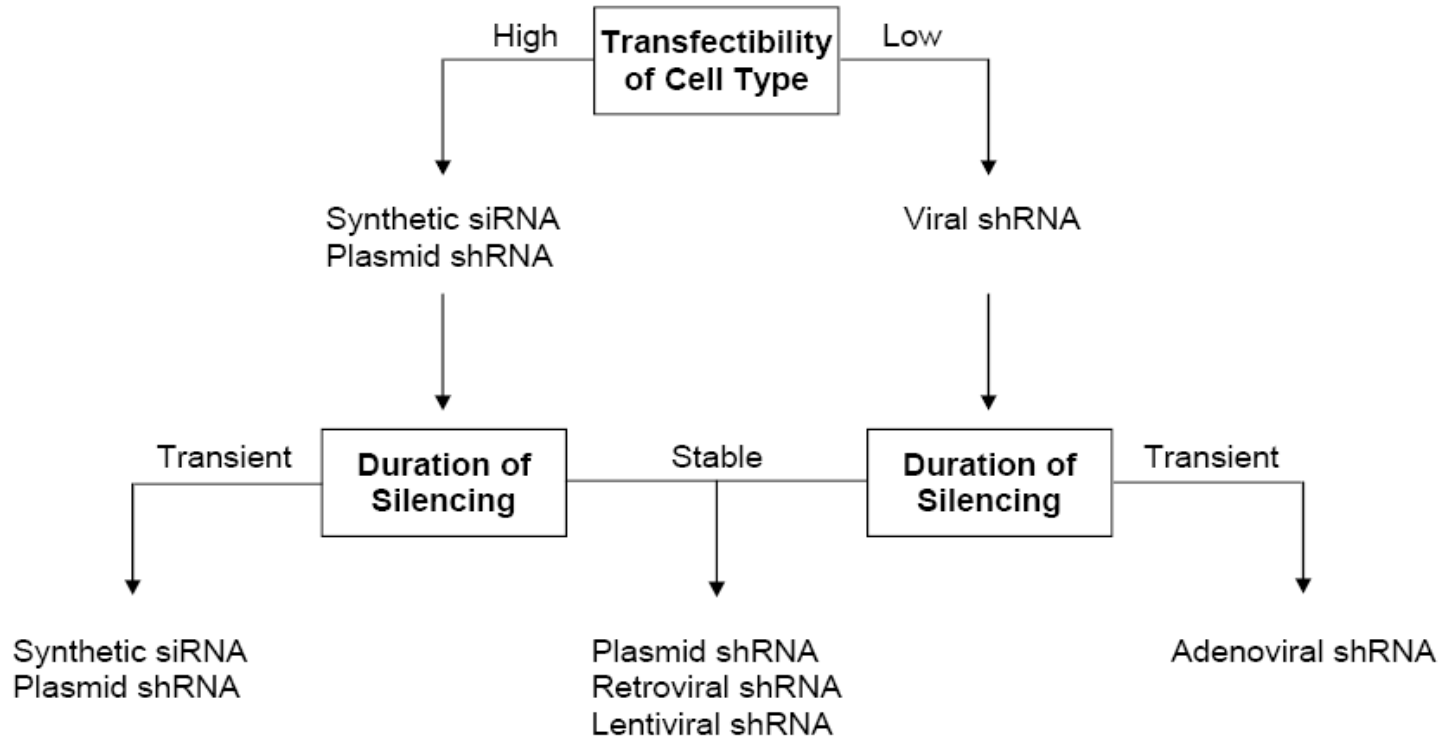


Figure 1. Selection of targeting molecules and delivery methods for mammalian RNA interference (RNAi). siRNA, small interfering RNA; shRNA, short hairpin RNA.

Mammalian RNAi: a practical guide

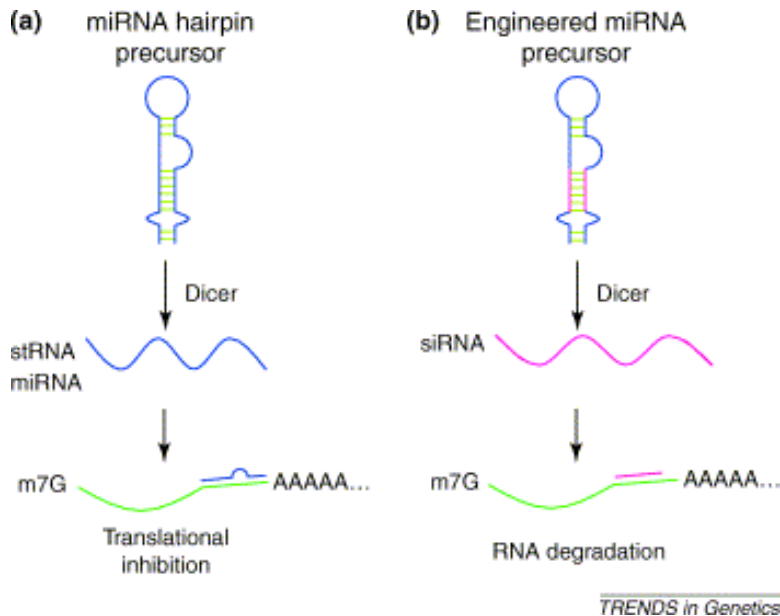
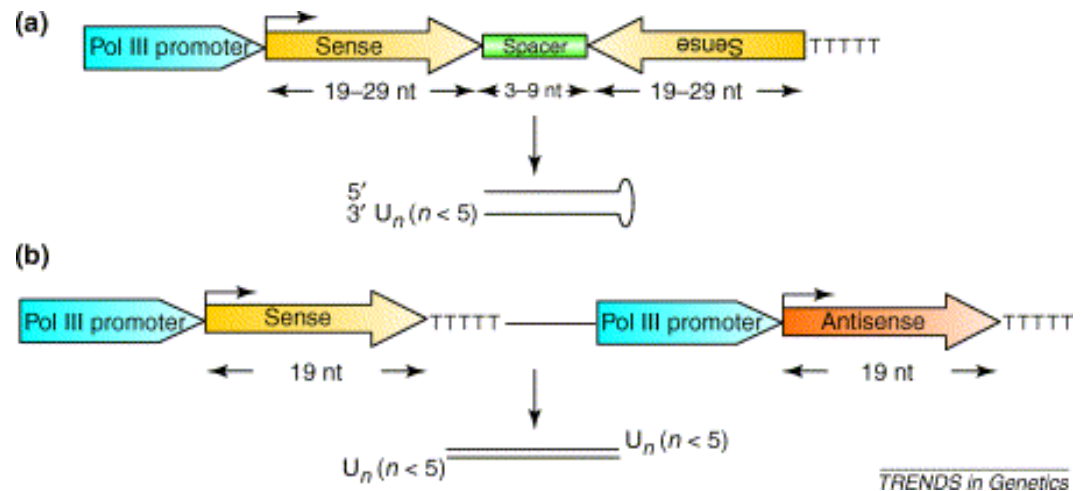
Peter Sandy, Andrea Ventura, and Tyler Jacks

BioTechniques 39:215-224 (August 2005)

Vektorski konstrukti za RNAi

Konstrukta z enim (a) in z dvema (b) promotorjema.

Posamezen motiv je dolg 19 nt –29 nt in ustreza kodirajoči regiji tarčnega gena. Distančnik je dolg 3-9 nt, na 3'-koncu pa dodamo še terminacijski signal (5T).

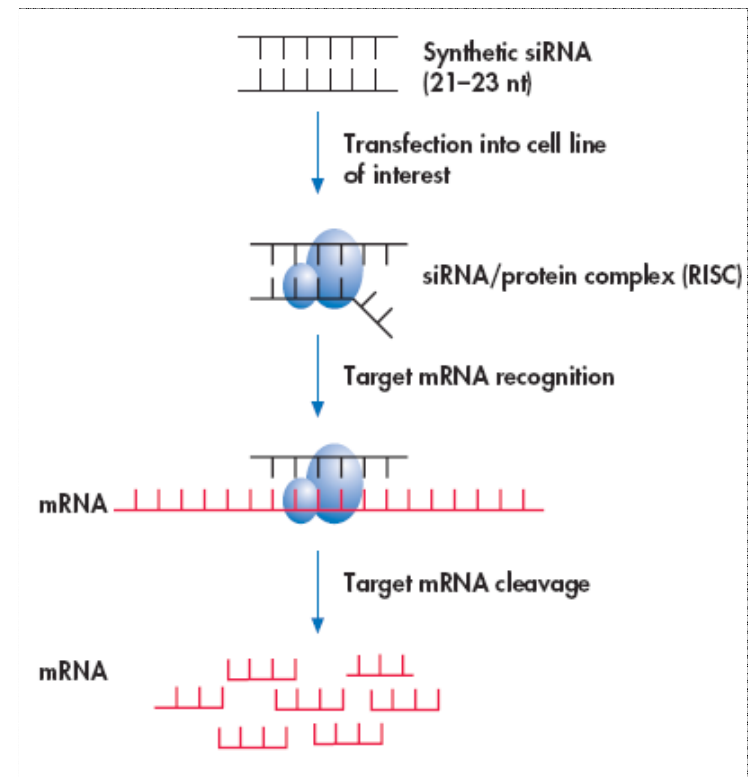
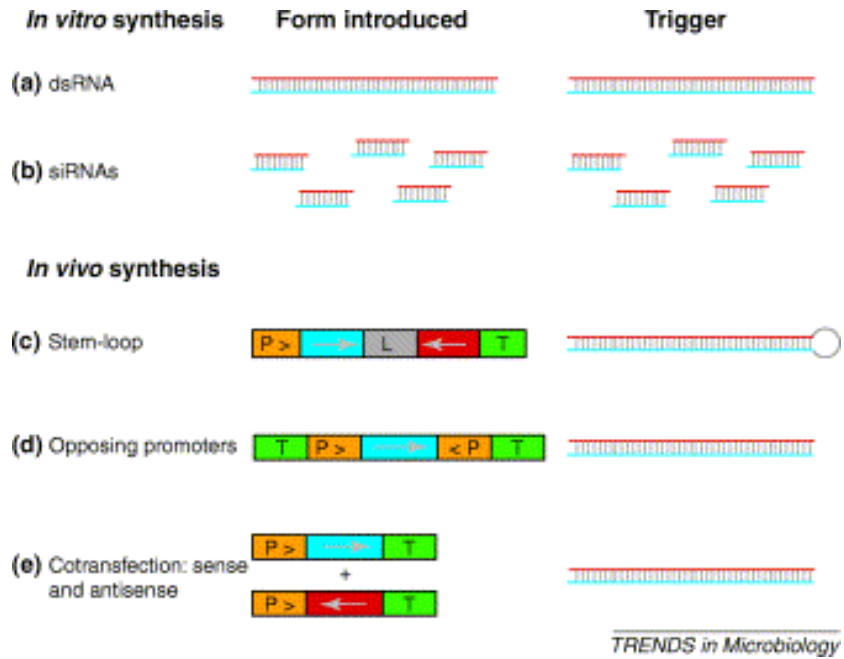


Naravna in umetna miRNA, ki lahko deluje kot siRNA.

(a) Naravna zaporedja so lasnične strukture, dolge ~70 nt, ki jih encim 'dicer' pretvori v ss miRNA. Na tarčna zaporedja se vežejo nepopolno in uravnavajo njihovo izražanje preko inhibicije translacije.

(b) Načrtovana umetna zaporedja so v celoti komplementarna tarčnim in povzročijo razgradnjo RNA.

Viri ds RNA za RNAi



Trends in Microbiology, 11 (1), 37-43 (2003)

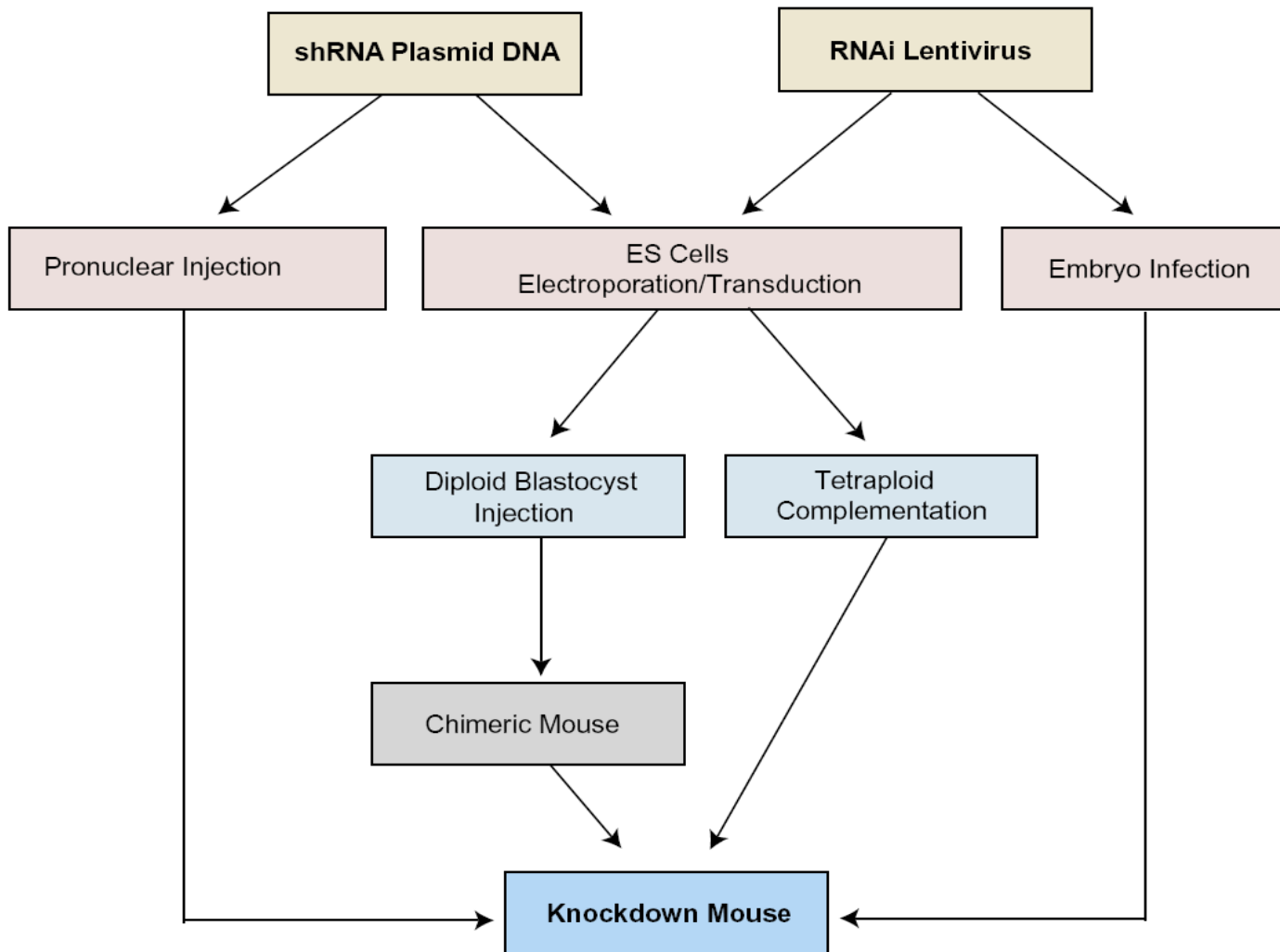


Figure 4. Generation of knockdown mice by various transgenic approaches. The fastest method is infection of single-cell embryos with high-titer lentiviruses. The advantage of using embryonic stem (ES) cells is that copy number and expression of the integrated short hairpin RNA (shRNA) can be monitored before blastocyst injection. RNAi, RNA interference.