

Transgenní zvířata – jejich příprava a použití

Jiří K a ň k a

Ústav živočišné fyziologie a genetiky
Akademie věd České republiky
Rumburská 89
277 21 Liběchov

tel.: 315 639551

fax.: 315 697186

e-mail : kanka@iapg.cas.cz

Geneticky modifikovaný organizmus (GMO) je organizmus, jehož genetický materiál byl změněn metodikami genetického inženýrství.

Transgenní organizmus je takový GMO, který má vloženu DNA, pocházející z jiného druhu.

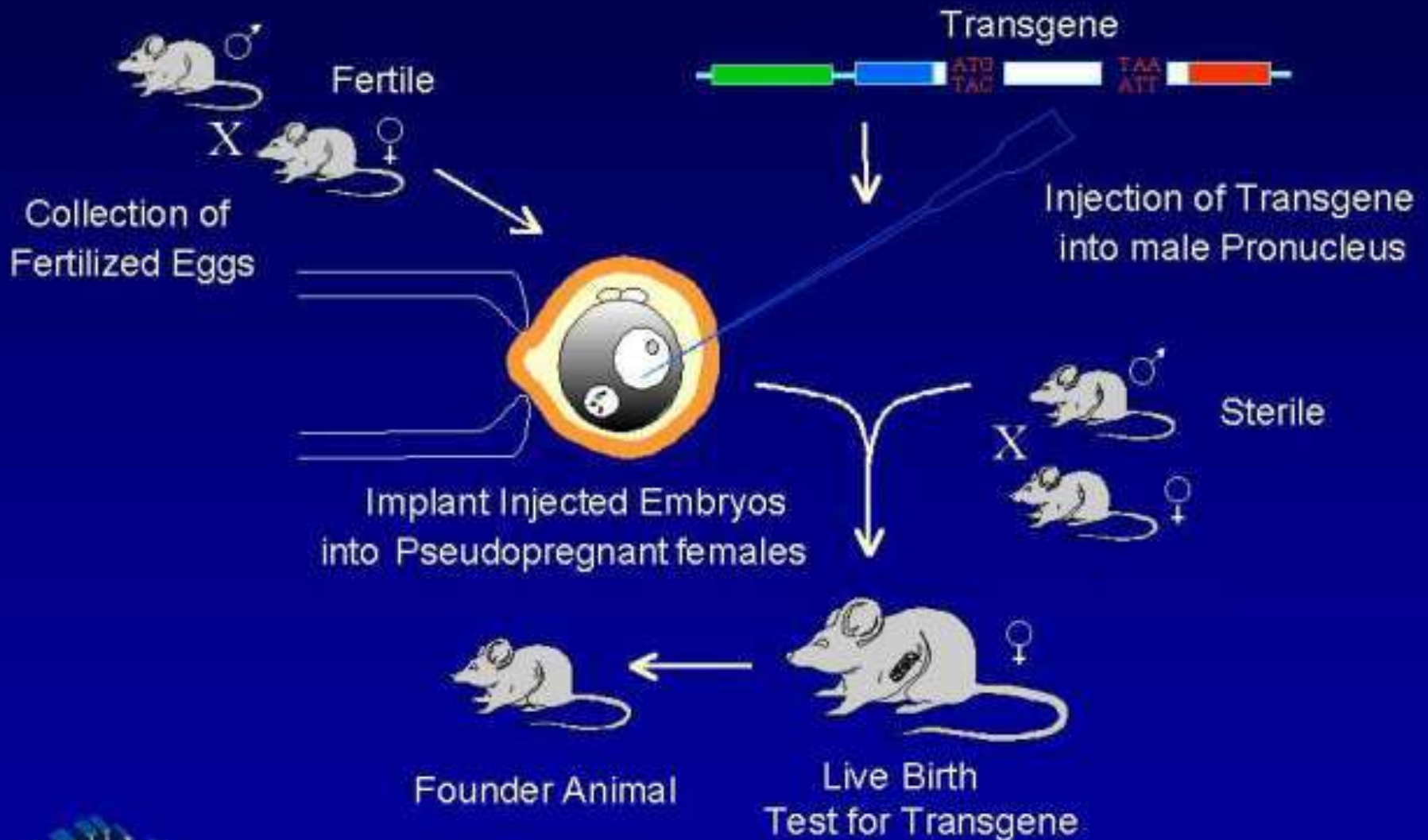
Tabulka 1. Důležité milníky transgenních technologií

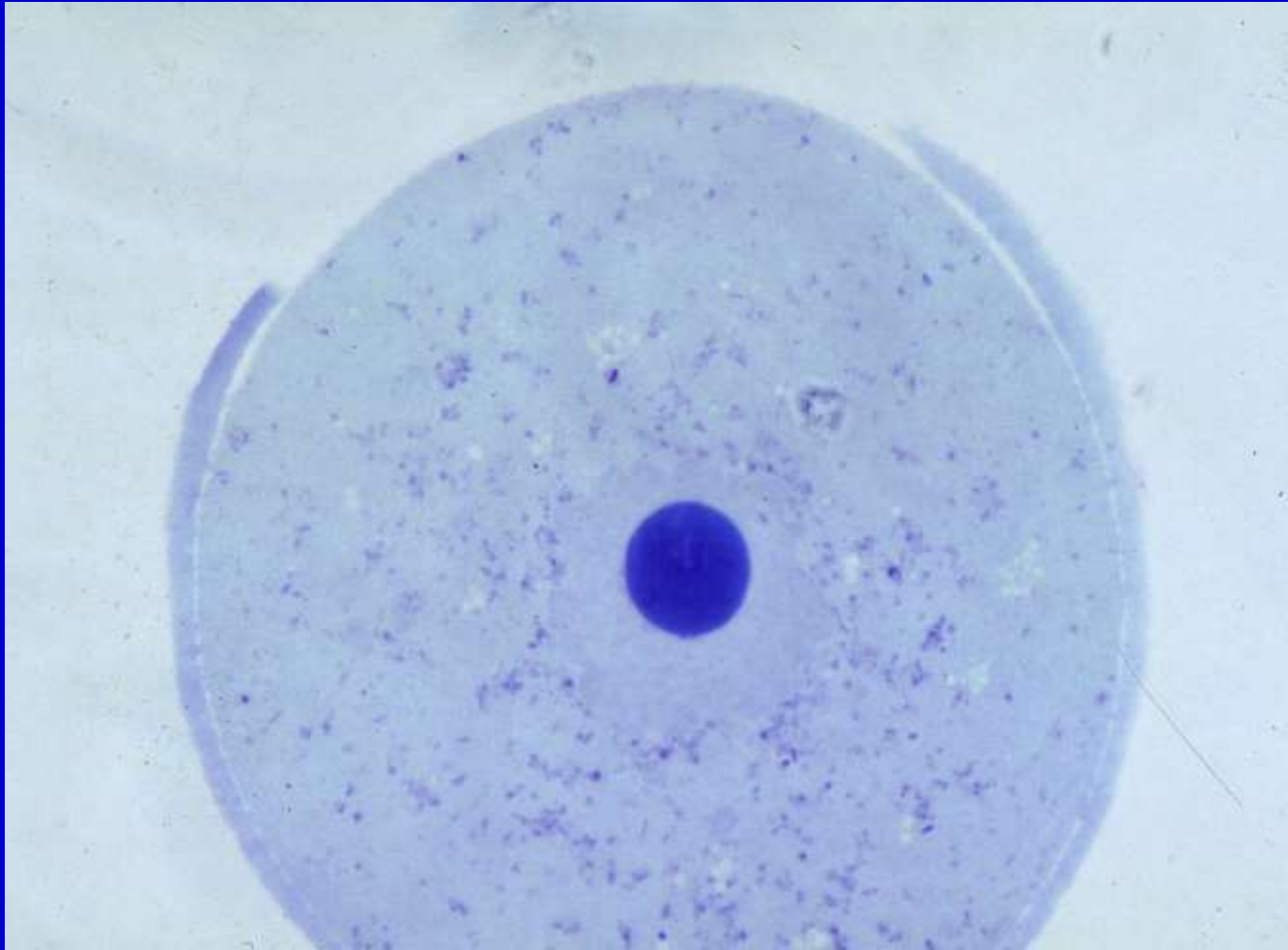
Rok	Událost	Reference
1974	Tvorba transgenní myši injekcí virové DNA do blastocysty	Jaenisch, 1974
1980	Tvorba transgenní myši injekcí DNA do pronukleu zygoty	Gordon a kol., 1980
1981	Ustavení embryonálních kmenových buněk myši	Evans a Kaufman, 1981
1982	Transgenní myš, exprese lidského růstového hormonu	Palmiter a kol., 1982
1985	Transgenní králíci, ovce a prase injekcí do pronukleu	Hammer a kol., 1985
1987	Homologní rekombinace u embryonálních kmenových buněk	Thomas a Capecchi, 1987
1989	Gene targeting u myši	Thompson a kol., 1989
1991	Transgenní skot, transgenní ovce	Krimpenfort a kol., 1991 Wright a kol., 1991
1997	Narození ovce Dolly	Wilmut a kol., 1997
1998	Transgenní skot pomocí přenosu jader	Cibelli a kol., 1998
2003	Transgenní skot se změněným složením mléka Inaktivace genu u prasete	Brophy a kol., 2003 Phelps a kol., 2003
2005	Transgenní skot rezistentní k bakteriální infekci (mastitis)	Wall a kol., 2005
2006	Komerční využití rekombinantního antithrombinu III (ATryn)	Niemann, Kues, 2007

Příprava transgenních zvířat:

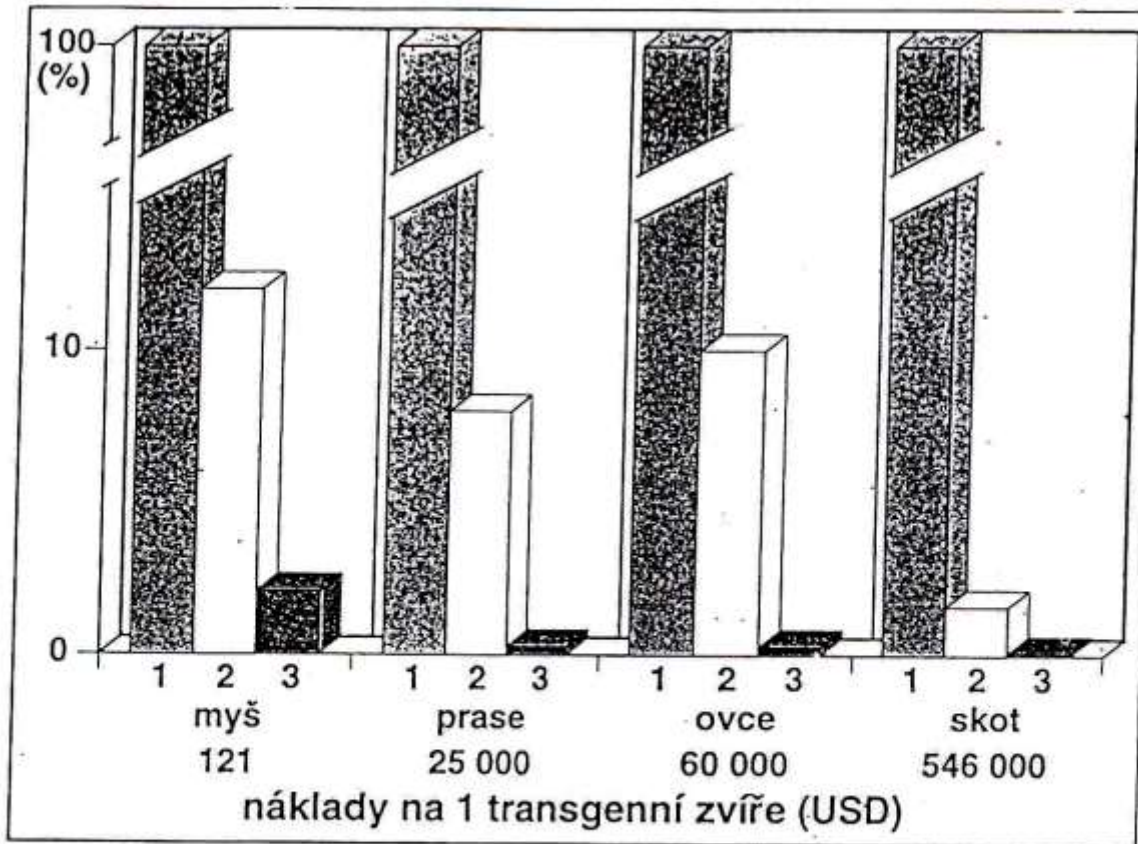
- 1) Injikace DNA do jednobuněčného embrya
(*Gordon et al., 1980*)
- 2) Embryonální kmenové buňky
- 3) Klonování
- 4) RNA interference
- 5) Lentivirové vektory

CONSTRUCTION OF A TRANSGENIC MOUSE



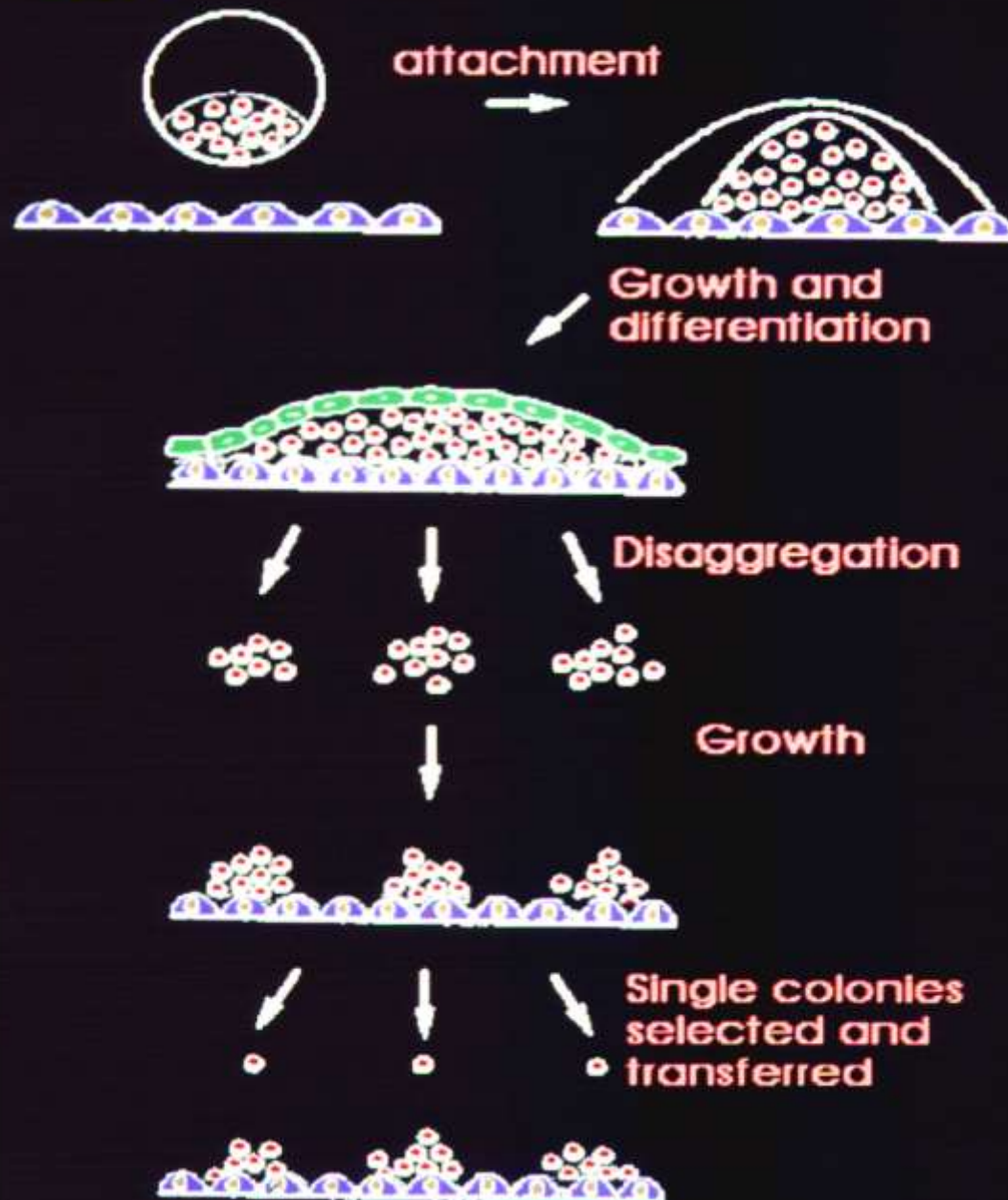


Efektivnost tvorby transgenních zvířat

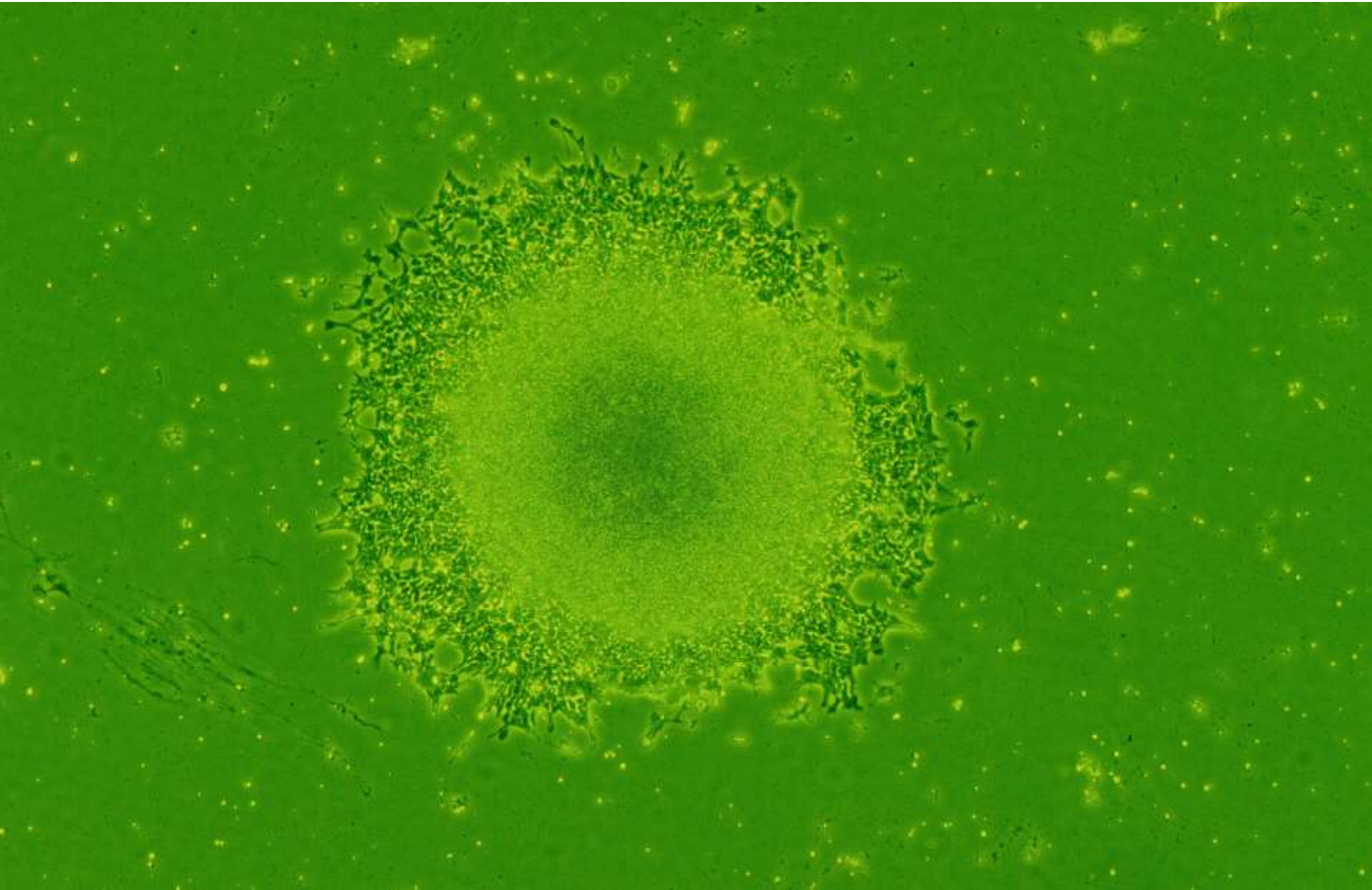


Srovnání efektivnosti tvorby transgenních zvířat včetně nákladů s ní spojených. 1 – oocyty s konstruktem, 2 – narození potomci, 3 – transgenní potomci.

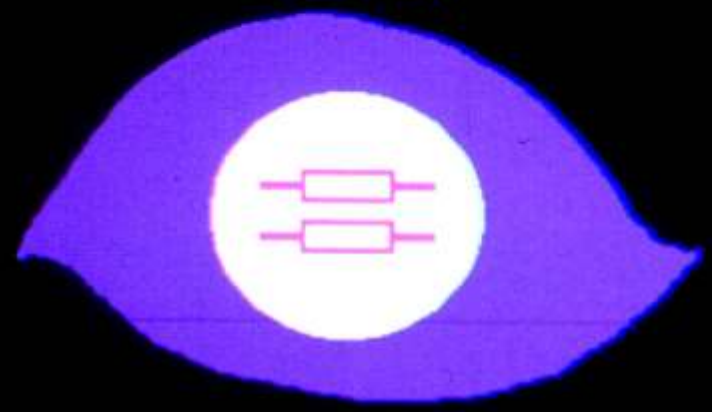
Isolation of embryo-derived stem cells



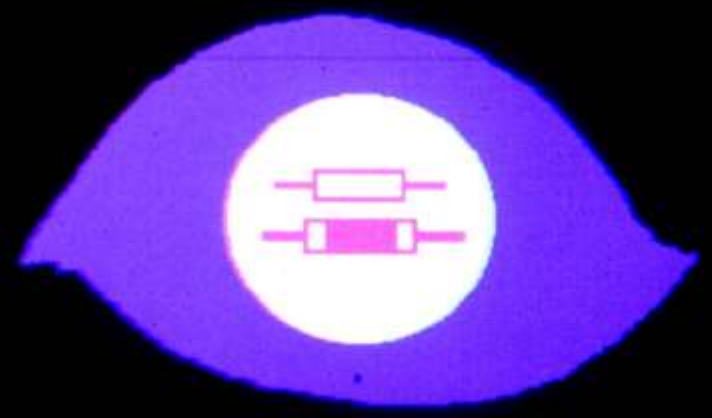
Embryonální kmenové buňky myši



ES cell

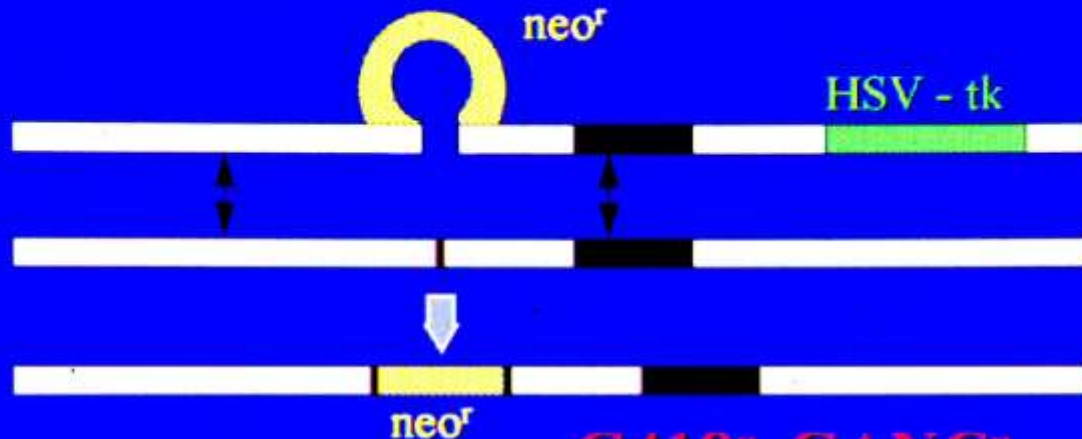


+

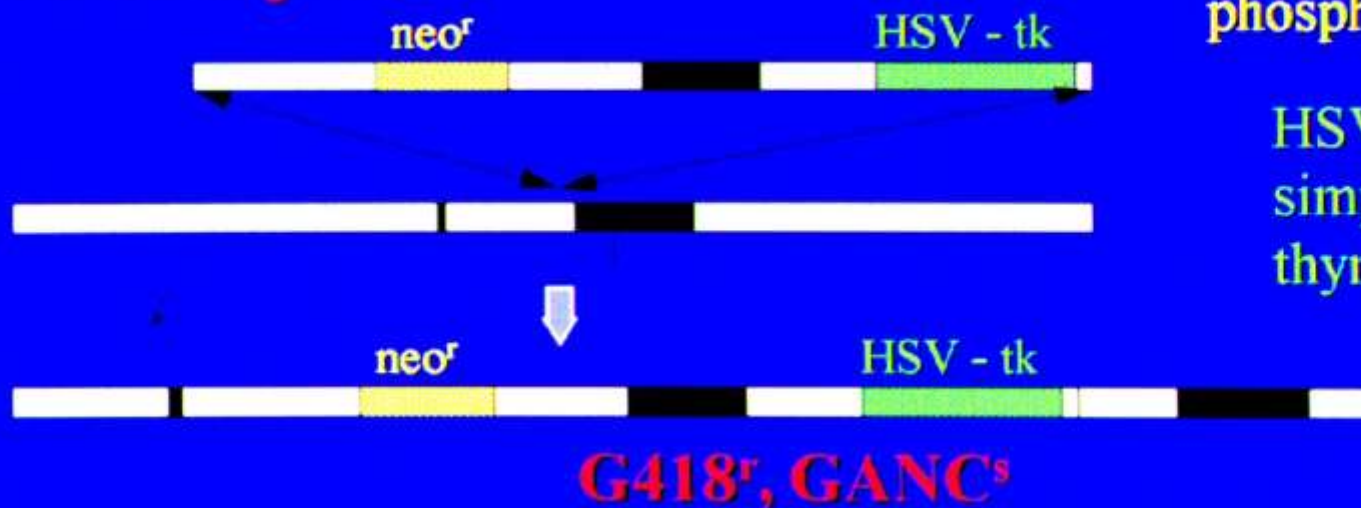


POSITIVE - NEGATIVE SELECTION

A/ Gene Targeting



B/ Random Integration



M. Capecchi,
K. Thomas

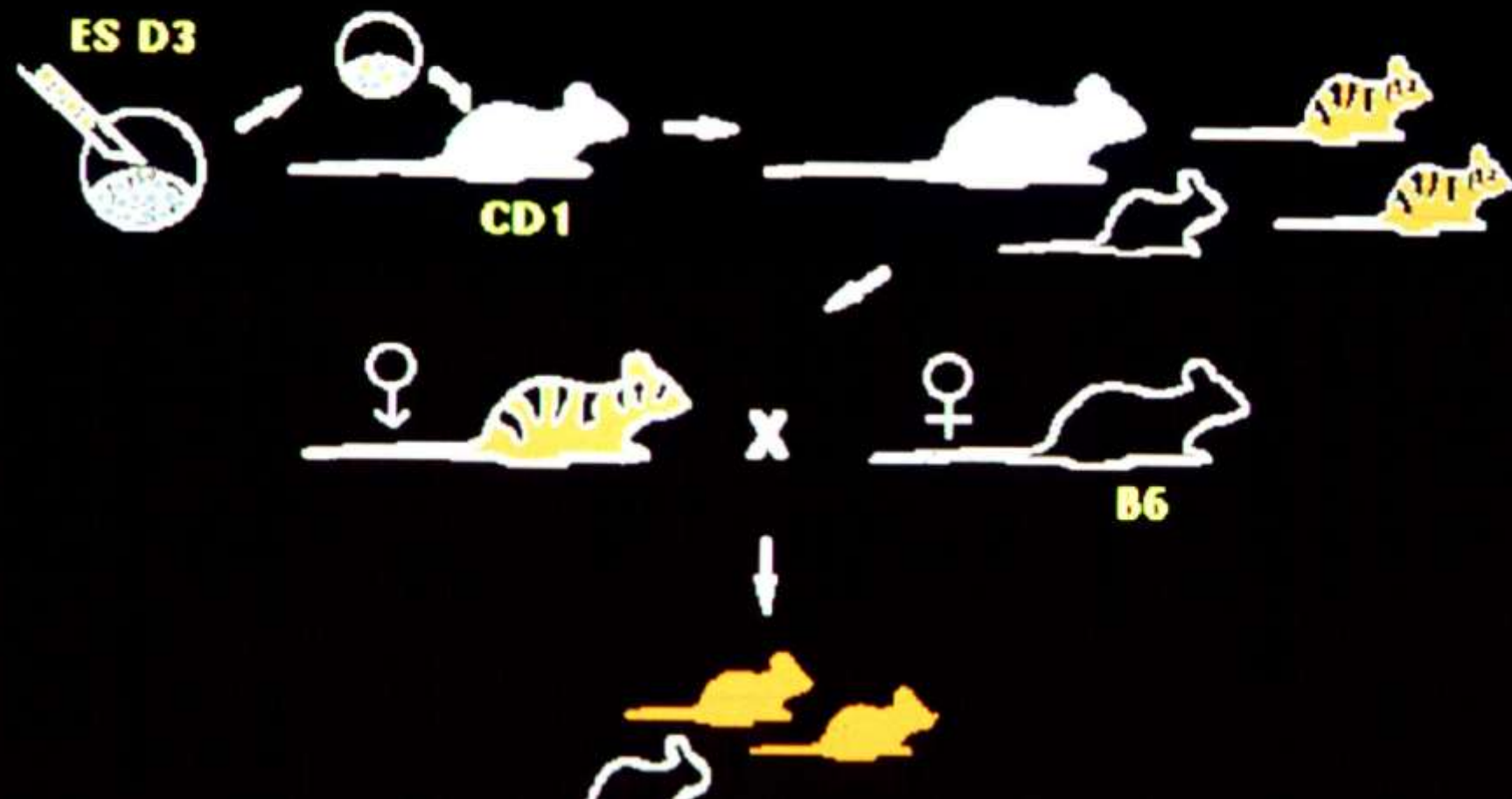
neo - neomycin-
phosphotransferase

HSV-tk - Herpes
simplex virus
thymidine kinase

G418^r, GANC^r

G418^r, GANC^s

Generation of mouse germ-line chimeras



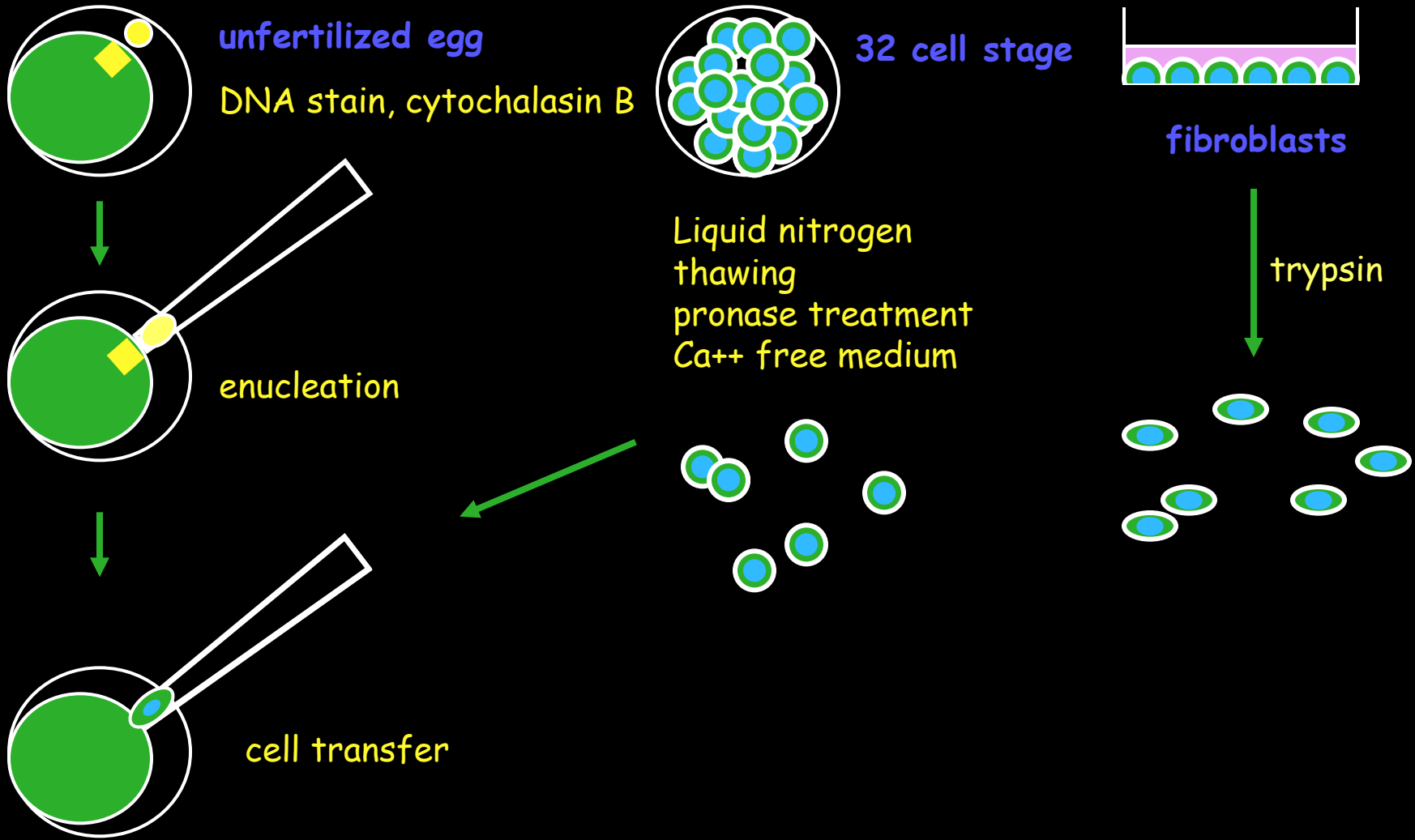


1996 - narodila se ovce Dolly, první savec klonovaný ze somatických buněk dospělého jedince

Wilmut, I./Schnieke, A.E./McWhir, J./Kind, A.J./Campbell, K.H.S.,
Nature, 1997



NUCLEAR TRANSFER



Electrofusion, in vitro cultivation

Aplikace – základní výzkum,
biomedicínský výzkum
zemědělství
produkce farmaceuticky zajímavých látek
(pharming)

1999 - Genzyme Transgenics oznamuje narození kozy, klonované ze somatických buněk, transgenních pro recombinant human antithrombin III.



Březen 2000 - PPL Therapeutics oznamuje narození 5 selat, klonovaných ze somatických buněk.

Millie, Christa, Alexis, Carrel and Dotcom, the first cloned pigs



August 22, 2002

PPL Therapeutics

Double knock-out pigs

Alpha 1,3 galactose



Odhadovaný počet transgenních zvířat, potřebných k uspokojení roční celosvětové potřeby vybraných farmaceutických látek

Species	Pharmaceutical					
	F-VIII	F-IX	Protein C	AT III	Fibrinogen	Albumin ^c
Rat	345	4,454	11 x 10 ³	24 x 10 ³	171 x 10 ³	358 x 10 ⁶
Rabbit	217	2,857	7,143	15,000	107 x 10 ³	225 x 10 ⁶
Pig	2	15	38	81	577	1212 x 10 ⁶
Goat	1	3	6	12	83	175,000
Sheep	1	1	3	6	45	93,000
Cattle	1	1	2	3	17	35,000

Tabulka 2. Lidské proteiny sekretované mléčnou žlázou transgenních hospodářských zvířat

Protein	Druh	Aplikace	Společnost	Reference
Antithrombin III	Koza	Thrombosis, pulmonary embolism	GTC Biotherapeutics (USA)	Ebert a kol., 1991 Denman a kol., 1991
tPA	Koza	Thrombosis	PPL Therapeutics (UK)	Ebert a kol., 1994
α -antitrypsin	Ovce	Emphysema and cirrhosis	PPL Therapeutics (UK)	Wright a kol., 1991
Factor IX	Ovce	Hemophilia b	PPL Therapeutics (UK)	Schnieke a kol., 1997
Factor VIII	Ovce	Hemophilia a	PPL Therapeutics (UK)	Paleyanda a kol., 1997, Niemann a kol., 1999
Polyclonal antibodies	Skot	Vaccines	Hematech (USA)	Kuroiwa a kol., 2004
Lactoferrin	Skot	Bactericide	Pharming Group (NED)	Van Berkel a kol., 2002
C1 inhibitor	Králík	Hereditary angioedema	Pharming Group (NED)	Van Doorn a kol., 2005
Calcitonin	Králík	Osteoporosis and hypercalcemia	PPL Therapeutics (UK)	McKee a kol., 1998

Table 1

Overview of the genes in GM farm animals and fish used in food production.

Species	Target trait	Transgenic gene	Origin of the gene	Reference	
Swine	Growth	GH cSKI	Human Chicken	Nottle et al. (1999) Pursel et al. (1992)	
	Milk	α -Lactalbumin Bacteria resistance	Bovine Mouse	Bleck et al. (1998), Wheeler et al. (2001) Lo et al. (1991)	
	Health	Lysozyme Unsat. fatty acid Omega-3	Human Spinach Nematode	Tong et al. (2011) Saeki et al. (2004) Lai et al. (2006)	
	Feed eff.	Phytase	Bacterium	Forsberg et al. (2006), Phillips et al. (2006)	
Sheep	Growth	IGF-1	Ovine	Damak et al. (1996)	
	Health	Visna virus resistance BSE Bacteria resistance	Virus Deletion Mouse	Clements et al. (1994) Denning et al. (2001) Lo et al. (1991)	
	Goat	Health	Lysozyme	Bovine	Scharfen et al. (2007)
Goat	Udder	Monosat. fatty acid	Bovine	Reh et al. (2004)	
	Chicken	Health	Leukosis resistance H5N1 resistance IacZ	Virus Virus Bacteria	Salter and Crittenden (1989) Lyll et al. (2011) Mozdziak et al. (2003)
Cattle		Growth	GH	Bovine	Chen et al. (1990)
		Health	Lysozyme BSE	Human Knockout	Yang et al. (2011) Richt et al. (2007)
	Udder	Omega-3 α and κ -Casein Antimicrobial	Nematode Bovine Bacteria	Wu et al. (2012) Brophy et al. (2003) Wall et al. (2005)	
Fish	Growth	GH	Fish	Du et al. (1992)	
		Follistatin	Fish	Medeiros et al. (2009)	
	Health	Cecropin Lactoferrin Lysozyme	Insect Human Fish	Dunham et al. (2002) Mao et al. (2004) Fletcher et al. (2011)	
		Envir. tolerance	Antifreeze GH	Fish Fish	Hew et al. (1999) Saunders et al. (1998)

Huntingtonova choroba

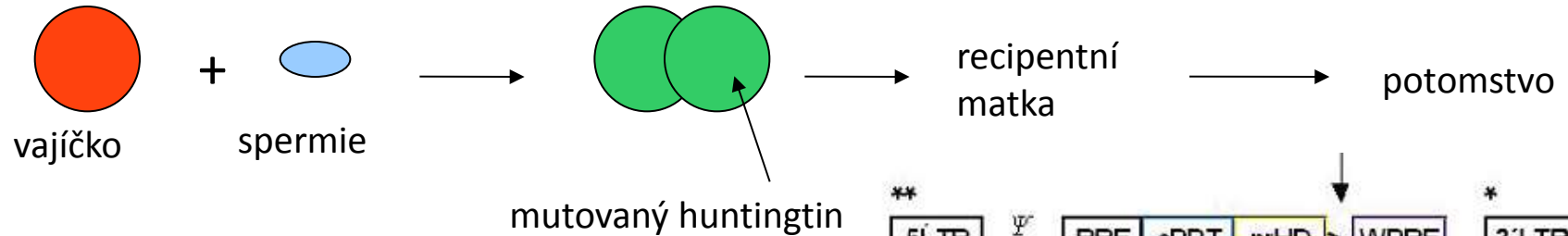
- autozomálně-dominantní dědičné neurodegenerativní onemocnění
- prevalence
- dědičnost
 - 3 až 7 z 100 000 obyvatel ze západní Evropy
- způsoby terapie
 - 50:50
- huntingtin
 - žádné, jenom potlačení symptomů
 - CAG repetice

Transgenní miniaturní prase s Huntingtonovou chorobou

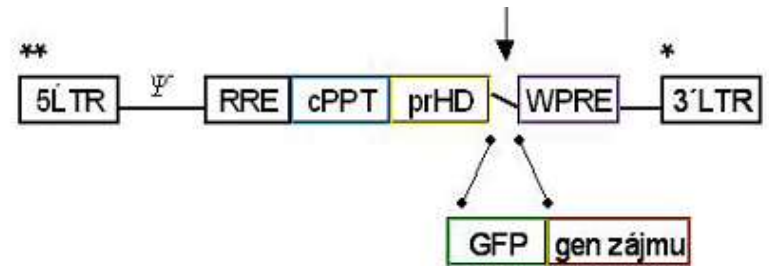
- fáze1: vytvoření transgenního miniaturního prasete s HCH
- fáze2: vytvoření transgenní F1 generace miniaturního prasete s HCH
- fáze3: simulace HCH u miniaturního prasete

Fáze 1: Transgenní miniaturní prase s HCH

Postup:



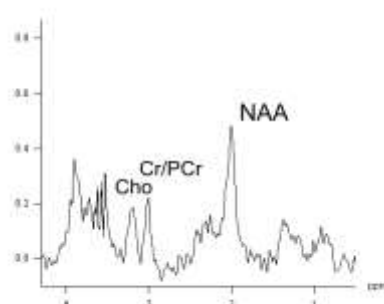
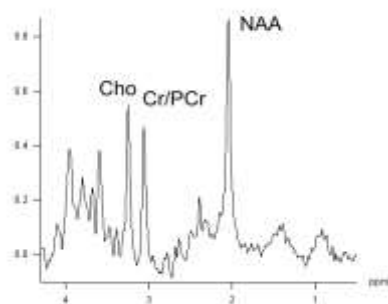
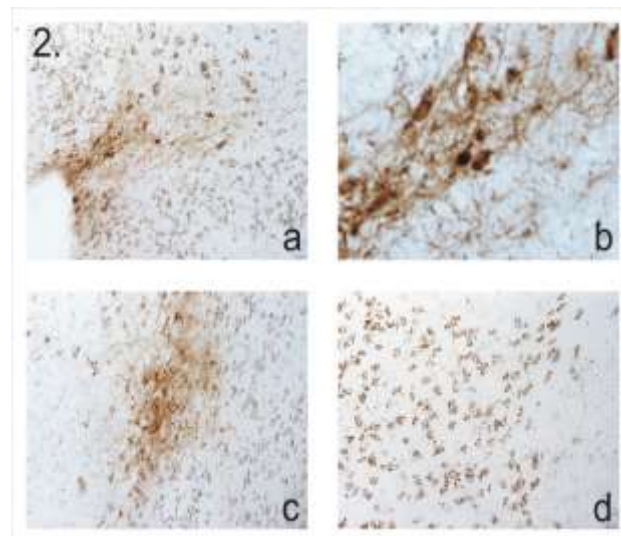
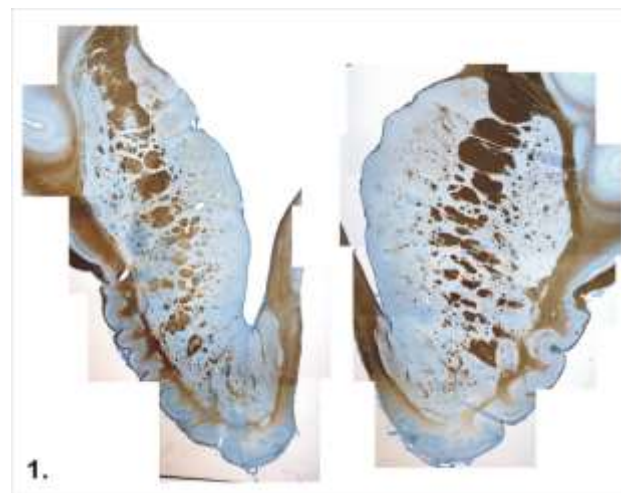
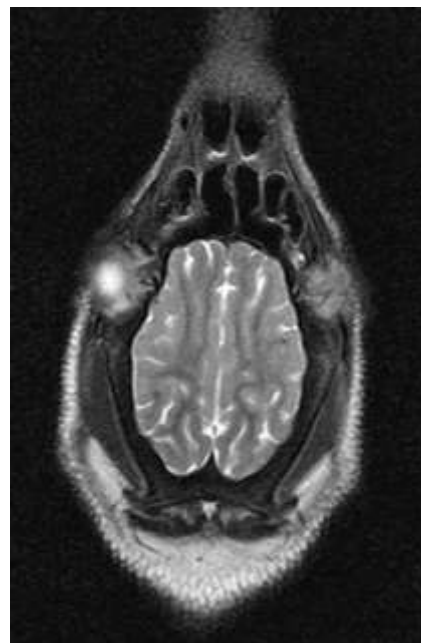
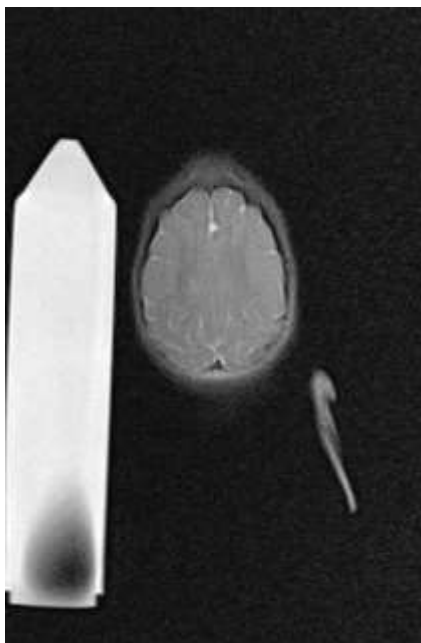
- behaviorální studie
- neuropatologie mozku



Fáze 3: Simulace HCH u miniaturního prasete

■ Postup:

- injekce of AAV nebo LV konstruktů s mutovaným huntingtinem do mozku



Gilbert – Developmental Biology, 6. vydání

Genes and Development, p. 79-107

The genetic core of development, p. 109-132

Fertilization, p. 185-212

Early mammalian development, p. 354-360

The saga of germ line, p. 585-616



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TERAMO

Dipartimento di
Scienze Biomediche Comparate

PIANO RIALZATO

- FISIOLOGIA
- BIOCHIMICA E
BIOLOGIA MOLECOLARE

PIANO SEMINTERRATO

- PATOLOGIA GENERALE ED
ANATOMIA PATOLOGICA
VETERINARIA

PIANO PRIMO

- ANATOMIA NORMALE
VETERINARIA
- SEGRETERIA AMMINISTRATIVA

PIANO SECONDO

- MICROBIOLOGIA
- MALATTIE INFETTIVE E
PARASSITARIE

