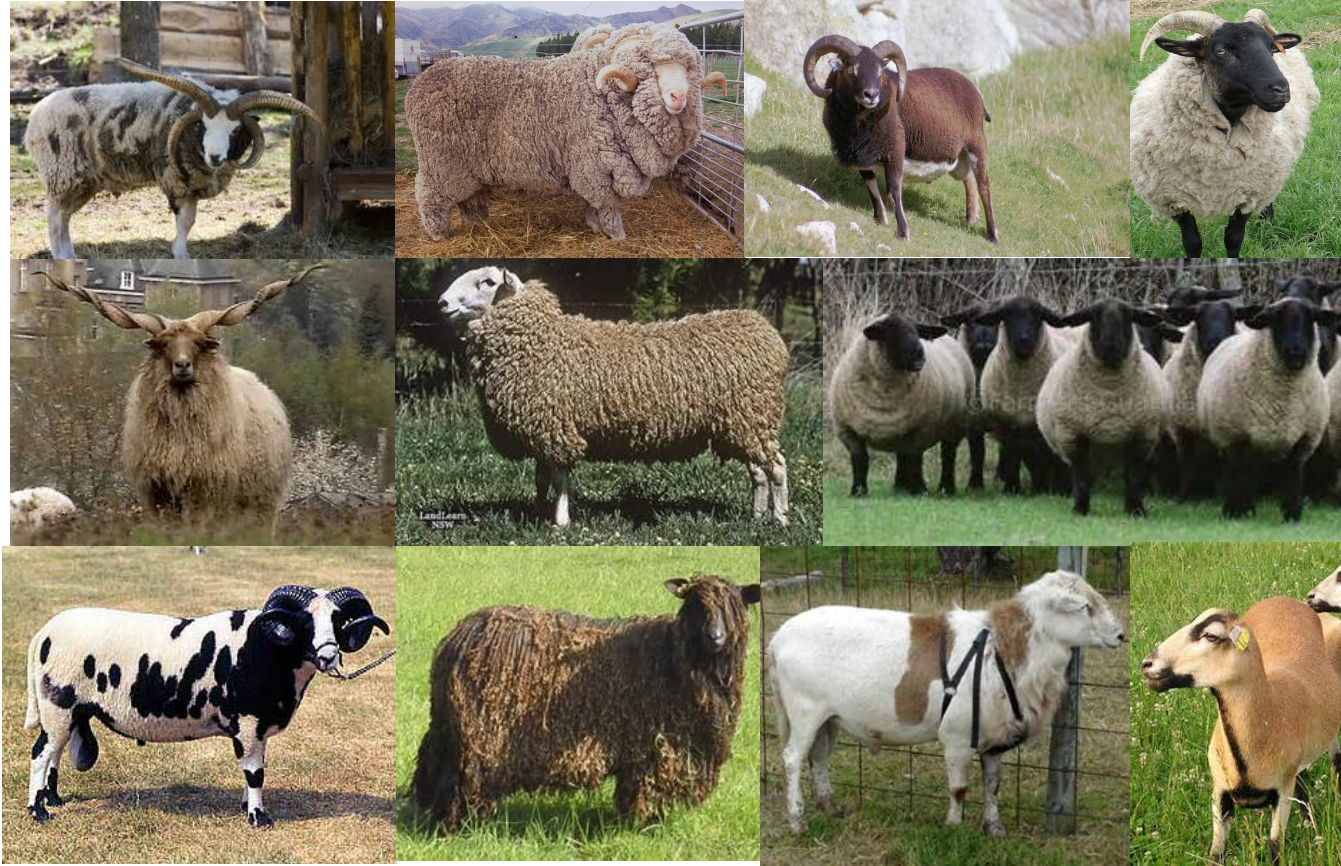
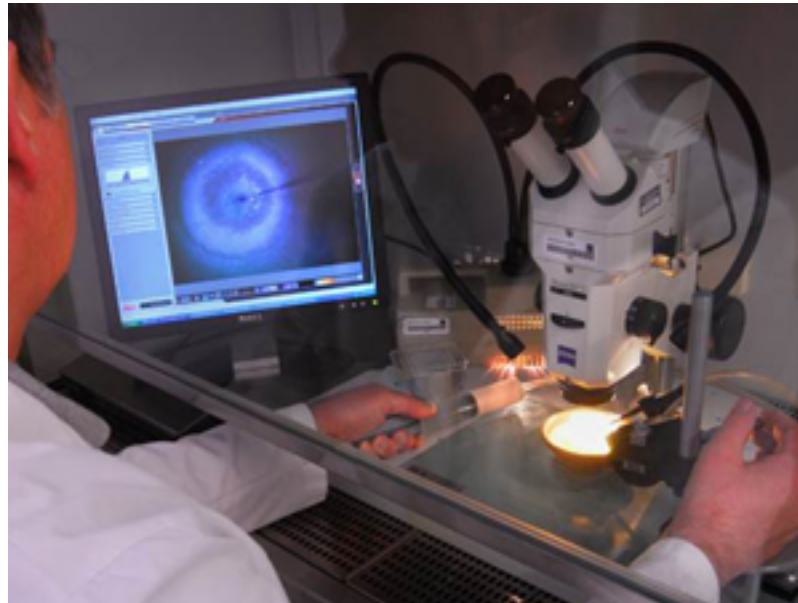
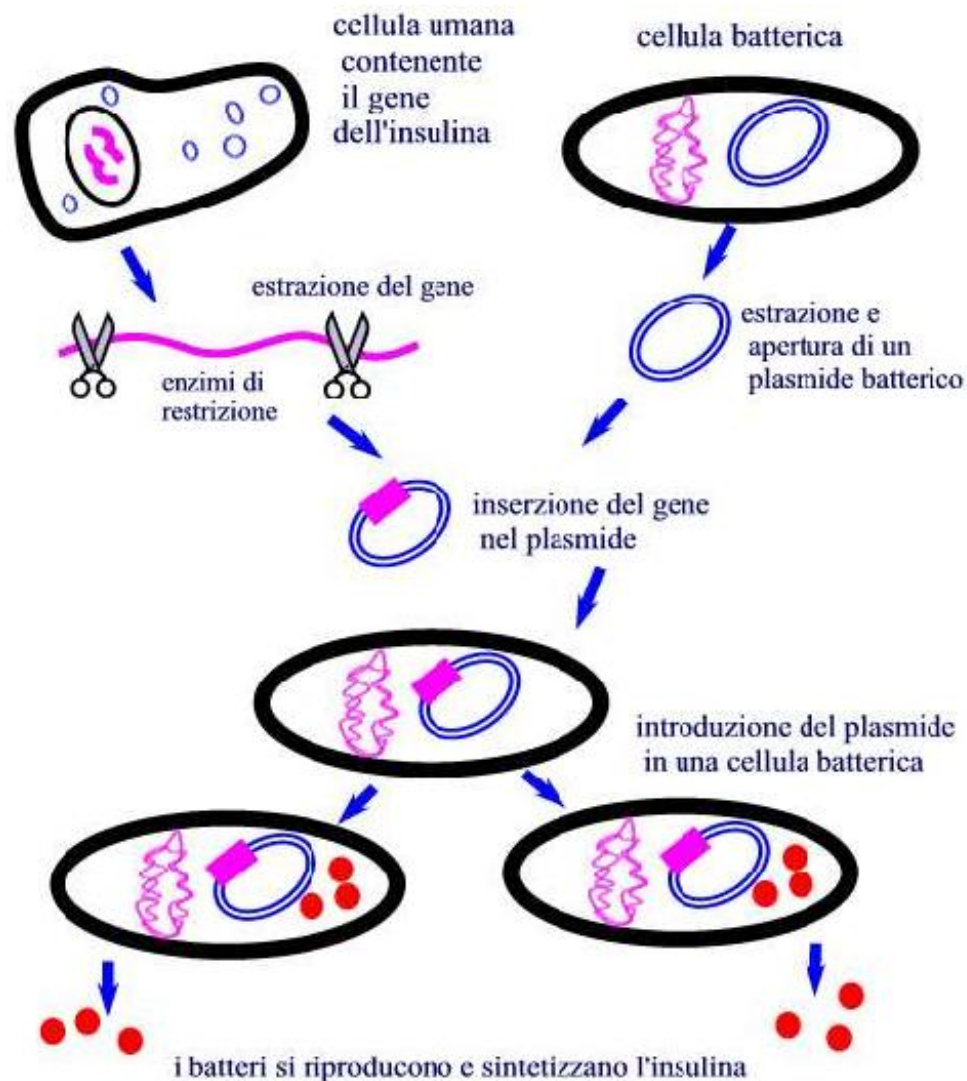


Ingegneria Genetica “Tradizionale”





Ingegneria genetica moderna: “DNA ricombinante”



Tappe fondamentali per lo sviluppo della tecnica del DNA ricombinante

1967:
Scoperta della DNA ligasi

1968:
Scoperta degli enzimi di
restrizione

1972:
Trasferimento di DNA e uso
dei plasmidi

Organismi transgenici ad
oggi:
Batteri, lieviti, insetti, piante,
Pesci, uccelli e mammiferi

Animali transgenici, che cosa sono?

Animali nel cui genoma è stato inserito un gene esogeno,
o depleto/modificato uno endogeno



Perché? Applicazioni

Produzione di peptidi biologicamente attivi Induzione di resistenza alle malattie - prioni-

Organi per xenotrapianti

Produzione di modelli animali di patologie umane

Ricerca di base

Organismi utilizzati come modelli transgenici

Arabidopsis

C. Elegans

Drosophila

Xenopus

Zebrafish

Topo

Ratto

Pecora

Bovino

Capra

Suino

Coniglio

Tipi di transgene

- **Piccole molecole di DNA ricombinante** – geni o cDNA legati a sequenze di DNA che permettono la corretta espressione da parte della cellula ospite
- **Construtti Reporter** – promoter del gene desiderato legato ad una cassetta di espressione la cui presenza può essere facilmente rilevata; es.: GFP, lacZ, luciferasi
- **Grandi molecole di DNA** – yeast artificial chromosomes (YACs) o bacterial artificial chromosomes (BACs)
- **RNAi (RNA Interference)** – ablazione funzionale geni

Cenni storici

Proc. Nat. Acad. Sci. USA

Vol. 71, No. 4, pp. 1250-1254, April 1974

Simian Virus 40 DNA Sequences in DNA of Healthy Adult Mice Derived from Preimplantation Blastocysts Injected with Viral DNA

(blastocyst microinjection *in vitro*/development/DNA reassociation kinetics of simian virus 40)

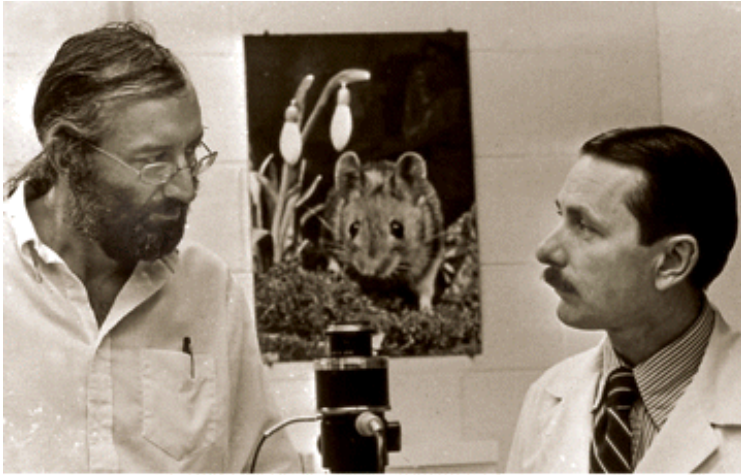
RUDOLF JAENISCH* AND BEATRICE MINTZ†

* Armand Hammer Center for Cancer Biology, Salk Institute for Biological Studies, San Diego, California 92112; and † Institute for Cancer Research, Fox Chase, Philadelphia, Pennsylvania 19111

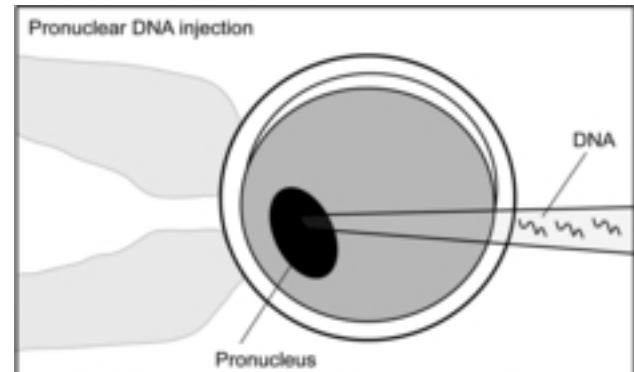
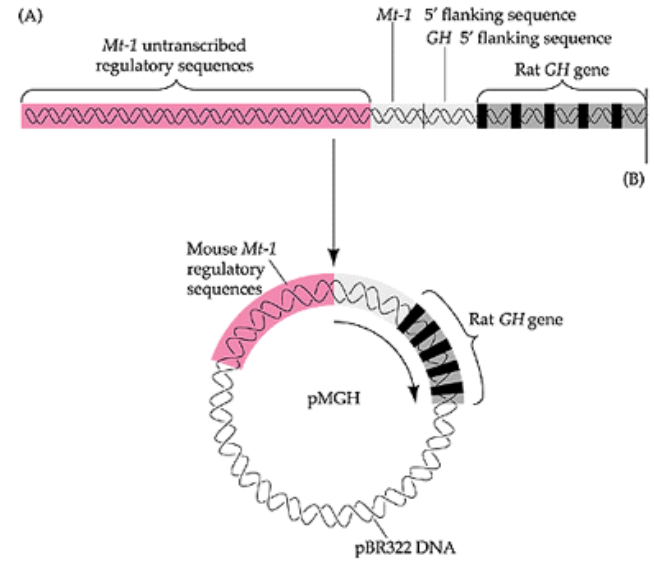
1980: Gordon JW et al.: "Genetic transformation of mouse embryo by microinjection of purified DNA" PNAS 77, 7380-84

1981: Gordon JW and Ruddle FH "Integration and stable germ line transmission of genes injected in mouse pronuclei " Science 214, 1244-46

Palmister & Brinster, 1982



Primi studi



Primi topi transgenici esperimenti il Growth Hormone Di ratto

Fase I: sintesi e preparazione del vettore transgenico

Costruzione del transgene



Amplificazione del transgene



Purificazione del transgene



Produzione di un topo transgenico: Metodologia

Iniettare femmine di topo con PMSG (pregnant Mare Serum Gonadotrophin)
HCG (induce l'ovulazione)

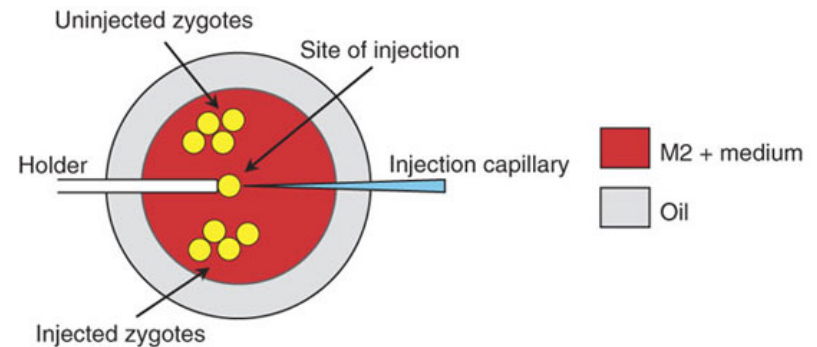
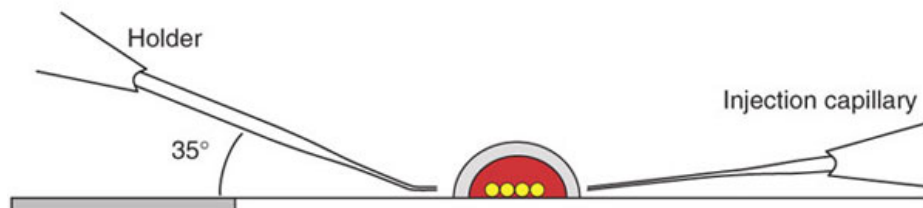
Verificare l'accoppiamento (vaginal plug)

Recuperare gli zigoti allo stadio pronucleare

Iniezione (capillari con filamento interno) pronucleare maschile:
(1/2 picolitri DNA linearizzato: 100/200 copie del gene –Eppendorf Injectman)

Trapianto nella ricevente (ovidotto) accoppiata con maschio vasectomizzato!

Analisi dei nati (Southern blot)



<https://www.youtube.com/watch?v=h-Bfc1GPWpE>

Basi molecolari

Inserzione del DNA esogeno casuale

Rottura del DNA dovuta azione meccanica iniezione

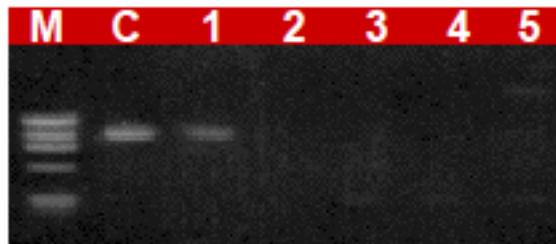
Plasmide con DNA esogeno inserito da ligase durante la riparazione DNA

Screening dei nati

Estrazione DNA dalle code
della progenie



Analisi tramite PCR



Analisi tramite Southern-blot



Efficienza

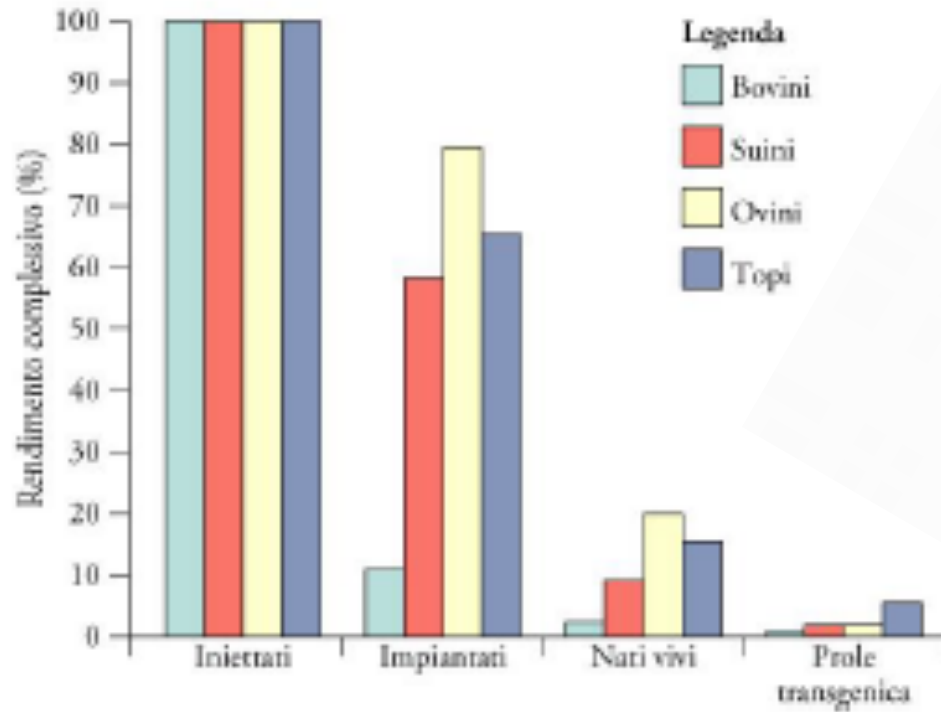
7-10% animali nati sono transgenici (Southern blot DNA genomico)

1-3% animali transgenici esprimono il gene esogeno (?)

1) Inserzione transgene in loci non espressi

2) Metilazione del transgene

Quadro generale efficienza iniezione pronucleare



Transgenesi mediante iniezione pronucleare

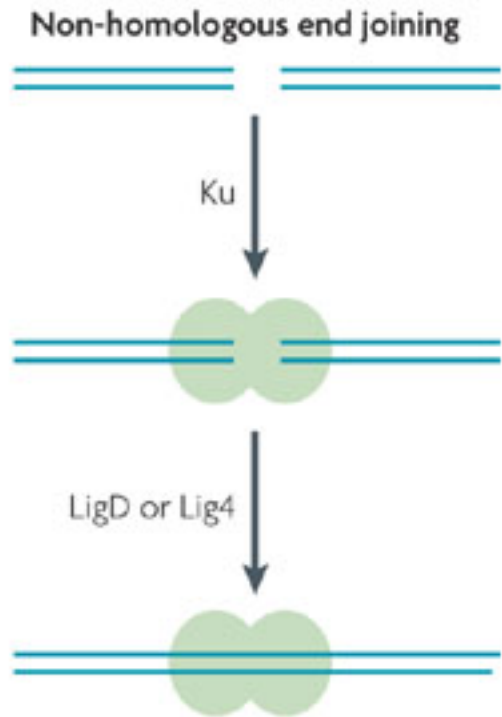
TABLE 1. Examples of transgenes introduced into fish that cause significant phenotypic effects*

Phenotype targeted	Species	Transgene
Growth (> twofold)	Atlantic salmon Tilapia Rainbow trout Coho salmon Chinook salmon Rohu Loach	Growth hormone
Freeze tolerance	Atlantic salmon	Antifreeze protein
Disease resistance	Catfish Carp Medaka	Cecropin Lactoferrin Cecropin
Carbohydrate metabolism	Rainbow trout Rainbow trout	Glucose transporter Hexokinase
Reproduction	Rainbow trout	Antisense GnRH
Lipid metabolism	Zebrafish	D6-desaturase
Phosphorus metabolism	Zebrafish	Phytase
Vitamin C metabolism	Rainbow trout	L-gulono-gamma-lactone oxidase

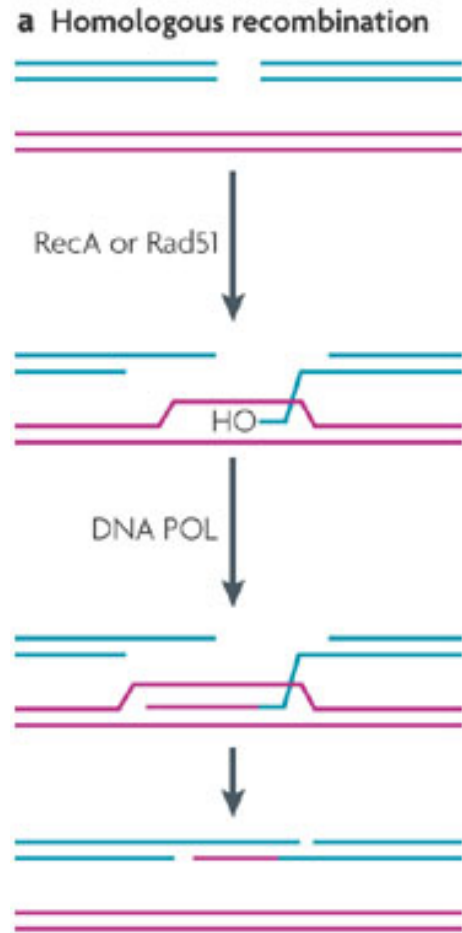
* Changes in physical or chemical traits.

Source: Reprinted from Trends in Biotechnology, Vol. 24, Devlin RH, Sundstrom LF, Muir WM, Interface of biotechnology and ecology for environmental risk assessments of transgenic fish, p 89–97 (2006), with permission from Elsevier.

Random vs inserzione mirata del transgene: ricombinazione omologa



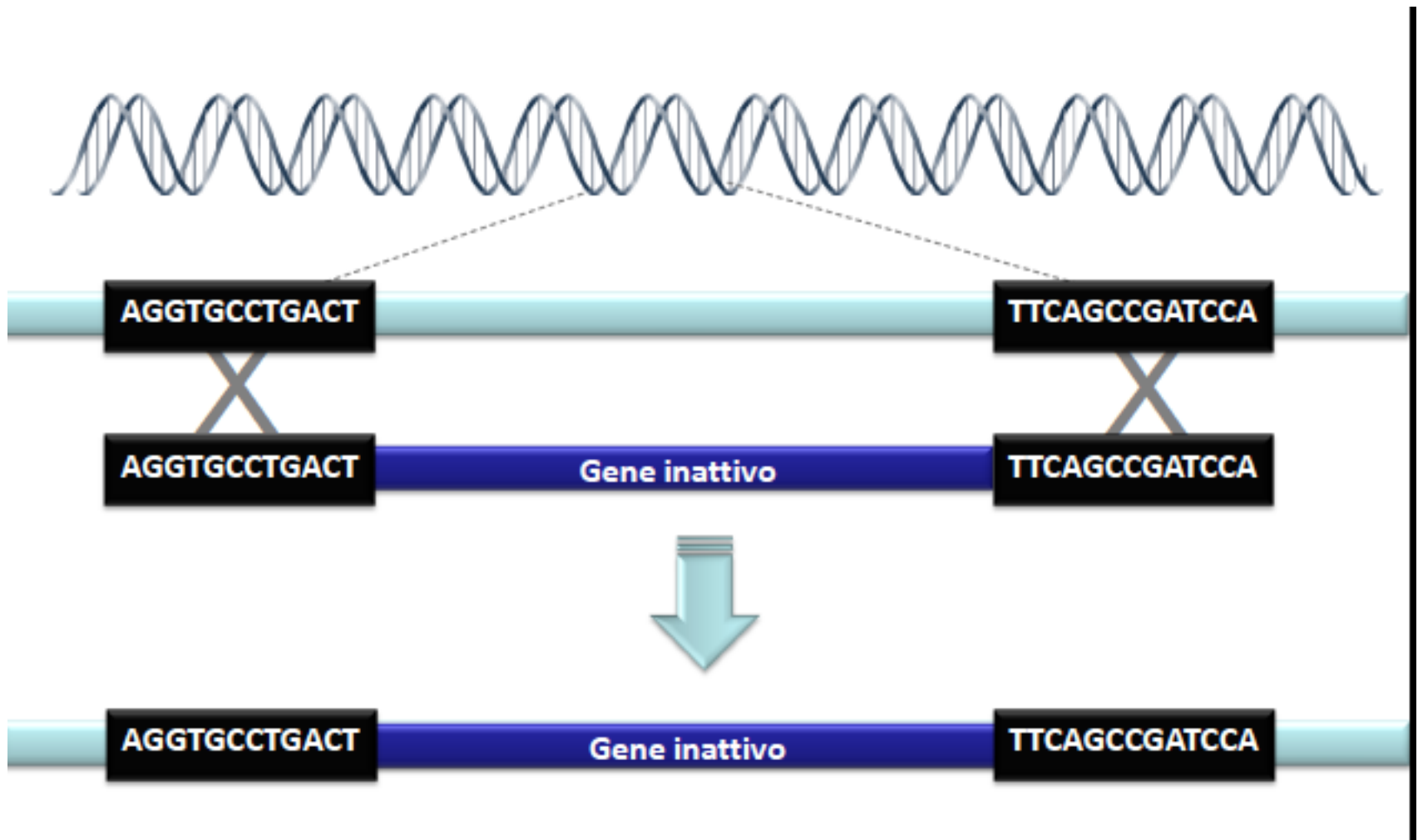
Iniezione pronucleare



Strategia:

**Affiancare il transgene in 3' e 5' con sequenze
Complementari alla regione genomica di interesse**

Schema ricombinazione omologa



Ricombinazione omologa:

Selezionare le cellule con transgene in posizione corretta

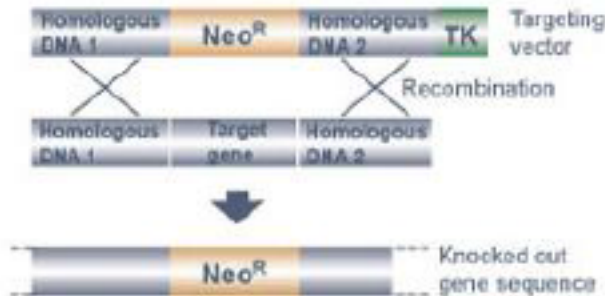


The targeting vector is inserted into ES cells via electroporation.



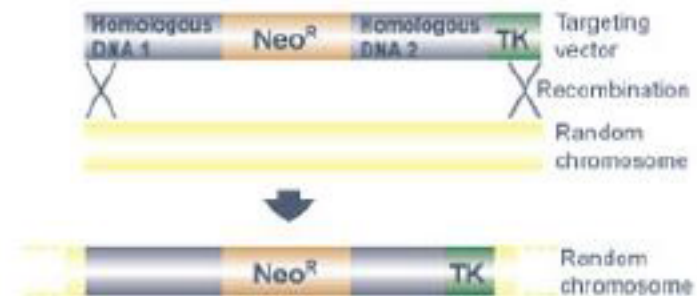
Altre opzioni di DNA transfer sono disponibili:
Lipofectamina, precipitazione con Ca++ fosfato

In some cells, the targeting vector recombines with the target gene and knocks out one copy of the target gene.



Result: cells with knocked out gene are
- neomycin-resistant
- ganciclovir-resistant (no TK)

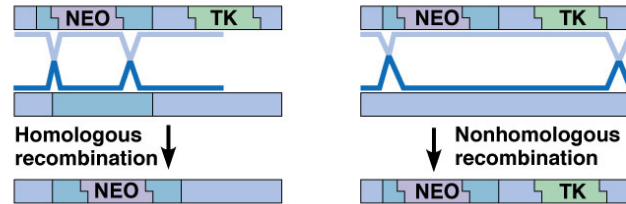
In other cells, the targeting vector recombines in the wrong place, a random section of the chromosome.



Result: cells with random recombination are
- neomycin-resistant
- ganciclovir-sensitive (TK present)

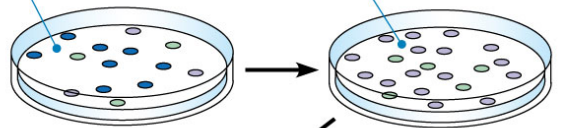
Ricombinazione omologa in stem cells

1 DNA is introduced into embryonic stem (ES) cells. The DNA contains a non-functional copy of the gene of interest, an antibiotic resistance gene (Neo) and a gene encoding a viral enzyme (TK). ^{Thymidin kinase}



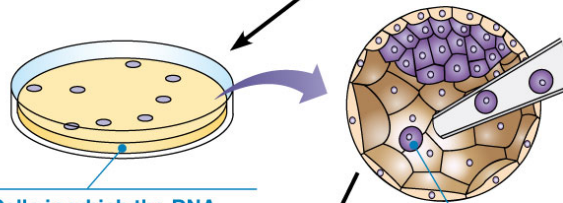
2 ES cells are grown in culture.

3 Cells containing DNA are selected using an antibiotic (neomycin).



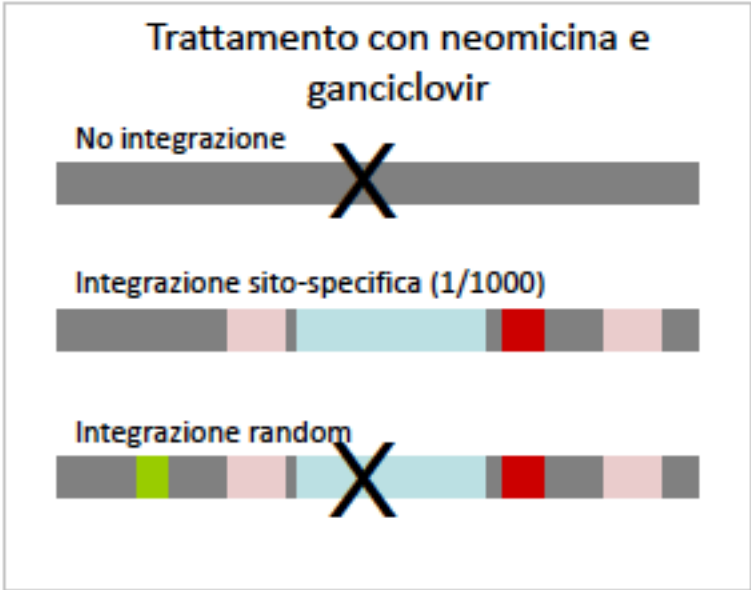
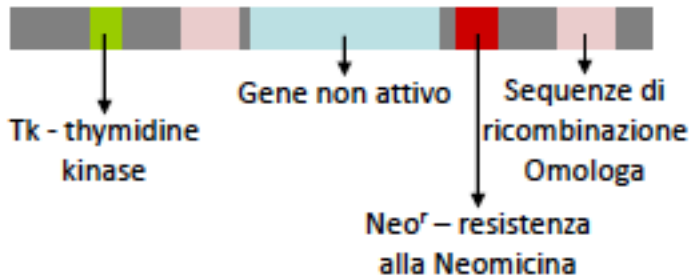
4 Cells in which the DNA has inserted by recombination are selected using an antiviral drug (ganciclovir).

5 "Knockout" cells are inserted into a host embryo.

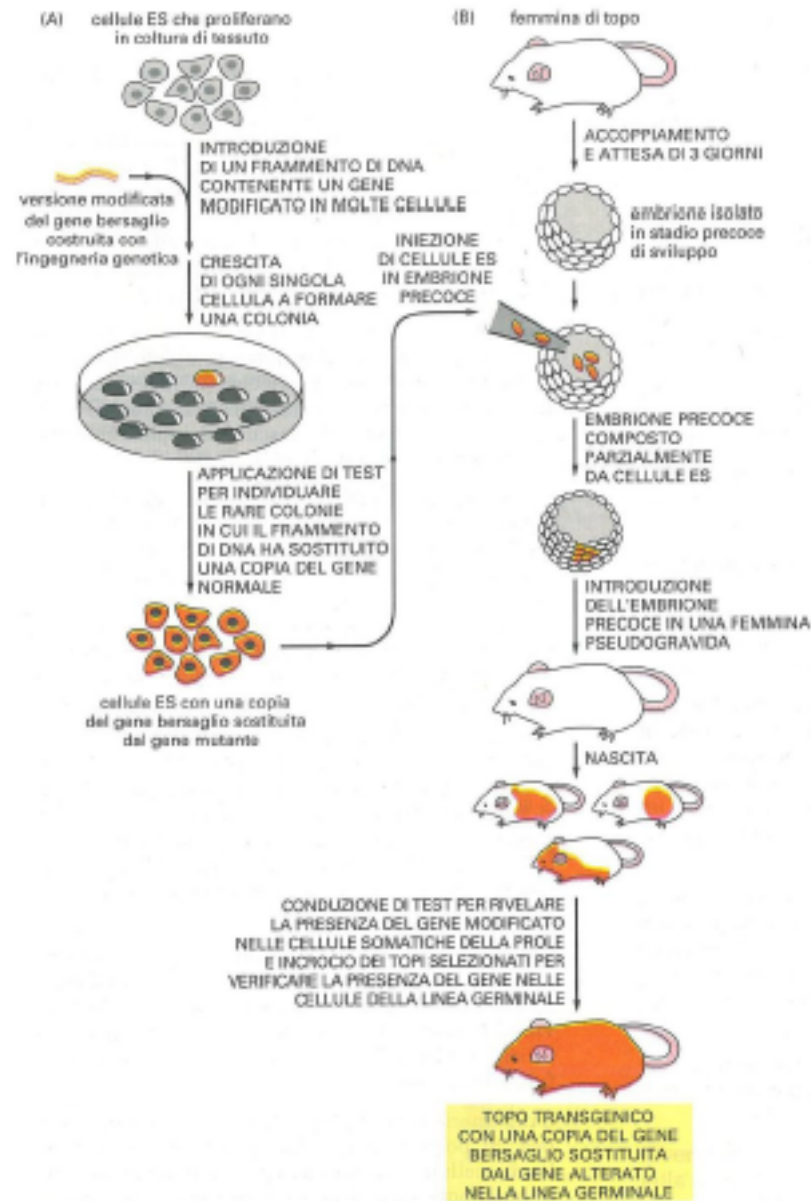


6 Resulting mice are bred to produce "knockout" mice.

Selezione cellule con transgene in posizione corretta



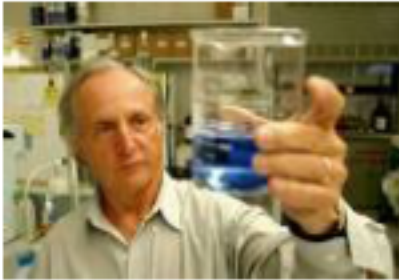
Transgenic mouse con ricombinazione omologa: Workflow



Inserzione mirata di un transgene serve a:

- **KNOCK-OUT:** INATTIVAZIONE dell'espressione di un gene
- **KNOCK-IN:** INSERZIONE di un gene difettivo/selvatico (modelli di patologie con mutazioni puntiformi; geni reporter)

Premio Nobel 2007 per “Gene Targeting”



Mario R. Capecchi



Martin J. Evans



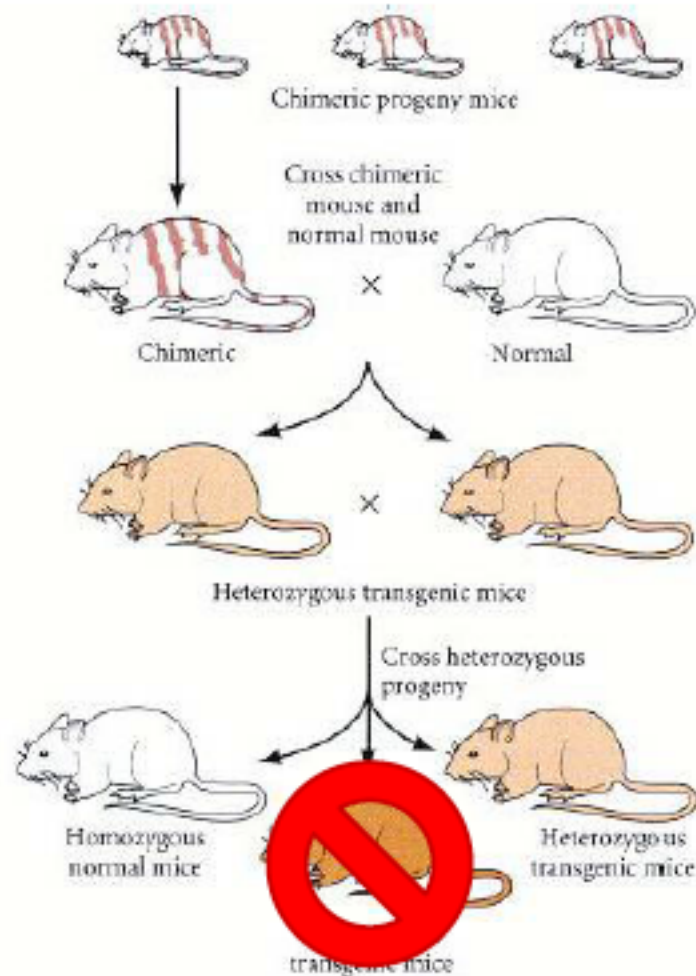
Oliver Smithies

PREMIO NOBEL per la MEDICINA 2007

Motivazione: for their work on "principles for introducing specific gene modifications in mice by the use of embryonic stem cells and gene targeting."

Limite KO costitutivi:
possibile mortalità degli omozigoti
durante lo sviluppo.

KO condizionali:
l'induzione della mutazione
tempo e **tessuto** specifica



Transgenesi condizionale: Il sistema Cre-LoxP

Eliminare/attivare un dato gene in un dato tessuto, organo, o
In una fase particolare di sviluppo

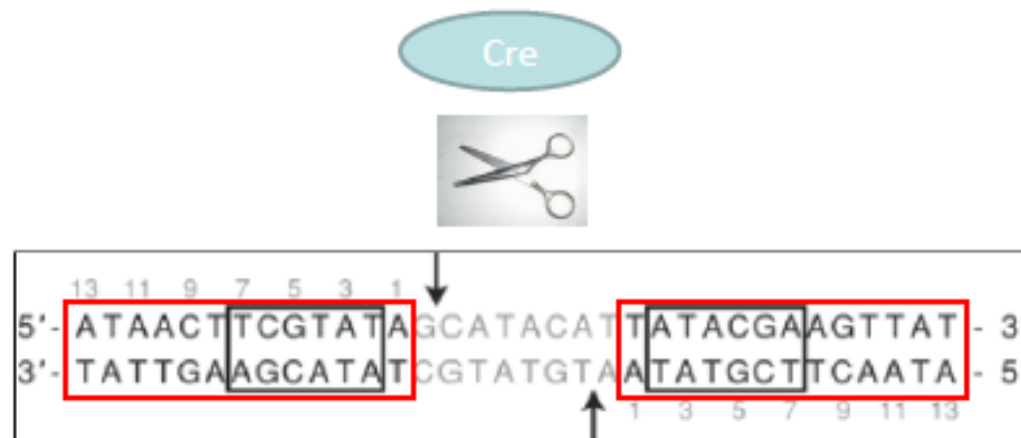
Sistema di RICOMBINAZIONE del fago P1

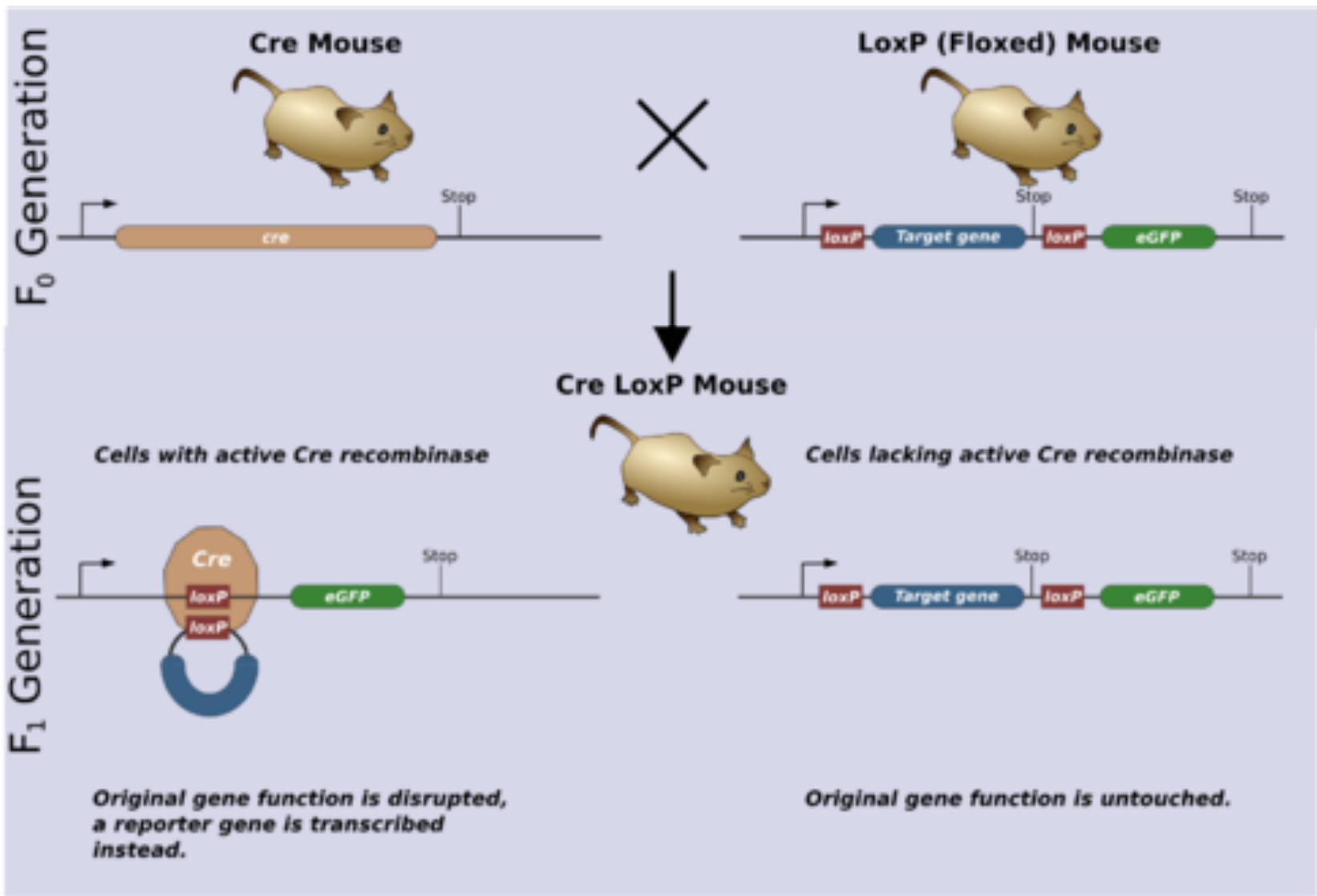
“Causes recombination”

CRE (cyclization recombination), ricombinasi specifica

LoxP (locus of X-over P1), locus di crossover

(2 seq palindrome di 13bp + regione centrale di 8nt)





Il sistema CRE-Lox

Transgenesi condizionale

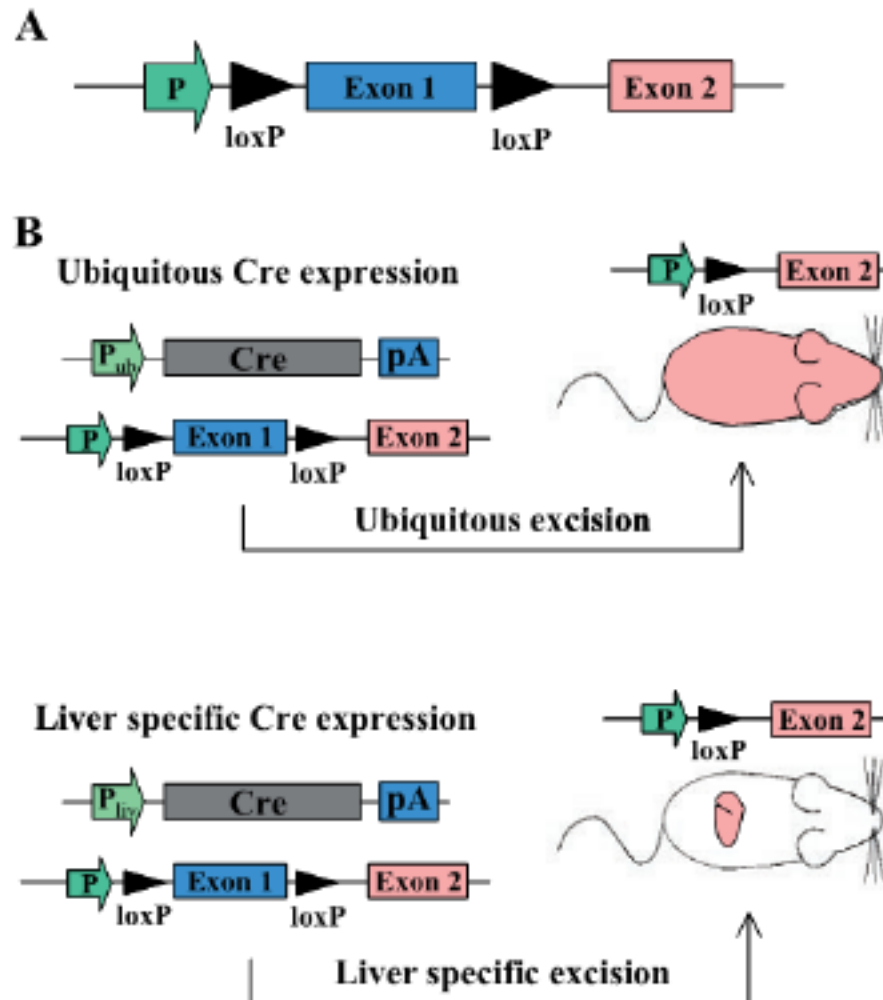
Controllo dell'espressione genica:

- **nello SPAZIO:** utilizzo di un PROMOTORE TESSUTO SPECIFICO
- **nel TEMPO:** utilizzo di un PROMOTORE
 - ❖ dipendente dallo STADIO di SVILUPPO
 - ❖ INDUCIBILE

3

Il sistema Cre-loxP

Esempio di delezione tessuto specifica

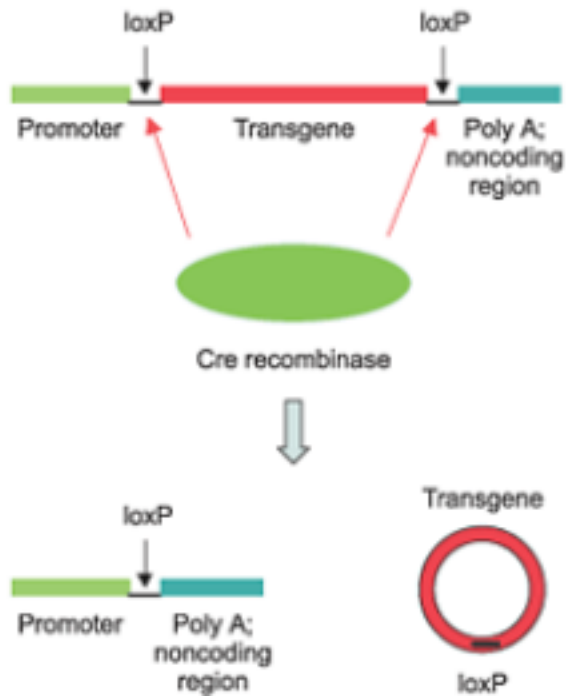


Il Sistema Cre-LoxP

DELEZIONE

KO programmabile

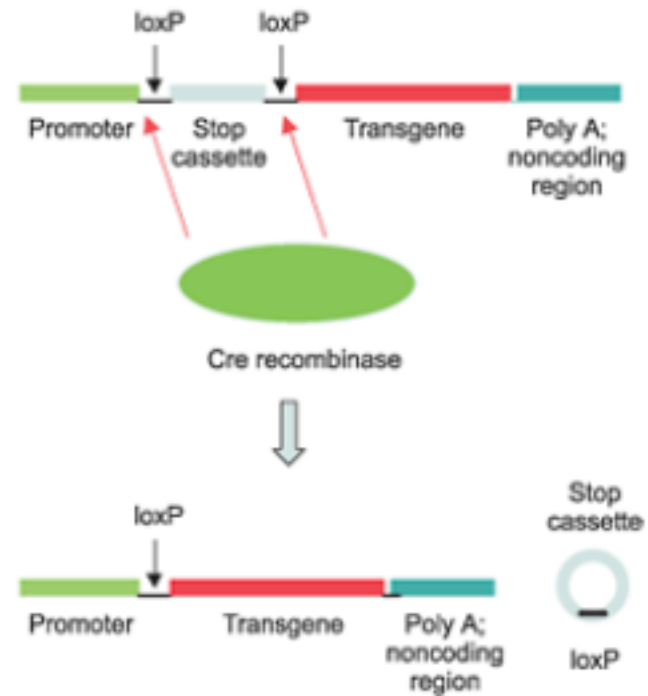
A) Cre/loxP recombination system: Loss of function



INSERZIONE

K-IN programmabile

B) Cre/loxP recombination system: Gain of function



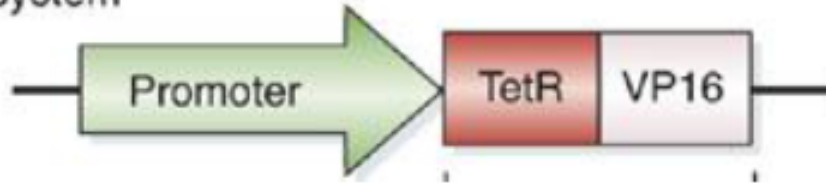
Transgenesi condizionale, il sistem TER OFF/TET ON

Sistema a 3 elementi:

- **TeT-Repressor:** repressore della trascrizione
- **Tc/Dox:** tetraciclina/doxyciclina
- **TRE:** tetracycline response element

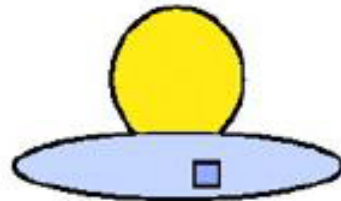
Sistema TET-OFF

Tet-off system



TetR: tet repressor

**VP16: transactivation domain
of herpes simplex virus**



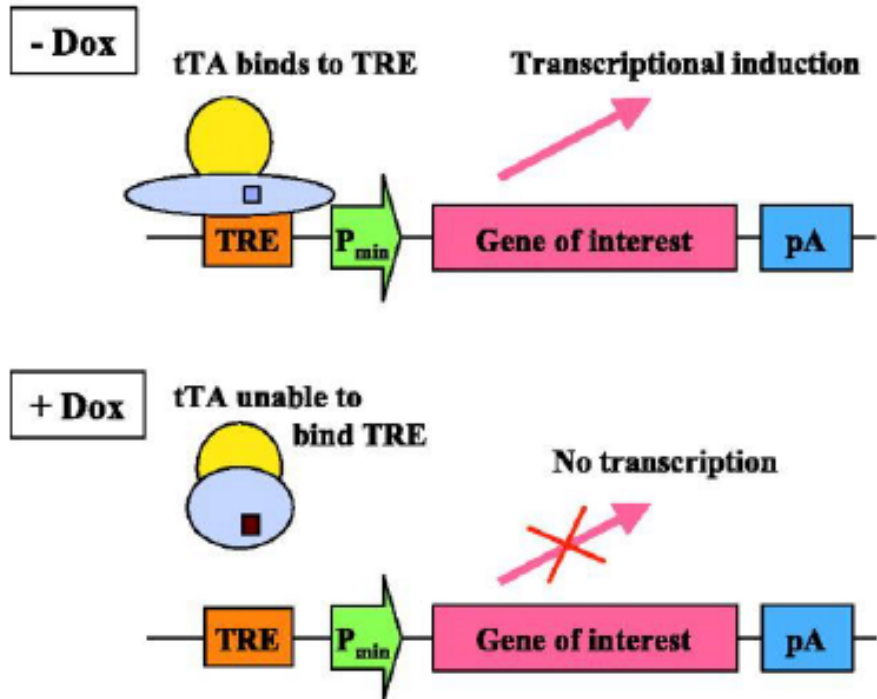
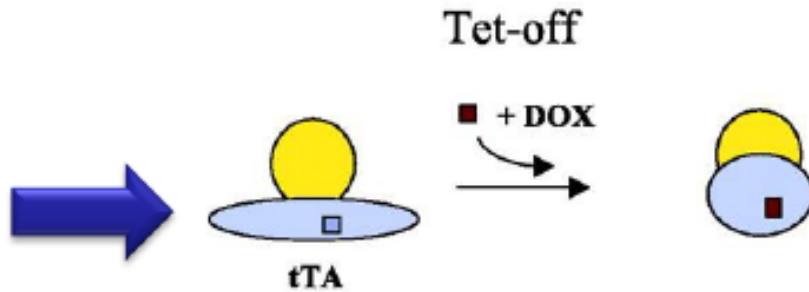
tTA

tTA

**Tetraycline controlled
transactivator**

Sistema TET-OFF

tTA: tetracycline controlled transactivator



Tet-off system (tTA) will activate expression in the absence of its ligand doxycycline.

Upon addition of DOX, transcription of the gene of interest is extinguished.

Sistema TET-OFF

VANTAGGI

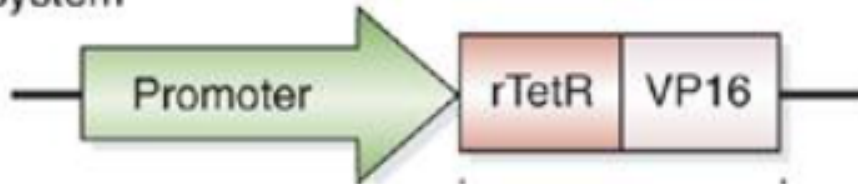
- Ben note proprietà della Tc/DOX: farmacocinetica, buona distribuzione tissutale, bassa tossicità, capacità di attraversare membrane cellulari
- Grande induzione in alcuni tessuti (anche 5 ordini di grandezza)

SVANTAGGI

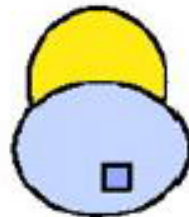
- Attività residua del promoter minimale *tetO*-CMV
- Tossicità cellulare del transattivatore
- Bassa sensibilità alla DOX in alcuni tessuti
- Basse cinetiche di induzione *in vivo*

Sistema TET-ON

Tet-on system



rTetR: reverse tet repressor
VP16: transactivation domain
of herpes simplex virus



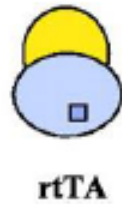
rtTA

rtTA

Reverse tet-on
Tetraycline controlled
transactivator

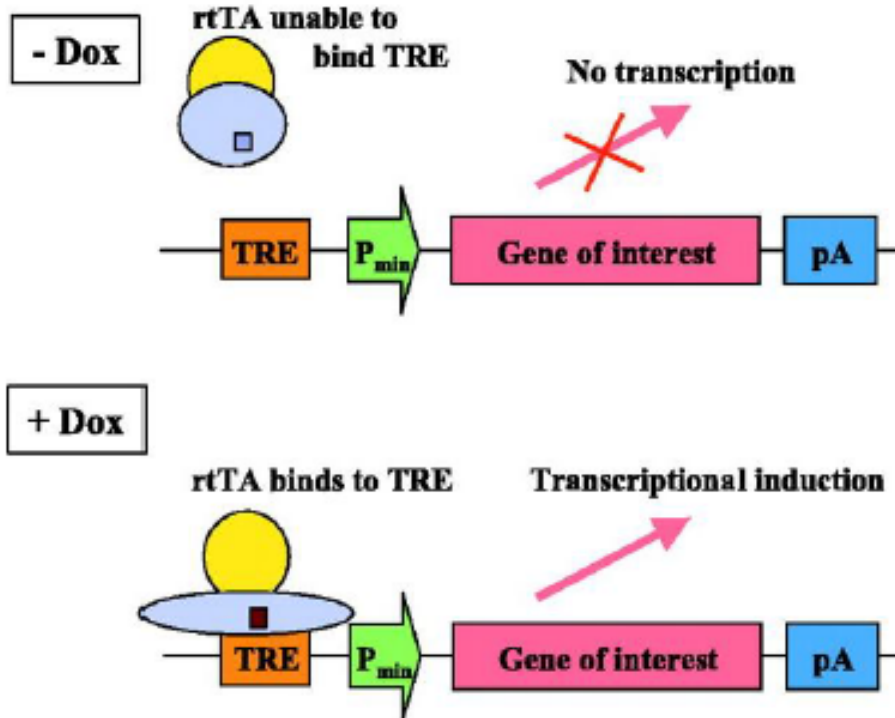
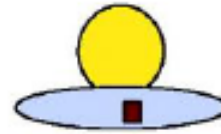
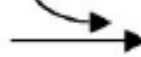
Sistema TET-ON

rtTA: reverse tet-on
tetracycline
controlled
transactivator



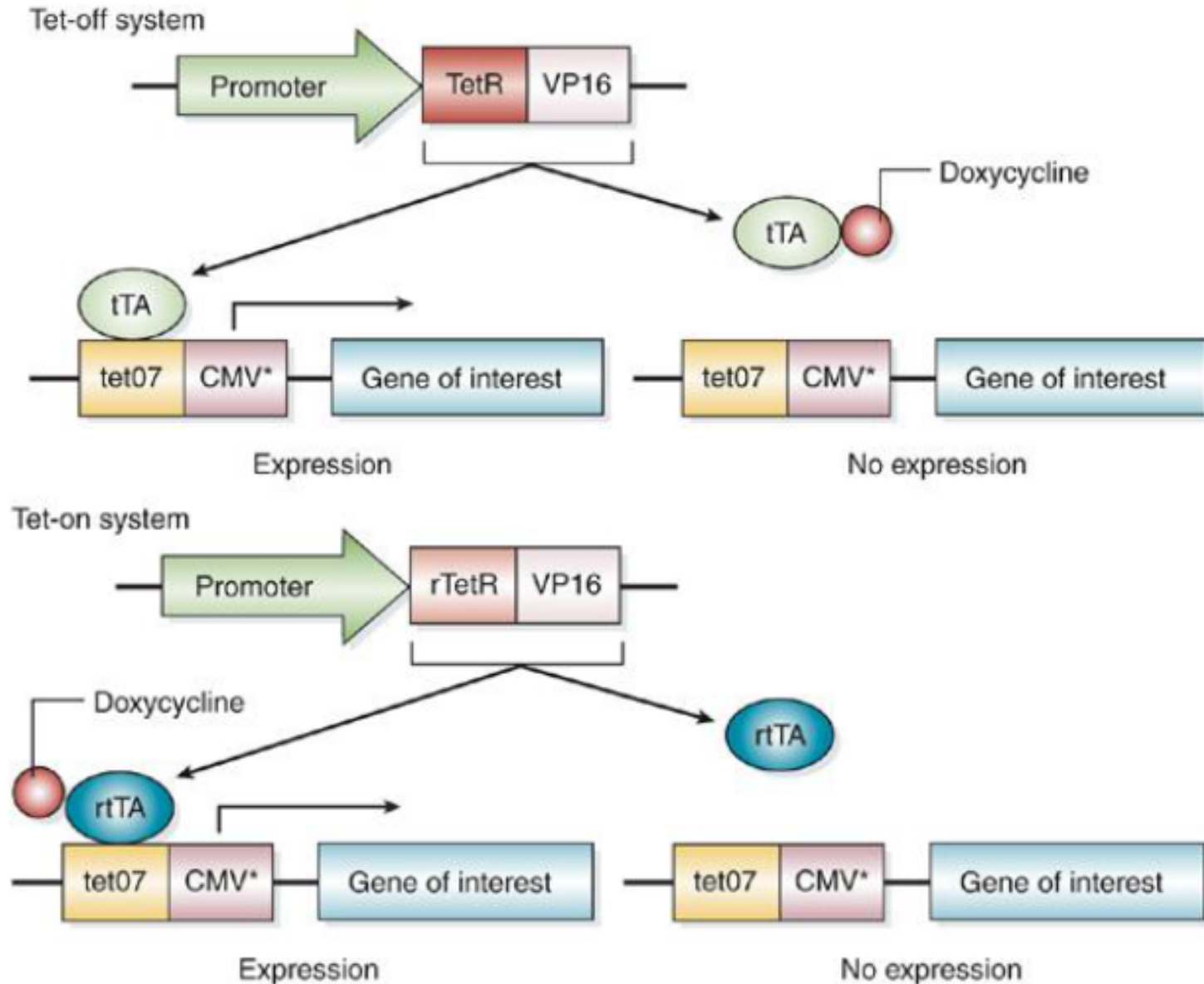
Tet-on

■ + DOX



Addition of DOX to the Tet-on system (rtTA) results in transcriptional induction of the gene of interest.

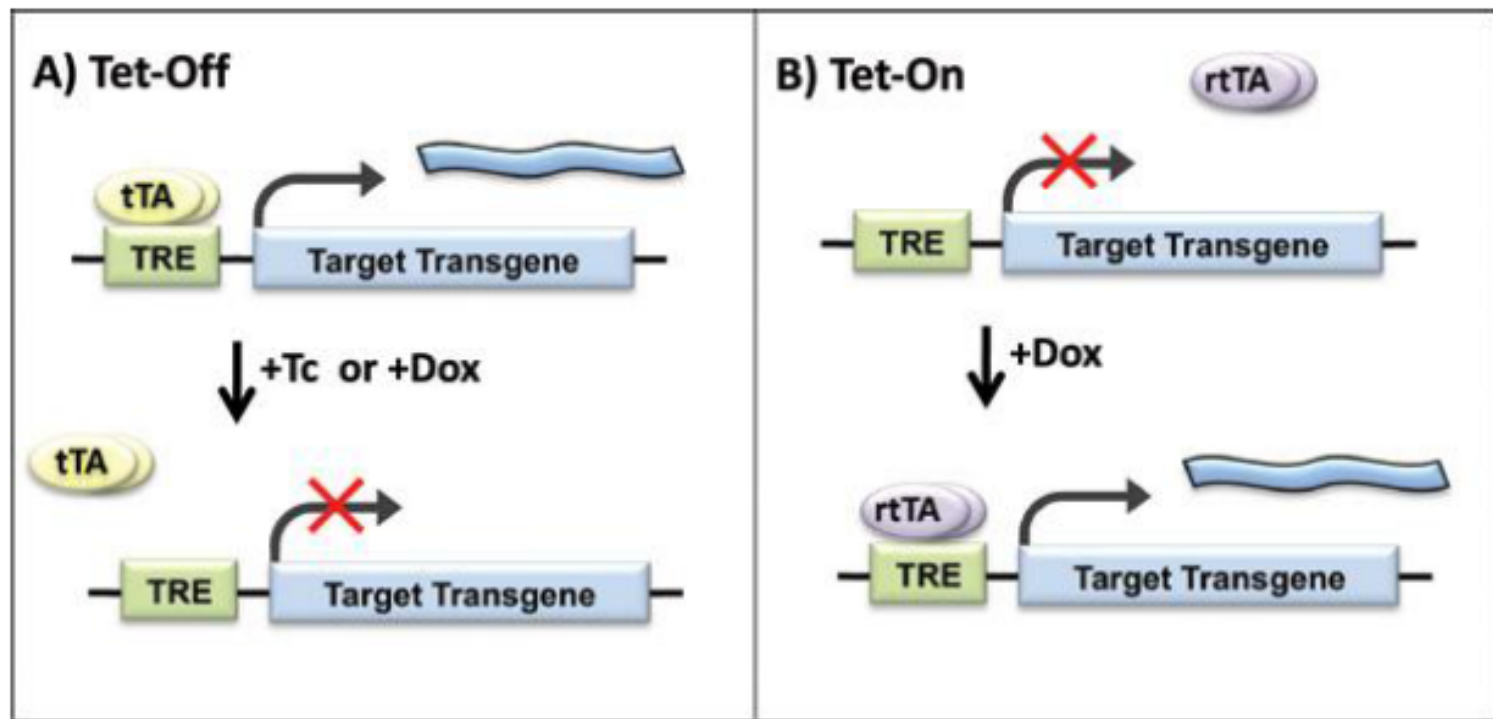
Sistema TET-OFF & TET-ON



VANTAGGI

Sistema TET-ON

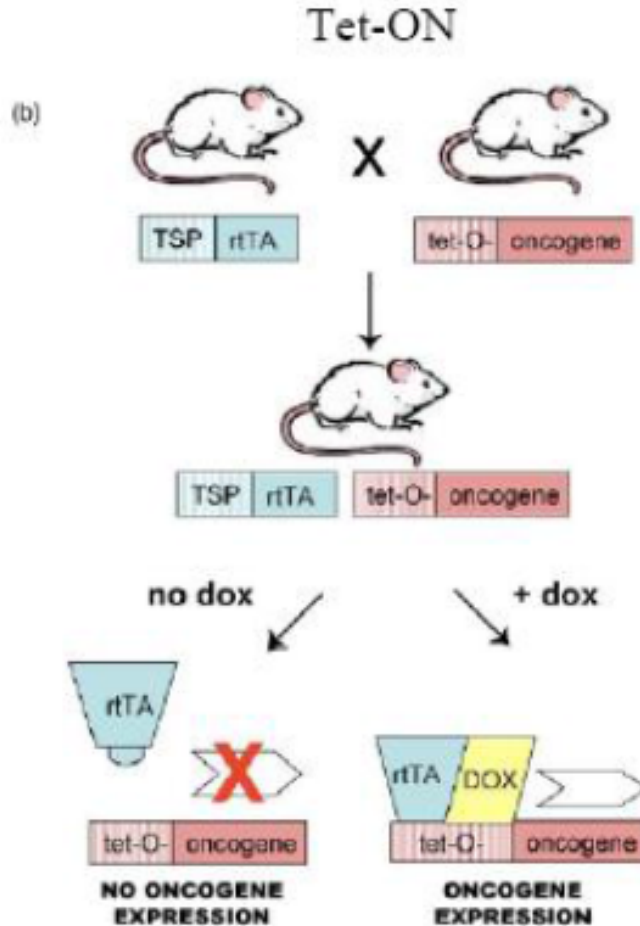
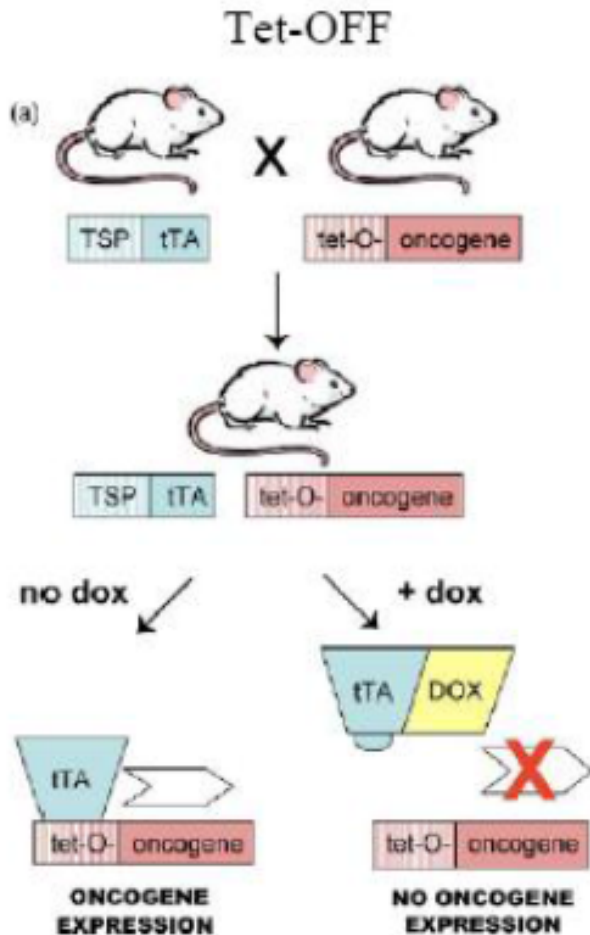
- **Aumentata velocità di espressione del transgene: completa attivazione in 1 ora, rispetto alle basse cinetiche di attivazione del sistema tet-OFF (fino ad una settimana)**



I due sistemi a confronto

La Tc **SPEGNE** il GENE

La Tc **ACCENDE** il GENE



Vettori retrovirali

Integrazione di materiale genetico nella cellula ospite

•**SCOPO:** Guadagno di funzione

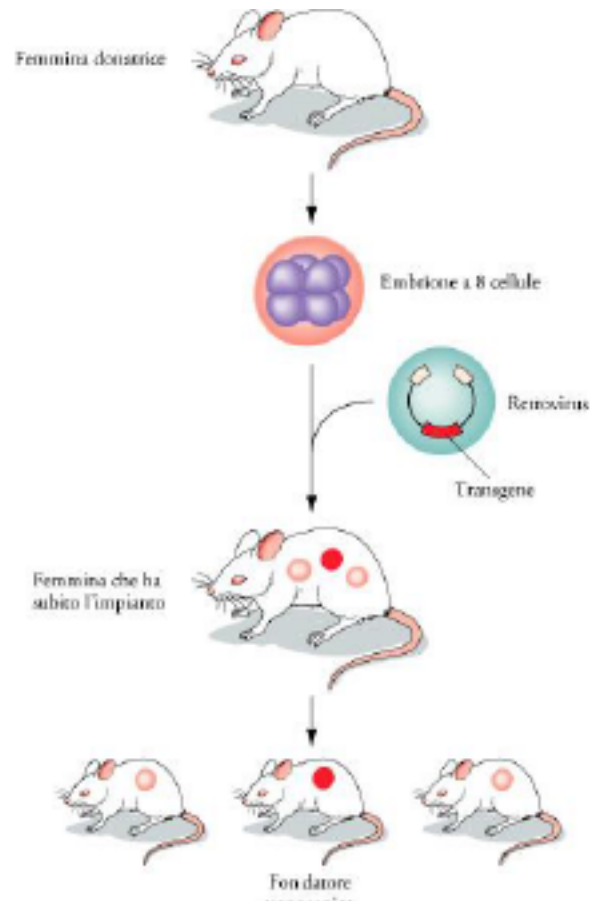
•**CARATTERISTICA:** - inserzione random, casuale - vettore max 8Kb - l'animale puo' risultare contaminato da retrovirus delle cellule helper

Vettori retrovirali

Principali tipi di vettore virale: caratteristiche

Vettore virale	Vantaggi	Svantaggi
Retrovirus	Capacità d'inserimento del gene, integrazione stabile nel DNA dell'ospite, elevati titoli di virus ricombinante, ampio tropismo d'infettività, relativa facilità di manipolazione del genoma virale	Difficoltà nel controllare l'infezione virale, mancata infezione delle cellule non in divisione, integrazione a caso nel genoma dell'ospite
Lentivirus	Infezione delle cellule in divisione o meno, espressione stabile del gene, elevata capacità d'inserimento	Mutagenesi potenziale presenza di sequenze proteiche regolatrici e accessorie
Adenovirus	Elevati titoli di virus, alta espressione genica, grande capacità d'inserimento, infezione di cellule in divisione e non in divisione	Risposte immuni alle proteine virali, nessuna integrazione nel genoma dell'ospite, espressione genica transitoria
Virus adeno-associati	Infettano le cellule in divisione o meno, ampio tropismo cellulare, potenziale d'integrazione, bassa immunogenicità e non patogenicità	Limitate capacità per i transgeni, difficile generazione di alti titoli virali, presenza di adenovirus o herpesvirus per la moltiplicazione dei virus adeno-associati
Herpesvirus	Infettano un'ampia varietà di tipi cellulari, alta capacità d'inserzione, tropismo naturale per le cellule neuronali, seguita dalla produzione di alti titoli virali	Possibile tossicità, rischio di ricombinazione, nessuna integrazione virale nel DNA dell'ospite
Poxvirus	Alta capacità d'inserzione, possibile inserzione di grandi frammenti di DNA, alti livelli di espressione transgenica, seguita da virus vivo ricombinante	Possibile effetto citopatico
Virus di Epstein-Barr	Infetta cellule in divisione o meno con prevalenza per i linfociti B, alta capacità d'inserimento	Difficoltà di controllare le linee cellulari

Schema transgenesi indotta con vettori retrovirali



Vantaggi e svantaggi della transgenesi con vettori virali

Vantaggi:
alta efficienza di trasfezione

Svantaggi

- Possibilità di generare nuovi virus patogeni per ricombinazione con eventuali virus presenti nell'ospite
- Mutagenesi inserzionale (per quelli che si integrano in maniera casuale nel genoma)
- Molecole di DNA di dimensioni limitate (max 8 kb)
- Reazioni immunitarie
- Costi elevati

Cromosomi artificiali di lievito

Yeast Artificial Chromosome - YAC

- **SCOPO:** trasferire GENI di grandi dimensioni 300-1000Kb.
- **CARATTERISTICA:** cromosoma artificiale che contiene sequenze (telomeri, centromeri, origini di replicazione) necessarie per la replicazione e la preservazione nelle cellule del lievito.

Cromosomi artificiali di lievito

Yeast Artificial Chromosome - YAC

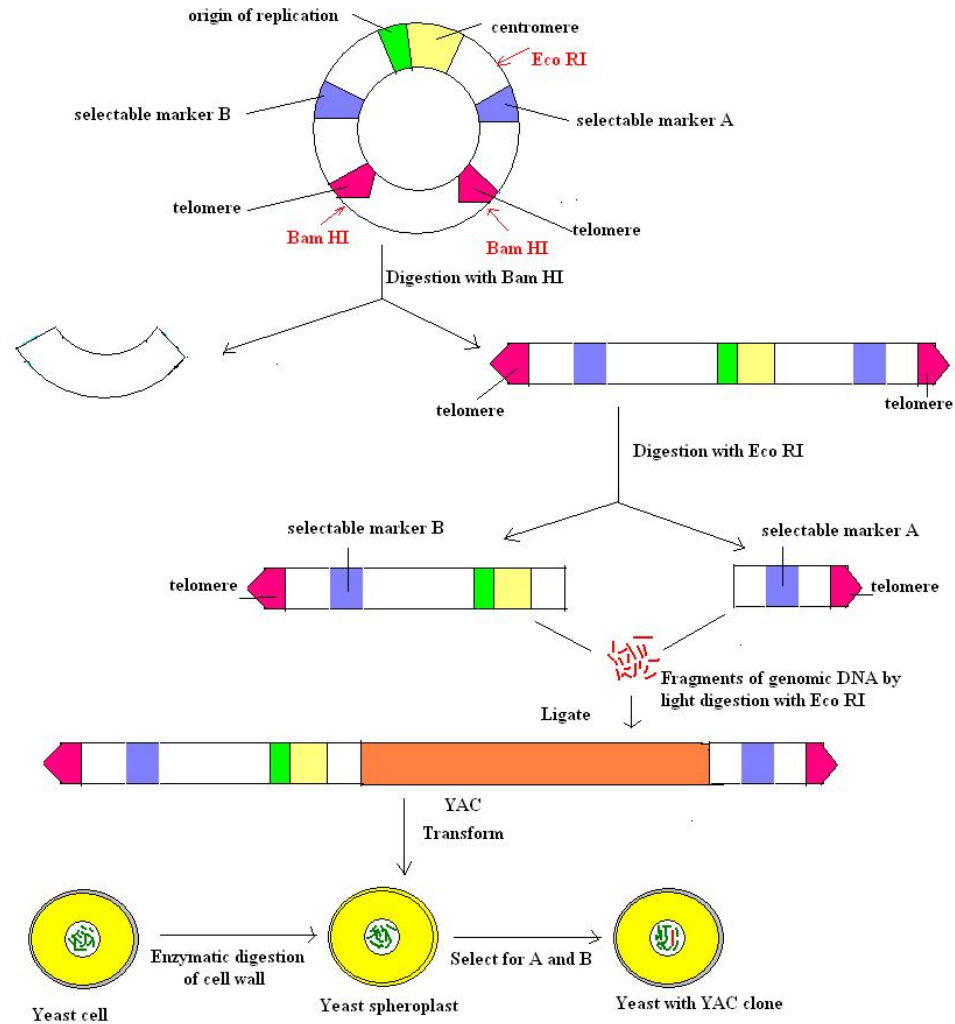


Figure: Construction of a yeast artificial chromosome (YAC)

Cromosomi artificiali di lievito

Yeast Artificial Chromosome – YAC

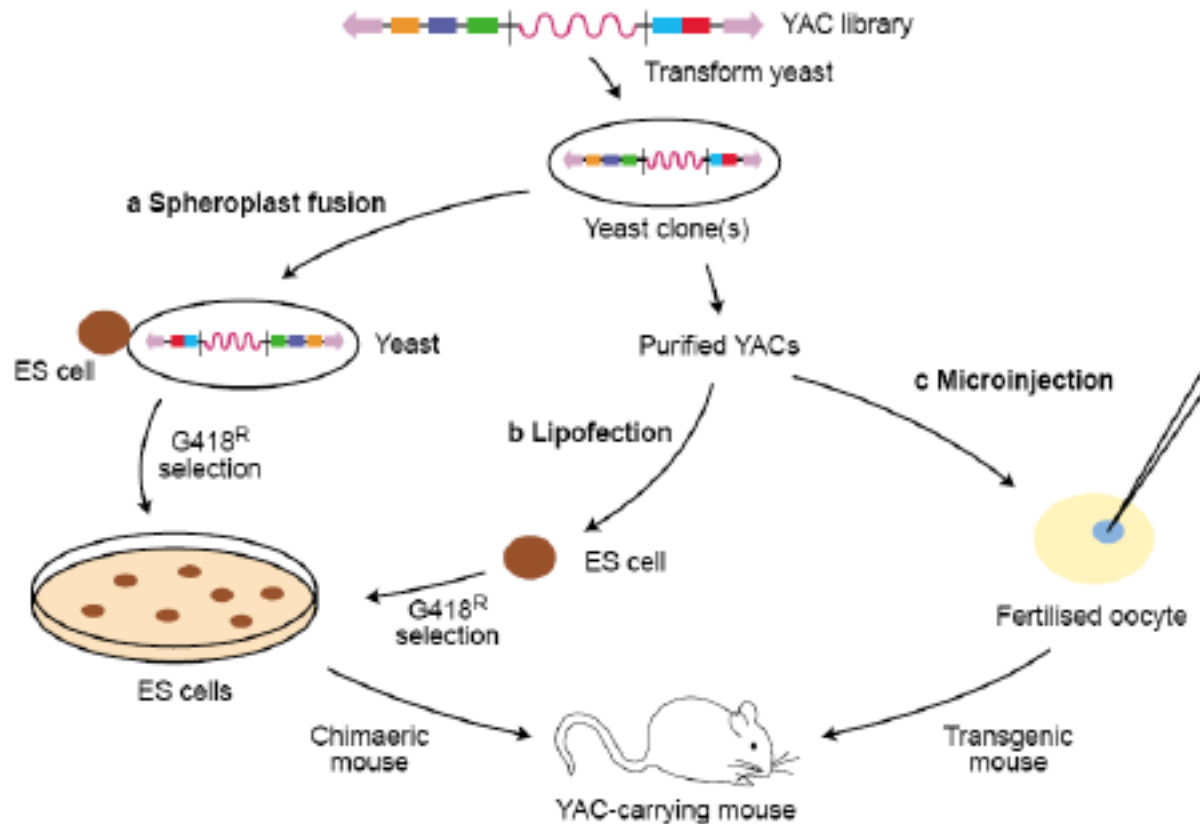
Come si usano

- **Fusione di SFEROPLASTI** (cellule Lievito senza parete) + cellule ES (rischio di contaminazione con genoma Lievito)
- **Purificazione di YAC** (separato per elettroforesi) + microiniezione nel pronucleo (se YAC non ha dimensioni grandi, altrimenti si frammenta)
- **Trasferimento di YAC nelle ES tramite LIPOSOMI** (vescicole lipidiche artificiali per fusione con membrana)

Cromosomi artificiali di lievito

Yeast Artificial Chromosome – YAC

Come si usano – SCHEMA -



Generation of YAC-transgenic mice

Applicazioni Transgenesi con YAC

- YAC di 670Kb contenente il gene umano **HPRT** in cellule ES di topo (funzione renale)
- YAC di 400Kb contenente il gene umano **APP** in cellule ES di topo (codifica il precursore della proteina amiloide Alzheimer)
- YAC contenente il gene umano **catena leggera/pesante IgG** in topo (produzione di anticorpi)

Transgenesi in grossi animali – animali da reddito

Vantaggi

TABLE 1: Comparison of the different systems used to produce recombinant pharmaceutical proteins.

Production level	
Investment cost	
Production cost	
Scaling-up ability	
Collection	
Purification	
Posttranslational modifications	
Glycosylation	
Stability of product	
Contaminant pathogens	
Products on the market	

Table adapted from [1].

Transgenesi in grossi animali – animali da reddito

Vantaggi

TABLE 2: Comparative estimated production cost between cell culture and transgenics.

Production scale (Kg/year)	System	Cost (dollars/gram product)
50	Cell culture	147
	Transgenics	20
100	Cell culture	48
	Transgenics	6

Table adapted from [7].

Transgenesi nelle specie da reddito

Possibilità applicative

Latte:

Aumento produzione
Produzione peptidi ad
azione biologica
Eliminazione composti
(– lattosio)

Sangue:

Peptidi
Farmaci
Resistenza alle
malattie

Ormoni:

Fattori di rilascio
ipofisario (gnrh)
Neuropeptidi

Miglioramento

Produzioni di:

Carne
Lana,
cuoio

Transgenesi in grossi animali – animali da reddito

Metodi

Iniezione pronucleare

Iniezione di retrovirus

Transfezione di spermatozoi

Modificazione genetica di spermatogoni

e trapianto nel testicolo

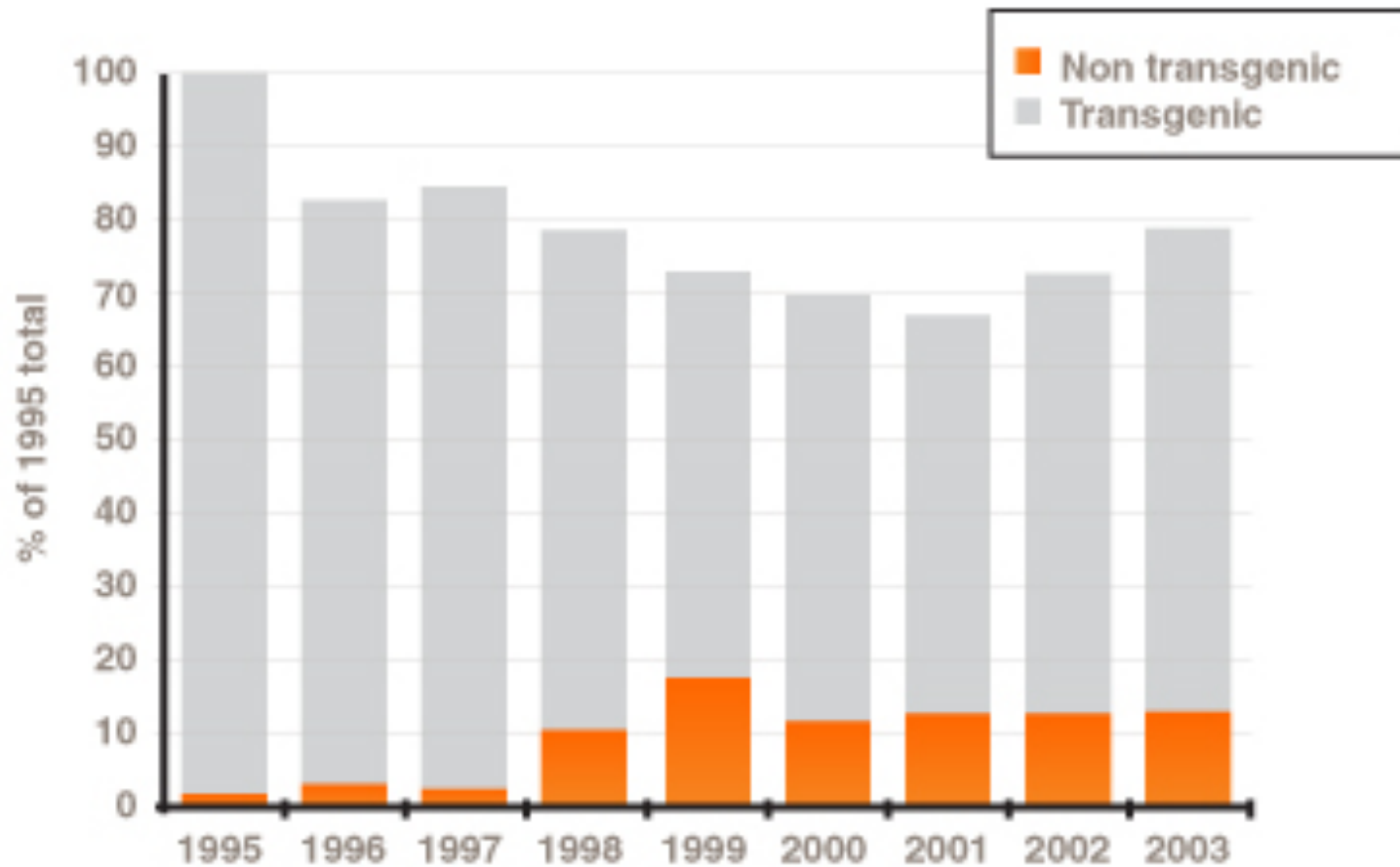
Trapianto nucleare di cellule modificate geneticamente

Cellule staminali embrionali strumento ideale per transgenici:

non isolate nelle specie da reddito

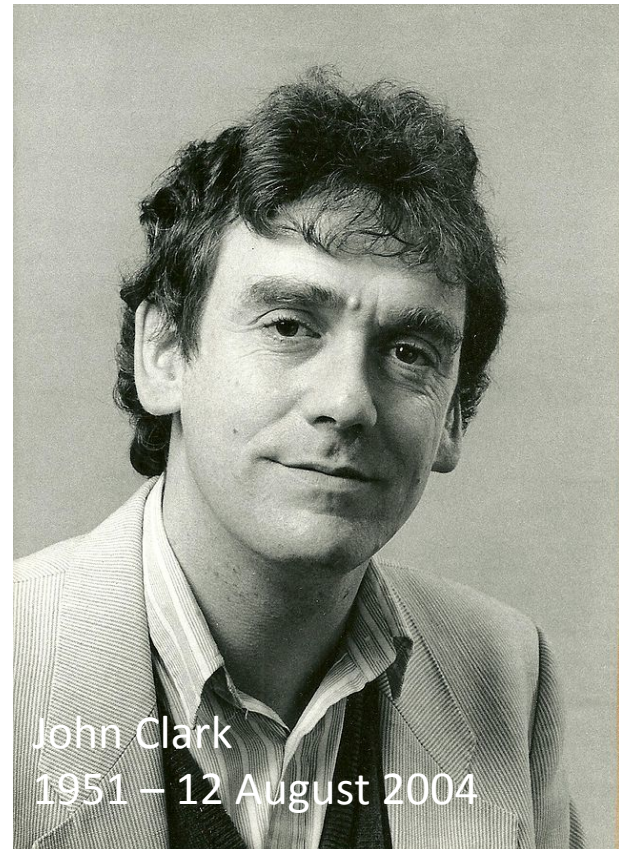
Numero di animali transgenici in continuo aumento

USA, Asia, Sud Corea, Giappone, Europa



Animali come bioreattori: storia

Tracy- prima pecora transgenica prodotta da John Clark, Roslin Institute
(produceva 35 g alfa-1-antitripsina per litro di latte 1991)



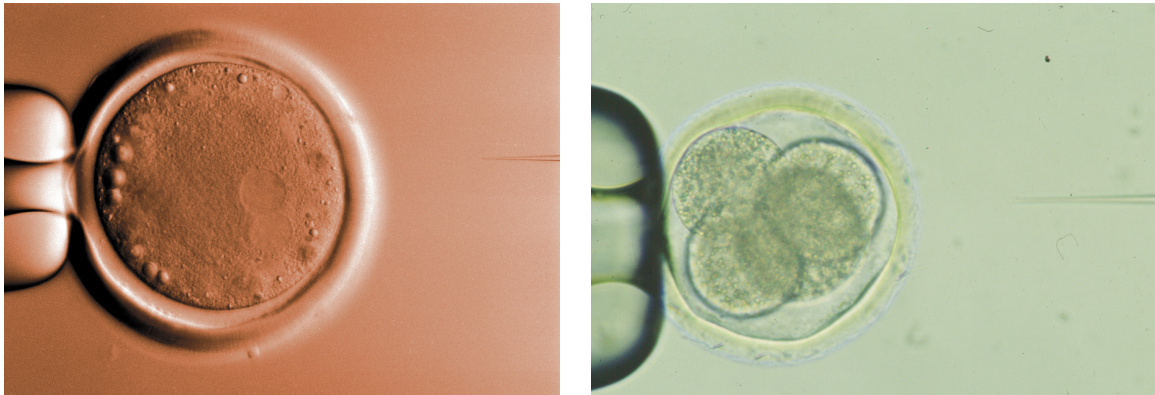
John Clark
1951 – 12 August 2004

Iniezione pronucleare in zigote di pecora



Principali tipi di ottica per la micromanipolazione

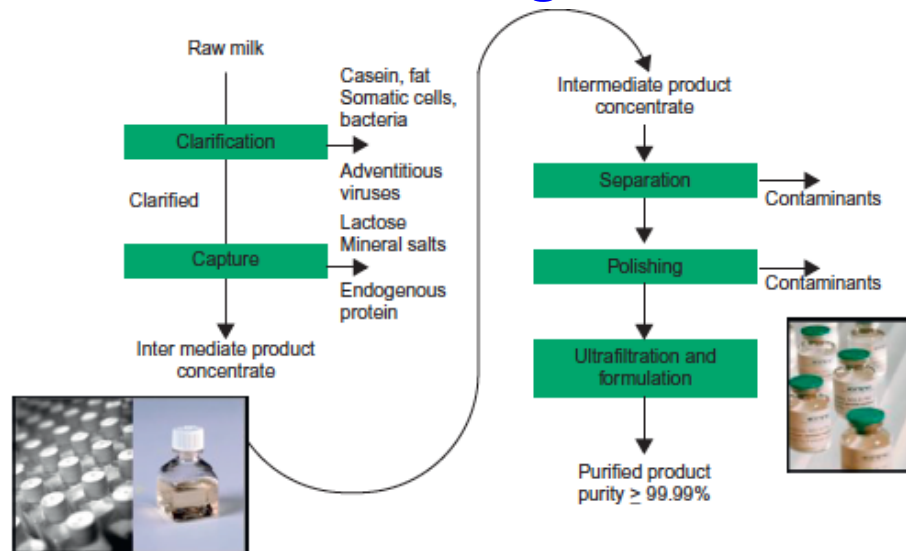
Contrasto interferenziale “Nomarski”, DIC (Differential Contrast)
Indispensabili capsule Petri di vetro!



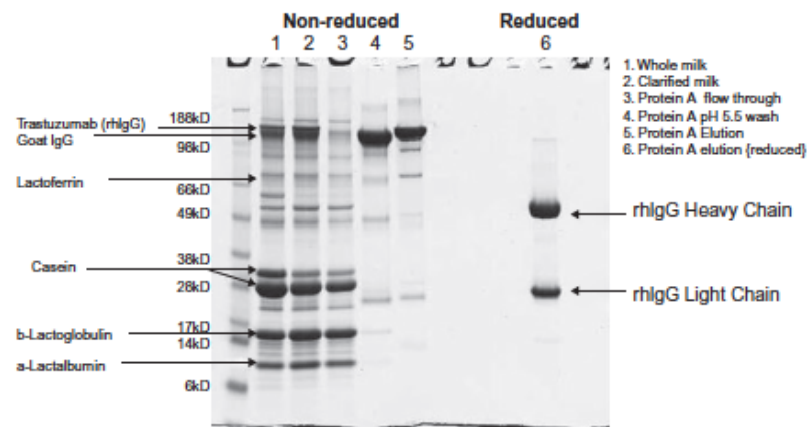
Contrasto interferenziale “Hoffman”
Il più usato, capsule Petri di plastica



Bioreattori: purificazione del peptide espresso nel latte di animali transgenici



(A)

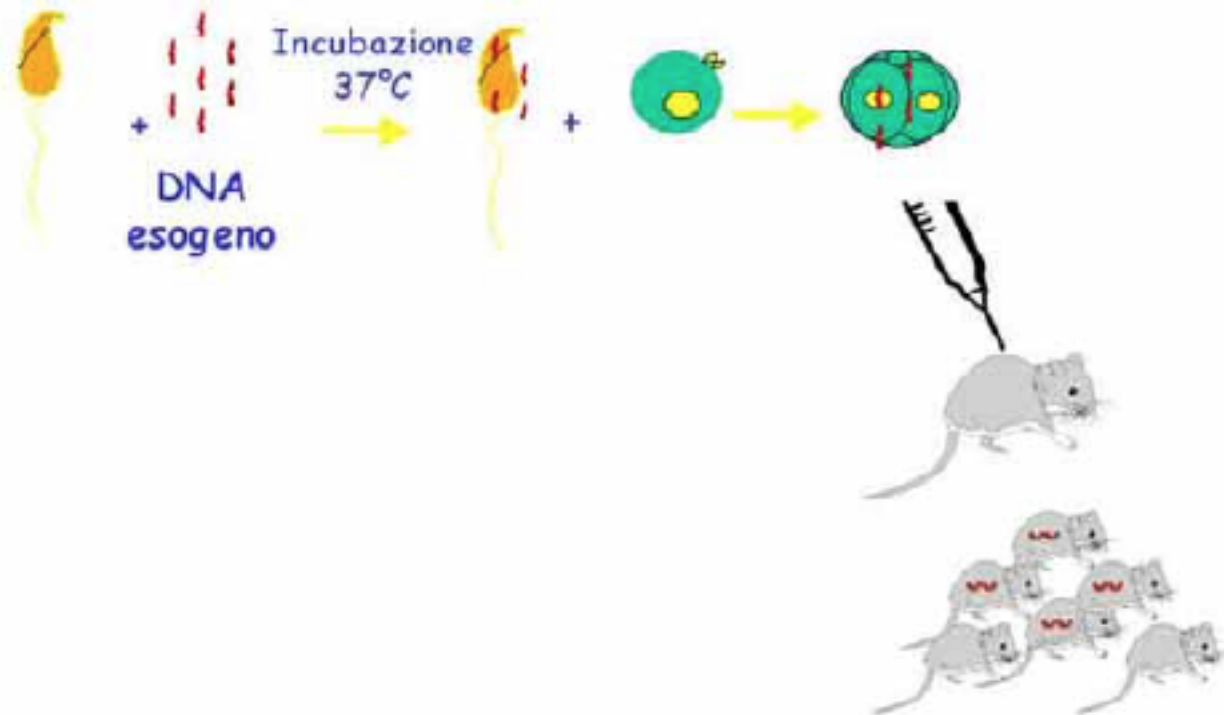


(B)

FIGURE 26.5 (A) Schematic representation of a typical purification process for the isolation of recombinant therapeutic proteins from the milk of transgenic goats: the clarification step can be accomplished by using techniques such as tangential flow filtration, depth filtration, or centrifugation. The capture, separation, and polishing steps are accomplished using standard chromatographic techniques. (B) Western blot of an antibody (trastuzumab) expressed in the milk of transgenic goats following the first purification column after clarification.

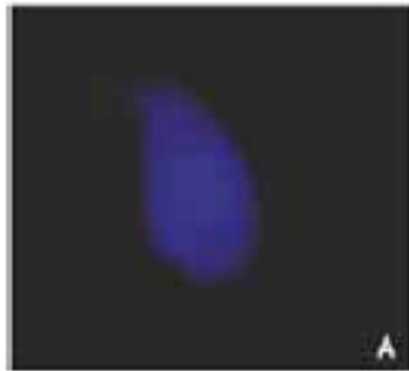


Transgenesi mediata da spermatozoi

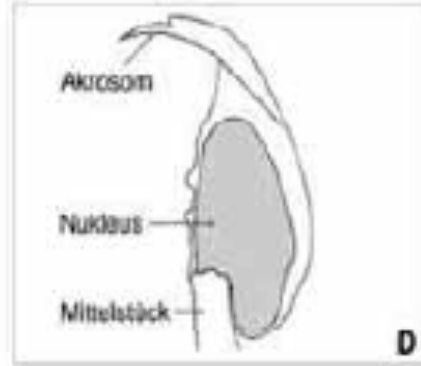
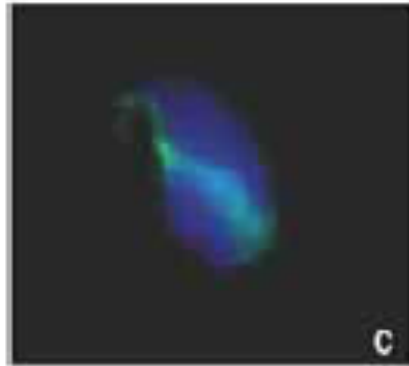
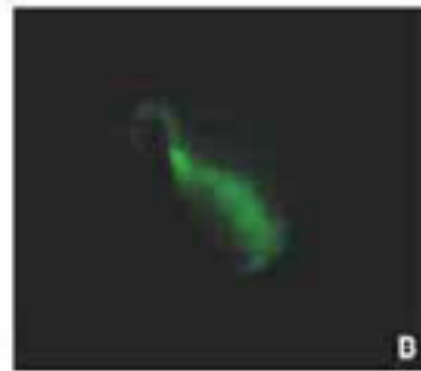


Gli spermatozoi “assumono” DNA esogeno

DAPI

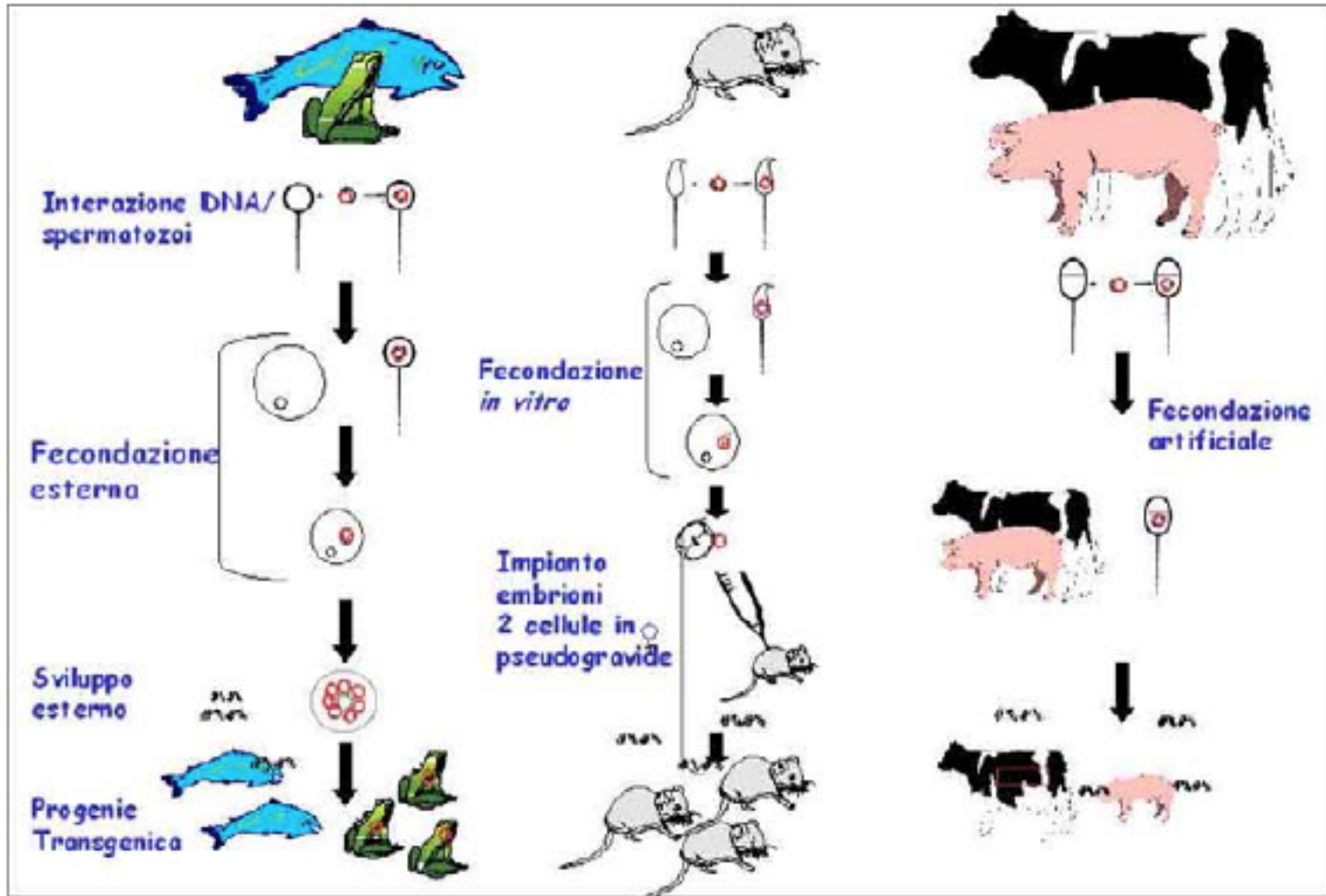


FISH

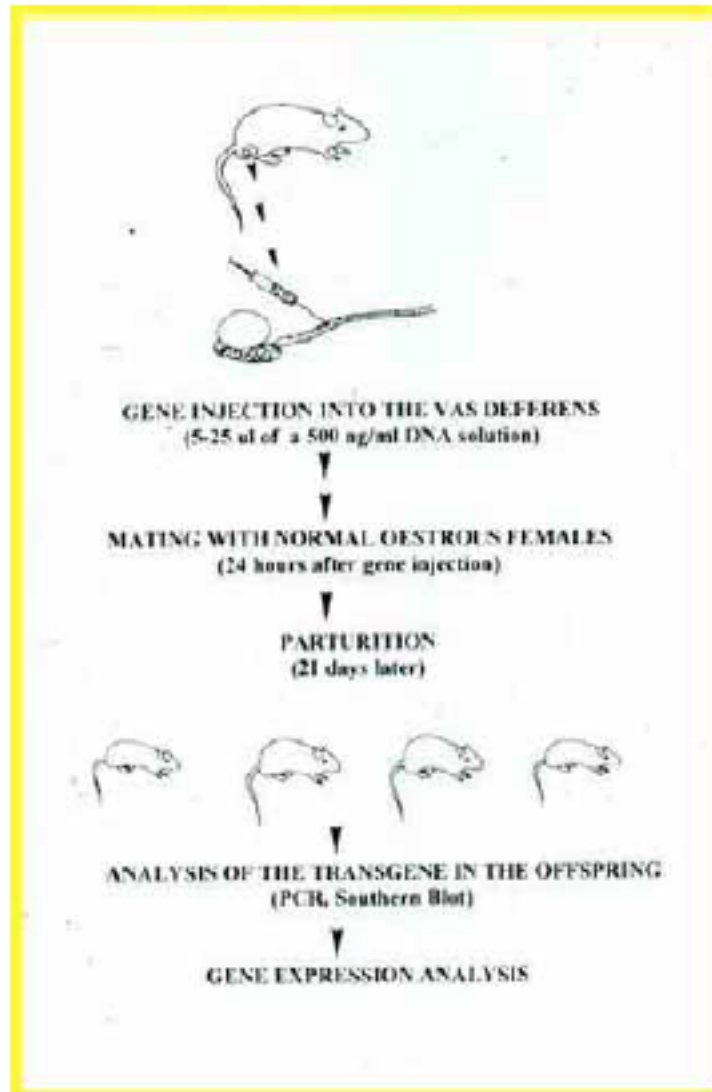


Merge

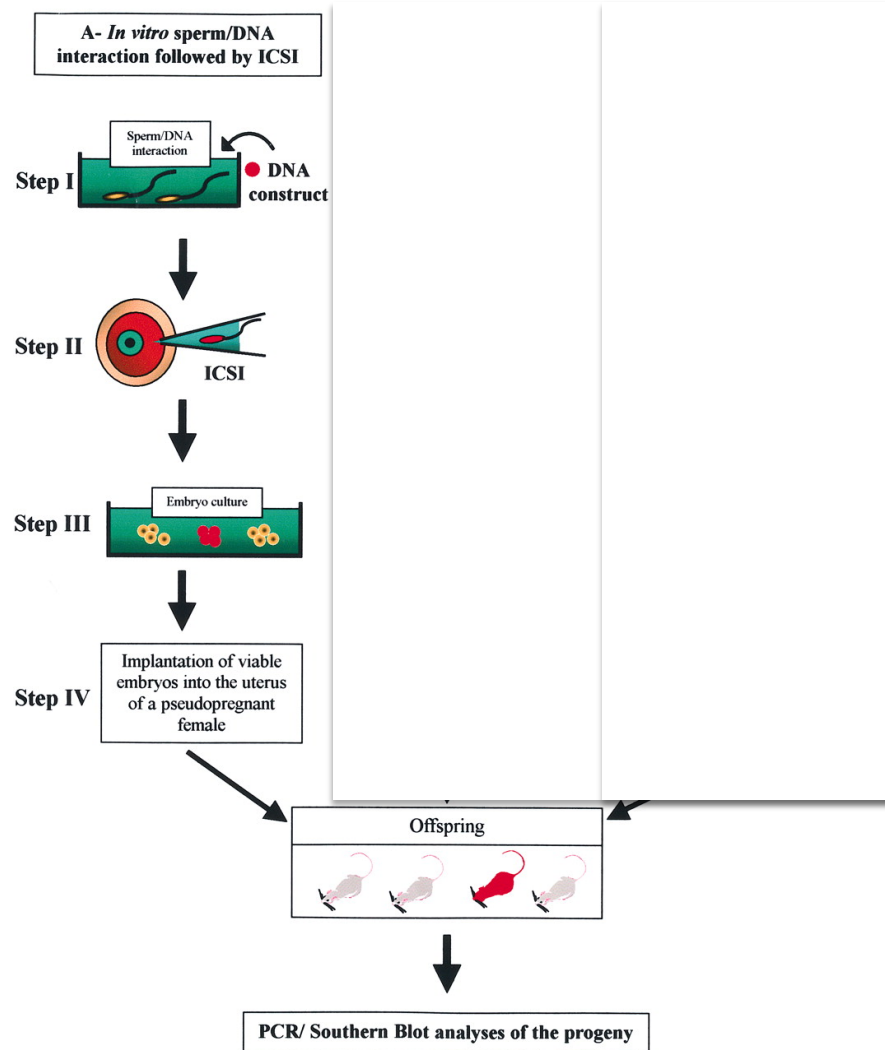
Transgenesi mediata da spermatozoi



Testis-mediated gene transfer



I tre approcci per la produzione di animali transgenici modificando i gameti maschili



Celebi C et al. Biol Reprod 2003;68:1477-1483

I tre approcci per la produzione di animali transgenici modificando i gameti maschili

Esposizione di spermatozoi eiaculati al costrutto di DNA

(a volte con pretrattamento –shock termico – permeabilizzazione – Elettroporazione - per facilitare l'uptake di DNA)

Iniezione del costrutto di DNA per vie endotesticolare (deferente -rete testis)

Iniezione intra-testicolare di germ cells modificate geneticamente (necessario eliminare le cellule germinali “residenti” prima)

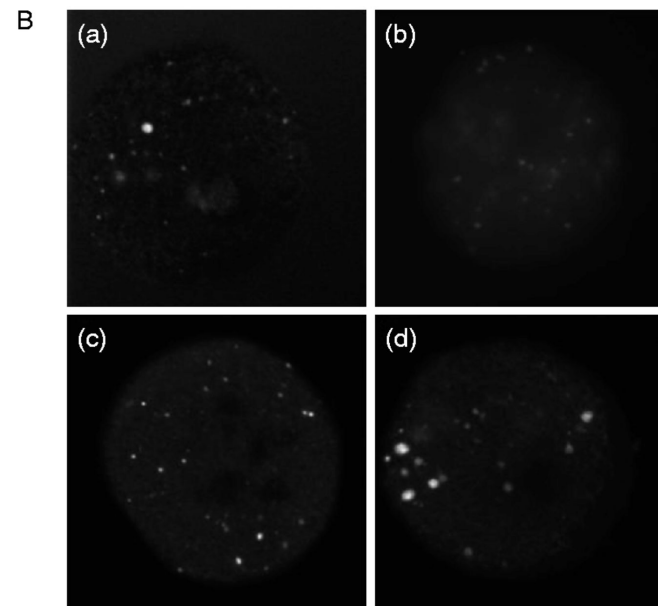
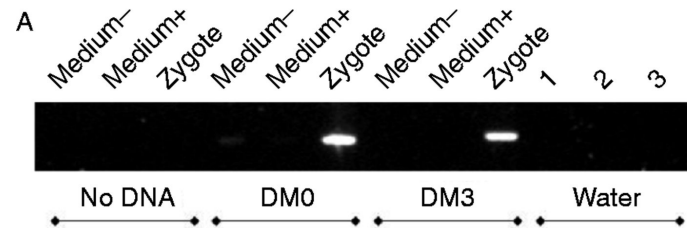
Applicazione nel topo; metodica ancora in fase sperimentale

Sinora bassa efficienza

Sperm – mediated transgenesis controversa.....

Exposure to DNA is insufficient for *in vitro* transgenesis of live bovine sperm and embryos

Shahin Eghbalsaied^{1,3}, Kamran Ghaedi², Götz Laible³, Sayed Morteza Hosseini⁴,
Mohsen Forouzanfar⁵, Mehdi Hajian⁴, Fleur Oback³, Mohammad H Nasr-Esfahani⁴ and
Björn Oback³



Gene Transferred	Objective	Achievements	Remarks
<p>Mice and Swine Human hemoglobin and specific circulating immunoglobulins (antibodies)</p>	Proteins from blood serum for blood transfusion and disease diagnosis	Genes expressed; proteins released in blood serum	Experimental stages
<p>Rabbits Human genes: Interleukin 2, growth hormone, tissue plasminogen activator, α_1-antitrypsin, etc. Bovine gene: α-lactoglobulin</p>	Molecular farming or gene farming	Genes expressed in mammary tissue; proteins harvested from milk	Experimental stage
<p>Sheep Bacterial genes cys E and cys M (genes concerned with cysteine biosynthesis) Human growth hormone</p>	Improved wool production/quality	Genes achievement in transgenic animals	
	Increased and desirable body growth	Improvements in body weight gain, feed efficiency. Fat composition, etc.	Produces joint pathology, skeletal defects, ulcers infertility, etc.
<p>Cattle, Goat, Sheep and Swine Human genes α_1 antitrypsin, tissue plasminogen activator, blood clotting factor IX, and protein C.</p>	Gene farming	Genes expressed in mammary tissue; protein secreted in milk in functional form	Experimental stages
<p>Fish Salmon or rainbow trout growth hormone</p>	Increased body growth	Upto 60% increase in size	Transgenes stably inherited; growth improve by selection.
Anti-freeze protein, α -globin gene, chicken δ -crystalline protein gene, etc.	Variable	Genes expressed in transgenic individuals	Transgenes are stably inherited.

Aumentare la quantità di latte con transgenesi (iniezione pronucleare)



Figure 1: A litter of α -LA transgenic piglets.

Transgenic sows produce up to 70% more milk than control non-transgenic litter mates. Piglets grow up to 500 gm more during a 21d lactation (Noble *et al.* 2002). © 2013 [Nature Education All rights reserved.](#)

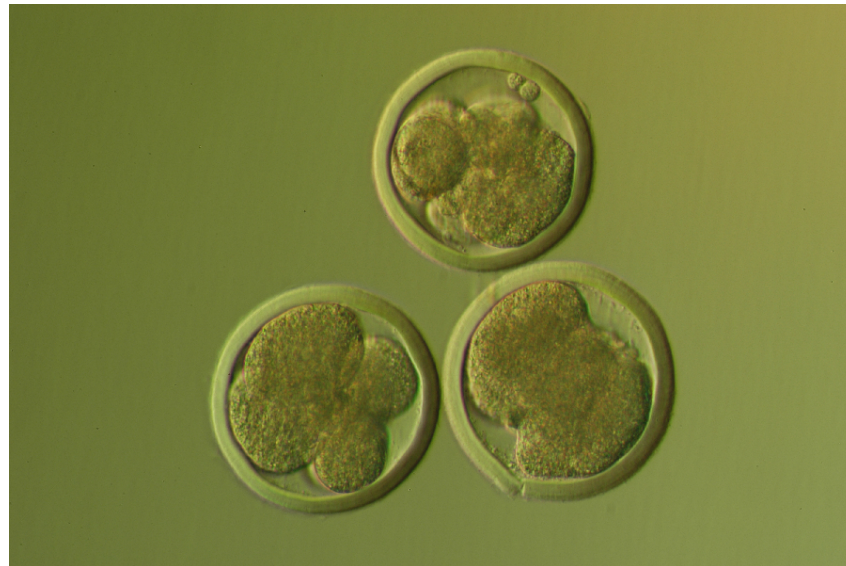
Aumentare la quantità di latte con transgenesi (iniezione pronucleare)



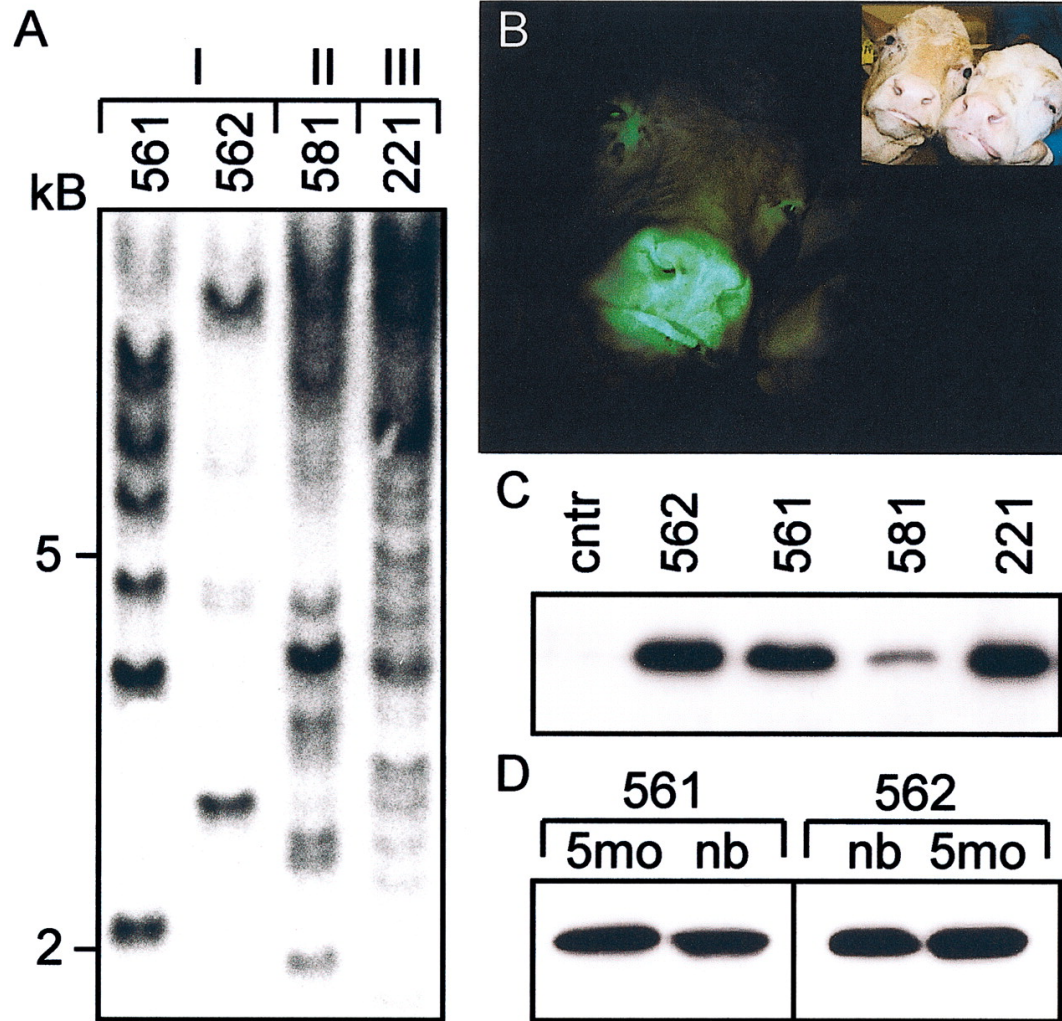
Figure 2: Can transgenic technology produce comparable milk volume? Small improvements in milk volume in Guzerat cows (left) using genetic material from high-producing Holsteins (right) could have a significant impact on Brazilian beef production (Wheeler **et al.** 2010).

© 2013 [Nature Education All rights reserved.](#)

Semplificando la transgenesi negli animali da reddito: Iniezione diretta di vettori lentivirali in oociti o embrioni

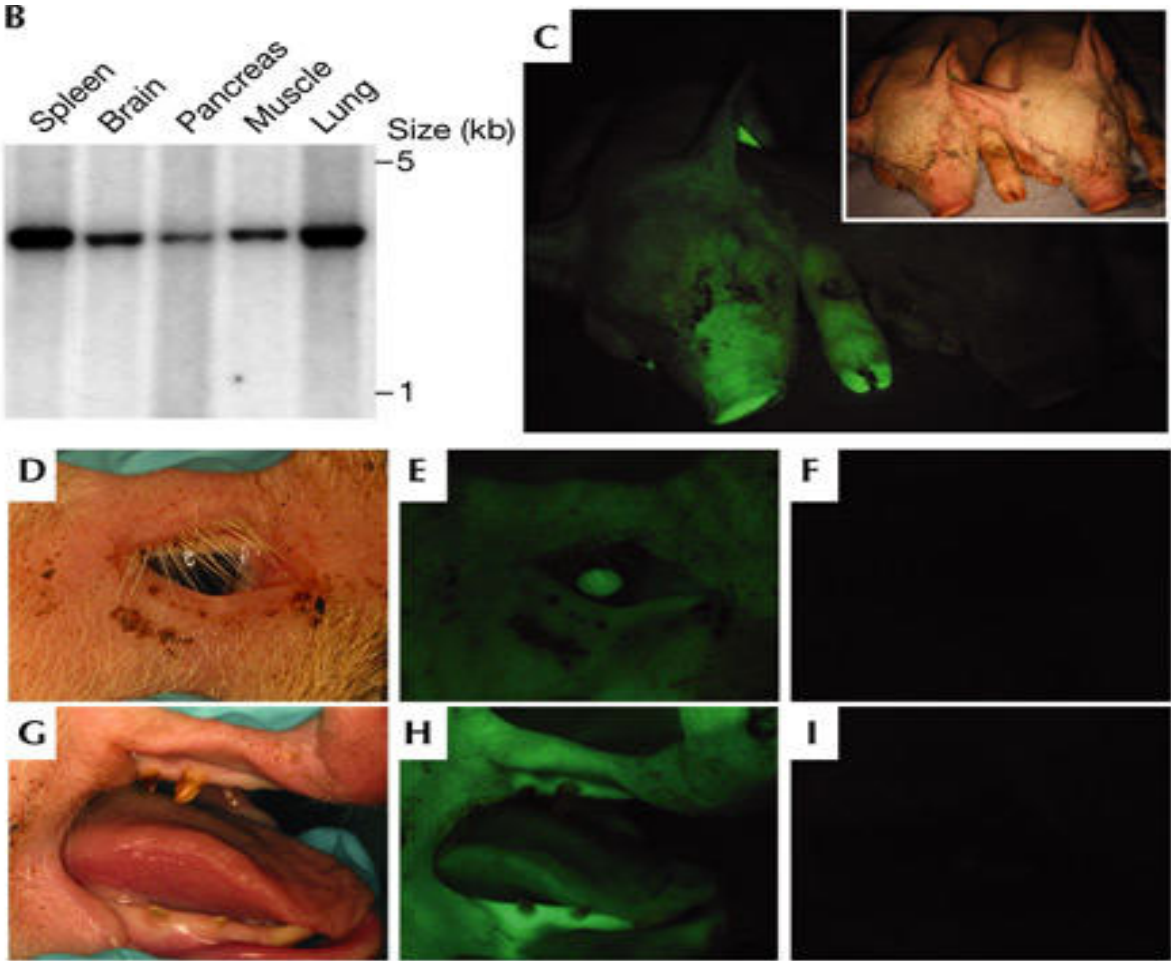


Generazione di bovini transgenici (solo GFP reporter gene)

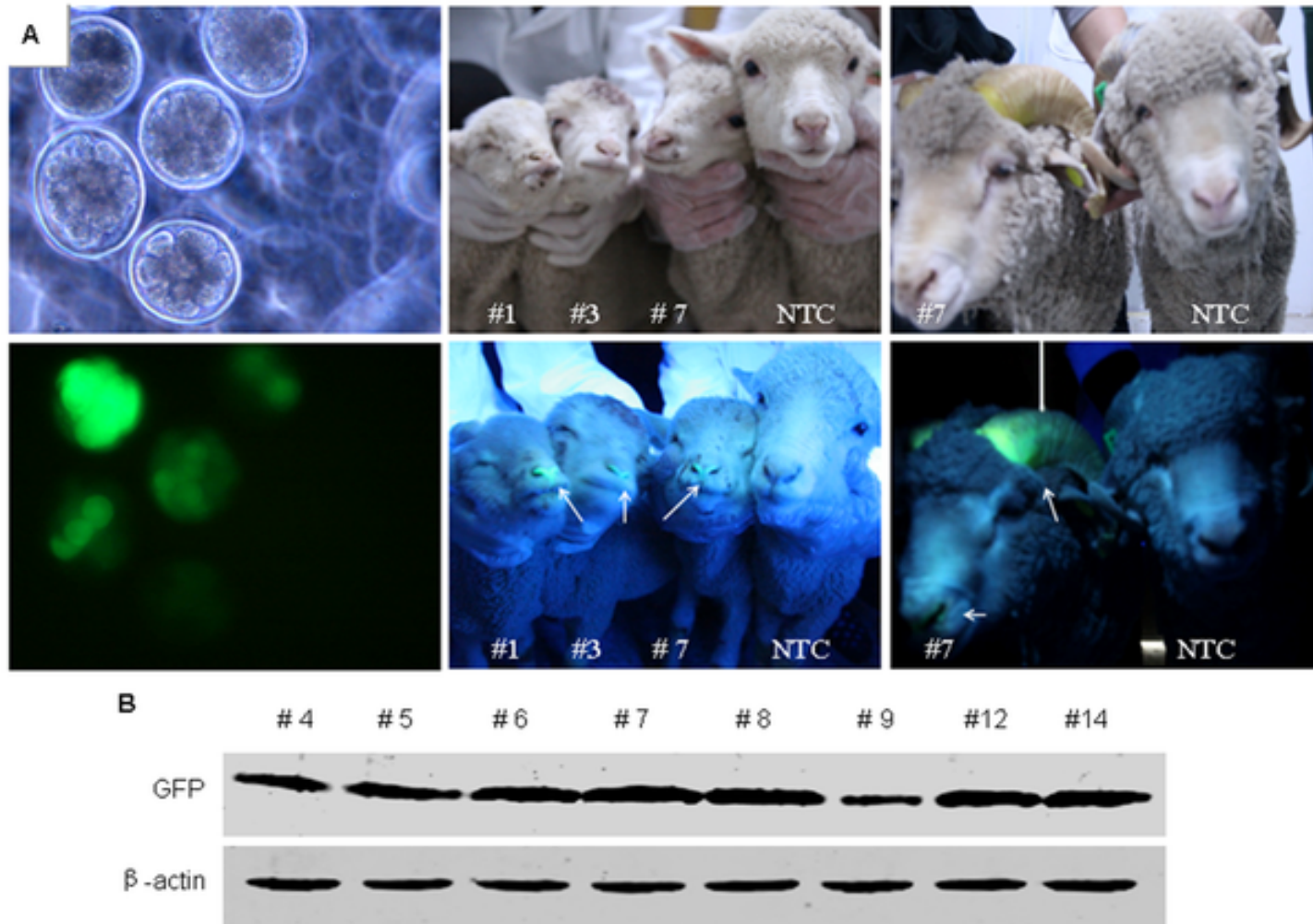


Hofmann A et al. Biol Reprod 2004;71:405-409

Generazione di suini transgenici (solo GFP reporter gene)



Generazione di suini transgenici (solo GFP reporter gene)



Liu C, Wang L, Li W, Zhang X, et al. (2013) Highly Efficient Generation of Transgenic Sheep by Lentivirus Accompanying the Alteration of Methylation Status. *PLoS ONE* 8(1): e54614. doi:10.1371/journal.pone.0054614
<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0054614>

Proteine umane prodotte da animali transgenici ottenuti con con iniezione pronucleare:

- Maiali : Factor VIII
- Ovini : Factor IX; human AAT (clinical trial phase III)
- bovini: Lactoferrin (anti-inflammatory/ Immunomodulatory)
- capre: Anti-thrombin IIIa (clinical trial phase III)

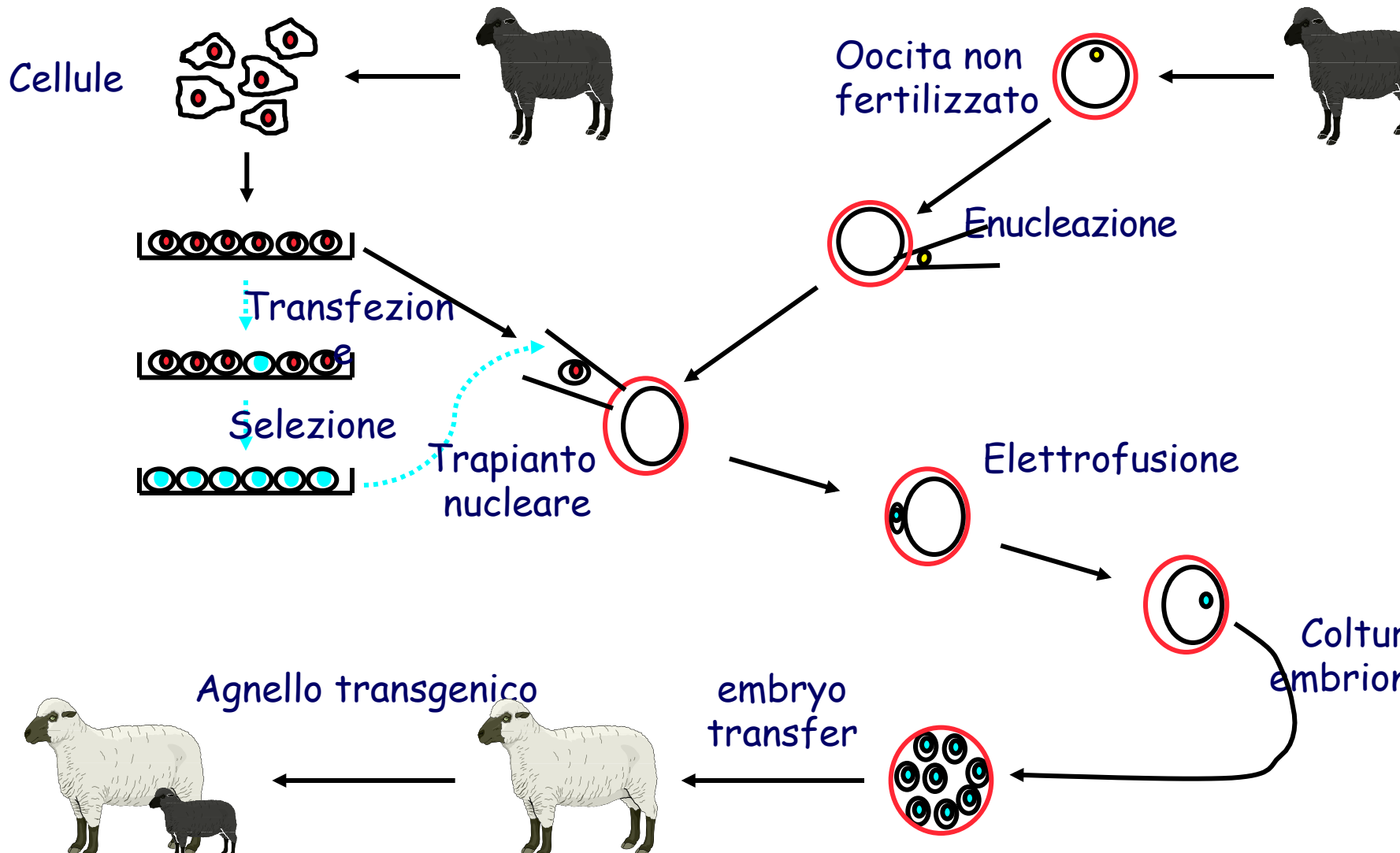
Tecnica per la produzione di transgenici più affidabile al momento

Vantaggi:

Grandi quantità (dell'ordine g/L; es. Fabbisogno del Fattore IX=2Kg/anno)

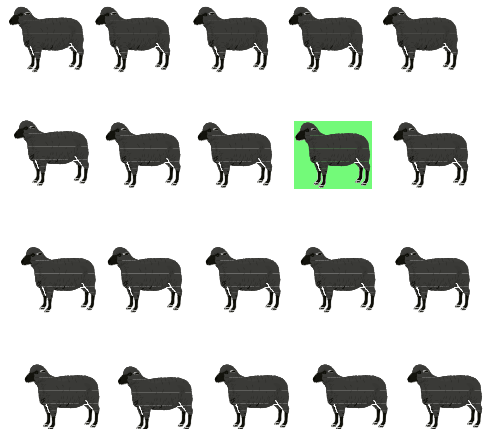
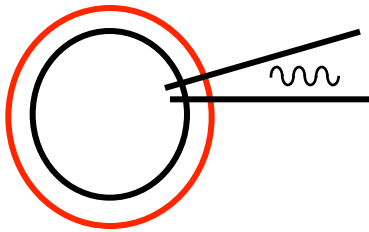
- Produzione di qualsiasi tipo di proteina

Transgenesi con Trapianto nucleare (clonazione) con cellule somatiche

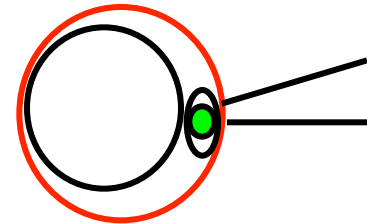
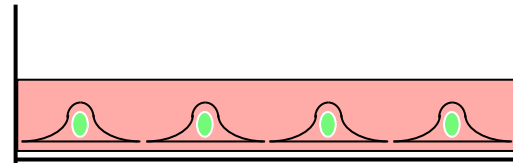


Vantaggi del trapianto nucleare

Microiniezione



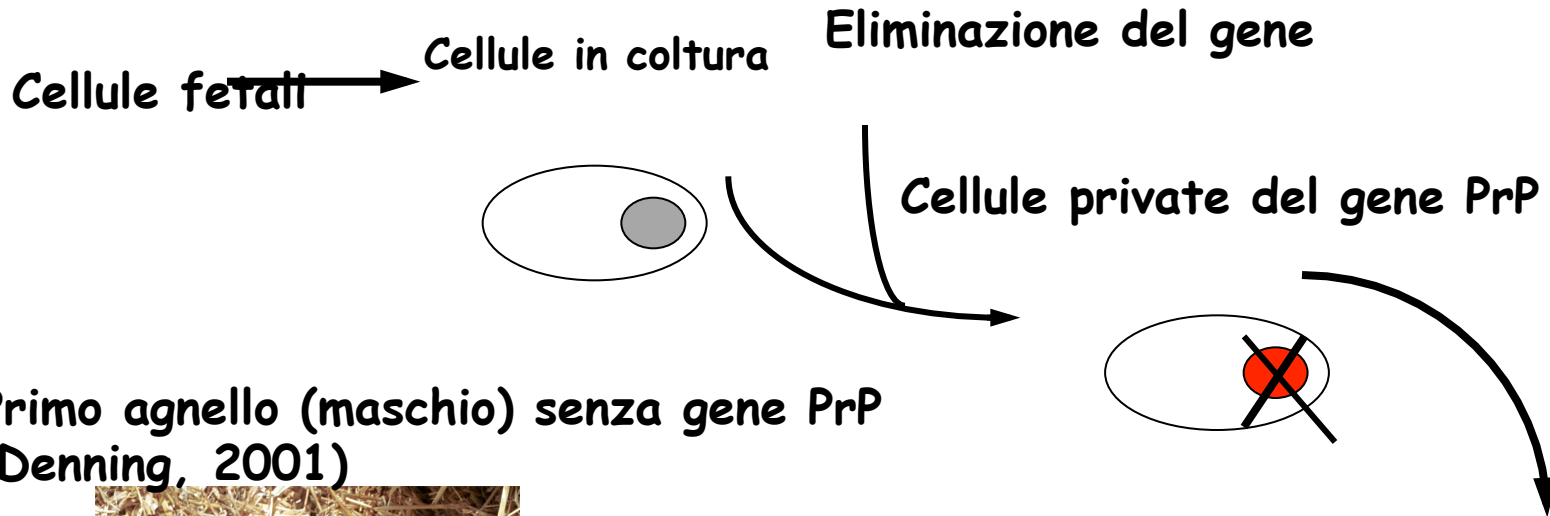
Trapianto nucleare



**Cupido e Diana – transgenici prodotti (trapianto nucleare)
con ricombinazione omologa
Esprimono la Alfa Anti-trypsin 1 (terapia fibrosi cistica).
Campbell, Nature 2003**



Eliminazione di geni endogeni (Prione)



Primo agnello (maschio) senza gene PrP
(Denning, 2001)



Clonazione

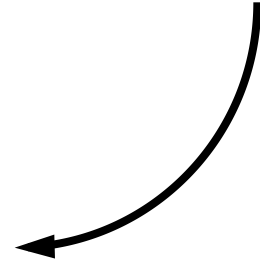




FIGURE 27.1 *PNRP* homozygous knockout cattle produced by BioDak, LLC. This cohort of genetically engineered, cloned Holstein bull calves come from a single genetically modified cell line containing a functional knockout of both alleles of the *prion protein* gene locus.



FIGURE 27.2 Genetically engineered, cloned, crossbred dairy heifers produced from a single genetically modified cell line containing a human artificial chromosome (HAC) and functional knockouts of the four alleles of the bovine immunoglobulin- μ heavy chain loci. These cattle are known as transchromosomic (Tc) bovine and the HAC they possess contains the entire repertoire of the human antibody genes. After hyperimmunization with a target antigen, these animals undergo plasmapheresis to collect large volumes of plasma containing targeted polyclonal human antibodies. The antibodies are purified from the plasma to produce human antibody therapeutics.

Transgenici per “umanizzazione” di organi suini per xenotrapianto



- Lai et al & Dai et al., 2002 reported disruption of one allele of GGTA1



MEDICAL REVOLUTION THE ORGANS THAT COULD HELP

Trials of pig tissue transplanted into humans to treat diabetes, Parkinson's disease and blindness are "imminent" but solid organ transplants - hearts, kidneys, livers - are still "several years away".

KEY ● Imminent ● Yearsaway

Pancreatic islets
to treat diabetes



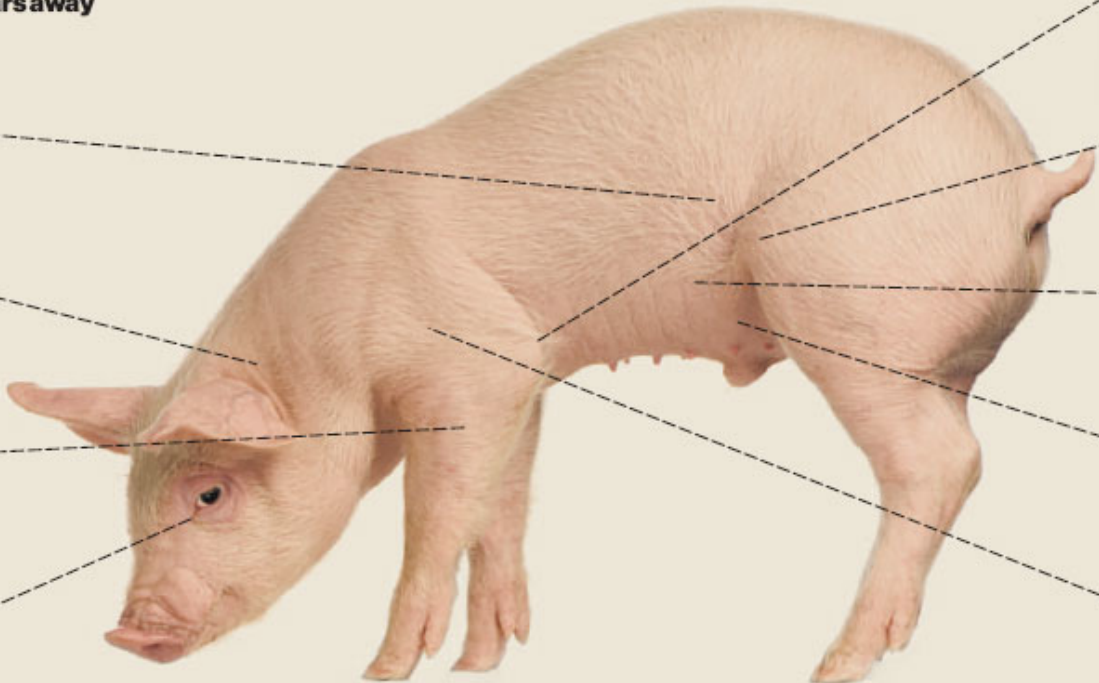
Brain cells to
treat Parkinson's
and Huntington's
disease



Red blood cells
for transfusion



Eye tissues
corneas etc.



Heart



Kidney



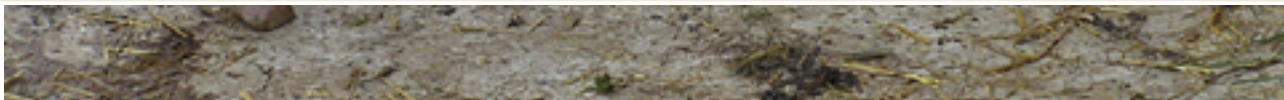
Liver



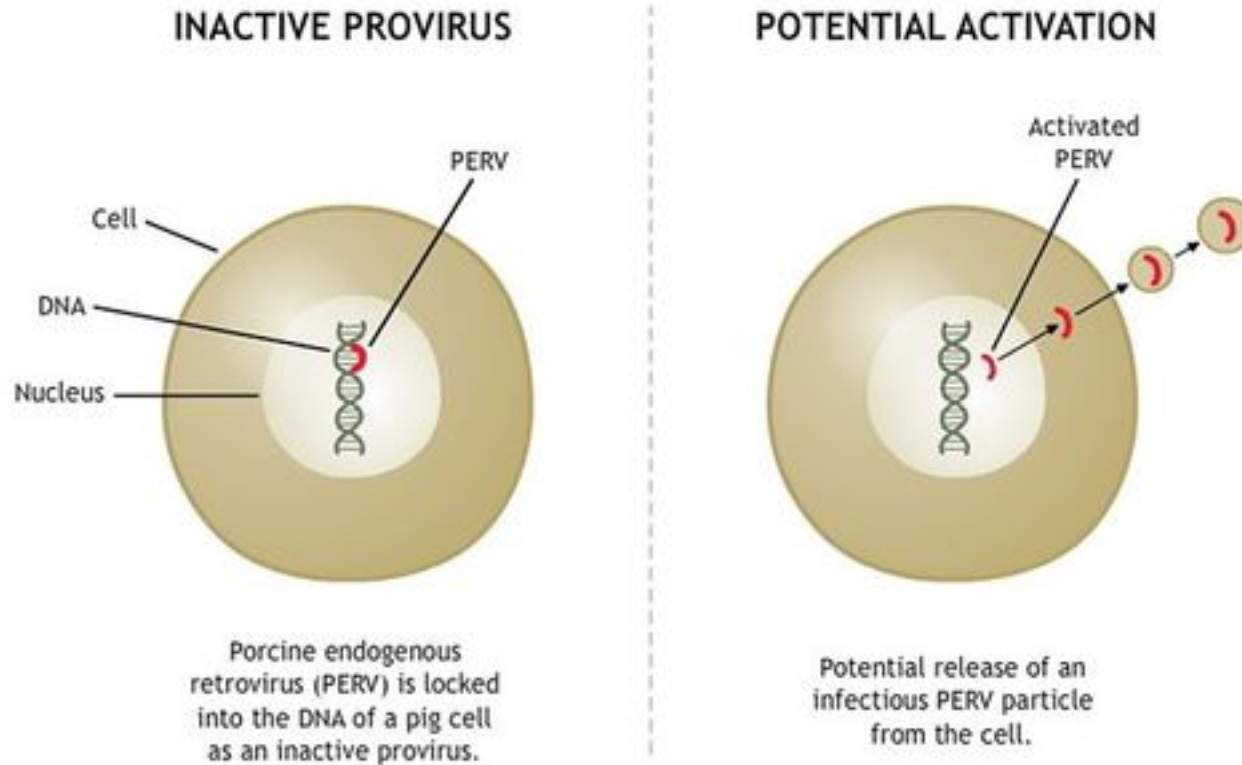
Small bowel

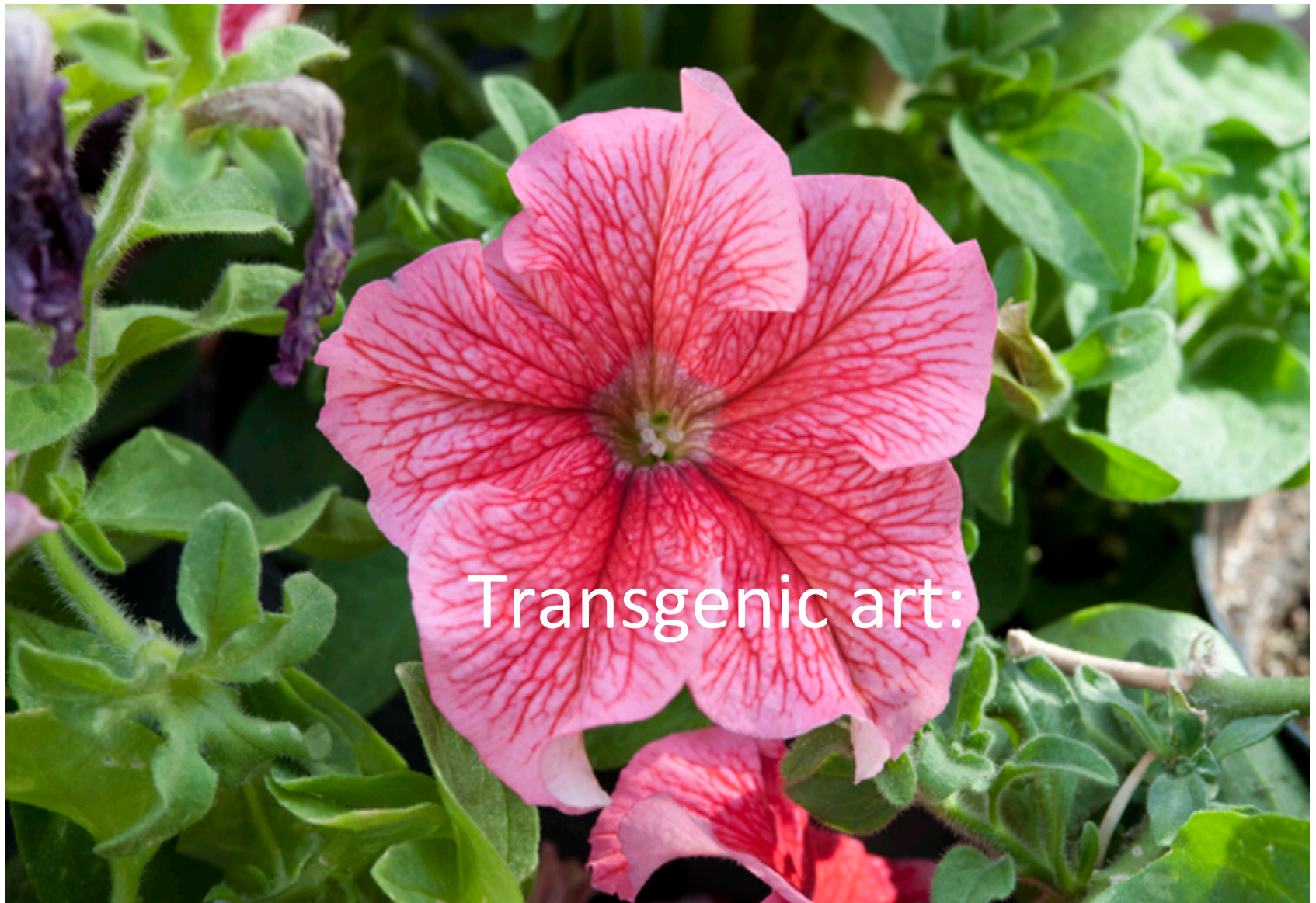


Lungs



Rischi dello xenotrapianto: Attivazione e passaggio retrovirus (suini) all'uomo





Eduardo Kac: "Edunia", a genetically engineered flower that is a hybrid of myself and Petunia. The Edunia expresses my DNA exclusively in its red veins.

Weisman Art Museum, Minneapolis, USA