

Predavanje GIO 4

Transgene stanice i životinje

Dr. sc. Višnja Bačun-Družina, izv. prof.

Tehnologija transgeneze:

- Sposobnost ciljanih genetskih promjena na molekularnoj razini predstavljala je revoluciju u biologiji. Taj napredak najviše je očitovan u proizvodnji transgeničnih životinja.
- Tehnologija transgeneze zahtjeva poznavanje različitih područja kao što su embriologija, biologija stanice i molekularna genetika.
- Transgenične životinje koriste se kao model u osnovnim istraživanjima o prijenosu gena pa sve do potencijalne kliničke primjene. Također se koriste kao bioreaktori za proizvodnju različitih proteina (hormoni, antitijela, enzimi) koji se izlučuju u krv, mlijeko, urin i ostala tkiva transgenične životinje, te za uzgoj organa i tkiva za transplantaciju.
- 1981. godine prvi put je upotrebljen naziv "transgeničan organizam" kako bi njime se opisala životinja u čiji je genom unesen egzogeni gen.
- U kasnim osamdesetima taj pojam je proširen i obuhvaćao je "gene-targeting" eksperimente i proizvodnju kimernih ili "knock-out" miševa koji ima selektivno uklonjene jedan ili više gena iz njihovog genoma. Danas pod transgeničnom životinjom podrazumijevamo organizam koji ima bilo koju specifičnu, ciljano genetsku modifikaciju.

Tehnologija transgeneze:

- Iako je 1981.g. tek prvi put definiran pojam transgeneze, istraživanja znanstvenika u tom području započela su već davne 1891.g. kad je Heape prenio embrije Angora zeca u trudnu ženku Belgijskog zeca što je rezultiralo okotom potomaka obiju pasmina. Nakon velikog napora znanstvenika na području endokrinologije ovulacije i uspostavljanja protokola superovulacije, 1945. g. prvi put je uspješno izvršen transfer mišjeg embrija. Tehnologija rekombinantne DNA započela je svoj razvoj 1973.g. i ona je označila novu eru u biologiji, te znatno utjecala na razvoj tehnologije transgeničnih životinja.
- Najčešće metode koje se koriste u proizvodnji takvih životinja jesu:
 - modifikacija zametne linije gameta
 - mikroinjektiranje DNA ili konstrukta gena u zigotu
 - unošenje modificiranih stanica (uključujući i ES stanice) u embrij u kasnijoj fazi razvitka

- Poslije modifikacije gameta ili embrija, embriji se unose u ženku recipijenta gdje dolazi do njihovog sazrijevanja i razvitka transgenične životinje.

Metode genetske modifikacije:

- I. **Mikroinjektiranje DNA**
- II. **Transfer gena pomoću retrovirusa**
- III. **Tehnologija embrionalnih matičnih stanica**
- IV. **Transplantacija jezgre**
- V. **Uporaba mitohondrijskog genoma**
- VI. **Muška gameta kao vektor**
- VII. **"Gene knockdown" i tehnologija interferirajuće RNA**

I. Mikroinjektiranje DNA

Mikroinjektiranje je metoda kojom se uvodi DNA u stanicu pomoću vrlo tanke pipete (mikroinjekcije) kroz koju se u stanicu (najčešće u zigotu) ubrizgava pikolitarski volumen otopine koja sadrži rekombinantnu DNA. Mikromanipulator kojim se pridržava stanica u koju želimo unijeti DNA.

Koristeći zigotu kao stanicu recipijenta, transgen će se nalaziti u svakoj stanici stanici životinje koja će se iz te zigote razviti, dok ako se kao recipijent koristi blastomer koji je prošao nekoliko mitozu prije integracije transgena, samo neke stanice embrija će sadržavati transgen (mozaična životinja).

- Linearni DNA konstrukti lakše se integriraju u genom domaćina, za razliku od zatvorene, kružne DNA. Pri uvođenju velikih DNA konstrukata kao što su bakterijski i kvašćevi umjetni kromosomi (BAC i YAC vektori) može doći do fragmentiranja DNA tijekom mikroinjektiranja.
- Mikroinjektirani genski konstrukt većinom se nasumično integrira u genom domaćina.
- Regulatorni elementi koji se nalaze blizu mjesta integracije imaju glavnu ulogu u razini ekspresiji unesenog gena, a budući da je ta integracija nasumična, ekspresija transgena značajno varira, ovisno o mjestu integracije transgena.



Slika 1.

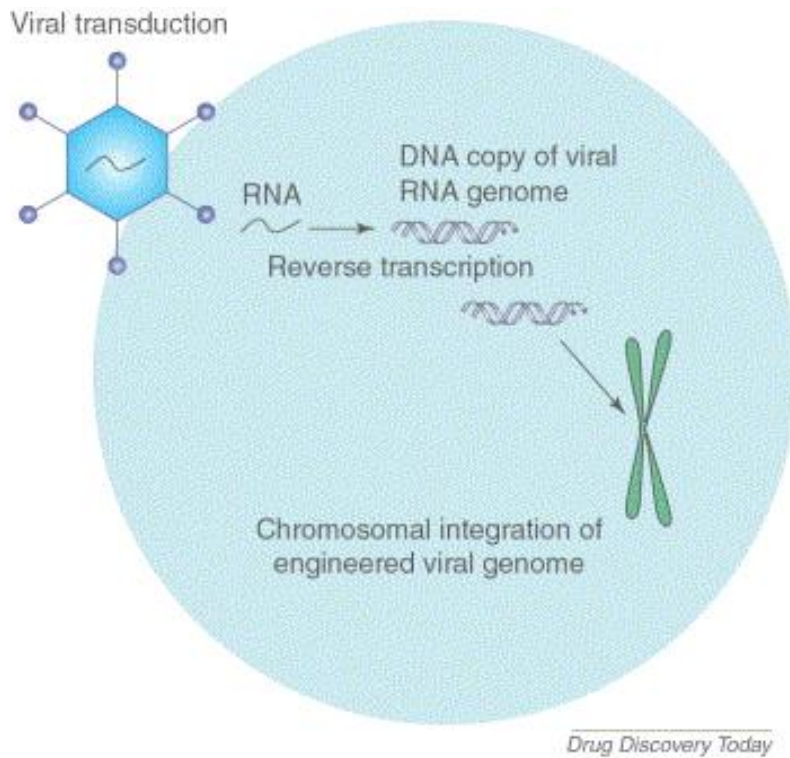
II. Transfer gena pomoću retrovirusa

U postupku dobivanja transgeničnih životinja najčešće se inficiraju embriji u fazi 4-16 stanica s jednim ili više rekombinantnih retrovirusa koji sadrže transgen.

Nakon infekcije (samo se mitotički aktivne stanice transduciraju) RNA genom retrovirusa se pomoću enzima reverzne transkriptaze prevede u DNA kopiju viralnog genoma te se on nasumično integrira u genom domaćina pomoću enzima integraze.

Zbog sigurnosnih razloga, retrovirusi se prethodno modificiraju uklanjanjem strukturnih gena *gag*, *pol* i *env*, ili se koriste virusi koji mogu inficirati samo modelni organizam (npr. miš ili štakor).

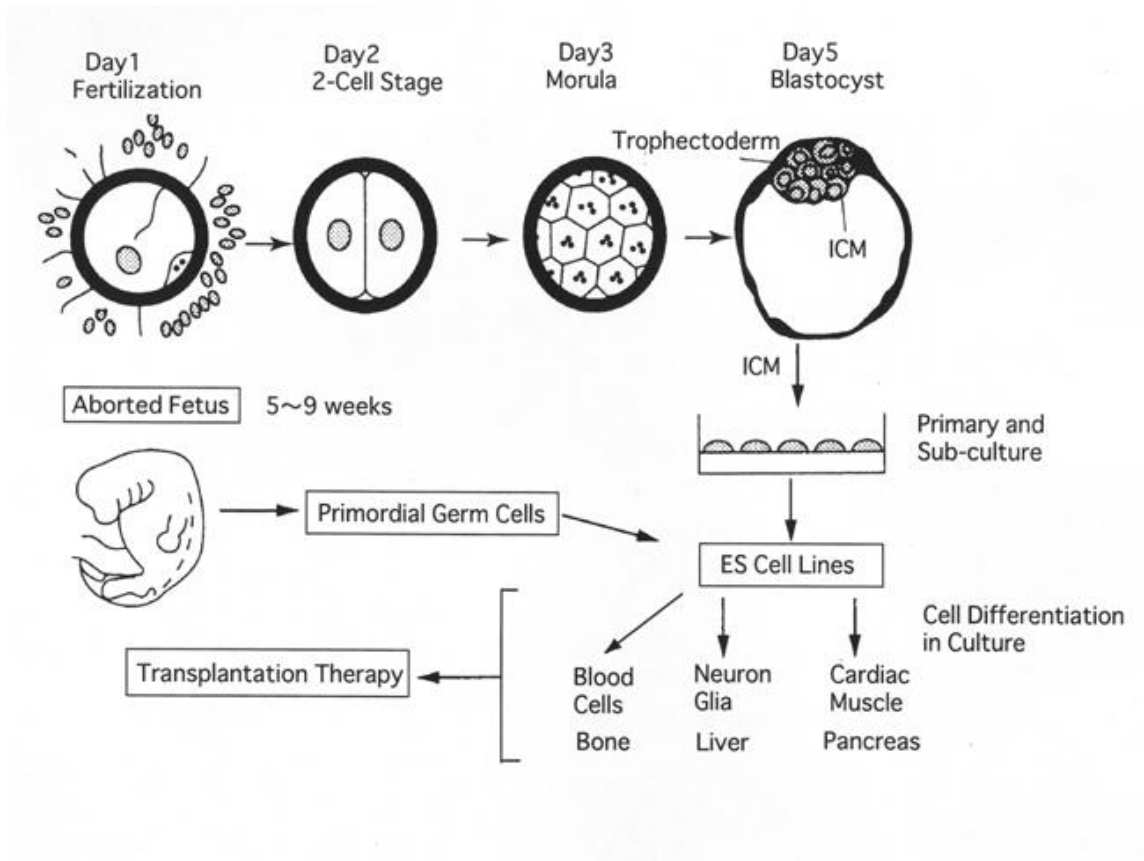
Prednosti ove metode su 100%-tna učinkovitost transfera gena, dok su nedostaci nasumična integracija DNA virusa, mali broj kopija transgena, ograničena veličina genetskog materijala koji želimo inserirati ovim postupkom (do 15kb), visoka učestalost mozacizma te nestabilna ekspresija.



Slika 2.

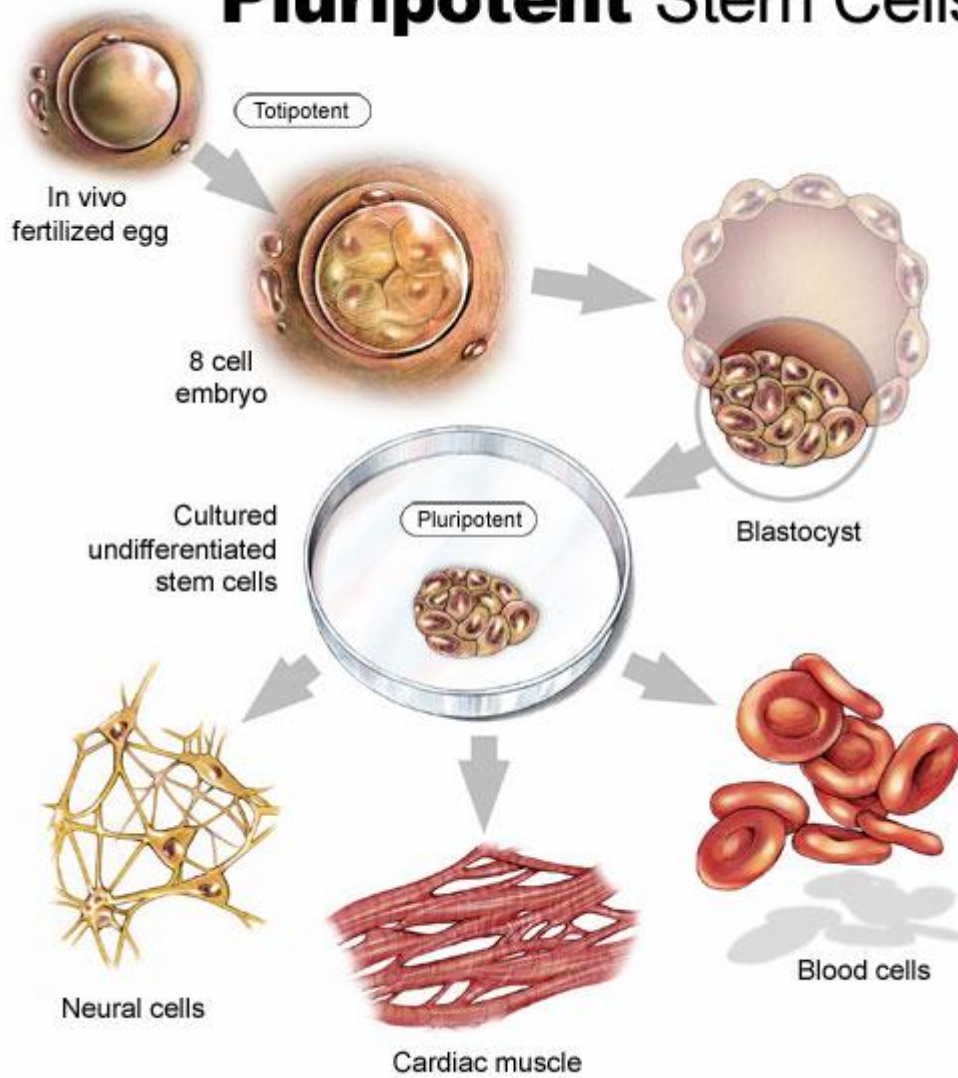
III: Tehnologija embrionalnih matičnih stanica

- Embrionalne matične stanice (ES stanice) su nediferencirane stanice kultivirane iz embrija u ranoj fazi razvitka koje imaju potencijal razviti se u bilo koju visoko specijaliziranu stanicu.
- ES stanice vrlo su pogodne za izvođenje različitih *in vitro* manipulacija kao što su uvođenje stranih DNA sekvenci pomoću elektoporacije, mikroinjektiranja, transfekcije, te retroviralna insercije gena.
- Nakon genetske manipulacije, ES stanice se direktno injektiraju u blastocist (faza od 64-128 stanica), te se blastocist unosi u surogat majku kako bi se dalje razvijao. Ovim postupkom nastaje kimera, organizam koji u pojedinim stanicama nosi određen gen (potječe od manipuliranih ES stanica).
- Najveći problem ove tehnologije je proizvodnja, karakterizacija, održavanje ES stanica u nediferenciranoj fazi i održavanje njihove pluripotentnosti.

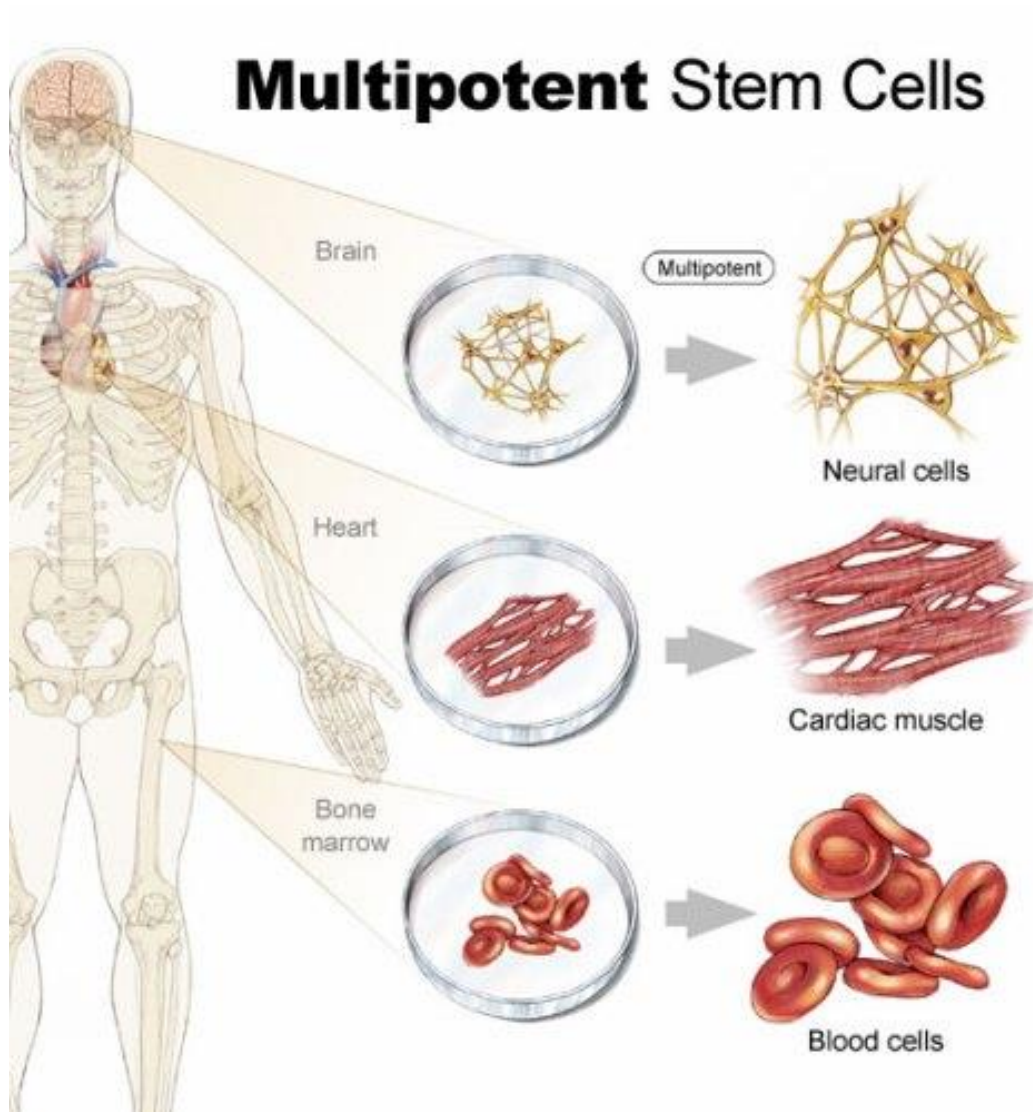


Slika 3.

Pluripotent Stem Cells



Slika 4.

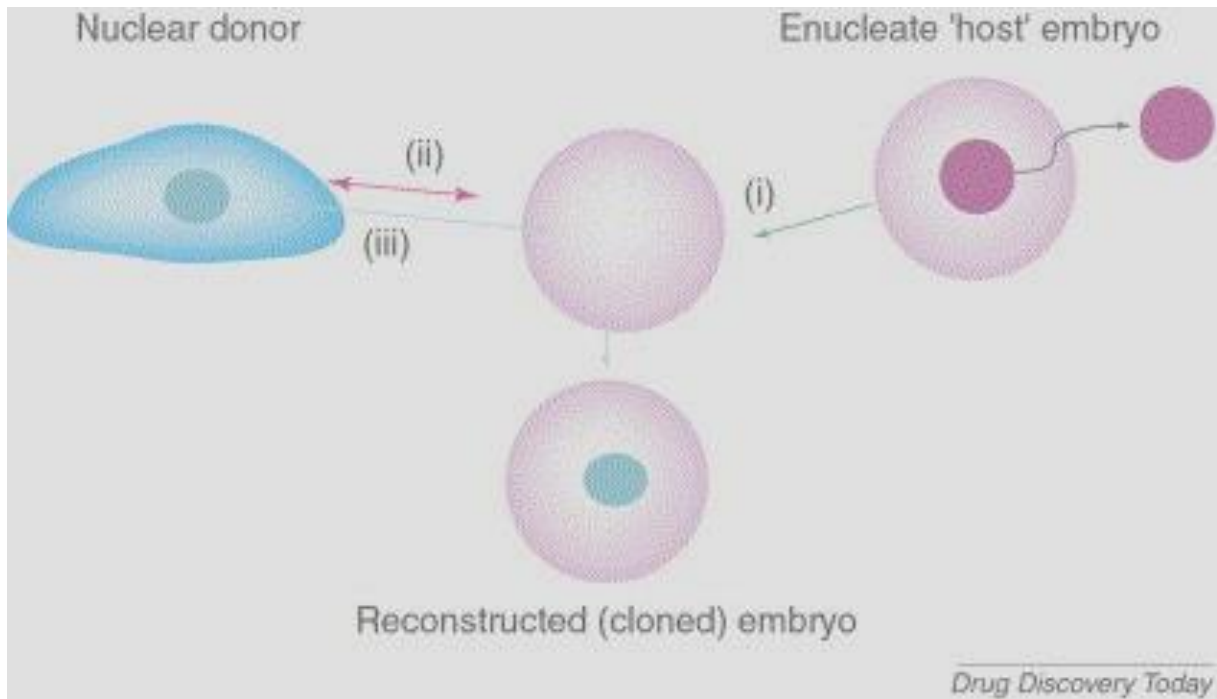


Slika 5. Shematski prikaz izvora matičnih stanica

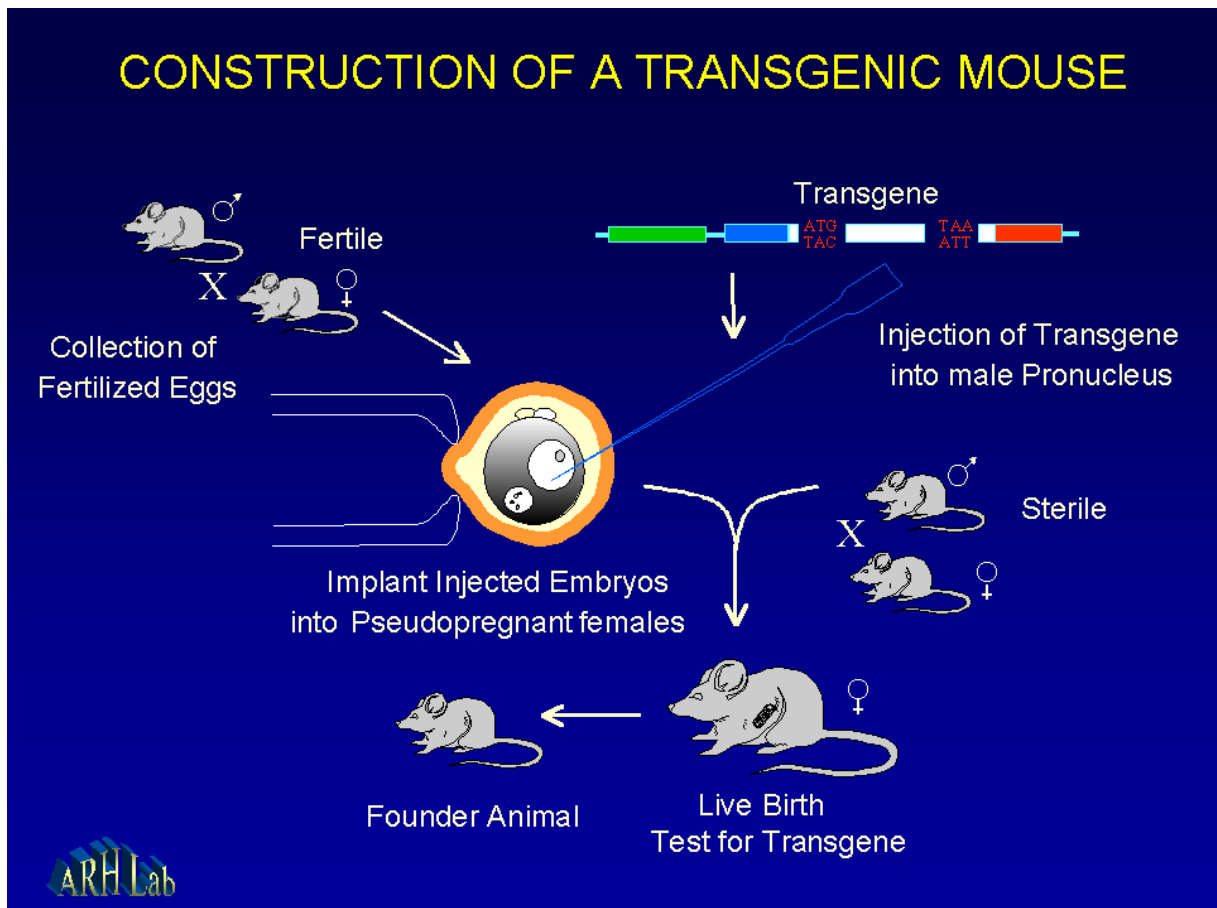
IV. Transplantacija jezgre

Transplantacija jezgre (eng. nuclear transfer) označava uvođenje jezgre donora (ES stanica ili neke diferencirane, specijalizirana stanica) u obezjegnenu (enukleiranu) oocitu. Rekonstruirana oocita se zatim prenosi u surogat majku kako bi se dalje razvijala.

Nuklearnim transferom zapravo nastaje stanica koja u vlastitoj citoplazmi (s vlastitom mitohondrijskom DNA) nosi tuđu jezgru s njezinom DNA. Stanica-davateljica jezgre provlači se kroz mikropipetu tako dugo dok joj se ne razori stanična membrana, a zatim se cijeli sadržaj ubrizga u obezjegnenu stanicu-primateljicu. Zapravo se događa stapanje ili hibridizacija dviju stanica.



Slika 6.



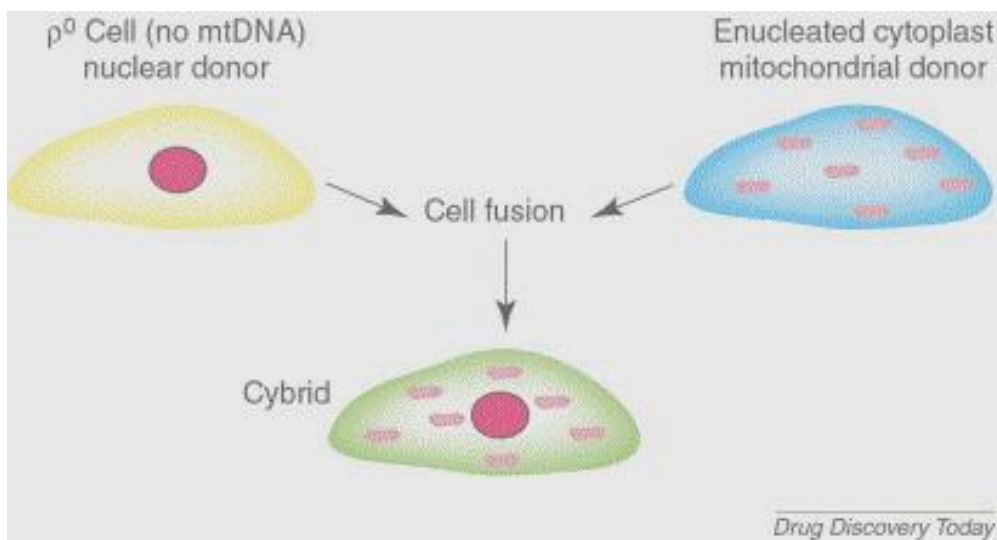
Slika 7. Shematski prikaz konstrukcije transgeničkog miša

V. Uporaba mitohondrijskog genoma

- Tek nedavno posvećena je pažnja važnosti mitohondrijskog genoma u proizvodnji transgeničnih životinja. Sposobnost manipulacije mitohondrijskog genoma i regulacija ekspresije mitohondrijskih gena pridonijeti će razvoju novih metoda u manipulaciji sisavaca.
- Razvitak ovog područja uvelike će pridonijeti boljem razumijevanju dinamike mitohondrija, dobivanju novih genetski modificiranih organizama ali i boljem razumijevanju ljudskih bolesti koje su posljedica mutacija u mitohondrijskom genomu, te u liječenju takvih bolesti.

Evolution: Out Of Africa Theory (Mitochondrial Eve)

- <http://www.youtube.com/watch?v=UNUwIE6iudo>
- Tehnika nazvana "mitohondrijski transfer" podrazumijeva fuziju stanice bez jezgre donora mitohondrijskog genoma s ρ^0 stanicom (stanica kojoj je odstranjen mitohondrijski genom), kako bi dobili stanice koje su hibrid između stanice donora mitohondrija i stanice domaćina.



Slika 8.

VI. Muška gameta kao vektor

- Genetski modificirane spermatogonije unose se u testise koji nemaju zametne stanice te se u njima dijele i proizvode stanice spermatocite iz kojih djeljenjem i sazrijevanjem nastaju fertilni spermiji.
- Pluripotentne spermatogonijske matične stanice uspješno su izolirane i mogu se uzgajati uz očuvanje njihove sposobnosti proliferacije.

Primjena transgeničnih životinja u medicini i farmaciji

- Transgenične životinje kao modeli za humane bolesti

- Farmaceutski proizvodi dobiveni iz transgeničnih životinja
- Ekspresija imunoglobulina u transgeničnim životinjama

(Transgenic Animals

<http://www.youtube.com/watch?v=zZwiL2gmByw>)

- Ksenotransplantaci

Transgenične životinje kao modeli za humane bolesti

- **Modeli za proučavanje** (imunoloških, neuroloških, reproduktivnih i hematoloških poremećaja te modeli za proučavanje pretilosti.)

-Proučavanje genetskih osnova bolesti u ljudi i životinja, kreiranje i testiranje strategija liječenja bolesti

-Otpornost na bolesti u ljudi i životinja

- **Testiranje lijekova i praćenje njegovog djelovanja u organizmu kada se u t. ž. nalazi humani gen**

(toksikološka istraživanja na transgeničnim životinjama kako bi se odredila farmakokinetika i efikasnost lijeka te njegova potencijalna štetnost za organizam)

- **Proizvodnja proteina u transgeničnim životinjama** (Uporaba transgeničnih životinja kao bioreaktora umjesto tradicionalne uporabe mikroorganizama i kultura animalnih i biljnih stanica, pogotovo u proizvodnji kompleksnih molekula)

Ekspresija imunoglobulina u transgeničnim životinjama

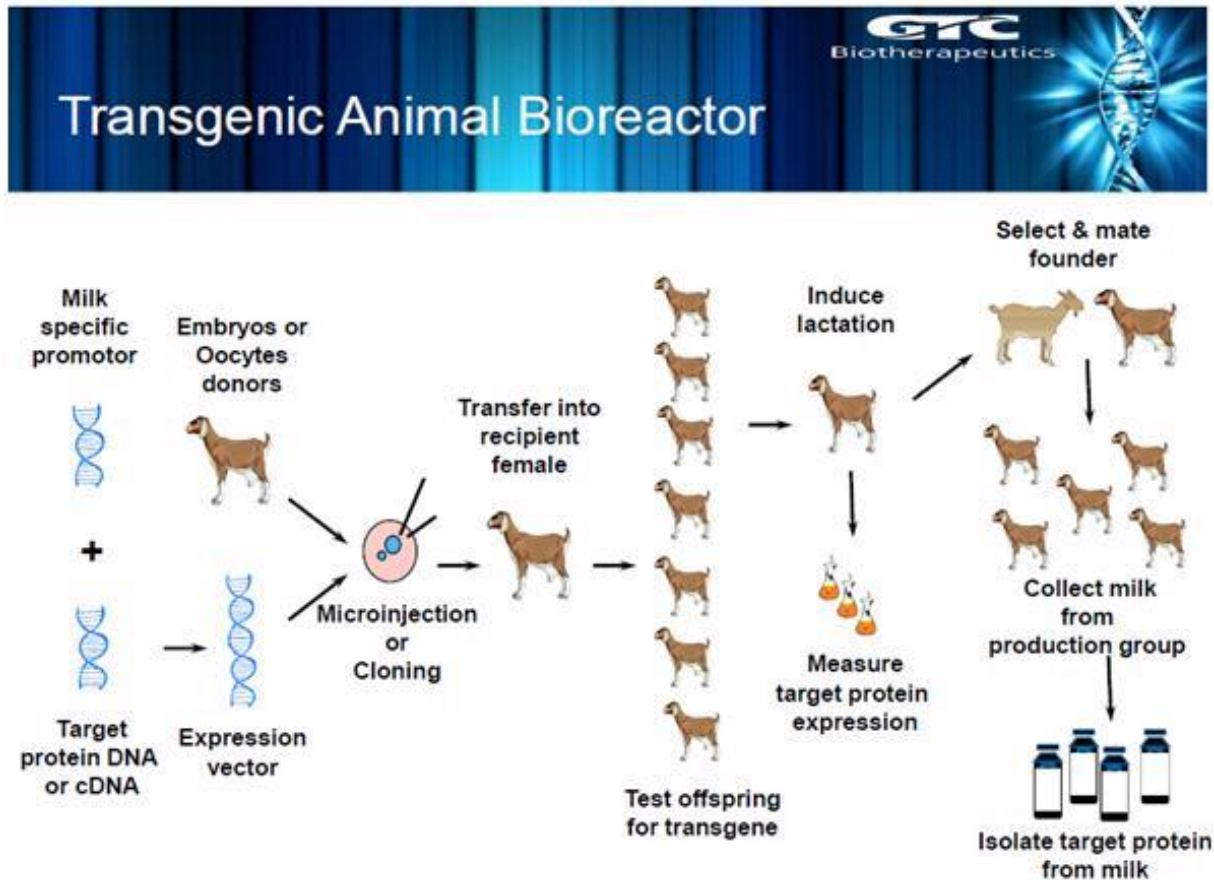
- Proizvodnja imunoglobulina započinje mikroinjektiranjem velikih fragmenata humane DNA koji sadrže Ig lokus u zigotu te razvitkom zigote u surogat majci. Transgenična životinja koja se razvije iz zigote ima ulogu bioreaktora te u njezinim B-limfocitima dolazi do ekspresije humanih antitijela za specifične antigene. Ovisno o imunoglobulinu koji se želi na ovaj način proizvesti, vrši se imunizacija s određenim antigenom kako bi se potakla ekspresija ciljanog imunoglobulina.

Farmaceutski proizvodi dobiveni iz transgeničnih životinja

Proizvodnja proteina koji se koriste u terapijske svrhe, koristeći transgenične životinje, uključuje ekspresiju transgena s promotora stanica mliječnih žlijezda kako bi se protein izlučivao direktno u mlijeko. Također se može koristiti ekspresija gena s promotora stanica mliječnog mjehura kako bi

došlo do sekrecije proteina u urin. Ovim metodama može se sakupljati proteinski produkt tijekom čitavog životnog vijeka transgenične životinje.

- Mnogi humani proteini zahtijevaju postranslacijske modifikacije kako bi dobili aktivan oblik, što se ne može postići u mikrobnim bioreaktorima kao što je *E. coli*, već samo u viših eukariota.



Slika 9. Shematski prikaz konstrukcije transgenih životinja i dobivanje željenog produkta

Ksenotransplantacija

- Ksenotransplantacija označava prijenos organa životinje jedne vrste u organizam životinje druge vrste. Problem takve vrste transplantacije je obrambeni mehanizam primaoca, tj. posebno snažna imunološka reakcija koja uništava strani organ u nekoliko minuta.
- Najbolji izbor za donora organa zbog svojih fizioloških, anatomskih i etičkih razloga jest svinja. Unošenjem gena koji

kodiraju za humane proteine-regulatore

komplementa u embrij svinje premoštena je

imunološka barijera pri transplantaciji organa iz

takve transgenične svinje u ljudski organizam.

Danas transplantacija ljudskih organa uz lijekove za uklanjanje imunološkog odgovora.

VII. "Gene knockdown" i tehnologija interferirajuće RNA

- "Gene knockdown" je postupak kojim nastaje modificirani organizam koji nosi jedan ili više gena sa smanjenom razinom ekspresije u odnosu na ekspresiju u normalnim uvjetima. Nova "Gene knockdown" tehnologija obuhvaća i uporabu antisens oligonukleotida kako bi se smanjila ekspresija određenog gena (nastaje hibrid antisens oligonukleotid-mRNA). Ova tehnologija koristi se u istraživanju gena čija funkcija još nije razjašnjena (reverzna genetika).
- "Short interfering" RNA (siRNA) egzistira u dvolančanom obliku i inhibira ekspresiju gena na temelju homologije komplementarne sekvence. *In vivo* pokusima pokazano je da je siRNA učinkoviti uklanja mRNA i sprječava sintezu određenih proteina.