

EKSPERIMENTALNE TRANSGENE ŽIVOTINJE

Katarina Kukuruzović

UVOD

Transgene životinje su one životinje koje nose strani gen (neogen), namerno insertovan ("knock-in") u njihov genom. U genom životinja se neogen ubacuje bez izbacivanja starih gena iz genoma ("knock-in" eksperimentalne životinje). Taj uneti strani gen se zatim prenosi iz generacije u generaciju. Ovakve životinje se koriste u raznim eksperimentima, naročito kada za *in vivo* uslove ne postoji adekvatan model za istraživanje. Npr., životinje nisu spontano osjetljive na HPV (humani papilomavirus), pa su u ispitivanju HPV-zavisnog karcinoma vulve transgene životinje jedan od načina za korišćenje animalnog eksperimentalnog modela. Najčešće se za ispitivanje karcinoma vulve koriste transgeni miševi u koje su ubačeni geni koji produkuju HPV onkoproteine. HPV16 kodira E6 i E7 onkoproteine, koji menjaju normalne funkcije ćelije domaćina, ometajući normalnu diferencijaciju i apoptozu. E6 i E7 onkoproteini karcinoma vulve eliminišu p53 protein, koji je produkt tumor-supresorskog gena ćelija domaćina. Ovo je rezultat istraživanja koje je sprovedeno na transgenim miševima, kojima su u genom genetskim inženjeringom ubačeni neogeni koji produkuju HPV16 E6 i HPV16 E7 onkoproteine (1). Transgene životinje se, takođe, koriste u studijama regulatornih genskih mehanizama, za proučavanje homeostatskih sistema, kao eksperimentalni modeli humanih bolesti i stanja, u toksikologiji kao test organizmi i u biotehnologiji za proizvodnju specifičnih proteina.

METODOLOGIJA DOBIJANJA NEOGENA

Strani gen se formira pomoću rekombinantne DNK metodologije. Rekombinantna DNK je ona DNK koja je uzeta iz nekoliko izvora i inkorporisana u jedan molekul DNK, koji će kao neogen biti insertovan u genom domaćina. Kao što je prikazano na slici 1, metodologija dobijanja rekombinantne DNK je kompleksna i obuhvata nekoliko koraka:

1. DNK oba izvora se tretira jednom restrikcijom endonukleazom, koja iseca molekule na istim delovima. Na slici 1 je prikazano dejstvo BamHI restrikcione endonukleaze, koja na oba molekula iseca sledeći deo:

5' GGATCC 3'
3' CCTAGG 5'

2. Krajevi molekula na mestu isecanja dela ostaju sa slobodnim jednolančanim delovima, koji se nazivaju

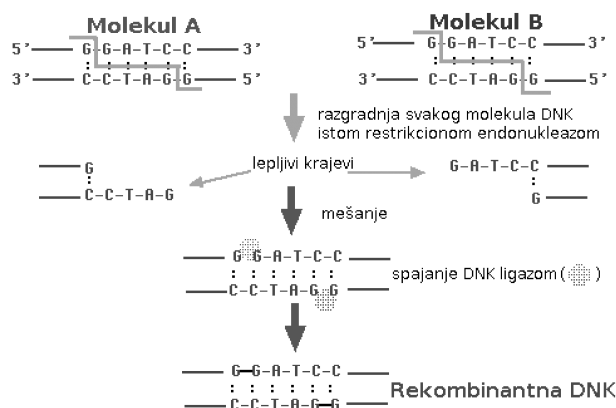
"lepljivi krajevi", jer imaju afinitet za sparivanje baza sa bilo kojim DNK molekulom koji ima komplementarni "lepljivi kraj",

3. Mešanjem ovako pripremljenih DNK sa komplementarnim "lepljivim krajevima", baze molekula DNK se sparuju,

4. DNK ligaza kovalentnim vezama povezuje dva molekula DNK u jedan molekul rekombinantne DNK, odnosno neogen.

Pravljenje velikog broja identičnih kopija istog rekombinantnog molekula DNK neogena naziva se kloniranje rekombinantne DNK. Kloniranje rekombinantne DNK može da se vrši:

- *in vitro*, pomoću procesa PCR (engl. polymerase chain reaction), i
- *in vivo*, koje može biti u jednoćelijskim mikrobima (na primer, *Escherichia coli*) ili u ćelijama sisara koje rastu u kulturama tkiva.



Slika 1. Postupak dobijanja rekombinantne DNK.

METODOLOGIJA UNOŠENJA NEOGENA U GENOM DOMAĆINA

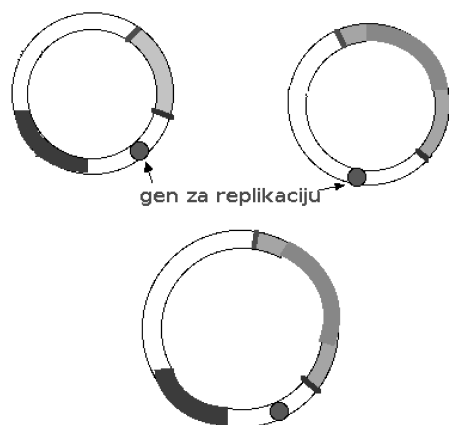
Posle kloniranja, rekombinantna DNK mora biti preuzeta od strane ćelije u onom obliku u kome može doći do replikacije i ekspresije neogena, odnosno neogen se mora ugraditi u odgovarajući deo genoma, tako da ne remeti replikaciju ćelije, a da je omogućena njegova ekspresija.

Postoje tri načina za unošenje stranog gena u genom eksperimentalnih životinja:

1. insertovanje neogena u vektor koji će svoj genetski materijal uneti u genom ćelija domaćina,
2. ubrizgavanje, neogena u fertilisanu jajnu ćeliju, i
3. manipulacija embrionalnim stem ćelijama, u koje se ubacuje neogen, a zatim se te ćelije vraćaju u eksperimentalnu životinju.

INSERTOVANJE NEOGENA U GENOM DOMAĆINA POMOĆU VEKTORA

Insertovanje neogena preko vektora u genom ćelija domaćina postiže se tako što se rekombinantna DNK prvo inkorporiše u vektor, a zatim se taj vektor sjedinjava sa ćelijama domaćina i tako se postiže inkorporacija rekombinantne DNK sa DNK ćelije domaćina. Kao vektor uglavnom služi neki od virusa ili plazmid. Plazmid je cirkularni molekul DNK koji se nalazi u bakterijama van bakterijskog hromozoma. Plazmid je veoma mali - sadrži nekoliko hiljada baznih parova, obično jedan ili nekoliko gena. Plazmidi nekih bakterija se replikuju istim mehanizmom i istom brzinom kojim se replikuje bakterijski hromozom, tako da jedna takva bakterijska ćelija ima uvek samo jednu kopiju hromozoma i jednu kopiju plazmida, a plazmidi drugih bakterija se kopiraju većom brzinom nego hromozom, tako da jedna bakterijska ćelija može da sadrži 50 ili više plazmida. Gen ili geni koji su u plazmidima uglavnom enkodiraju proteine, najčešće enzime, koji štite bakteriju od jednog ili više antibiotika.



Slika 2. Spajanje plazmida koji sadrži dva gena različitog porekla i jedan gen za replikaciju (funkcionalna kombinacija).

Uobičajenim, već opisanim postupkom rekombinantne DNK metodologije, kada se sa izvora DNK molekula ukloni restrikciona endonukleaza i obezbede uslovi za dejstvo DNK ligaze, može se napraviti plazmid, zahvaljujući komplementarnosti "lepljivih krajeva". Uglavnom postoji više mogućnosti za spajanje isečenih DNK molekula. Neki od ovih plazmida neće biti funkcionalni, naprimer oni spojevi u kojima nema ni jedan ili ima dva gena za replikaciju. Glavni problem u ovom postupku je slučajno insertovanje gena, jer se mogu dobiti i nefunkcionalne kombinacije. Spajanje plazmida koji sadrži dva gena različitog porekla i jedan gen za replikaciju (funkcionalna kombinacija) prikazan je na slici 2. Samo plazmidi sa funkcionalnim kombinacijama gena mogu dalje da se koriste za

unošenje tih gena u druge ćelije. Ukoliko se plazmid unese u bakteriju, DNK plazmida se inkorporiše u genom bakterije i transformiše bakterijsku ćeliju novim genima. Bakterija koja se najčešće koristi je *E. coli*. Ona može biti simultano transformisana pomoću više od jednog plazmida, a prisustvo rekombinantnih plazmida se kasnije može dokazati elektroforezom DNK.

Metodologija dobijanja vektora sa rekombinantnom DNK može poslužiti i za kloniranje humanih gena. Humani geni mogu da budu inkorporisani u plazmid, kojim se posle vrši transformacija *E. coli* ili gljivica, i na taj način se mogu *in vitro* proizvoditi neograničene količine humanih proteina, u terapijske svrhe.

Produkti rekombinantne DNK koji se najčešće koriste su: insulin (za terapiju *diabetes mellitus*-a), faktor VIII koagulacije (za terapiju hemofilije A), faktor IX koagulacije (za terapiju hemofilije B), GH (engl. Growth hormon) - hormon rasta, eritropoetin (za terapiju anemije), interferoni, interleukini, GM-CSF (engl. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) - faktor stimulacije rasta kolonija granulocita i makrofaga, u terapiji stimulacije kosne srži nakon transplantacije kosne srži, G-CSF (engl. Granulocyte colony-stimulating factor) - faktor stimulacije rasta kolonije granulocita, za stimulaciju produkcije neutrofila, na primer nakon hemioterapije, TPA (engl. Tissue plasminogen activator) - aktivator tkivnog plazminogena, za trombolizu, angiostatin i endostatin, koji se koriste u terapiji karcinoma, paratireoidni hormoni, HBsAg (engl. Hepatitis B surface antigen), za vakcinaciju protiv HBV.

UBRIZGAVANJE NEOGENA U FERTILISANU JAJNU ĆELIJU

Postupcima unošenja neogena u fertilisanu jajnu ćeliju dobija se zigot sa novim genomom. Ovakav zigot se zatim ubacuje u ženku. Mladunac koji se rađa je transgena životinja, koja će neogen prenositi na svoje potomstvo po zakonima nasleđivanja. Životinje koje najčešće služe kao transgene životinje su ovce i koze, koje u tom slučaju služe za ekspresiju stranih proteina u mleku i transgene kokoške koje proizvode strane proteine u belancetu jaja.

MANIPULACIJA EMBRIONALNIM STEM ĆELIJAMA

U proceduri manipulacije embrionalnim stem ćelijama se neogen prvo ubaci u embrionalne stem ćelije, a zatim se one vraćaju u embrion. Na ovaj način se dobijaju himerični organizmi koji nemaju neogen u svim ćelijama svog organizma, nego samo u

određenom tkivu. Integracija neogena sa DNK domaćina može da se postigne ili mikroinjekcijom neogena u pronukleus oplodene jajne ćelije, u kom slučaju je insercija neogena randomizirana pa postoji mogućnost da se neogen ubaci u region koji neće dozvoliti njegovu ekspresiju, ili metodom korišćenja vektora, koji je u ovom slučaju retro-virus. Za čuvanje linija transgenih životinja koristi se tehnika zamrzavanja embriona. Krioprezervacija embriona transgenih životinja spremnih za implantaciju je korisna u slučaju bolesti postojećih životinja, u slučaju kontaminacije ili bilo kog drugog uzroka gubitka životinja. Ovim načinom čuvanja embriona je moguće smanjiti troškove držanja transgenih životinja kada nisu potrebni za eksperimente koji su trenutno u toku.

Prvi transgeni primat koji je proizveden je Rhesus majmun u čiji je genom ubačen gen koji kodira zeleni fluorescentni protein meduze (engl. Jellyfish) (2). Mladunče je nazvano ANDi, što je unazad čitano iDNA (engl. inserted DNA). Iako ANDi ne svetli u mraku i nema zelene delove, ovo je veliki korak u genetskoj modifikaciji organizama i boljem razumevanju primata. Da bi nastao ANDi, u 224 neoplođene jajne ćelije Rhesus majmuna je ubačen retrovirus sa GFP engl. (Green fluorescent protein) iz meduze. GFP se slučajnim postupkom ubacio u genom jajnih ćelija, koje su zatim oplodene spermatozoidima Rhesus majmuna. Polovina oplodjenih jajnih ćelija je počela deobu, dostižući stadijum od četiri ćelije, od kojih je odabrano 40 i implantirano u surogat majke, po dva zigota u svaku ženku. Ukupno je rođeno tri zdrava mužjaka i dva mrtvorodena mužjaka iz blizanačke trudnoće. Od svih, ANDi je jedini živi majmun koji nosi GFP. Blizanci koji su mrtvorodeni su takođe nosili GFP i dlaka i nokti su im svetleli zelenom bojom pod fluorescentnom lampom. Nije jasno da li je do njihove smrti došlo zbog prisustva GFP ili zbog blizanačke trudnoće, koja je veoma retka i rizična kod Rhesus majmuna.

Pre Rhesus majmuna ubacivanje GFP uspelo je na svinjama. Prvi sisari kod kojih je uspela integracija GFP u genom su bili goli eksperimentalni miševi engl. (nude mouse). Na ovako genetski modifikovanim miševima se proučavaju genetske modulacije metastaza humanog neuroblastoma (3), Alzheimerova bolest i ALS (engl. Amyotrophic lateral sclerosis) (4), moguća je direktna vizualizacija ćelija hipokampusa koje sadrže receptore za glukokortikoide (5), proučavanje vaskularnih modela hipertenzije (6) i drugo (7).

ZAKLJUČAK

Razvojem metodologije dobijanja transgenih životinja je omogućeno istraživanje humanih bolesti na humanim tkivima bez učešća ljudi u eksperimentima. Eksperimentalne transgene životinje kao modeli humanih bolesti mogu da pruže odgovore na pitanja o

mehanizmima genske regulacije i homeostaze, jer vrlo blisko podražavaju humane procese. Toksikološka i farmakološka istraživanja su takođe pomerena jedan korak unapred pre testiranja na ljudima.

Glavni izazov za buduća usavršavanja ove metodologije predstavlja to što trenutno nemamo pouzdan način sprečavanja slučajnog insertovanja neogena u genom domaćina. Nepredviđeno insertovanje može dovesti do malih genotipskih, a velikih fenotipskih promena kod eksperimentalne životinje. Veća specifičnost modela vremenom bi trebalo da dovede do redukcije broja eksperimentalnih životinja koje se koriste u istraživanjima, a genetske modifikacije mogu da dovedu do velike koristi za ljude ukoliko se na transgenim životinjama omogući uzgajanje humanih organa za transplantaciju.

LITERATURA

1. Riley R, Duensing S, Brake T, Münger K, Lambert P, Arbeit J. Dissection of Human Papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer Res* 2003; 63: 4862-71.
2. Chan AWS, Chong KY, Martinovich C, Simerly C, Schatten G. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. *Science* 2001; 291(5502): 309.
3. Henriksson K, Almgren M, Thurlow R, Varki N, Chang C. A fluorescent orthotopic mouse model for reliable measurement and genetic modulation of human neuroblastoma metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2004; 21(6): 563-570.
4. Borchelt DR, Wong PC, Sisodia SS, Price DL. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol* 1998; 8(4): 735-57.
5. Nishi M, Usuku T, Itose M, Fujikawa K, Hosokawa K, Matsuda KI, et al. Direct visualization of glucocorticoid receptor positive cells in the hippocampal regions using green fluorescent protein transgenic mice. *Neuroscience* 2007; 146(4): 1555-60.
6. Nishijo N, Takamine S, Sugiyama F, Kimoto K, Taniguchi K, Horiguchi H, et al. Vascular remodeling in hypertensive transgenic mice. *Exp Anim* 1999; 48(3): 203-8.
7. Hayashi Y, Kodama Y. Use of animals in experimental tests. *Exp Anim* 2004; 53(2): 11-3.