

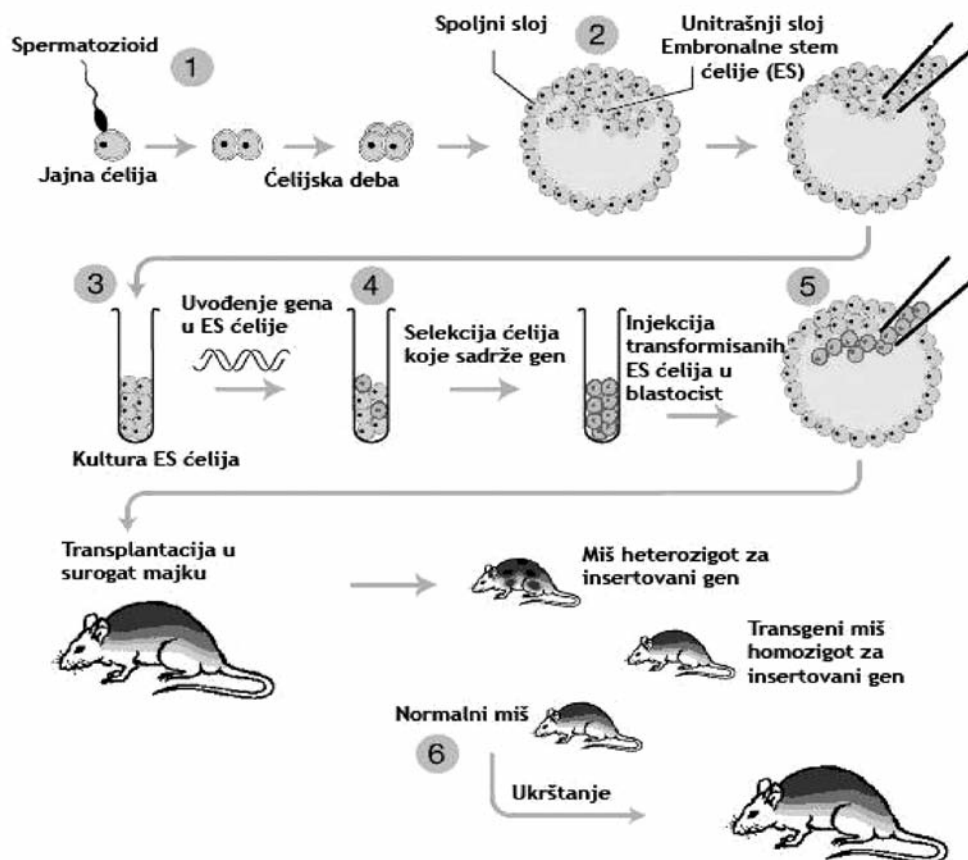
## KNOCK OUT MIŠEVI

Maja Zlatanović

### UVOD

Decenijama su istraživači pokušavali da stvore nešto što bi im omogućilo preciznu kontrolu specifičnog gena kako bi mogli da proučavaju njegovu funkciju. Osamdesetih godina prošlog veka razvijena je tehnologija poznatija kao transgeneza ili prenošenje gena (1). Ova nova tehnologija je obuhvatala proces pronuklearnog mikro-ubrizgavanja (Slika 1).

Dakle, *knock out* miš je laboratorijski miš kome istraživači deaktiviraju ili "isključe" postojeći gen tako što ga zamene ili ga prekinu veštačkim delom DNK. Gubitak aktivnosti gena često izaziva promene u fenotipu miša, i to u izgledu, ponašanju i drugim fizički primetnim i biohemijskim karakteristikama (3). Modifikovanjem aktivnosti gena dobijaju se korisni podaci o tome šta ti geni u normalnim uslovima određuju.



Slika 1. Nastanak transgenih miševa

Međutim, koristeći ovu metodu istraživači nisu mogli niti da predvide niti da kontrolišu gde će se u genomu strani genetski materijal umetnuti (1). Tim naučnika predvođen Martinom Evansom, Oliverom Smitsom i Mariom Kapeći uspeo je da ukloni ovaj nedostatak stvarajući genetski "nokaut" i za to otkriće 2001. godine dobili su Laskerovu nagradu. Stvarajući nokaut oni su dokazali da je moguće ciljati određenu lokaciju za umetanje gena u genomu miša. Ovo je omogućilo naučnicima da zamene ili modifikuju određeni gen sa neaktivnim ili mutiranim alelima. Na taj način su stvoreni *knock out* miševi.

Ljudi imaju mnogo sličnih gena sa miševima. Stoga, samo posmatranje karakteristika *knock out* miševa, pruža informacije istraživačima, koje mogu poslužiti za bolje razumevanje kako slični geni mogu da izazovu, ili doprinesu razvoju bolesti kod ljudi (3).

Primeri istraživanja u kojima su *knock out* miševi korišćeni su: proučavanje različitih tipova tumora, gojaznosti, srčanih oboljenja, dijabetesa, artritisa, Parkinsonove i mnogih drugih bolesti. Zatim, *knock out* miševi nude biološki model u kome lekovi i druge terapije mogu biti razvijene i testirane. Stoga, oni danas predstavljaju jedno od najuspešnijih naučnih sredstava u proučavanju ljudskog genoma i njegovog uticaja na pojavu bolesti.

## POSTUPAK DOBIJANJA *KNOCK OUT* MIŠEVA

Postoje dve metode dobijanja *knock out* miševa. Obe metode se izvode *in vitro* i obe počinju izdvajanjem embrionalnih stem (ES) ćelija u ranom stadijumu embriona miša, četiri dana posle oplođivanja (4). Koriste se ES ćelije zato što se razlikuju u skoro svakom tipu odraslih ćelija, što znači da ako je gen "isključen" u ES ćeliji, efekat se može pratiti u bilo kom tkivu odraslog miša. Pored toga, ES ćelije koje se uzgajaju u laboratoriji mogu biti iskorišćene za stvaranje modifikovanih miševa i 10 godina nakon dobijanja. Da bi se stvorili genetski modifikovani miševi, istraživači ubacuju veštačku DNK u hromosome koji se nalaze u jezgru ES ćelija.

Prvom metodom, nazvanom ciljanje gena ili homologna rekombinacija, istraživači posebno rukuju genom u jedru ES ćelije. Ovo se, uglavnom, obavlja uvođenjem veštačkog dela DNK koji ima identičan ili homologni deo tog gena. Ovaj homologni deo obilazi postojeći deo DNK gena i uzvodno i nizvodno od lokacije gena na hromozomu. Ćelijska nuklearna mašinerija automatski prepoznaje identične spojeve delova i menja postojeći gen ili deo gena sa veštačkim delom DNK. Pošto je veštački deo DNK neaktivan, i nosi samo etiketu gena ili kako ga još zovu "gen dopisnik", stvoren samo za praćenje, zamena eliminiše ili "nokautira" funkciju postojećeg gena (3). Zamena se izvodi u dva dela:

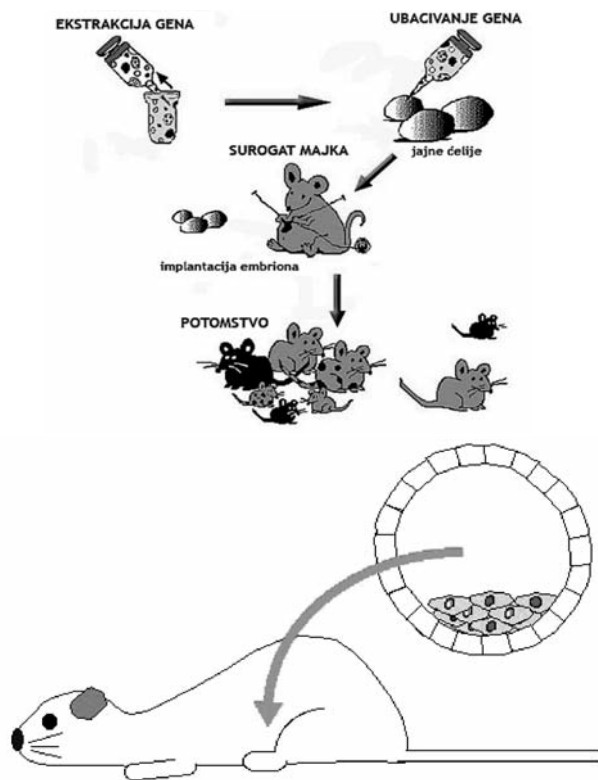
a) Formiranje vektora: Vektor sadrži dve homologne oblasti na svakom kraju, poremećen ciljani gen, i dva dodatna gena koja omogućavaju kontrolu kvaliteta procesa (1). Homologne oblasti su locirane na svakom kraju vektora i komplementarne onom delu genoma koji se nalazi neposredno uz ciljani gen. Vektor se vezuje za genom preko ovih homolognih tačaka.

b) Da bismo bili sigurni da li je vektor umetnut u genom, koristi se gen koji je otporan na neomicin. U slučaju da vektor nije umetnut, sve ćelije će izumreti u neomicinu. Takođe je moguće da se vektor umetne na pogrešno mesto u genomu. Da ne bi došlo do ovoga, timidin kinaze (tk) gen se, takođe, dodaje u konstrukciju izvan homologne oblasti. Ako se desi ponovna kombinacija onda (tk) gen neće biti u genomu i te ćelije će biti neosetljive na ganciklovir. Ako je vektor, ipak, umetnut u genom potpuno, onda će ćelije izumreti kada porastu u gancikloviru (2). Prema tome, kroz pozitivni i negativni odabir, ćelije koje su pravilno umetnute mogu biti izolovane.

Drugom metodom, pod nazivom hvatanje gena u zamku, istraživači ponovo manipulišu genomom u ES ćeliji. U ovom slučaju, umesto direktnog gađanja željenog gena, koristi se nasumičan proces. Deo veštačkog DNK sadrži takozvani gen dopisnik koji je napravljen tako da se umetne nasumično u bilo koji gen. Umetnuti deo veštačkog DNK sprečava RNK "spojni" mehanizam da funkcioniše ispravno, prema

tome, sprečava postojeći gen da proizvodi njegov planski protein i isključuje njegovu funkciju. Kao i u prvom slučaju, istraživači mogu da prate aktivnosti veštačkog gena dopisnika da bi otkrili normalni obrazac aktivnosti postojećeg gena u tkivima miša (3).

Obe metode (i ciljanje gena i hvatanje gena u zamku) koriste sredstvo koje često sadrži modifikovan vektor ili linijski fragmenat bakterijske DNK, da bi preneli veštački DNK u ES-ćelije. Pošto je veštački DNK umetnut, genetski izmenjene ES-ćelije se razvijaju u laboratorijskim posudama nekoliko dana, a zatim se, u ranom stadijumu embriona miša, usađuju u uterus ženke miša kako bi se razvili u mladunčad miša (Slika 2).



Slika 2. Usađivanje embriona u uterus ženke miša

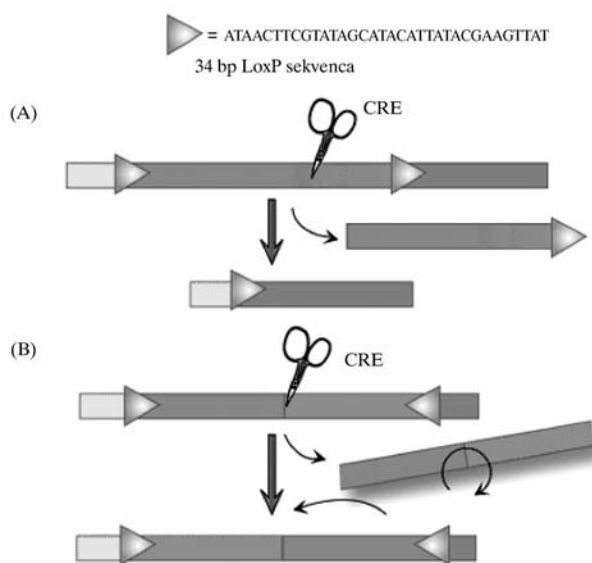
Tek okoćena mladunčad miševa imaju neka tkiva u kojima je gen modifikovan, nastala iz izmenjenih ES-ćelija. Međutim, takve životinje imaju i neka normalna tkiva, koja su nastala iz neizmenjenih embriona u koja su izmenjene ES-ćelije ubrizgane. Stoga, ti miševi nisu kompletno genetski modifikovani. Neophodno je međusobno ukrstiti ovakve miševе kako bi se dobila porodica miševa kod kojih su obe kopije gena (jedan na svakom hromozomu) modifikovane u svim tkivima. Istraživači se odnose prema ovim miševima kao prema homozigotima.

Obe metode (i ciljanje gena i hvatanje gena u zamku) imaju određene prednosti. Prednost metode ciljanja gena je u tome što, ukoliko je deo DNK mete gena poznat, istraživači mogu tačno da modifikuju gen

uz visoku stopu efikasnosti, a prednost metode hvatanja gena u zamku je u tome što istraživači ne moraju da znaju sekvencu DNA specifičnog gena da bi ga genetski modifikovali. Pored toga, kod metode hvatanja gena u zamku isti vektor se može upotrebiti da bi stvorio niz miševa u kojima će razni geni biti genetski modifikovani.

Loša strana metode hvatanja gena u zamku je ta što nije toliko efikasna niti specifična kao metoda ciljanja gena, zato što svako uspešno umetanje veštačkog DNK u gen ne utiče na gubitak funkcije. Istraživači često moraju da izgube dragoceno vreme kako bi identifikovali ES-ćelije u kojima je gen stvarno modifikovan. Pored toga, pošto je metod hvatanja gena u zamku nasumičan proces, određeni geni mogu uvek biti promašeni ili, ukoliko gen nije aktivan u ES ćelijama, oni neće proizvoditi markere koji pokazuju da je gen genetski modifikovan (3).

U skorije vreme, razvijene su nove tehnologije koje omogućavaju uslovne ili ciljane genetske modifikacije. Cilj uslovnih genetskih modifikacija je brisanje gena u određenom organu, tipu ćelije ili stepenu razvoja (5). Istraživači mogu da koriste ovu tehniku kako bi sigurno modifikovali delove specifičnih gena u vreme kada su ti geni aktivni. Uslovni *knock out* miševi imaju nekoliko prednosti u odnosu na konvencionalni tip: duže žive od tradicionalnih modifikovanih miševa i uslovne genetske modifikacije miševa su preciznije. Postoji nekoliko različitih načina da se dobiju ovi modeli. Najrasprostranjeniji je metod Cre-loxP sistem rekombinacije (Slika 3). Cre je enzim koji funkcioniše poput makaza, kako bi odstranio gen koji je između dve ciljne sekvence nazvan loxP (2). Pošto je ovaj enzim karakterističan samo za određeni tip ćelija, ciljani gen će biti modifikovan samo kod tih ćelija i samo onda kada istraživači to žele.



Slika 3. Cre-LoxP sistem

## OGRANIČENJA TEHNOLOGIJE

Iako je tehnologija genetskog modifikovanja izuzetno korisna, kako za biomedicinska istraživanja tako i za dobijanje lekova, ona ima i određenih ograničenja. Naime, zbog razvojnih nedostataka, mnogi miševi umiru još dok su embrioni, pre nego što istraživači imaju priliku da ih iskoriste kao model za eksperimentisanje. Takođe, postoje modeli *knock out* miševa, koji imaju neke različite fenotipske osobine od ljudi. Primer ovog fenomena je p53 nokaut. Gen p53 ima određenu ulogu u patogenezi skoro polovine ljudskih tumora. Međutim, taj gen izaziva potpuno različite tipove tumora kod *knock out* miševa u odnosu na one koje izaziva kod čoveka (kod miševa se razvijaju limfomi i sarkomi, dok se kod ljudi razvijaju tumori eptelnih ćelija) (6). Zbog tih utvrđenih razlika, ne možemo sa sigurnošću reći da će određeni gen pokazati identičnu funkciju i kod miša kod čoveka (7).

Takođe, proizvodnja i čuvanje *knock out* miševa su jako skupi i zahtevaju specijalne objekte gde osoblje može pomagati istraživačima u čuvanju i preduzimanju odgovarajućih mera, kako bi se ove modifikovane životinje držale u optimalnim uslovima za potrebe istraživanja.

## ZAKLJUČAK

Iako postoje brojna ograničenja vezana za upotrebu *knock out* miševa, njihovo otkriće predstavlja veliki napredak na biomedicinskom i farmaceutskom polju. *Knock out* miševi su danas, definitivno, jedno od najboljih dostupnih sredstava za proučavanje funkcije gena kod živih životinja.

## LITERATURA

1. The life history of the mouse in genetics [editorial]. Nature 2002; 420 (6915): 510.
2. Walinski H. Styding gene function: creating knockout mice. The Science Creative Quarterly [serial online] 2007 Jan - Mar [cited 2007 May 4]; 2. Available from: URL: <http://www.scq.ubc.ca/p=264>
3. National Human Genome Research Institute online. 2007 April 20 [cited 2007 May 4]; Available from: URL:<http://www.genome.gov/12514551>
4. Knock out mouse station. Knock out mouse creation online. 2006 [cited 2007 May 4]; Available from: URL:<http://www.knockoutmousestation.com>
5. Smith CM. Technical Knockout. The Scientist 2000; 14 (15):32.
6. Pray L. Refining transgenic mice. The Scientist 2002; 16 (13): 34.
7. Zambrowicz BP, Sands AT. Knockout model the 100 best - selling drugs - will they model the next 100? Nature Rewiews Drug Discovery 2003; 2: 38 - 51.