

TEHNIKE PRIJENOSA GENA I TRANSGENE ŽIVOTINJE

Martina Bradić

Sažetak

U selekciji i različitim križanjima, vrlo je važno poznavanje podrijetla svakog pojedinog grla. Problemi s kojima je suočeno križanje su, prvo, točna procjena genotipa na kojemu se temelji fenotip; drugo, činjenica da premda je određen čitav genom, samo pola genoma životinje na kojoj je provedena selekcija prelazi na potomka. Ti problemi postoje i u modernim tehnologijama uzgoja životinja, uključujući umjetno osjemenjivanje, prijenos embrija, oplodnju *in vitro* i mikrokirurgiju embrija. Metode korištene u tim tehnologijama također su primijenjene na genome u haploidnoj ili diploidnoj formi kao da su proizvedeni prirodnim putem segregacije ili nasumičnog parenja. Postignuta je mogućnost stvaranja specifičnih gena ili skupina gena, ovisno o načinu križanju, pa su isključeni mnogi drugi geni od manje važnosti, što je vrlo značajno u križanju životinja.

Ključne riječi; genotip, fenotip, križanje, transgeničnost, gen

Uvod

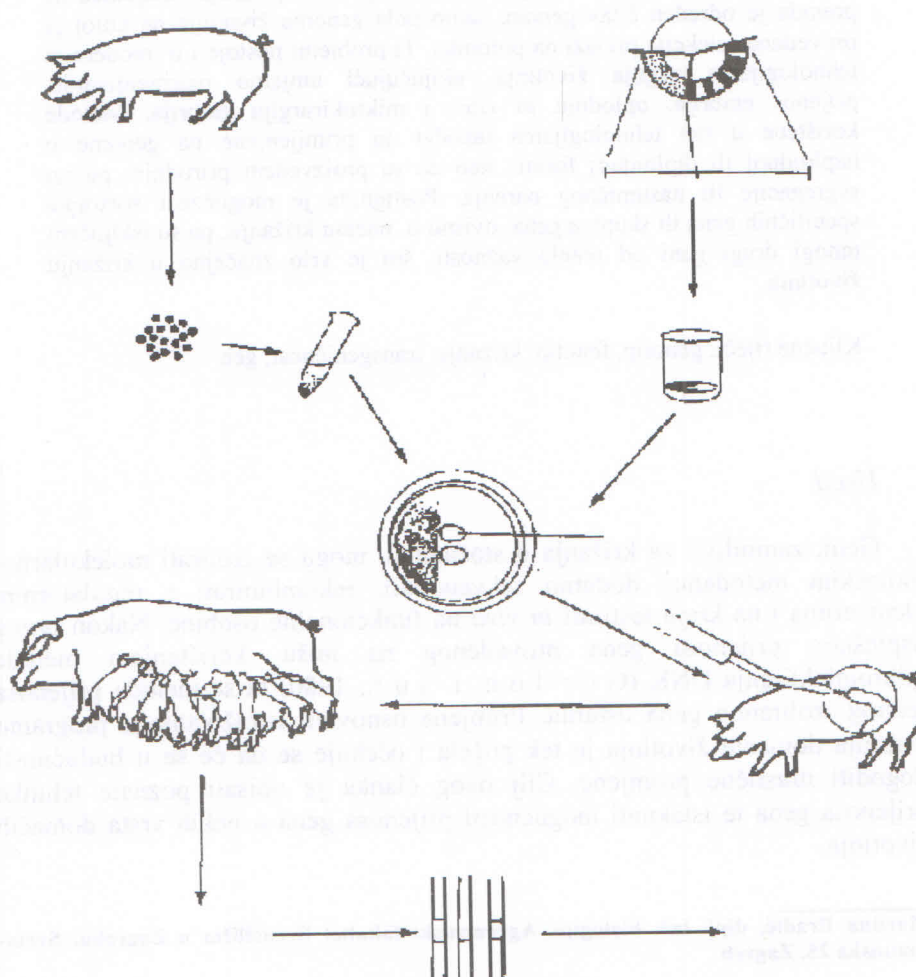
Geni, zanimljivi za križanja u stočarstvu, mogu se izolirati molekularno-biološkim metodama, dodatno sekvencirati, rekombinirati s regulatornim elementima i na kraju testirati *in vivo* na funkcionalne osobine. Nakon prvog uspješnog prijenosa gena provedenog na mišu, korištenjem metode mikroinjektiranja DNK (G o r d o n i s u r., 1980) ta se metoda prijenosa jednog izoliranog gena ustalila. Primjena osnovnih istraživanja u programu križanja domaćih životinja je tek počela i očekuje se da će se u budućnosti dogoditi drastične promjene. Cilj ovog članka je opisati poznate tehnike prijenosa gena te istaknuti mogućnosti prijenosa gena u nekih vrsta domaćih životinja.

Martina Bradić, dipl. inž. biologije, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Svetošimunska 25, Zagreb

Tehnike prijenosa gena

Pod prijenosom gena podrazumijeva se prijenos *in vitro* rekombiniranih genskih konstrukata u genom životinje. Genski konstrukt integriran u genom životinje naziva se transgen. Kodirani protein kojeg je proizveo transgen naziva se transgenični produkt. Životinje s transgenima nazivaju se transgenične, a ako transgen prelazi na potomke, nastaju transgenične linije ili populacije. Krajnji cilj ove tehnologije je utjecaj na transgenični produkt.

Slika 1.- SHEMA TEHNIKE PRIJENOSA GENA U SVINJA



Za prijenos gena u sisavaca moguće je koristiti tri različite tehnike:

- Izravno mikroinjektiranje DNK u pronukleus zigote,
- Prenošnje DNK korištenjem retroviralnih vektora,
- Proizvodnja transgeničnih himera injektiranjem genetički transformiranih totipotentnih stem (osnovnih) stanica u embrio.

Prijenos gena izravnim mikroinjektiranjem DNK

Za sada je mikroinjektiranje DNK u pronukleus zigote jedina metoda za prijenos gena u domaćih životinja. Ta se procedura sastoji od sljedećih faza:

- Kloniranje i rekombinacija prikladnog genskog produkta,
- Pripremanje donora,
- Pronalaženje zigote (oplođene oocite),
- Vizualizacija pronukleusa (neophodna u nekih vrsta domaćih životinja),
- Pripremanje DNK otopine koja će se injektirati,
- Mikroinjektiranje DNK otopine u pronukleus zigote,
- Prenošnje injektirane zigote u jajovod sinkronog recipijenta,
- Ispitivanje potomaka da bi se utvrdilo primanje novih genskih konstrukata (tehnike Dot-Southern-Blot).

Genski konstrukti koji služe za prijenos gena rekombinirani su u kozmidima ili plazmidima, a zatim klonirani. Nakon cijepanja rekombinantnog vektora s restriksijskim endonukleazama potrebno je genski konstrukt ekstrahirati, precipitirati, isprati i smjestiti u injekcijski pufer. Da bi se izbjegli problemi injektiranja, sve otopine korištene u pripremi injekcijske tekućine moraju se sterilno filtrirati kako bi genska otopina bila bez kontaminiranih čestica. DNK otopina se razrjeđuje tako da jedan pikolitar sadrži oko tisuću kopija genskog konstrukta.

Pribor potreban za mikroinjektiranje uključuje invertni mikroskop, dva mikromanipulatora i injekcijski pribor. Potreban dopunski pribor čine injekcijska šupljina i posebna injekcijska pipeta za držanje zigote.

Injekcijska pipeta, s vanjskim promjerom od 1-2 μm , ispunjena je DNK otopinom. Za vrijeme injektiranja, zigota se drži pomoću posebne pipete. Injekcijska pipeta se uvodi u pronukleus, prolaskom kroz zonu pelucidu, staničnu membranu i jezgrinu membranu. Oko jedan do dva pikolitara DNK otopine su injektirana u pronukleus i tako se povećao njegov volumen.

Zigota, u koju je injektiran genski konstrukt nakon in vitro kulture, prenosi se u jajovod sinkrone životinje recipijenta. Recipijentne životinje su sinkroni-

zirane sa životinjom donorom hormonskim tretiranjem. Nakon nastanka potomka, kao produkta unošenja gena, visokomolekularna DNK se izolira iz njegova tkiva (krv i stanice mogu se praktično uzeti iz zadnjice) da se ustanovi uspješnost ugradnje novog gena. Integracija injektirane DNK i broja integriranih kopija može se detektirati Southern Blot ili Dot Blot hibridizacijom. Mjesta integracije u kromosomima mogu se dokazati hibridizacijom s metafaznim kromosomima, tako da se taj uneseni gen koristi za probu.

Transgenične životinje mogu se pariti. Njihovi potomci su testirani kako bi se ustanovilo da li je transgen prešao na potomke. Kod sparene hemizigotne-transgenične F1 generacije napravljeni su pokušaji da se proizvedu homozigotne transgenične životinje.

Prijenos gena pomoću retroviralnih vektora

Retrovirusi imaju RNK genom, koji se u zaraženim stanicama transkribira putem vlastite virusne reverzne transkriptaze u DNK, a nakon toga se integrira u genom stanice. Integracija se događa slučajno. Međutim, samo se jedna kopija može pronaći u provirusu. Taj ciklički retroviralni vektor može se u prijenosu gena koristiti kao posrednik. Godine 1974. prvi je puta dokazano, da je nakon injektiranja SV40 DNK u blastocel mišje blastociste kasnije moguće pronaći DNK u stanicama odraslog miša (J a e n i s c h, 1974; J a e n i s c h i M i n t z, 1974). Proviralna DNK, korištena u tim eksperimentima, integrira se u potomke gradeći stabilne linije (J a e n i s c h, 1976; S t u h l m a n, J ä h n e r i J a e n i s c h, 1981).

Uspješna uporaba retroviralnih vektora u domaćih životinja još nije napravljena. S a l t e r i sur. (1986) su napravili pokus na peradi injektiranjem divljeg lanca DNK. Isto su napravili i s rekombinantnim pilećim virusom leukoze u jajetu prije valjenja. Kao rezultat pronađene su neke životinje koje su zaista pokazivale integraciju.

Prijenos gena proizvodnjom zametnih (germ) linija himera

Način koji se koristi u prijenosu rekombinantnih genskih konstrukata u zametne linije putem totipotentnih transformiranih stem stanica danas zadobiva sve veću pozornost, osobito u miševa. Totipotentne stem stanice izolirane su iz in vitro kultiviranih blastocista. Himere se mogu proizvesti agregacijom stem stanica s ranim embrionskim diobenim stadijem ili injektiranjem tih stanica u blastocistu. Do 30% tako proizvedenih himera su zametne linije himera koje

sadrže genotip stanične linije. M i n t z (1977) ističe mogućnost uporabe osnovnih stanica kao prijenosnika za uvođenje novih gena.

Prednost takvog prijenosa gena putem transformiranih osnovnih stanica je da se integracija i eventualna ekspresija transgena mogu testirati već u staničnoj liniji. Možda je još važnija činjenica da se prijenos, vjerojatno, može učiniti manipulacijom morule i blastociste. Kad je embrio na tom stadiju razvitka, osobito u goveda, to je moguće učiniti i bez kirurškog zahvata, što znači da će program prijenosa gena biti uvelike olakšan.

Druga metoda, također moguća potencijalna tehnika prijenosa gena pomoću manipulacije blastocista, je mikroinjektiranje DNK upakirane u liposome. Takvi liposomi injektiraju se u blastocistu goveda, no pozitivni rezultati tih pokusa nisu još utvrđeni.

Godine 1989. bila je objavljena uporaba tehnike spermijski posredovanog prijenosa gena na generaciju transgeničnih miševa i svinja (L a v i t r a n o i sur., 1989; G a n d o l f i i sur., 1989). Ta metoda je prilično jednostavna, i kako je autor prikazao, vrlo učinkovita. Drugi znanstvenici nisu uspjeli doći do rezultata koji bi to potvrdili (B r i n s t e r i sur., 1989).

Križanje s transgeničnim domaćim životinjama

Primjenom prijenosa gena u programu uzgoja stoke, od ključne je važnosti prenošenje gena na potomke. To znači da sve ili neki od zametnih stanica primarnih transgeničnih životinja moraju sadržavati transgene. Nažalost, postoji malo spoznaja o molekularno-biološkim procesima koji se događaju kad je injektirana DNK integrirana u genomu.

Kad su transgenične životinje bile provjerene nakon rođenja, dokazano je da se mora dogoditi mozaičnost. Mozaične životinje imaju različite linije staničnih genotipova, koji su, međutim, nastali iz jedne zigote. Transgenične mozaične životinje sadrže transgenične i netransgenične stanice, što ponekad može biti problem. Očito je da potomak ne može sadržavati transgen od svojih transgeničnih roditelja ako transgen nije nazočan u gonadama. Iz prijašnjih iskustava, oko 30% primarnih transgeničnih životinja proizvedenih mikroinjektiranjem je mozaično i zato prijelaz transgena ide samo na manje od polovice ili na nijednog njihovog potomka.

Nasljeđivanje osobina u potomaka životinja koje su integrirale injicirane genske konstrukte na stabilan način odvija se prema Mendelovim zakonitostima. Općenito, integracija zauzima jedan lokus na kromosomu. Te se životinje zovu hemizigotni transgenici. Termin heterozigotni nije primjenjiv dok nedostaje alel koji odgovara transgenu u homolognim netransgeničnim

kromosomima. Ako su gonade mozaici između transgeničnih i netransgeničnih stanica, postotak transgeničnih potomaka ovisi o sudjelovanju tih dviju staničnih linija u proizvodnji gameta a može iznositi između 0 i 50%. Mozaične životinje normalno se javljaju u Fo generaciji. Potomci transgenične F1 generacije i kasnijih generacija sadrže, ako su pozitivni, genske konstrukte u svim somatskim stanicama i stanicama gonada. Opaženo je, međutim, da transgen često nije bio prenesen kroz nekoliko generacija. Razlog zašto transgen ne ostaje stabilno integriran, a može biti i izgubljen iz genoma katkada nema zadovoljavajuće objašnjenje. Moglo bi se reći da je velika nestabilnost u ekspresiji gena čak učestalija pojava od nestabilne integracije. U sljedećim generacijama se javljaju sve različiti oblici promjena; od porasta do smanjenja ekspresije ili čak do njezine potpune odsutnosti.

Prije uvođenja transgeničnih životinja u populaciju, neophodno je utvrditi da kod tih životinja nema insercijskih mutacija da se spriječi porast učestalosti letalnih gena. Te insercijske mutacije mogu biti posebno zanimljive za osnovna istraživanja. *W o y c h i k i sur. (1985)* utvrdili su da insercijska mutacija dovodi do poznatog defekta ekstremne malformacije. To znači da se insercijska mutacija može iskoristiti za izolaciju i karakterizaciju endogenih gena.

S m i t h i sur. (1987) su ustalili plan križanja za testiranje transgeničnih životinja i za osnivanje homozigotnih linija.

Što se tiče križanja i selekcije, posljedica tih problema mozaičnih i insercijskih mutanata je da je jedna transgenična životinja dovoljna za uvođenje dobro definiranog genskog konstrukta u populaciju. Da ne bi došlo do povećanog broja problema s križanjem, moraju se ispuniti sljedeći uvjeti:

- Stabilno prenošenje transgena na potomka,
- Bez insercijskih mutacija i mogućnosti proizvodnje homozigotnih transgeničnih životinja,
- Stabilna ekspresija transgena s pozitivnim biološkim utjecajem na ciljane osobine.

S obzirom na te nesigurnosti na kraju je potrebno pet do deset primarnih transgeničnih životinja za proizvodnju uspješnih linija.

Abnormalni razvitak ploda

Mnogi protokoli koji su se koristili za kulturu i manipulaciju embrija preživača rezultirali su neobično velikim embrijima, koji su također imali visok postotak nagle, neobjašnjene, perinatalne smrti (*W a l k e r i sur., 1996*). Manipulacije koje rezultiraju proizvodnjom velikih potomaka uključuju nuklearni transfer (*W i l s o n i sur., 1994*), embrio kao kulturu (*F o r m i n i F a r i n, 1995*), kulturu u jednostavnom mediju sa serumom dodanim za 5 dana

(Thompson i sur., 1995; Walker i sur., 1996) izlaganje embrija u maternicu u neprikladno vrijeme estrusnog ciklusa asinkronim prijenosom embrija (Wilm i Sals, 1981) ili nakon modifikacije majčine normalne okoline (Kleeman i sur., 1994).

Međutim, tretmani nisu toliko različiti koliko se moglo očekivati. U istraživanju, kad su se iz embrija proizvedenog nuklearnim prijenosom razvila odrasla goveda, embriji su bili kultivirani u podvezanim jajovodima životinje, s time da se prethodno nije razmotrila sinkronizacija estrusa (Bond i, 1993). Zato nije moguće znati do koje se faze razvitka događaju poremećaji kao rezultat prijenosa jezgre ili kulture.

Promjene odgovorne za izlaganje neprikladnoj okolini mogu biti potaknute biološki aktivnim čimbenicima, kao što su čimbenici rasta, bilo da su nazočni u neprikladno vrijeme ili se nalaze u neodgovarajućoj koncentraciji. Na taj način, vremenski asinkroni transfer ili povećana razina progesterona majke može prouzročiti izlaganje embrija neobičnim sekretima maternice.

Abnormalni učinak kulture povezan je s nazočnošću seruma. Npr. kad životinja dobije potomke koji su prethodno bili u embrio-kulturi u mediju u kojem nema seruma, potomci su normalne porodne mase. (Thompson i sur., 1995). Isti čimbenik (s) može biti odgovoran za narušavanje u kulturi sa serumom i pri umetanju u reproduktivni sustav u neodgovarajućoj fazi spolnog ciklusa. Čimbenici u serumu uzrokuju promjene koje treba definirati. Najjednostavnija hipoteza je da narušavaju razvitak embrija istim meha-nizmom, ali to ne smije biti slučaj. Postoji jasna potreba da se razumije mehanizam i da se definiraju čimbenici u reproduktivnom sustavu koji utječu na razvoj embrija. To će također pomoći u optimizaciji razvoja embrija u kulturi, dok se ne eliminira narušavanje razvoja. Nažalost, to je jedan tvrdokoran problem zbog teškoće određivanja djelovanja određenih čimbenika na razvoj embrija u kulturi bez prijenosa pojedinog embrija i određivanja preživljavanja embrija i fetalne mase.

Zaključci

Molekularne tehnike su vezane uz nova dostignuća u molekularnoj i staničnoj biologiji i osnova im je: (1) otkriće restrikcijских enzima koji omogućuju izrezivanje DNK sekvence; (2) razvoj tehnika koje omogućuju detekciju i odvajanje DNK fragmenata različitih duljina; (3) tehnike za brzo umnožavanje DNK sekvenci; (4) razvoj tehnika za određivanje baznih sekvenci na kratkim lancima DNK; (5) istraživanje DNK proba i tehnika obilježavanja pojedinih segmenata.

Rezultati istraživanja ovih osnovnih molekularnih tehnika izvrstan su temelj za rad na genomu domaćih životinja te za izolaciju i karakterizaciju zanimljivih gena u svrhu križanja.

Za uobičajenu upotrebu u svrhu križanja najvažnije je da se proizvedu genski konstrukti koji će dopustiti prijenos gena koji će potom biti izravan u pravom (ciljnom) tkivu u pravo vrijeme, a također i u pravoj količini.

LITERATURA

1. B a n d i o l i, K. R. (1993.): Nuclear transfer in cattle. *Molecular Reproduction and Development* 36: 274-275.
2. B r i n s t e r, R. L., S a n d g r e n, E. P., B e h r i n g e r, R. R., P a l m i t e r, R. D. (1989): No simple solution for making transgenic mice. *Cell*, 59: 239-Woychik, R.P., Stewart, T.A., Davis, L.G., D'Eustachio, P. & Leder, P. 1985. An inherited limb deformity created by insertional mutagenesis in a transgenic mouse. *Nature* 318: 36-40.
3. F a r i n, P. W., F a r i n, C. E. (1995): Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and foetal development. *Biology of Reproduction* 52: 676-682.
4. G a n d o l f i, F., L a v i t r a n o, M., C a m a i o n i, A., S p a d a f o r a, C., S i r a c u s a, G., L a u r i a, A. (1989): The use of sperm-mediated gene transfer for the generation of transgenic pigs. *J. Reprod. Fert., Abstract Series* 4: 10.
5. G o r d o n, J. W., S c a n g o s, G. A., P l o t k i n, D. J., B a r b o s a, A., R u d d l e, F. H. (1980): Genetic transformation of mouse embryos by microinjection. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 77: 7380-7384.
6. J a e n i s c h, R. (1974): Infection of mouse blastocysts with SV 40 DNA: Normal development of infected embryos and persistence SV 40-specific DNA sequences in the adult animals. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 39: 375-380.
7. J a e n i s c h, R. (1976): Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 73: 1260.
8. J a e n i s c h, R., M i n t z, B. (1974): Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc. Nat. Acad.*
9. K l e e m a n, D. O., W a l k e r, S. K., S e a m a r k, R. F. (1994): Enhanced fetal growth in sheep administered progesterone during the first three days of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility* 102: 411-417.
10. L a v i t r a n o, M., C a m a i o n i, A., F a z i o, V. M., D o l c i, S., F a r a c e, M. G., S p a d a f o r a, C. (1989): Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* 57: 717-723.
11. M i n t z, B. (1977): Teratocarcinoma cells as vehicles for mutant and foreign genes. Genetic interaction and gene transfer. *Brookhaven Symposia in Biology*, 29: 82 Upton, NY, Brookhaven National Laboratories.
12. S a l t e r, D. W., S m i t h, E. J., H u g h e s, S. H., W r i g h t, S. E., C r i t t e n d e n, L. B. (1986): Retroviruses as vectors for germ line insertion in the chicken. *Proc. 3rd World Congr. Genetics Appl. Livestock Prod. Lincoln, Nebraska, July 1986.*
13. S m i t h, C., M e u w i s s e n, T. H. E., G i b s o n, J. P. (1987): On the use of transgenes in livestock improvement. *Anim. Breed. Abstr.* 55: 1-10.

14. 14. Stuhlmann, H., Jähner, D., Jaenisch, R. (1981): Infectivity and methylation of retroviral genomes is correlated with expression in the animal. *Cell*, 26: 221-232.
15. 15. Walker, S. K., Hartwich, K. M., Seaman, R. F. (1996): The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. *Theriogenology* 45: 111-120.

GENE TRANSFER METHODS AND TRANSGENIC ANIMALS

Summary

In selection and different animal crossbreeding, it is very important to recognize every individual animal. The problems faced in secondly conventional crossbreeding programmes are, first by, an accurate evaluation of genotype on which the phenotype is based and, second, the fact that although the entire genome of an animal is always assessed, only half of the genome of the selected animal is passed on to its offspring. These problems also apply to the modern technologies in animal breeding, including artificial insemination, embryo transfer, in vitro maturation and fertilization, and embryo microsurgery since the methods used in these technologies are also applied to the genome in haploid or diploid form as produced by natural processes of segregation and random mating. There is a possibility of making a specific gene or group of genes, depending on breeding work, thus excluding many other genes of less importance, which is an option of great interest in animal crossbreeding.

Keywords: genotype, phenotype, breeding, transgenesis, gene

Objašnjenje pojmova

- HAPLOID - jezgra koja sadrži polovičan broj kromosoma (simbol: n)
DIPLOID - diploidna jezgra sadrži dva seta homolognih kromosoma
SEGREGACIJA - nasumično sparivanje jezgri
SEKVENCIRANJE - metoda kojom se mogu izdvojiti sekvence (sljedovi parova baza) gena koji nam je interesantan za daljnju manipulaciju.
REGULATORNI ELEMENTI - proteini koji se vežu na specifični niz molekule DNK i mijenjaju ekspresiju gena.
REKOMBINANTNI GENSKI KONSTRUKTI - bilo koja molekula DNK koja je nastala udruživanjem s DNK molekulom nekog drugog podrijetla. Takva DNK najčešće se upotrebljava u kloniranju i genetičkoj modifikaciji organizama.
RETROVIRALNI VEKTOR - virusni prenositelj određenog gena koji želimo ugraditi u nekog domaćina.
TOTIPOTENTNE (STEM) STANICE - nakupina stanica koje još nisu započele proces diferencijacije.
KOZMIDI - strana DNK upakirana u glavu faga (bakterijski virus) kako bi taj konstrukt poslužio za unošenje strane DNK u novog domaćina. Kozmid je poznat po tome da može ugraditi velike količine strane DNK.

- PLAZMIDI - ekstrakromosomalne strukture DNK koje kao replikoni imaju sposobnost samostalne replikacije i koji se samostalno nasljeđuju u stanicama domaćina.
- RESTRIKCIJSKE ENDONUKLEAZE - velika porodica enzima koja može cijepati DNK na bilo kojem mjestu gdje postoji specifična kratka sekvenca nukleotida. Ekstenzivno se koristi u rekombinantnim DNK tehnologijama.
- PIKOLITAR - milijarditi dio mililitra.
- KOPIJA GENSKOG KONSTRUKTA - umnoženi genski konstrukt (konstrukt napravljen od različitih segmenata DNK).
- SOUTHERN BLOTTING - otkrivanje željenog niza baza komplementarnim nizom baza pomoću hibridizacije. Npr. pomoću određene mRNK, koja može služiti kao sonda, moguće je otkriti fragment DNK koji kodira tu mRNK.
- HIBRIDIZACIJA METAFAZNIM KROMOSOMIMA - detektiranje integracije željenog stranog gena pomoću sparivanja sa metafaznim kromosomima tako da se taj uneseni gen koristi kao proba.
- HEMIZIGOTNA TRANSGENIČNA F1 GENERACIJA - prva generacija potomaka nastalih iz transgenične životinje koja ima pola genoma normalnog i pola s novim genom.
- RETROVIRUS - virus koji sadrži RNK koja se umnožava u stanici tako da najprije napravi DNK intermedijere.
- TRANSKRIPCIJA - prepisivanje genetičke informacije s DNK na mRNK.
- REVERZNA TRANSKRIPTAZA - enzim prisutan u retrovirusima koji radi dvolančanu formu iz jednolančanog RNK kalupa.
- CIKLIČKI RETROVIRALNI VEKTOR - isto što i retroviralni vektor samo ne u linearnoj već u cikličkoj formi.
- MOZAIČNOST - organizam sastavljen od stanica s različitim genotipovima
- INSERCIJSKA MUTACIJA - mutacija koja nastaje umetanjem baza u između baza u normalnom slijedu u molekuli DNK čime se mijenja okvir čitanja tripleta baza a samim time i kranji signal za protein.
- ENDOGENI GENI - novi geni koji su se uspjeli ugraditi u DNK i koji se prenose dalje na potomstvo.