

Srećko Gajović

Odsjek za neurogenetiku, citogenetiku i razvojnu genetiku, Hrvatski institut za istraživanje mozga, Medicinski fakultet u Zagrebu, Šalata 12, HR-10000 Zagreb, Hrvatska, e-mail: [srecko.gajovic@hiim.hr](mailto:srecko.gajovic@hiim.hr)

## **Genetičko inženjerstvo u pokusnim modelima sisavaca**

Završetkom projekta sekvencioniranja ljudskog genoma iščitana je ukupna nasljedna informacija koja se prenosi s generacije na generaciju. Ona određuje zbivanja kojima od oplodene jajne stanice nastane ljudsko biće. Zajedno s utjecajima iz okoline nasljeđe određuje svojstva koja ispoljavamo i koja upravljaju našim životom. Međutim, premda je zapis poznat, njegovo značenje nam za sada ostaje nedostupno, te ga ne možemo pretočiti u odgovore koje bi od njega očekivali kao što su sklonosti k bolestima ili procjena očekivane duljine života. Stoga je trenutno u tijeku široka znanstvena djelatnost, u svom obimu puno opsežnija od samog sekvencioniranja, a kojoj je zadatak razumjeti informacije zapisane u nasljeđu. Osnovno pitanje na koje se traži odgovor je uloga gena, jer kada bi poznavali ulogu svih gena, mogli bi rekonstruirati mrežu njihovih djelovanja. Tako je jedna od osnovnih namjena genetičkog inženjerstva u pokusnim modelima sisavaca stvaranje genetskih preinaka koje bi ukazale na ulogu proučavanih gena. Obzirom da se od ovih informacija očekuje cijelo novo tržište lijekova i usluga, nove znanstvene spoznaje imaju značajnu tržišnu vrijednost, te se ovaj dio biotehnologije izuzetno brzo razvija.

Dva su osnovna pristupa proučavanju uloge gena. Prvi je fenotipski i na njemu se osniva klasična genetika, jer je još Mendel na osnovu ovog pristupa promatrajući fenotip graška zaključivao o zakonitostima nasljeđivanja. Ovaj pristup se osniva na praćenju fenotipskih svojstava jedinke koji se nasljeđuju. Fenotip zapravo direktno ukazuje na ulogu gena, napr. ako je kod graška fenotipsko svojstvo koje se nasljeđuje visoki rast, očito je da je regulacija visine upravo uloga gena koji određuje to svojstvo. Premda je uloga gena jasna, odrediti koji je to gen u zapisu DNA može biti vrlo složeno. Iako znamo da postoji nasljedna sklonost određenim bolestima kao što je to napr. visoki krvni tlak, vrlo nam je teško odrediti koji geni određuju ovu sklonost. Zato je nedostatak ovog pristupa dugotrajan postupak određivanja o kojem se genu u zapisu DNA radi, a zadužen je za proučavanu fenotipsku osobinu.

Drugi pristup je genotipski, pa se postupak naziva obrnuta genetika. Zasniva se na poznatim podacima o genomu, te potom proučavanju uloge nekog odabranog gena. Poznati gen za kojeg se ne zna uloga može se genetskim inženjerstvom preinačiti, a posljedična promjena fenotipa ukazat će na ulogu preinačenog gena. Ovakva promjena se može raditi u kulturi stanica ili štoviše u biokemijskim pripravcima, no vrlo često se prava uloga otkriva tek u samoj jedinki kojoj gen pripada. Jednostavan je primjer regulacija krvnog tlaka. Ne postoji niti jedan «in vitro» sustav koji nam može pomoći pri otkrivanju genetskih zakonitosti regulacije krvnog tlaka i sklonosti hipertenziji osim cijele jedinke.

Iako je osnovni cilj znanstvenih napora pomoći čovjeku, pa su stoga i znanstvene informacije dobivene na ljudima među najvažnijima, znanstvena proučavanja genetike čovjeka ograničena su na fenotipski pristup. To uključuje proučavanje medicinskih slučajeva unutar obitelji, proučavanja jednojajčanih blizanaca, te populacijsku genetiku, gdje se proučava raspored svojstava unutar cijele obično zemljopisno izdvojene populacije (npr. Island ili Susak). Genotipski pristup u čovjeka moguć je samo u kulturi stanica ili tkiva. On se vrlo široko primjenjuje, jer zajedno s informacijama dobivenim na pokusnim životinjama upotpunjuje znanje o genima čovjeka.

Genotipski pristup na razini cijele jedinice u sisavaca je moguć na laboratorijskim životinjama i to prvenstveno glodavcima, mišu i štakoru. Ove životinje imaju niz prednosti koje ih čine vrlo prikladne za razne vrste biomedicinskih pokusa uključujući i one genetičke. Miš i štakor su male životinje, koje dobro podnose život u zatočeništvu, imaju velika legla i kratko generacijsko razdoblje, a troškovi održavanja njihovog uzgoja su relativno niski. Za genetska proučavanja su osobito pogodni miševi, jer postoje brojni visoko srođeni sojevi (engl. inbred strains). Oni su nastali dugogodišnjim sparivanjem potomaka iz istog legla kroz niz generacija, pa su svi miševi unutar ovakvog soja genetski identični. Pokusi koji se izvode na ovim miševima mogu se usporediti u ljudi s onima na jednojajčanim blizancima s tom razlikom da se može imati po volji velik broj genetski jednakih miševa unutar jednog visokog srođenog soja. Također su ovakvi sojevi rasprostranjeni po cijelom svijetu, pa se pokusi učinjeni u udaljenim laboratorijima mogu uspoređivati. Obzirom da nema genetske varijabilnosti učinjena genetska preinaka se promatra na stalnoj genetskoj podlozi, te se može sa sigurnošću ustvrditi da je uočena promjena fenotipa uzrokovana učinjenom genetskom preinakom, a ne rezultat genetske varijabilnosti unutar populacije.

Kako bi se otkrila uloga gena u sisavaca dva su osnovna načina genske preinake koja se primjenjuje na miševima i na osnovu kojih zaključujemo o ulozi proučavanih gena. Obzirom da su ova dva pristupa na neki način suprotna, međusobno se dopunjuju. Prvi je gubitak uloge (engl. loss of function) onemogućavanjem gena (engl. gene knock-out), a drugi nadodavanje uloge (engl. gain of function). Gen se smatra onemogućenim ako više ne dolazi do stvaranja bjelančevine koju taj gen određuje. Zbog tog nedostatka potom nastaje neka posljedica koja se očituje promjenom fenotipa. Primjer ovog pristupa je onemogućavanje gena koji određuju bjelančevinu međustanične tvari fibronektin. Obzirom da ova bjelančevina služi za određivanje puteva seljenja stanica tijekom embrionalnog razvoja, zametak se ne može ispravno razviti i odumire upravo na stadiju kada je seoba stanica najvažnija (nakon gastrulacije). Ovim pristupom nedvosmisleno je potvrđeno da je fibronektin nužan u seobi stanica tijekom embrionalnog razvoja.

Nadodavanje uloge je suprotni pristup kojim se djelovanje gena uspostavlja na mjestima ili u razdobljima kada gen u normalnoj životinji ne djeluje. Primjer su geni koji određuju plan tijela, koji ako postanu djelatni u drugim dijelovima tijela uzrokuju razvoj krivih struktura. Ako se gen koji određuje ventralni dio kralježničke moždine učini genetskom preinakom djelatnim u dorzalnom dijelu, tada i taj dio stječe značajke ventralnog dijela – pojavljuju se biljezi budućih motoričkih neurona, a nestaju biljezi svojstveni dorzalnom dijelu s pretežno osjetnom ulogom. Time se

nedvosmisleno pokazuje da preinačeni gen ima ulogu u uspostavljanju plana razvoja kralježničke moždine tako što učestvuje u uspostavljanju njene ventralne strane.

Postupak genetske preinake u kojoj se nadodaje uloga gena podrazumijeva ugradnju dodatne kopije proučavanog gena u genom. Ova dodatna kopija može biti vođena drugim regulacijskim elementima što onda uzrokuje različito djelovanje novougrađenog gena. Istim postupkom se u mišji genom mogu ugraditi i dijelovi ljudskih gena, ali i bakterijski geni. Obzirom da se takav pripremljeni konstrukt može ugraditi bilo gdje u genom primjenjuje se postupak injiciranja oocite, a kao rezultat se dobiva miš s dodatnom kopijom gena (transgenom), pa se miš zove transgenični miš.

Postupak injiciranja oocite obuhvaća izolaciju tek oplodjenih jajnih stanica iz ampule jajovoda miša. Uređajem koji se zove mikroinjektor može se pod kontrolom mikroskopa jednom pipetom pridržati jajna stanica a drugim mikromanipulatorom upiknuti posebno naoštrena staklena kapilara u jajnu stanicu, te uštrcati pripremljenu DNA koja sadrži gen koji se želi ugraditi u muški pronukleus oplodjene jajne stanice. Ova DNA se spontano ugradi negdje u genom domaćina, a jajne stanice se vrate natrag u lažno trudnu ženku, gdje nastavljaju svoj embrionalni razvoj. Jednom ugrađena DNA se prenosi s generacije na generaciju, te se dobivaju sojevi transgeničnih miševa.

Primjer transgeničnog miša je miš kojemu je ugrađen gen za oštećeni receptor čimbenika rasta BDNF. Obzirom da su postojali suprotni rezultati da li višak ili manjak BDNF-a potiče epilepsiju, napravljen je miš koji osim vlastitog gena za receptor BDNF-a ima dodatnu kopiju ovog gena kojom se stvara receptor koji može vezati BDNF, ali ne može poslati unutarstanični signal koji je posljedica vezanja. Obzirom da se ovako oštećeni receptor natječe s normalnim receptorima za slobodni BDNF, djelovanje BDNF-a na stanice je smanjeno. Ovako preinačenim miševima dana je tvar koja uzrokuje epilepsiju, kainatna kiselina, te je pokazano da je učestalost i težina epilepsije bila puno manja. Tako je ovakav mišji model pokazao da smanjeno djelovanje BDNF-a ima dobrotvoran učinak u epilepsiji, te otvorio put ka eventualnoj terapiji epilepsije djelovanjem na signalizaciju BDNF-om.

Dodatne kopije gena mogu nositi biljege genske aktivnosti kao što su to fluorofori koji svijetle u vidljivom dijelu spektra pod ultraljubičastim svjetlom (napr. zelena fluorescentna bjelančevina, engl. GFP, green fluorescent protein), ili bakterijski gen lacZ čiji produkt beta-galaktozidaza mijenja boju supstrata X-gal u plavu.

Onemogućavanje gena je tehnički složenije od nadodavanja uloge. Kod nadodavanja uloge dodatna kopija gena mogla se ugraditi bilo gdje u genom, te je stoga mogla biti primjenjena direktna genetska preinaka oplodjene jajne stanice. Ako se želi onemogućiti gen, mora se preinačiti već postojeći alel u genomu, kako bi gen prestao biti djelatan. To znači da se ne djeluje bilo gdje u genomu, nego preinačuje upravo mjesto gdje se proučavani gen nalazi.

Zbog tog je potrebna ciljana promjena gena (engl. gene targeting), i njome se onemogućuje gen koji se proučava. Ciljana promjena gena postiže se postupkom homologne rekombinacije. Homologna rekombinacija zapravo znači da ako se u stanicu unese DNA koja je ista s nekim dijelom DNA domaćina, taj identični dio se može zamijeniti jedan s drugim. Ovo svojstvo se koristi tako da se između krila

homologije, dakle područja koja će se zamijeniti, umeću nehomologni dijelovi DNA, a istovremeno izbacuju aktivne regije gena koji želimo onemogućiti. Obzirom da je homologna rekombinacija vrlo rijetka, može se učiniti samo u kulturi na velikom broju stanica. Stanice koje se koriste u ovom postupku su embrionalne matične stanice.

Embrionalne matične stanice su dobivene iz zametka na stadiju blastociste, od stanica embrionalnog čvorića u njenoj sredini. Ove stanice se mogu održavati u nediferenciranom stanju u kulturi, međutim kada se vrate natrag u zametak na stadiju blastociste, prepoznaju okružje iz kojeg su potekle i uključe se u normalni razvitak zametka domaćina. Embrionalne matične stanice se vraćaju u zametak postupkom injiciranja blastociste koji se radi vrlo slično injiciranju oocite. Blastociste se izoliraju iz maternice miša. Mikroinjektorom se može pod kontrolom mikroskopa jednom pipetom pridržati blastocista, a drugim mikromanipulatorom upiknuti u nju posebno naoštrena staklena kapilara samo malo šira od one koja se upotrebljava za injiciranje oocite, te u blastocistu ubaciti embrionalne matične stanice. Blastociste se potom vraćaju natrag u maternicu lažno trudne ženke. Miševi koji nastaju ovim postupkom sadrže stanice dviju jedinki, blastociste domaćina i blastociste od koje su dobivene embrionalne matične stanice, pa se nazivaju kimerični miševi. Kimerizam se prepoznaje po boji krzna, jer se uvijek uzimaju sojevi miševa različitih boja. Embrionalne matične stanice doprinose svim tkivima i organima kimerične životinje, no najvažnije je da doprinesu spolnim žlijezdama. Spermij ili jajna stanica koji potječu od embrionalnih matičnih stanica osnova su za novu generaciju, čiji otac ili majka su zapravo stanice iz kulture.

Embrionalne matične stanice možemo u kulturi genetski preinačiti, pa ovim postupkom poslije od njih načiniti miša nosioca učinjene genetske preinake. Rijetka homologna rekombinacija može se provesti na embrionalnim matičnim stanicama, jer se u kulturi može raditi s velikim brojem stanica koje se onda različitim tvarim selekcioniraju kako bi ostale samo one koje nose željenu genetsku preinaku.

Primjer upotrebe homologne rekombinacije je onemogućavanje gena za beta-aducin. Bilo je poznato da je aducin bjelančevina koja povezuje citoskelet s membranskim bjelančevinama u eritrocitu. Kao rezultat onemogućavanja beta-aducina miševi su dobili nasljednu anemiju, koja odgovara sferocitičkoj eliptocitozi – vrsti anemije kod čovjeka. Također ovi miševi imaju visoki krvni tlak, što ukazuje na ulogu beta-aducina u regulaciji krvnog tlaka.

## Genetske preinake u službi medicine budućnosti

Premda su genetske preinake ljudi etički neprihvatljive, ipak se očekuje da će genetsko inženjerstvo imati veliku i važnu ulogu u medicini budućnosti. Znanstvene spoznaje dobivene postupcima molekularne genetike koji su nezamislivi bez genetskog inženjerstva upotrijebit će se i u dijagnostici i terapiji.

U dijagnostici se očekuje prepoznavanje individualnih genetskih sklonosti ka oboljenju od nekih bolesti. Moguće bi bilo prepoznati rizike za teži tok bolesti ako se pregledavaju već oboljeli ljudi. Također bi se na osnovu genetskih sklonosti mogla prilagoditi individualna terapija lijekovima koji bi kod njih bili djelotvorni. Sličan primjer je terapija AIDS-a, gdje virus brzo mutira i sa stalnim praćenjem mutacija može se prilagođavati terapija koja odgovara pojedinoj mutaciji. Konačno i zdrave jedinke će moći odrediti genetske sklonosti pojedinim bolestima, te primijeniti postupke ranog otkrivanja, promijeniti stil života ili djelovati na neki način kako bi se bolest spriječila još prije nego što nastane.

Novi načini terapije se razvijaju u dva osnovna smjera. Prvi smjer je genska terapija. Postoji niz bolesti koje nastaju zato što je naslijeđen nedostatak ili neispravni oblik bjelančevine važne za neku ulogu. Kada bi se nadomjestio taj gen stanicama kojima nedostaje, bolest bi se izliječila. DNA konstruirana postupcima genetskog inženjerstva bi se mogla ugraditi u bolesne stanice, pa bi se počeo proizvoditi ispravni oblik bjelančevine.

Premda se ovakav pristup čini jednostavnim, te su očekivanja s napretkom postupaka molekularne biologije bila da će se vrlo brzo uvesti u svakodnevnu praksu, ipak za sada nema prihvaćenih primjena genske terapije. Problemi koji je prate su raznoliki. Vrlo je teško bolesnim stanicama dostaviti gen koji im je potreban. To obično uključuje zarazu nekim od promijenjenih virusa koji se daju pacijentima ili kroz probavni ili dišni sustav. Također je teško provesti selektivnost da samo oboljele stanice budu zaražene. Nastale genetske promjene su prilično varijabilne i često nastaju neželjene nuspojave. Alternative direktnoj preinaki stanica u tijelu bolesnika je izolacija oboljelih stanica iz tijela u kulturu stanica, njihova genetska preinaka i testiranje te genetske preinake u kulturi, te potom vraćanje preinačenih stanica natrag pacijentu.

Drugi smjer razvoja novih postupaka je terapija stanicama. Oboljele ili odumrle stanice bi se mogle nadomjestiti ispravnima, koje se dobivaju od matičnih stanica. Izvor od kojeg bi se mogla dobiti bilo koja stanica ljudskog tijela su embrionalne matične stanice. Međutim dobivanje ljudskih embrionalnih stanica podrazumijeva uništenje zametka od kojih se dobivaju, pa je za sada etički nejasno da li će se razvoj ovog pristupa nastaviti. Alternativa je dobivanje matičnih stanica od odraslog davaoca, koji onda može biti i sam bolesnik. Osnovni izvor matičnih stanica je koštana srž i ovakav vid terapije se već koristi u postupcima transplantaciji koštane srži. Postoje postupci u kojima se iz stanica koštane srži mogu dobiti i druge vrste stanica, a ne samo krvne stanice, te one otvaraju nadu da bi ovaj pristup mogao imati i širu primjenu. Jedno od područja terapije stanica koje izgleda najbliže primjeni je terapija srčanog infarkta, gdje bi srčane matične stanice mogle zamijeniti ožiljak nastao nakon infarkta novim srčanim mišićnim tkivom.

Matične stanice bi također mogle biti genetski preinačene u kulturi, pa bi onda mogle nadomještavati stanice domaćina s određenim genetskim oštećenjem. Mogućnosti transplantacije jezgre koje su primijenjene u kloniranju Dolly daju dodatni broj mogućih kombinacija, jer bi se jezgra jedne jedinke mogla ubacivati u matične stanice druge jedinke i tako dobiti nizove stanica koji bi genetski potpuno odgovarale bolesniku kojem su namijenjene.

Svi ovi novi postupci nisu još na primjeni na pacijentima i proći će još vremena dok uđu svakodnevnu praksu. Vrijeme koje slijedi neće biti ispunjeno samo znanstvenim pokusima koji će omogućiti njihovu primjenu, nego i etičkim promišljanjima koji bi trebali odrediti njihovu primjenu za dobrobit čovjeka