

Zwierzęta transgeniczne w neurobiologii

Witold Konopka

Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Streszczenie

Zwierzęta transgeniczne w ciągu ostatnich 20 lat stały się ważnym narzędziem badawczym w wielu naukach biologicznych w tym także w neurobiologii. Istnieją cztery główne sposoby otrzymywania zwierząt transgenicznych: 1 - mikroinjekcja DNA do zygoty, 2 - transfer DNA przy pomocy wirusów, 3 - modyfikacja pierwotnych komórek zarodkowych ES (ang. *Embryonic Stem Cells*), 4 - transplantacja jąder komórkowych. Pierwsze dwie metody wykorzystywane są do otrzymywania zwierząt głównie z nadekspresją określonych konstrukcji genetycznych. Natomiast technologia ES pozwala na wyłączenie wybranego genu tzw. „knock-out”. Jak dotąd technikę delekcji genów można było zastosować jedynie u myszy. Alternatywną metodą tworzenia zwierząt typu „knock-out” dla innych gatunków jest technika transplantacji jąder komórkowych. Obecnie intensywnie rozwijane są metody indukowalnej/warunkowej ekspresji genów. Spowodowane jest to potrzebą uzyskania zwierząt, w których ekspresja lub „knock-out” wybranego genu obecne są tylko w określonych komórkach ciała lub w czasie zależnym od badacza. Głównymi systemami tego typu są: system Cre/lox – umożliwiający „knock-out” genu ograniczony tylko do pewnego typu komórek oraz system tetracyklinowy – umożliwiający włączanie i wyłączanie ekspresji wprowadzanego genu w dowolnym czasie.

Wstęp

Pierwsze próby otrzymania transgenicznych myszy pojawiły się już w na początku lat 80-siątych XX wieku (Gordon i Ruddle 1980, 1981, Costantini i Lacy 1981). Zwierzęta transgeniczne powstały w wyniku połączenia dwóch dziedzin naukowych: embriologii doświadczalnej oraz biologii molekularnej. Embriologowie opanowali umiejętność hodowania zarodków poza ustrojem oraz rozwinęli techniki manipulacji nimi. Natomiast w wyniku postępów biologii molekularnej stało się możliwe niemal dowolne konstruowanie fragmentów DNA, wprowadzanych następnie do genomu zwierząt transgenicznych.

Terminem zwierzę transgeniczne określa się takie zwierzę, które w swoim genomie posiada egzogeny DNA w postaci:

- losowo zintegrowanego fragmentu liniowego DNA
- zmodyfikowanego własnego genu w wyniku wprowadzenia egzogenego DNA (technologia „knock out” oraz „knock-in”)
- wprowadzonej całej sztucznej jednostki genetycznej np. sztucznego chromosomu bakteryjnego BAC (ang. *Bacterial Artificial Chromosome*) lub sztucznego chromosomu drożdżowego YAC (ang. *Yeast Artificial Chromosome*)

Sposoby otrzymywania zwierząt transgenicznych

Można wyróżnić kilka podstawowych metod wykorzystywanych do transgenizacji zwierząt laboratoryjnych oraz hodowlanych:

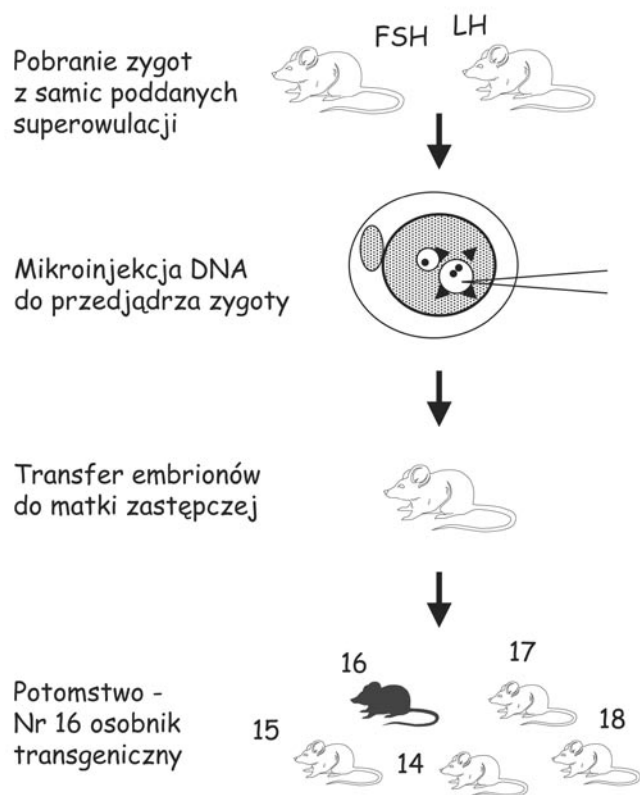
- mikroinjekcja DNA do zygoty
- transfer DNA przy pomocy wirusów
- modyfikacja pierwotnych komórek zarodkowych ES (ang. *Embryonic Stem Cells*)
- transplantacja jąder komórkowych

Mikroinjekcja DNA do zygoty

Pierwsza z metod polega na mikroinjekcji DNA (liniowego lub w postaci sztucznych chromosomów) do jednego z przedjądrzy jednokomórkowego zarodka – zygoty przy pomocy mikrochirurgicznej szklanej pipety. Przedjądrza posiadają materiał genetyczny pochodzący od ojca i matki tuż przed połączeniem się w jedno jądro komórkowe, które pokieruje rozwojem zarodka w późniejszym okresie. Roztwór DNA wstrzykiwany jest do dowolnie wybranego przedjądrza, a następnie nastrzyknięte zygoty hodowane są *in vitro* do stadium dwukomórkowego. Brak jest możliwości dokładnego kontrolowania objętości wstrzykiwanego roztworu DNA. Mikroinjekcję DNA przeżywa około 50% zarodków, które następnie przeszczepiane są do

jajowodu samic – matek zastępczych. Po okresie ciąży trwającej u gryzoni około 3 tygodni rodzi się około 30% przetransferowanych zarodków, wśród których około 15% posiada w swoim genomie zintegrowany transgen (Ryc. 1). W metodzie mikroinjekcji integracja wstrzykniętego transgeny do genomu jest losowa i nie ma możliwości wyboru miejsca wbudowania. Ponadto nie można kontrolować liczby kopii transgeny wbudowanych w genom, które często układają się tandemowo.

Otrzymany osobnik transgeniczny może posiadać transgen we wszystkich komórkach swojego ciała lub może być chimerą. Chimerą nazywamy taki organizm, którego komórki ciała nie są identyczne pod względem genetycznym. W przypadku zwierząt transgenicznych oznacza to, że niektóre komórki posiadają transgen, natomiast inne nie. Taka sytuacja może się zdarzyć, gdy integracja transgeny do genomu nastąpiła po pierwszym podziale komórkowym i tylko w jednej z komórek potomnych zwanych blastomerami. W przypadku gdy transgen nie znajduje się w komórkach płciowych założycielskiego osobnika transgenicznego, wtedy nie będzie on przekazywany następnym pokoleniom, co



Ryc. 1. Transgenizacja przy pomocy mikroinjekcji DNA do przedjądra zygoty.

uniemożliwi wyprowadzenie linii transgenicznej oraz przeprowadzenie badań.

Główną zaletą metody mikroinjekcji DNA jest brak ograniczenia rozmiaru wstrzykiwanego DNA. Dokonuje się iniekcji DNA pochodzącego z plazmidów (ok. 10 kpz), kosmidów (ok. 45 kpz) a także DNA sztucznych chromosomów BAC, YAC (długość fragmentu DNA sięgająca milionów par zasad).

Transfer DNA przy pomocy wirusów

Kolejną metodą wykorzystywaną do otrzymywania zwierząt transgenicznych jest infekcja przy pomocy retrowirusów i lentiwirusów. Główną przewagą tej metody nad innymi jest jej wyjątkowo duża wydajność, sięgająca nawet 80% transgenicznego potomstwa. Ponadto retrowirusy i lentiwirusy posiadają zdolność integracji do genomu po wnikięciu do komórki. W przypadku retrowirusów głównym ograniczeniem stało się wyciszenie ekspresji genów (obecnych w sekwencji wbudowanego do genomu retrowirusa) podczas rozwoju zarodka. Prawdopodobnie wady tej pozbawione są lentiwirusy, stanowiące jedną z klas retrowirusów. Lentiwirusy są zdolne do infekcji dzielących się oraz nie dzielących się komórek. Z tego powodu znalazły szerokie zastosowanie jako wektory w terapiach genowych. Do otrzymania zwierząt transgenicznych z zastosowaniem lentiwirusów wykorzystano dwie metody: infekcje jednokomórkowych zarodków (Lois i wsp. 2002) oraz infekcje pierwotnych komórek zarodkowych ES (Pfeifer i wsp. 2002).

Modyfikacja pierwotnych komórek zarodkowych ES

Metoda otrzymywania zwierząt transgenicznych z wykorzystaniem pierwotnych komórek zarodkowych ES (ang. *embryo stem cells*) pozwala na precyzyjną modyfikację badanego genu lub miejsca w genomie (Ryc. 2). Komórki ES izolowane są z blastocysty (wczesny etap rozwoju zarodka), dzięki czemu otrzymuje się komórki niezróżnicowane, które posiadają zdolność wbudowywania się do tkanek rozwijającego się zarodka po ponownym wprowadzeniu do blastocysty (Evans i Kaufman, 1981; Martin, 1981).

W metodzie tej komórki ES modyfikowane są *in vitro* w bardzo precyzyjny sposób. Podstawową techniką wprowadzania genów do komórek ES jest elektroporacja, ale także wykorzystuje się lipofekcję oraz metodę wapniową. Aby uzyskać pożądane miejsce integracji wprowadzany fragment DNA zawiera sekwencję genu

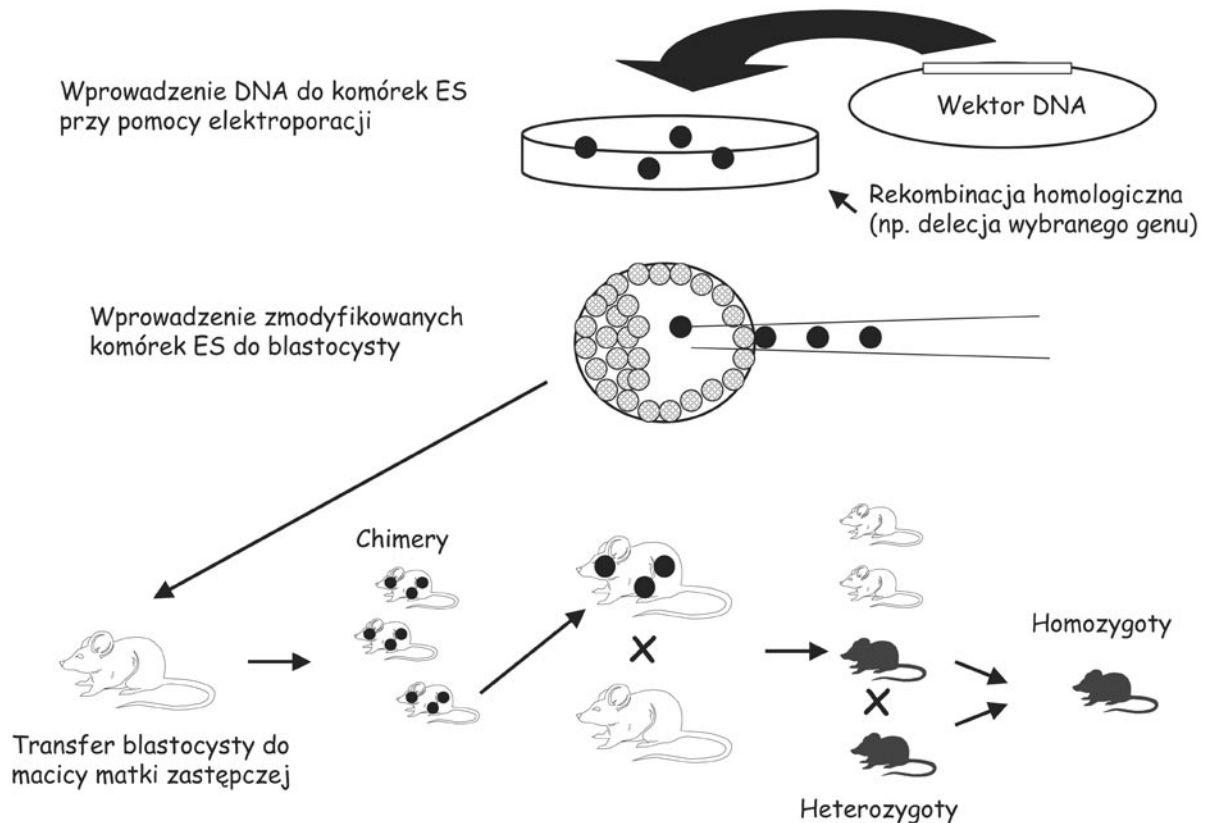
selekcyjnego otoczoną przez sekwencje homologiczne do modyfikowanego genu. W jądrze komórki następuje rozpoznanie sekwencji otaczających i wymiana genomowej sekwencji na sekwencję wprowadzaną przez badacza. Wprowadzenie „obcego DNA” wyłącza prawidłowe funkcjonowanie tego genu w komórce, dzięki czemu uzyskuje się komórki z wyłączonym genem tzw. *knock-out*. Ekspresja genu selekcyjnego (znajdująca się na wprowadzonym DNA) pozwala wybrać tylko te komórki-klony, w których nastąpiła właściwa wymiana (homologiczna rekombinacja).

Komórkę, w której nastąpiła wymiana i wyłączenie interesującego nas genu namnaża się w odpowiednich warunkach selekcyjnych. Komórki potomne następnie transferuje się do blastocysty, w której zmodyfikowane komórki ES łączą się z niezmodyfikowanymi komórkami zarodka tworząc jeden organizm. Otrzymana chimera posiada część komórek ze zmienionym genotypem, czyli z wyłączonym genem – *knock-out*. Jeżeli komórki ES-*knock-out* zasiedlą tzw. sznury płciowe, czyli komórki z których w życiu dorosłym powstaną komórki rozrodcze, to taki osobnik będzie mógł przekazać nową cechę - *knock-out* genu następnemu pokoleniu.

Potomstwo osobników chimerowych jest heterozygotyczne i dopiero po skrzyżowaniu dwóch heterozygot można otrzymać osobnika homozygotycznego z całkowicie wyłączonym genem (*knock-out*) na obu chromosomach homologicznych (Ryc. 2). Opisane wyłączenie genów stosuje się w celu zbadania funkcji danego genu, poprzez analizę nieprawidłowości powstałych u homozygotycznych osobników typu *knock-out*.

Transplantacja jąder komórkowych

Wcześniej opisana metoda możliwa jest do zastosowania jedynie u myszy, natomiast dla pozostałych gatunków istnieje inna droga otrzymywania osobników z wyłączonym genem typu *knock-out*. Wykorzystuje ona technikę transplantacji jąder komórkowych. Technika taka określana jako klonowanie somatyczne została wykorzystana do otrzymania owcy Dolly (Wilmut i wsp. 1997). W metodzie tej można wykorzystać wiele rodzajów komórek somatycznych, które w hodowli mogą być modyfikowane w podobny sposób jak mysie komórki ES. Po otrzymaniu komórek zmodyfikowanych np. typu *knock-out*, jedną z nich umieszcza się w pobliżu oocytu, z którego wcześniej mikrochirurgicz-



Ryc. 2. Transgenizacja przy pomocy pierwotnych komórek zarodkowych ES.

nie usunięto jądro komórkowe. Następnie łączy się obie komórki w procesie elektrofuzji, poddając je działaniu pola elektrycznego. W ten sposób otrzymujemy jednokomórkowy zarodek, którego rozwój kierowany jest na początku przez składniki zawarte w cytoplazmie oocyta, a następnie funkcję rozwoju przejmuje jądro komórki somatycznej. Jeżeli komórka ta została wcześniej zmodyfikowana np. poprzez *knock-out* genu, zmiana ta obecna będzie w każdej komórce powstałego organizmu.

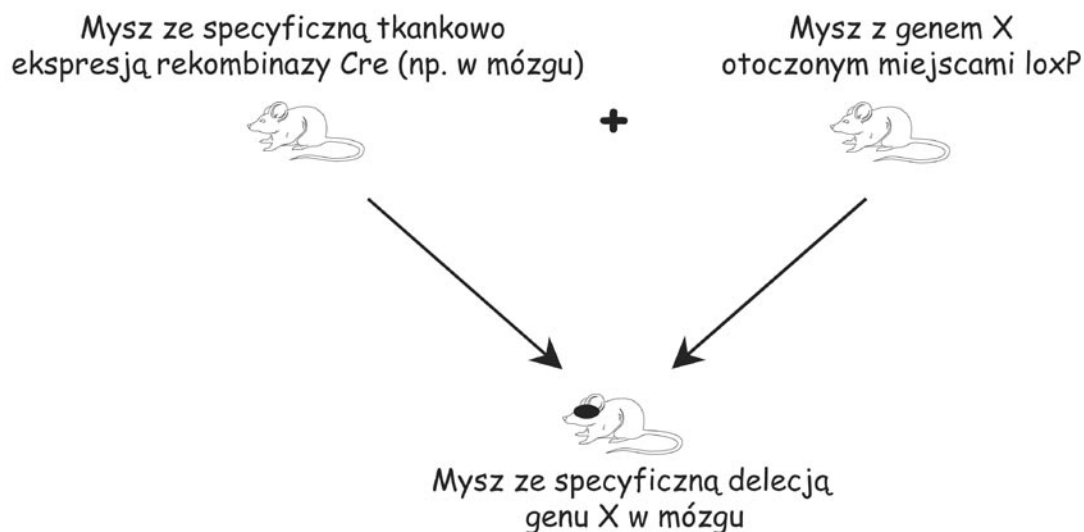
Systemy warunkowej/indukowalnej ekspresji genów

W opisanych dotychczas metodach otrzymywania zwierząt transgenicznych wprowadzone zmiany w genomie np. nadekspresja lub *knock-out* wybranego genu, istnieją od początku życia organizmu i jak w przypadku zwierząt „*knock-out*” we wszystkich komórkach ciała. Czasem może to powodować problemy z interpretacją wyników tj. u części myszy typu *knock-out* występują efekty kompensacji funkcji brakującego genu przez inne geny homologiczne lub pokrewne. Natomiast w pewnych przypadkach, gdy badany gen odgrywa kluczową rolę podczas rozwoju, jego usunięcie powoduje obumieranie zarodka, co uniemożliwia prowadzenie badań. Z tego powodu naukowcy pracują nad systemami warunkowej/indukowalnej ekspresji genów, które pozwalają na ekspresję bądź „*zknockoutowanie*” wybranego genu tylko w pewnych typach komórek oraz w czasie zależnym od badacza lub od specyficzności

promotora. Przykłady takich systemów oraz ich wykorzystania w neurobiologii podano poniżej.

System Cre/lox

W systemie tym komórki ES modyfikuje się w celu wprowadzenia do badanego genu pewnych sekwencji bez uszkodzenia funkcjonowania tego genu (tzw. technologia *knock-in*). W tym przypadku sekwencja badanego genu jest zastępowana przez taką samą sekwencję otoczoną miejscami loxP. Sekwencje loxP to krótkie sekwencje rozpoznawane przez enzym rekombinazę Cre, który usuwa sekwencję DNA zawartą między nimi. Tak zmodyfikowane komórki ES wstrzykuje się do blastocysty w celu otrzymania myszy ze zmienionym genotypem. Następnie takie myszy (tzn. posiadające gen, który chcemy usunąć, otoczony sekwencjami loxP) krzyżuje się z myszami posiadającymi gen rekombinazy Cre. W zależności od własności promotora kierującego ekspresją Cre, wycięcie genu będzie następowało tylko w tych komórkach, w których obecny będzie ten enzym (Ryc. 3). Przykładem promotora, który wykazuje specyficzność do pewnego rodzaju komórek (neuronów pobudzających przodomózgowia) jest promotor genu α podjednostki CaMKII. Fragment promotora α CaMKII (o długości 8,5 kbp) zastosowano do otrzymania myszy α CaMKII-Cre (Tsien i wsp. 1996a). Otrzymano 14 linii myszy transgenicznych, które następnie skrzyżowano z myszami posiadającymi gen β -galaktozydazy pod promotorem β -aktyny, przy czym promotor i gen były rozdzielone sekwencją z kodonem „stop” dla transkrypcji. Sekwencja „stop” była ponadto otoczona miejscami



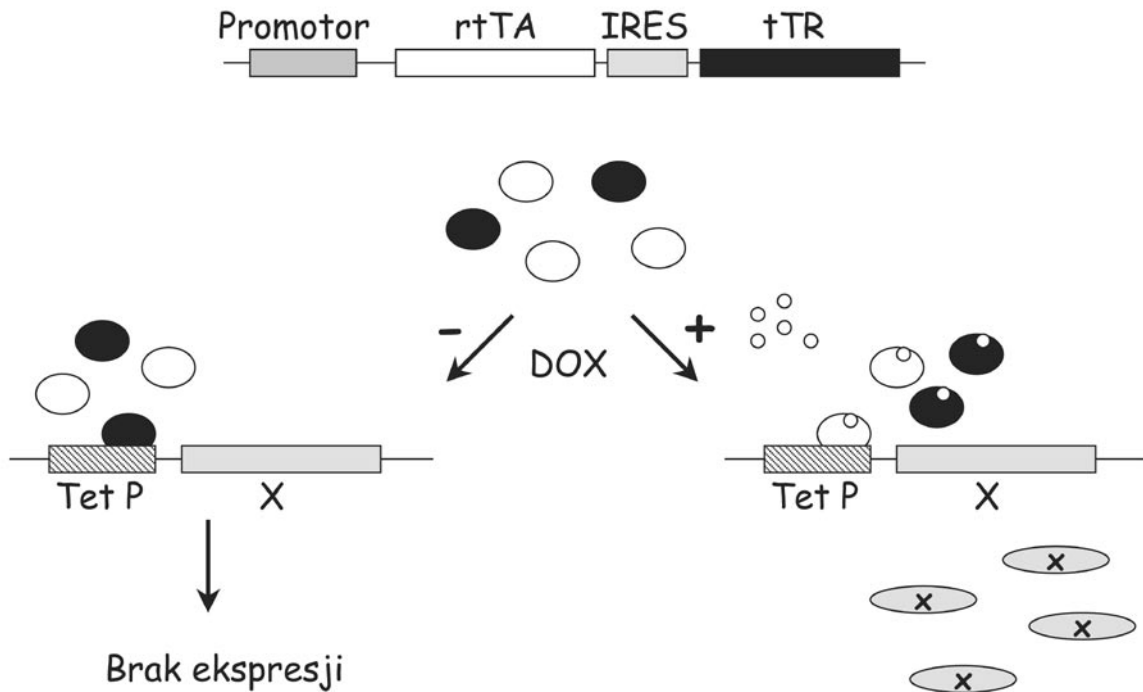
Ryc. 3. System Cre/lox warunkowej ekspresji genów.

loxP, wskutek czego ekspresja β -galaktozydazy możliwa była tylko po usunięciu tej sekwencji rozdzielającej przez rekombinazę Cre. W jednej z linii myszy obserwowano ekspresję β -galaktozydazy (świadczącej o zaistniałej rekombinacji Cre-loxP) tylko w komórkach pola CA1 hipokampa w mózgu. Opisaną linię myszy α CaMKII-Cre skrzyżowano ponadto z myszami posiadającymi gen dla receptora NMDAR1 otoczony sekwencjami loxP. Uzyskano w ten sposób myszy z „knock-outem” receptora NMDA ograniczonym tylko do niewielkiego regionu mózgu i tylko do pewnych komórek – pole CA1 hipokampa (Tsien i wsp. 1996b).

System tetracyklinowy

Kolejnym systemem pozwalającym na indukowalną ekspresję genów jest system tetracyklinowy (Gossen i Bujard, 1992). W systemie tym gen, który chcemy regulować znajduje się pod kontrolą promotora tetracyklinowego ($P_{CMV^{*}-1}$) złożonego z minimalnego promotora CMV oraz z sekwencji operatora tetracyklinowego (TetO). W ulepszonej wersji tego systemu (Rossi i wsp. 1998) wykorzystano represor oraz odwrotny aktywator tetracyklinowy. Oba białka wiążą się z promotorem tetracyklinowym i regulują jego działanie w sposób zależny od doksycykliny. W stanie podstawowym (gdym

brak jest antybiotyku w komórce) związany z promotorem represor blokuje ekspresję regulowanego przez nas genu. Natomiast po dodaniu doksycykliny zastępowany jest on przez odwrotny aktywator, który z antybiotykiem zyskuje powinowactwo do promotora $P_{CMV^{*}-1}$ i włącza ekspresję (Ryc. 4). Za pomocą doksycykliny możemy dokonywać wyboru czasu włączenia i wyłączenia ekspresji genu. Natomiast od wyboru promotora kierującego ekspresją represora i aktywatora zależy to w jakich komórkach lub tkankach system będzie działał. Przykładem zastosowania systemu tetracyklinowego do badania procesów uczenia się i pamięci w zwierzętach transgenicznych jest praca, w której dzięki indukowalnej nadekspresji inhibitora calcyneuryny wykazano jej rolę w regulacji tych procesów (Malleret i wsp. 2001). Otrzymano podwójnie transgeniczne myszy, w których gen inhibitora calcyneuryny znajdował się pod kontrolą promotora tetracyklinowego, natomiast odwrotny transaktywator pod kontrolą promotora α CaMKII. Doksycyklinę podawano w pożywieniu minimum tydzień przed wykonaniem eksperymentów. Ekspresję inhibitora wywołaną doksycyklinę obserwowano w korze mózgowej, hipokampie, prążkowie, opuszkach węchowych, a także w mózdzku. Indukcja ekspresji genu inhibitora była odwracalna, a brak efektu



Ryc. 4. Tetracyklinowy system indukowalnej ekspresji genów. rtTA – odwrotny transaktywator tetracyklinowy; tTR – transrepresor tetracyklinowy; TetP – promotor tetracyklinowy ($PCMV^{*}-1$); X – regulowany gen; DOX – Doksycykлина.

hamowania calcyneuryny (świadczącym o wyłączeniu ekspresji inhibitora) obserwowano 12 dni po odstawieniu doksycykliny.

Na zakończenie warto podkreślić, że w najbliższym czasie będziemy prawdopodobnie obserwować znaczący rozwój technik kontroli ekspresji genów w zwierzętach transgenicznych, dzięki czemu możliwe będzie dokonywanie coraz bardziej precyzyjnych zmian genomu.

Bibliografia

- Costantini F i Lacy E (1981) Introduction of a rabbit beta-globin gene into the mouse germ line. *Nature*. 294: 92-4
- Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature*. 292:154-156.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77:7380-4.
- Gordon JW, Ruddle FH (1981) Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science*. 214: 1244-1246.
- Gossen M., and Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5547-5551.
- Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D (2002) Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science*. 295:868-872.
- Malleret G, Haditsch U, Genoux D, Jones MW, Bliss TV, Vanhoose AM, Weitlauf C, Kandel ER, Winder DG, Mansuy IM (2001) Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell* 104:675-686.
- Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78:7634-7638.
- Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM (2002) Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:2140-2145.
- Rossi FM, Guicherit OM, Spicher A, Kringstein AM, Fatyol K, Blakely BT, Blau HM (1998) Tetracycline-regulatable factors with distinct dimerization domains allow reversible growth inhibition by p16. *Nat. Genet*. 20:389-393.
- Tsien JZ, Chen DF, Gerber D, Tom C, Mercer EH, Anderson DJ, Mayford M, Kandel ER, Tonegawa S (1996a) Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell*. 87:1317-26.
- Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S (1996b) The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*. 87:1327-38.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 385:810-813.