

HRVATSKA AKADEMIJA ZNANOSTI I UMJETNOSTI

ZBORNİK RADOVA
SIMPOZIJA O



**FUNDAMENTALNIM
ISTRAŽIVANJIMA**



ZAGREB, 1997.

Izdavač
Milan Moguš

Glavni i odgovorni urednik
Dubravko Tadić

Urednički odbor
Dubravko Tadić
Krunoslav Pisk
Danilo Pejović
Nikša Stančić

Lektor
Davor Piskač

Prijevod sažetaka
Kornelija Džepina-Burić

Tehnički urednik
Ranko Muhek

Korektor
Nena Bogdanić

Naklada
500 komada

Tisak
Birotisak, Zagreb

ISBN 953-154-078-0

Ivan Bašić i Zoran Tadić

Prirodoslovno-matematički fakultet, Zavod za animainu fiziologiju, Biološki odsjek, Zagreb

Genska tehnologija u uzgoju životinja

Ljudi od davnina uzgajaju domaće životinje zbog različitih proizvoda koje od njih dobivaju. Zbog toga je u njihovom uzgoju posebna pažnja posvećena dobivanju željenih odn. naglašenih proizvodnih svojstava (primjerice, povećane nesivosti u kokoši, povećane mliječnosti u goveda, izraženije mesnosti u svinja, itd.). Ovakav usmjereni uzgoj uglavnom se i danas temelji na pažljivoj selekciji, te daljnjem uzgoju jedinki koje pokazuju proizvodno poželjna svojstva.

Tehnike genskog inženjerstva razvijene su sedamdesetih godina ovog stoljeća i one su korijenito izmjenile genetiku. Uporabom ovih tehnika moguće je iz bilo kojeg organizma izolirati neki gen (ili neki njegov dio), umnožiti ga u bakteriji, ponovno ga izolirati, te *in vitro* istraživati njegovu gradnju i/ili funkciju. Iako se u početku istraživanja u molekularnoj genetici temelje na bakteriji *Escherichia coli*, kasnije se ista usmjeruju i na druge organizme kao što su gljivice pekarskog kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*), vinska mušica (*Drosophila melanogaster*), mali sisavci (miševi i štakori), te ljudi (*in vitro* uzgoj različitih ljudskih stanica). Naravno, postojali su i pokušaji izmjene svojstva domaćih životinja primjenom genskog inženjerstva, ali su isti do početka osamdesetih godina bili uglavnom neuspješni zbog nepostojanja prikladne metode unosa gena u žive životinje. Takve metode nisu niti do danas razvijene, ali se početkom osamdesetih godina razvijaju *in vitro* metode mikromanipulacije embrijima kojima je moguće pod mikroskopom u oplodenu jajnu stanicu (u pronukleus) ubrizgati otopinu u kojoj se nalazi željeni gen. Ovako obradena jajašca se umjetno implantiraju u ženke koje zatim daju potomke s izražajnosti unešenih gena. Ovakve se životinje nazivaju transgenske životinje. Prvi ovakvi pokusi napravljeni su početkom osamdesetih godina na miševima, a 1983. u časopisu *Methods of Enzymology* prvi je puta objavljen članak o proizvodnji transgenskih miševa. Kasnije je razvijena i metoda u kojoj se za proizvodnju transgenskih miševa koriste i embrijske matične stanice, ali je metoda mikroubrizgavanja u oplodenu stanicu i dalje ostala temeljna metoda za brzu i cijenom pristupačnu proizvodnju transgenskih životinja. U dobrim izvedbama, učinkovitost ove metode je oko 25%.

Danas postoje mnogi sojevi transgenskih miševa, a mnogi od njih se mogu i kupiti od velikih komercijalnih proizvođača mišjih sojeva (primjerice, od Jack-

son Laboratory u Bar Harboru u SAD). Transgenski su se miševi pokazali korisnima u proučavanju mnogih bioloških procesa. Posebice je izražajna njihova korist u području onkologije, aktivacije i ekspresije eukariotskih gena, u imunologiji, te u razvojnoj biologiji.

Ubrzo nakon proizvodnje prvih transgenskih miševa, izvedeni su prvi pokušaji proizvodnje transgenskih domaćih životinja. Cilj tih istraživanja bio je manipulacija genoma s namjerom dobivanja životinja sa izraženim korisnim svojstvima (primjerice, povećanja mesnatosti, povećanja mliječnosti), a time i skraćivanje postupka klasične selekcije koja može trajati godinama. Prvi geni koji su uneseni u domaće životinje bili su geni za hormon rasta. Ovi su geni 1985. uneseni u oplodene jajne stanice svinja, te su dobivene prve transgenske životinje. Ovakve su životinje rasle 11 - 14% brže od normalnih (netransgenskih) životinja, a dnevno iskorištenje hrane povećano je 16 - 18%, ali samo uz prehranu bogatu na proteinima. U transgenskih je svinja znatno je smanjena i debljina leđne slanine i to sa 21mm na 7,5 mm (prosječno). Međutim, ovakve pozitivne značajke bile su potpuno zasjenjene negativnim popratnim učincima povelike ekspresije gena za hormon rasta. Transgenske su svinje imale slabo razvijene zglobove nogu, te se nisu mogle slobodno kretati, a uočena je i bezvoljnost životinja i česti poremećaji rada srca koji su dovodili do uginuća životinja.

Slični su pokusi izvedeni i na ovcama, te je i tu primjećeno smanjenje potkožnog sloja masnog tkiva, ali nije došlo do nikakvog ubrzanja rasta ili do povećane mesne mase. I transgenske su ovce pokazivale sve negativne posljedice jake ekspresije gena za hormon rasta.

U piliće su geni za hormon rasta uneseni pomoću retrovirusnih vektora (primjerice, pomoću virusa retikuloendotelioze), ali do danas nisu poznati rezultati ovih pokusa.

Područje u kojem se pokušalo komercijalno iskoristiti transgenske životinje jest dobivanje medicinski važnih bioaktivnih tvari. Cilj ovih pokusa bio je usmjerenje željene tvari u mliječne žlijezde tako da se tvar kasnije može bioke-mijskim postupcima lako izdvojiti iz mlijeka. Na ovaj su način proizvedeni trans-genski miševi koji su u mlijeku izlučivali a1 antitripsin, te faktor IX koji je važan za grušanje krvi. Međutim, niti jedna od transgenskih linija životinja nije izlučivala zadovoljavajuće količine ovih proteina u mlijeku tako da se, zbog ekono-mskih razloga, odustalo od konstrukcije transgenskih domaćih životinja sa navedenim genima. Godine 1991. tvrtka Pharmaceutical Proteins Ltd. iz Edin-burgha u Škotskoj proizvela je transgensku ovcu koja je izlučivala a1 antitrip-sin. Ove su životinje u mlijeku izlučivale i do 35 mg / ml ovog proteina što je velika količina. Nažalost, nije poznato da li je tvrtka koristila ove životinje u industrijskoj proizvodnji ovog proteina.

Primjena metoda proizvodnje transgenskih domaćih životinja još se uvijek nalazi u pokusnoj fazi. Mikroubrizgavanje u oplodene jajne stanice pokazalo se jedinim sigurnim načinom za unos stranog genetskog materijala u svinje, ovce i goveda. Osim tehničkih ograničenja ove metode na domaćim životinjama (oplodene jajne stanice goveda, svinja i ovaca su često pune granulā koje onemogućuju određivanje položaja pronukleusa u koji treba ubrizgati željene

gene), postoji i veliki broj drugih čimbenika koji utječu na njenu učinkovitost. Prvo, još ni danas nisu u potpunosti poznati fiziološki procesi mnogih proizvodno poželjnih značajki tako da svi pokušaji njihovog mijenjanja izvana mogu imati nepredvidljive posljedice, kako za ta svojstva tako i za životinju u cjelini. Drugo, opće znanje o mehanizmima aktivacije i ekspresije eukariotskih gena je nepotpuno, a to znatno ograničuje obujam regulacije unešenih gena. Zbog ovih složenih problema može se pretpostaviti da će transgenske domaće životinje još dulje vremena ostati u pokusnoj fazi istraživanja, te da se neće dulje vrijeme industrijski iskorištavati.

Iako se gensko inženjerstvo u direktnoj proizvodnji domaćih životinja direktno ne primjenjuje, ono je našlo svoju vrlo važnu primjenu u dijagnostici, te u nekim postupcima direktno vezanima za klasičnu stočarsku selekciju. Tehnika koja se pokazala posebno korisnom jest lančana reakcija polimerazom - PCR (engl. Polymerase Chain Reaction). Ova se metoda temelji na selektivnom umnožavanju gena ili nekog njegovog dijela koji se onda može analizirati. PCR se koristi u detekciji mnogih zaraznih i/ili nasljednih bolesti u svinja i goveda. U svinja se njome mogu otkrivati bolest Aujeszkog, progresivni atrofični rinitis, svinjska kolera, te neke patogene spirohete u crijevu (primjerice, *Serpulina hypodysenteriae*). Nadalje, metoda jest temelj za otkrivanje nositelja gena za malignu hipertermiju. Postoje i naznake da bi se ova metoda mogla uspješno upotrijebiti za otkrivanje svinja osjetljivih na kolibacilozu. Primjena PCR - a značajno ubrzava otkrivanje patogena, a u nekim slučajevima može biti i mnogo osjetljivija metoda za otkrivanje bolesti od klasičnih imunoloških metoda. Primjerice, u slučaju otkrivanja bolesti Aujeszkog, metoda u kojoj se koristi PCR je od 100 - 400 puta osjetljivija od standardne metode u kojoj se virus izolira iz stanične kulture.

U goveda se PCR može primjeniti za otkrivanje nekih nasljednih bolesti kao što je citrulinemija (oštećenje gena za argininosukcinat sintetazu), nasljedna deficijencija adherencije limfocita B (oštećen gen za CD - 18 protein), te oštećenje gena za uridin monofosfat sintetazu. Metoda lančane reakcije polimerazom u kombinaciji sa metodom transfera embrija u goveda uspješno se u svijetu primjenjuje za određivanje spola u goveđih embrija, što ima veliki značaj u mliječnoj i mesnoj industriji. Osnovu te metode čini primjena PCR -a za određivanje nazočnosti Y kromosoma u izoliranim goveđim embrijima. Embriji sa i bez Y kromosoma, nakon odredbe, mogu se pohraniti ili odmah implantirati u uteruse krava - pomajki.

U Hrvatskoj do danas nije proizvedena niti jedna transgenska životinja. Razlog tome treba tražiti u visokoj cijeni čitavog postupka, te u velikim početnim izdvajanjima za opremu. Naime, najjeftinija varijanta potpune opreme laboratorija košta od 60 000 - 100 000 DEM. Osim toga, potrebno je mnogo uložiti i u opremu štale za životinje koja se mora održavati na poseban način. U našim je uvjetima istraživanja vjerojatno mnogo prihvatljivije kupiti transgenski soj životinja ili ga dati napraviti u nekom od dobro uhodanih laboratorija u svijetu, u slučaju planiranja istraživanja na transgenskim životinjama.

Centar za reprodukciju u stočarstvu RH i skupina istraživača (I. Bašić, Z. Tadić) sa Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno - matematičkog fakulteta započeli su genetička testiranja svinja na nazočnost mutacija u genu koji izaziva sindrom stresa u svinja (malignu hipertermiju). Ova je bolest u svinja nasljedne naravi, a javlja se u svinja nakon podvrgavanja stresu (primjerice, pri lošim uvjetima transporta, smještaja itd.). Bolest je uvjetovana genom (RYR1) koji regulira protok iona kalcija u mišiću, a koji se nalazi na šestom kromosomu. Prije se je podložnost bolesti testirala udisanjem plina halotana, ali se ta metoda pokazala nekorisnom, jer je dio svinja prolazio ovaj test kao negativan, ali je, međutim, prenosio mutirani gen na svoje potomstvo. Primjenom metode PCR moguće je u potpunosti definirati sva tri genotipa koja se javljaju, te u potpunosti isključiti bolesti podložnesvinje iz daljnjeg uzgoja.

LITERATURA

1. Otsu K. i sur.: Refinement of diagnostic assays for a probable causal mutation for porcine and human malignant hyperthermia. *Genomics* (1992.) 13: 835 - 837
2. O'Brien P.J. i sur.: Use of a DNA - based test for the mutation associated with porcine stress syndrome (malignant hyperthermia) in 10 000 breeding swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* (1993.) 203: 842 - 851
3. Grosveld F, Kollias G. eds.: *Transgenic Animals*, Academic Press, London, 1992.

Ovim putem želimo se zahvaliti voditeljima Centra za reprodukciju u stočarstvu RH dr. Dubravku Viduču i dr. Petru Bosniću na matrijalnoj i sveopćoj pomoći koju nam je njihova institucija pružila u ovim istraživanjima. Zahvaljujemo se također suradnicima i studentima našeg Zavoda, sudionicima ovih istraživanja Vesni Lacković, Ivici Milošu i Nadi Oršolić.

Summary

Ivan Bašić and Zoran Tadić

GENE TECHNOLOGY IN ANIMAL BREEDING

Man is a part of nature, he evolved together with animals and is very closely connected to them. Animals supply man with meat and milk, they help man hunting, they participate in various kinds of sports and accompany man in everyday life. It is known that in the development of the first great civilizations on our earth the usage of domestic animals played an important role. Although today the link between man and animals seems to be more loose, 60% of all proteins consumed by people in highly developed countries are proteins from animal origin, while by consuming meat and other products of animals people take 80% of substantial calcium, two thirds of phosphore and nearly cover their complete need of Vitamin B6.

Animals like frogs, mice, rats, guinea-pigs, hamsters and rabbits used for experiments in laboratories also play an important role in improving the quality of life. Such animals are excellent models for studying human diseases and, in addition, physiological and pharmaceutical research on them deliver information about the constitution and tasks of human organs and organic systems.

At the beginning of the 70-ies methods of gene engineering were developed. With these methods it was possible to manipulate genes and the discovering of their constitution and tasks was made easier. In the early 80-ies it was possible to create first transgeneal animals

by applying these methods together with methods used for the micromanipulation with embryos. Today there are a lot of sorts of transgeneal mice. Research on them resulted in a better understanding of many physiological, immunological and oncological processes as well as processes in development biology.

Also a great number of transgeneal domestic animals was produced of which goal it was to improve or to emphasize some of their characteristic features (e.g. to multiply meat or milk products) by adding the wished genes. We learned very much about molecule processes which are important for the production of a number of products of animals (e.g. production of milk by cows), although the production of such transgeneal domestic animals economically has not proved effective, there were even some rather disappointing results. Gene technology, however, has played an important part in diagnosing hereditary and infective diseases of domestic animals as well as in the production of preparations for veterinary medicine. This field of applied gene technology is the fastest developing today and it is widely being applied in highly developed countries, while some methods are being used in Croatia as well.