

ΖΩΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΝΟΣΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΣΤΗ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Τα ζωικά πρότυπα βοηθούν σημαντικά στην κατανόηση της φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού καθώς και του βιολογικού υποστρώματος των νόσων του ανθρώπου. Ο τρόπος με τον οποίο οι νόσοι επηρεάζουν τον οργανισμό καθώς και η αντίστοιχη θεραπευτική τους προσέγγιση μπορούν να μελετηθούν ολοκληρωτικά μόνο σε ζωικά πρότυπα. Παρότι υπάρχουν πιθανές φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των ασθενών και των ζωικών προτύπων νόσων του ανθρώπου η μελέτη τους έχει συντελέσει στην εξάλειψη πολλών θανατηφόρων νόσων τις τελευταίες δεκαετίες. Επίσης, η χρήση των ζωικών προτύπων έχει συνεισφέρει στην απομόνωση γονιδίων που εμπλέκονται σε νόσους του ανθρώπου. Η γονιδιακή στόχευση σε συνδυασμό με την διαγονιδιακή τεχνολογία έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη πολλών διαγονιδιακών ζωικών προτύπων νόσων του ανθρώπου διευκολύνοντας την βιοιατρική έρευνα πάνω στην παθοφυσιολογία διαφόρων νόσων.



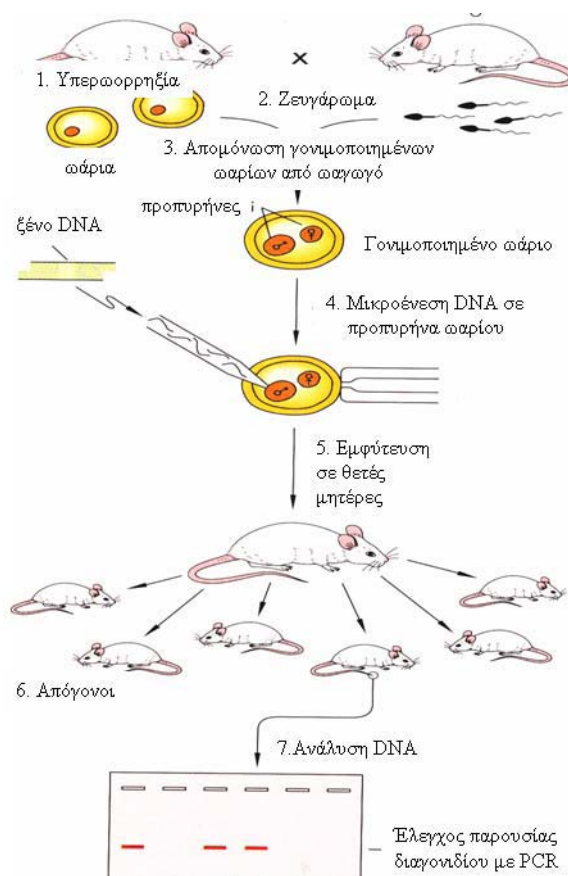
ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΖΩΩΝ

Διαγονιδιακοί, ονομάζονται οι οργανισμοί στους οποίους έχει τροποποιηθεί το γενετικό τους υλικό με την εισαγωγή «ξένου» DNA. Το ξένο γενετικό υλικό μεταβιβάζεται στη συνέχεια μέσω των κυττάρων της γαμετικής σειράς στους απογόνους. Σε γενικές γραμμές οι μέθοδοι δημιουργίας διαγονιδιακών ζώων είναι δύο:

- Μικροένεση γενετικού υλικού σε προπυρήνα γονιμοποιημένου ωαρίου
- Ιικοί φορείς για την μεταφορά των επιθυμητών γονιδίων

Μικροένεση γενετικού υλικού σε προπυρήνα γονιμοποιημένου ωαρίου

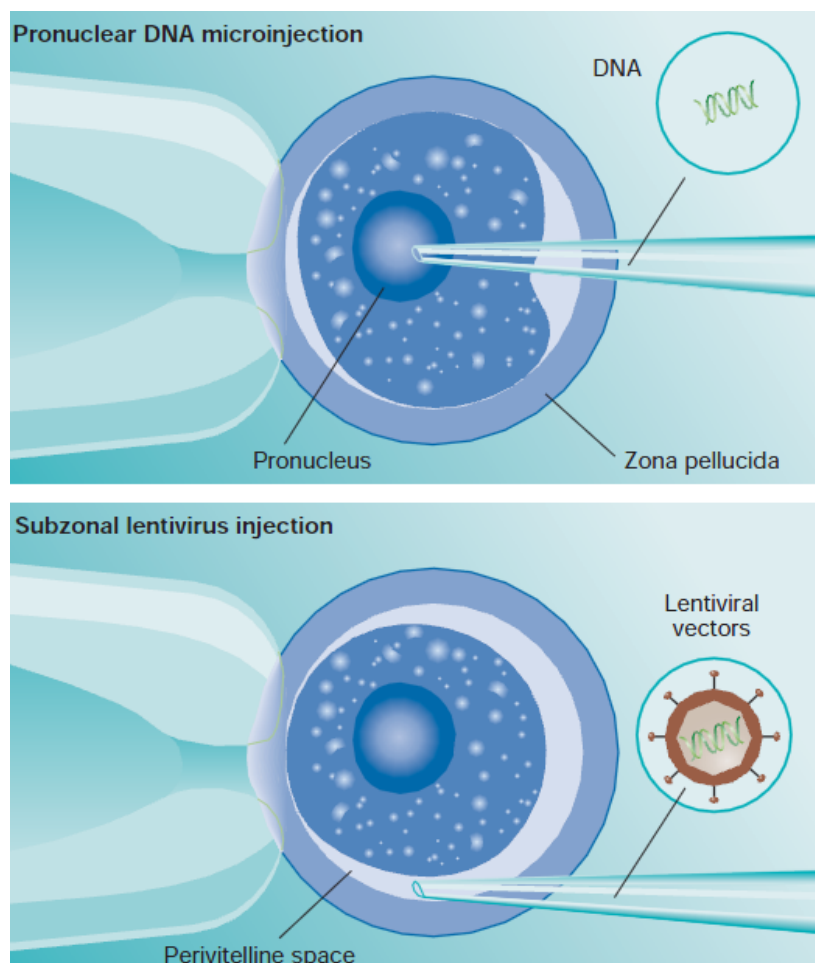
Τα πρώτα διαγονιδιακά ποντίκια με την μέθοδο της μικροένεσης δημοσιεύθηκαν το 1982, στα οποία είχε γίνει παρέμβαση στα γονίδια που καθορίζουν την ανάπτυξη. Σήμερα, σχεδόν όλα τα διαγονιδιακά ποντίκια παράγονται με μικροένεση του 'ξένου' DNA σ' έναν από τους δύο προπυρήνες του γονιμοποιημένου ωαρίου, έναν προερχόμενο από το σπερματοζωάριο και έναν από το ωάριο, που με τη σύντηξή τους θα προκύψει ο πυρήνας του εμβρύου στο στάδιο του ενός κυττάρου. Στην συνέχεια τα ζυγωτά μεταφέρονται στον ωαγωγό μιας θετής μητέρας όπου και αναπτύσσονται φυσιολογικά και οι απόγονοι που θα γεννηθούν ελέγχονται για την παρουσία του διαγονιδίου. Ένα οποιοδήποτε κλωνοποιημένο τμήμα DNA, είτε cDNA είτε γονιδιωματικό, μπορεί να εισαχθεί με μικροένεση στον προπυρήνα αφού απομακρυνθεί πρώτα απ' αυτό η περιοχή του φορέα κλωνοποίησης. Η ενσωμάτωση γίνεται τυχαία σε μία ή περισσότερες θέσεις του γονιδιώματος του ζυγωτού.



Εικόνα 1. Τα στάδια της διαγένεσης με την μέθοδο της μικροένεσης DNA σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωαρίων.

Λικοί φορείς για την μεταφορά των επιθυμητών γονιδίων

Η πιο καλά περιγραφείσα οικογένεια ιών που έχουν την εγγενή ιδιότητα να ενσωματώνονται στο γενετικό υλικό των κυττάρων των θηλαστικών είναι οι ρετροϊοί (*retroviridae*). Οι ρετροϊκοί φορείς που κυρίως χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία διαγονιδιακών ζώων είναι οι λεντιοί. Κατά τη δημιουργία διαγονιδιακών ζώων απομονώνονται γονιμοποιημένα ωάρια. Επειδή η διαφανής ζώνη αποτελεί ένα φυσικό εμπόδιο για την λεντική μόλυνση, η επώαση των γονιμοποιημένων ωαρίων με τους ιούς δεν αρκεί για την είσοδο του ιού στα κύτταρα. Για να ξεπεραστεί το πρόβλημα αυτό τα ιικά σωματίδια ενίονται στο διάστημα μεταξύ της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και της διαφανούς ζώνης (εικόνα 2). Η ένεση των ιών στην περιοχή αυτή όπως έχει αποδειχθεί δεν έχει σημαντική επίδραση στην εμβρυϊκή ανάπτυξη.



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση των τεχνικών μικροένεσης DNA σε προτυρήνα γονιμοποιημένου ωαρίου και εισαγωγή DNA στην περιοχή μεταξύ της διαφανούς ζώνης και της πλασματικής μεμβράνης του γονιμοποιημένου ωαρίου

Εφαρμογές τεχνολογίας διαγονιδιακών συστημάτων

- Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης *in vivo*
- Δημιουργία πειραματικών μοντέλων ασθενειών του ανθρώπου
- Ανάλυση των μοριακών, κυτταρικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην επαγωγή του φαινοτύπου
- Δοκιμές νέων φαρμακευτικών ουσιών στα μοντέλα ασθενειών
- Δημιουργία οργανισμών με νέα βελτιωμένα χαρακτηριστικά χρήσιμα στην ιατρική (π.χ. παραγωγή ινσουλίνης), στην κτηνοτροφία και στην γεωργία
- Γονιδιακή θεραπεία

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ KNOCKOUT ΠΟΝΤΙΚΩΝ

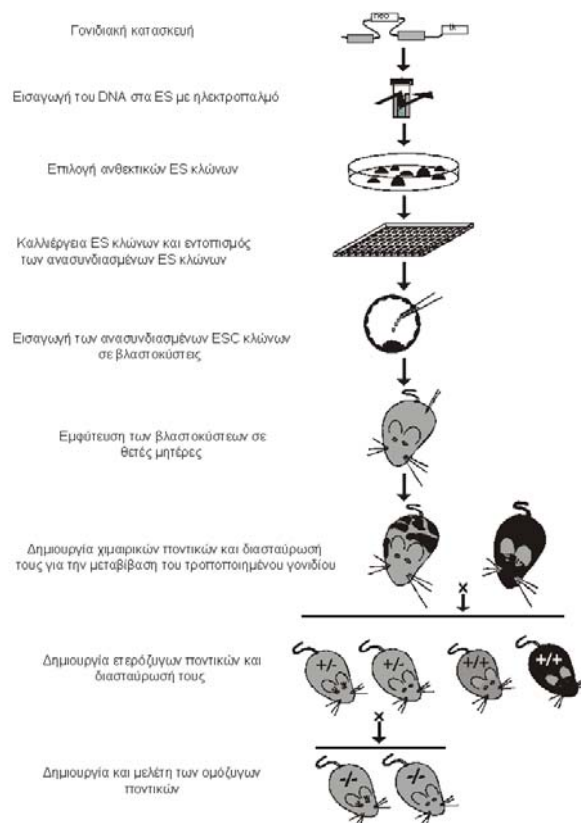
Η τεχνολογία της κατευθυνόμενης γονιδιακής στόχευσης (gene targeting) έχει εφαρμοστεί με μεγάλη επιτυχία τις τελευταίες δύο δεκαετίες στο ποντίκι και επιτρέπει την αντικατάσταση ενός ενδογενούς γονιδίου από ένα εξωγενές που φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη και επιτυγχάνεται με ομόλογο ανασυνδυασμό σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (Embryonic stem cells, ES). Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα απομονώνονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα (inner cell mass) της βλαστοκύστης, δηλαδή του εμβρύου 3.5 ημερών που δεν έχει ακόμα εμφυτευθεί (εικόνα 3). Η βλαστοκύστη αποτελείται από δύο διακριτά μέρη: την εξωτερική επιφάνεια (τροφοεξώδερμα) απ' όπου προέρχονται μεμβράνες που περιβάλλουν το έμβρυο και την εσωτερική κυτταρική μάζα από την οποία προέρχονται τα κύτταρα που συνιστούν το έμβρυο. Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα μπορούν να καλλιεργηθούν και υπό ειδικές συνθήκες παραμένουν αδιαφοροποίητα, και διπλοειδικά, έχοντας τη δυνατότητα όταν εισάγονται σε

άλλες βλαστοκύστες να συμβάλουν στη παραγωγή διαφοροποιημένων κυττάρων ακόμα και κυττάρων της γαμετικής σειράς.



Εικόνα 3. Βλαστοκύστη ποντικού.

Για να επιτευχθεί η στόχευση ενός γονιδίου σε όλα τα κύτταρα του ποντικού, η γονιδιακή κατασκευή εισάγεται με ηλεκτροπαιλμό σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα με σκοπό να αντικαταστήσει το ενδογενές γονίδιο μέσω του φαινομένου του ομόλογου ανασυνδυασμού. Τα ανασυνδυασμένα ES κύτταρα, δηλαδή τα κύτταρα όπου το ξένο DNA έχει αντικαταστήσει το ενδογενές γονίδιο-στόχο εισάγονται στο βλαστοκύτταρο της βλαστοκύστης συμβάλλοντας στον σχηματισμό ενός χιμαιρικού οργανισμού. Η μεταφορά των βλαστοκύστεων αυτών σε θετές μητέρες θα οδηγήσει στη δημιουργία χιμαιρικών απογόνων, που θα φέρουν δηλαδή κύτταρα τόσο από τη βλαστοκύστη όσο και από τα τροποποιημένα ES κύτταρα (εικόνα 4).



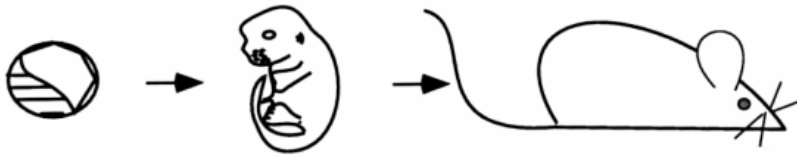
Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση των σταδίων που ακολουθούνται στην κατευθυνόμενη γονιδιακή στόχευση

«Υπό όρους» γονιδιακές τροποποιήσεις

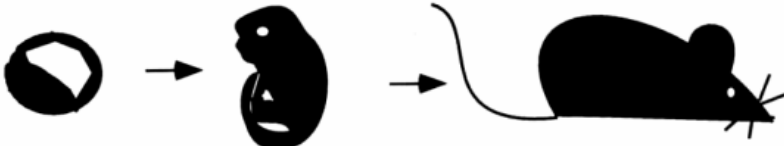
Οι «υπό όρους» γονιδιακές τροποποιήσεις (conditional gene targeting), μπορούν να οριστούν ως οι γονιδιακές τροποποιήσεις, οι οποίες συμβαίνουν μόνο σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους (κυτταροειδικές) ή επάγονται σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια ενός οργανισμού (χρονοεπαγόμενες). Αντιθέτως, η αδρανοποίηση γονιδίων στους κνoκoυt οργανισμούς γίνεται σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού (εικόνα 5). Η τεχνολογία αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε περιπτώσεις που α) τα αντίστοιχα κνoκoυt ποντίκια δεν επιβιώνουν και β) ένα γονίδιο εκφράζεται σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια και/ή σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Η προσέγγιση αυτή συνδυάζει την τεχνολογία της γονιδιακής στόχευσης με το σύστημα τοποειδικού ανασυνδυασμού Cre/loxP και αποσκοπεί συνήθως στην υπό όρους ενεργοποίηση, απενεργοποίηση ή αντικατάσταση ενός γονιδίου.

Η εφαρμογή του συστήματος Cre/loxP στις «υπό όρους» γονιδιακές τροποποιήσεις προαπαιτεί τη δημιουργία δύο σειρών ποντικών: μιας σειράς ποντικών που έχει δημιουργηθεί με γονιδιακή στόχευση, η οποία φέρει δύο loxP σε προκαθορισμένες θέσεις ενός γονιδίου, και μιας δεύτερης σειράς ποντικών που συνήθως παράγεται με διαγένεση, η οποία εκφράζει την Cre σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους ή αναπτυξιακά στάδια. Η «υπό όρους» μεταλλαγμένη σειρά ποντικών (conditional) προκύπτει με διασταύρωση των δύο αυτών σειρών ποντικών, έτσι ώστε η τροποποίηση του τμήματος DNA που φέρει τα loxP, να περιορίζεται μόνο στους κυτταρικούς τύπους ή αναπτυξιακά στάδια όπου εκφράζεται η Cre (Εικόνα 5).

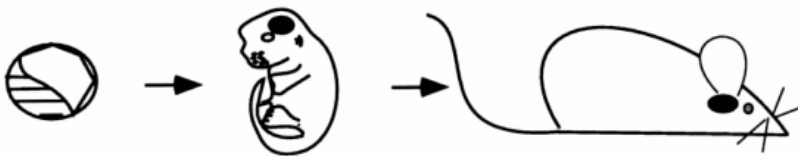
Wildtype



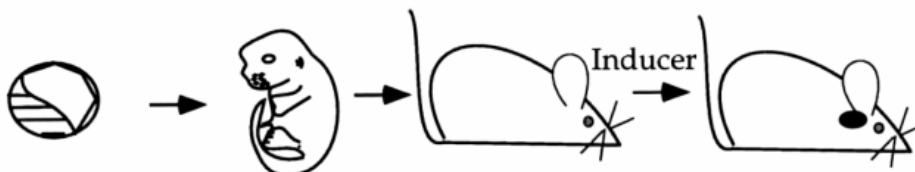
Conventional gene targeting



Cell type-specific gene targeting



Inducible gene targeting



Εικόνα 5. Κυτταροειδικές και χρονοεπαγόμενες γονιδιακές τροποποιήσεις.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mouse models for human disease. Hardouin, S. N., & Nagy, A. *Clinical Genetics* 57, 237-244 (2000)
2. Animal transgenesis: an overview. M.Sosa, R. Gasperi, G. Elder. *Brain Struct Funct* (2010) 214:91–109
3. Transgenic Mice: An Irreplaceable Tool for the Study of Mammalian Development and Biology (2000). Babinet C. *J Am Soc Nephrol* 11: S88–S94
4. Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring. Nagy A. (2000). *Genesis* 26(2): 99-109.