

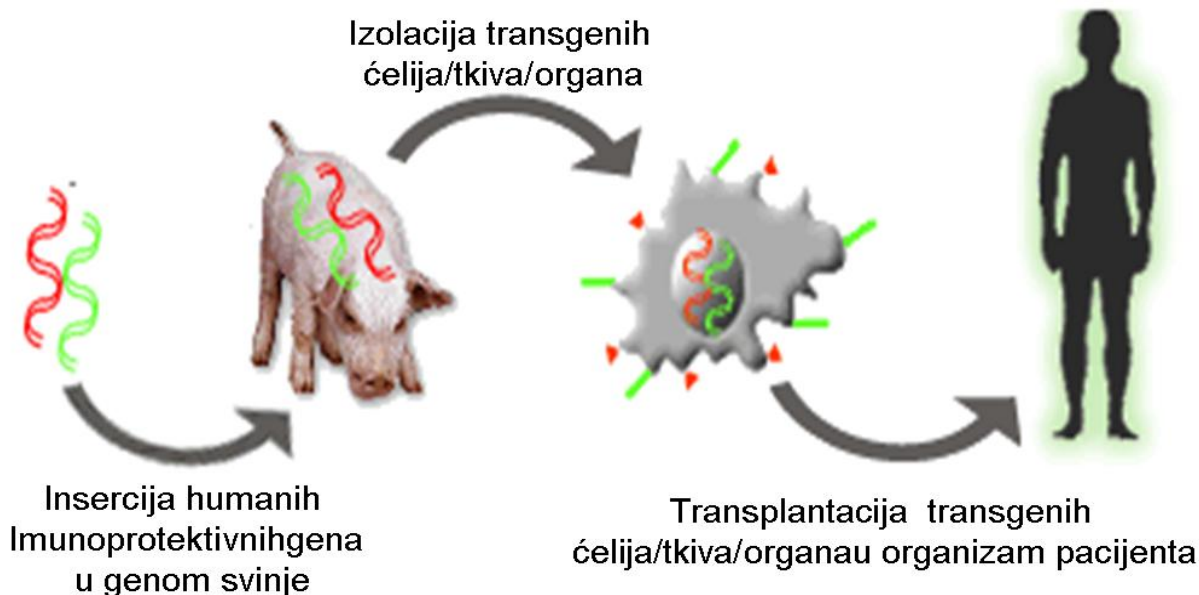
GENSKA TERAPIJA, GENETIČKI INŽENJERING I TRANSGENEZA



Prof. dr Zoran Stanimirović

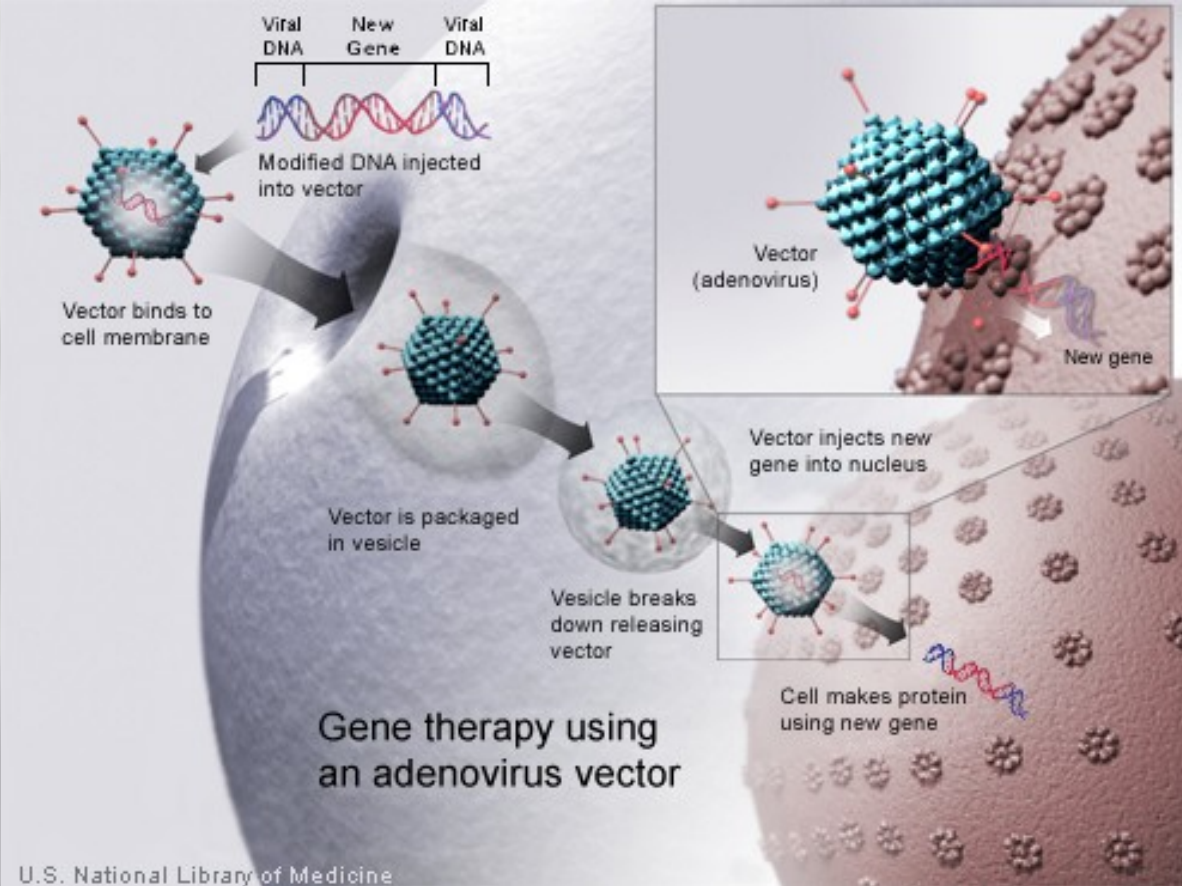
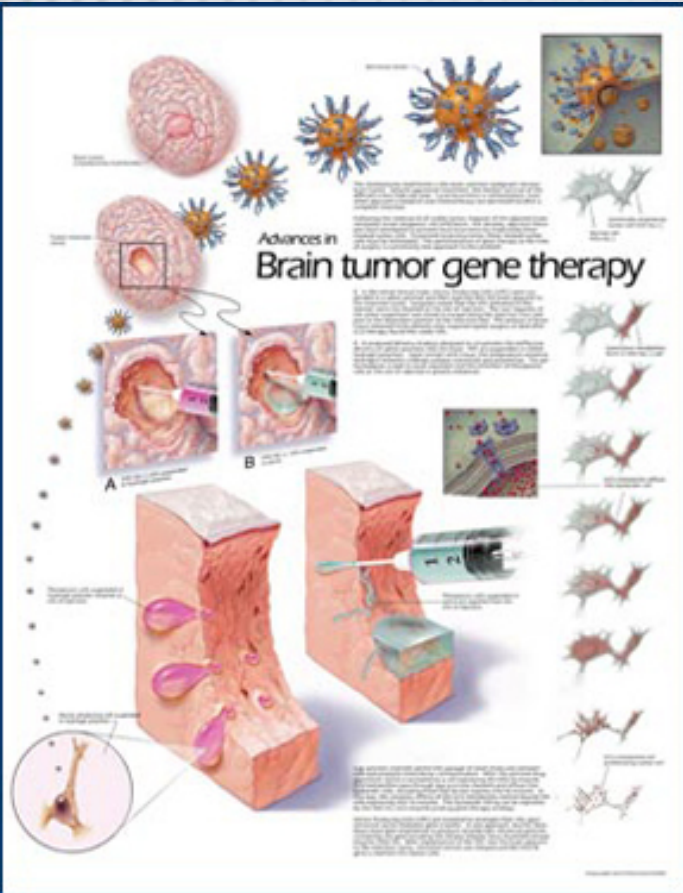
**Katedra za biologiju
Fakultet veterinarske medicine
Univerziteta u Beogradu**

Genska terapija u širem smislu je svaki terapijski postupak pri kojem se manipuliše delovanjem gena. Po takvoj definiciji, u gensku terapiju bi spadali mnogi terapijski postupci koji su već decenijama prisutni u medicini. Takav je primer terapija kortikosteroidima koja deluje na ćelije imunološkog sistema tako što menja izražavanje-ekspresiju određenih gena u njima. Međutim, pojam genske terapije ograničen je na postupke kojima se u ćeliju unosi genski materijal.

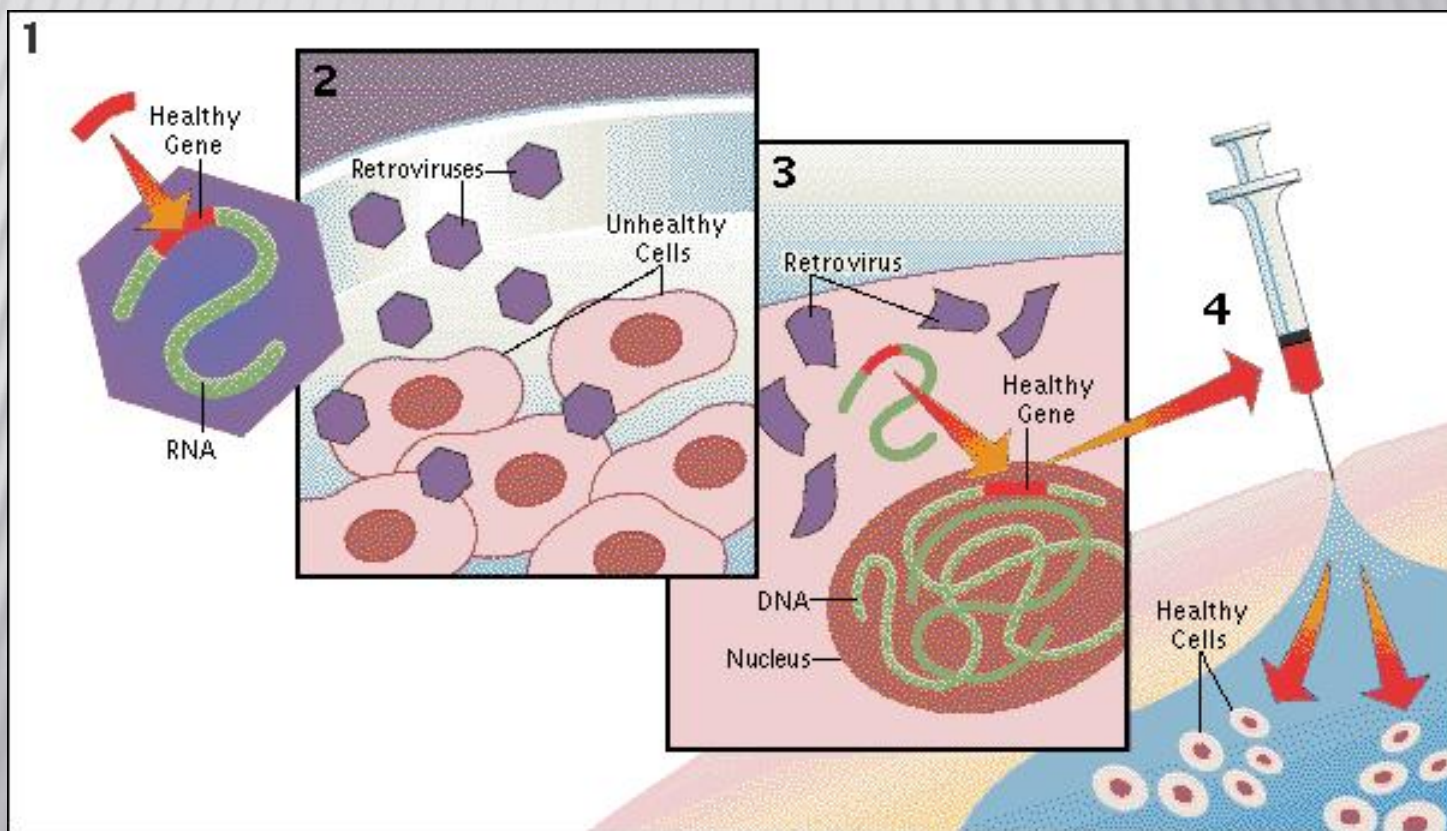


*Genska
terapija*

Posebno su interesantna istraživanja u oblasti genske terapije, odnosno zamene bolesnih gena zdravim čime bi se kod monogenских bolesti (prouzrokovanih jednim genom) postiglo trajno izlječenje (“genska hirurgija”).



Za sada, genska terapija se uglavnom radi eksperimentalno na životinjama pri čemu se intenzivno ispituje uvođenje molekula DNK u ćelije životinja putem retrovirusa. Najveći problem je u činjenici da se danas raspolaže još uvek primitivnim metodama za nasumično uvođenje DNK u ćeliju, bez mogućnosti usmeravanja prema defektnoj ćeliji i bez mogućnosti odstranjivanja mutirane genetske informacije, kao i bez uspešne metode za korekciju mutacije u oboleloj ćeliji. Sadašnja istraživanja su usmerena na transplantaciju gena humanih ćelija .



Genska terapija

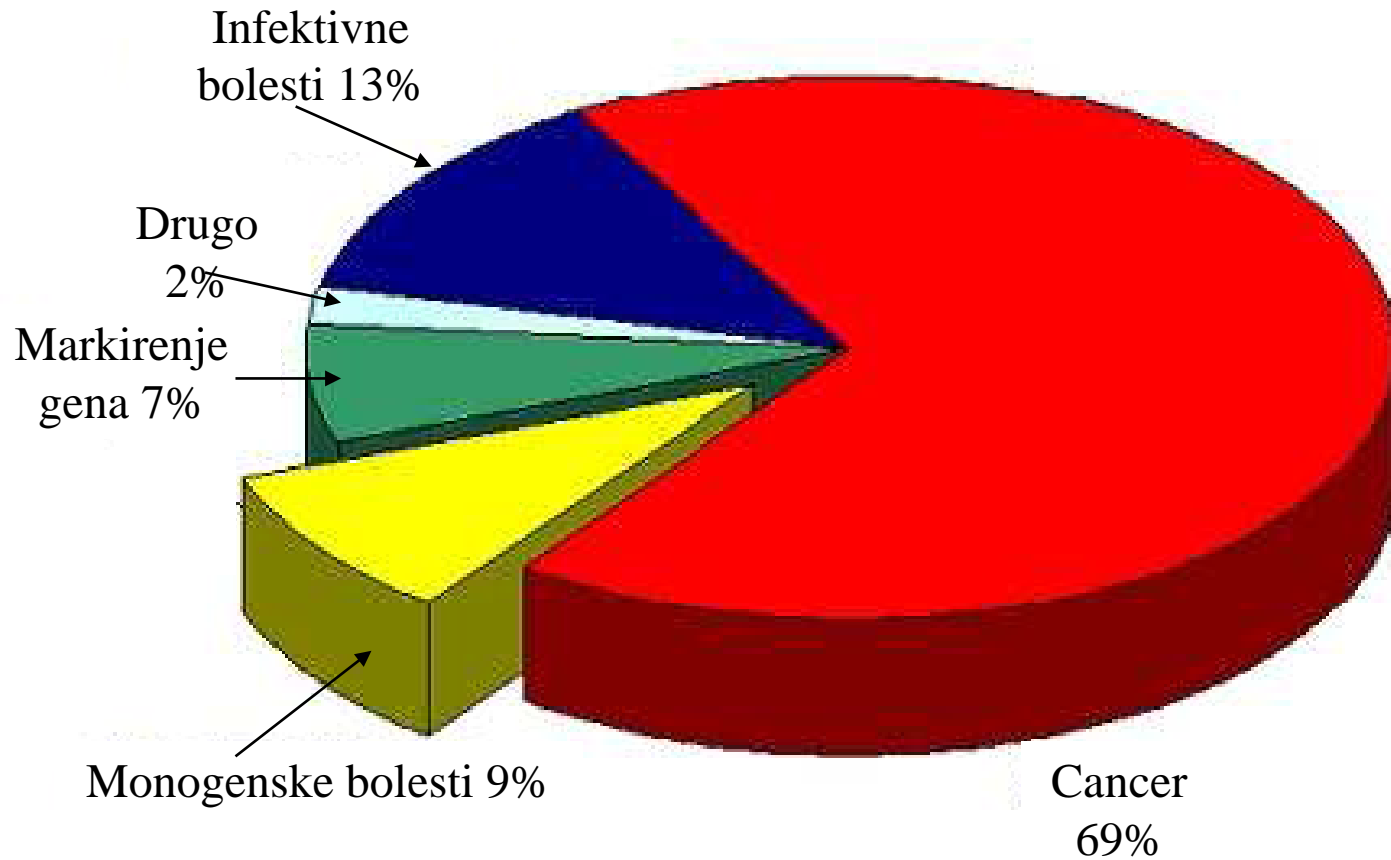
Prenos terapeutskog gena u obolelo tkivo može se obavljati iz više razloga:

- Transplantacije gena (kod delecija).
- Korekcija gena (ispravljanje mutacije).
- Povećavanje ekspresije ciljnog gena.
- Ciljano uništenje pojedinih ćelija unosom gena ubice.
- Ciljana inhibicija genske ekspresije.

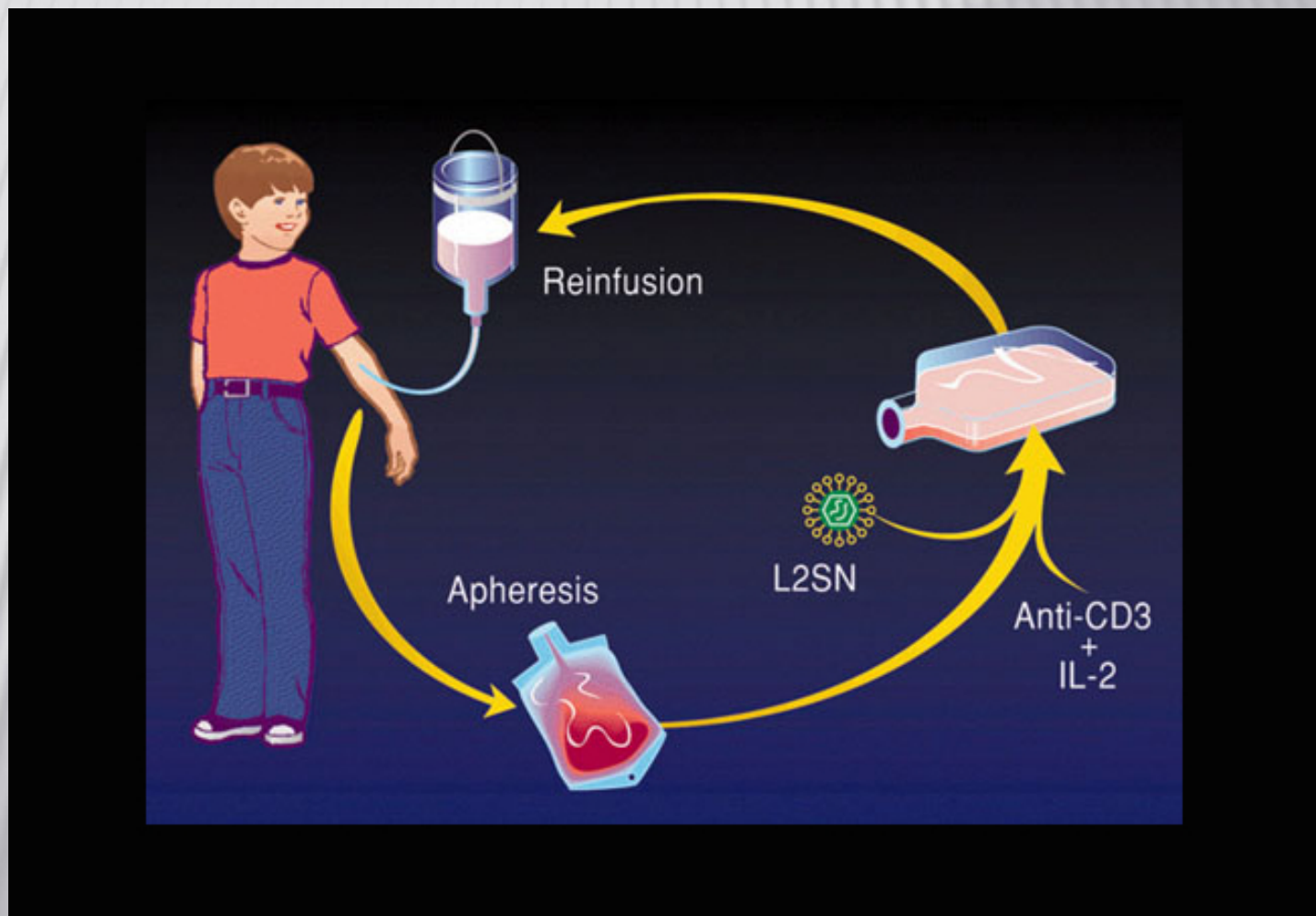
Bolesti kod kojih se može primeniti genska terapija

Bolest	Defekt	Ciljana ćelija
Teška kombinovana imunodeficijencija	Adenozin-deaminaza 4	Ćelije koštane srži, T limfociti
Hemofilija	Faktor VIII, IX	Jetra, mišic, fibroblasti
Cisticna fibroza	Gubitak gena CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)	Vazdušni mehurići - pluca
Rak	Više uzroka	Više tipova ćelija
Neurološke bolesti	Parkinson, Alzheimer	Direktno u mozak
Kardiovaskularne bolesti	Ateroskleroza	Endotel krvnih sudova
Autoimune bolesti	Dijabetes	MHC, 62-mikroglobulin
Infektivne bolesti.	AIDS, hepatitis B, COVID-19 CORONAVIRUS	T-limfociti, makrofagi.

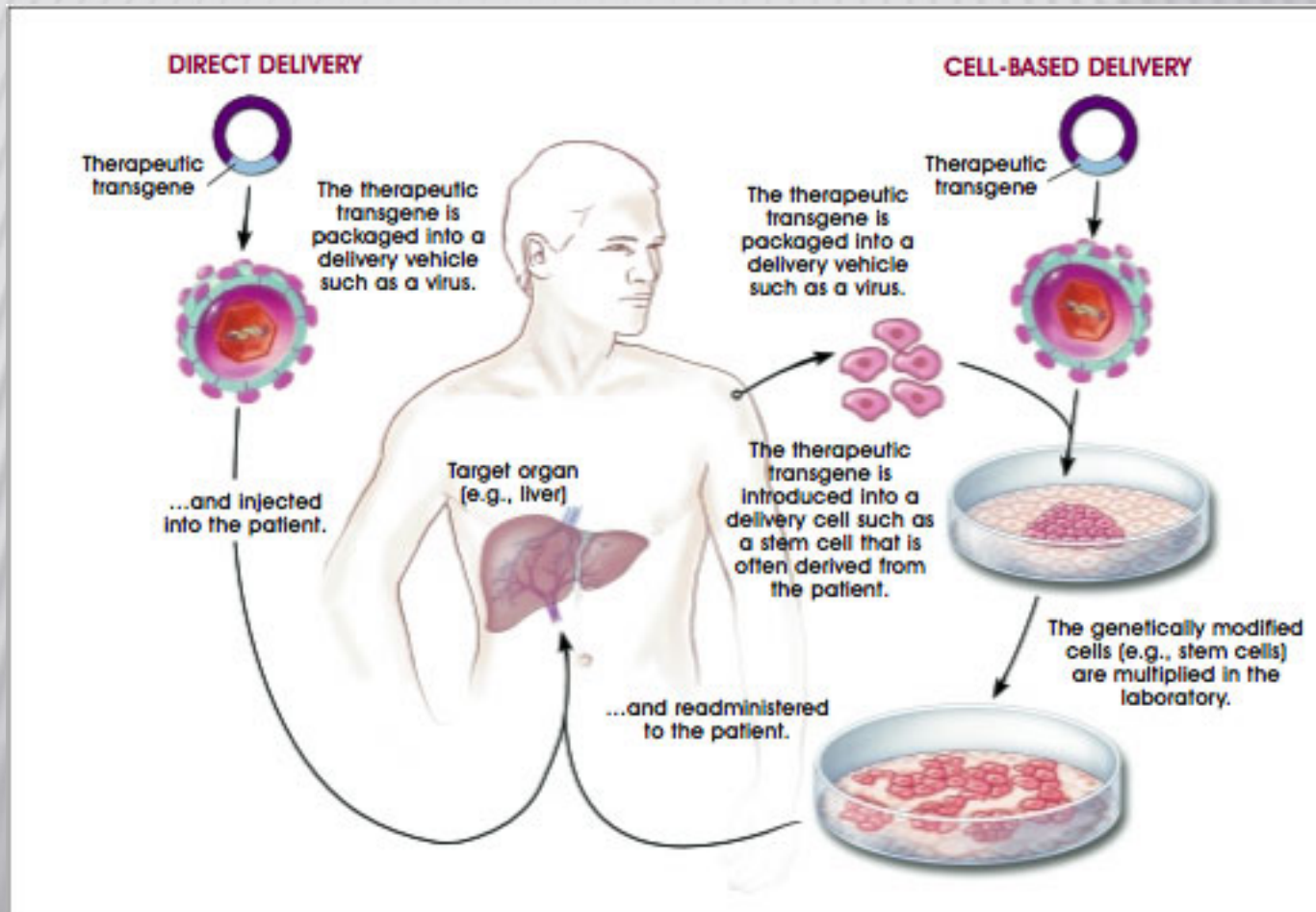
Primena genske terapije u medicini



Najpogodnije ćelije za ova istraživanja su ćelije kostne srži zbog svoje visoke proliferativne mogućnosti. Punkcijom, kostna srž se izdvaja iz grudne kosti pacijenta obolelog od nekog hematološkog oboljenja i ćelije se stavljaju u medijum (kultura ćelija). U isti medijum se ubacuju retrovirusi kojima su ugrađeni zdravi geni.



Retrovirusi kao vektori, pored svog genoma u ćeliju (limfocit) ugrađuju i zdravi gen. Nakon više mitotskih deoba ovako genetski izmenjene ćelije se vraćaju u organizam obolele osobe. Međutim, ova metoda još uvek nije dovoljno usavršena jer od velikog broja ćelija samo neke od njih su dobile zdravi gen na odgovarajućem mestu genoma.



Problemi s genskom terapijom

- **Kratkotrajna**

Vrlo teško je postići dugotrajan učinak bez integracije u genom, a čak i tada ishod nije izvestan.

- **Imuni odgovor**

Reducira učinak, onemogućava operativnu terapiju.

- **Problemi s virusnim vektorima.**

Toksičnost, imuni i upalni odgovor, mogućnost povratka sposobnosti za izazivanje bolesti.

- **Višegenske bolesti**

Kombinovani učinak više gena – teško lečenje.

Prema ciljnim ćelijama genska terapija može biti:

- somatska genska terapija, gde su ciljne ćelije sve ćelije organizma, osim polnih i
- germinativna genska terapija kod koje se genski materijal unosi u polne ćelije.

Pri somatskoj genskoj terapiji, promene u genomu ostaju ograničene na osobu/jedinku kod koje je terapija primenjena, i nema uticaja na genom potomstva. A pri germinativnoj genskoj terapiji promena u genomu se prenosi na potomstvo generacijama. Ova podela je za sada uglavnom teoretska, jer ne postoji pouzdan način kojim bi se moglo pri *in vivo* genskoj terapiji sprečiti unos genetskog materijala u polne ćelije.

Prema načinu primene genska terapija može biti:

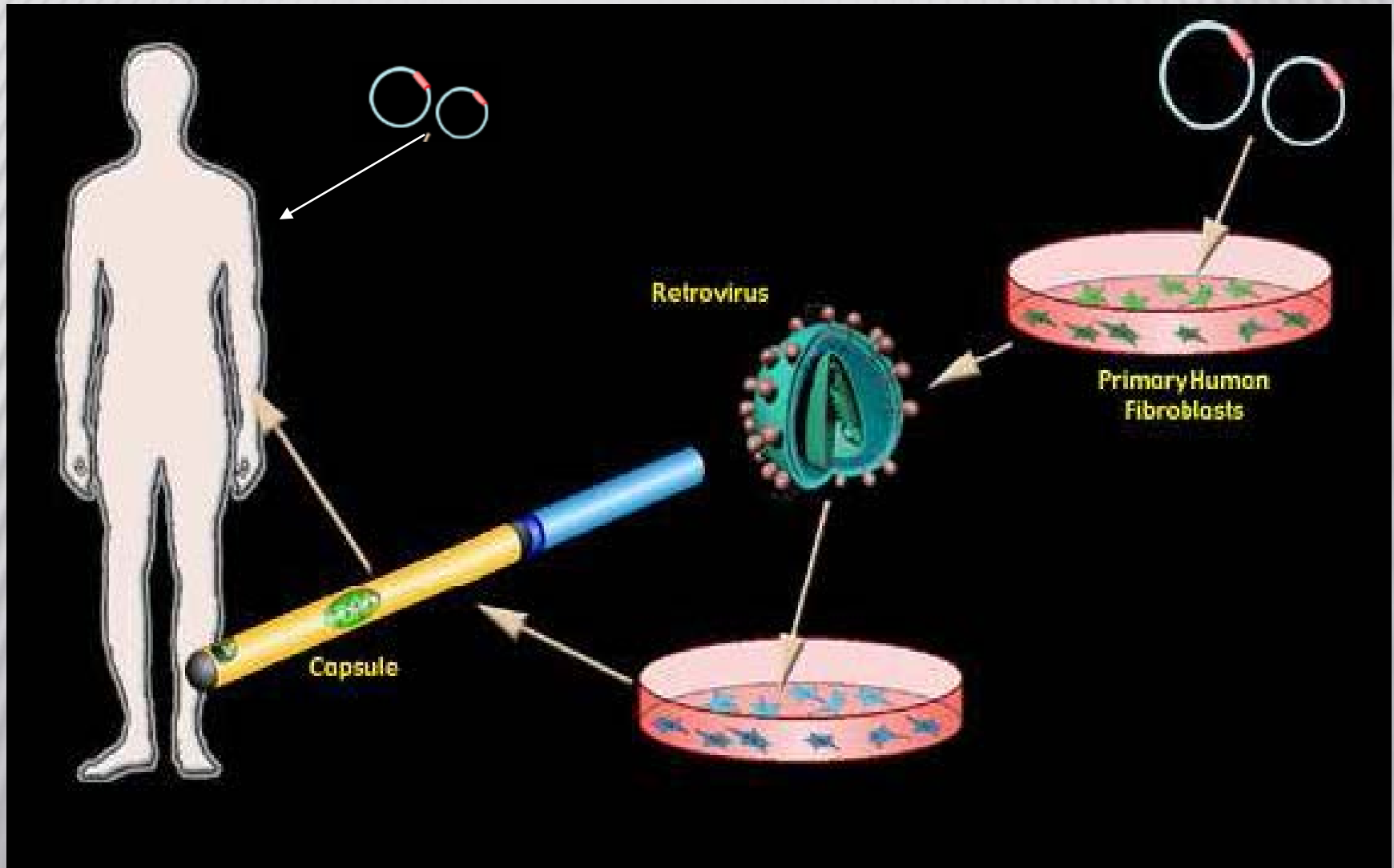
- *ex vivo* genska terapija, koja se obavlja u laboratorijskim uslovima na ćelijama koje se kasnije vrata u organizam bolesnika i
- *in vivo* genska terapija kod koje se genski materijal unosi direktno u telo bolesnika putem vektora.

**Genska
terapija**

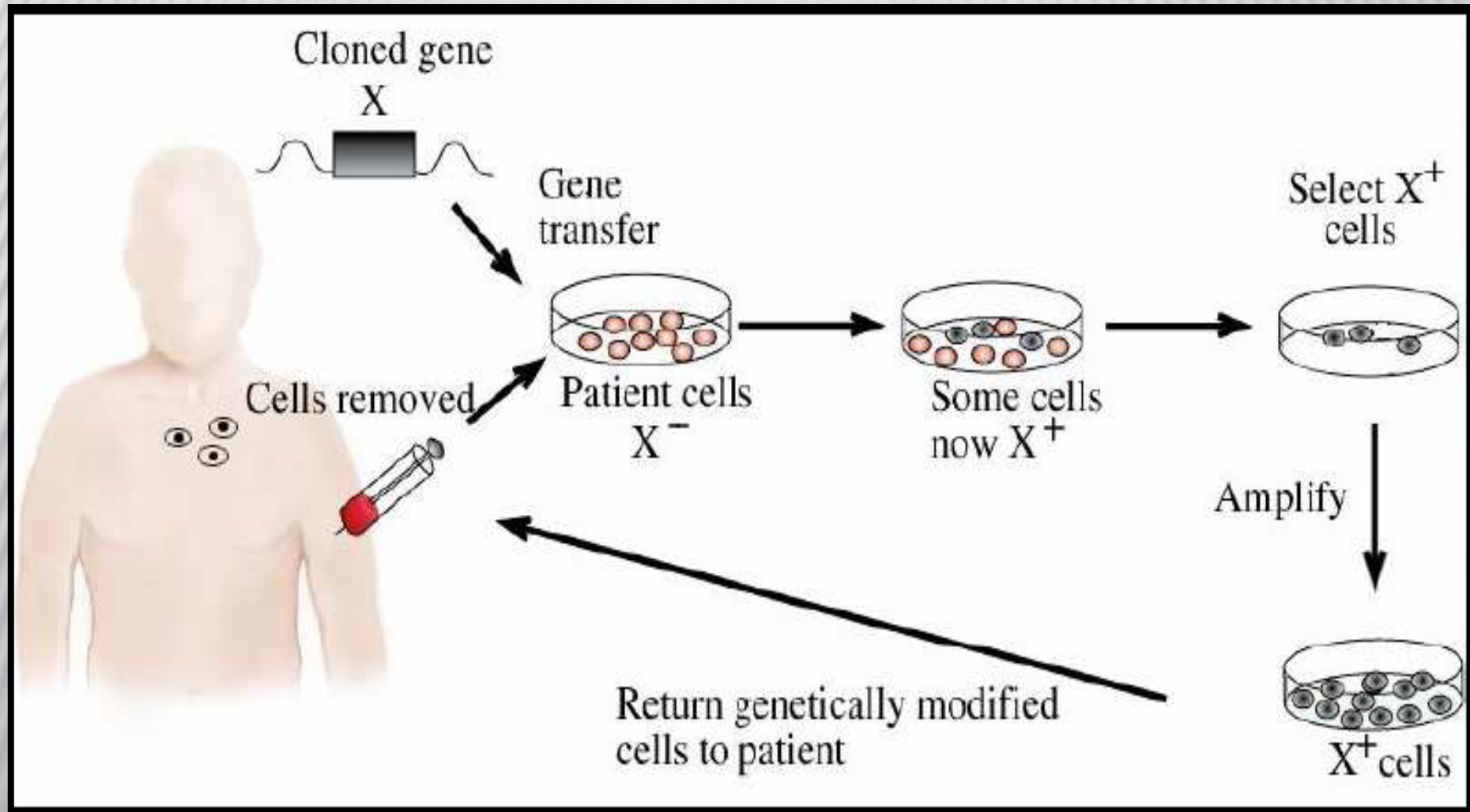
Dva tipa genske terapije

in vivo

ex vivo



GT *ex vivo*



GT *in vivo* i *ex vivo*

in vivo

- Genetički materijal unosi se direktno u telo pacijenta.
- Prilično nasumičan proces i mala mogućnost kontrole.
- Jedina mogućnost za tkiva koja se ne mogu uzgajati *in vitro*.

ex vivo

- Genetički materijal se najprije unosi u ćelije u kulturi.
- Kontrolisan proces, selekcija ćelija sa transgenom.
- Ćelije su obično autologne tj. uzimaju se iz tela pacijenta i nakon modifikacije vraćaju nazad.

Načini unosa DNK zavisno od namene GT

- Unos visokoefikasnim biološkim vektorima; virusnim vektorima-Zamena gena. Monogenske bolesti: cistična fibroza, teška kombinovana imunodeficijencija, hemofilija.
- Direktni unos gole DNA- Kratkotrajna ekspresija za podsticanje imunog odgovora.
- Unos DNK putem liposoma čime se ćelije čine osjetljivijim za radioterapiju.

Metode unosa terapeutskih elemenata DNA

- *Unos putem bioloških vektora*

Geneticki modifikovani virusi - ne mogu se replicirati u domaćinu.

Trenutno najefikasnija metoda prenosa DNA u genskoj terapiji

Poželjna svojstva vektora za gensku terapiju

- Visoki titar ($>10^8$ čestica/ml).
 - Laka i reproducibilna metoda proizvodnje.
 - Precizno i stabilno uvođenje transgena.
 - Vektor ne bi smeo indukovati imuni odgovor nakon unosa u organizam.
 - Kontrolisana ekspresija transgena (on/off sistem)
 - regulatorni elementi unutar transgena.
 - Specifičnost za pojedine tipove ćelija.

Virusni vektori za gensku terapiju

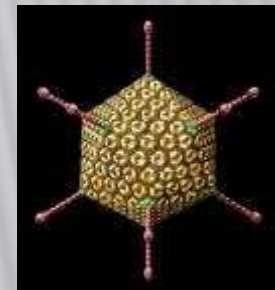
Retrovirusi

dl RNA (*dendrimer-like RNA*) virusi koji se ugrađuju u genom domaćina putem dl DNA oblika, HIV, mišji virus Leukemije (MoMuLV), (Reverzna transkripcija).



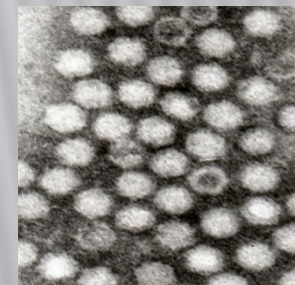
Adenovirusi

dl DNA (*dendrimer-like DNA*) virusi koji uzrokuju respiratorne, intestinalne i infekcije oka u ljudi
Virus obične prehlade.



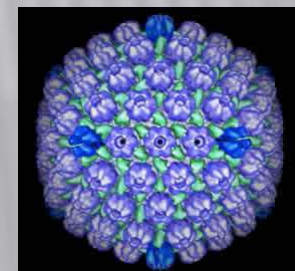
Adeno-asocirani virusi

jl DNA (*jejuni like DNK*) virusi koji se mogu ugraditi na specifično mesto unutar hromosoma 19.



Herpes simplex virusi

dl DNA virusi koji napadaju specifične tipove ćelija,
npr. Neurone.



Metode unosa terapijskih elemenata DNA

•Unos gole DNA

Jednostavnom iglom i špricom – tumorsko tkivo,

*Genskim pištoljem – koža, neprikladno za
tumore,*

Unos liposomima :

**Dopremanje do ciljnog tkiva intravaskularnim,
intratrahealnim, intraperitonealnim,
intrakolonjskim putem.**

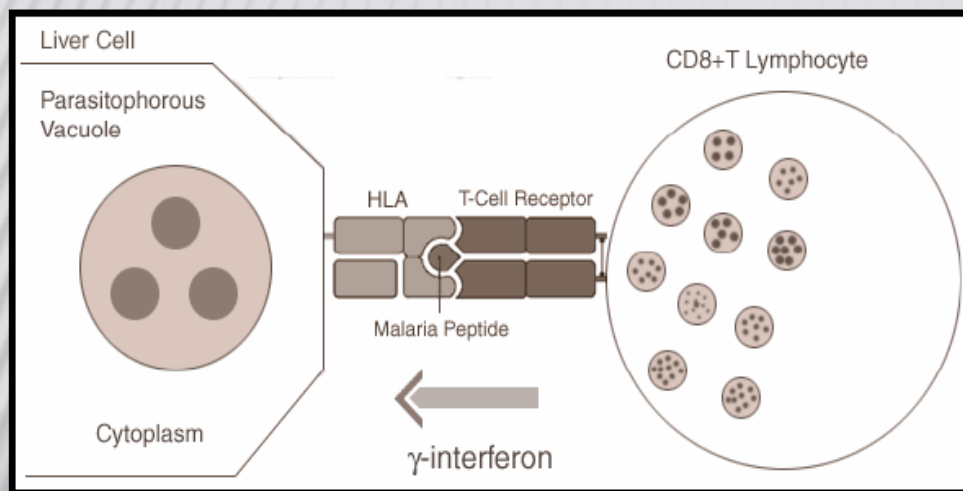
Unos gole DNA

Intramuskularno, intravaskularno.

Produžena *in vivo* ekspresija niskog stepena.

Jednostavno i jeftino, ali ne i univerzalne

DNA vakcine:



T-limfociti prepoznaju ćeliju s parazitom malarije
Proizvodnja INF-A i stimulacija prezentacije antigena

Infektivne bolesti

Tradicionalne vakcine još uvek efikasne.

Rak

Povećanje postojećeg imuno-odgovora i podsticanje imuno odgovora prema neprepoznatom ili slabo antigenom tumoru.



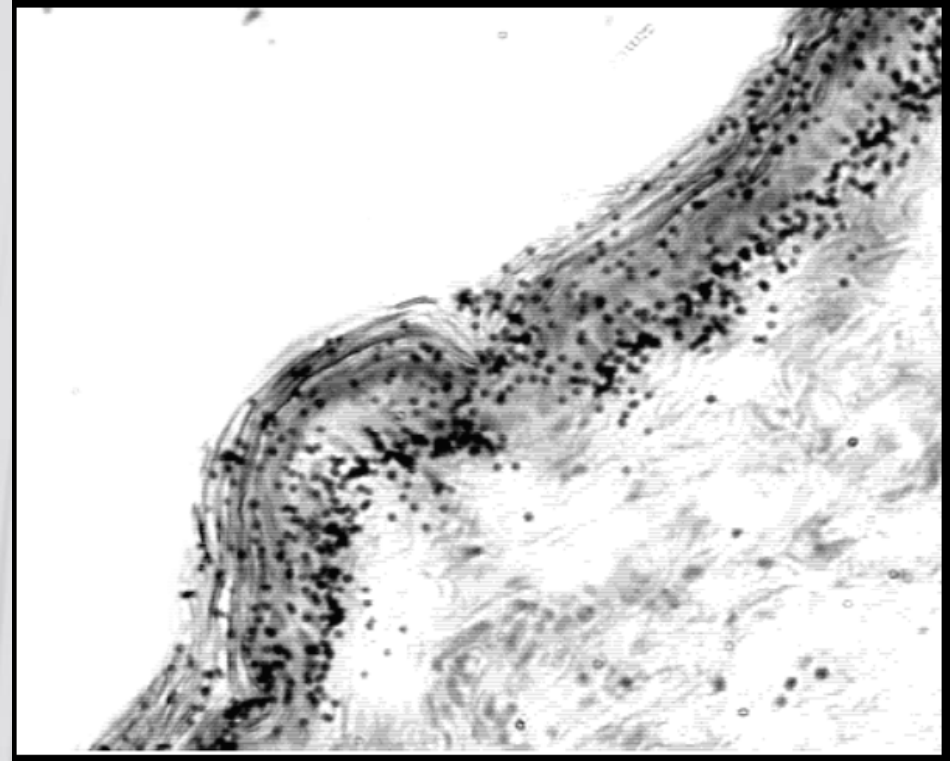
Biolistika
mikroinjektori
Mišićna distrofija

Genski pištolj

Plazmidna DNA se taloži na čestice zlata ili volframa dijametra 1-3 μm

Ispaljivanje pod pritiskom helijuma ili pod visokim naponom.

Unos gole DNA



Čestice zlata obavijene oko DNA
nakon ispaljivanja u kožu

Biolistika-mikroinektori
Mišicna distrofija

Unos gole DNA

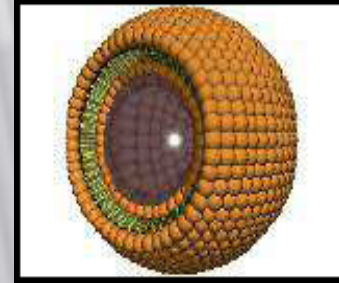
Liposomi – Cisticna fibroza

Nastaju spontanom agregacijom lipidnih molekula u vodenom okruženju.

Kationski liposomi vežu negativno naelektrisanu DNA.

Tako omotana DNA zaštićena je od razgradnje.

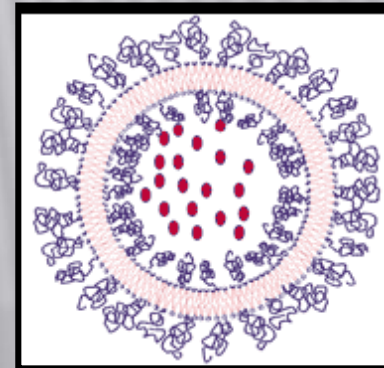
Lipofektin, lipofektamin – služe i za transfekciju ćelija u kulturi.



Nedostatak jednostavnih liposoma je jer se vrlo se brzo uklanjaju iz cirkulacije putem makrofaga iz jetre.

Međutim, dodatak površinskih liganada smanjuje degradaciju liposoma:

Modifikatori lipozoma su: Monosijalogangliozidi, Polioksietileni, Holesterol, Glukuronska kiselina



Modifikovani lipozomi imaju produženi polu-život zbog reducirane opsonizacije (ometanja) proteinima iz plazme.

Liposomi mogu poslužiti kao tumor-specifične vezikule čak i bez posebnog usmeravanja

PREDNOSTI

Jeftiniji od virusnih vektora.

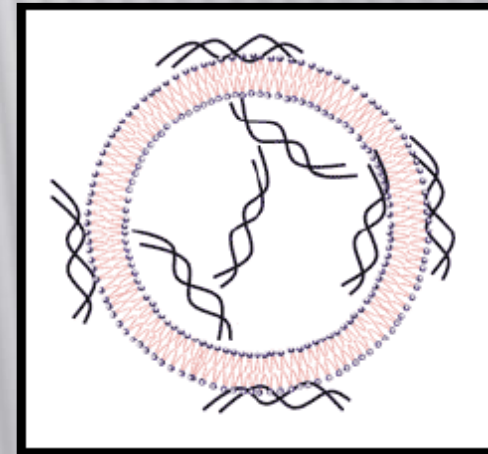
Ne izazivaju imuni odgovor.

Izuzetno prikladni za dopremu DNA u pluća putem aerosola (cistična fibroza).

NEDOSTACI

Potrebno 100-1000 puta više DNA da bi se postigao isti efekat kao kod virusnih vektora.

Nisu prikladni za tretman mnogih bolesti.



Unos gole DNA

Kohleati – višeslojni liposomi

Dugotrajno i jednostavno čuvanje

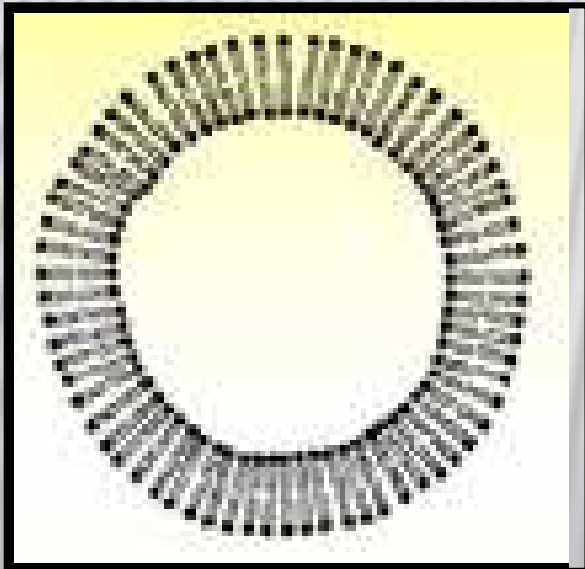
barem godinu dana kao liofilizirani prah na sobnoj temperaturi,

Trajne vezikule

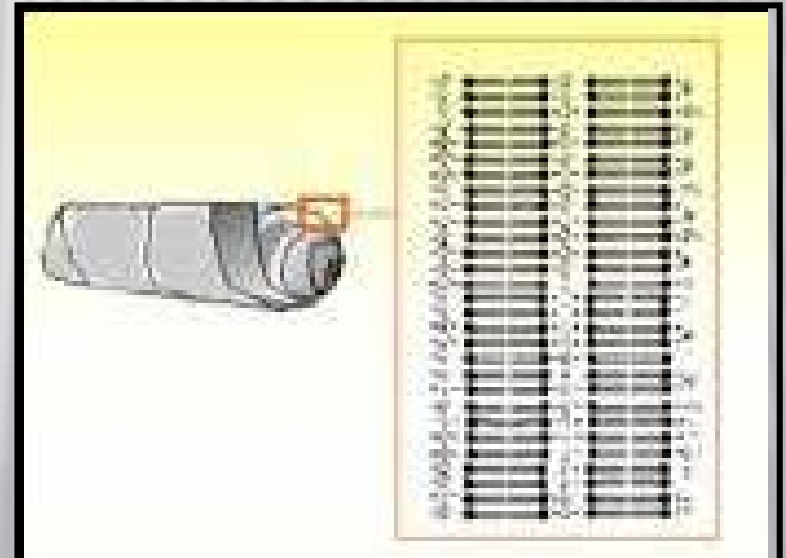
preživljavaju višestruke fuzije s membranom,

Preživljavanje u gastrointestinalnom traktu

prikladni za oralnu primjenu,



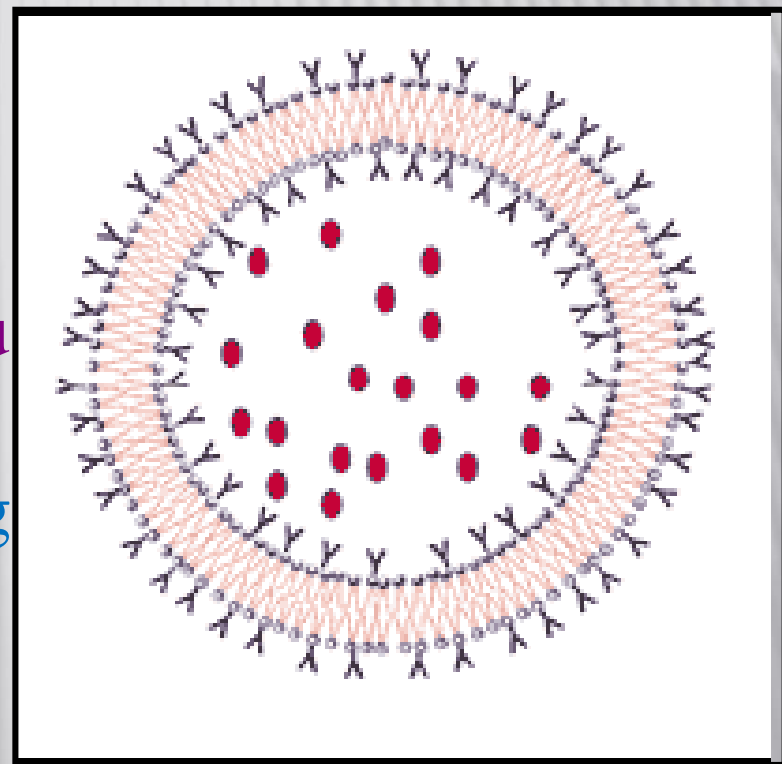
liposom



kohleat

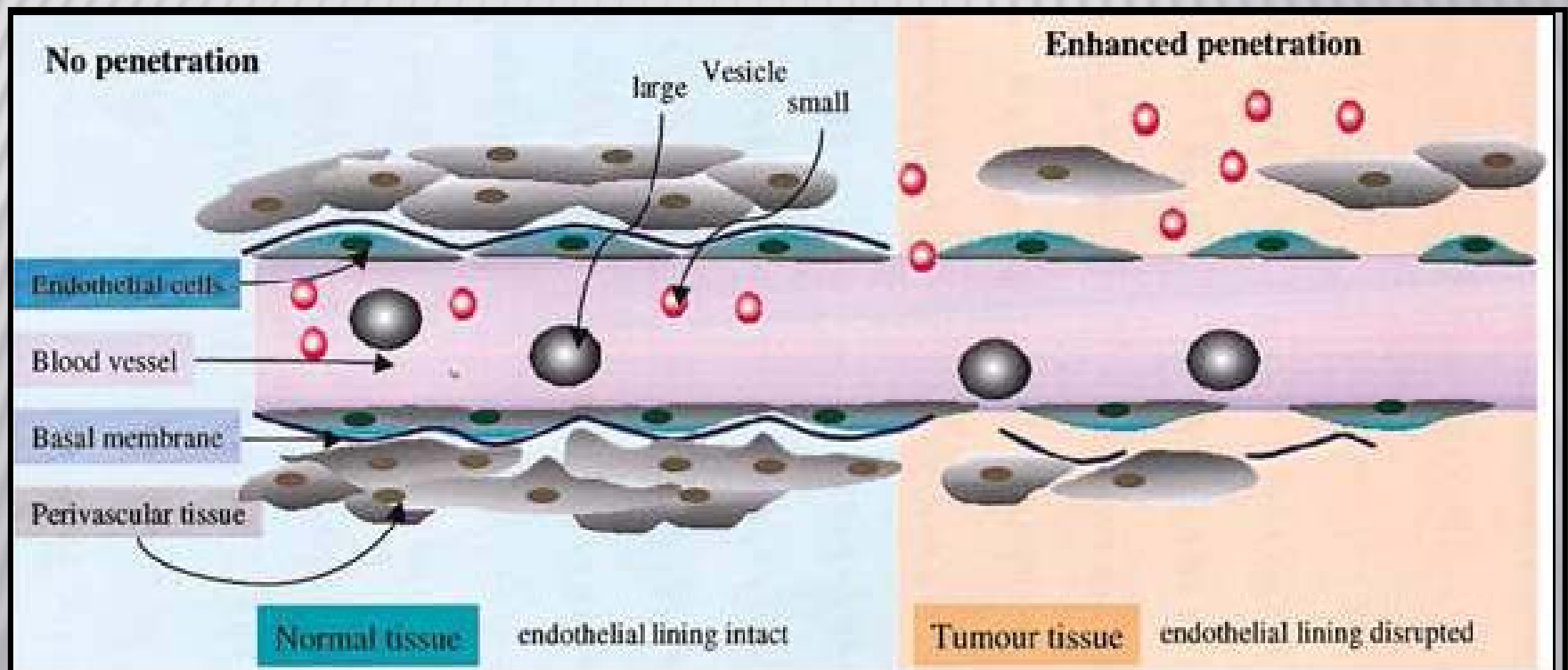
Imunoliposomi

- Za aktivno usmeravanje DNA
- Na površini nose specificna protivtela=antitela
- Antitela na unutarćelijskom miozinu usmeravaju imunoliposome na područje srčanog mišića zahvaćenog infarktom.
- Antitela na molekule specificne za tumore usmeravaju imunoliposome na ćelije tumora.



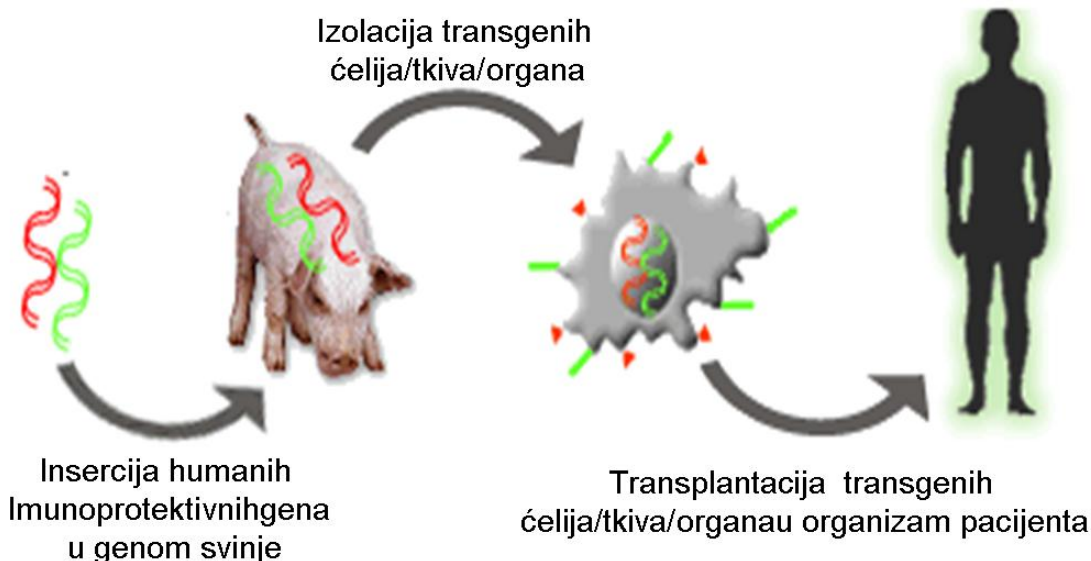
Liposomi mogu poslužiti kao tumor-specifične vezikule čak i bez posebnog usmeravanja

Liposomi lakše ulaze u krvne sudove sa oštećenim endotelom -tumorska tkiva



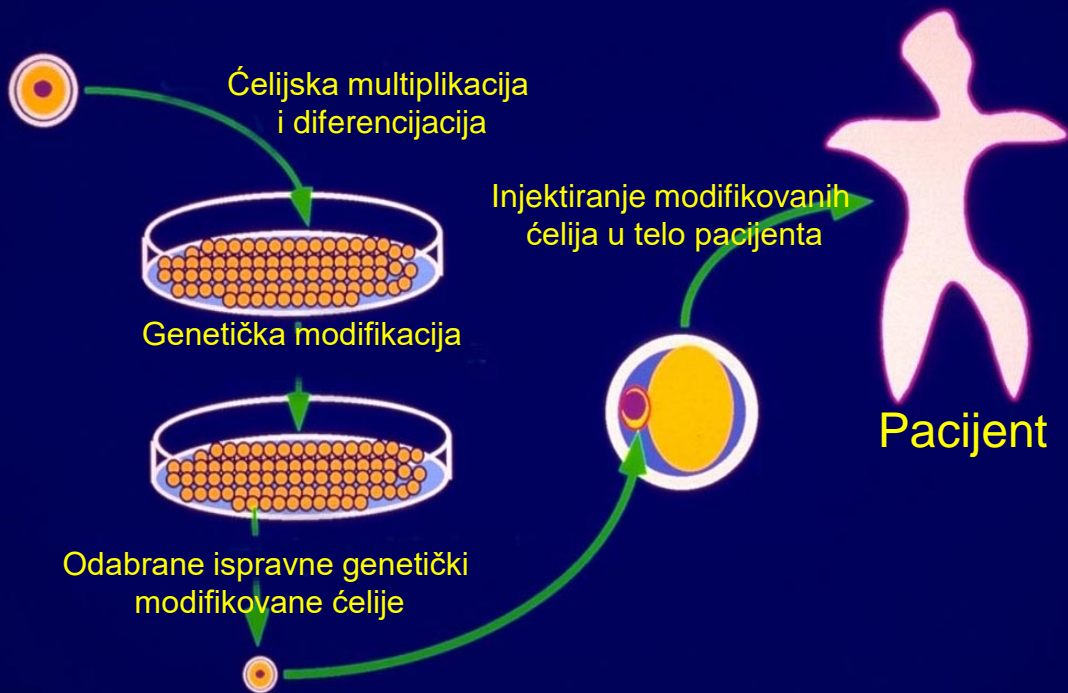
GENETIČKI INŽINJERING I TRANSGENEZA -

Transgeneza kodirajućih sekvenci može značiti uvođenje novih alela ili već postojećih gena u genom određene vrste. Tako su, u genomu ženki životinja, već prisutni geni koji kodiraju sintezu enzima, aktivnih u laktogenezi. Postupkom transgeneze, moguće je dobiti ženke koje će proizvoditi mleko sa niskim sadržajem laktoze. Ovakve životinje u svom genomu sadrže transgen, tj. gensku konstrukciju, čija kodirajuća sekvenca kontroliše sintezu enzima koji učestvuju u stvaranju mlečnog šećera, tj. Laktoze.



**Genetički
inženjering i
transgeneza**

Posebnu pažnju zaslužuju transgene životinje koje služe za proizvodnju humanih proteina u terapijske svrhe, kao što su npr. faktori koagulacije krvi ili alfa-1-antitripsin. Tako, mogu da se dobiju transgene ovce za genske sekvence koje kodiraju sintezu faktora koagulacije krvi kod čoveka. Obično se, u ovom postupku, kodirajuće sekvence humanog genoma za faktore koagulacije krvi insertuju u molekul DNK, neposredno iza promotorne sekvence gena koji kodiraju sintezu proteina mleka, kao što je npr. promotorna sekvencija gena za beta-laktoalbumin



**Genetički
inženjering i
transgeneza**

Tada se u organizmu transgenih ovaca, proizvode faktori koagulacije krvi čoveka, izlučuju se u mleku, a iz mleka se mogu jednostavno izolovati u čistom obliku. Razmatra se upotreba transgenih životinja za proizvodnju tkiva ili organa, namenjenih za transplantaciju kod čoveka. Tako mogu da se dobiju transgene svinje za gene koji kodiraju sintezu polipeptida, a koji se nalaze na površini ćelija tkiva i organa kod čoveka i da, na taj način, pri transplantaciji bude onemogućena reakcija odbacivanja transplantanata.

Genska terapija



Oduvek je čovekova želja bila da utiče na kvantitativne, tj. proizvodne karakteristike domaćih životinja. Međutim, rani eksperimenti u proizvodnji transgenih životinja sa bržim i većim prirastom, ostali su bez uspeha. Transgene svinje za gen koji kodira sintezu hormona rasta sa bržim i većim prirastom, bile su podložne nizu koštano-zglobnih oboljenja, koja su upravo bila posledica abnormalnog prirasta

Genetički inženjering i transgeneza

Transgeno prase sa izmenjenim genom za hormon rasta



GENETIČKI INŽINJERING I TRANSGENEZA—

Pankreas

Bakterijska ćelija
sa plazmidima

Insulin
produkujuća
ćelija

Plazmid
prstenasta DNK iz
genoma bakterije

Izolovana DNK iz
Insulin ćelija

Plazmid
sa prekidom

Insulin gen isečen iz DNK
ćelije pankreasa

Insulin gen slepljen
sa DNK iz plazmida

Ubačen hibridni plazmid
u ćeliju bakterije

Bakterija proizvodi
humani insulin

Danas je moguće sintetisati pojedine proteine koji se koriste u terapijske svrhe (insulin, somatostatin, interferon) ubacivanjem humanih gena u prokariotske sisteme. Humani insulin sintetisan u *Escherichia coli* pušten je na tržište 1982. god.

Genska terapija kod psa sa mukopolisaharidozom VII koja je u osnovi Taj Sach sindroma (deficit b-glukuronidaze)



**Genetički inženjering, transgeneza
i primena matičnih ćelija u
genskoj terapiji**



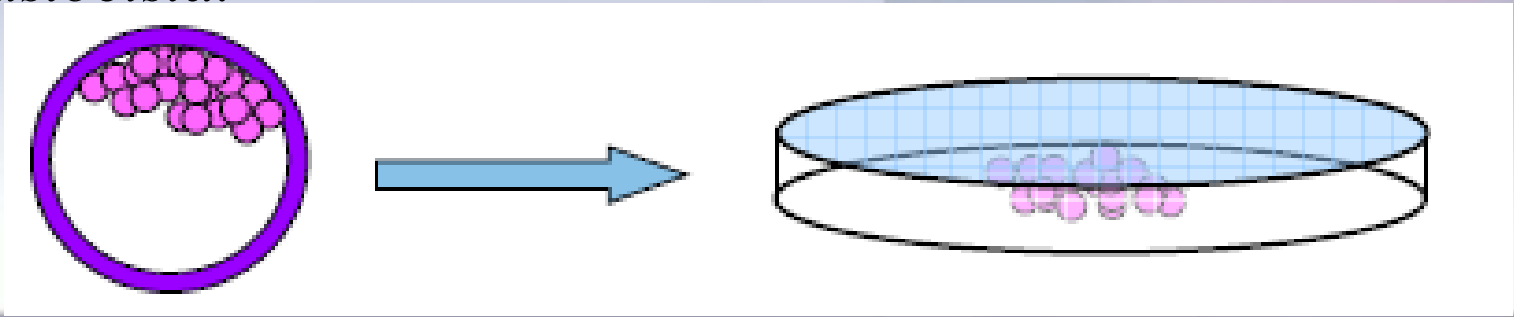
TERAPIJA MATIČNIM ĆELIJAMA

Embrionalne matične ćelije

- **TOTIPOTENTNE ĆELIJE** su sposobne stvoriti bilo koji drugi tip ćelije, to su embrionalne ćelije u fazi od 8 blastomera.

PLURIPOTENTNE ĆELIJE su sposobne stvoriti mnoge, ali ne sve tipove ćelija, to su embrionalne matične ćelije i odrasle matične ćelije.

- Pluripotentne embrionalne matične ćelije potiču iz unutrašnje ćelijske mase blastocista.



- Moguće je gajenje ovih ćelija u kulturi, manipulacija i ponovno vraćanje u blastocistu gde doprinose rastu svih delova embriona.



Odrasle matične ćelije

- **Multipotentne ćelije** su malobrojne nediferencirane ćelije među diferenciranim ćelijama ili tkivu, koje mogu da se diferenciraju u glavne specijalizovane tipove ćelija.

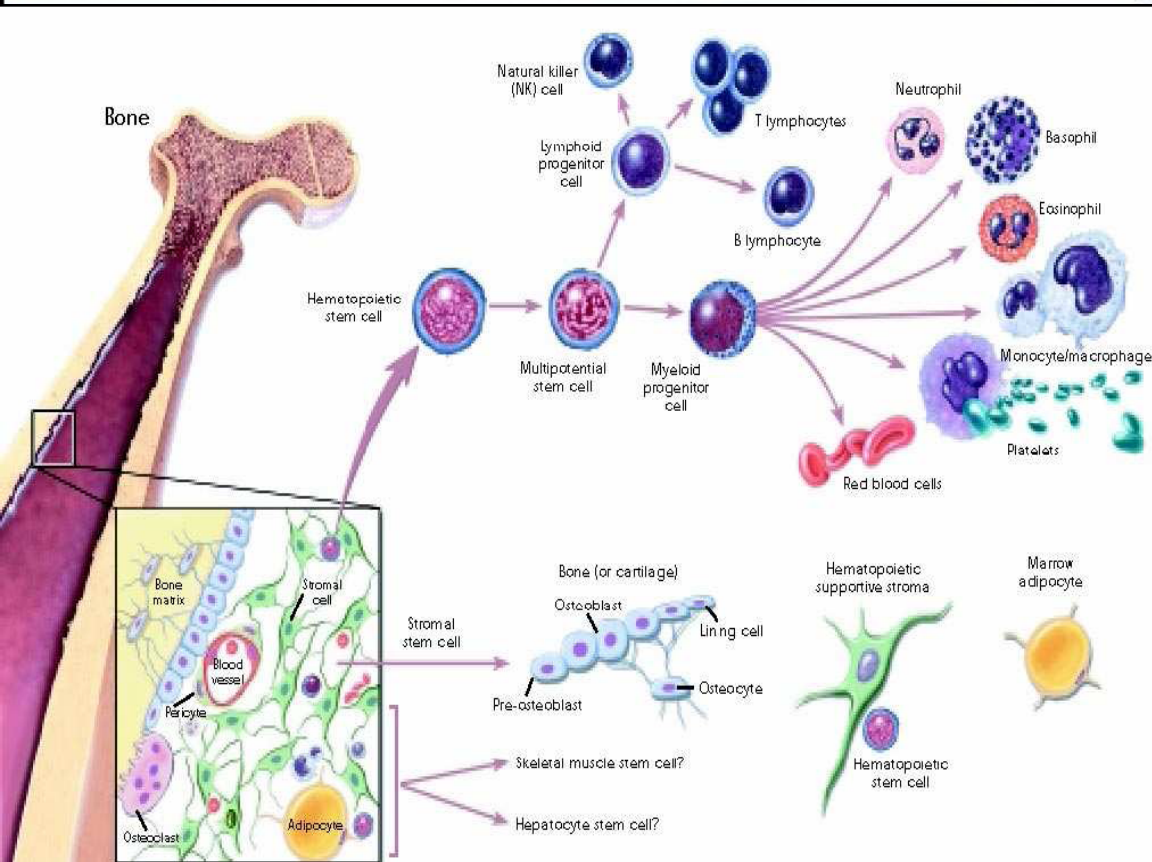
- Hematopoietske matične ćelije.
- Matične ćelije strome koštane srži.
- Moždane matične ćelije.
- Ćelije nađene u koži u perifernoj krvi, krvnim sudovima i jetri.

- **Umbilikalne matične ćelije**

(izolovane iz umbilikalne vene po rođenju)



Diferencijacija hematopoetskih i stromalnih matičnih ćelija

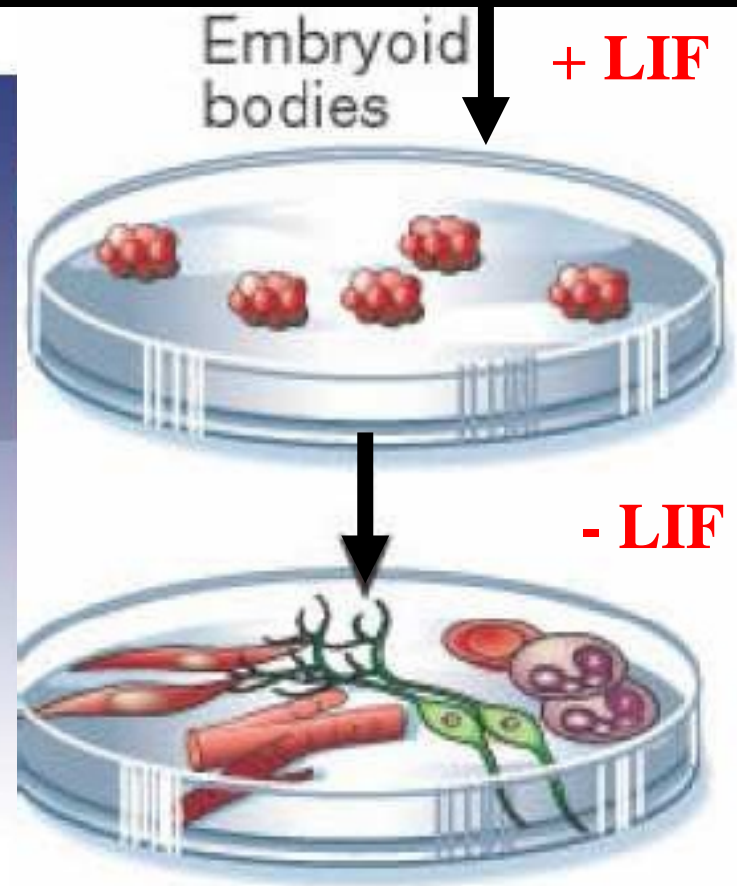


Održavanje EMS u kulturi

- U kulturi se EMS održavaju u nediferenciranom stanju na sloju ćelija hraniteljica (feeder layer) uz dodatak faktora inhibicije leukemije (*leukemia inhibitory factor, LIF*).

- Održavaju se lako u kulturi u dužem vremenskom periodu.
- Neograničena količina ćelija.
- Ne pokazuju znakove starenja ili degeneracije.

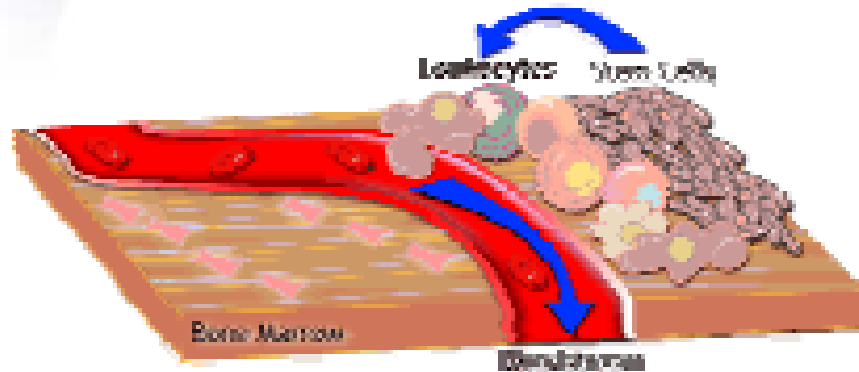
EMS spontano diferenciraju u različite ćelijske tipove u odsutnosti LIF.





Najčešći izvori odraslih MS

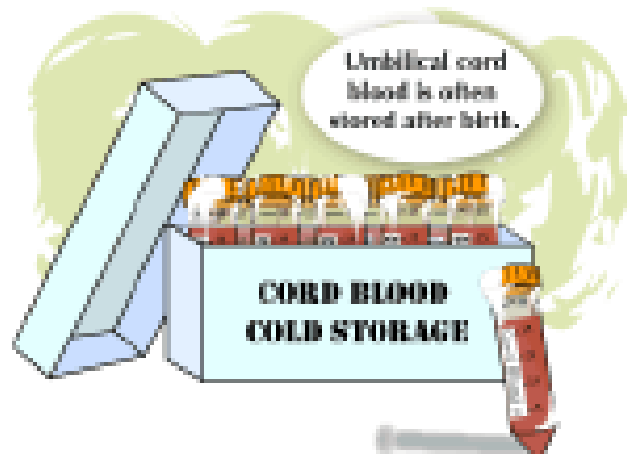
■ Koštana srž



■ Periferna krv



Krv iz umbilikalne vene



Embrionalne i odrasle matične ćelije

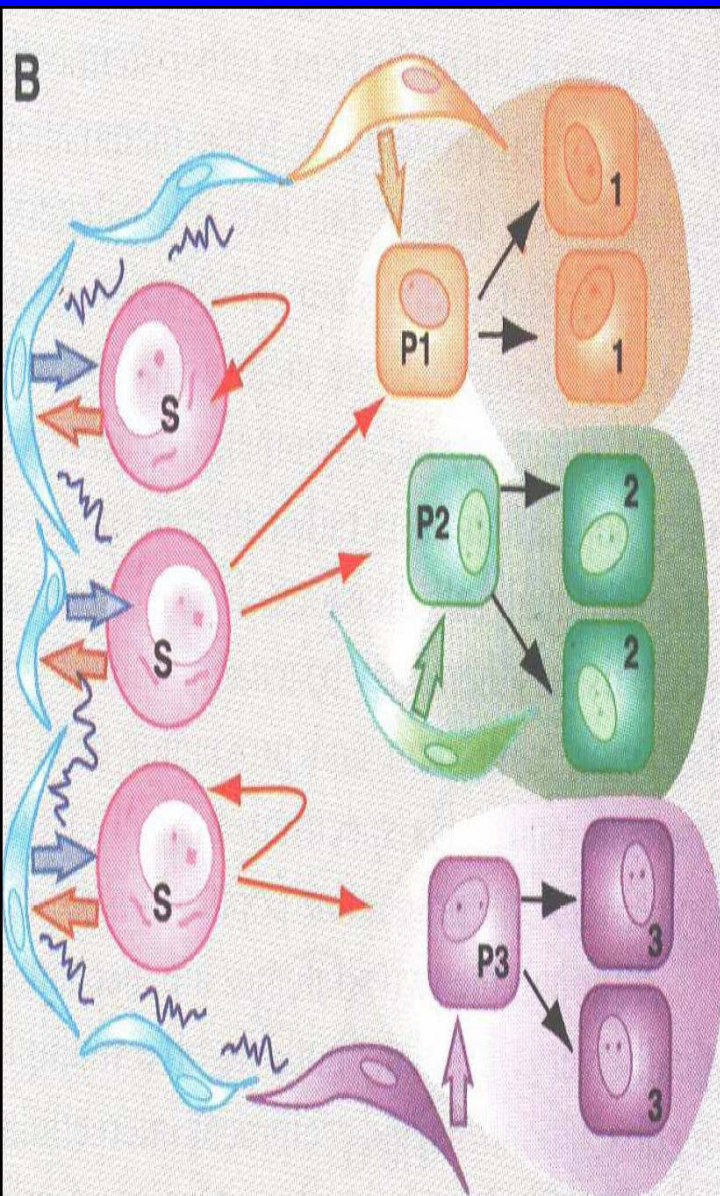
EMBRIONALNE MS

- *Visoki kapacitet za adaptivne promene.*
- *Potencijal za razvoj malignih bolesti.*
- *Neograničen životni vek.*
- *Neograničene zalihe.*
- *Etički i legalno problematični status.*

ODRASLE MS

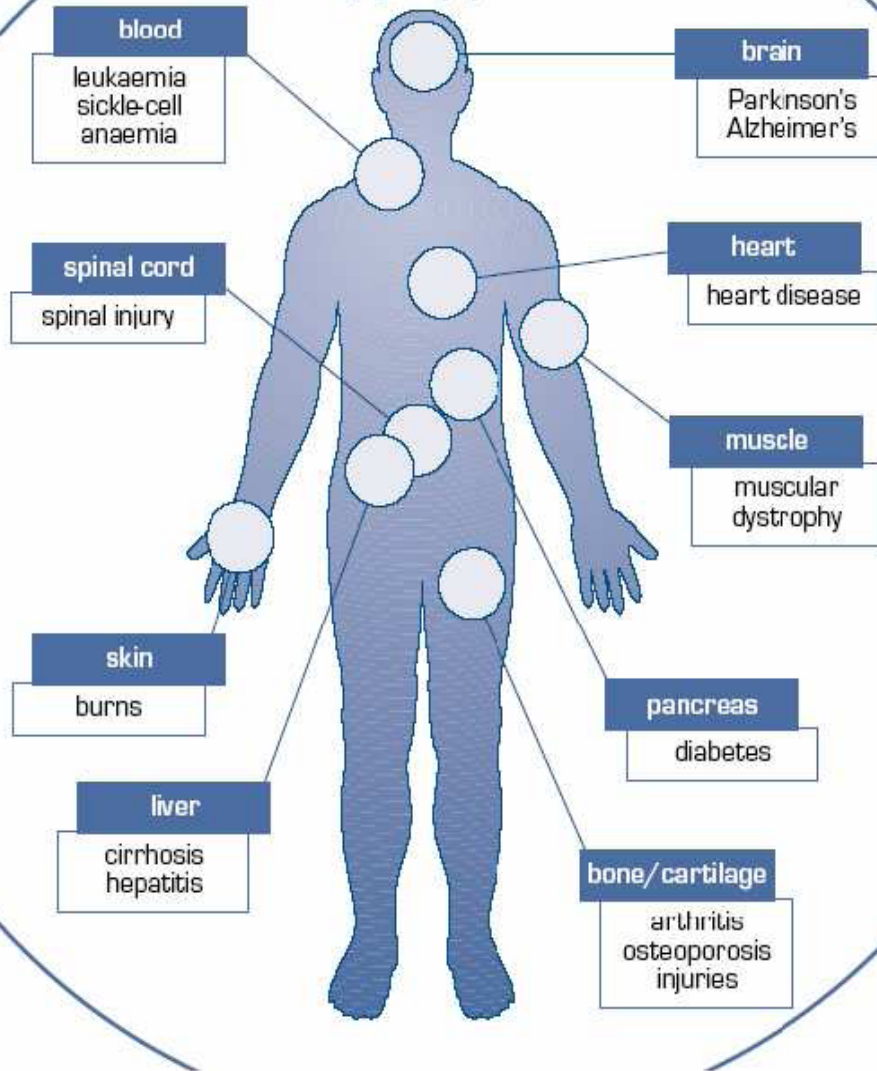
- *Ograničen razvojni potencijal*
- *Lakše za održavanje u kulturi.*
- *Gubitak sposobnosti proliferacije i diferencijacije nakon nekog vremena u kulturi.*
- *Etički status je manje problematičan.*

Ponašanje embrionalnih ćelija zavisi od sredinskog okruženja



- *Matične ćelije žive u specifičnom okružju koje im omogućava zadržavanje funkcije.*
- *Matična ćelija se nalazi unutar džepa kojeg čine potporne ćelije, omogućavajući pravilno orjentisanu ćelijsku deobu.*
- *Nakon deobe jedna ćelija prima specifične biohemijske signale kojima se zadržava u stanju matične ćelije, a druga ćelija ulazi u specifičnu diferencijaciju.*

Potential stem-cell therapy applications



Degenerative diseases of many tissues and organs might be treated by transplanting either stem cells or stem cell derived material

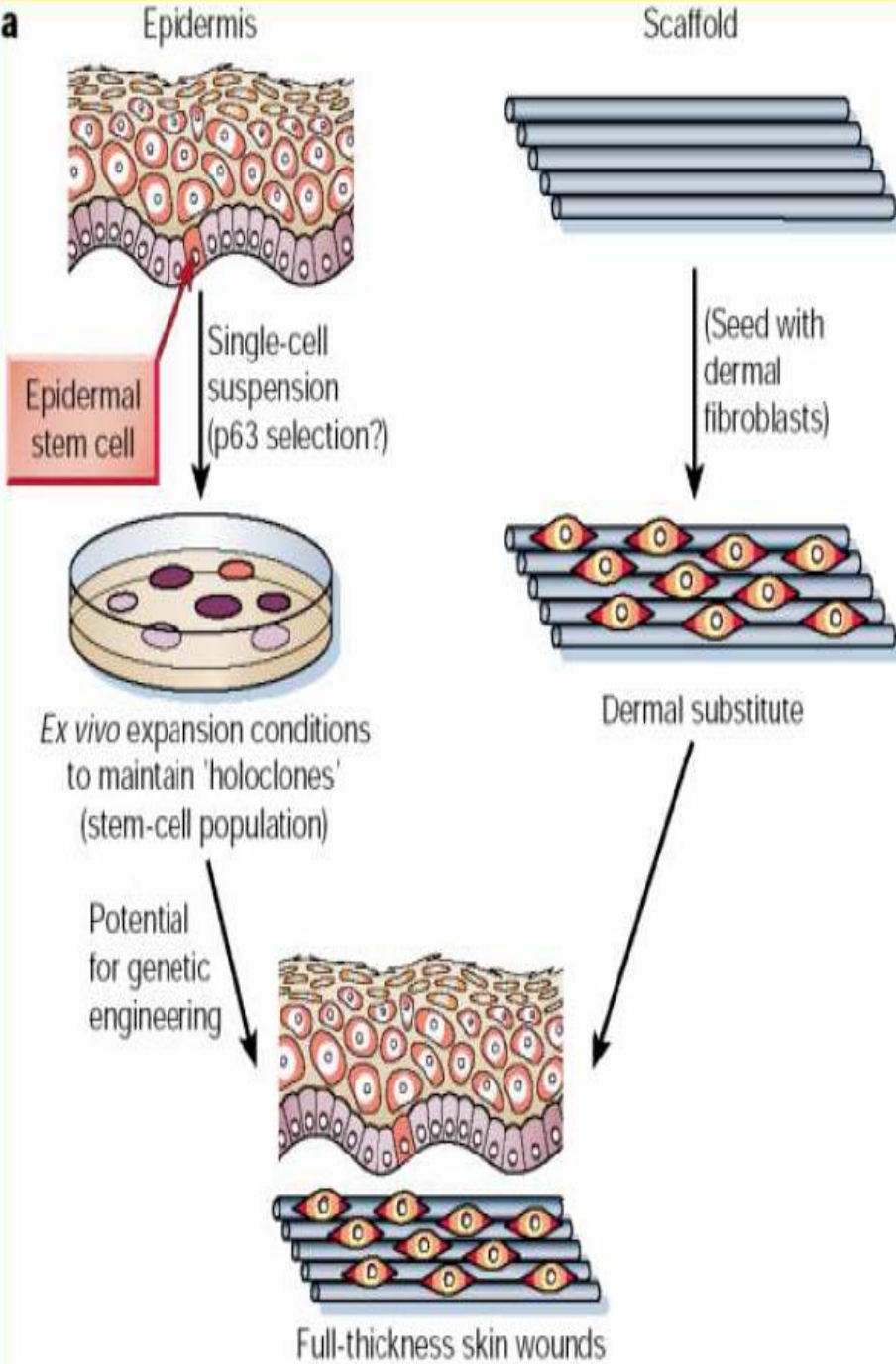


TERAPIJA MATIČNIM ĆELIJAMA

Klinička primena embrionalnih ćelija

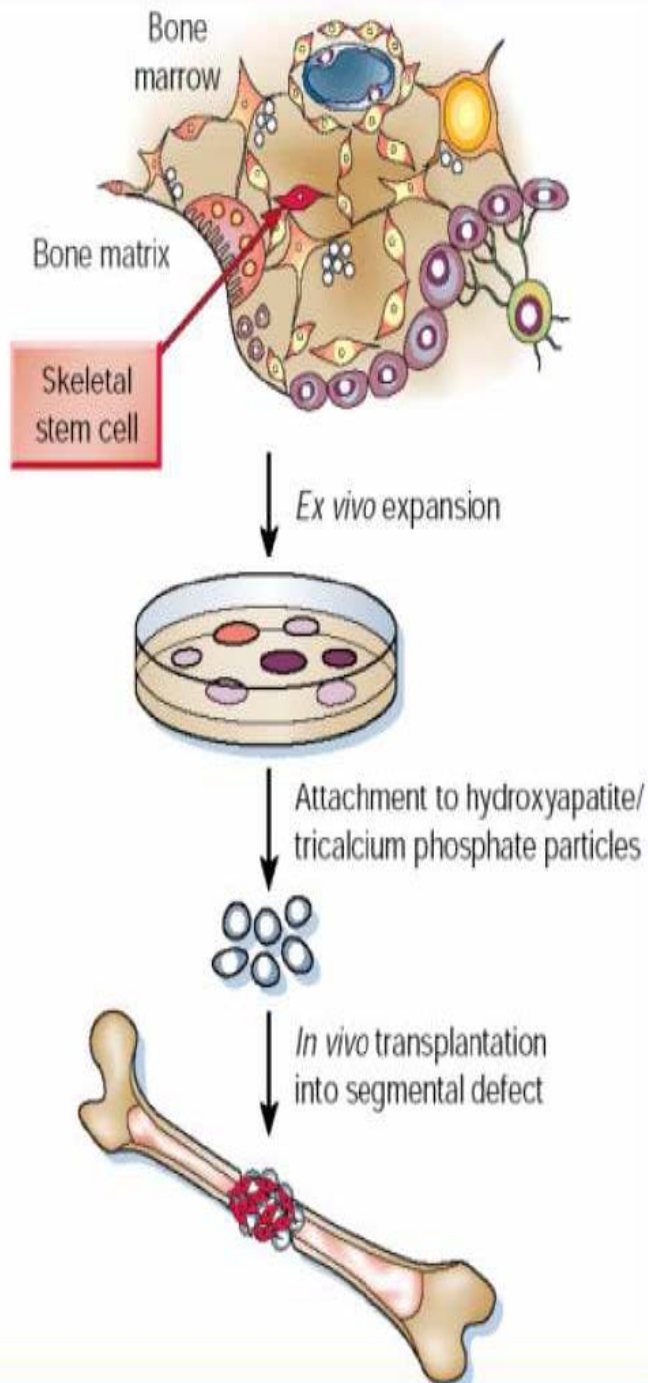
- *Hematopoeza kao model transplantacije matičnih ćelija:*
 - *Eliminacija endogenih tumorskih ćelija zračenjem, hemoterapijom i unos zdravih matičnih ćelija*
 - *Leukemija, limfom, rak dojke...*
- *Transplantacijska terapija akutnih i hroničnih degenerativnih bolesti; tkivno inženjerstvo.*
 - *Teške opekline, Parkinsonova bolest, multipla skleroza, oštećenja jetre, dijabetes (Langerhansova ostrvca koja ne proizvode insulin), plastična i rekonstruktivna hirurgija*
- *Genska terapija*

Tkivno inženjerstvo



- *Regeneracija 2D tkiva – koža*
- *Izolacija epidermalnih matičnih ćelija i propagacija u kulturi.*
- *Združivanje sa tkivom kože za zamenu (rešetka s fibroblastima)*
- *Bianco & Robey, Nature 414: 118-121, 2001*

b



Tkivno inženjerstvo

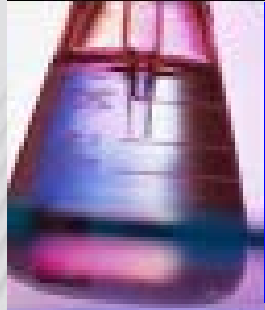
Regenracija 3D tkiva – kost

Izolacija skeletnih matičnih ćelija i propagacija u kulturi

Združivanje s 3D rešetkom, česticama hidroksiapatita/trikalcijum fosfata

Unošenje na mesto povrede

*Bianco & Robey, Nature
414: 118-121, 2001*



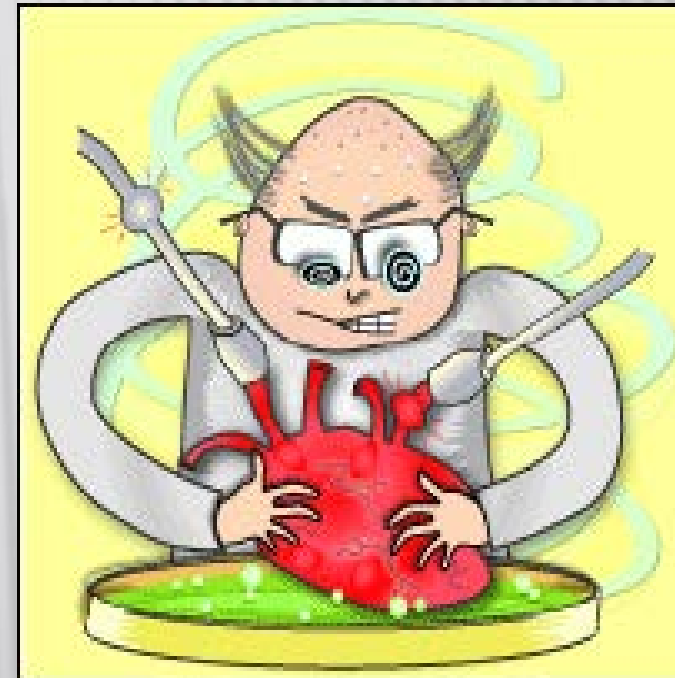
Transplatacija matičnih ćelija u kombinaciji sa GT

Ekstrakcija matičnih ćelija koštane srži



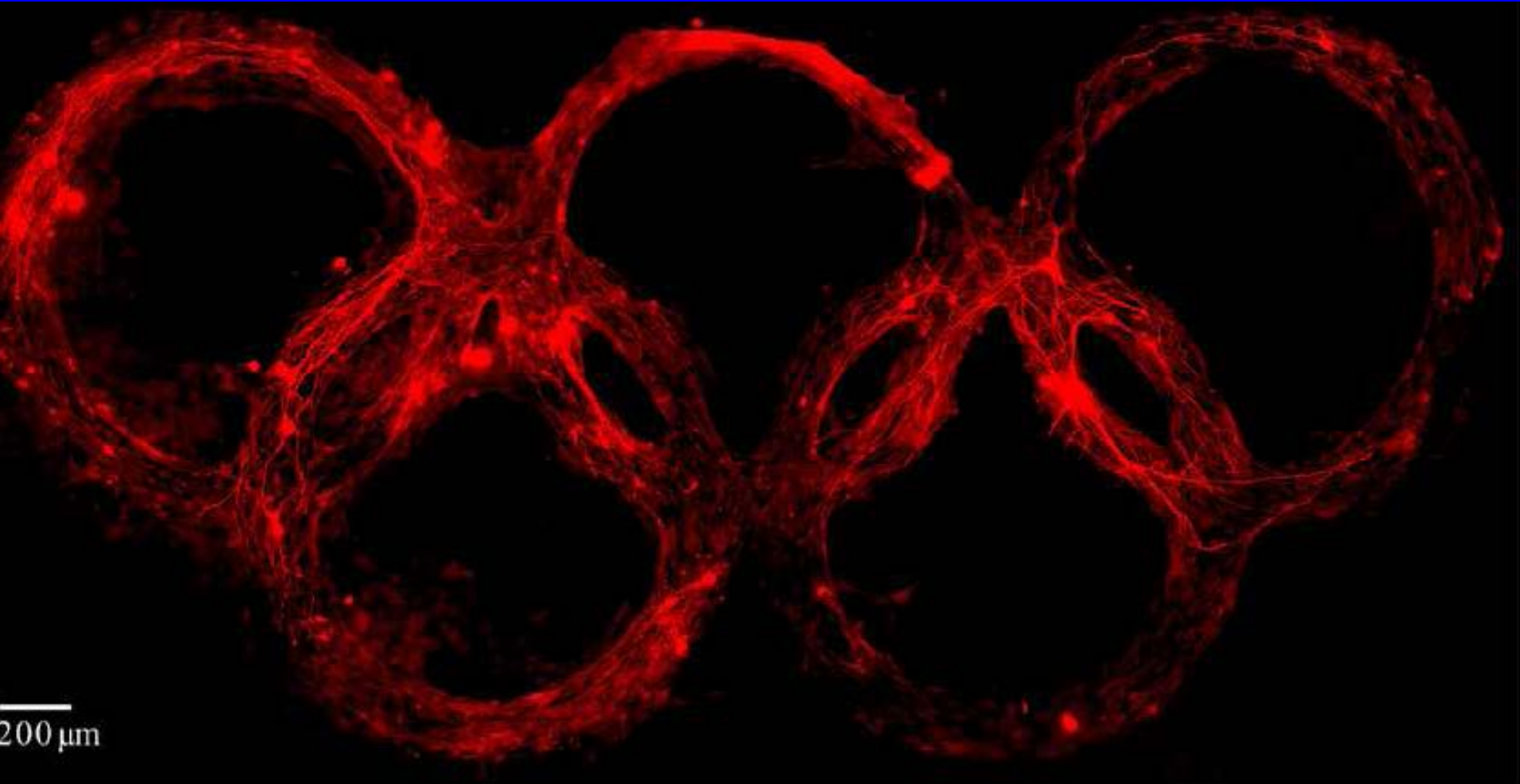
Koliko smo daleko od uzgoja organa in vitro ?

- *Organi su građeni od više vrsta tkiva – potrebno više vrsta matičnih ćelija; ćelije različitog tipa?*
- *Uzgojiti matične ćelije u kulturi, podstaći ih na ispravnu diferencijaciju-nesavršenost biotehničkih metoda*
- *Simulacija fizičkog okružja*
- *Izrada 3D rešetke za oblikovanje organa*
- *In vitro angiogeneza*



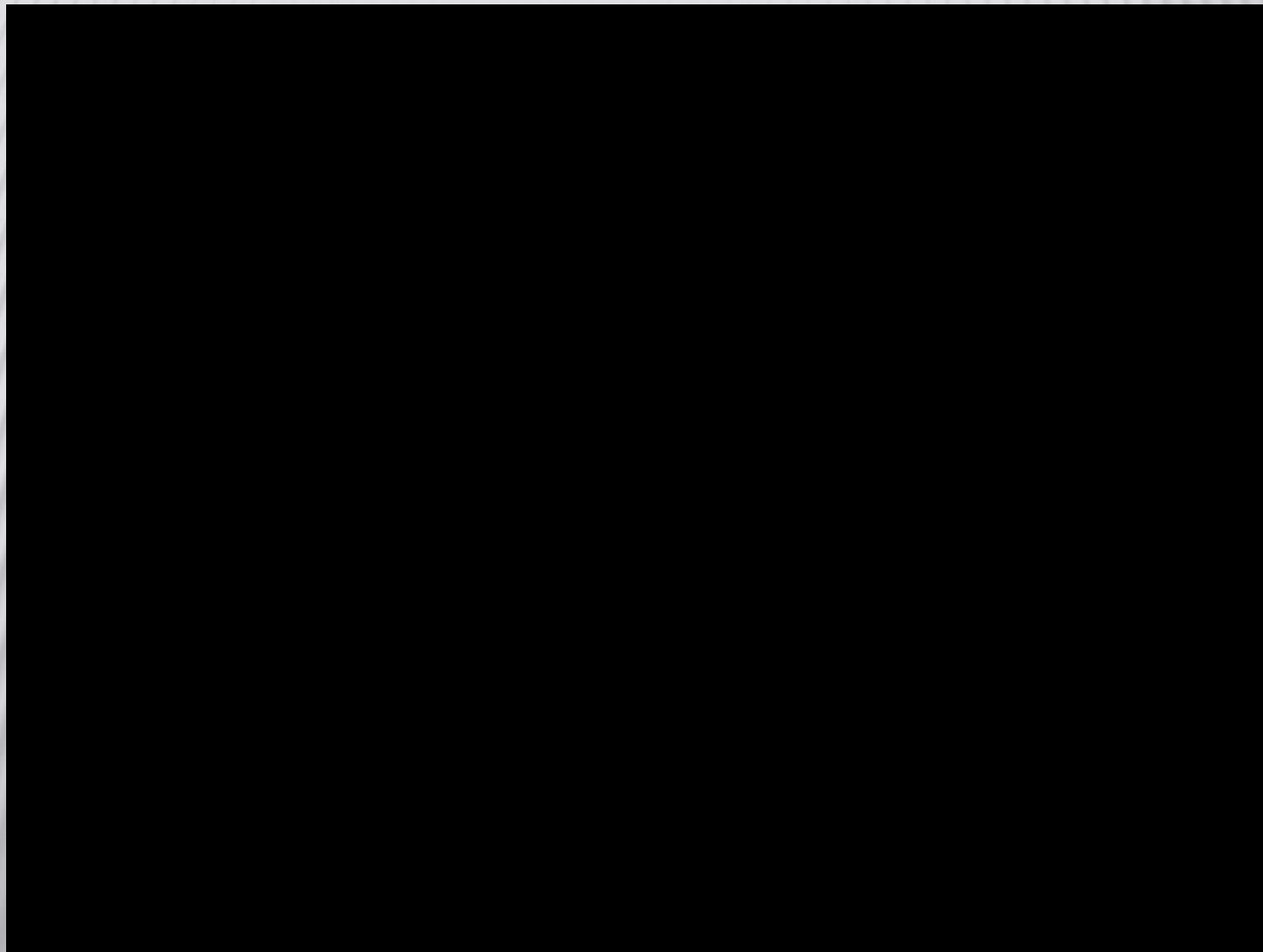
Još uvek je mnogo nepoznanica

*Današnja nivo tehnologije:
olimpijski prsteni načinjeni od živih
ćelija u kulturi*



plastična rešetka+fibronektin+fibroblasti+neuroni+fl. antitela

Tkivno inženjerstvo - 3D produkcija cevastih organa



Tkivno inženjerstvo

3D bioprodukcija ušne školjke čoveka

2266-USA-BIOPRINTING-TRACKED

**LOCATION: WINSTON-SALEM, NORTH
CAROLINA, UNITED STATES**

Duration: 0.57

Date Shot: RECENT

Narration by Matthew Stock

Restrictions: Broadcasters: None

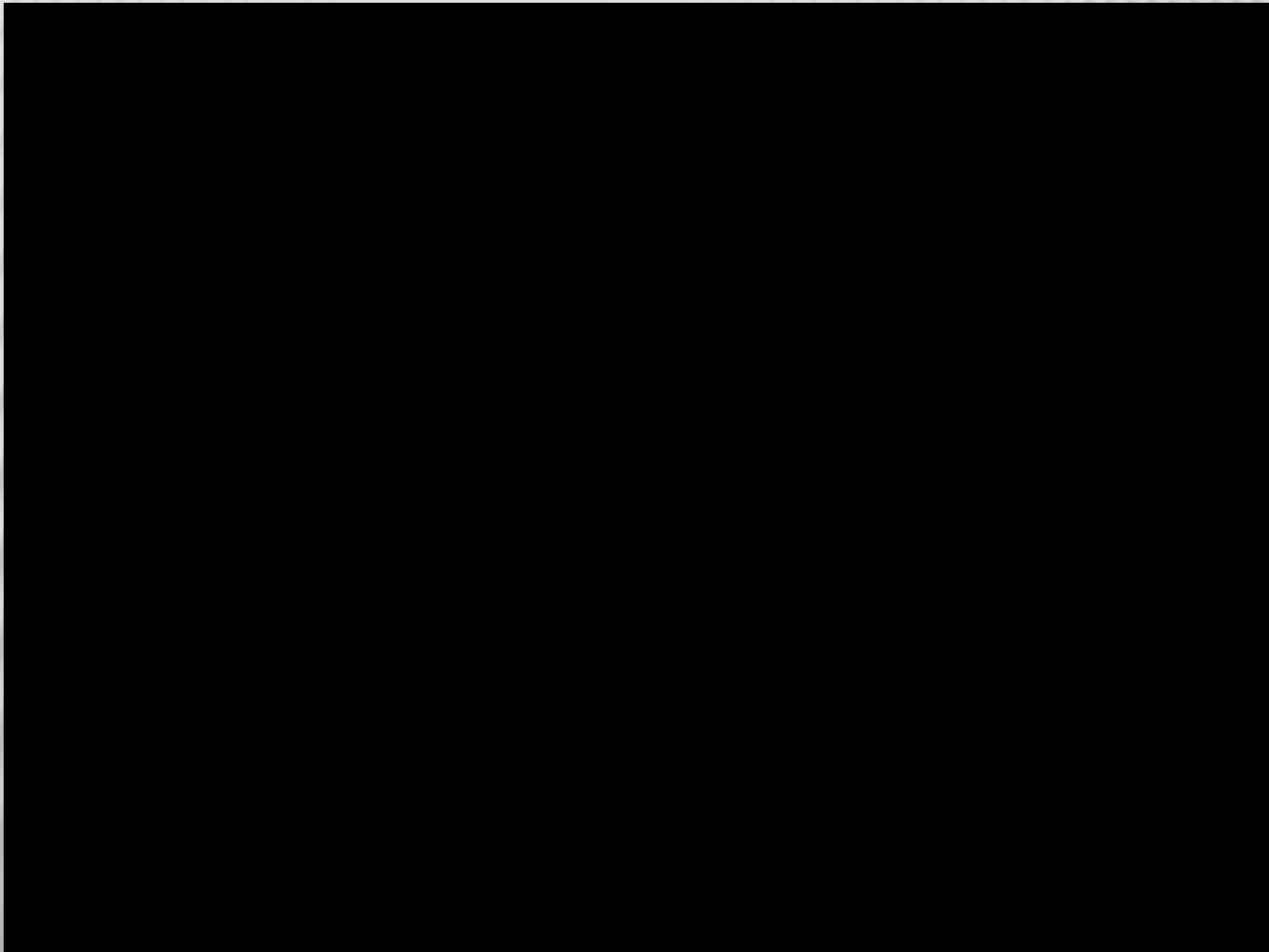
Digital: None



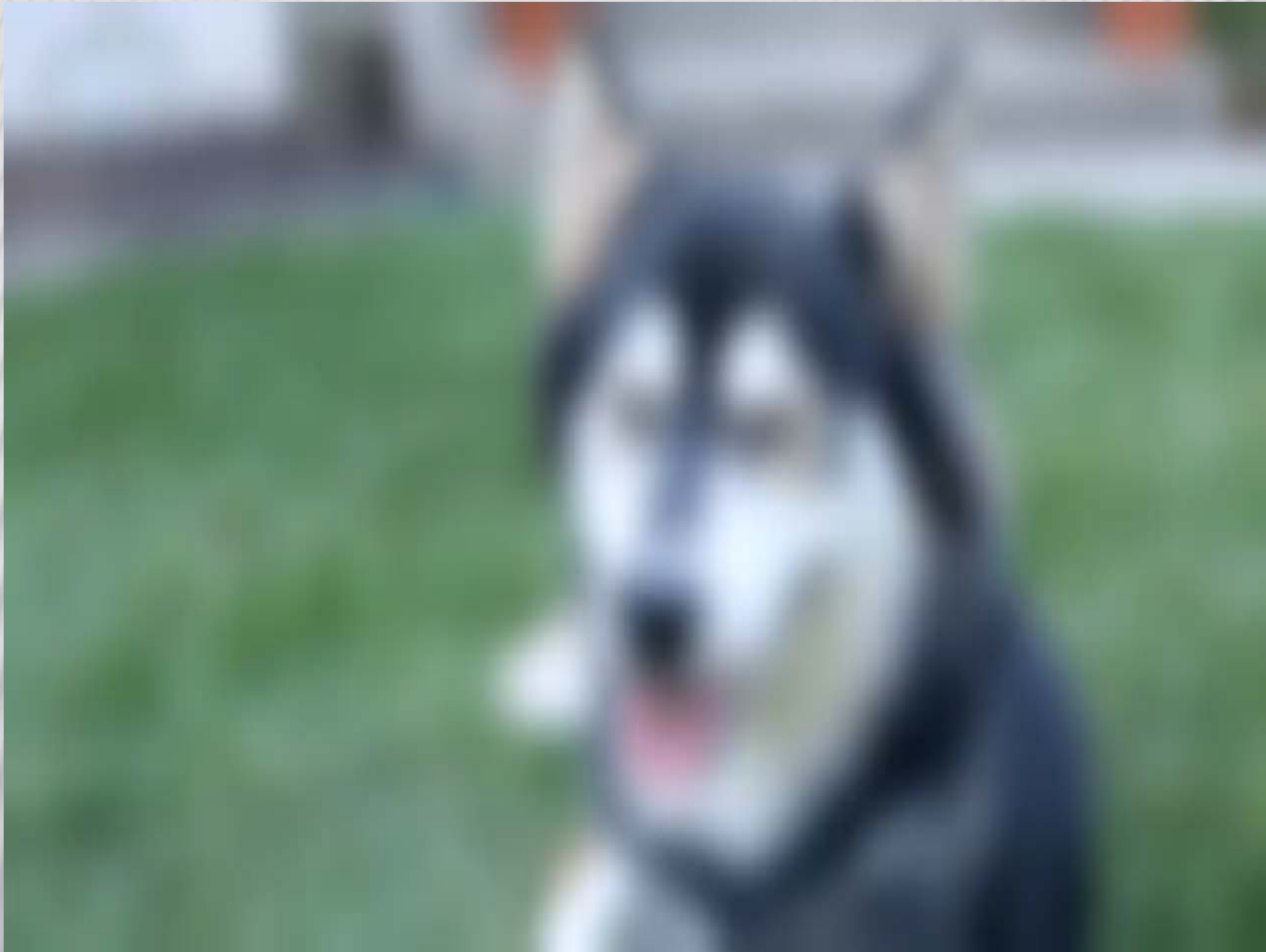
REUTERS

Tkivno inženjerstvo

3D nanoprodukcija ušne školjke čoveka



*Tkivno inženjerstvo -
3D nanoprodukcija proteza za prednje ekstremitete psa*



Kloniranje i genska terapija

Kloniranje je definisano kao stvaranje grupe genetski istovetnih organizama od jedne jedinke aseksualnim putem; to je izazivanje deoba somatskih ćelija kojima se dobijaju nove jedinke, istovetne kako sa organizmom iz kojeg su izvedene tako i medjusobno.

<i>Tipovi kloniranja</i>	<i>Tehnika kloniranja</i>	<i>Specifcnost</i>	<i>Rezultati</i>
<i>reproduktivno</i>	<i>Bilo koja od 3 poznate tehnike kloniranja</i>	<i>Klonirani embrion se <u>implantira</u> u matericu</i>	<i>Radja se klonirani embrion</i>
<i>terapeutsko</i>	<i>Bilo koja od 3 poznate tehnike kloniranja</i>	<i>Klonirani embrion se <u>ne</u> implantira u matericu</i>	<i>Generišu se stem celije, koje mogu dati "rezervna" tkiva i organe</i>

TRI NAČINA KLONIRANJA SISARA

1. Odvajanje ćelija od embriona

2. Roslin tehnika kojom je stvorena Doli

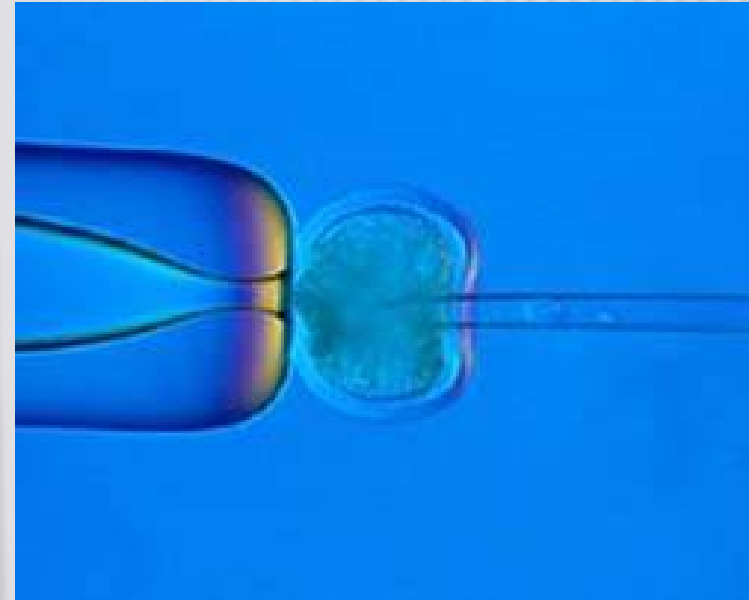
3. Honolulu tehnika

Odvajanje ćelija od embriona

Odvajanje ćelija od embriona se koristi za kloniranje već stvorenog embriona, a za kloniranje adulta se koriste druge dve tehnike.

Kloniranje adulta zahteva transfer nukleusa iz donorske ćelije adulta u OOCITU (jajnu ćeliju) kojoj je prethodno izvađen nukleus. U eksperimentima su se bolje pokazale neoplođene jajne ćelije jer bolje prihvataju nov nukleus. Nakon uklanjanja nukleusa iz jajne ćelije eliminiše se glavčina (većina) njenog genetičkog materijala. Ono što je veoma važno, jeste, da donorska ćelija mora biti u G0 (Gap Zero) fazi ćelijskog ciklusa što se postiže na različite načine.

Nukleus donorske ćelije se postavlja u jajnu ćeliju ili ćelijskom fuzijom ili transplatacijom.





Roslin tehnika :



To je tehnika kojom je stvorena ovca Doli. Za kloniranje Doli zaslužni su Jan Vilmut i Kejt Kembl iz Rozlin Instituta u Edinburgu.

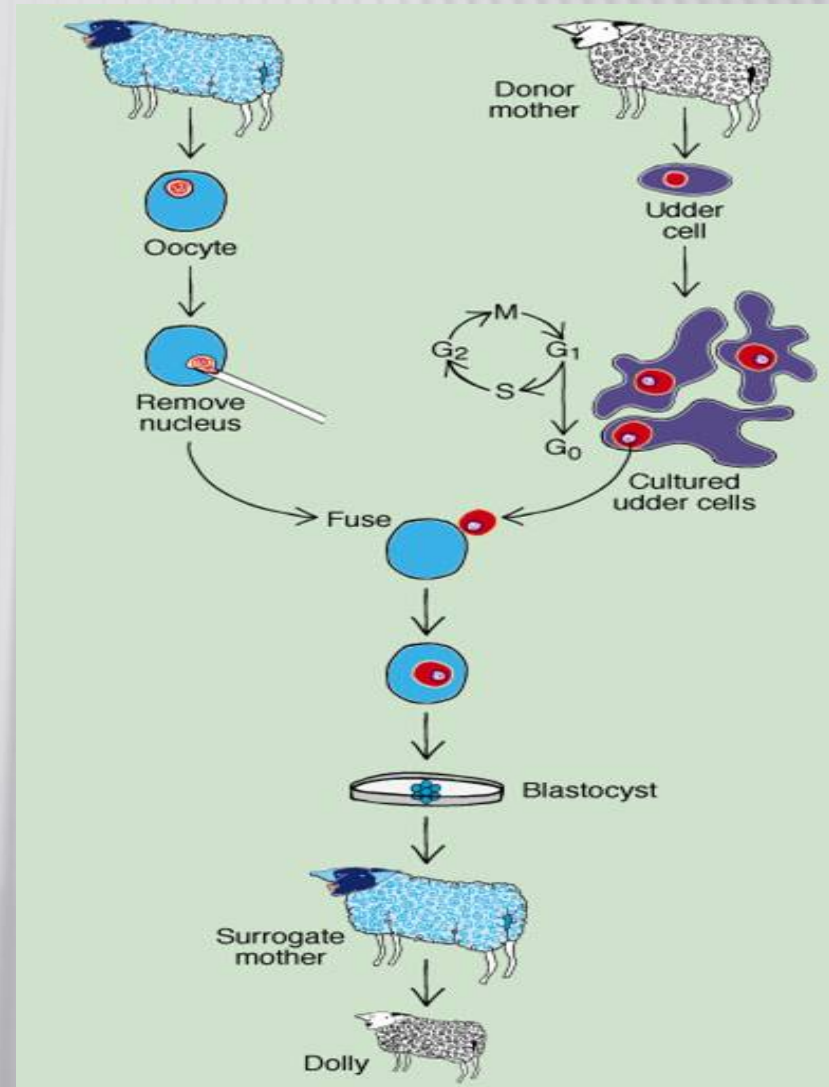
Crna ovca se tretira hormonima i izaziva se oslobađanje ocite spremne za oplođenje koja nastavlja mejozu I.

Pod visokovoltnim mikroskopom, pomoću mikropipeta iz oocite se vadi prvo polarno telo i haploidni pronukleus.

Donorska ćelija je uzeta iz vimena ovce Fin Dorset koja je bela.

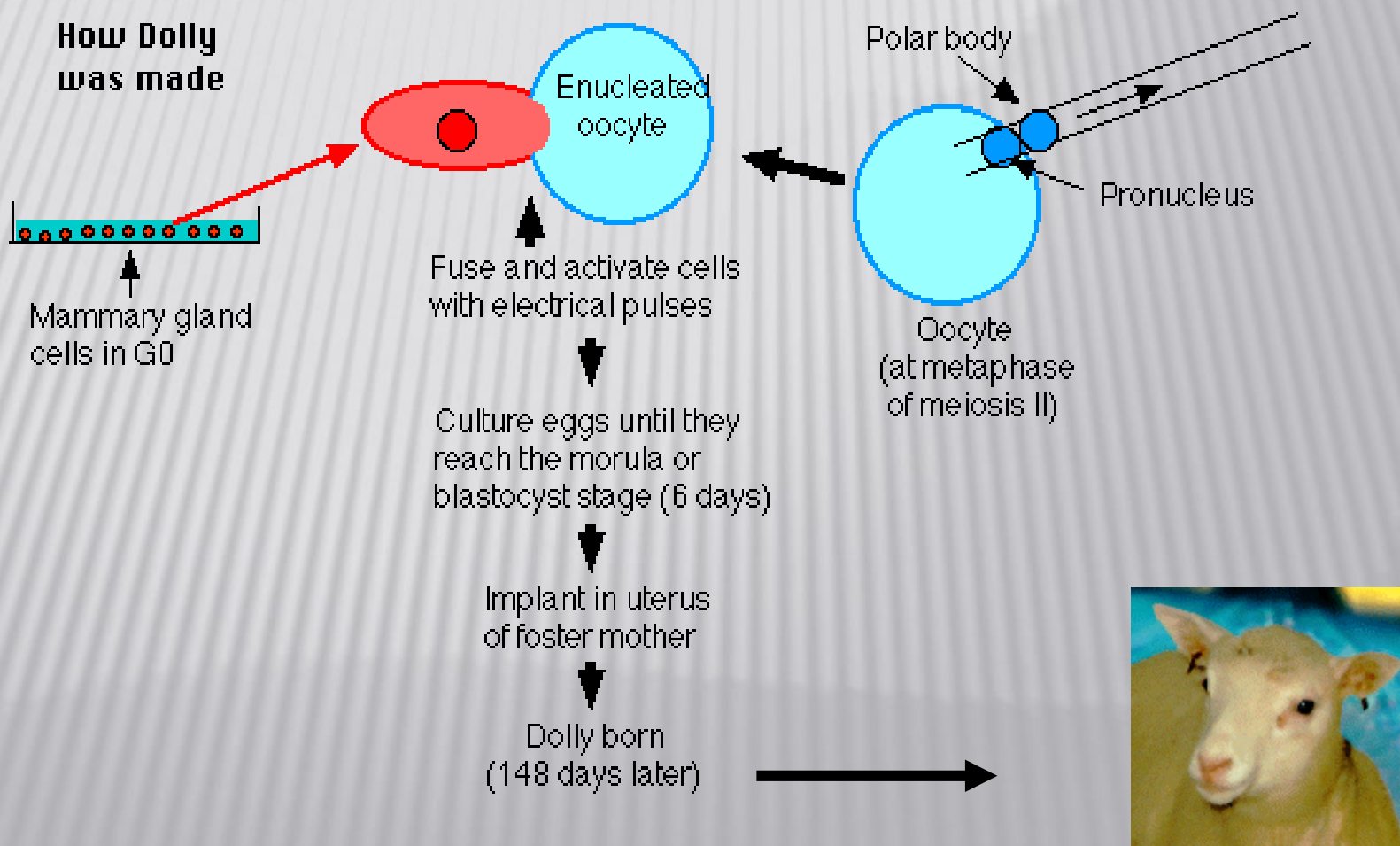
Ćelije mlečne žlezde se gaje u kulturi pošto su to primitivne stem ćelije i mogu da se dele.

Najvažnije dostignuće eksperimenta je postići da sve ćelije uđu u G₀ fazu ćelijskog ciklusa, tako što se smanjuje koncentracija nutritijenata, tj. ćelije imaju samo onoliko hrane koliko im je potrebno da prežive, ali se ne dele.



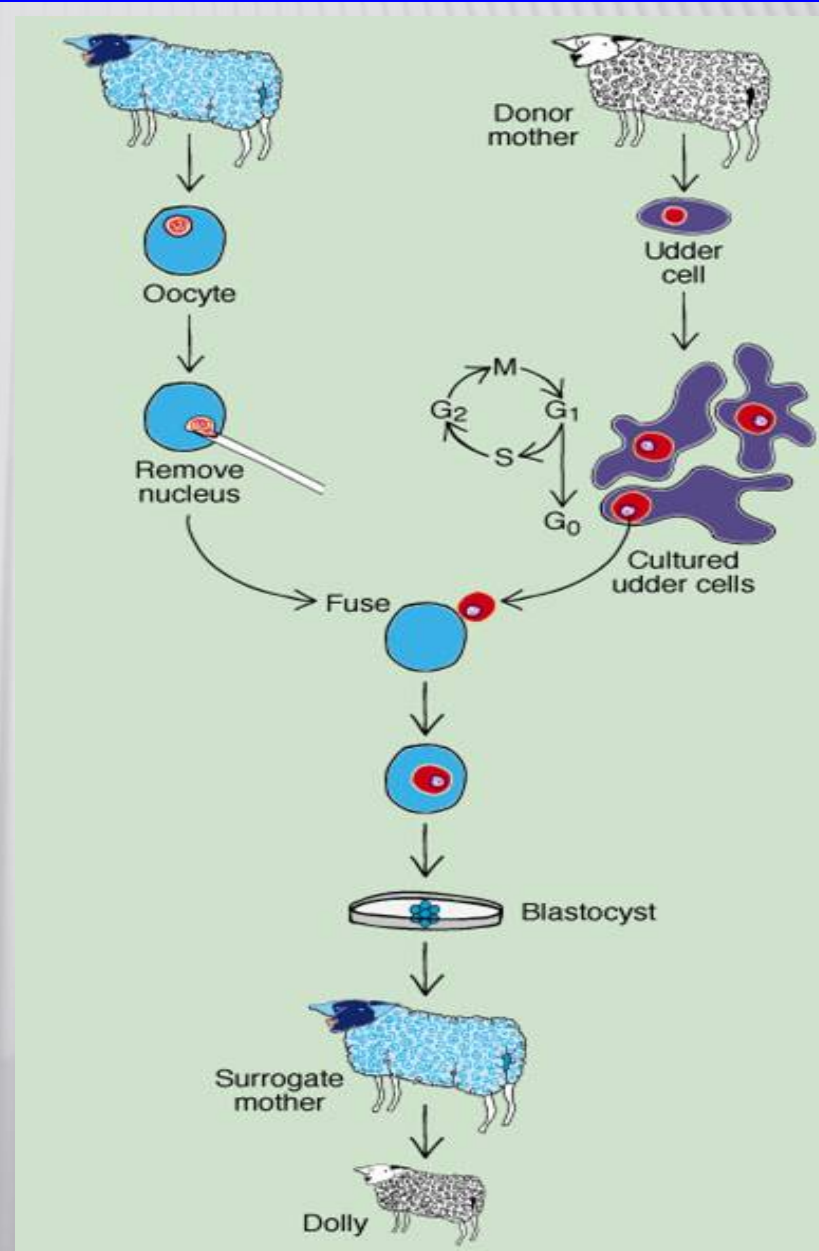
ZAŠTO JE VAŽNO DA DONORSKA ČELIJA BUDE U G0 FAZI ?

Zbog toga što je tada sprečena replikacija DNK, većina gena je inaktivirana metilacijom i samo ovakvo stanje nukleusa omogućava njegovo reprogramiranje demetilacijom nakon implantacije u jajnu ćeliju.



Roslin tehnika :

Donorske ćelije i jajne ćelije bez nukleusa su stavljene zajedno u kulturu. Nakon toga se primenjuje kratak električni impuls visokog napona da bi se promenila permeabilnost membrane što izaziva fuziju ćelija (metod je razvio Zimmerman 1978. godine), a da bi se novonastala ćelija stimulisala da počne deobu (imitiranje stimulusa spermatozoida pri fertilizaciji). Zigot se inkubira 6 dana do stanja morule, ili blastule, ili u kulturi, ili bolje u jajovodu ovce. Zatim se obavlja implantacija embriona u hormonski pripremljenu surogat majku – crnu ovcu. Od 277 pokušaja 29 embriona je implantirano, a samo 1 se razvio – nakon 148 dana rodila se ovca Doli.



Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells

I. Wilmut, A. E. Schnieke*, J. McWhir, A. J. Kind* & K. H. S. Campbell

Roslin Institute (Edinburgh), Roslin, Midlothian EH25 9PS, UK
* ICR, Therapeutics, Roslin, Midlothian EH25 9PW, UK

NATURE VOL 365 | 27 FEBRUARY 1992

Ovca Dolly

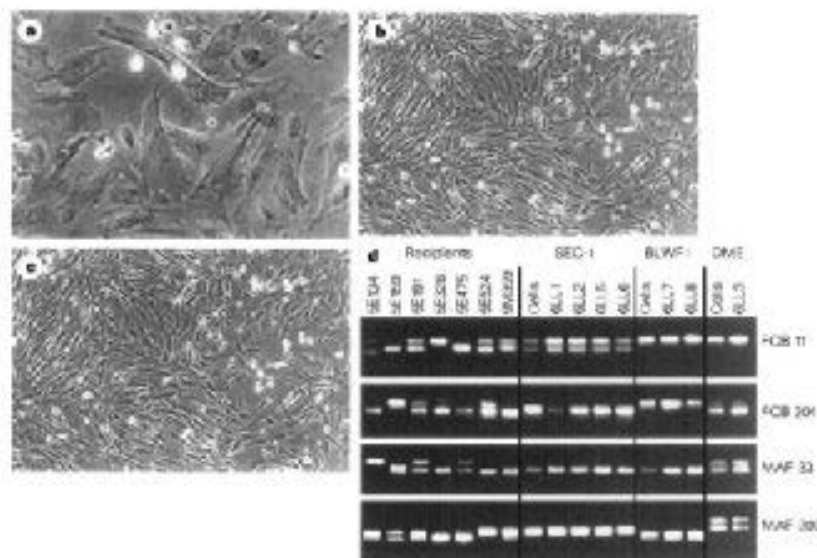


Figure 1 Phase-contrast photomicrograph of donor cell populations: (a) Embryo-derived cells (EDC); (b) fetal fibroblasts (FF); (c) mammary epithelial cells (ME). (d) Microsatellite analysis of recipient oviducal, nuclear donor cells and lambs using four polymorphic DNA markers*. The lanes are arranged from left to right:

into oviducal cells in the lambs. Cell populations are embryo-derived (SEC-1), fetal-derived (BLWF-1), and mammary-derived (DME), respectively. Lambs have the same genotype as the donor cells and differ from their recipient mothers.

Table 1 Development of embryos reconstructed with three different cell types

Cell type	No. of fused couples/ (No)	No. recovered from oviducal (%)	No. cultured	No. of micules/ anisogamyl (%)	No. of micules or blastocysts transferred	No. of pregnancies/ no. of recipients (%)	No. of live lambs (%)
Mammary epithelial	277 (53.0)*	247 (89.2)	-	25 (10.2)	22	1/13 (7.7)	1 (3.4%)
Fetal fibroblast	172 (64.7)*	124 (90.1)	24	54 (27.4)*	34	4/13 (40.0)	2 (15.9%)
Embryonic	385 (52.6)*	231 (60.0)	32	90 (39.0)*	72	34/27 (91.3)	4 (15.0%)
						1/5 (20.0)	0

Table 2 Delivery of lambs developing from embryos derived by nuclear transfer from three different donor cell types, showing gestation length and birth weight

Cell type	Breed of lamb	Lamb identity	Duration of pregnancy (days)	Birth weight (kg)
Mammary epithelial	Finn Dorset	5.1.3	148	6.6
		5.1.7	152	6.6
		5.1.8	148	2.6
Fetal fibroblast	Black Welsh	5.1.19†	156	3.1
	Black Welsh	5.1.24†	152	6.2
Embryo derived	Finn Dorset	5.1.1	148	6.5
		5.1.5	146	4.2
		5.1.10‡	152	6.3

* Breed averages are 143, 147 and 145 days, respectively for the three genotypes: Finn Dorset, Black Welsh Mountain and Friesian.

† This lambs died within a few minutes of birth.

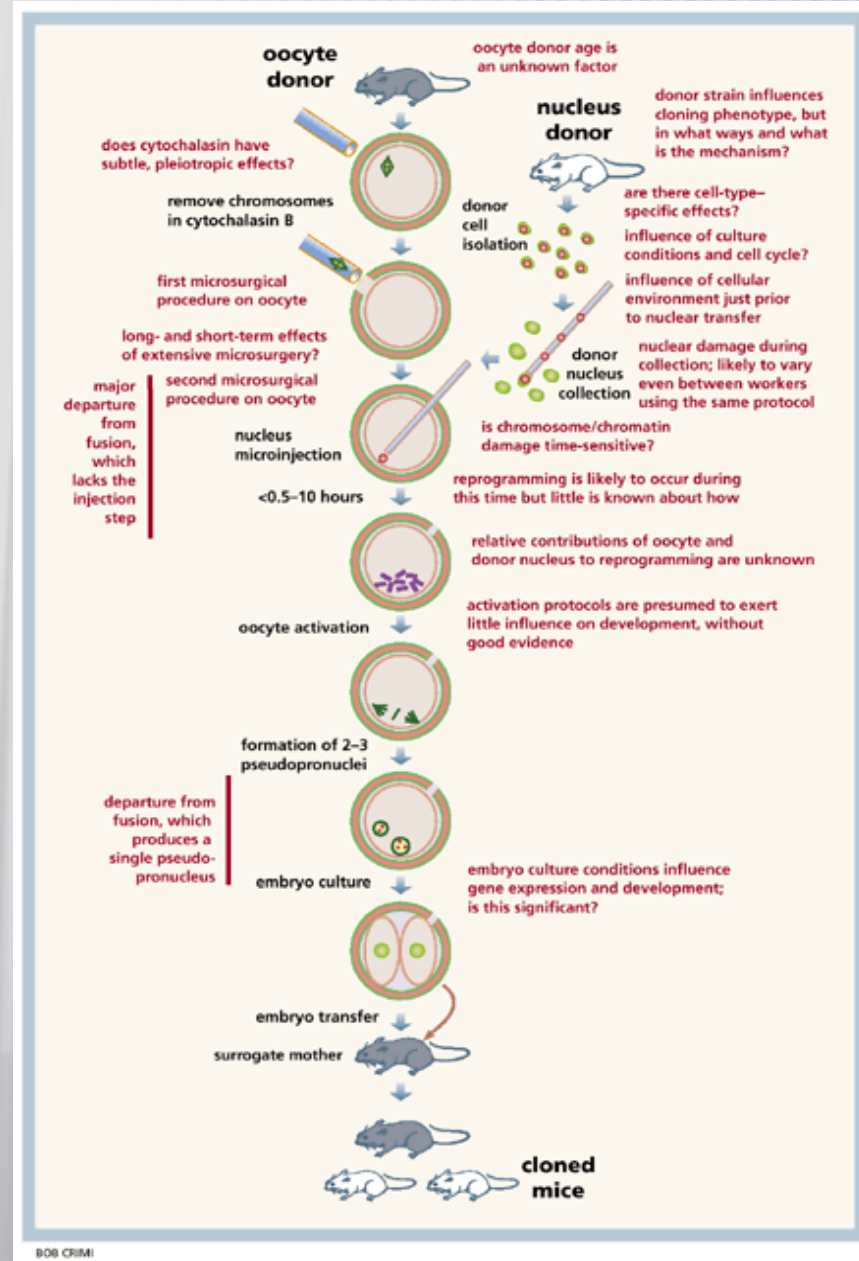
‡ These lambs were delivered by caesarian section. Overall the nature of the assistance provided by the veterinary surgeon was similar to that expected in a commercial flock.

Figure 2 Lamb number 611, derived from the mammary gland of a Finn Dorset ewe with the Scottish Blackface sire, which was the recipient.



Honolulu tehnika

Ovu tehniku su razvili Terihiko Wakayama i Rynzo Yamaginalbi iz Havajskog Univerziteta koji su uspeli da stvore tri generacije (genetički istih) kloniranih miševa. Miševi su dugo smatrani za životinje koje se najteže kloniraju jer kod njih oplođena jajna ćelija počinje da se deli odmah nakon fertilizacije i nema dovoljno vremena da se izvrši reprogramiranje nukleusa. Ali bez obzira na to, ovi naučnici su uspeli da kloniraju miševe sa mnogo većom efikasnošću nego što je kloniranje ovaca: 3 klona na svakih 100 pokušaja.

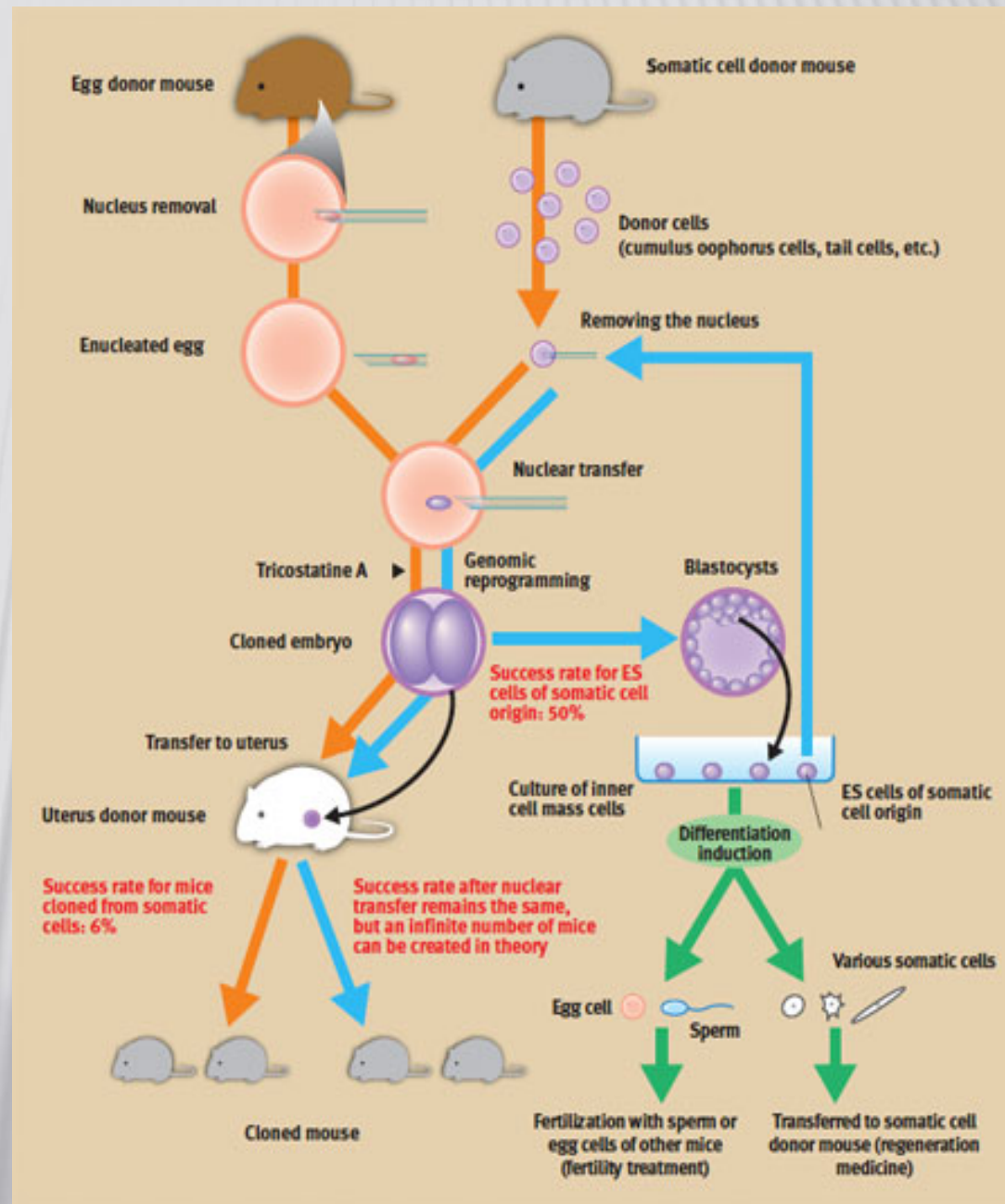


Honolulu tehnika

Za razliku od Vilmuta, koji je koristio ćelije mlečne žlezde koje je trebalo održati u G0 fazi, Vakajama i Yamaginalbi su eksperimentisali sa potpuno izdiferenciranim ćelijama koje su bile u G0 fazi. Koristili su tri tipa ćelija:

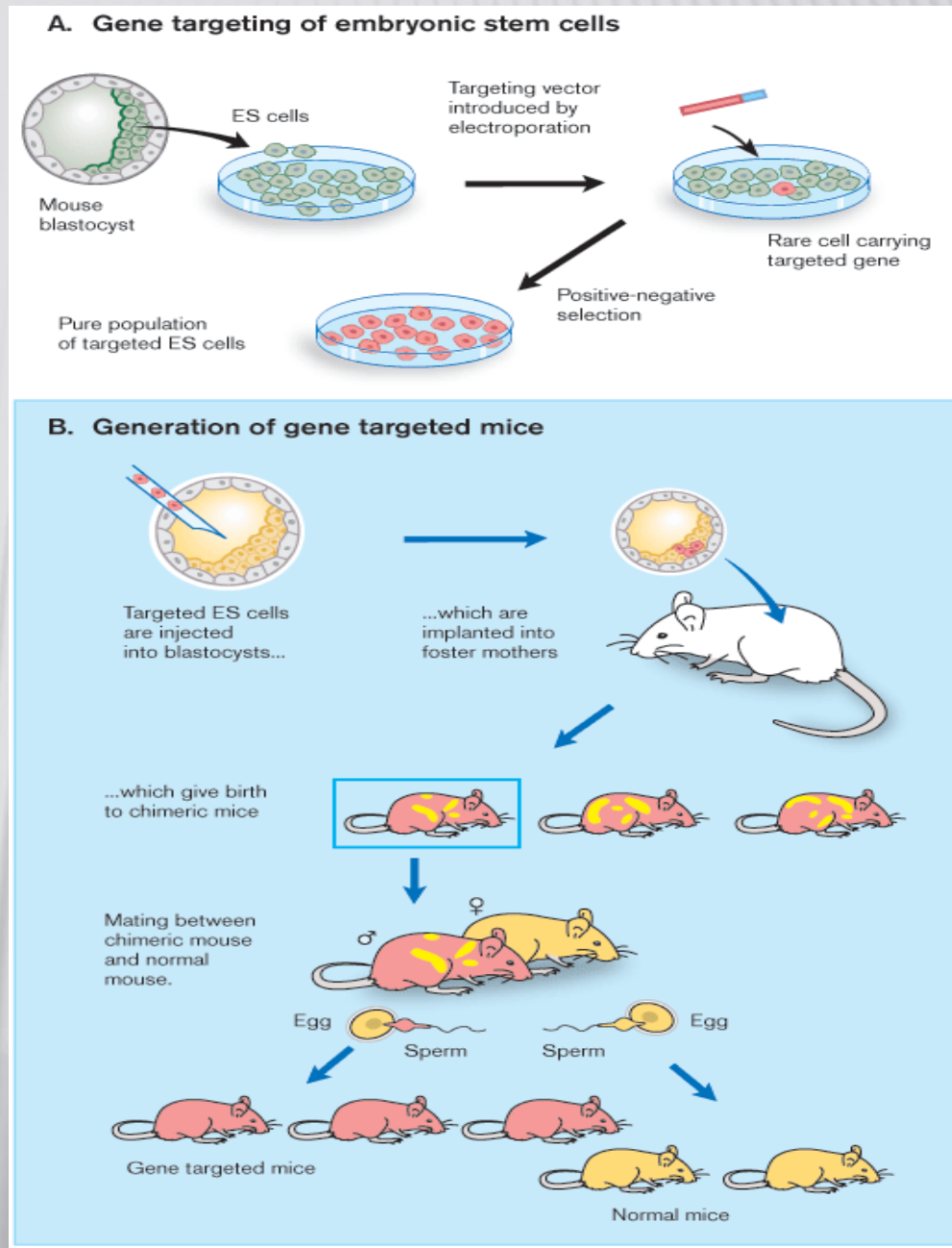
Sertolijeve ćelije,
Nervne ćelije i
Ćelije cumulus
oophorus-a iz jajnika.

Nakon vađenja nukleusa iz jajnih ćelija novi nukleus je ubačen u njih (transplatacija nukleusa, a ne fuzija ćelija).



Honolulu tehnika

Nukleusi donorskih ćelija su vađeni iz njih odmah nakon ekstrakcije ćelija iz miša i nije obavljano kultivisanje donorskih ćelija. Nakon jednog sata ćelije su prihvatile novi nukleus, a nakon narednih 5 sati, koliko je bilo potrebno za reprogramiranje nukleusa, ćelija se stavlja u kulturu gde počinje da raste i da se deli. U kulturi se nalazi i supstanca (CITOHALAZIN B) koji zaustavlja formiranje prvog polarnog tela koje se normalno formira pre fertilizacije. To se čini da ne bi došlo do odstranjivanja polovine genetičkog materijala.



Honolulu tehnika



Klonirani miševi

Ćelija se potom razvija u embrion koji se implantira u surogat majku. Najuspešnije za proces su se pokazale ćelije kumulus oforus. Vakajama je posle pravio klonove klonova i prvobitne klonove je puštao da se reprodukuju i dokazao da je njihova reprodukcija bila normalna.

Kloniranje ogroženih vrst /2

Kloniranje gaur a Noaha (ACT, januar 2001)

Epitelne celice samca, ki je poginil 8 let pred tem, so odmrznili in jih spojili z jajčnimi celicami navadne krave. Porabili so 692 jajčec, rodilo pa se je samo eno tele. 48 ur po rojstvu je klonirano ogroženo azijsko govedo gaur poginilo zaradi griže.



Prva klonirana ogrožena divja žival, ki so jo klonirali, je bil **muflon** (2000).

Kot nadomestna mati je služila običajna ovca, ki je bila tudi donorka (izpraznjene) jajčne celice. Somatske celice so odvzeli poginulemu divjemu muflonu in izvedli fuzijo. Analiza mtDNA je pokazala, da je klon imel mtDNA identično kot donorka oocit. 23 celičnih fuzij, 7 implantiranih embrijev, 1 mladič (Nature Biotechnology, 10/2001)



Kloniranje drugih sesalcev

Japonci so že 7/1998 klonirali govedo (Noto in Kaga, kasneje še Noto II in III). Leta 2000 je Kaga II povrgla tele, ki je bilo spočeto z umetno osemenitvijo.



Ameriškim znanstvenikom je (Science, 5/2003) uspelo klonirati mulo (križanca med oslom, ki ima 62 kromosomov in kobilu, ki jih ima 64). DNA izhaja iz gojenih fetusnih celic, ki so jih 1998 začeli gojiti na Univerzi Idaho. Po implantaciji 305 oocit se je nadomestni materi, kobili Syringi, skotila ena mula (s 63 kromosomi), ki je bila zdrava. Ime ji je Idaho Gem.



Kloniranje prašičev

Podjetje PPL Therapeutics je po Dolly kloniralo še prašiče (3/2000): Millie, Christa, Alexis, Carrel, Dotcom. Končni cilj je bil pripraviti živali z izbitimi geni in za vir organov za (kseno)transplantacijo. Klone prašičev z izbito eno kopijo gena za α -1,3-galaktoziltransferazo so pripravili konec leta 2002 (Noel, Angel, Star, Joy in Mary).

Na Univerzi Missouri so le malo zatem objavili podatek, da so pripravili 3000 gensko spremenjenih embrijev in jih vstavili v 28 nadomestnih svinj. Do skotitve se jih je razvilo le 7, od teh so 3 kmalu poginili.

S kloniranimi prašiči so izvedli več študij njihove morfološke, fiziološke in etiološke podobnosti. Ugotovili so, da so si genetsko identični kloni med seboj različni.



“Behavioral variation among cloned pigs”

Authors: Gregory S. Archer and T.H. Friend, Texas A&M University, J. Piedrahita, North Carolina State University, C.H. Nevill, S. Walker, Texas A&M University

Published: Feb. 19, 2003, in the early online edition of Applied Animal Behaviour Science

“Hierarchical Phenotype and Epigenetic Variation in Cloned Swine”

Authors: Greg S. Archer, Scott Dindor, Ted H. Friend, Shawn Walker, Gretchen Zaunbrecher, Bruce Lawhorn, Texas A&M University, Jorge A. Piedrahita, North Carolina State University

Published: Accepted by *Biology of Reproduction*

Kloniranje mačk

2000: Kitajci so klonirali kozo Yuanyuan.

2001: Francozi klonirali zajca na osnovi DNA iz odrasle somatske celice.

CC=CopyCat je bila prva klonirana mačka. Raziskovalce je presenetilo, ker je bil njen kožuh drugačen kot pri donorki kumulusnih celic (DNA). CC je bila edina rojena mačka od 87 ustvarjenih embrijev. (Nature 2/2002)



Leta 2004 so na osnovi DNA mačka Tahinija s t.im. "prenosom kromatina" klonirali mačka (Tabouli in Baba Ganoush). Kasneje so pri podjetju "Genetics Savings & Clone" klonirali še več drugih mačk: Mango → Peaches, Nicky → Little Nicky, Gizmo → Little Gizmo; zadnja dva po naročilu.



Kloniranje drugih sesalcev /3

Psa je prvič uspelo klonirati korejskim znanstvenikom (Nature, 4.8.2005).

Somatsko celico so odvzeli iz uhlja afganistanskega hrta Taija in jo spojili z izpraznjeno jajčno celico.

Nadomestna mati je bila druge pasme.

Psa so tako pozno klonirali, ker oocite še ne dozoriijo v jajčnikih in jih je tudi težko gojiti v laboratoriju.

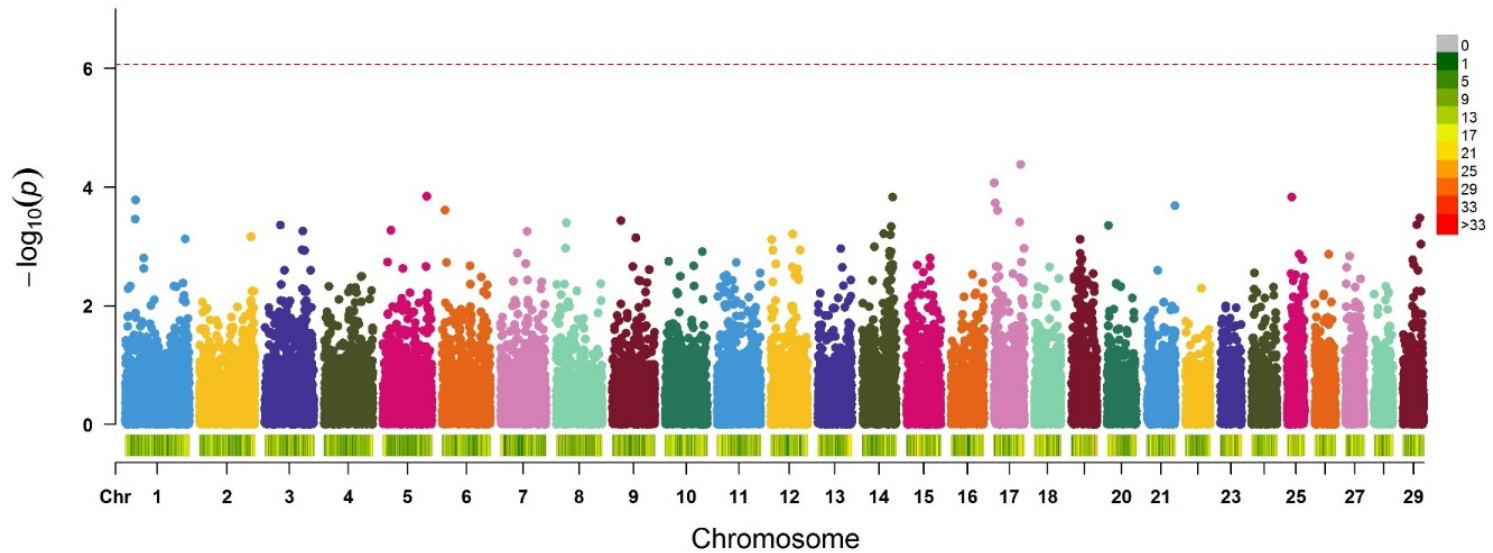
Jajčne celice so zato odvzeli šele 3 dni po ovulaciji in jim odvzeli DNA. Po fuziji in kemičnem šoku so se celice začele deliti, zgodnje zarodke pa so vstavili v nadomestne matere (123).

Implantirali so 1095 zgodnjih embrijev, zaznali pa so le tri brejosti. V enem primeru je prišlo do splava, dva psa pa sta se rodila živa s carskim rezom. En je poginil zaradi pljučnice, preživelemu pa je ime **Snuppy** (Seoul National University). Ker psi zbolevajo za podobnimi boleznimi kot ljudje (visok krvni tlak, okvare srca, rak na dojki), bi bili psi lahko uporabni za raziskave teh bolezni.



Figure 1 | Dog cloned by somatic-cell nuclear transfer. a, Snuppy, the first cloned dog, at 67 days after birth (right), with the three-year-old male Afghan hound (left) whose somatic skin cells were used to clone him. Snuppy is genetically identical to the donor Afghan hound. b, Snuppy (left) was implanted as an early embryo into a surrogate mother, the yellow Labrador retriever on the right, and raised by her.

Genome Wide Association Studies -GWAS-



Manhattan plot

Genome Wide Association Studies -GWAS-

- Razvojem tehnologije omogućena su sofisticirana istraživanja povezanosti određenih gena sa fenotipskim karakteristikama životinja ili određenih proizvodnih osobina. Jedna od takvih metoda je Genome Wide Association Studies (GWAS - u slobodnom prevodu: sveobuhvatno istraživanje genoma u asocijaciji sa ispoljavanjem složenih osobina).
- Poslednjih godina, zajedno sa napredovanjem sekvenciranja genoma i tehnologije genotipizacije SNP, GWAS studije pokazale su se kao praktične za istraživanje gena asociраних sa ispoljavanjem složenih osobina.

Genome Wide Association Studies -GWAS-

- U poređenju sa tradicionalnim QTL mapiranjem, GWAS ima prednost kako u moći otkrivanja uzročnih varijacija, tako i u tačnijem određivanju genskih regiona na kojima se nalaze uzročne varijacije.
- GWAS je široko prihvaćen kao primarni pristup za pronalaženje gena, te je postignut ogroman uspeh u identifikovanju gena koji kod ljudi mogu predstavljati opasnost za pojavu određenih bolesti. Međutim, samo nekoliko GWAS studija se bavilo identifikovanjem gena koji se asociraju sa proizvodno- reproduktivnim osobinama kod goveda.

THIRD RESEARCH
COORDINATION MEETING
INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY - IAEA

Coordinated Research Project D3.10.28
- RC 20774 -

***“ANIMAL IDENTIFICATION, PEDIGREE, EXTERIOR AND PERFORMANCE
DATA RECORDING IN SELECTED HOLSTEIN FRIESIAN CATTLE
POPULATION IN SERBIA USED FOR FUTURE GENETIC SELECTION
UNDER AI PROGRAMME ”***

Head Project Staff:

Dr Zoran Stanimirović (CSI)

Marko Ristanić, DVM

Dr Uroš Glavinić

Dr Jevrosima Stevanović

Dr Milan Maletić

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

DEPARTMENT OF BIOLOGY

LABORATORY FOR ANIMAL GENETICS

Genome Wide Association Studies -GWAS-

- U okviru navedenog projekta, čiji je integralni deo doktorska disertacija asistenta Marka Ristanića, sakupljeno je preko 500 uzoraka krvi i sperme od Holštajn-frizijskih goveda iz Srbije.
- Pored uzoraka, od istih grla su sakupljeni i proizvodno-reproduktivni podaci (dužina laktacije, prinos mleka, prinos proteina, prinos mlečne masti, dužina servis perioda, starost pri prvom parenju itd.)
- Iz prikupljenih uzoraka izvršena je ekstrakcija DNK.

Genome Wide Association Studies

GWAS

- U saradnji s
Production
Vienna, Aus
Bovine BovM
taurus.
- Rezultati ge
softverskog
uzoraka i r
Weinberg r
testiranim lokusima (QTL).

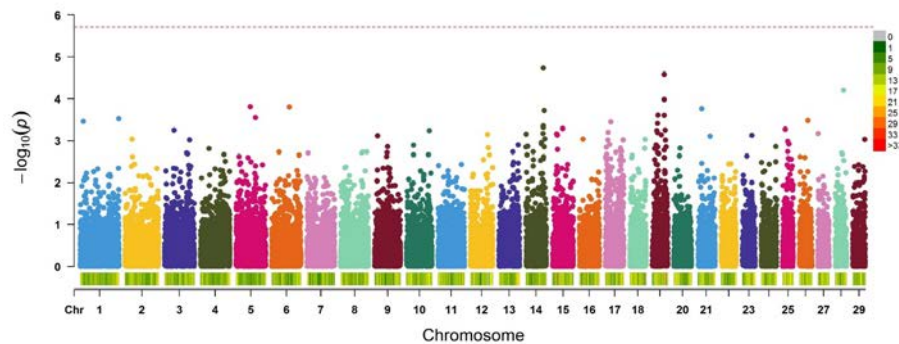
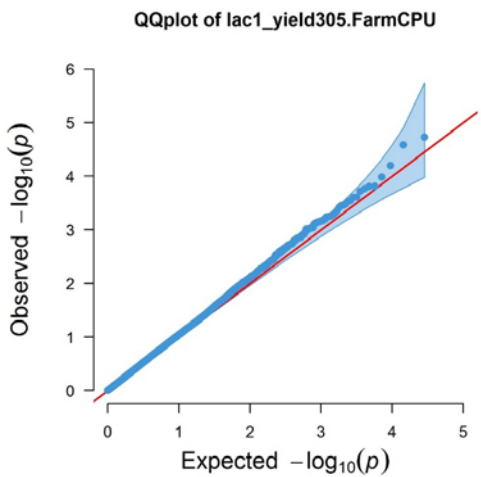


cije (Animal
Seibersdorf,
moću Axiom
genomu *Bos*

LINK V. 1.9
pojedinačnih
anje Hardy-
alelima na

LAC1 Yield 305

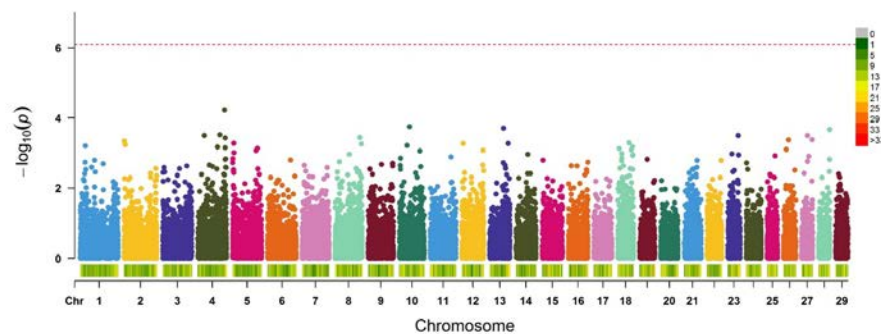
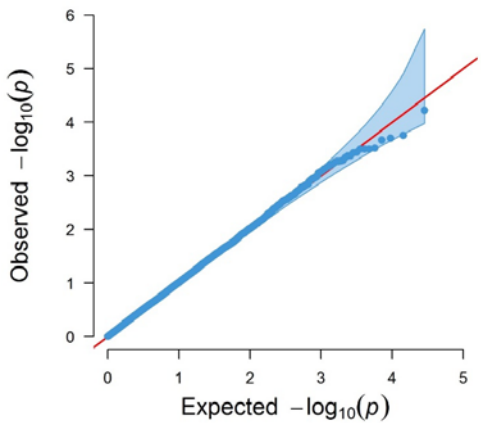
Prinos mleka u 1. laktaciji sveden na 305 dana



LAC2 Yield 305

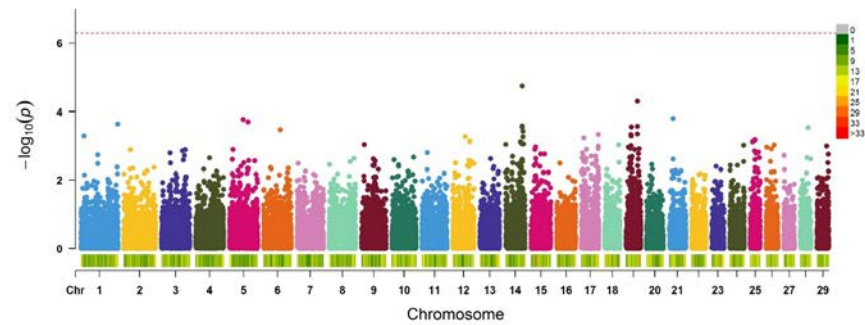
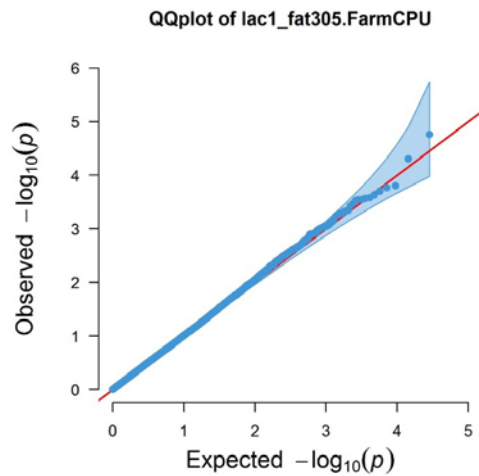
Prinos mleka u 2. laktaciji sveden na 305 dana

QQplot of lac2_yield305.FarmCPU



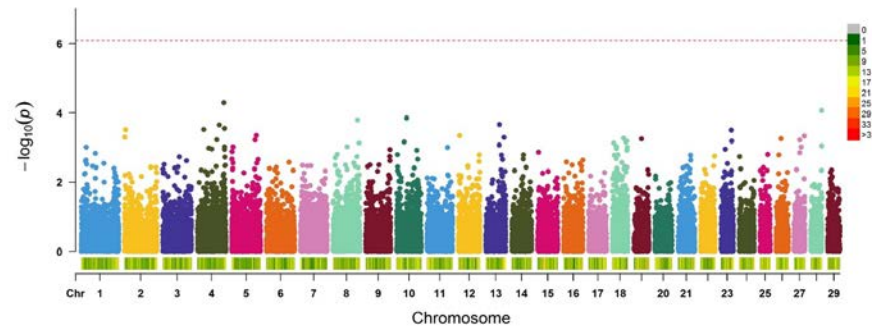
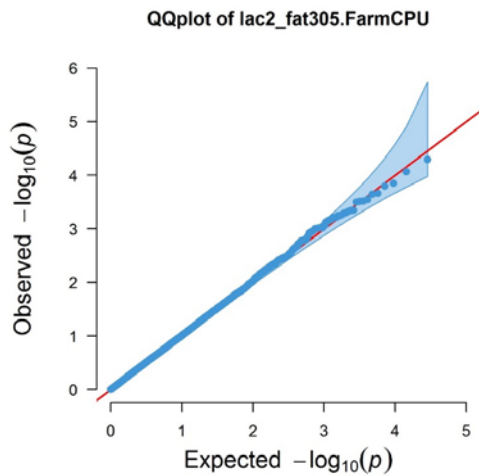
LAC1 FAT 305

Prinos mlečne masti u 1. laktaciji sveden na 305 dana



LAC2 FAT 305

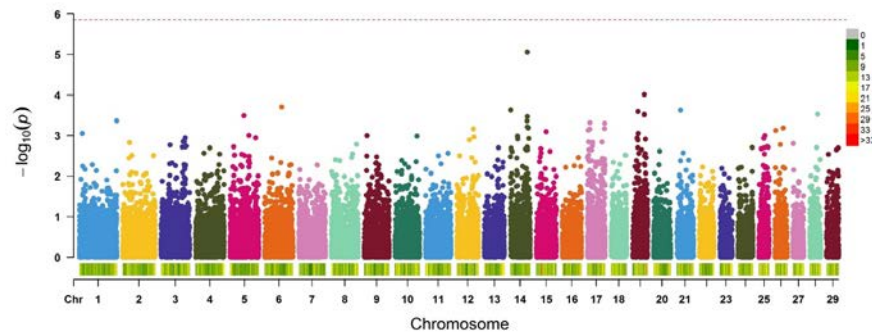
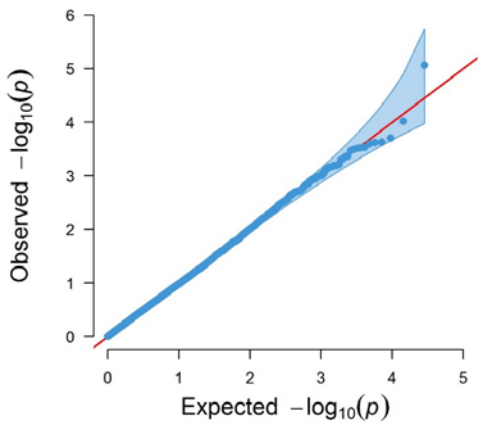
Prinos mlečne masti u 2. laktaciji sveden na 305 dana



LAC1 PROT 305

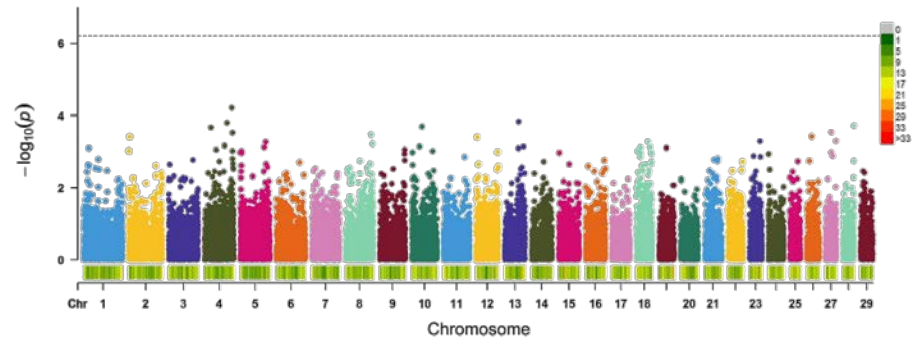
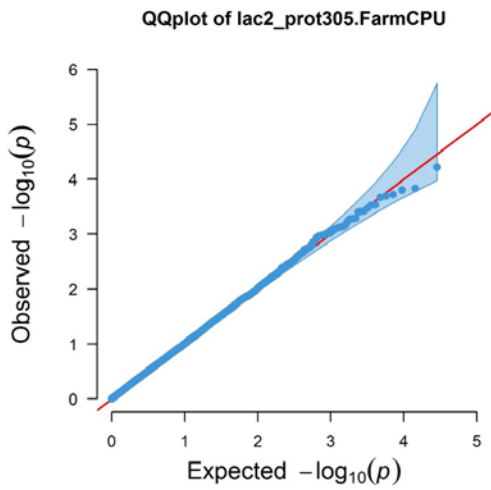
Prinos mlečnih proteina u 1. laktaciji sveden na 305 dana

QQplot of lac1_prot305.FarmCPU



LAC2 PROT 305

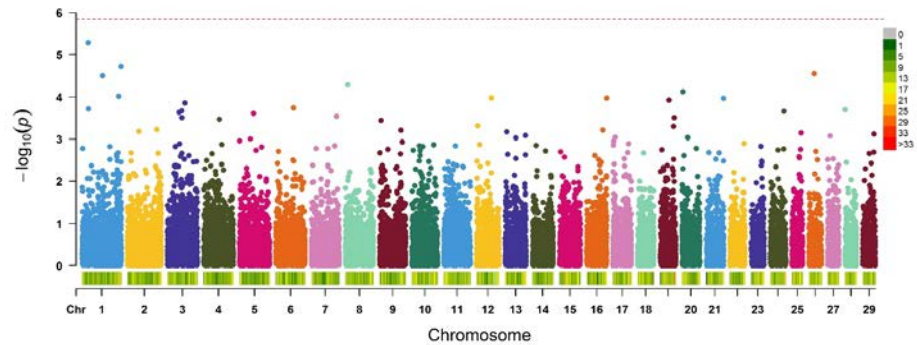
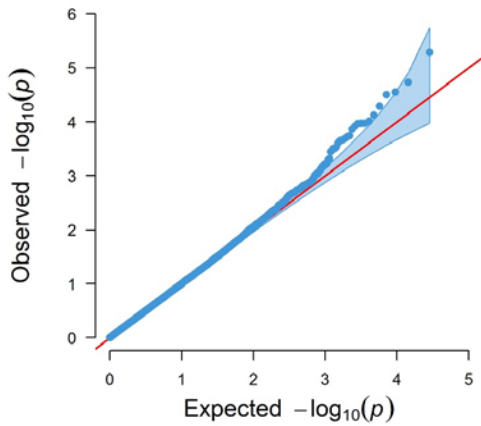
Prinos mlečnih proteina u 2. laktaciji sveden na 305 dana



FIRST CALVING INTERVAL

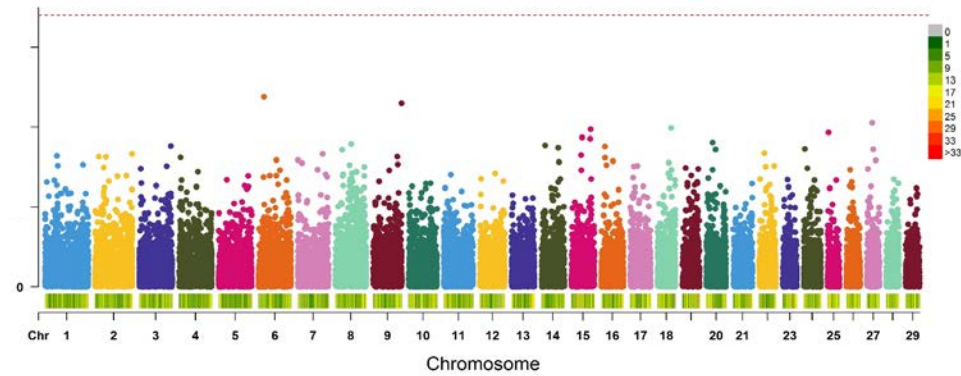
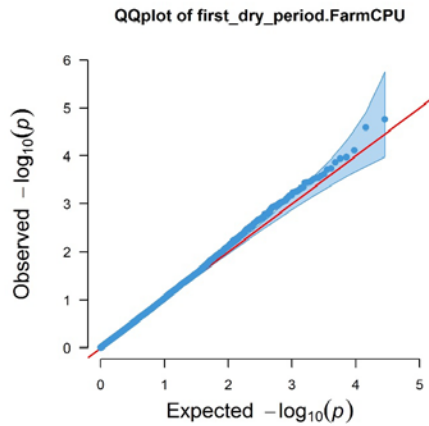
Prvi međutelidbeni period

QQplot of first_calving_interval.FarmCPU



FIRST DRY PERIOD

Prvi period zasušenja



CRISPR/Cas sistem

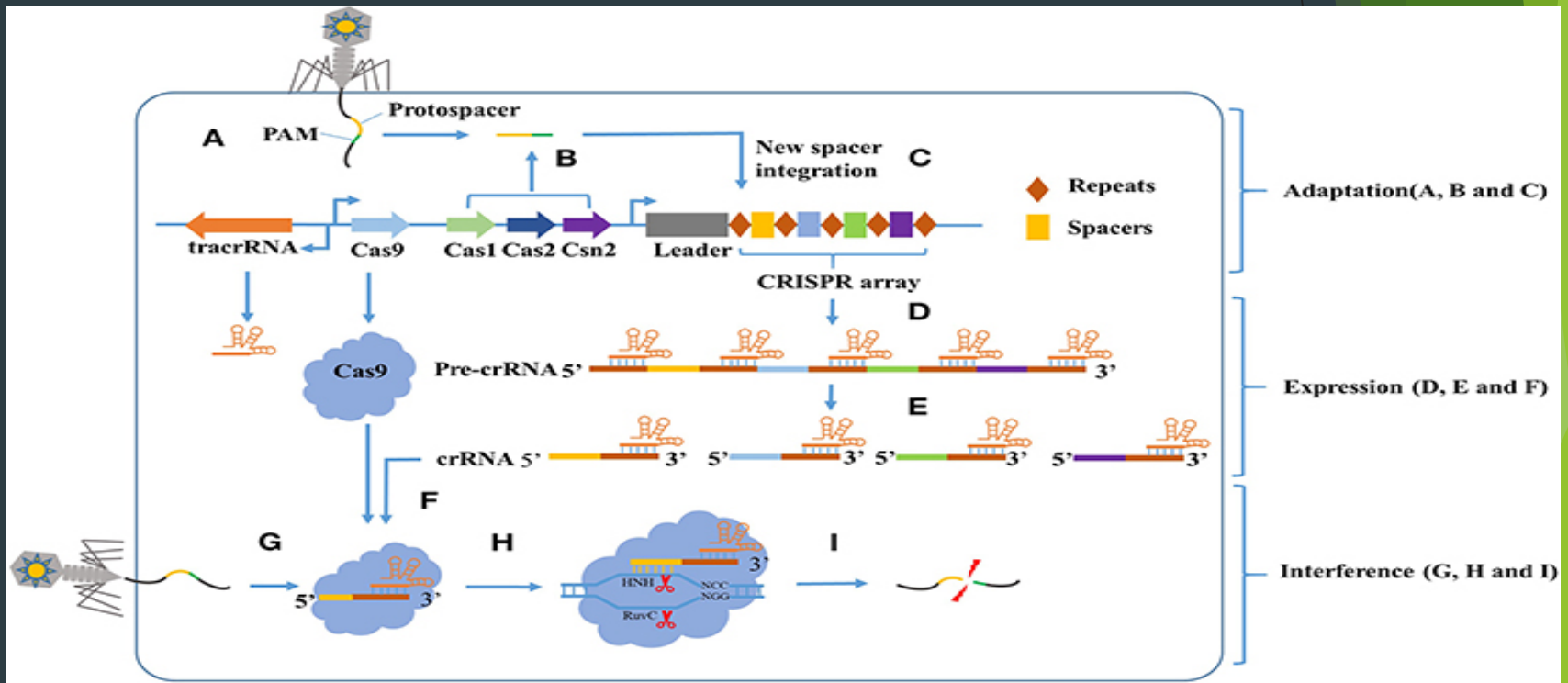
- ▶ CRISPR predstavlja deo „imunskog“ mehanizma koji bakterije koriste za zaštitu od stranih molekula DNK. U pitanju je specifičan lokus sačinjen od ponovljenih sekvenci, koje su međusobno odvojene spejserima. Nakon uspešnog prvog susreta sa dotičnim virusom, bakterija iseca pomenuti niz nukleotida iz njegovog genoma i inserira ga između rasutih ponovaka. Svaki naredni susret sa tim bakteriofagom za posledicu će imati ekspresiju sekvence pomenutog spejsera, koji će hibridizovati sa sebi komplementarnim nizom nukleotida u okviru fagne DNK, te na specifičnu lokaciju navesti Sas9 endonukleazu koja će uvesti dvolančani prekid i sprečiti infekciju.

CRISPR/Cas sistem

- ▶ **CRISPR** (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) predstavlja *deo* imunskog mehanizma koje bakterije koriste za zaštitu od molekula strane DNK
- ▶ *Adaptivna* imunost bakterija prema stranoj DNK
- ▶ **Cas** (eng. CCRISPR-asociated) **protein**
- ▶ **Tri koraka**

CRISPR/Cas9 sistem za editovanje genoma

- Specifičnost CRISPR/Cas sistema zavisi od jedinstvenosti ciljne sekvence
- **PAM motiv** je DNK sekvenca koja se prostire odmah nizvodno od protograničnika (Slika – A)



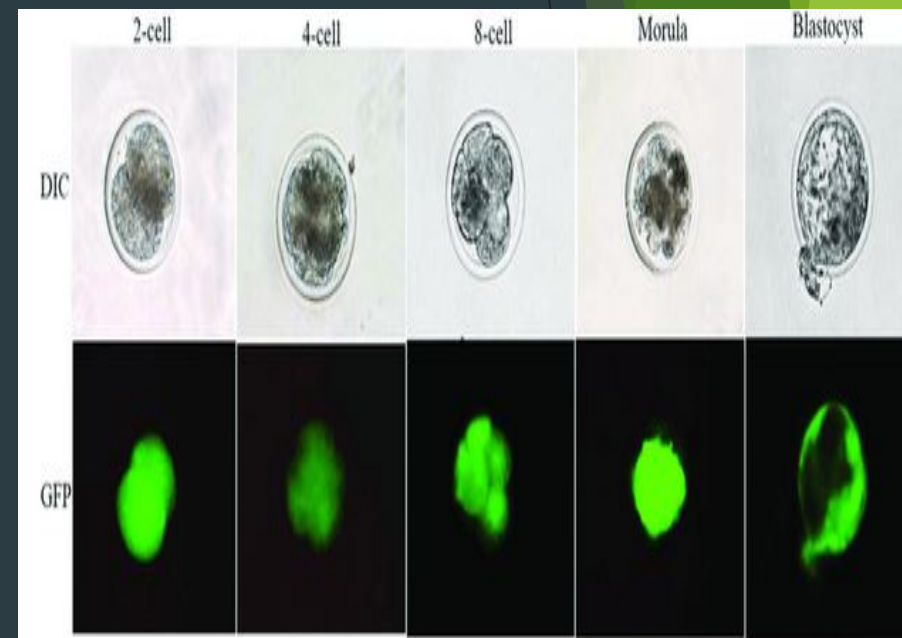
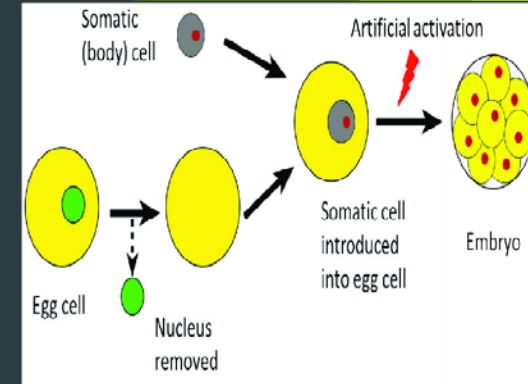
CRISPR/Cas sistem

- ▶ Ova adaptivna „imunost“ bakterija modifikovana je metodama genetičkog inženjerstva i biotehnologije u cilju stvaranja mašinerije za programirano editovanje genoma. Ovaj kompleks nalazi primenu i u veterinarskoj medicini – stvaranjem transgenih životinja. Aplikacija ovog sistema u veterini predstavlja moćan alat u programima kontrole proizvodno-reproduktivnih kapaciteta domaćih životinja kao i u procesu kontrole zdravstvenog kapaciteta životinja u okviru koncepta “Jedno zdravlje”. Verovatno i najznačajnija primena ovog ribonukleoproteinskog kompleksa u veterinarskoj medicini tiče se stvaranja životinja rezistentnih na različite bolesti, počevši od PRRS-a u farmskom uzgoju svinja, zatim bruceloze i tuberkuloze, pa sve do otpornosti na leukozu. Potencijal i značaj rezistencije na bolesti nije od značaja samo za uzgajivače, već i za dobrobit i poboljšanje kvaliteta života samih životinja.

Primena CRISPR/Cas sistema u veterinarskoj medicini

- Poboljšana proizvodnja (sisari) -

- ▶ Modifikovano prase kod koga se eksprimira fat-1 gen iz *C. elegans* ima mali odnos ω -6 : ω -3 masnih kiselina
- ▶ Nokaut gena za miostatin kod prasića, goveda, ovaca i koza
- ▶ Modifikovano jagnje postiže veću masu, a zadržava kvalitet vune
- ▶ Nokin gena za eGFP u Y hromozom BFF ćelijskih linija



Primena CRISPR/Cas sistema u veterinarskoj medicini

- Poboljšana proizvodnja mleka (sisari) -

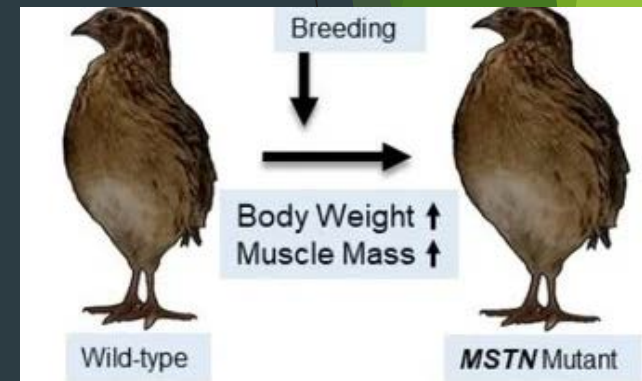
- ▶ Eradikacija alergena
- ▶ Dobijanje mleka sa antibakterijskim svojstvima



Primena CRISPR/Cas sistema u veterinarskoj medicini

- Poboljšana proizvodnja (ptice) -

- ▶ Nokaut gena za miostatin kod kokoške i prepelice
- ▶ Insercije u polne hromosome
- ▶ Nokin željenih sekvenci u ovalbumin lokus → inkorporacija rekombinantnih proteina u belance
- ▶ Eradikacija alergena



Primena CRISPR/Cas sistema u veterinarskoj medicini

- Životinje otporne na bolesti (sisari) -

- ▶ Svinje i goveda rezistentna na tuberkulozu
- ▶ Disrupcija gena za protein CD163 → svinje rezistentne na PRRSV (eng. *Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome virus*)
- ▶ Inaktiviranje gena uključenog u replikaciju bakterija roda *Brucella* u ćelijama domaćina → otpornost na brucelozu



Primena CRISPR/Cas sistema u veterinarskoj medicini

- Životinje otporne na bolesti (ptice) -

- ▶ Ptice rezistentne na AIV (eng. *Avian Influenza Virus*)
- ▶ Kokoške otporne na ALV (eng. *Avian Leukosis Virus*)



CRISPR/Cas sistem

CRISPR/Cas9 kompleks može pomoći u još nekim poljima veterine i uzgajanja životinja, kao što je proučavanje odnosa domaćina i parazita. Modifikovanjem sekvenci od interesa i njihove ekspresije može se utvrditi da li, i ako da, kako ciljano uvođenje izmena u genomu domaćina ili parazita, utiče na njihov odnos, te time omogućiti efikasniju zaštitu životinja značajnih za veterinarsku struku. Programiranim remećenjem ekspresije esencijalnih gena štetoina, pre svega nekih artropoda, moguće je dodatno zaštititi domaće životinje. CRISPR/Cas9 sistem sam po sebi ne vredi ništa ako se ne uvede u ćeliju. Distribucija ovog kompleksa odigrava se na različite načine, a najčešći su mikroinjektiranje i elektroporacija.

Primena CRISPR/Cas sistema u veterinarskoj medicini

- Proučavanje interakcija domaćin-parazit -

- ▶ Medonosna pčela vs *Lotmaria passim*



Primena CRISPR/Cas sistema u veterinarskoj medicini - Borba protiv štetočina -

- ▶ Genski pogon omogućava širenje željenih sekvenci kroz čitavu populaciju sa verovatnoćom prenošenja većom od one koja karakteriše nasleđivanje po Mendelu → ovime se omogućava da se varijanta nekog gena brzo proširi kroz populaciju

