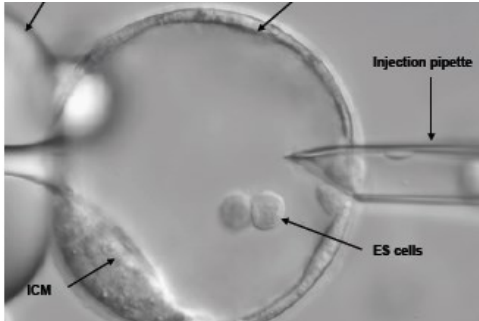


Lecția 5. TRANSGENEZA LA ANIMALE

Conținuturi:

1. Aspecte cronologice ale realizărilor de inginerie genetică la animale
2. Transfer de gene în celula animală
3. Obținerea animalelor transgenice

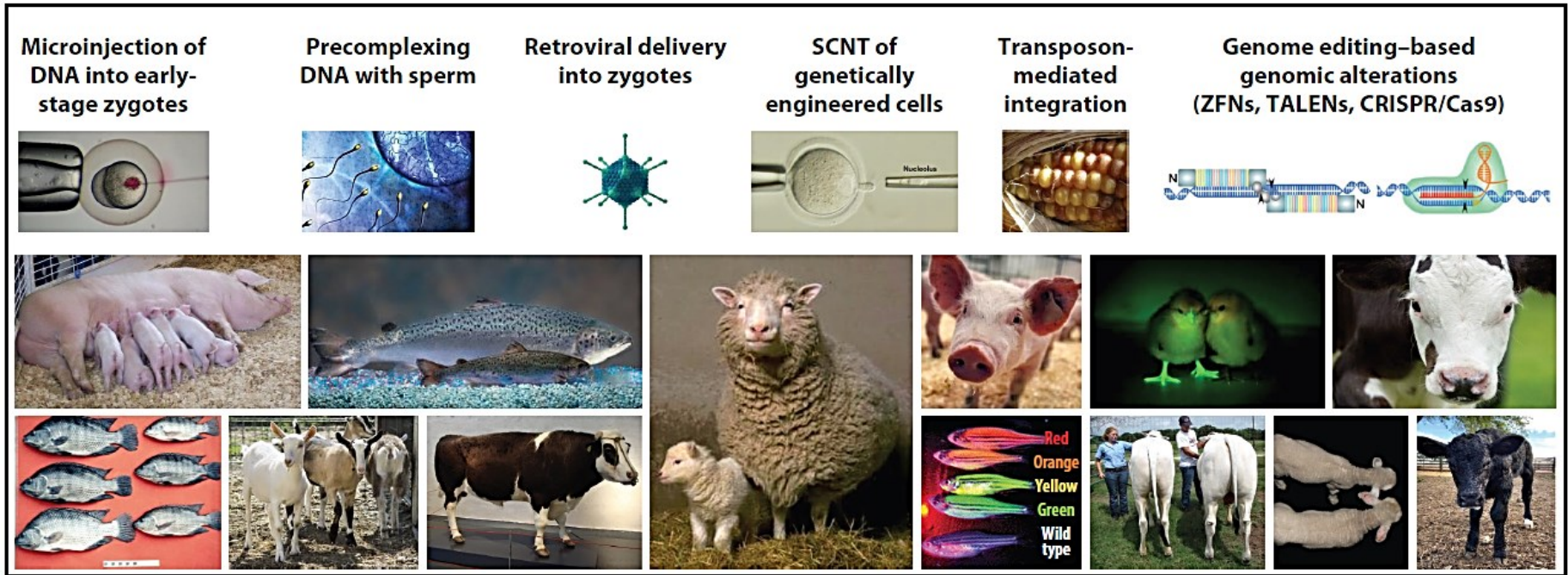
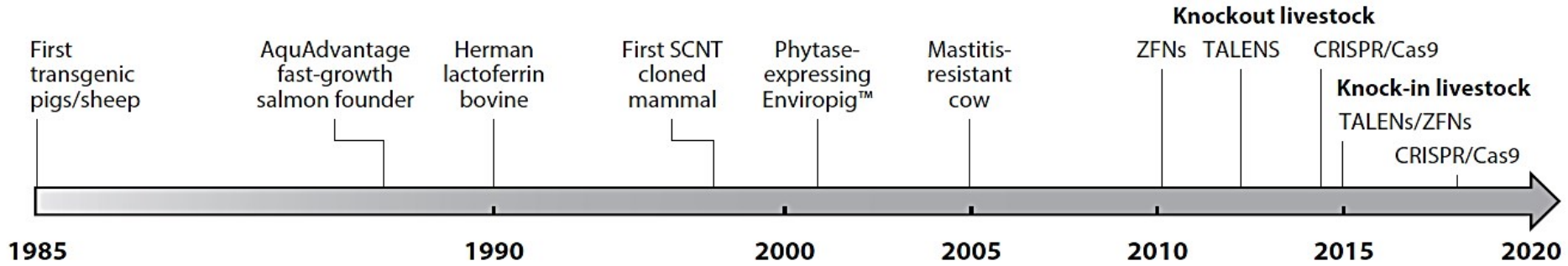


1. ASPECTE CRONOLOGICE ALE REALIZĂRILOR DE INGINERIE GENETICĂ LA ANIMALE

- ❑ Experimente de transformare genetică la bacterii – 1928, microbiologul Griffith
- ❑ Fenomenul de conjugare la bacterii – 1946, J. Lederberg, E. Tatum
- ❑ Fenomenul de transducție la bacterii – 1951, N. Zinder
- ❑ Modelul structurii bicatenare a ADN, replicarea semiconservativă a ADN – 1953, J. Watson, F. Crick etc.
- ❑ Descoperirea enzimelor de restricție – 1960, W. Arber
- ❑ Tehnica recombinării AN, clonarea genetică, analiza expresiei genelor, cartare etc. – începând cu anii 70- 80 ai secolului XX

REALIZĂRI PRIVIND TRANSFERUL DE GENE LA ANIMALE

- 1952**- transfer de nucleee din celule embrionare de la broască (*Rana pipiens*) în ovule anucleate
- 1962** – clonarea la broască *Xenopus Laevis*
- 1966** - primul raport privind microinjectarea în celule embrionare de șoarece
- 1980** - **Obținerea șoarecilor transgenici (microinjectare ADN recombinant)**
- 1981**- transfer de celule embrionare stem derivate de la embrionii de șoarece
- 1982** - șoareci giganți obținuți prin transferul genei hormonului de creștere de la om
- 1983** - expresie țesut specifică la șoarecele transgenic
- 1985** - iepuri, mei și porci transgenici – prin microinjectare
- 1987** - pui transgenici – mediați de retrovirusuri
- 1989** - integrarea ADN – prin recombinare specifică (targeting)
- 1996** - utilizarea celulelor stem pentru transfer de gene la oi
- 1997** - transferul nucleului diferențiat într-un ovul anucleat – clonarea la oi, Dolly



Abrevieri: CRISPR/Cas9, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat targeted by Cas 9 nuclease; SCNT (somatic cell nuclear transfer), transfer nuclear de celule somatic; TALEN (transcription activator-like effector nuclease); ZFN (zinc-finger nuclease), nuclează cu motive *degete de zinc*.

Alison L. Van Eenennaam, Felipe De Figueiredo Silva, Josephine F. Trott, and David Zilberman. Genetic Engineering of Livestock: The Opportunity Cost of Regulatory Delay. Annual Review of Animal Biosciences. Vol. 9:453-478 (Volume publication date February 2021) <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-animal-061220-023052>

De reținut:

Progresul științific realizat în producerea de șoareci transgenici și de porci transgenici pentru cercetări biomedicale este considerabil mai mare, în comparație cu AMG produse pentru scopuri comerciale

Cauze:

- ❑ Comunitatea științifică relativ mică (în acest domeniu), în parte din cauza deficitului de finanțare atât din sectorul public, cât și din privat, în special în comparație cu cercetarea biomedicală de bază, fundamentală și aplicată.
- ❑ Aceste cercetări sunt foarte costisitoare. Costul producerii unui singur porc transgenic fondator a fost estimat la 25.000 USD (în 1992), iar producerea unui singur vițel transgenic a costat mai mult de 500.000 USD.

Costul ridicat al producției de animale transgenice a fost și continuă să fie un factor major care îi limitează pe cei interesați să exploreze potențialul acestei tehnologii.

Problemele care determină costurile ridicate în obținerea OMG

Crearea animalelor transgenice este un proces foarte dificil de realizat.

Experiențele de producere a primelor AMG prin tehnologia ADN recombinant, *tehnici de microinjecție pronucleară și tehnici avansate de reproducere*, cum ar fi *superovulația și transferul de embrioni* (1985) au demonstrat că ratele de integrare a alogenelor sunt scăzute:

- 10,4% la porci
- 1,3% la oi,

Această problemă rămâne complicată pentru inginerii în zootehnie.

Alte câteva probleme în producerea AMG de talie mare:

- zigotul este opac, ceea ce face microinjecția (pro)nucleară mai dificilă decât la șoareci;
- rate scăzute de integrare aleatorie a transgenelor;
- mozaicism în embrionii transgenici;
- perioade lungi între generații;
- costuri mari de îngrijire și întreținere a animalelor;
- protocoale ineficiente de izolare a celulelor stem embrionare (ESC, Embryonic stem cells) de la majoritatea speciilor de animale.

Exemple care demonstrează dificultățile de obținere a AMG

- ❑ În rezultatul transferului de nucleee în ovule enucleate (anucleate):
 - ✓ din 40 de embrioni se obține doar un șoarece transgenic,
 - ✓ din 100 de embrioni de oaie se obține o singură oaie transgenică,
 - ✓ din 1500 de embrioni de ovine supraviețuiește numai unul singur.
- ❑ Doar la 50% dintre animalele transgenice se expresează **proteina de interes**, iar un nivel ridicat de expresie a **transgenei** în celulele epiteliale ale glandei mamare se depistează doar la unii indivizi.
- ❑ În unele cazuri **gena se expresează**, însă **proteina transgenică** nu se secretă în lapte.
- ❑ Chiar dacă se obține un animal transgenic “ideal” după mai mulți parametri, calitățile acestuia **nu se transmit, întotdeauna, prin ereditate descendenților**.

!Soluție pentru biotehnologi - clonarea animalelor. Prin clonare se poate obține un număr suficient de clone ale animalului modificat genetic “ideal”.

2. TRANSFERUL DE GENE ÎN CELULA ANIMALĂ

2.1. CLONARE

Proceduri de transfer de material genetic care nu implică transgeneza

CLONAREA include procesele utilizate pentru a crea o copie genetică exactă a unei alte celule, țesut sau organism, denumită CLONĂ.

Reproducerea non-sexuată este clonare. Acest fenomen are loc pe scară largă în natură (bacteriile și drojdia se reproduc prin astfel de procese)

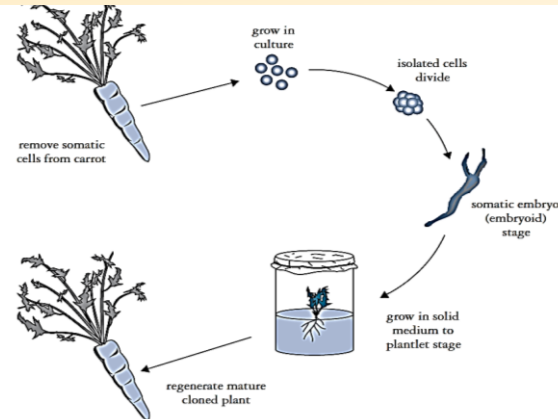
Există trei tipuri diferite de clonare:

- Clonarea genelor** (clonare moleculară), sunt produse copii ale genelor sau ale fragmentelor de ADN.
- Clonarea reproductivă**, sunt produse „copii” ale unui organism.
- Clonarea terapeutică**, obținerea de **celule stem embrionare în scopul** producerii de țesut sănătos pentru a înlocui țesutul bolnav din corpul uman.

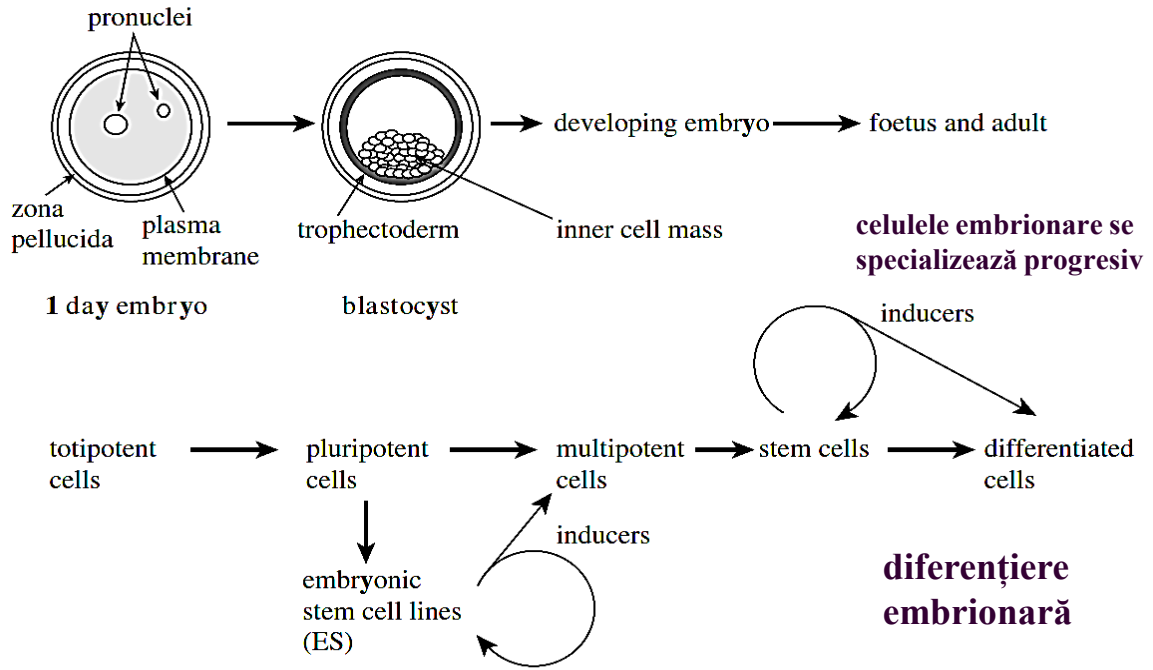
Ideea de a transplanta un nucleu intact într-o celulă (ovul) pentru a genera o clonă a fost propusă încă din 1938, dar tehnica a fost dezvoltată mult mai târziu, în 1996 fiind obținută clona Dolly (??).

Clonarea prezintă particularități specifice la plante și animale

La plante: celulele se pot **dediferenția complet *in vitro*** și pot da naștere la celule embrionare **totipotente**. Acest fenomen este indus de factori hormonal. Fiecare dintre celulele diferențiate poate genera o plantă normală. Această proprietate a celulelor vegetale este exploatată pe scară largă în agricultură (altoire/grafting). **Capacitatea de a clona plante prin dediferențierea celulelor somatice este, de asemenea, un element cheie în generarea de plante transgenice.**



La animalele superioare, celula zigotului format imediat după fertilizare, precum și celulele embrionului în faza de 2 sau 4 celulele (blastomeri) sunt totipotente - pot genera toate celulele organismului (se poate genera un organism viu dacă sunt introduse în zona pellucida a unui ovul).



După câteva zile, în funcție de specie, embrionul (blastocist) este compus din două categorii de celule.

1. **un strat unicelular de-a lungul zonei *pellucide***, cunoscute ca trofoblastul - precursorul placentei.
2. **un grup compact de celule** -masă celulară internă din care se dezvoltă embrionul. Celulele masei celulare interne sunt pluripotente

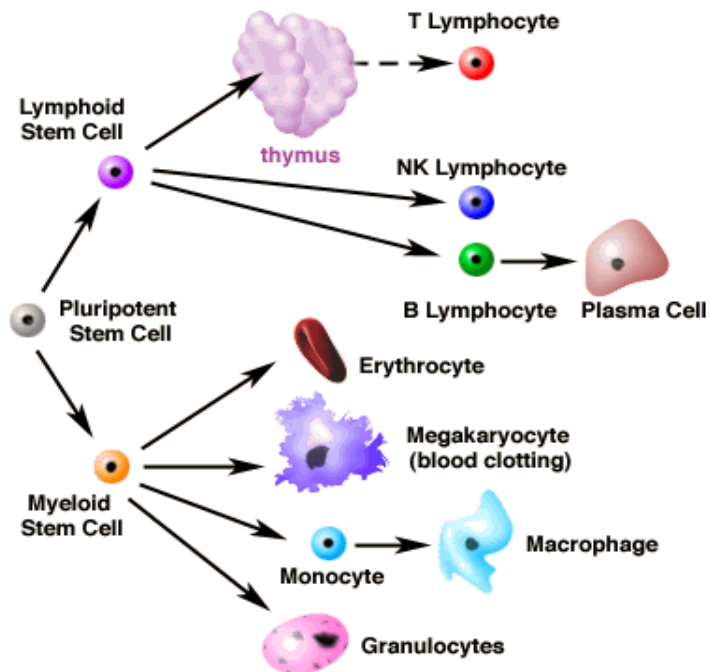
Potențial de dezvoltare a celulelor

Totipotență - capacitatea de a forma orice tip de linie celulară

Pluripotență - abilitatea de a forma diferite categorii de celule, ex. **celule embrionare stem (CES)**, cu excepția celulelor țesuturilor “extraembrionare” amnion, corion, componenți ai placentei.

Multipotență - abilitatea celulelor stem adulte de a forma linii celulare multiple de la o singură linie, ex. celule stem hematopoietice (eritrocite, limfocite, mastocite, macrofage, trombocite etc.). Toate sau cel puțin unele dintre organele **fătului și la adulți** conțin celule stem **zonale/organ stem cells, notate astfel** pentru a evita confuzia cu **Celulele Stem embrionare**. Celulele stem ale organelor se pot diviza rapid și se pot diferenția pentru a regenera un organ. Celulele stem reprezintă o rezervă a organismului, pentru înlăturarea unor defecte –un rol de reparare.

Unipotență - capacitatea celulelor de a forma doar un singur tip de linie celulară, ex. *în testicul celulele stem ale spermatogoniilor generează doar spermatozoizi*.



Dediferențierea in vitro a celulelor vertebratelor similar plantelor prin adăugarea de factori la mediul de cultură nu a fost încă obținut.

Reprogramare - proces de dediferențiere a celulelor somatice. Poate fi indus de transferul de nucleu, fuziunea celulelor și manipulari genetice.

Primele celule stem au fost descrise la șoareci – 1981

Primele celule stem umane au fost descrise în – 1998.

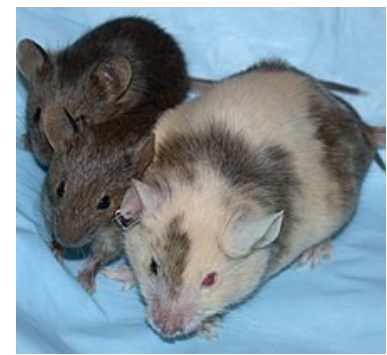
https://www.youtube.com/watch?v=UO_4otDZ8mc

How will stem cell research help society?

<https://www.youtube.com/watch?v=EY5CTGI03uM>

What are embryonic stem cells? Narrated by Dr. Janet Rossant

Celulele pluripotente pot fi transferate experimental într-un blastocist, generând un organism himer. Acest tip de organism nu trebuie confundat cu un **hibrid**.



O **himeră** rezultă dintr-un amestec de populații de celule distinte genetic (fiecare păstrându-și genomul). Gameții și descendenții himerelor sunt derivate doar de la un tip de celulă a embrionului original. Prin urmare, genele lor nu reprezintă o combinație de la doi embrioni.

În unele cazuri, animale himere pot fi obținute cu celule care provin de la două specii diferite. Au fost obținute himere interspecifice de caprine și ovine, sau cu prepeliță și găini. **Descendenții din aceste himere sunt oi sau capre**, dar nu o combinație genetică a ambelor.

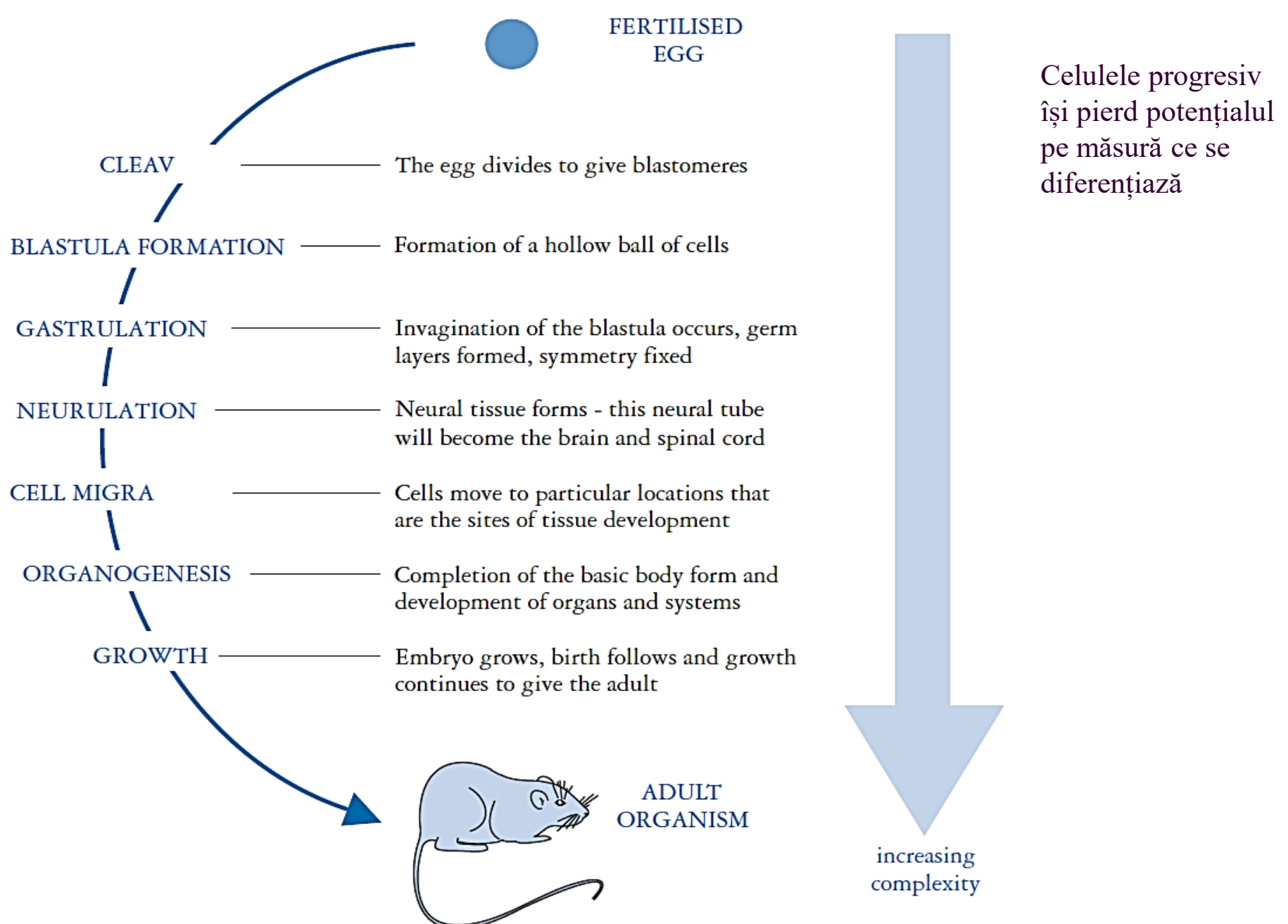
Hibrizii, în schimb, sunt formați prin fertilizare și, prin urmare, reprezintă o combinare a genomurilor în toate celulele organismului. Hibrizii sunt generați frecvent în cadrul aceleiași specii (**intraspecifici**) pentru a ameliora anumite trăsături/caractere de exemplu producția/recolta.

Pot fi obținuți și hibrizii **interspecifici/intergenerici**. La plante, astfel sunt create varietăți noi. De ex. cazul *Triticale*, care este un hibrid obținut prin încrucișarea reprezentanților a două genuri diferite de plante de cereale - grâu și secară.

Hibrizii interspecifici la animale superioare sunt infertili și nu generează specii noi. De ex. **Catâarul** - hibrid rezultat din încrucișarea unui cal și a unui măgar (**iapă și măgar**);

Bardou - animal hibrid obținut prin încrucișarea dintre armăsar și măgăriță





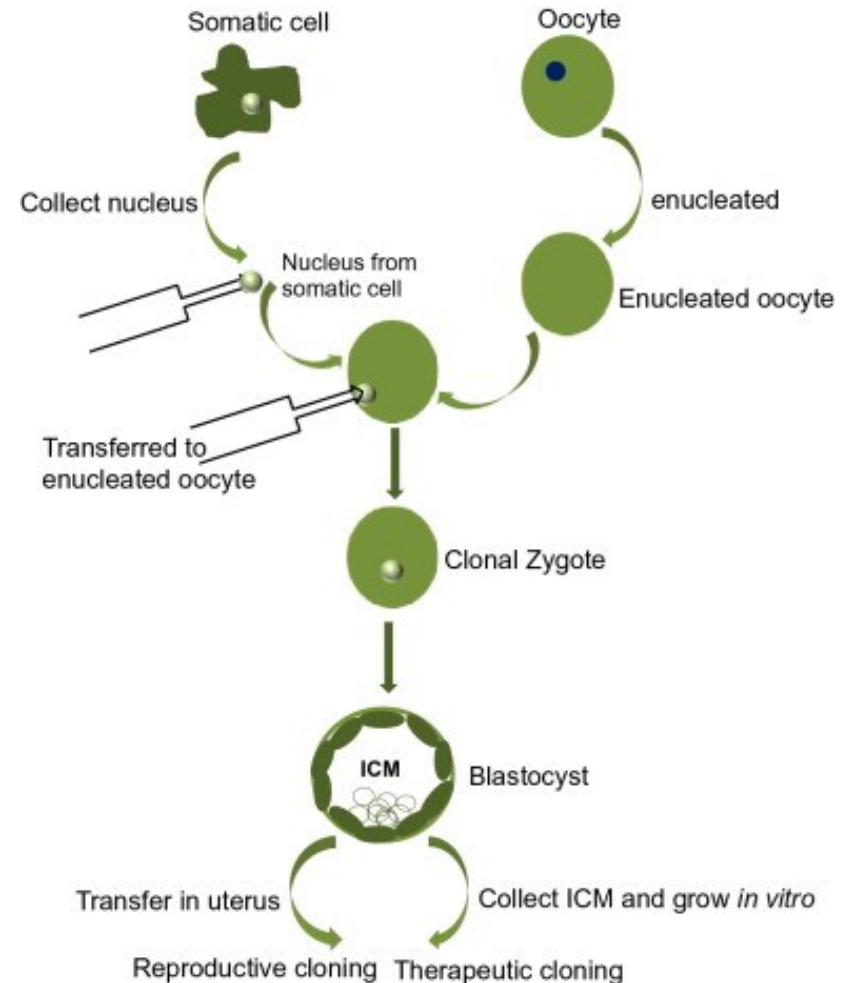
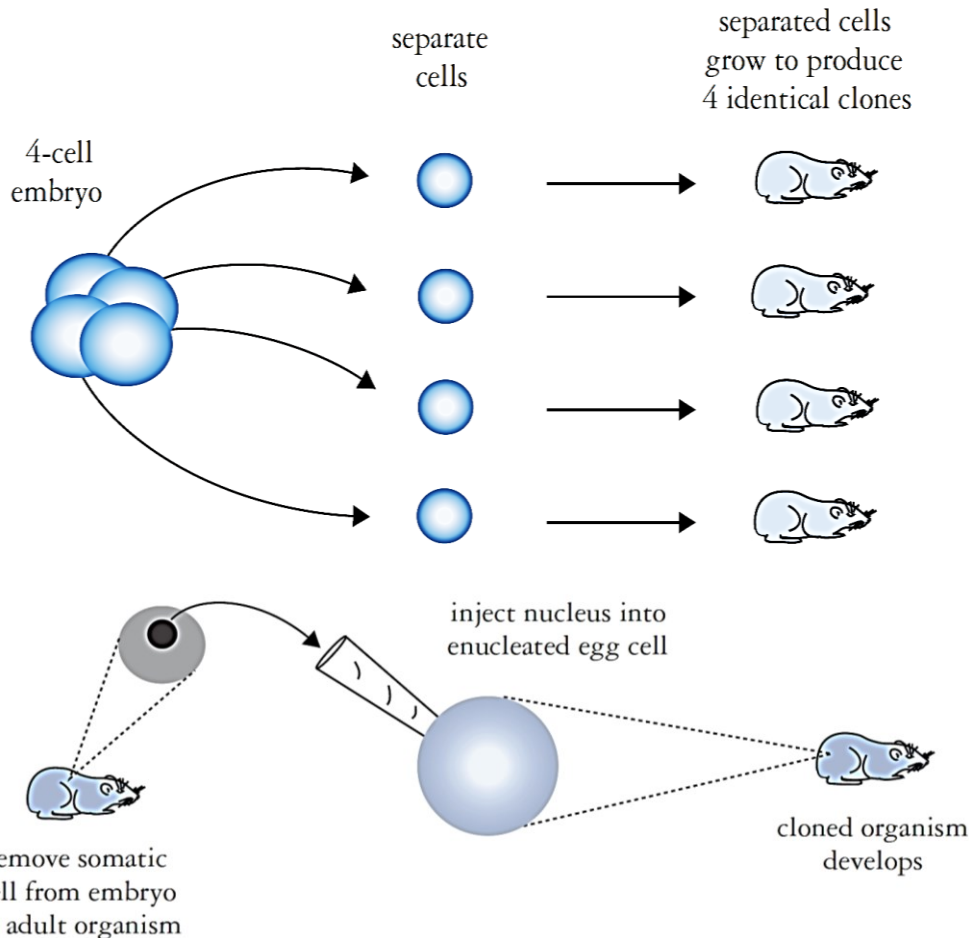
Etape de dezvoltare la șoarece din ovulul fertilizat la organismul adult implică diviziunea celulară, diferențierea celulelor și generarea de modele complexe în timpul embriogenezei (Nicholl (2000), Cell & Molecular Biology)

MODURI DE CLONARE A ORGANISMELOR ANIMALE

Două metode pentru clonarea animalelor.

1. Diviziunea embrionului: celulele dintr-un embrion timpuriu (prezentat ca un embrion cu 4 celule) sunt separate și lăsate să continue dezvoltarea. Cele patru organisme sunt clone identice genetic.

2. Tehnica transferului de nucleu. Un nucleu dintr-o celulă somatică (de la un embrion sau un adult) este transplantaat într-o celulă ovul enucleată. În acest caz, clona nu este absolut identică cu „părintele” ei. ADN-ul mitocondrial este moștenit pe linie maternă (mitocondriile din citoplasma din celula ovul). Clonele pot fi identice din punct de vedere genetic numai atunci când ovocitele receptoare provin de la aceeași femelă.



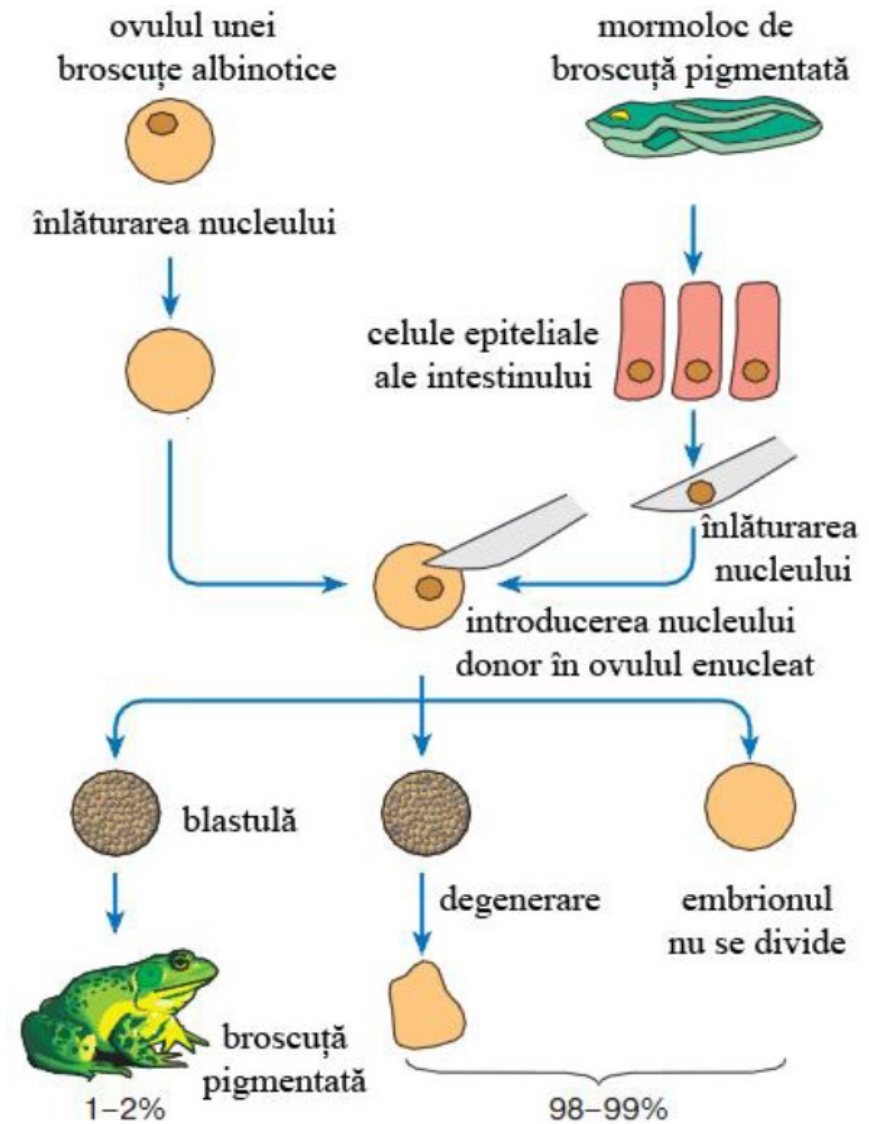
2.2 CLONARE PRIN TRANSFER DE NUCLEE/ SCNT (somatic cell nuclear transfer)

Clonarea la broasca sud-africană *Xenopus laevis* prin transferul de nuclee din celulele epiteliale ale intestinului de mormoloc în ovule enucleate (John Gurdon, 1962)

Ulterior s-a constatat că nucleele embrionilor de oaie, la stadiul de dezvoltare de **16 celule**, își păstrează totipotența. În anul 1989 L. Smith și I. Wilmut au **transplantat nuclee dintr-un embrion din 16 celule în ovule enucleate de oaie** și au obținut 2 miei vii.

Mai târziu, în anii 1993-1995, au fost obținute 5 oi-clone, prin **transplantare de nuclee din celule embrionare cultivate *in vitro***, în ovule enucleate [10].

Autorii au concluzionat: embrionii la stadiul de 16 celule sau liniile de celule embrionare cultivate *in vitro* reprezintă cei mai buni donori de **nuclee totipotente**.



Reprezentarea schematică a experienței de clonare la broasca *Xenopus laevis*

Principiul transferului de nuclee din celule somatice în ovule anucleate

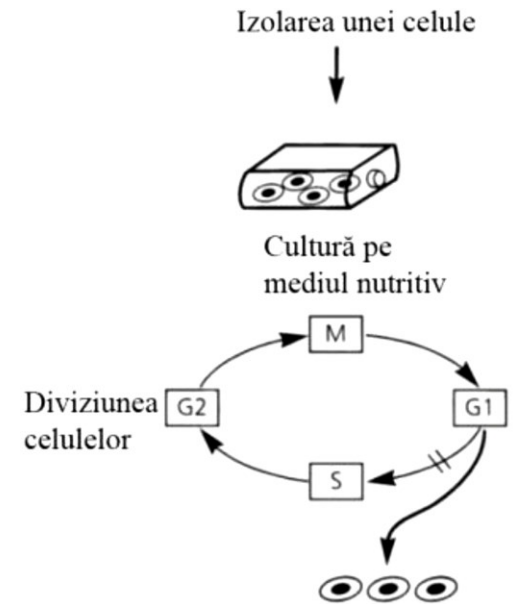
În anul 1997, **J. Wilmut, G. Bulfield, A. Colman** au realizat un transfer de informație din **celulă somatică provenită din glanda mamară** a unei oi din rasa **Finn Dorset** într-un ovul nefecundat de la o oaie din rasa **Scottish Blackface**, căreia i s-a eliminat nucleul.

1. Celule diferențiate din epiteliul glandei mamare a unui organism adult din rasa **Finn Dorset** au fost multiplicat *in vitro* fiind menținute în starea G_0 prin introducerea inhibitorilor creșterii celulare

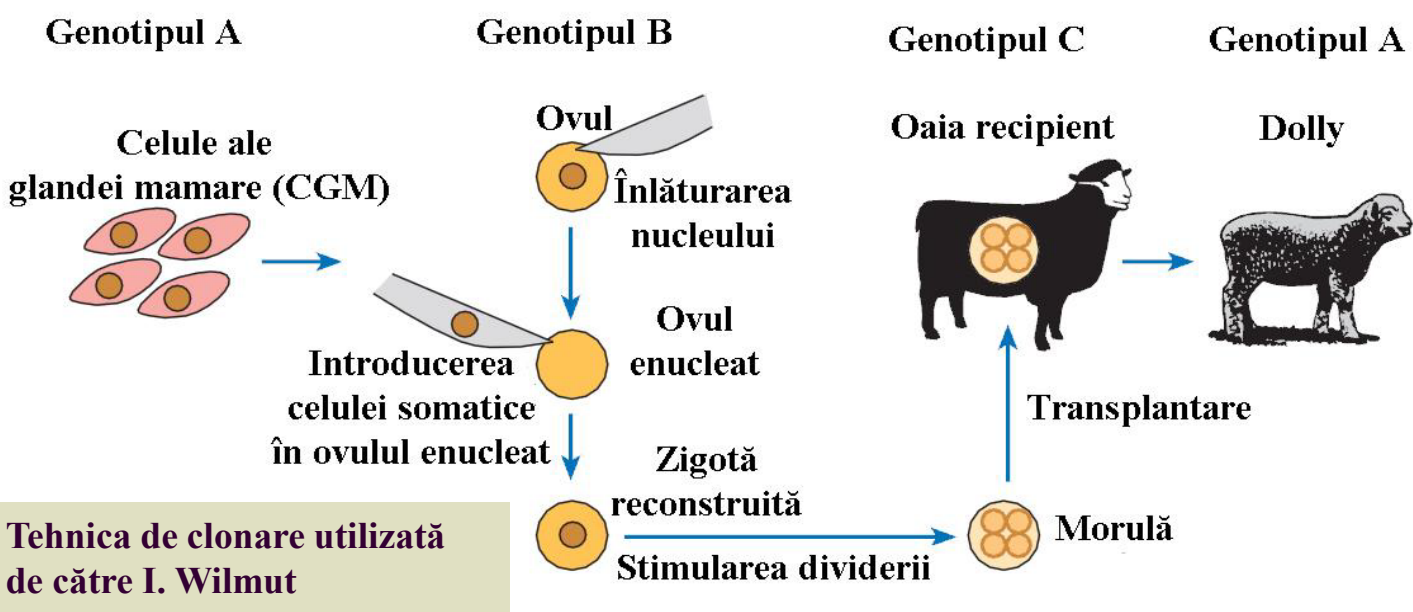
2. Se obțin ovule anucleate derivate de la **Scottish Blackface**, care în prezență de celule provenite din țesutul glandei mamare **Finn Dorset** fuzionează, proces mediat de impulsuri electrice slabe. *Ovulul cu nucleu străin ulterior poate fi cultivat in vitro sau oviducte legate până la o etapă embrionară timpurie înainte de a fi implantat în uterul unei mame adoptive/surogat*

3. Peste 6 zile embrionul obținut, care conținea informația genetică din nucleul oii-donor **Finn Dorset**, a fost implantat în uterul unei oi adoptive din rasa **Blackface**. La terminarea perioadei de gestație s-a obținut un miel genetic similar cu oaia-donor a celulei.

!!! Au fost transferate nuclee din celule ale glandei mamare un 277 de ovocite, dintre care doar 29 au ajuns la stadiul de morulă sau blastocist și au fost transferate în uterul altor oi, și dintre acestea doar 1 din cei 29 de embrioni transferați în faza timpurie a dat naștere la un organism normal.



Izolarea unor celule diploide din glanda mamară a unei oi și cultivarea acestora *in vitro*



Tehnica de clonare utilizată de către I. Wilmut

Dolly cu mama surrogat
Dolly a trait 6 ani (2003) în timp ce ovinele normale trăiesc până la 12 ani.



Dolly cu primul nou născut, Bonnie

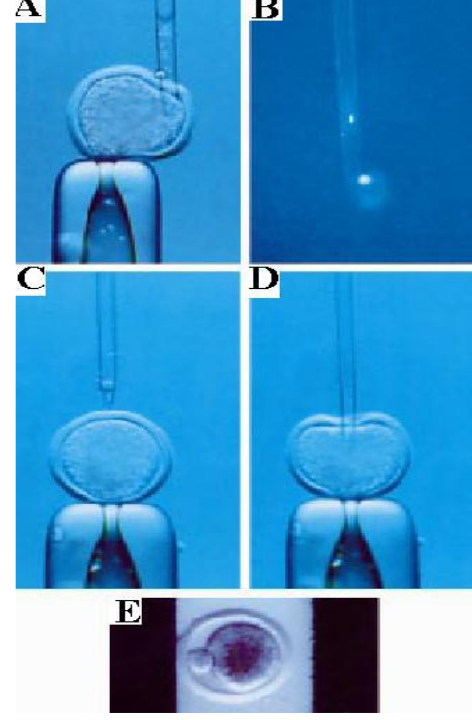


Fig. 5.14. Tehnica de clonare utilizată de către I. Wilmut
A – înlăturarea nucleului din ovul; B – controlarea procesului de enucleare, prin iluminare cu raze ultraviolete; C, D – transferul nucleului în ovulul enucleat; E – fuzionarea prin impuls electric a nucleului celulei somatice cu ovulul enucleat.

Importanța deosebită a acestei metode constă în faptul că pentru clonare se folosesc cellule diferențiate de la un organism adult pentru a fi transplantate în celule în stare de totipotență. **Din punct de vedere practic, metoda prezintă avantajul că se pot astfel obține copii genetice de la un organism adult cu caractere fenotipice cunoscute de amelioratori.**

Alte experimente de clonare a șoarecilor efectuate de un grup de embriologi sub conducerea lui Yanagimachi (SUA) au avut ca scop optimizarea metodei de clonare folosită de către I. Wilmut. Astfel, nu a fost **aplicată stimularea electrică a fuzionării** celulei somatice donor cu ovulul anucleat.

A confecționat o micropipetă cu ajutorul căreia se putea extrage nucleul dintr-o celulă somatică fără a-i provoca leziuni. Ulterior nucleul era introdus într-un ovul anucleat. Plus la aceasta, s-au folosit nuclee donor din celule somatice mai puțin diferențiate, aflate în vecinătatea ovocitului – *cumulus oophorus*, celule Sertoli din testicule și neuroni.

După introducerea nucleelor celulelor somatice în ovulele anucleate, dezvoltarea zigotului era stimulată prin plasarea acestuia într-o soluție specială *HEPES-CZB*, **lipsită de calciu** cu adaos de stronțiu și citohalazină. **Stronțiu** activează ovulul, iar citohalazina inhibă formarea nucleelor polari.

Embrionii erau cultivați până în stadiul de 2-8 celule-morulă sau blastulă, apoi transplantați în uterul unor femele receptoare.

Circa 15% din embrionii implantați în uter își continuau dezvoltarea. Numărul de șoriceci clone născuți era foarte redus, cca. 2-3 %.

Pentru clonare se pot utiliza și culturi celulare transformate genetic *in vitro*

**Ryuzo
Yanagimachi cu
șoareci clonați**



!!! Obținerea animalelor transgenice - prin clonare reproductivă cu nuclee din celule transformate genetic.

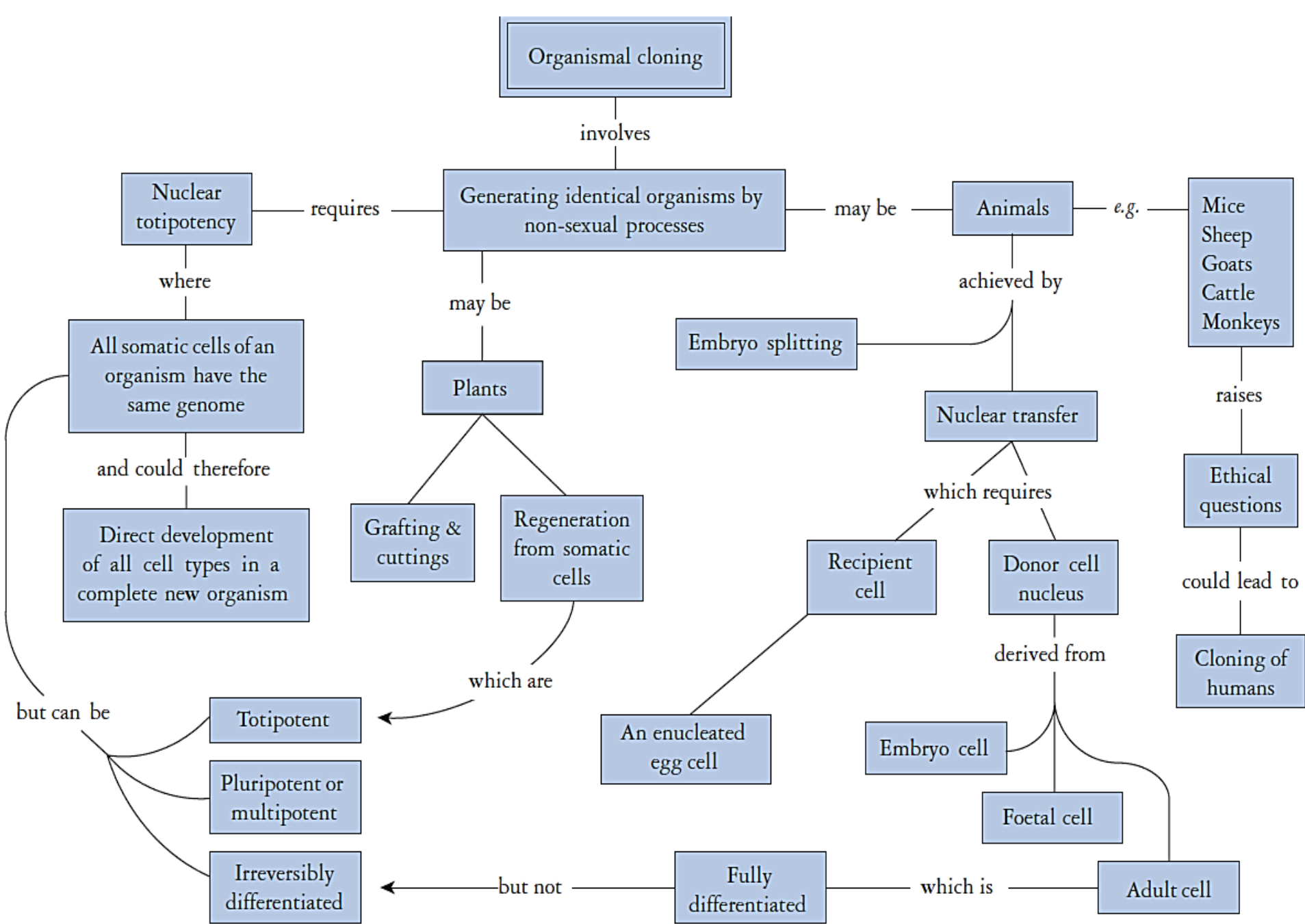
În concluzie:

- dezvoltarea embrionilor din celule cu nucleu străin/transferat este indusă prin tratamente chimice.
- embrionii sunt cultivați *în vitro* pentru a le testa viabilitatea, apoi sunt transferați chirurgical (mai mulți) în uterul mamei surogat.

A fost constatat că, în aproximativ o treime din cazuri, organismele clonate, la naștere, sunt mai mari decât în mod normal, fenomen numit *sindromul descendenților cu dimensiuni mari* / large offspring syndrome.

A fost realizată clonarea unui șir de organisme, inclusiv pisici, șoareci, capre, vite, iepuri, cai, măgari, maimuțe etc.

Experiențe de clonare a embrionilor umani prin scindarea embrionilor a fost raportat încă din a.1993, deși majoritatea oamenilor de știință consideră că procedura de clonare prin transfer de nucleu la oameni **nu trebuie încercată (codul de etică a cercetărilor)**. ??



3. OBȚINEREA ANIMALELOR TRANSGENICE

Transferul genelor poate fi realizat *in vivo* fie în celule somatice, fie în celule germinale. Procesul se numește **terapie genică** în primul caz și **transgeneză** în al doilea. Scopurile acestor proceduri sunt diferite, la fel ca și instrumentele folosite pentru a le realiza.

Genotipul organismului nu este modificat în terapia genică, în timp ce **transgeneza este utilizată pentru a genera organisme modificate genetic**.

Generarea animalelor transgenice este una dintre cele mai complexe aspecte ale ingineriei genetice, atât în ceea ce privește dificultatea tehnică, cât și în problemele etice care apar.

Dezbaterile cu privire la utilizarea tehnologiei MG sunt mai intense în ceea ce privește animalele transgenice și ridică adesea probleme legate de viața animalelor, precum și aspectele de modificare genetică ale tehnologiei.

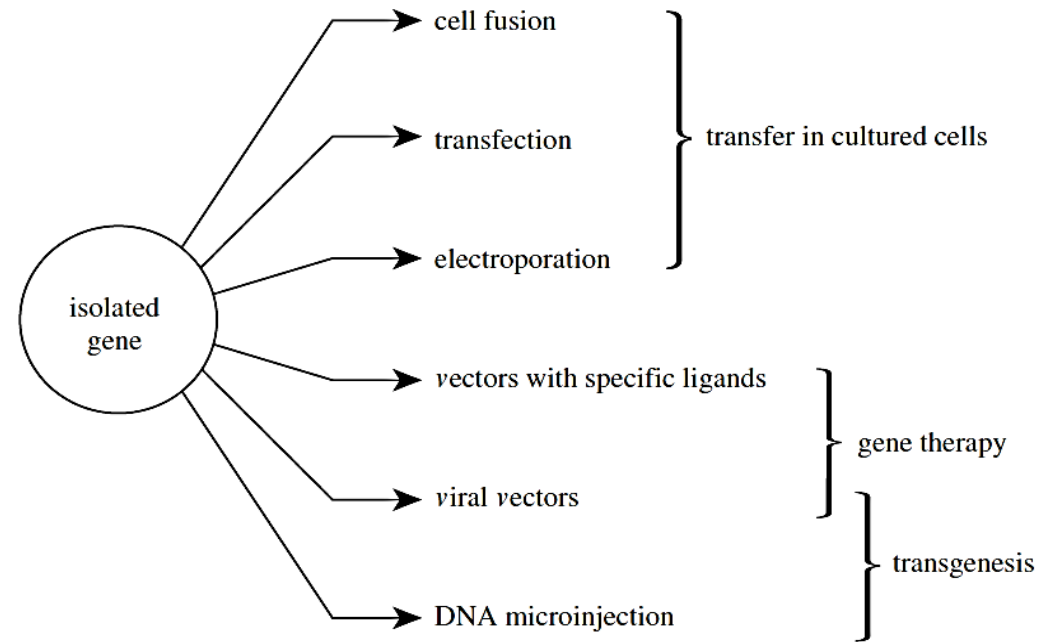


Figure 1.4 Different methods of gene transfer into animals cells

Metodele de obținere a animalelor transgenice

METODE FIZICE

- Microinjectare
- Electroporare (pentru zigoți, spermatozoizi)
- Biolistic
- Mediat de lipozomi

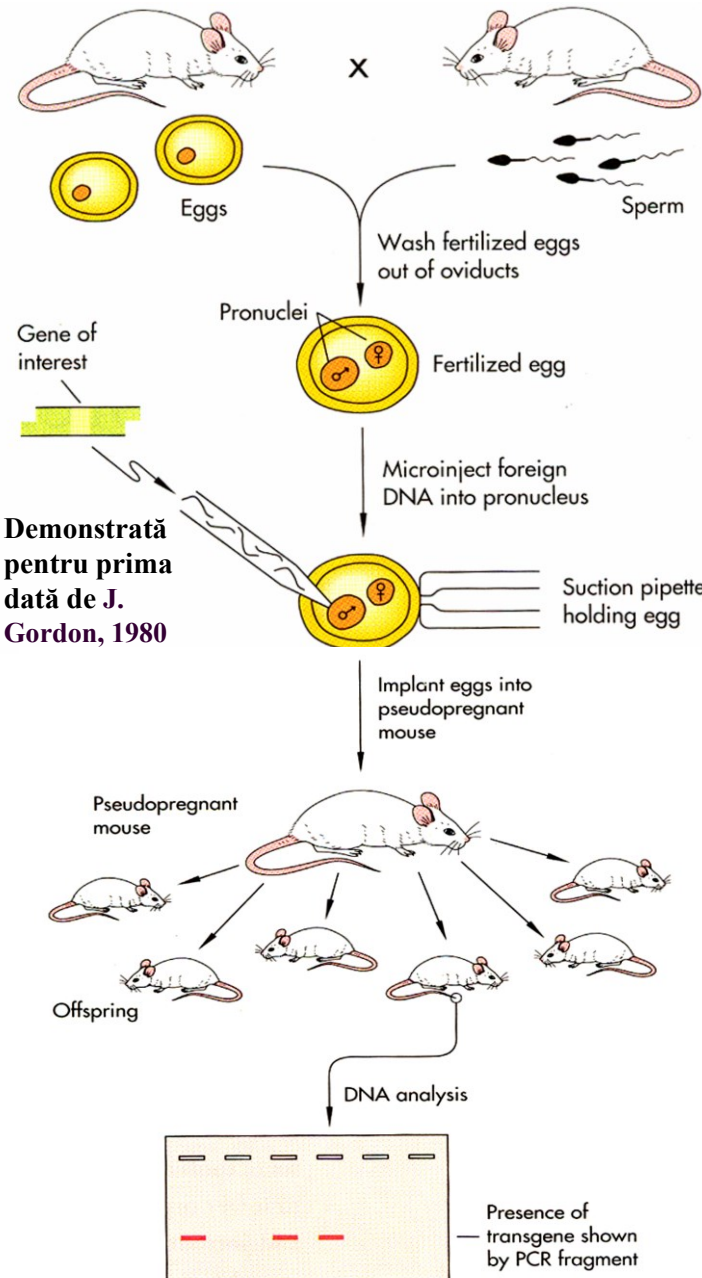


METODE BIOLOGICE

- Mediat de vectori virali adenovirusuri/retrovirusuri
- Transfer mediat de celule embrionare stem (CES)
- Transfer de nuclee de la celulele transformate genetic în ovule anucleate (obținerea AMG prin clonare reproductivă)



3.1. MICROINJECTARE DE GENE ÎN OVULUL FECUNDAT - una din cele mai utilizate metode pentru crearea animalelor transgenice



Principiul

ADN-ul exogen este injectat în pronucleul masculin înainte de formarea nucleului zigotului. Cel mai înalt grad de integrare a transgenei în genom se realizează când zigotul se află la începutul sau la mijlocul fazei G1 a primului ciclu celular (cca 20 de ore după fecundare, la mamifere).

Rezumat al etapelor de obținere a AMG prin microinjectare

1. Se utilizează femele donatoare și acceptoare de celule din rase diferite cu caracteristici specifice distincte
2. Obținerea ovulelor pentru injectarea de ADN (*se stimulează ovulația cu hormoni, ulterior se fertilizează ovulele in vitro*)
3. Microinjectarea alogenei/constructului genetic în **pronucleul masculin al ovulului fertilizat**
4. Zigoții sunt menținuți *in vitro* până la stadiul de blastocist
5. Implantarea blastocistilor în uterul unor femele receptoare
6. Testarea animalelor născute pentru confirmarea prezenței transgenei în genom prin analize moleculare. *Animale care se dezvoltă din embrionii implantați, de regulă, sunt heterozigote/himizigoți (transgena se conține doar într-un singur cromozom omolog dintr-o pereche) și prezintă mozaicism (nu toate celulele și țesuturile animalului conțin transgena)*
7. Încrucișarea anim. transg. pentru obținerea descendenților homozigoți

Cercetările efectuate la **animalele de fermă** au demonstrat că 1 **animal transgenic** se obține în rezultatul microinjecției a 200 de ovule fertilizate, ceea ce este o frecvență de 10-15 ori mai redusă față de experiențele pe șoareci.

Se evaluează doi parametri principali ai transgenezei:

gradul de integrare a transgenei în genom și **eficiența transgenezei**.

- ❑ **Gradul de integrare a transgenei** - reprezintă numărul de animale transgenice în raport cu numărul total de animale născute. Acest parametru la șoareci constituie 15%, la iepuri – 10%, la porci variază între 10-15%, la bovine și caprine – 5-10%).
- ❑ **Eficiența transgenezei** - reprezintă numărul animalelor transgenice raportat la numărul total de embrioni implantați (la șoareci – 2%, la iepuri – 1%, la ovine și caprine – 0,5-1%, la porcine și bovine – 0,5%).

Metoda de microinjectare a ADN-lui este folosită și la diferite specii de pește – **carp, păstrăv, nisetru etc.** Întrucât la pești pronucleul în ovulul fertilizat se depistează foarte greu la microscopul obișnuit, ADN transgenic linear se introduce în citoplasma ovulelor fertilizate și nu în nucleu ca la mamifere. Enzimele care distrug ADN sunt mai puțin active la vertebratele inferioare.

Viabilitatea embrionilor de pești obținuți în rezultatul microinjectării este destul de ridicată, iar frecvența descendenților transgenici variază între 10-70%.

Exemplu,

la păstrăv, somon s-au realizat microinjectări în ovul a genei pentru hormonul uman de creștere HGH (*HGH* – *human growth hormone*). S-a constatat că cca. 20% din ovulele injectate erau transgenice, iar atât peștii transgenici din prima generație, cât și cei din generațiile următoare aveau un ritm de creștere mai intens.

Somonii transgenici de un an, cântăreau de 11 ori mai mult, decât formele de control netransformate.

Păstrăvi/somon transgenici cu gena HGH



CONCLUZII

- ADN-ul alogen se va integra în genomul gazdă randomizat și sub formă de concatemi;
- Alogenele se transmit la descendenți în mod mendelian;
- Expresia transgenei va varia datorită efectului de poziție în cromozom, numărul de copii;
- Gradul de expresie al genei străine integrate depinde de prezența unor elemente reglatorii specifice, de prezența unor factori reglatori specifici celulari și este influențat de gradul de diferențiere a țesutului;
- Poate determina rearanjamente genice;
- Este laborioasă și costisitoare.

<https://www.youtube.com/watch?v=YhFkylhJEQg>

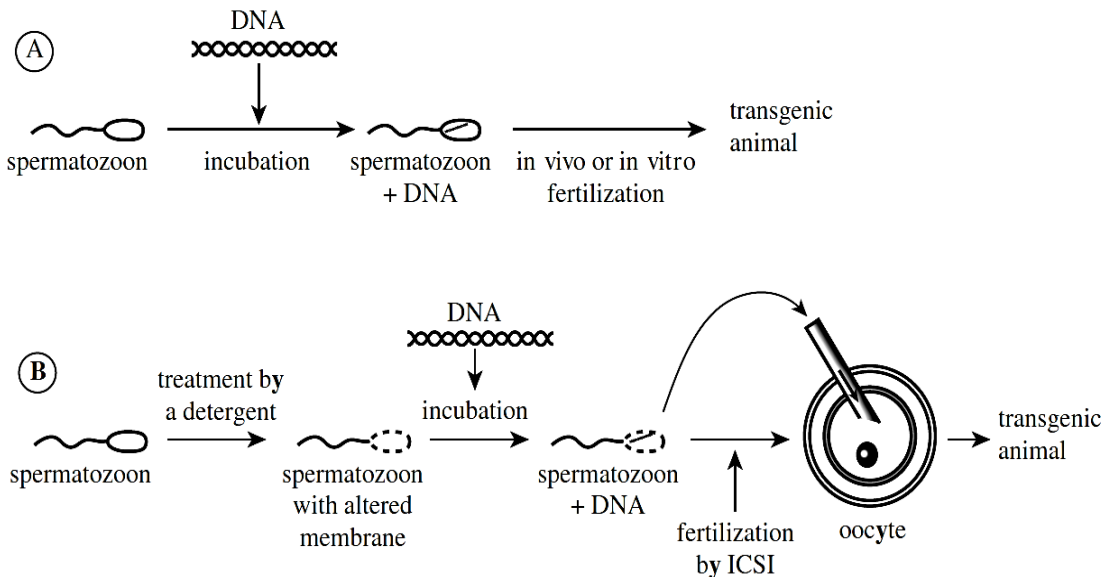
Microinjection of Zebrafish Embryos

3.2. TRANSFER DE GENE MEDIAT DE SPERMATOZOIZI

În calitate de vectori naturali care transportă ADN exogen în celule pot fi folosiți spermatozoizii. În anul 1971 a fost demonstrată posibilitatea transferului de ADN al virusului SV40 în ovulele iepurilor după însămânțarea artificială cu spermă, în prealabil, incubată cu ADN. **Spermatozoizii permit pătrunderea ADN liniar și acumularea în nucleu.** Prezența ADN-lui exogen a fost depistată la 60-70% dintre spermatozoizii tratați cu ADN *in vitro* și *in vivo*.

Metoda transferului de gene mediat de spermatozoizi (SMGT – Sperm Mediated Gene Transfer) a fost dezvoltată pe șoareci. Cca 30% dintre șoarecii obținuți după fertilizarea *in vitro* a ovulelor cu spermă tratată cu ADN au fost transgenici și transmiteau transgena prin ereditate descendenților. Această metoda **este mai eficientă în obținerea porcilor transgenici.**

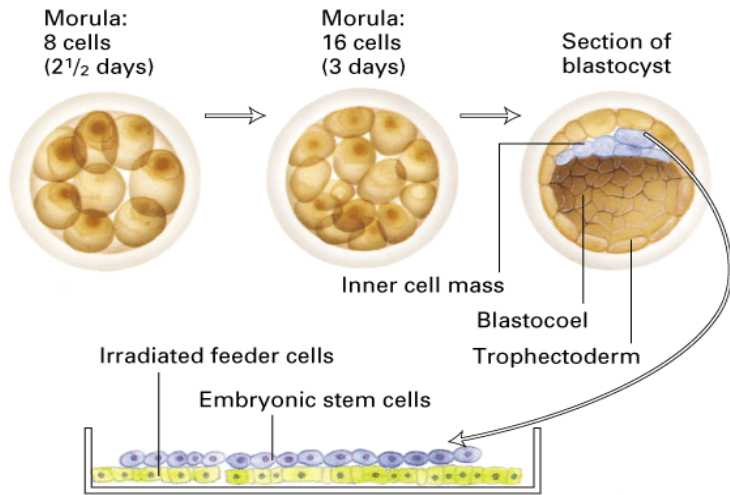
Pentru a facilita pătrunderea ADN-lui exogen în nucleul spermatozoizilor se recurge la optimizări, de ex.: *injectarea ADN-lui în testicule, canalele seminale și vezicula seminală; injectarea ADN-lui în canalele seminale urmată de electroporare.*



Transfer de gene prin spermatozoizi.

- (A) Spermatozoizii sunt incubati cu ADN și utilizați pentru fertilizare *in vivo* sau *in vitro*. Această metodă nu este deosebit de eficientă pentru generarea de animale transgenice și genele integrate sunt de obicei inactivate prin rearanjarea ADN-ului
- (B) Membrana spermatozoidală este deteriorată cu un detergent slab. ADN-ul străin intră liber în spermă, care este folosită pentru fertilizarea *in vitro* folosind ICSI (injecție intra-citoplasmică de spermă)

3.3. Transfer de gene mediat de celule embrionare stem (CES)



CULTURI DE CELULE EMBRIONARE STEM (CES)

Proprietăți

- ☐ Pot fi cultivate *in vitro* în cantități nelimitate
- ☐ Nu prezintă caracteristici de senescență

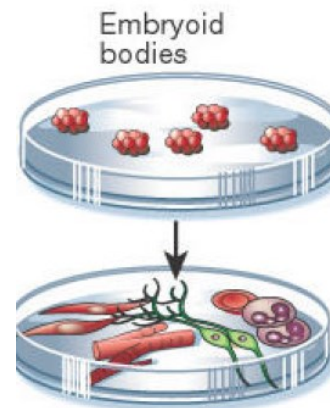
CES spontan se pot diferenția pe medii de cultură
În lipsa factorului de inhibare
LIF

Animale transgenice se pot obține și prin utilizarea liniilor celulare transformate genetic

În acest scop pot fi folosite atât **celule CES**, cât și **celule somatice cultivate *in vitro***

1. Celule embrionare stem - sunt extrase din embrioni în stadiul de blastocist
2. Celule stem zonale – extrase din organele organismelor adulte sau din organele embrionilor din stadii mai târzii de dezvoltare

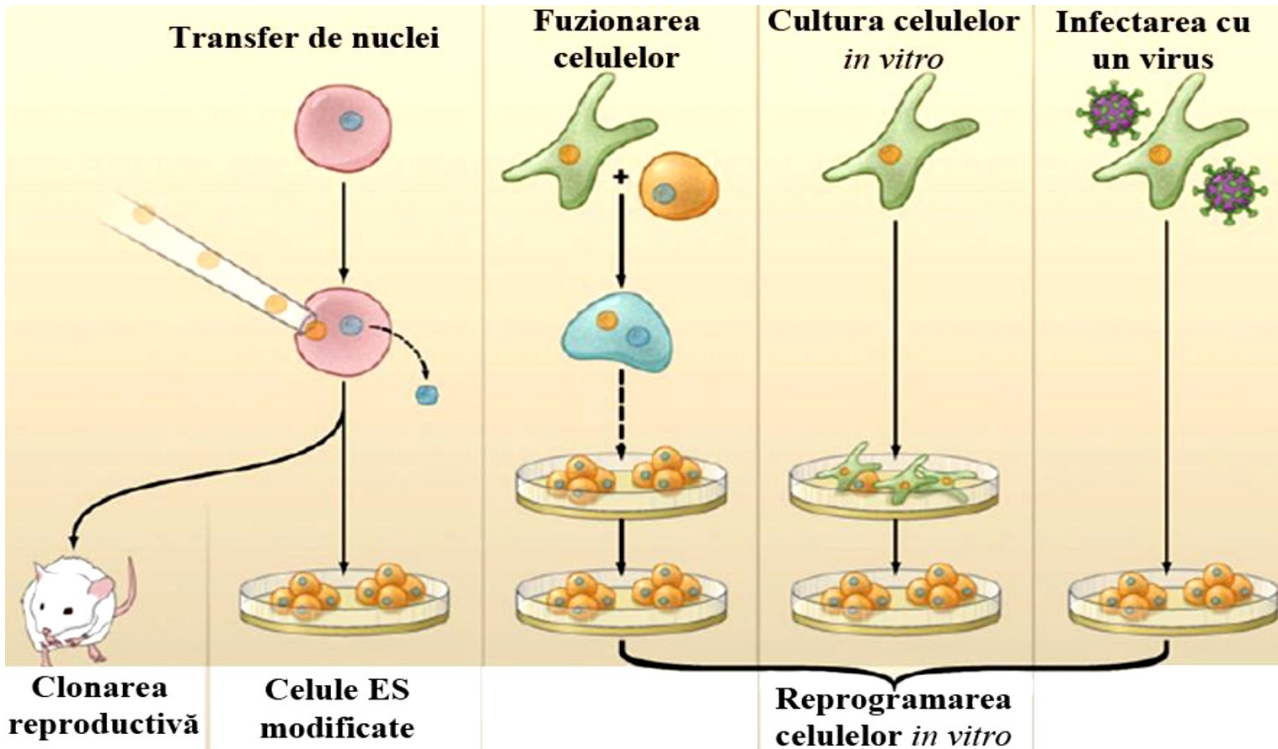
LIF (leukaemia inhibitory factor)
menține CES în stare
nediferențiată



- LIF

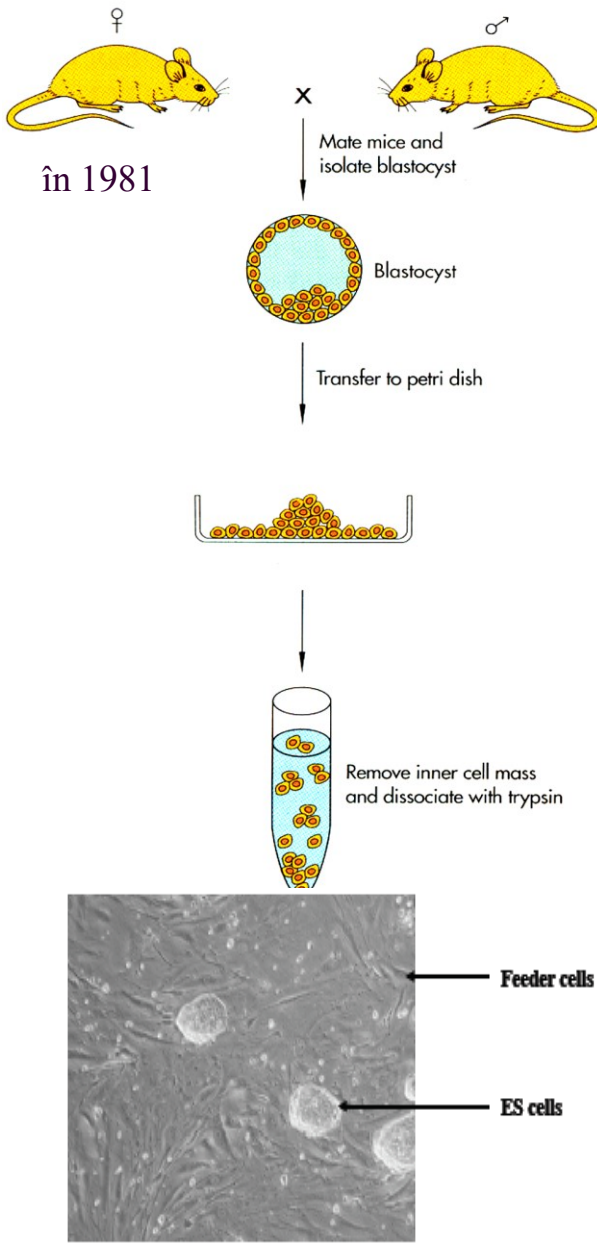
În prezent sunt patru strategii principale folosite pentru reprogramarea celulelor somatice diferențiate în celule pluripotente

1. Transferul de nuclee din celule somatice în ovule anucleate (*SCNT* – *somatic cell nuclear transfer*). Dacă ovulele obținute sunt implantate în uterul unor femele receptoare se pot obține clone (clonare reproductivă). **Dacă ovulele respective se cultivă *in vitro* se pot obține CES.**
2. Fuzionarea celulelor somatice cu celule ES și obținerea unor hibrizi celulari care au toate caracteristicile celulelor ES pluripotente.
3. Cultivarea celulelor somatice *in vitro* permite selectarea unor linii celulare care pot fi pluripotente sau multipotente. De ex. celulele stem ale testiculelor (spermatogoniile) derivate de la animale pot fi transformate *in vitro* în sursă de celule pluripotente.*
4. Transferul mediat de vectori retrovirali în celulele somatice a unor factori de transcripție specifici care inițiază procesul de reprogramare a celulelor somatice în celule pluripotente.

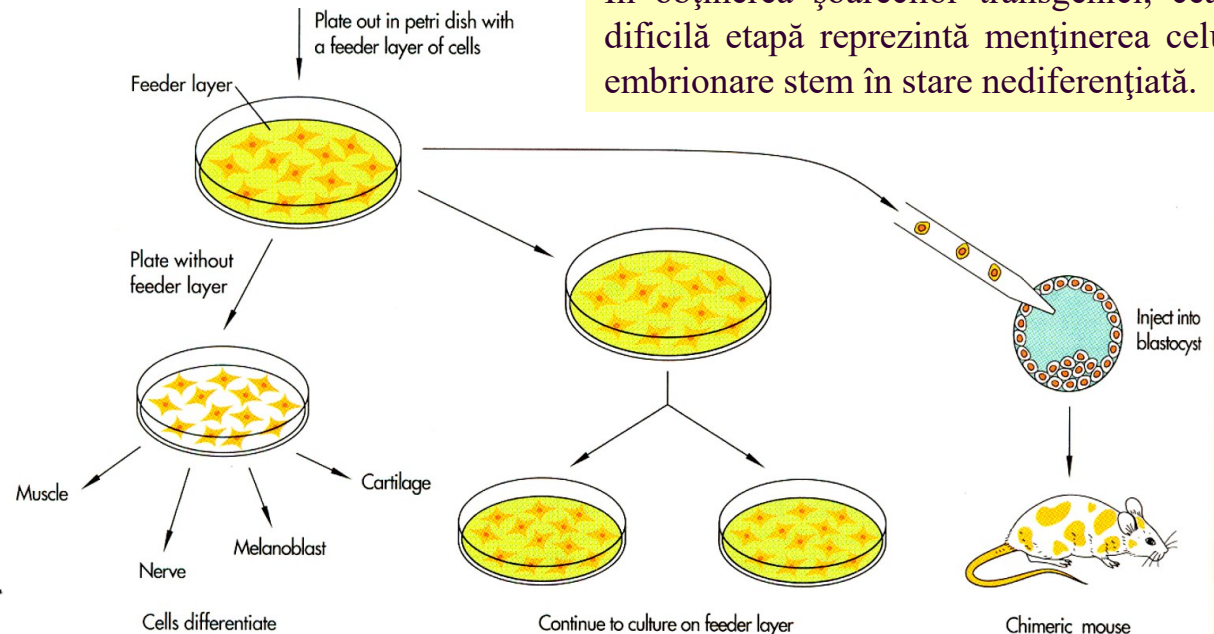


*** Guan K et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*. 2006 Apr 27;440(7088):1199-203. doi: 10.1038/nature04697. Epub 2006 Mar 24. PMID: 16565704.

Etapele metodei de transfer de gene mediat de CES



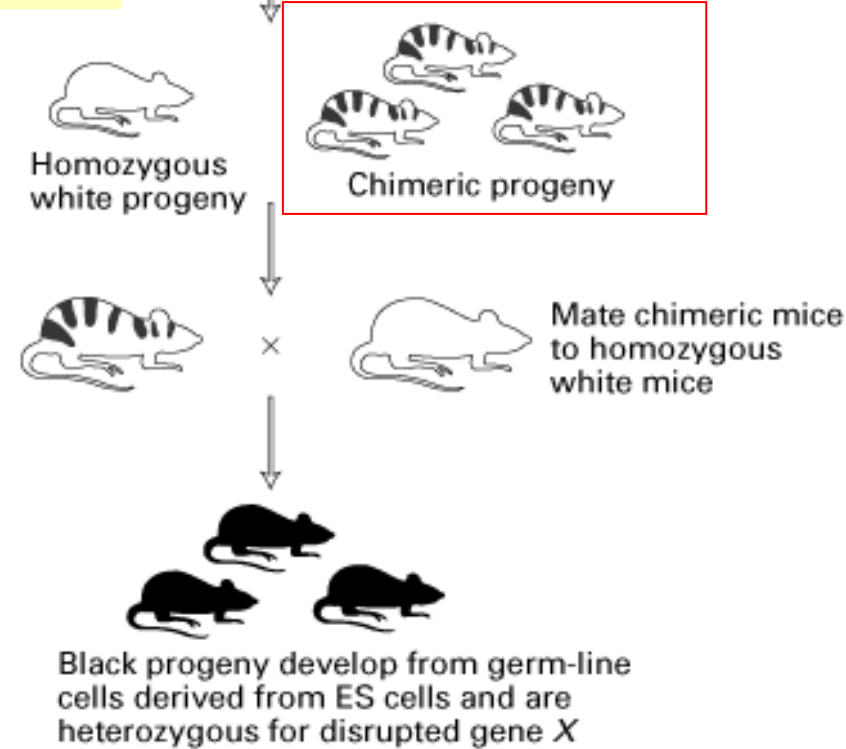
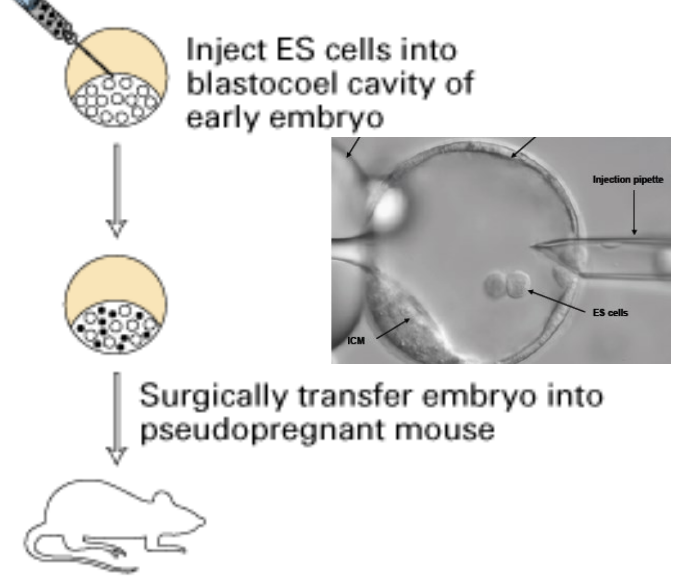
1. Obținerea culturii CES din celule interne ale blastocistului
2. Introducerea în celulele embrionare stem a construcției genetice cu gena marker. Transformarea genetică a CES prin electroporare sau injectare
3. Analiza coloniilor de CES transgenice (insert /copii) și selectarea acestora
4. Introducerea CES modificate genetic în blastociști receptori, izolați de la animale care se deosebesc după culoare sau alte caractere
5. Implantarea blastocistilor în uterul femelelor receptoare și obținerea embrionilor himeri
6. Analiza descendenților



În obținerea șoarecilor transgenici, cea mai dificilă etapă reprezintă menținerea celulelor embrionare stem în stare nediferențiată.

Celulele embrionare stem, introduse în cavitatea blastocistului, pot da naștere la orice tip de țesuturi și organe, **inclusiv și la celule germinale și astfel sunt moștenite de șoarecii-himere.**

Animalele himere au în componența organismului atât celule care provin din blastocist (celule albe), cât și celule descendente din celulele embrionare transgenice (celule colorate în negru). Unii șoareci în general nu conțin celule transgenice (animale complet albe). Pentru încrucișări se selectează șoarecii la care procentul celulelor transgenice este cel mai mare (șoarecii aproape în totalitate de culoare neagră). E de dorit ca animalul selectat să fie mascul, întrucât de la acesta se poate obține un număr mare de descendenți.

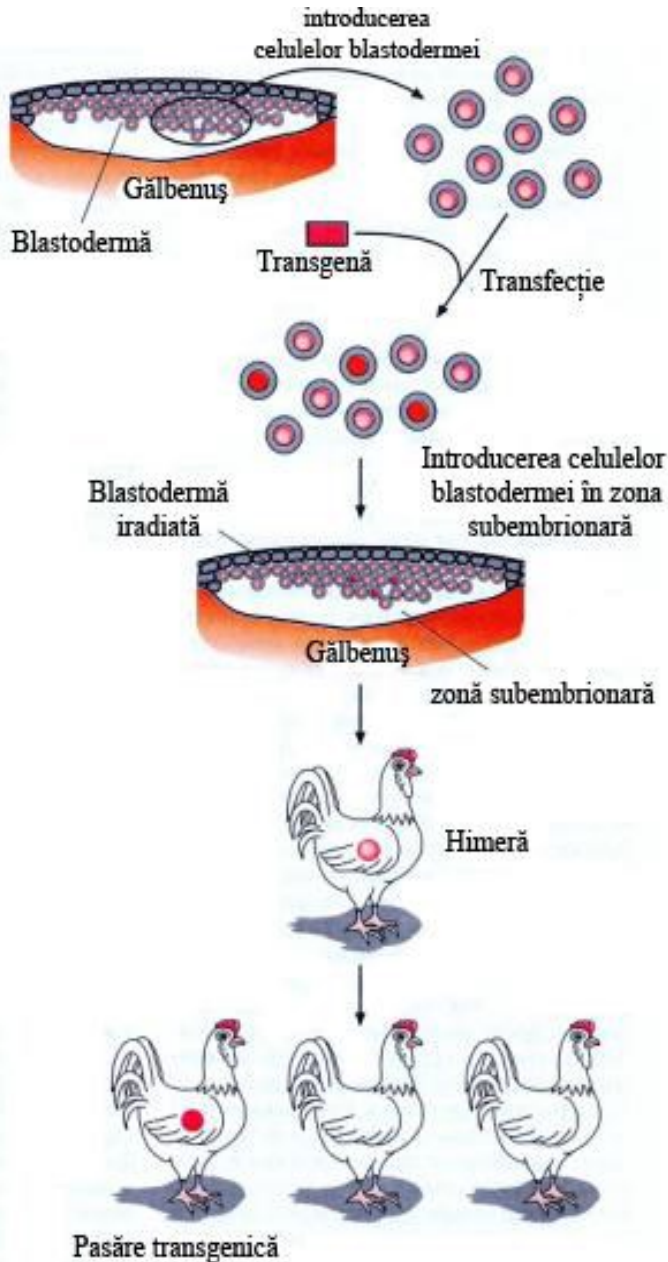


ANALIZA DESCENDENȚEI HIMERE – organismul conține celule care provin din blastocist și din CES transgenice.

Se selectează, pentru încrucișări, șoarecii la care procentul de celule transgenice este cel mai înalt.

Hibridizare: masculi himeri X femele albinoase

La păsări n-au fost identificate celule ES, dar păsări transgenice se pot obține prin folosirea celulelor embrionare recombinate.



Obținerea păsărilor transgenice prin transfecția celulelor izolate ale blastodermei. Transgena este introdusă în celule cu ajutorul lipozomilor:

- separarea celulelor blastodermei embrionului de pasăre;
- introducerea ADN-lui transgenic în celulele blastocistului cu ajutorul lipozomilor;
- reintroducerea celulelor transformate ale blastocistului în zona subembrionară a oului.

O parte din descendenți vor fi purtători ai celulelor organismului donor.

La unele organisme himere, celulele transformate pot forma linii embrionare și după câteva runde de încrucișări ale himerelor pot fi obținute linii de păsări transgenice.

Pentru a mări probabilitatea de obținere a himerelor purtătoare de transgene în celulele liniei germinale, numărul de celule donor poate fi mărit în urma iradierii embrionului recipient (540-660 rad/oră) înainte de transfecție. Sub acțiunea iradierii unele celule ale blastocistului pier, iar numărul de celule transformate se va mări în raport cu celulele recipientului.

Astfel de linii celulare CES transgenice au fost obținute și în cazul altor mamifere: hârciogi (1988), porcine (1990), ovine (1990), vite (1992), iepuri (1993), șobolani (1994), nurci (1992), maimuțe (1995) ...

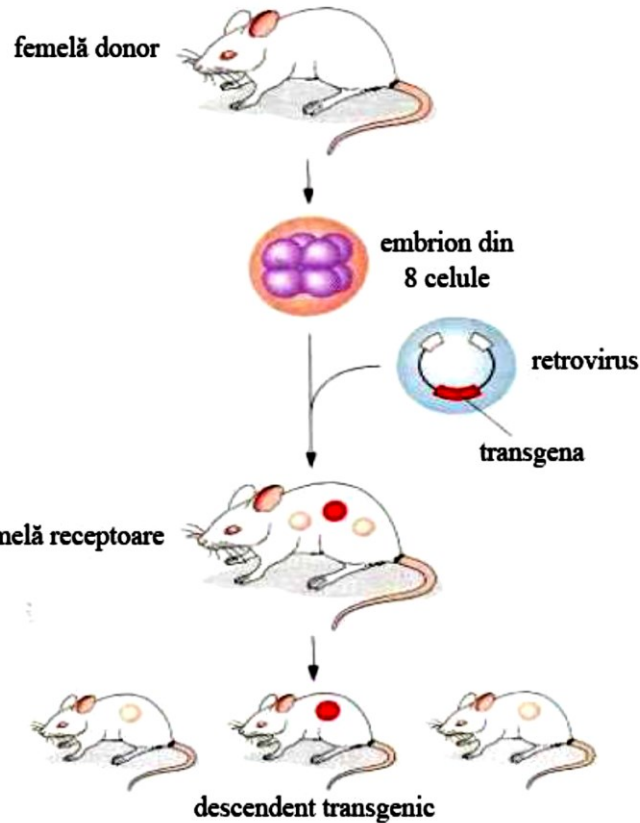
Pentru obținerea peștilor transgenici ADN-ul exogen se introduce în celulele embrionului alcătuit din 4 blastomeri. Embriogeneza are loc la pești în afara organismului, respectiv implantarea nu este necesară. Toate procesele ulterioare se pot desfășura în rezervoare în care poate fi reglată temperatura apei. Încrucișând pești transgenici, se pot crea linii transgenice.

Avantaje

- ❑ Spre deosebire de metoda care prevede microinjecția nucleului/ADN în ovulul fecundat, tehnologia de transfer de gene mediat de CES permite, încă la etapa cultivării celulelor, analiza inserării genei în genomul celulei și a numărului de copii integrate, iar în unele cazuri, verificarea expresiei transgenei. Prin urmare poate fi selectată linia de celule embrionare stem cu cele mai bune caracteristici.
- ❑ O parte din aceste celule pot fi crioconservate în azot lichid și păstrate un timp îndelungat pentru folosirea lor ulterioară în crearea animalelor transgenice.
- ❑ Pe lângă aceasta, spre deosebire de metoda microinjecției în ovulul fecundat, utilizarea celulelor embrionare stem permite manipulări genetice prin knock-out-ul unor gene, obținându-se astfel mutații specifice, care devin apoi obiectul cercetărilor experimentale.

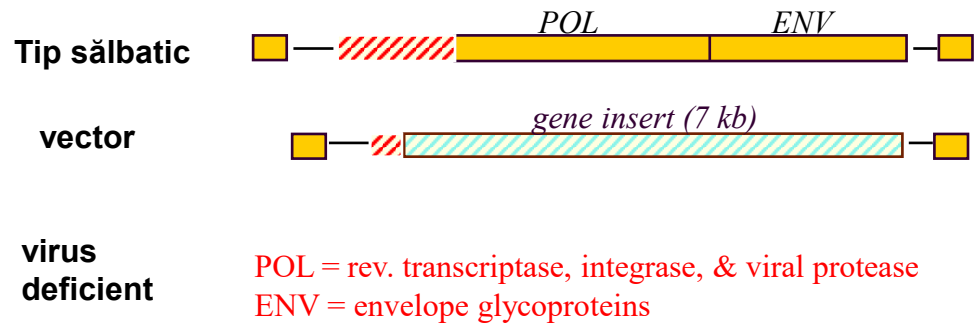
3.4. TRANSFER DE GENE MEDIAT DE VECTORI RETROVIRALI

O altă metodă de transfer a ADN-lui în liniile embrionare ale animalelor se bazează pe utilizarea retrovirusurilor



A fost demonstrată integrarea provirusului ADN al unui retrovirus MuLVs (*MuLVs – murine leukemia virus*) în genomul șoarecelui și transmiterea acestuia prin ereditate.

În construcția vectorului de transfer genele care codifică proteinele structurale ale retrovirusului (*pol, env*) sunt înlocuite cu alte gene de interes (spre exemplu, gena β -galactozidazei și gena rezistenței la neomicină).



Obținerea șoarecilor transgenici folosind vectori retrovirali

Embrionul în stadiul de 8 celule este infectat cu un virus recombinant, care conține transgena. Femelele cu embrioni implantați nasc șoricei transgenici.

Ulterior au fost obținute, păsări, bovine și alte animale transgenice prin intermediul vectorilor retrovirali, fiind demonstrată posibilitatea folosirii cu succes a metodei respective în transferul de gene la animalele domestice.

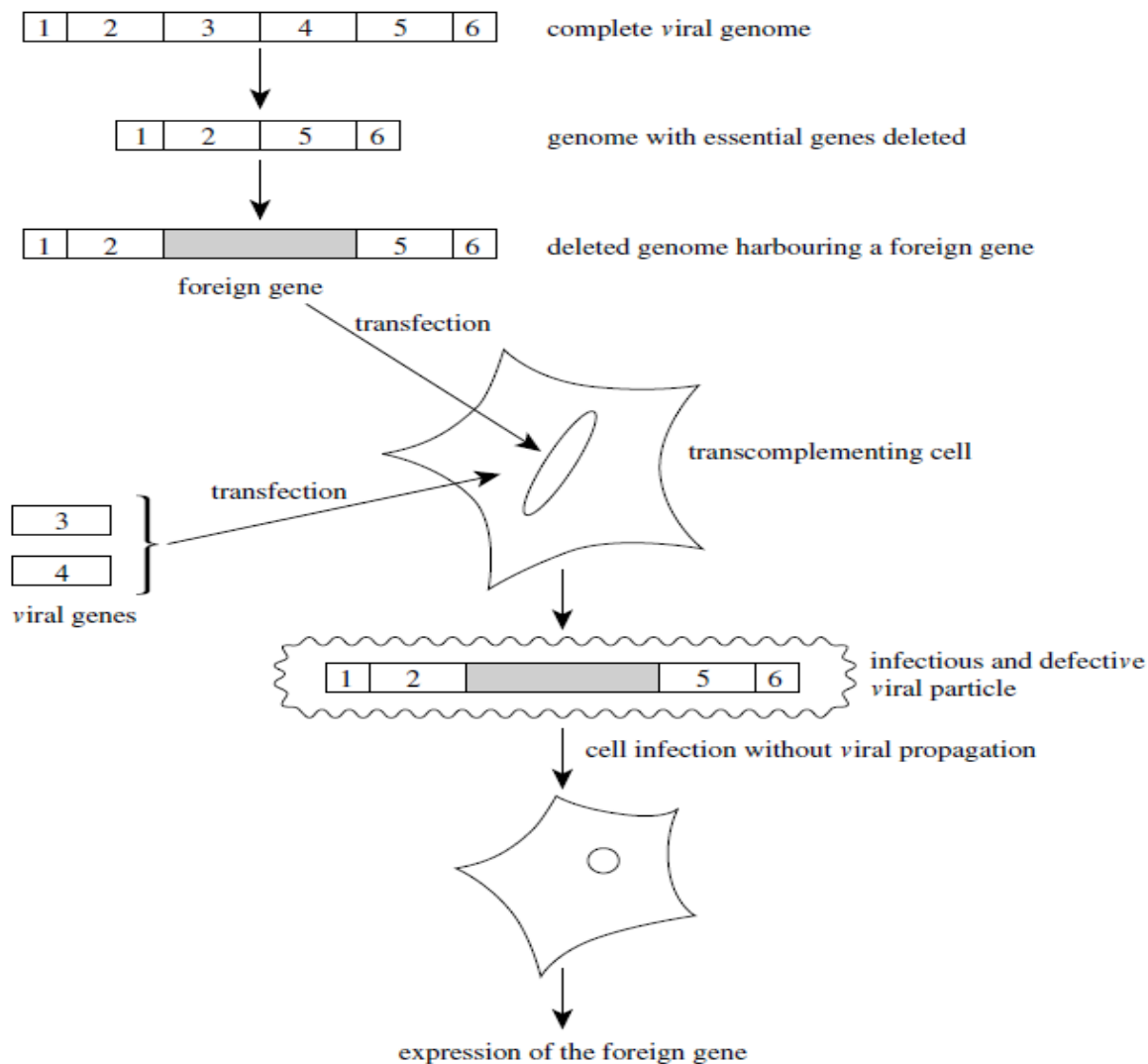


Figure 1.5 Principle of viral vectors. Genes required for virus propagation are removed and replaced by foreign genes of interest. A defective viral genome has to be complemented by a wild virus or by transcomplementing cells that synthesize the proteins coded by the genes deleted from the viral genome. The viral particles produced by the cells may infect cells and transfer their genes without propagating

Virusuri – eficiență înaltă de pătrundere în celulele animale *in vitro/in vivo*

Avantajul utilizării retrovirusurilor în calitate de vectori pentru obținerea animalelor transgenice, constă în faptul, că 100% din embrionii tratați pot fi infectați cu retrovirusuri.

Unul din dezavantajele vectorilor retrovirali constituie capacitatea lor limitată (mărimea fragmentului inserat nu trebuie să depășească 8 mii pb).

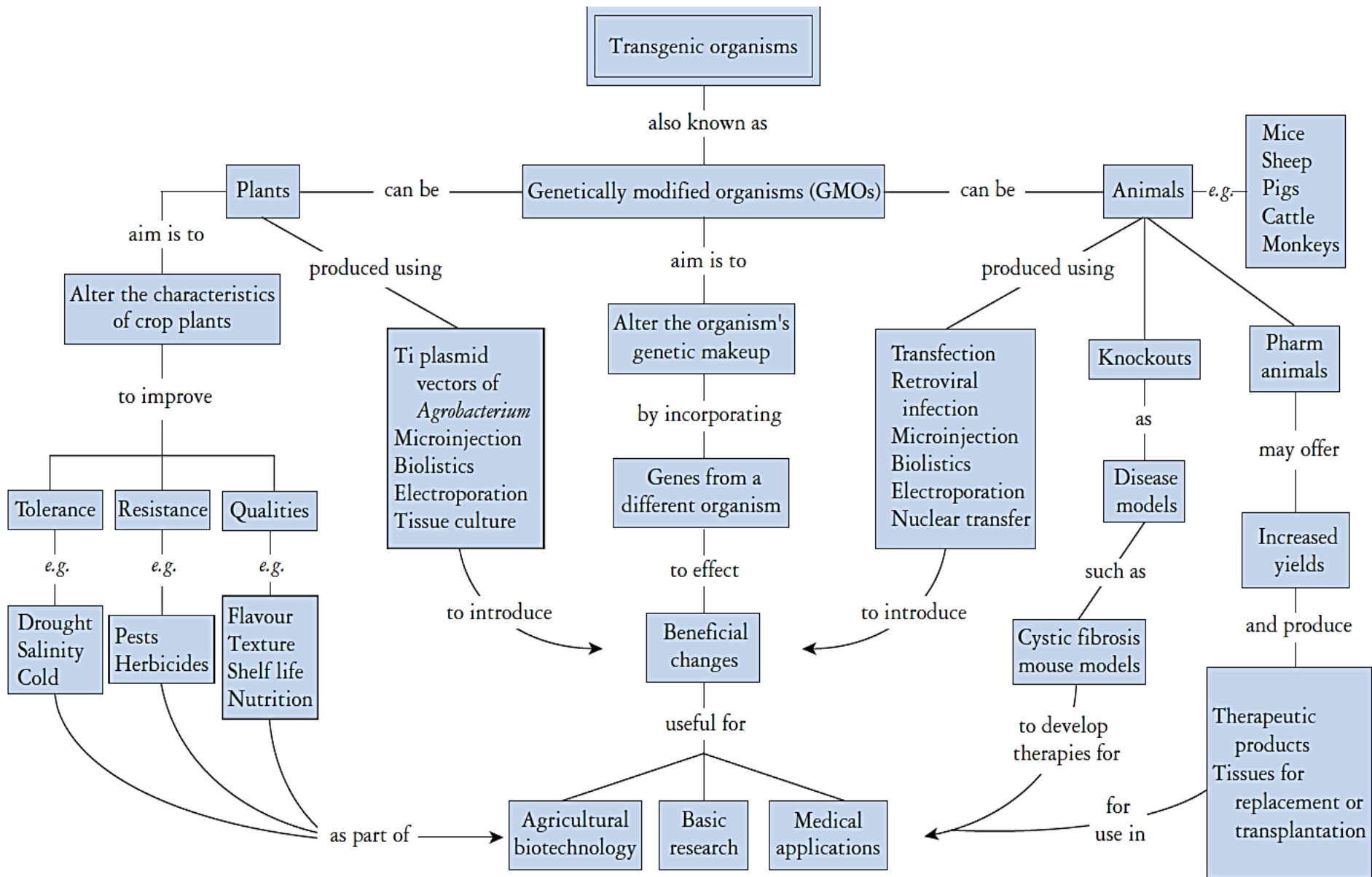
Expresia transgenelor *in vivo* poate fi inhibată ca urmare a inactivării promotorilor virali în celule de către α - și γ - interferoni.

Această problemă poate fi soluționată prin includerea în construcția retrovirală a unor promotori specifici sau alte elemente reglatoare - precum situsul intern ribosomal IRES (*IRES – internal ribosome entry site*) o secvență specifică de nucleotide cu lungimea de câteva sute de pb. Secvența *IRES*, identificată pentru prima dată în genomul picoranovirusurilor, permite ribosomului eucariot să realizeze translația ARNm policistronic.

Alt neajuns al transferului de gene pe bază de retrovirusuri îl constituie posibilitatea activării oncogenelor celulare.

https://www.youtube.com/watch?v=VYKS9EWmX_0

What are viral vector **vaccines** and how do they work?



Himeră - un organism sau un țesut care conține cel puțin două seturi diferite de ADN, cel mai adesea provenind din fuziunea a cât mai mulți zigoti. **Himerele se disting de mozaicism**, organisme care conțin populații de celule diferite din punct de vedere genetic, **provenite dintr-un singur zigot**, și **de hibridi** - organisme care conțin populații de celule identice din punct de vedere genetic provenite dintr-o încrucișare a două specii diferite.

Diferite tipuri de himere animale: **himerele dispermice** și gemene, **microhimerele** și **himerele partenogenetice și androgenetice**.

În himerele dispermice, două ovule care au fost fertilizate de doi spermatozoizi fuzionează împreună, producând un așa-numit **individ tetragametic** – 4 gameți (**în condiții normale, în absența fuziunii zigotului, două ovule fertilizate duc la producerea de gemeni dizigoți**). Diferite țesuturi ale himerelor tetragametice sunt formate din celule derivate din unul sau ambii zigoti. *De ex., în timp ce un tip de țesut poate consta din celule de la un zigot, alte țesuturi pot consta din celule de la celălalt zigot sau pot fi compuse din celule ale ambilor zigoti.* **Semne ale himerismului tetragametic includ ochi care diferă ca culoare, culoarea mozaică a pielii și organele genitale externe ambigue, care este un semn al hermafroditismului (având atât organe reproducătoare masculine, cât și feminine).**

În cele mai multe cazuri, totuși, nu există simptome observabile de himerism tetragametic, iar afecțiunea este detectată numai prin analize genetice extinse atunci când testele standard, cum ar fi testul de histocompatibilitate preliminar transplantului de organe, dau rezultate neașteptate/obișnuite.

Când doi zigoti nu fuzionează, dar fac un schimb de celule/material genetic în timpul dezvoltării, **se produc doi indivizi sau himere gemene**, dintre care unul sau ambele conțin două populații celulare distincte genetic. Cele mai cunoscute exemple de **himerism gemeni** sunt **himerele de sânge**. Acești indivizi sunt produși atunci când se formează anastomoze de sânge (conexiuni) între placentele gemenilor dizigoți, permițând astfel transferul de celule stem între embrionii în curs de dezvoltare.

Microchimere umane sunt produse atunci când **celulele stem fetale** sau **celulele materne** traversează placenta (microchimerism fetal-matern) sau în urma **transfuziei de sânge** (microchimerism asociat transfuziei) **sau transplant de organe**. Semnificația fiziologică a microchimerismului este puțin înțeleasă. De exemplu, există unele dovezi privind asocierea cu răspunsurile imune de hipersensibilitate întârziate la fetuși și mame, alte studii au găsit asocieri între microchimerism și tulburări autoimune și boli de piele.

Alte tipuri de himere includ **himere partenogenetice și androgenetice**. Primul poate fi produs atunci când un ovul fertilizat generat prin partenogeneză (o formă de reproducere asexuată) fuzionează cu un zigot normal. **Partenogeneza în natură este, în general, limitată la plantele inferioare și la nevertebrate și este prevenită la mamifere prin amprentarea genomică (expresia genetică determinată parental)**. Cu toate acestea, himerele partenogenetice ale mamiferelor au fost dezvoltate experimental și sunt utilizate în mod obișnuit pentru studiul geneticii dezvoltării. ***În timp ce himerele partenogenetice umane par improbabile, oamenii de știință au raportat un astfel de caz în 1995.***

Himerele androgenetice sunt formate din celule care conțin **combinația normală de cromozomi materni și paterni și celule care conțin două seturi de cromozomi paterni** (izodisomie paternă). Himerele androgenetice ale mamiferelor generate experimental supraviețuiesc rar până la naștere și adesea sunt afectate de tulburări severe de dezvoltare. La oameni, afecțiunea poate apărea în mod natural, deși se termină de obicei cu moartea embrionară. **Himerele androgenetice umane par să apară prin fuziunea unui zigot normal cu un ovul care nu are propriul nucleu, dar a fost fertilizat și conține un nucleu patern duplicat.**

Himerism artificial. Un individ care se încadrează în această clasificare posedă două seturi diferite de ADN: unul care a fost moștenit genetic în momentul formării embrionului uman și celălalt care a fost introdus în mod intenționat printr-o procedură medicală - transplant.

[https://en.wikipedia.org/wiki/Chimera_\(genetics\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Chimera_(genetics))

!!! În 2021, o himeră om-maimuță a fost creată ca proiect comun între Institutul Salk din SUA și Universitatea Kunming din China și publicată în revista Cell. **Aceasta a implicat injectarea de celule stem umane în embrioni de maimuță**. Embrionii au fost lăsați să crească doar pentru câteva zile. **Deoarece oamenii sunt mai strâns înrudiți cu maimuțele decât alte animale, înseamnă că există mai multe șanse ca embrionii himeri să supraviețuiască perioade mai lungi, astfel încât organele să se poată dezvolta**. Proiectul a deschis posibilități în transplantul de organe, precum și preocupări etice, în special în ceea ce privește dezvoltarea creierului uman la primate.

Mozaicism - prezența la un individ a două sau mai multe linii celulare diferite genetic (poate fi un cromozom întreg sau doar o genă). Mozaicismul se produce după formarea zigotului (postzigotic), inițial la nivelul unei singure celulă. **Dacă celula în care apare modificarea este viabilă**, ea se va multiplica și va transmite această modificare celulelor-fiice, formându-se o clonă (subpopulație) de celule anormale. Acestea vor „conviețui” cu restul de celule normale ale zigotului. **Fenomenul se poate produce oricând: în stadiul de embrion, de făt sau după naștere.** Cu cât apare mai devreme în timpul dezvoltării, cu atât proporția de celule anormale este mai mare, iar consecințele vor fi mai grave.

Mozaicism germinal - mutațiile se produc precoce în viața embrionară, și afectează celulele precursorale ale gameților (ovulul și spermatozoidul), **celulele germinale**. Se formează astfel o subpopulație de celule care poartă mutația (anormale), pe lângă cea de celule normale. **Individul respectiv va avea o parte din gameți normali și o parte anormali.** Celule somatice nu poartă mutația, ca urmare individul respectiv nu prezintă nici un semn de boală. **Acest fenomen explica apariția mai multor copii afectați de o boală genetică, având părinți sănătoși.** Mecanismul este foarte rar și a fost demonstrat în cazuri de copii cu boli autozomal dominante ca osteogeneza imperfecta sau neurofibromatoza.

Mozaicism somatic -este **produs de mutații care apar în unele celule somatice.** Celulele anormale se vor multiplica și vor forma o clonă anormală, prezentă doar în anumite țesuturi. Mozaicismul somatic poate produce manifestări neuniforme, segmentale, „în pete”, care afectează numai o parte a corpului (de ex. neurofibromatoza segmentală). Poate produce însă diverse forme de cancer, boli degenerative sau fenomene de „îmbătrânire” precoce. **Intrucât mutațiile nu afectează celulele germinale, ele nu vor fi transmise generațiilor următoare.**

Mozaicurile genetice pot fi adesea confundate cu himerismul, în care două sau mai multe genotipuri apar la un individ. În himerism, totuși, cele două genotipuri apar din fuziunea a mai mult de un zigot fertilizat în stadiile incipiente ale dezvoltării embrionare, mai degrabă decât dintr-o mutație sau pierderea cromozomilor.

Mozaicismul genetic poate rezulta prin multe mecanisme diferite, inclusiv nondisjuncția cromozomilor, decalajul anafazei și endoreplicarea. Întârzierea anafazei este cea mai comună cale prin care apare mozaicismul în embrionul preimplantare.