PRIMJENA TRANSGENIH TEHNOLOGIJA U ZOOTEHNICI

Špehar, Antonela

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:068337

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKUTET U OSIJEKU

Antonela Špehar

Preddiplomski studij, smjer Zoothenika

PRIMJENA TRANSGENIH TEHNOLOGIJA U ZOOTEHNICI

Završni rad

Osijek, 2016.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURAJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKUTET U OSIJEKU

Antonela Špehar

Preddiplomski studij, smjer Zoothenika

PRIMJENA TRANSGENIH TEHNOLOGIJA U ZOOTEHNICI

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu završnog rada:

1. Doc.dr.sc. Ivona Djurkin Kušec, predsjednik

2. Doc.dr.sc. Vladimir Margeta, mentor

3. Mag.ing.agr. Kristina Gvozdanović, član

Osijek, 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. DOMAĆE TRANSGENE ŽIVOTINJE 2
    2.1. Svinje 2
    2.2. Ovce 4
    2.3. Koze 4
    2.4. Goveda 5
3. METODE GENETSKE MODIFIKACIJE 5
    3.1. Mikroinjektiranje DNA 5
    3.2. Prijenos gena putem spermija 6
    3.3. Prijenos gena embrionalnim matičnim stanicama 6
    3.4. Prijenos gena putem virusnih vektora 7
    3.5. Prijenos gena somatskim stanicama 8
4. PRIMJENA TRANSGENIH DOMAĆIH ŽIVOTINJA U BIOTEHNOLOGIJI 10
    4.1. Primjena u biomedicini 10
        4.1.1. Cell tracking 10
        4.1.2. Ksenotransplatacija 11
        4.1.3. Kardiovaskularne bolesti 12
        4.1.4. Cistična fibroza 12
        4.1.5. Alzheimerova bolest 13
        4.1.6. Spinalna mišićna atrofija 13
        4.1.7. Dijabetis 14
    4.2. Primjena u farmaceutskoj industriji 15
    4.3. Primjena u poljoprivredi 15
        4.3.1. Proizvodnja mesa 15
        4.3.2. Bolesti i stres 16
        4.3.3. Hranidba 16
5. ZAKLJUČAK 18
6. POPIS LITERATURE 19
7. SAŽETAK 23
8. SUMMARY 24
9. POPIS SLIKA 25
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

1. UVOD

Tijekom 70. godina prošlog stoljeća omogućeno je rekombiniranje DNK molekula *in vitro*, što je bilo veliko dostignuće molekularne genetike. Razdoblje DNK započelo je otkrićem restrikcijskih enzima. Restrikcijski enzimi cijepaju dvolančanu molekulu DNK na fragmente određene dužine. Izolirani su od bakterija.

Restrikcija i modifikacije DNK omogućila je dobivanje manjih fragmenata, a njihovim spajanjem uz određene enzime doveo je do nastanka novih kombinacija nasljednih osnova. Takve molekule DNK moguće je unijeti u žive stanice domaćina. Da bi to bilo moguće potrebno je napraviti nosioce, tj. vektore koji se u unesenom domaćinu stabilno održavaju i nasljeđuju. Tehnologija rekombinantne DNK odnosno genetički inženjering ima široku primjenu u svim područjima prirodnih znanosti. Sposobnost ciljanih genetskih promjena na molekularnoj razini najviše je primijenjena za proizvodnju transgenih životinja. Transgena životinja je životinja koja ima bilo koju specifičnu ciljanu modifikaciju.

Danas nam transgene životinje služe kao modeli u istraživanjima o prijenosu gena, kao bioreaktori za proizvodnju različitih proteina te za uzgoj tkiva i organa za transplantaciju. Znanstvenici rade na proizvodnji transgeničnih životinja s genama za liječenje težih bolesti poput raka, cistične fibroze i dr. Ljude još uvijek zabrinjava potencijalna opasnost od proizvoda transgenih životinja. Pravilnom upotrebom tehnologije, strogim nadzorom i kontrolom opasnosti se mogu izbjeći.

U ovom radu upoznat ćemo se s osnovama genetičkog inžinjerstva te dobrobitima transgenih životinja u svrhu unapređivanja biomedicine i poljoprivrede.

2. DOMAĆE TRANSGENE ŽIVOTINJE

Tijekom 1975. godine znanstvenici su ubacivanjem majmunskog genoma u miša stvorili prvu transgenu životinju. Kako transgen nije prenesen na potomstvo, ista skupina znanstvenika 1977. godine ponavlja pokus i stvara prvu generaciju transgenih miševa (transgen se prenosi na potomstvo). Tijekom 80. godina prošlog stoljeća znanstvenici su ugradili ljudski gen za proizvodnju inzulina u bakteriju, čime je bakterija počela proizvoditi ljudski inzulin. Tijekom 1989. godine ugrađeni su zečji geni u majmunske genome, te ljudski geni u mišje. Nakon 277 neuspjela pokušaja 1997. godine stvorena je poznata ovca Dolly, prvi klonirani sisavac. U dobi od 6 godina uspavana je zbog toga što je došlo do poremećaja kao što su prijevremeno starenje, prekomjerna težina, oštećenje pluća i srca. Smatra se da su ovi poremećaji rezultati kloniranja što je pokrenulo brojne rasprave u vezi kloniranja. Od 1997. godine klonirao se veliki broj životinja, a njihova svrha je višestruka. Te transgene životinje prvenstveno se koriste kao proizvođači raznih proteina za svrhu liječenja, ksenotransplataciju i sl. Cilj znanstvenika u budućnost je stvaranje transgenih domaćih životinja i njihovih klonova u svrhu dobivanja "elitne" rase koje bi davale kvalitetno meso, mlijeko, jaja i sl.

2.1. Svinje

U posljednjih nekoliko godina, transgene svinje su postale neophodne za biomedicinska istraživanja. Injektiranje DNK konstruktora (naziv za molekule aminokiselina koje pri eksperimentima kloniranja služe kao nosioci strane DNK) u pronukleus oplođenog jajašca, pokazalo se kao problem u proizvodnji za dobivanje potrebnog broja transgenih svinja (Nottle, 1997.). Perry i sur. (1999.) u svom su istraživanju razvili alternativnu metodu za proizvodnju transgenih miševa, tzv ICSI-s metodu (Intra-cytoplasmic sperm injection), u kojima su spermiji ko-inkubirani s DNK te mikroinjektirani u plazmu (ubrizgavanje intracitoplazmatskih spermija, ICSI). Ova metoda omogućuje umetanje stranih gena u embrionski genom uvođenjem DNK molekule vezane za glave spermija u ooplazmai (Perry, 1999.).

Transgeni miševi mogu se proizvesti ICSI-s metodom uz sličnu učinkovitost onoj s pronuklearnim mikro injekcijama (Perry, 1999.). Ako se ova tehnologija može primijeniti

na svinje, to će osigurati visoko učinkovitost i jednostavan način proizvodnje. ICSI-posredovana metoda može biti od velike koristi za kombiniranje gena korištenjem *in vitro* sazrelih (IVM) jajnih stanica, jer to bi uvelike smanjilo troškove i pojednostavilo proceduru. Ako je moguća, povećana dostupnost svinjskog transgena olakšati će širenje praktične vrijednosti transgenih svinja. Transgeneza od ICSI metode nudi nove tehnološke mogućnosti u transgenih svinja u svinjogojstvu.



Slika 1. Transgene svinje za uzgoj pluća

(http://www.spacedaily.com/reports/Transgenic_Animals_Produced_Using_Cultured_Sperm.html)

Somatski nuklearni transfer stanica (SCNT) koristi se u proizvodnji transgenih životinja. Preduvjet za ovu tehnologiju je stvaranje nuklearnih stanica donora na kojem je transgen uveden bez narušavanja stanice. ICSI prijenos gena može se koristiti kao praktična metoda za generiranje transgenih somatskih stanica. Kurome i sur. (2006.) u svom radu ispitivali su mogućnost kloniranja transgenih svinja iz somatskih stanica transgenih svinja stvorenih ICIS metodom. Prvo su uveli bicistronički gen koji se sastoji od ljudskog albumina (hALB) i EGFP gena u svinjske IVM jajne stanice koristeći ICIS metodu, pomoću odmrznutih glava spermija. Nadalje, u radu navode da je ICIS metoda izvediva na svinjama. Transgen je uspješno uveden i bio je izražen u fetusu, kao i u novo oprasenoj prasadi. Uspostavili su različite primarne stanične kulture iz transgenih prasadi stvorenih ICIS metodom i stvorili

su određen broj transgenih klonova koristeći te stanice kao nuklearne donatore za SCNT (Kurome i sur., 2006.)

2.2. Ovce

Oplodnja u ovaca možda se provesti prirodnim putem ili umjetnom oplodnjom. Oplođena jajašca kirurški se odstranjuju i mikroinjektiraju pomoću DIC (Differential interference contrast) mikroskopa kako bi uočili zigotu. Nedostatak kod ovaca je to što godišnje jednom daju mlade, što ograničava upotrebu tijekom godine. Međutim ovaj problem može se riješiti korištenjem domaće ovce (*Ovis aries*). Nakon obrade jajašca se kirurški prenose u jajovod ženki primateljice koja je hormonski usklađena s donorom. Ovce imaju mala lega, što ograničava broj ubrizgavanja jajašaca na maksimalno četiri ili pet (Clark, 2012.).

2.3. Koze

Metode za razvijene za proizvodnju transgenih koza slične su onima za ovce. Prema tome, estrus se potakne pomoću progesteron implantanta, a superovulaciju induciramo injekcijom s folikostimulirajućim hormonom (FSH). Oplodnja se obično događa prirodnim putem. Koze, poput ovaca, jednom godišnje daju mlade, ali uz manju promjenu doze hormona, mogu se koristiti i izvan sezone parenja (Clark, 2012.).

Drugi dan nakon parenja, pravi se laparaskopski rez i kirurški se vade embriji. Embriji se ispiru fosfatnim puferom (FBS). Poštivanjem standardnih protokola dobijemo pet oplođenih embrija spremnih za injektiranje. Prije injektiranja, embriji se kratkoročno tretiraju u Hams F12 mediju + 10% fetalnog telećeg seruma. Nakon injekcije, embriji se kratkotrajno analiziraju za procjenu preživljavanja prije reimplatacije u sinkroniziranu primateljicu. Primatelji su sinkronizirani kombinacijom implantanta progesterona i injekcijama PMSG-a (serum konjskog gonadotropina) te se pare sa steriliziranim jarcem kako bi se osigurala sinkronizacija. Tri do četiri jajašca rutinski se prenose u jajovod. Frekvencije prijavljene za proizvodnju koza, u rangu su s onima prijavljenim za ovce, raspon 6-10% živih potomaka (Clark, 2012.).

2.4. Goveda

Od svih domaćih životinja kod goveda je najteže primijeniti metode genetske modifikacije. U provedenim eksperimentima, u prosjeku su dobivene četiri upotrebljive zigote od donora. S obzirom na mali postotak upotrebljivih zigota, koje pridonose transgeničnosti, veliki broj donora biti će potrebno da bi se proizvelo jedno transgeno tele. Jedan od načina dobivanja transgenog goveda je upotreba zigote koje su *in vitro* sazrile i zigote neposredno zaklanih goveda. Nezrele oocite aspiriraju iz jajnika nakon klanja, te ih se zatim in *vitro* oplođuje Clark, 2012.).

Prosječna kvaliteta embrija proizvedenih ovim putem je niska, nadalje teško je utvrditi genetsko ili zdravstveno stanje jajašaca dobivenih iz klaoničkih životinja. Kao i za svinje, zigote goveda moraju se centrifugirati kako bi bio vidljiv pronukleus (Clark, 2012.).

3. METODE GENETSKE MODIFIKACIJE

Cilj primjene transgenih tehnologija je stvaranje životinja u koje se može stabilno ugraditi strani DNK. Takve životinje mogu dati potomstvo koje nosi nama željene gene što utječe na ispoljavanje novih proizvodnih svojstava. Prve životinje u koje su se ugrađivali geni bili su miševi. Tijekom 1975. godine u Cold Spring Harboru, znanstvenik Rudolf Jaenisha i sur. su transgen iz majmunskog genoma ugradili u mišji genom, ali nažalost transgeni se nisu prenijeli na potomstvo. Ista grupa znanstvenika je tijekom 1977. godine, uspjela je stvoriti generaciju miševa koji svoje transgene prenose na potomstvo. Kako je znanost napredovala tako se prelazilo na veće životinje. U nastavku ćemo opisat nekoliko najvažnijih metoda genetske modifikacije.

3.1. Mikroinjektiranje DNK

U posljednjih 20 godina, mikroinjektiranje DNK postala je najčešća metoda prijenosa gena kod životinja. Miš je bio prva životinja kod koje je ova metoda uspješno obavljena. Metoda uključuje nekoliko koraka:

1. Prijenos željenog gena konstruktora,

2. Uzgoj *in vitro* kulture za manipulaciju stanica za određeni embrionalni razvoj,

3. Transfer embrionalnih stanica u ženku primateljicu.

Mikroinjektiranje uključuje korištenje mikroskopa, mikromanipulatora i injekcija. Proces za dobivanje transgena i procjenu DNK sastoji se od određene količine oplođenih jajašaca iz superovuliranog donatora, injekcije željenih gena u muške pronukleuse, kiruški prijenos 20-25 jajašaca u pseudogravidnu primateljicu i analizu potomstva kako bi vidjelo nosi li ostatke transgeneze. Frkvencije dobivene pronuklearnom mikroinjekcijom iznose 5-30%. Studije na mišu pokazale su da linearni integrirani fragmenti DNK imaju veći stupanj učinkovitosti od kružne DNA, da se transgena DNK mora ubrizgati u malim količinama, usuprotnom ima toksičan efekt na embrij te da je nuklearno ubrizgavanje učinkovitije od citoplazmatskog ubrizgavanja (Maio, 2012.).

3.2.Prijenos gena putem spermija

Druga metoda uvođenja transgene DNK u svrhu stvaranje transgenih životinja je prijenos gena putem spermija. Spermiji mnogih životinjskih vrsta vežu se na samu DNK kao i na DNK – liposom. Sperma se prikuplja ejakulacijom i inkubira u oplođenom mediju na temperaturi od 37 ˚C do 39 ˚C u različitim vremenskim intervalima. Tijekom 30 minuta do 1 sat, otopini DNK dodana je suspenzija sperme kako bi se dobila konačna koncentracija od 1 do 25 ug/mL DNK. Transformirani spermiji koriste se za *in vitro* oplodnju ili umjetno osjemenjivanje, međutim većina studija je usmjerena na *in vitro* oplodnju. Da bi koristili spermije kao vektore prijenosa gena mora doći do oplodnje. U brojnim istraživanjima su analizirani prijenosi gena u različitim fazama razvoja. Uspješnost prijenosa gena putem spermija pokazala se kod miša, zeca, svinje, peradi, žabe *Xenopusa* i goveda (Wheeler i Walters, 2001.).

3.3. Prijenos gena embrionalnim matičnim stanicama

Embrionalne matične stanice (ES) koriste se za stvaranje transgenih miševa. ES stanice se izoliraju iz unutarnje stanične stijenke blastocista, ako se čuvaju u odgovarajućim uvjetima te imaju mogućnost mnogobrojnog dijeljenja. Kada su ES stanice izolirane i umetnute u rastući embrij miša, množe se i doprinose rastu fetusa. Takve nastale životinje potom se ispituju i koriste za stvaranje potpuno transgenih životinja. Prednost korištenja matičnih

stanica putem mikroinjektiranja je sposobnost odabira transgene integracije korištenjem selektivnih markera. Upotreba ES stanica i omogućeno ciljano mijenjanje DNK pomoću homologne rekombinacije vodi do stvaranja "knockout" gena. Miš se smatra jednim od najboljih modela za genetička istraživanja zbog lakog stvaranja ovakvih gena. Zbog uspjeha na mišjim ES stanicama mnogi su pokušali izolirati stanice domaćih životinja no s ograničenim uspjehom. Genetska modifikacija domaćih životinja putem ES stanica nije jednostavna, a s obzirom na sastav potrebno ih je zadržati kao nediferencirane matične stanice. Ta ograničenja manipulacije ES stanicama mogu se zaobići upotrebom tehnike nuklearnog prijenosa. Dokazano je da se genetski modificirani fetalni fibroblasti mogu de diferencirani putem nuklearnog prijenosa, te se iz tog prijenosa mogu izdvojiti ES stanice. Izdvojene ES stanice prilikom uvođenja u predimplatacijski embrij pridonose nastajanju tkiva kod transgenog teleta. Nažalost, čak i da su ES stanice domaćih životinja usporedive sa stanicama miša, vrijeme proizvodnje i troškovi održavanja takvih životinja previsoki su za testiranje zametnih linija prijenosa (Bosch i sur., 2004.).

3.4. Prijenos gena putem virusnih vektora

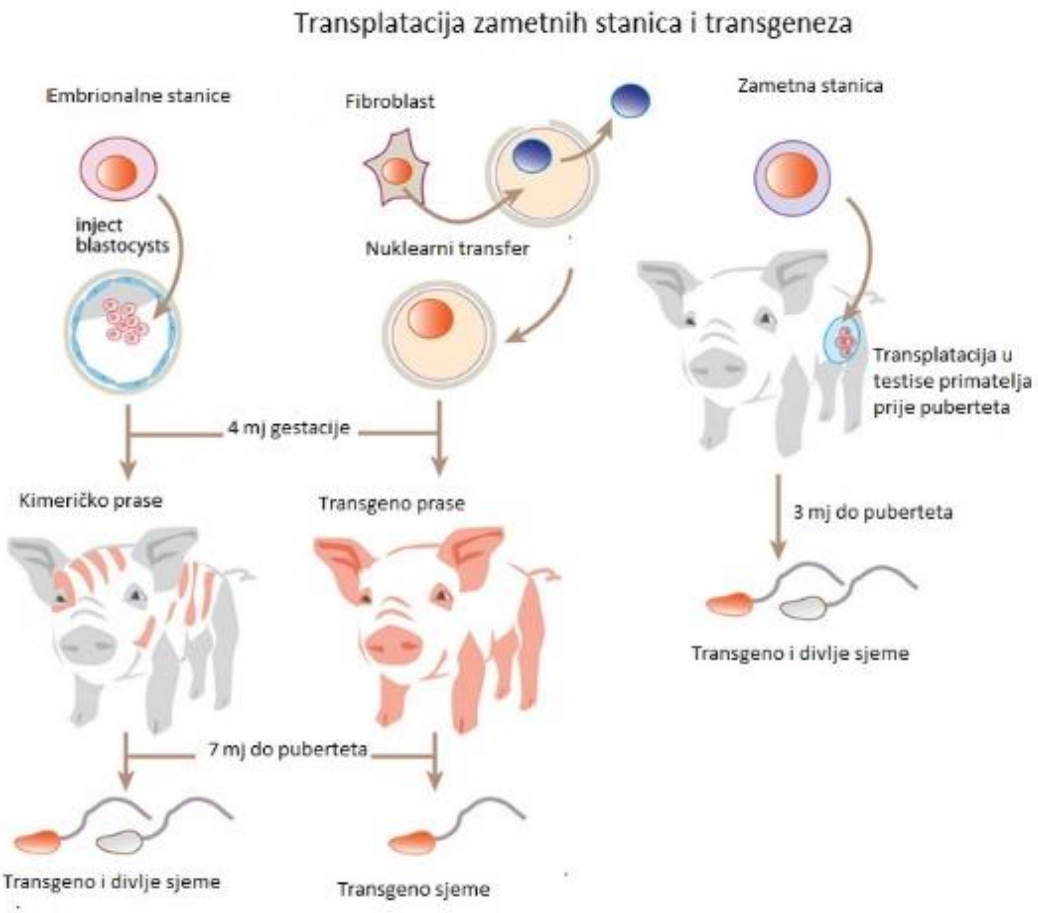
Iako su se virusni vektori opsežno koristili za prijenos gena na somatske stanice u terapijske svrhe, njihova primjena za proizvodnju zametnih linija transgenih životinja je ograničena. Istraživači su iskoristili infekcijski mehanizam retrovirusa za stvaranje metode prijenosa transgena u ciljani genom. Tijekom retrovirusne infekcije genetski materijal umetnut je u stanice kao RNK koji se kasnije reverzno transkriptirao na DNK i integrirao u genom domaćina. Jedini način retrovirusno preintegracijskog kompleksa da sadrži taransgen i da se kasnije integrira u kromatin domaćina je nakon pucanja membrane tijekom mitoze. Retrovirusna integracija ograničena je na stanice koje se dijele. Raniji pokušaji da se proizvede transgen putem retrovirusne infekcije embrija rezultirao je genetskom mozaičnosti. Mogućnost virusnog preintegriranog kompleksa da uđe u kormatin embrija događa se u M-fazi. Značajan napredak ove tehnike postignut je nedavno izlaganjem oocite u metafazi II transgenu koji sadrži retrovirus. Izložene jajne stanice su prikladne jer im se oštetila. To povećava vjerojatnost preintegriranog kompleksa da se uklopi u kromatin oocite. Prijenos gena reverzibinom transkripcijom koristi se za proizvodnju transgenih goveda s visokom učinkovitošću (4 od 4 životinje su transgene). No ekspresija transgena u tim životinjama nije provedena. Adenovirus predstavlja alternativu retrovirusima kao

vektora za umetanje rekombinantne DNK u zametne linije sisavaca. Prednosti korištena adenovirusa za transgene svrhe su široki spektar različitih vrsta stanica i mogućnost ugradnje velike dijelove egzogene DNK (>20 Kb). Unatoč tim prednostima adenovirusa, vode se rasprave o mogućnostima prijenosa gena adenovirusom u spolnim stanicama i zamecima. Prijenos gena adenovirusom može biti alternativa za stvaranje zametnih linija umetanjem gena, ali potrebno je riješiti problem pronalska odgovarajuće doze infektivnih čestica koje imaju maksimalnu frekvenciju integriranja s prihvatljivom toksičnošću uz poboljšanje virusnog konstrukta (Bosch i sur., 2004.)

3.5. Prijenos gena somatskim stanicama

Zbog nedostatka dokazanih matičnih stanica i nedavnih dostignuća u nuklearnom prijenosu (NT), trenutni naglasak na stvaranje transgenih životinja stavljen je na nuklearni prijenos somatskih stanica (SCNT). Nuklearni prijenos je tehnika koja se može koristiti za stvaranje genetski identične kopije, tj. klona životinje. Nuklearni prijenos obično uključuje prijenos jezgre donora u citoplazmu izvađene oocite. Stanice donatora mogu biti od raznih tipova stanica, od embrionalnih blastomera do odraslih stanica. Iako se na početku nuklearnog prijenosa koristio embrij blastomera kao donatora, proces je usporen zbog ograničenog broja stanica u ranoj fazi embrija. Odnedavno se fetalne i odrasle stanice koriste za kloniranje većih domaćih životinja uključujući ovce, goveda, koze i svinje. Sposobnost korištenja stanica koje se mogu uzgajati, povećava broj stanica dostupnih za kloniranje, čime se olakšava stvaranje transgenih životinja. Transgeni se mogu uvesti u kulturu stanica koje se koriste kao stanice donori za SCNT. Prva prednost korištenja SCNT za transgenezu je da spol životinje možemo odrediti odabirom materijala donora. Sposobnost odabira spola životinje povećava učinkovitost i olakšava manipulaciju proizvodnje mlijeka. Nadalje, korištenje kultura stanica može dovesti do stvaranja velikog broja transgenih stanica koje je moguće zamrznuti i pohraniti na duži vremenski period. Transgena struktura i ekspresija može se testirati molekularnim tehnikama kao što je lančana reakcija polimerazom (PCR), southern blot analiza, fluorescentna *in situ* hibridizacija i western blot analiza. Pravilnom upotrebom SCNT dobivamo 100% transgene životinje, a svaka stanica klonirane životinje sadržavat će transgen čime će se uštediti vrijeme i troškovi izvođenja cijelog procesa analize. Sposobnost da se koriste klonirane populacije stanica jamči umetanje istih transgena u klonove, čime se smanjuje mogućnost pojave varijacija životinje na životinju u

transgenim ekspresijskim razinama. Transgenu se može dodati određeno genetsko podrijetlo. Na primjer, ženka koja je iznad prosjeka u proizvodnji mliječnih bjelančevina može se koristiti kao donor somatskih stanica u kojima se nalazi transgen. Ova metoda omogućava ne samo nasumično umetanje DNK nego i ciljano umetanje homologne rekombinantne DNK što je bitno u moduliranju specifične genske ekspresije, kao i stvaranje "knockout" gena. Ciljani geni kod svinja i ovaca proizvedeni su pomoću SCNT tehnike (Bosch i sur., 2004.).



Slika 2. Proces započinje transdukcijom embrionalnih matičnih stanica i proizvodnjom kimera injektiranjem u blastocite. Nakon toga slijedi transdukcija somatskih stanica, nakon čega slijedi nuklearni transfer somatskih stanica. Proces završava transdukcijom zametnih stanica, nakon čega slijedi njihovo presađivanje.

(http://people.ucalgary.ca/~idlab/Research.html)

4. PRIMJENA TRANSGENIH DOMAĆIH ŽIVOTINJA U BIOTEHNOLOGIJI

Proučavanje bolesti koje se pojavljuju kod ljudi na životinjskim modelima, pomaže znanstvenicima u boljem razumijevanju patogenih bolesti i na taj način osigurava potrebne alate za razvoj genske terapije za liječenje bolesti. Do danas, humanizirani miš se koristio kao model za proučavanje ljudske hematopoeze, urođene i stečene imunosti, autoimunih bolesti, zaraznih bolesti, raka i regenerativne medicine. Nažalost, humanizirani miš ne može vjerno oponašati odgovarajuće uvjete koji se javljaju kod ljudi. Stoga su potrebni bolji životinjski modeli. Jedan od primjera je dobro razvijen model svinjske asteroskleroze koji je olakšao analizu napredovanja bolesti i testiranje novih lijekova. Svinja se koristi kao glavni model sisavca za proučavanje patologije. Mogućnost korištenja svinja iz istog legla ili kloniranih transgenih svinja olakšava genetsko mapiranje. Genom svinje ima visoki slijed i strukturu kromosoma homolognim s ljudskim genomom (Lunney, 2007.).

4.1. Primjena u biomedicini

4.1.1. Cell tracking

Neki od prvih dokaza o načelu modela transgenih svinja uključuje NT klonove kod kojih je izražen zeleni fluorescentni protein (EGFP) (Park i sur., 2008.). Od tada su proizvedene svinje kod kojih je izražen crveni fluorescentni protein (Matsunari i sur., 2008.) i multi-fluorescentni protein (plava, zelena i crvena) (Webster i sur., 2005.). Tkiva iz transgenih svinja koriste se u biomedicinskim istraživanjima koja zahtijevaju određenu genetsku i fenotipsku stanicu. U jednoj takvoj studiji, stanice izoliranje iz fetalnih EGFP transgeničnih svinja korišteni su za procjenu preživljavanja mrežnice svinja progenitorskih stanica kao alografita kod primitivne pasmine svinja s oštećenom mrežnicom (Klassen, 2008.). Nakon transplantacije, ekspresija EGFP-a omogućava histološki uvid stanične integracije u svinju primateljicu, što pokazuje veliku koristi svinja kao transgenih modela (Whyte i Prather, 2011.).



Slika 3. Svinje kod kojih je izražen multi-fluorescentni gen (http://www.buzzfeed.com/alisonvingiano/scientists-in-china-made-glow-in-the-dark-pigs#.aeJ4Oqw9z)

4.1.2. Ksenotransplatacija

Potreba za presađivanjem organa potaknula je velike znanstvene napore kako bi se omogućilo izvođenje navedenog postupka. Hiperakutno odbacivanje (HAR) javlja se unutar 24 sata od transplantacije. Akutni humoralni ksenograft odbacivanja (AHXR) obično se javlja nakon prvog tjedna transplantacije, a uzrokovan je neprilagođenim antigenom (HLA) na leukocitima ljudskih stanica.

Sve pasmine svinja nose endogeni retrovirus (PERVs) jer je integriran u njihov genom. Iako nije poznata bolest svinja koja se može pripisati PERVs-u, povišena virusna ekspresija kod melanoma i metastaze pluća uočene su kod selektivno uzgojenih minijaturnih pasmina. Funkcija virusa kod razvoja tumora još uvijek je nejasna. Glavna prepreka za upotrebu organa svinja za ljude je infekcije ljudskih stanica tijekom ksenotransplatacije. Da bi inhibirali infekciju ljudskih stanica s PERVs-om, znanstvenici su transficirali fibroblaste svinja s letinivirusom. Ako razina inhibicije PERV-a bude dovoljna da bi se spriječila infekcija ljudskih stanica, svinje bi se u kombinaciji s drugim metodama genetske kombinacije mogli koristiti za ksenotransplataciju (Whyte i Prather, 2011.).

4.1.3. Kardiovaskularne bolesti

Kardiovaskularne bolesti svinja smatraju se kao izvrstan model za ljudski kardiovaskularni sustav. Kao potencijalni prehrambeni izvor esencijalnih i korisnih masnih kiselina, genetski modificirane svinje su uzgojene da bi izrazile D12 masnu kiselinu desaturazu (FAD2) iz špinata (Saeki i sur., 2004.) za povećanje linoleinske kiseline, kao i svinje koje bi izražavale humanizirani *Caenorhabditis elegans* (Lai, 2002.). Ovi modeli svinja mogu se koristiti za ispitivanje učinka zamjene n-3 / n-6 masnih kiselina u odnosu na same svinje. Drugi važan regulator kardiovaskularnog zdravlja je signalna molekula, dušikov oksid (NO). Transgene svinje koje hipereksprimiraju endotel dušikov oksid sintazu (eNOS) (Hao i sur., 2006.), koji je odgovoran za proizvodnju NO u unutarnjim oblogama krvnih žila, povećava razumijevanje složene regulacije vazodilatacije i potencijalne terapije za bolesti povezanih s disfunkcijom endotela. Vaskularna signalizacija od strane NO usko je povezana s vodikovim peroksidom (H2O2), molekulom koja igra ključnu ulogu u kardiovaskularnim regulacijama (Drouin i Thorin, 2009.) i dobno ubrzanih vaskularnih poremećaja (Collins i sur., 2009.). Za daljnje istraživanje vaskularne uloge H_2O_2, razvijene su transgenske Yucatan male svinje koje hipereksprimiraju ljudsku katalazu u endotelu. Ovi veliki životinjski kardiovaskularni modeli omogućit će mjerenje funkcionalnih parametara u stvarnom vremenu, uključujući protok krvi, temperaturu, oksigenaciju tkiva te perfuzije i difuzije koje je teško ili nemoguće pratiti u sličnim genetski modificiranim modelima glodavaca (Whyte i Prather, 2011.).

4.1.4. Cistična fibroza

Cistična fibroza (CF) je autosomno recesivna bolest. CF uzrokovana je mutacijom gena koji kodira transmembranske provodljive cističke fibrozne regulatorne (CFTR) anion kanale. Simptomi CF-a proizlaze iz neispravnog transporta vode i iona preko epitelnih tkiva, što dovodi do neadekvatne hidratacije sluzavog sekreta. Ove guste izlučevine u organima kao što su pluća mogu pokrenuti progresivne cikluse infekcija i upala, a to je ujedno i glavni uzrok smrtnosti. Više od 1.600 mutacija vezanih za CF su opisani, a iako je razvijeno nekoliko modela CFTR miševa, nitko od njih ne razvija opstruktivne plućne bolesti sa simptomima vidljivima na ljudima (Bragonz, 2010.). U nastojanju da se naprave točni CF modeli, svinje su klonirane iz fetalnih fibroblasta u kojem je gen CFTR mutiranjem proizveo DF508 najčešću genetsku mutaciju u CF alela (Rogers i sur., 2008.). Ove novorođene CF

svinje prikazat će neispravan kloridni prijenos, razaranje gušterače i rano žarišnu bilijarnu cirozu koja se javljaju u novorođenčadi kod ljudi s CF (Meyerholz i sur., 2010.). Za razliku od CF na miševima, te CF svinja razvijaju glavne karakteristike humane CF plućne bolesti (Stoltz i sur., 2010.). Nedavno je fenotip CF svinja riješio dugo postavljano pogrešno pitanje o redoslijedu događaja u upali i infekciji ciklusa patogena. Početni simptomi prikazani u CF svinjama je umanjena bakterijska eliminacija iz pluća nakon čega slijedi kaskada upala (Stoltz i sur., 2010.). Ovo ključni nalaz o CF patogenezi pruža nove mogućnosti za CF terapiju i prevenciju.

4.1.5. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (AD) je progresivna manifestacija demencije koja obično počinje sa suptilnim i slabo očitim nedostatkom pamćenja, postupno postaje sve teža i na kraju dovodi do onesposobljavanja pacijenta. Genetska osnova za obiteljski, autosomni dominantni AD (FAD) leži u mutaciji na genima PSEN1, PSEN2, i na genskom proteinskom amiloidnom prekursoru (APP). Te mutacije su povezane s povećanom proizvodnjom proteolitičkog fragment Ab koji agregira u fibrile i toksične oligomerne oblike te inicira sinaptička oštećenja i neurodegeneraciju (Walsh i sur., 2005.). Genetski modificirani model svinja FAD je razvijen na temelju sličnosti u veličini, fizičkim karakteristikama, i stopi rasta između svinjskog i ljudskog mozga (Kragh i sur., 2009.). Transgen je izražen u mozgu, ali autori nagađaju da bi moglo potrajati do dobi od 1-2 godine prije nego AD akumulira do simptomatskih razinama u svinjskom mozgu. Većina (95%) AD slučajeva kasnije se pojave, ali ne slijede mendelovsko nasljeđivanje, unatoč pokazivanju značajne nasljednosti. Modeli svinja koji se bave genetskim temeljima drugih oblika AD mogu pružiti neke podatke za rano otkrivanje i novi tretmana bolesnika (Whyte i Prather, 2011.).

4.1.6. Spinalna mišićna atrofija

Spinalna mišićna atrofija (SMA) je autosomalno recesivna neurodegenerativna bolest, i najčešći genetski uzrok smrtnosti dojenčadi. Klinički simptomi SMA uključuju gubitak motornih neurona i gubitak skeletalnih mišića. SMA je uzrokovan brisanjem ili mutacijom SMN1 gena. SMN2 je također prisutan isključivo u ljudima. Mutacije u SMN2 nemaju kliničke posljedice ako je SMN1 zadržana. U slučaju kada je SMN1 mutirana, ozbiljnost

bolesti obrnuto je razmjerna SMN2 kopiji gena, iako SMN2 ne može sam spriječiti bolest. Model svinje za SMA posebno je razvijen za procjenu učinkovitosti, farmakologije i toksikologije SMA lijekova (Lorson i sur., 2011). Autori su istaknuli važnost dokazivanja očuvanja alternativnih splicing procesa od ljudskih SMN1 i SMN2 u svinjama da bi se proizveo uspješan transgenski model SMA. (Lorson i sur., 2011). U tijeku su istraživanja koja se odnose na uvođenje ljudskog SMN2 transgen u svinjske fetalne fibroblaste, što dovodi do završetka svinjskog modela SMA. Učinkovite SMA terapije trenutno ne postoje, što ističe vrijednost genetski modificiranog modela svinja za tu bolest.

4.1.7. Dijabetes

Dijabetes mellitusa (DM) definiran je u American Diabetes Association kao skupina metaboličkih bolesti karakteriziranih hiperglikemijom uslijed nedostataka izlučivanja inzulina, inzulinskog djelovanja, ili oboje. Tip 1 DM rezultira autoimunim razaranjem B-stanica u gušterači, a tip 2 DM je generalizirani poremećaj metabolizma uslijed smanjene osjetljivosti tkiva na inzulin. Kronična hiperglikemija, uzrokovana nedostatkom ili ne djelovanjem inzulina povezana je s dugoročnim oštećenjem organa, osobito očiju, bubrega, živaca, srca i krvnih žila. Tip 2 DM predstavlja više od 80% DM slučajeva. Tip 3 DM je starački dijabetes mladih (MODY3), rani početak inzulin-ovisnog tipa šećerne bolesti karakteriziran autosomnim dominantnim nasljeđivanjem. Transgeni modeli svinja za tipa 3 DM proizvedeni su na temelju mutacija na ljudskom nuklearnom faktoru hepatocita (1A-1a) HNF gena (Umeyama i sur., 2009). Iako je opraseno 22 živa praščića oprašeno, blizu 80% tih klonova je uginulo u roku od 10 dana od dana rođenja. Uloga transgeneza i postupak kloniranja u ovim uginućima ne mogu se odrediti. Preživjeli praščići pokazuju dijabetičke fenotipe, uključujući visoke razine šećera u krvi i slabo izlučivanje inzulina iz Langerhansovih otočića. Iako su modeli dijabetesa svinja prethodno bili generirani kemijskim uništavanjem B-stanica, te klonirane svinje tvore prvi model transgenih svinja iz kojih su vidljive patofiziološke karakteristike dijabetesa (Renner i sur., 2010.). Normalno, izlučivanje inzulina se inducira uslijed GIP (Gastric inhibitory polypeptide) hiperosmolarnost glukoze u dvanaesniku. Ovaj svinjski model pokazuje znatno smanjenu toleranciju glukoze što pokazuje bitnu ulogu GIP-a za izlučivanje inzulina. Osim toga, proliferacija B-stanica i fiziološko širenje b-stanične mase su značajno smanjene u tim transgeničnim svinja, te nalikuju na karakteristične značajke humanog dijabetesa tipa 2.

4.2. Primjena u farmaceutskoj industriji

Visoke cijene pročišćavanja proteina potrebnih za liječenje bolesti poput hemofilije ograničavaju liječenje u većini razvijenih zemalja, a previsoke su za zemlje u razvoju (Fischer i sur., 2002.). Dominantne metode izolacije proteina iz ljudske plazme donacijom ili od transgenih proteina proizvedenih u kulturi stanica sisavaca su skupi i neučinkoviti. Kao alternativa, svinjski mliječni bioreaktor može biti odličan sustav za proizvodnju velikih razmjera terapeutskih proteina zbog velikog volumena mlijeka koji se može sakupiti na dan i kvalitetnim posttranslacijskim procesiranjem složenih proteina (Van Cott i sur., 1999.). Od transgenih proteina izoliranih po mililitru svinjskog mlijeka, samo će 60 transgenih svinja biti potrebno da se dostavi cjelokupni iznos faktora IX za potrebne u Sjedinjenim Američkim Državama. Postoji nekoliko izvješća u kojima se pomoću svinja producira ljudski rekombinantni protein, pronuklearnom injekcijom ili NT-om, kao što je humani faktor VIII i IX (Van Cott i sur., 1999.), hemoglobin (Swanson i sur., 1992.), humani protein C (Van Cott i sur., 2001.), humani eritropoetin (Park i sur., 2001.), humani stimulirajući faktor kolonije granulacitnog makrofaga. Da bi se takvi proteini koristili kao zamjena u ljudskim pacijentima, veliki broj transgenih svinja mora biti izolirano u nepatogenim objektima te se moraju rutinski testirati izolirani protein za kvalitetu i čistoću (Van Cott i sur., 1999.).

4.3. Primjena u poljoprivredi

Primjena transgenih životinja za proizvodnja mesa, otpornosti na bolesti i učinkovito iskorištavanje hrane za životinje su područja poljoprivrede koja imaju najviše koristi od genetski modificiranih svinja. Biomedicinski modeli svinja nalaze se u u laboratorijima, a upotreba transgenih svinja u poljoprivredi predstavlja izravan ulazak transgenih materijala u ljudski hranidbeni lanac. Nužno je procijeniti sigurnost bilo kojeg proizvoda koji ulazi na tržište za prehranu ljudi.

4.3.1. Proizvodnja mesa

Pursel (1999.) je u svom radu pokazao da su geni za hormone koji imaju utjecaj na rast (npr, hormon rasta, faktor rasta poput inzulina) mogu biti izraženi u svinjama koje su proizvedene DNK mikroinjekciranjem. Ove transgenske svinje imaju značajno smanjeno potkožnu mast

i imaju varijabilno poboljšanje rasta u odnosu na kontrolu svinja, ali je i uočen probleme kao što su umor, želučani čir i nizak libido. Ovi problemi su posljedica induciranog hormona rasta. Miostatin (MSTN) je jedini izlučeni protein koji je pokazao negativan utjecaj na mišićnu masu *in vivo* (Long i sur.). Ciljanje ovog gena moglo bi rezultirati pojačanim rastom mišića u svinjama, dajući više nemasnog mesa u životinji. Do danas nisu stvorene svinje s miostin knockout genom, ali svinjski fetalni fibroblasti transficirani s MSTN ciljanim vektorom pokazali su da imaju znatno nižu ekspresiju MSTNmRNK nasuprot kontrolnih fibroblasta. To ukazuje na mogućnost da će klonirani MSTN-knockout geni svinja dobivenih iz ovih fibroblasta imati veći rast mišića od divljeg tipa pasmine svinja. Poboljšana proizvodnja može se postići poboljšanjem kvalitete mlijeka ili količinom dostupnih novorođenih svinja. Proizvedene transgene krmače koje imaju izražen goveđi α-laktalbumin u mliječnoj žlijezdi, imaju veću proizvodnju mlijeka. Debljanje je veće u prasadi sisanjem od a-laktalbumin nazimica.

4.3.2. Bolesti i stres

Genetska modifikacija može poboljšati preživljavanje praščića i kvalitetu mesa. Uslijed visokih temperatura svinjama su u završnim fazama rasta smanjene performanse te dolazi do slabije kvalitete polovica zbog ograničenog kapaciteta termoregulacije (Spencer i sur., 2005.). Zbog poboljšanja svinjske termotolerancije, transgene svinje s prekomjernom ekspresijom proteina toplinskog šoka HSP70.2 proizvedene su pronuklearnim mikroinjektiranjem (Chen i sur., 2005.). Stopa preživljavanja primarnih fibroblasta pri 45˚C značajno je veće kod transgenih svinja u odnosu na netransgene svinje. Autori nagađaju da transgene svinje hipereksprimiraju HSP 70 te da mogu biti otpornije na ljetne temperature, čime se smanjuje mortalitet i ekonomski gubitak u proizvodnji životinja.

4.3.3. Hranidba

Povećanje apsorpcije hranjivih tvari u hranidbi svinja ima dvostruku korist, učinkovito iskorištavanje hrane te smanjenjenje proizvodnje izmeta. Većina fosfora u hrani za stoku je u obliku žitarica, prirodnog fitata što je stabilniji i složeniji fosforni spoj kojeg svinje ne mogu probaviti u potpunosti. To sve dovodi do velike količine fosfora u svinjskim gnojivu (Emiola i sur., 2009.). Za rješavanje navedenog problema, Golovan i sur. su 2001. godine

proizveli transgene svinje pronuklearnim mikroinjektiranjem koje imaju izraženu *Escherichia coli* fitata transgena u svinjskim žlijezdama slinovnicama. Transgena fitaza djeluje u niskim pH uvjetima svinjskog probavnog trakta. Varijabilnost u aktivnosti fitaze među transgenim svinjama pripisuje se učincima umetanja transgena. Ova genetska modifikacija rezultirala je gotovo potpunom digestijom dijetalnog fitata i smanjenju izlučivanja fekalnog fosfora do 75%. Transgeni modeli svinja predstavljaju novi biološki pristup smanjenju otpada i onečišćenja na svinjogojskim farmama i smanjivanje potrebe za suplementarnim hranjivih tvari koje se dodaju hranidbi svinja (Whyte i Prather, 2011.).

5. ZAKLJUČAK

Otkriće transgeneze doprinijelo je razvitku molekularne genetike. Transgene životinje su one životinje koje su genetskim modifikacijama na bilo koji način promijenjene. One se koriste kao modeli u istraživanjima o prijenosu gena pa sve do kliničke primjene, koriste se kao bioreaktori za proizvodnju proteina, za uzgoj tkiva i organa za transplantaciju. Najčešće metode koje se koriste u proizvodnji takvih životinja su mikroinjektiranje DNK, unošenje embrionalnih i somatskih stanica, prijenos gena putem virusnih vektora i spermija. Upotrebom ovih metoda dobivamo visokovrijedne jedinke koje imaju široku primjenu u medicini, farmaciji i poljoprivredi. Zbog fizioloških sličnosti svinja i ljudi, transgene svinje važni su modeli u biomedicini za istraživanja o bolestima modernog vijeka. Primjenom transgenih metoda u poljoprivredni, stvaramo životinje koje će biti otpornije na bolesti, manje podložne stresu i bolje će iskorištavati hranu.

6. POPIS LITERATURE

1. Bosch, P., Hodges, H., Stice, S. (2004.): Generation of transgenic livestock by somatic cell nuclear transfer, Georgia Athens GA

2. Bragonzi, A. (2010.): Murine models of acute and chronic lung infection with cystic fibro is pathogens, Int J Med Microbiol 300:584–593.

3. Chen, M., Tu, C., Huang, J., Lin, J., Tzang, B., Hseu, T., Lee, W. (2005.): Augmentation of thermotolerance in primary skin fibroblasts from a transgenic pig overexpressing the porcine hsp70.2, Asian Aust J Anim Sci 18:107–112.

4. Clark, AJ. (2002.): Generation of Transgenic Livestock by Pronuclear Injection

5. , AR., Lyon, CJ., Xia, X., Liu, JZ., Tangirala, RK., Yin, F., Boyadjian, R., Bikineyeva, A., Harrison, DG., Hsueh, WA. (2009.): Ageaccelerated atherosclerosis correlates with failure to upregulate antioxidant genes, Circ Res 104:e42–e54.

6. Drouin, A., Thorin, E. (2009.): Flow-induced dilation is mediated by Aktdependent activation of endothelial nitric oxide synthasederived hydrogen peroxide in mouse cerebral arteries, Stroke 40:1827–1833.

7. Emiola, A., Akinremi, O., Slominski, B., Nyachoti, CM. (2009.): Nutrient utilization and manure P excretion in growing pigs fed cornbarley - soybean based diets supplemented with microbial phytase, Anim Sci J 80:19–26.

8. Fischer, K., Van der Bom, JG., Molho, P., Negrier, C., Mauser-Bunschoten, EP., Roosendaal, G., De Kleijn, P., Grobbee, DE., Van den Berg, HM. (2002.): Prophylactic versus on-demand treatment strategies for severe haemophilia: A comparison of costs and long-term outcome, Haemophilia 8:745–752.

9. Hao, YH., Yong, HY., Murphy, CN., Wax, D., Samuel, M., Rieke, A., Lai, L., Liu, Z., Durtschi, DC., Welbern, VR., Price, EM., McAllister, RM., Turk, JR., Laughlin, MH., Prather, RS., Rucker, EB. (2006.): Production of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) over-expressing piglets,Transgenic Res 15:739–750.

10. Klassen, H., Warfvinge, K., Schwartz, PH., Kiilgaard, JF., Shamie, N., Jiang, C., Samuel, MS., Scherfig, E., Prather, RS., Young, MJ. (2008.): Isolation of progenitor cells from GFP-transgenic pigs and transplantation to the retina of allorecipients, Cloning Stem Cells 10:391–402.

11. Kragh, PM., Nielsen, AL., Li, J., Du, Y., Lin, L., Schmidt, M., Břgh, IB., Holm, IE., Jakobsen, JE., Johansen, MG., Purup, S., Bolund, L., Vajta, G., Jřrgensen, AL. (2009.):

Hemizygous minipigs produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer's disease-causing dominant mutation APPsw, Transgenic Res 18:545–558.
12. Lai, L., Park, KW., Cheong, HT., Samuel, M., Bonk, A., Im, GS, Rieke, A., Day, BN., Murphy, CN., Carter, DB., Prather, RS. (2002.): Transgenic pig expressing the enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicine- treated fibroblasts as donor cells, Mol Reprod Dev 62: 300–306
13. Lunney, J.K. (2007.): Advances in Swine Biomedical Model Genomics, International Journal of Biological Sciences ISSN 1449-2288
14. Matsunari, H., Onodera, M., Tada, N., Mochizuki, H., Karasawa, S., Haruyama, E., Nakayama, N., Saito, H., Ueno, S., Kurome, M., Miyawaki, A., Nagashima, H. (2008.): Transgenic-cloned pigs systemically expressing red fluorescent protein, Kusabira-Orange, Cloning Stem Cells 10:313–323.
15. Meyerholz, DK., Stoltz, DA., Namati, E., Ramachandran, S., Pezzulo, AA., Smith, AR., Rector, MV., Suter, MJ., Kao, S., McLennan, G., Tearney, GJ., Zabner, J., McCray, PB., Jr., Welsh, MJ. (2010.): Loss of CFTR function produces abnormalities in tracheal development in neonatal pigs and young children, Am J Respir Crit Care Med 182:1251–1261.
16. Miao, X. (2012.): Recent Advances and Applications of Transgenic Animal Technology, China
17. Park, KW., Cheong, HT., Lai, L., Im, GS., K€uhholzer, B., Bonk, A., Samuel, M., Rieke, A., Day, BN., Murphy, CN., Carter, DB., Prather, RS. (2001.): Production of nuclear transfer-derived swine that express the enhanced green fluorescent protein., Anim Biotechnol 12:173–181
18. Park, KW., Choi, KM., Hong, SP., Han, GS., Yoo, JY., Jin, DI., Seol, JG., Park, CS. (2008.): Production of transgenic recloned piglets harboring the human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) gene from porcine fetal fibroblasts by nuclear transfer, Theriogenology 70:1431–1438.
19. Renner, S., Fehlings, C., Herbach, N., Hofmann, A., Von Waldthausen, DC., Kessler, B., Ulrichs, K., Chodnevskaja, I., Moskalenko, V., Amselgruber, W., G€oke, B., Pfeifer, A., Wanke, R., Wolf, E. (2010.): Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function, Diabetes 59:1228–1238.
20. Rogers., CS., Hao, Y., Rokhlina, T., Samuel, M., Stoltz ,DA., Li, Y., Petroff, E., Vermeer, DW., Kabel, AC., Yan, Z., Spate, L., Wax, D., Murphy, CN., Rieke, A.,

Whitworth, K., Linville, ML., Korte, SW., Engelhardt, JF., Welsh, MJ., Prather, RS. (2008.): Production of CFTR-null and CFTR-DeltaF508 heterozygous pigs by adeno-associated virus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer, J Clin Invest 118:1571–1577.

21. Saeki, K., Matsumoto, K., Kinoshita, M., Suzuki, I., Tasaka, Y., Kano, K., Taguchi, Y., Mikami, K., Hirabayashi, M., Kashiwazaki, N., Hosoi, Y., Murata, N., Iritani, A. (2004.): Functional expression of a Delta12 fatty acid desaturase gene from spinach in transgenic pigs, Proc Natl Acad Sci USA 101:6361–6366.

22. Spencer, JD., Gaines, AM., Berg, EP., Allee, GL. (2005.): Diet modifications to improve finishing pig growth performance and pork quality attributes during periods of heat stress, J Anim Sci 83:243–254.

23. Stoltz, DA., Meyerholz, DK., Pezzulo, AA., Ramachandran, S., Rogan, MP., Davis, GJ., Hanfland, RA., Wohlford-Lenane, C., Dohrn CL., Bartlet, JA., Nelson, GA IV., Chang, EH., Taft, PJ., Ludwig, PS., Estin, M., Hornick, EE., Launspach, JL., Samuel, M., Rokhlina, T., Karp, PH., Ostedgaard, LS., Starner, TD., Horswill, AR., Brogden, KA., Prather, RS., Richter, SS., Shilyansky, J., McCray, PB., Jr., Zabner, J., Welsh, MJ. (2010.): Cystic fibrosis pigs develop lung disease and exhibit defective bacterial eradication at birth, Sci Transl Med 2:29ra31.

24. Swanson, ME., Martin, MJ., O'Donnell, JK., Hoover, K., Lago, W., Huntress, V., Parsons, CT., Pinkert, CA., Pilder, S., Logan, JS. (1992.): Production of functional human hemoglobin in transgenic swine, Biotechnology 10:557–559.

25. Umeyama, K., Watanabe, M., Saito, H., Kurome, M., Tohi, S., Matsunari, H., Miki, K., Nagashima, H. (2009.): Dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1alpha induces diabetes in transgenic- cloned pigs, Transgenic Res 18:697–706.

26. Van Cott, KE., Butler, SP., Russell, CG., Subramanian, A., Lubon, H., Gwazdauskas, FC., Knight, JW., Drohan, WN., Velander, WH. (1999.): Transgenic pigs as bioreactors: A comparison of gammacarboxylation of glutamic acid in recombinant human protein C and factor IX by the mammary gland, Genet Anal Biomol E 15:155–160.

27. Van Cott, KE., Lubon, H., Gwazdauskas, FC., Knight, JW., Drohan, WN., Velander, WH. (2001.): Recombinant human protein C expression in the milk of transgenic pigs and the effect on endogenous milk immunoglobulin and transferrin levels, Transgenic Res 10:43–51.

28. Walsh, DM., Klyubin, I., Shankar, GM., Townsend, M., Fadeeva, JV., Betts, V., Podlisny, MB., Cleary, JP., Ashe, KH., Rowan, MJ., Selkoe, DJ. (2005.): The role of cell-

derived oligomers of Abeta in Alzheimer's disease and avenues for therapeutic intervention, Biochem Soc Trans 33:1087– 1090.

29. Webster, NL., Forni, M., Bacci, ML., Giovannoni, R., Razzini, R., Fantinati, P., Zannoni, A., Fusetti, L., Dalpra, L., Bianco, MR., Papa, M., Seren, E., Sandrin, MS., Mc Kenzie, IF., Lavitrano, M. (2005.): Multi-transgenic pigs expressing three fluorescent proteins produced with high efficiency by sperm mediated gene transfer, Mol Reprod Dev 72:68–76.

30. Wheeler, M.B., Walters, E.M. (2001.): Transgenic technology and applicationsin in swine, Illinois

31. Whyte, J.J., Prather, R.S., (2011.): Genetic Modifications of Pigs for Medicine and Agriculture, Molecular Reproduction & Development 78:879–891 (2011), Columbia, Missouri

7. SAŽETAK

Transgene životinje su životinje koje su na bilo koji način genetski modificirane. Danas transgene životinje koristimo kao modele u istraživanjima o prijenosu gena, kao bioreaktori za proizvodnju različitih proteina, za uzgoj tkiva i organa za transplantaciju. Znanstvenici imaju cilj u budućnosti stvoriti transgene domaće životinje i njihove klonove u svrhu dobivanja "elitne" rase koja bi davala kvalitetno meso, mlijeko, jaja i sl.

Raznim načinima se pokušavalo doći do transgenih životinja, neki su više, a neki manje uspješni. U posljednjih 20 godina, mikroinjektiranje DNA postala je najčešća metoda prijenosa gena u životinja. Ostale metode uvođenja transgene DNA u svrhu stvaranje transgenih životinja je prijenos gena putem spermija, embrionalnih matičnih stanica, virusnih vektora, adenovirusom. Trenutni naglasak na stvaranje transgenih životinja stavljen je na nuklearni prijenos somatskih stanica

Genetičko inženjerstvo ima široku primjenu u svim područjima prirodnih znanosti. Proučavanje ljudskih bolesti na životinjskim modelima, pomaže znanstvenicima u boljem razumijevanju patogenih bolesti i na taj način osigurava potrebne alate za razvoj genske terapije za liječenje bolesti. Tehnologija rekombinantne DNA koristi se u biomedicini, farmaceutskoj industriji te u poljoprivredi.

8. SUMMARY

Transgenic animals are animals that have been genetically modifeid in some way. Today transgenic animals are used as models in research on the gene transfer, as bioreactors for creating different kinds of proteins, for tissue growth and for organ transplantation. Scientists have a goal in the future to create transgenic domestic animals and their clones with the purpose of creating an elite rise which would give quality meat, dairy, egg, etc. There are different ways to create transgenic animals, some are more, and some less successful. In the last 20 years, microinjection of DNA has become the most common way of transferring genes into animals. Other methods of introducing transgenic DNA with the purpose of creating animals in the transfer of genes through sperm, embryonic stem cells, virus vectors and adenoviruses. Currently the emphasis on creating transgenic animals is placed on the nuclear transfer of somatic cells. Genetic engineering has a wide application in all parts of natural sciences. Studying human diseases on animal models helps scientists have a better understanding of pathological diseases and in such a way secures the necessary tools for the genetic therapy for curing diseases. The technology of recombination DNA is used in biomedicine, pharmaceutical industry and in agriculture.

9. POPIS SLIKA

Slika 1. Transgene svinje za uzgoj pluća (http://www.spacedaily.com/reports/Transgenic_Animals_Produced_Using_Cultured_Sperm.html)

Slika 2. Transplatacija zametnih stanica i transgeneza

(http://people.ucalgary.ca/~idlab/Research.html)

Slika 3. Svinje kod kojih je izražen multi-fluorescentni gen (http://www.buzzfeed.com/alisonvingiano/scientists-in-china-made-glow-in-the-dark-pigs#.aeJ4Oqw9z)

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Završni rad

PRIMJENA TRANSGENIH TEHNOLOGIJA U ZOOTEHNICI

Antonela Špehar

Sažetak: Transgene životinje su životinje koje su na bilo koji način genetski modificirane. Danas transgene životinje koristimo kao modele u istraživanjima o prijenosu gena, kao bioreaktori za proizvodnju različitih proteina, za uzgoj tkiva i organa za transplataciju. Znanstvenici imaju cilj u budućnosti stvoriti transgene domaće životinje i njihove klonove u svrhu dobivanja "elitne" rase koja bi davala kvalitetno meso, mlijeko, jaja i sl. Raznim načinima se pokušavalo doći do transgenih životinja, neki su više, a neki manje uspješni. U posljednjih 20 godina, mikroinjektiranje DNK postala je najčešća metoda prijenosa gena u životinja. Ostale metode uvođenja transgene DNK u svrhu stvaranje transgenih životinja je prijenos gena putem spermija, embrionalnih matičnih stanica, virusnih vektora, adenovirusom. Trenutni naglasak na stvaranje transgenih životinja stavljen je na nuklearni prijenos somatskih stanica. Genetičko inženjerstvo ima široku primjenu u svim područjima prirodnih znanosti. Proučavanje ljudskih bolesti na životinjskim modelima, pomaže znanstvenicima u boljem razumijevanju patogenih bolesti i na taj način osigurava potrebne alate za razvoj genske terapije za liječenje bolesti. Tehnologija rekombinantne DNA koristi se u biomedicini, farmaceutskoj industriji te u poljoprivredi.

Ključne riječi: transgene životinje, DNK, geni, somatske stanice

APPLICATION OF TRANSGENIC TECHNOLOGIES IN ZOOTEHNIQUES

Summary: Transgenic animals are animals that have been genetically modifeid in some way. Today transgenic animals are used as models in research on the gene transfer, as bioreactors for creating different kinds of proteins, for tissue growth and for organ transplantation. Scientists have a goal in the future to create transgenic domestic animals and their clones with the purpose of creating an elite rise which would give quality meat, dairy, egg, etc. There are different ways to create transgenic animals, some are more, and some less successful. In the last 20 years, microinjection of DNA has become the most common way of transferring genes into animals. Other methods of introducing transgenic DNA with the purpose of creating animals in the transfer of genes through sperm, embryonic stem cells, virus vectors and adenoviruses. Currently the emphasis on creating transgenic animals is placed on the nuclear transfer of somatic cells. Genetic engineering has a wide application in all parts of natural sciences. Studying human diseases on animal models helps scientists have a better understanding of pathological diseases and in such a way secures the necessary tools for the genetic therapy for curing diseases. The technology of recombination DNA is used in biomedicine, pharmaceutical industry and in agriculture.

Key words: transgenic animals, DNA, genes, somatic cells

Datum obrane: 26.9.2016