

## Knock-out genowy - zastosowanie w badaniach medycznych

MAGDALENA GÓRSKA\*, MAREK L. KOWALSKI

Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej Akademii Medycznej, ul. Mazowiecka 11, 92-215 Łódź

\*Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze Immunologii AM w Łodzi

Knock-out genowy jest to nowa metoda biologii molekularnej polegająca na usunięciu określonej sekwencji z chromosomalnego DNA, co równoznaczne jest z brakiem syntezy białka kodowanego przez wycięty gen. Jeżeli używa się do tego celu komórek embrionalnych, może powstać z nich nowy organizm nie posiadający określonej, kodowanej przez dany gen cechy. Do tej pory udało się tego dokonać jedynie u myszy. Zwierzęta, u których wszystkie lub część komórek nie wykazują ekspresji określonego genu, usuniętego w wyniku manipulacji genetycznych nazywamy zwierzętami knock-out. Obecnie technikę knock-out'u genowego wykorzystuje się we wszystkich dziedzinach medycyny i biologii. W sposób bardzo prosty pomaga wyjaśnić złożone funkcje pojedynczych białek w organizmie, służy do tworzenia modeli zwierzęcych różnych chorób a także do wprowadzania nowych form terapii. Wniosła ona wiele nowych informacji do immunologii oraz wiedzy o chorobach alergicznych.

### SŁOWNICZEK

<b>Delecja</b>	- usunięcie określonej sekwencji z DNA
<b>Egzon</b>	- fragment genu, który ulega odczytowi, sekwencje takie poprzedzielane są intronami, czyli fragmentami niekodującymi
<b>Klonowanie genów</b>	- technika namnażania obcych genów w bakteriach lub innych komórkach, wykorzystująca wektory jako ich nośniki
<b>Plazmid</b>	- kolisty pozachromosomalny fragment DNA obecny w bakteriach, używany jako wektor
<b>Promotor</b>	- fragment DNA poprzedzający gen, regulujący jego odczyt
<b>Rekombinacja homologiczna</b>	- wymiana pomiędzy sekwencjami DNA o podobnym składzie zasad
<b>Transkrypcja</b>	- odczyt genu, czyli przepisanie informacji z DNA na informacyjny RNA
<b>Translacja</b>	- odczyt informacyjnego RNA i przepisanie informacji w nim zawartych na białko
<b>Wektor</b>	- fragment DNA pochodzenia bakteryjnego lub wirusowego, do którego może być wprowadzona nowa sekwencja; używany w technikach klonowania
<b>Zwierzęta transgeniczne</b>	- zwierzęta z dodatkowym, ulegającym ekspresji genem

### Zwierzęta transgeniczne

Pierwszą próbą modyfikacji DNA na tyle trwałej, by zmieniona informacja genetyczna mogła zostać przekazana potomstwu są tzw. zwierzęta transgeniczne, u których każda komórka zawiera dodatkowy, obcy gen. Myszy takie tworzy się wstrzykując do zapłodnionego oocyta DNA zawierające nowy gen i wymuszając stałą jego ekspresję. Nowa sekwencja DNA może być odczytywana we wszystkich tkankach lub tylko w wybranych komórkach organizmu. Zależy to od wyboru promotora, a więc fragmentu DNA, który reguluje transkrypcję (odczyt) określonego genu. Z pierwszą sytuacją mamy do czynienia gdy połączymy nowy gen z promotorem genu niezbędnego do życia każdej komórki np. genu dla aktyny. Połączenie obcej sekwencji z promotorem specyficznym tkankowo np. z promotorem genu dla insuliny ogranicza jej odczyt do komórek wysp trzustkowych. Z natury rzeczy technika tworzenia zwierząt transgenicznych pozwala zatem na studiowanie cech przekazywanych w sposób dominujący. Wniosła ona wiele do wiedzy nad sposobem dziedziczenia szeregu chorób. Na przykład, połączenie protoonkogenu c-ras z sekwencjami regulującymi genu elastazy powoduje rozwój raka trzustki u zwierząt. Nowotwory rozwijają się również u myszy powstałej z zapłodnionego oocyta, do którego wstrzyknięto gen c-myc. U transgenicznych zwierząt cechujących się nadmierną ekspresją prekursora amyloidowego białka  $\beta$  (APP) obserwuje się zmiany w mózgu naśladujące chorobę Alzheimera.

Jeszcze kilkanaście lat temu hodowanie nowych zwierząt o pożądanym cechach poprzez ingerencję w ich genom wydawało się jedynie spekulacją. Dziś, dzięki postępowi biologii molekularnej marzenia te są realizowane w placówkach naukowych na całym świecie.

## Technika knock-out'u genowego

Studiowanie chorób dziedziczających się recesywnie wymagało jednak opracowania innego modelu. W schorzeniach recesywnych bowiem czynnikiem sprawczym nie jest nadmierna ilość lub wzmożona aktywacja określonego białka, ale jego brak lub też wadliwa, wpływająca na funkcję budowa. Zwierzęcy model choroby recesywnej wymaga zatem inaktywacji genu odpowiedzialnego za stan patologiczny.

Metodą używaną w tym przypadku jest technika tzw. knock-out'u genowego (ryc. 1.). Wykorzystuje ona zjawisko tzw. rekombinacji homologicznej czyli reakcji wymiany pomiędzy DNA chromosomalnym a obcą, nowo wprowadzoną sekwencją. Rekombinacja homologiczna oznacza wymianę pomiędzy fragmentami DNA o podobnym składzie zasad. Mamy z nią do czynienia np. podczas mejozy, kiedy to wymianie ulegają odpowiadające sobie odcinki DNA chromosomów jednej pary. W omawianej technice wymiana następuje pomiędzy wektorem, czyli obcym fragmentem DNA - nośnikiem zainaktywowanego genu mającym zdolność reakcji z DNA gospodarza, a odpowiadającą mu sekwencją w genomie gospodarza. Technika ta bywa dlatego nazywana celowaniem genomowym (gene targeting).

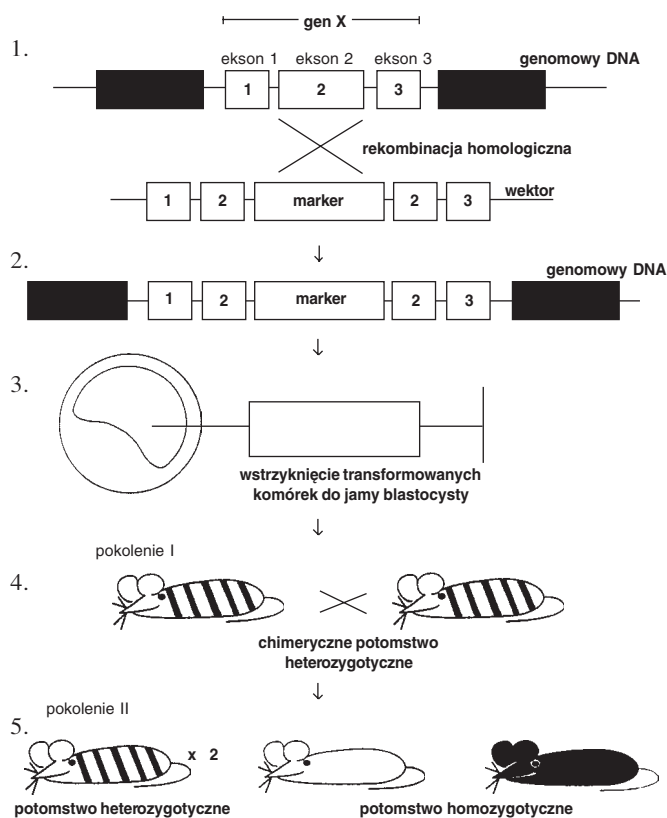
Inaktywacja genu w wektorze polega na jego rozbięciu poprzez wstawienie doń markera selekcji. Marker selekcji to sekwencja DNA pozwalająca na odróżnienie komórek, w których zaszedł proces rekombinacji. Marker selekcji zostaje w ten sposób oflankowany fragmentami byłego genu, dzięki obecności których nadal możliwa jest rekombinacja homologiczna z sekwencją natywną genomu.

Komórki, w których następuje rekombinacja muszą odznaczać się pewnymi cechami. Przede wszystkim powinny być mieć zdolność różnicowania się w każdą inną komórkę organizmu. Po drugie ich wskaźnik mitotyczny musi być wysoki, czyli muszą ulegać częstym podziałom. Cechy te pozwalają takim komórkom na odtworzenie całego organizmu [1,2].

## Etapy tworzenia myszy knock-out

Pierwszym etapem w tworzeniu myszy knock-out jest przygotowanie wektora, fragmentu DNA o znanej sekwencji zawierającego nieczynny gen. Stosuje się tutaj standardowe techniki klonowania. Klonowanie jest to technika namnażania obcych genów w bakteriach lub innych komórkach, wykorzystująca wektory jako nośniki. Wektor zostaje wprowadzony do komórki w procesie tzw. elektroporacji, w którym dzięki impulsom prądu elektrycznego błona cytoplazmatyczna staje się przepuszczalna dla DNA ze środowiska.

Markerem selekcji może być np. gen oporności na antybiotyk neomycynę (neo). Komórki nie zawierające tego genu a więc te, w których wektor nie wbudował się do DNA (innymi słowy, w których nie zaszła rekombinacja homologiczna pomiędzy wektorem



Ryc. 1. Etapy tworzenia myszy knock-out.

1. Rekombinacja homologiczna pomiędzy genem X w genomowym DNA komórki embrionalnej a wektorem niosącym sekwencję homologiczną, rozbitą przez marker selekcji.
2. Selekcja komórek na pożywce z antybiotykiem.
3. Wstrzyknięcie komórek, które przetrwały selekcję do jamy blastocysty oraz implantacja blastocysty w macicy matki zastępczej.
4. Potomstwo otrzymane poprzez zmieszanie komórek blastocysty z komórkami transformowanymi.
5. Potomstwo otrzymane po skrzyżowaniu chimer pierwszego pokolenia.
  - 1, 2, 3 - ekson 1, 2, 3 genu X
  - mysz w paski - mysz zbudowana z komórek pochodzących z blastocysty oraz z komórek transformowanych (pozbawionych genu X)
  - mysz czarna - mysz w całości zbudowana z komórek nie wykazujących ekspresji genu X
  - mysz biała - mysz w całości zbudowana z komórek posiadających gen X

a genomowym DNA), giną na pożywce zawierającej antybiotyk. Przeżywają tylko komórki, w których dochodzi do ekspresji kodowanego przez gen neo enzymu inaktywującego neomycynę. Komórki te pozbawione teraz aktywnego genu zostają następnie wstrzyknięte do jamy blastocysty otrzymanej z macicy ciężarnej myszy. Komórki transgeniczne łączą się z komórkami węzła zarodkowego i wkrótce są od nich nieodróżnialne. Alternatywną metodą wprowadzania komórek transgenicznych do zarodka jest ich agregacja

z komórkami moruli. Blasocystę, lub morulę wprowadza się do macicy matki zastępczej. Potomstwo uzyskane od tej matki wykazuje heterozygotyczność (+/-), co w tym przypadku oznacza, że połowa komórek nowego organizmu pochodzi z puli komórek transformowanych wektorem, a połowa z węzła zarodkowego. Skrzyżowanie tak uzyskanych chimericznych myszy daje 25% szansy na otrzymanie homozygoty (-/-) w drugim pokoleniu [3]. Statystycznie więc 1/4 myszy drugiego pokolenia jest zbudowana wyłącznie z komórek nie wykazujących ekspresji określonego genu, a więc jest myszami knock-out (ryc. 1).

### Kinaza tymidynowa

Uproszczony model rekombinacji homologicznej przedstawiony powyżej rodzi w praktyce pewne trudności, a podstawowym problemem jest niska wydajność opisanego metody. Wynika ona z częstego występowania rekombinacji przypadkowej, w której bierze udział inny niż docelowy fragment genomu. Przewyciężenie tej trudności jest możliwe dzięki wprowadzeniu do wektora dodatkowego markera selekcji - genu dla kinazy tymidynowej (HSV-tk). Włączenie nowego genu pozwala na eliminację komórek, w których proces rekombinacji zaszedł w sposób nieprawidłowy.

Wektor zawiera więc gen X, homologiczny dla docelowej sekwencji DNA, przecięty przez sekwencję neo oraz wspomniany gen kinazy tymidynowej pochodzący z wirusa Herpes simplex (HSV-tk), ograniczający jeden z fragmentów rozbitego genu X (HSV-tk) [1,2,4]. Gen oporności na neomycynę oraz gen dla kinazy tymidynowej znajdują się pod kontrolą tego samego, silnego promotora dla kinazy tymidynowej co gwarantuje dużą wydajność selekcji.

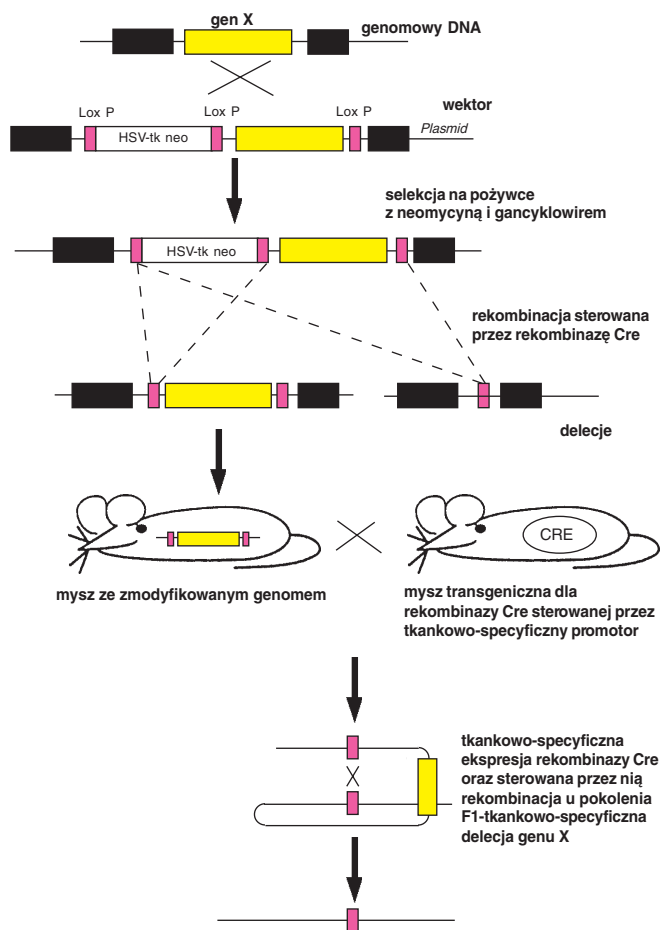
Gdy wektor ulega przypadkowemu włączeniu w obręb DNA gospodarza istnieje wysokie prawdopodobieństwo, że gen HSV-tk również zostanie wbudowany. Dzieje się tak ponieważ używany wektor ma strukturę linową, a większość przypadkowych integracji egzogenego, liniowego DNA zachodzi przez jego wolne końce. Wektor ulega zatem w całości wbudowaniu do DNA komórki. Kinaza tymidynowa katalizuje reakcję fosforylacji znajdującego się w pożywce gancyklowiru, czyniąc go silnie toksycznym dla komórek. Komórki, w których zaszła integracja przypadkowa posiadają czynny gen X oraz są neo+, HSV-tk+, przez co giną na pożywce zawierającej neomycynę z gancyklowirem.

Rekombinacja homologiczna zachodzi między genem X z DNA gospodarza a regionami homologii, stanowiącymi część rozbitego w wektorze genu X, znajdującymi się po obu stronach markera selekcji neo. Ponieważ gen HSV-tk leży na zewnątrz segmentu: zinaktywowany gen X - marker selekcji, nie ulega integracji w obręb DNA, a więc także ekspresji. Komórki, w których rekombinacja homologiczna miała

miejsce (neo+, HSV-tk -) są więc odporne zarówno na neomycynę jak i na gancyklowir.

### System rekombinazy Cre

U myszy knock-out otrzymanej opisaną wyżej metodą, żadna z komórek nie wykazuje obecności mRNA dla badanego genu. Brak ekspresji określonej sekwencji cechuje wszystkie etapy życia embrionalnego i postnatalnego. Tak skonstruowana mysz nie nadaje się zatem ani do badania genów, których mutacje powodują letalność, ani do studiowania genów ulegających ekspresji tylko w określonych tkankach. Możliwe jest to jedynie w modelu, w którym istnieją warunki do ekspresji genu tylko w wybranych komórkach i na pewnym etapie rozwoju. W tym celu stworzona została alternatywna technika konstrukcji myszy knock-out, oparta o system wykorzystujący miejscowo - swoistą, a zatem rozpoznającą tylko określone fragmenty DNA, rekombinazę Cre. Katalizuje ona rekombinację między tzw. miejscami loxP (ryc. 2) [5,6]. W specjalnie skonstruowanym do tego celu wektorze miejsca te ograniczają kolejno: gen X oraz kasetę oporności na neomycynę i gancyklowir (HSV-tk neo). Wektor jest tak zaprojektowany, że w wyniku rekombinacji homologicznej pomiędzy nim a genomowym DNA integracji w obręb genomu gospodarza ulega zarówno czynny jak dotąd gen X, jak i segment HSV-tk neo. Wymiana fragmentów DNA pomiędzy wektorem a genomowym DNA prowadzi więc nie tyle do inaktywacji badanego genu, ile do włączenia kasety oporności oraz miejsc loxP. Komórki, w których integracja wektorowego DNA zaszła w sposób prawidłowy przeżywają na pożywce z neomycyną i gancyklowirem. Przejściowa obecność rekombinazy Cre w takich komórkach daje dwa typy delecji, czyli utraty fragmentu DNA. Delecje zachodzą tu na skutek rekombinacji między miejscami loxP, katalizowanej przez enzym. Delecja kasety oporności (HSV-tk neo) wraz z badanym genem, zachodząca na skutek reakcji między segmentami loxP, ograniczającymi z zewnątrz gen X oraz kasetę oporności jest letalna, gdyż komórki nie potrafią przeżyć bez czynnego genu X. Komórki, w których wycięta została jedynie sekwencja HSV-tk neo (rekombinacja pomiędzy miejscami loxP ograniczającymi blok oporności) służą do konstrukcji myszy. Zawierają one czynny gen X, oflankowany sekwencjami loxP. Procedura tworzenia takiej myszy jest identyczna z metodą opisaną powyżej. Zostaje ona następnie skrzyżowana z myszą transgeniczną dla rekombinazy Cre, której gen znajduje się pod kontrolą tkankowo-zależnego promotora, co oznacza, że rekombinaza Cre jest obecna jedynie w określonym narządzie. U potomstwa badany fragment DNA ograniczony przez miejsca loxP wycinany jest więc jedynie w tkance, w której zaszła transkrypcja rekombinazy Cre.



Ryc. 2. System rekombinazy Cre (wg. Galli-Taliadoros L.A. i wsp., J.Immunol.Methods 1995, 181: 1 - 15)

System wykorzystujący miejscowo - specyficzną rekombinazę Cre, katalizującą wymianę pomiędzy sekwencjami LoxP. Po rekombinacji homologicznej pomiędzy genomowym DNA a wektorem na skutek reakcji pomiędzy miejscami LoxP, dochodzi do dwóch typów delecji sterowanych przez enzym: usunięcia genu X wraz z nowo wprowadzonym markerem selekcji HSV-tk neo lub tylko markera selekcji. Komórki, w których zachodzi reakcja pierwsza służą do konstrukcji myszy chimerycznej. Gen X u takiej myszy jest otoczony przez sekwencje LoxP i ulega ekspresji. Po skrzyżowaniu tej myszy z myszą transgeniczną dla rekombinazy Cre, której gen pozostaje pod kontrolą tkankowo-specyficznego promotora otrzymuje się potomstwo u którego gen X ulega usunięciu jedynie w tych tkankach, gdzie enzym jest obecny (dokładne objaśnienia w tekście).

LoxP - sekwencje rozpoznawane przez rekombinazę Cre  
 HSV - tk neo - marker selekcji  
 Cre - rekombinaza Cre

### Komórki wielopotencjalne

Jak już powiedziano, komórki podlegające transformacji muszą wykazywać wielopotencjalność. Początkowo w celu konstrukcji myszy knock-out używano komórek wywodzących się z raka zarodkowego [7], co wiązało się jednak z istotnymi ograniczeniami. Przede wszystkim populacja różnych linii komórkowych wykazywała heterogenność pod względem zdolności do różnicowania i łączenia się

z komórkami embrionu gospodarza. Dzisiaj w miejsce linii nowotworowych stosowane są embrionalne komórki macierzyste, izolowane z węzła zarodkowego blastocyst [8,9,10]. Komórki macierzyste można również otrzymać z oocyta dzielącego się partogenetycznie, tzn. takiego, u którego indukuje się podziały bez udziału gamety męskiej. Preferowaną linią komórkową jest linia XY. Kariotyp 40 XY jest bardziej stabilny w hodowli, w porównaniu z 40 XX, gdzie często obserwuje się utratę jednego z chromosomów X.

Macierzyste komórki embrionalne hoduje się na warstwie komórek odżywczych (feeder cells). Są to embrionalne fibroblasty pozbawione zdolności podziału wskutek naświetlania promieniami g. Efekt ten można także uzyskać poprzez traktowanie ich mitomycyną C. Szybko dzielące się komórki odżywcze zużywają duże ilości materiałów energetycznych. Zahamowanie podziałów fibroblastów wspomagających ma więc na celu oszczędzenie pożywki. Komórki wspomagające posiadają zdolność produkcji LIF (Leukaemia Inhibiting Factor - czynnik hamujący białaczkę). LIF hamuje różnicowanie macierzystych komórek embrjonalnych, a tym samym utrzymuje ich zdolność do wielokierunkowego różnicowania się [11]. Tylko takie komórki mogą być transformowane wektorem i przeniesione do blastocysty.

### Sprawdzanie wyników transformacji oraz analiza chimer

Komórki macierzyste zawierające nieaktywny gen, przeżywające selekcję na pożywce z neomycyną i gancycloirem poddawane są ostatecznej weryfikacji mającej na celu sprawdzenie wydajności i sposobu rekombinacji. Wykorzystując techniki PCR [12,13] lub Southern blotting [4] można sprawdzić, czy rzeczywiście zawierają oczekiwaną sekwencję DNA. Badanie kariotypu zaś ma na celu selekcję komórek zawierających prawidłową liczbę chromosomów [14]. Komórki embrionalne jako komórki szybko dzielące się cechuje bowiem skłonność do aberacji chromosomowych.

Badanie za pomocą PCR wykorzystuje dwie pary primerów. Jeden starter z pary jest homologiczny do sekwencji genu oporności na neomycynę. Amplifikacji ulega więc tylko DNA pochodzące z komórek, w których zaszło zdarzenie rekombinacyjne. W metodzie Southern blotting używane są sondy rozpoznające sekwencje należące do badanego genu oraz do genu oporności na neomycynę. Łączą się one jedynie z DNA tych komórek, które wbudowały unieczynniony gen wraz z markerem selekcji.

Najprostszym sposobem potwierdzenia homo- lub heterozygotyczności potomstwa jest analiza pigmentacji. Używane komórki macierzyste i blastocysty pochodzą z dwóch różnych szczepów myszy. Jeden szczep cechuje brązowe, drugi czarne zabarwienie futerka. Myszy otrzymane tą metodą są brązowo-czarne,

po ich skrzyżowaniu uzyskujemy zwierzęta czarne, brązowe (homozygoty) oraz brązowo-czarne (heterozygoty). Innym markerem służącym do identyfikacji chimerizmu jest enzym polimorficzny - izomeraza glukozo-6-fosforanowa [14].

Polimorfizm oznacza, że sekwencje DNA kodujące dane białko są różne dla poszczególnych osobników, co nie zmienia jednak jego funkcji. Mysz chimeryczna, a zatem zbudowana z dwóch różnych populacji komórek powinna posiadać zarówno wybrany izomer enzymu kodowany przez DNA komórek ze zinaktywowanym genem, wprowadzanych do blastocysty, jak i izomer pochodzący z samych komórek blastocysty. Mysz knock-out powinna natomiast zawierać tylko sekwencje kodujące izomerażę komórek transformowanych.

### Zastosowanie myszy knock-out w medycynie

Myszy knock-out są w tej chwili wykorzystywane w medycynie doświadczalnej, jako doskonałe modele różnych chorób. W kardiologii za pomocą tej techniki próbuje się więc dociekać przyczyn nadciśnienia poprzez usunięcie genu dla przedsiorkowego peptydu natriuretycznego. W badaniu otyłości ocenia się rolę mutacji w genie dla receptora adrenergicznego  $\beta_3$ , w celu studiowania miażdżycy oraz hiperlipidemii zmieniono sekwencje kodujące apolipoproteinę E oraz receptor dla LDL.

W dziedzinie onkologii doskonałym przykładem zastosowania myszy knock-out są modele zespołu Li-Fraumeni, w którym obserwuje się zwiększoną zapadalność na niektóre nowotwory, w tym na raka sutka u kobiet. Mysz taką konstruuje się poprzez zmiany w genie dla czynnika transkrypcyjnego zaangażowanego w proces apoptozy - p53. Nerwiakowłókniakowatość bada się usuwając gen dla NF-1 (ang. neurofibromatosis type 1), kodujący czynnik kontrolujący białko ras; retinoblastoma usuwając gen Rb dla białka będącego inhibitorem progresji cyklu komórkowego.

Geny supresorowe dla transformacji nowotworowej mają często znaczenie w organogenezie. Przy pomocy knock-out'u genowego wykazano, iż gen WT-1 (Wilms Tumor 1, zmutowany w nephroblastoma) jest niezbędny dla prawidłowego rozwoju nerki. Dzięki tej technice udowodniono rolę receptora dla steroidów ST-1 w kształtowaniu się przyszłych gonad oraz nadnerczy, miogeniny - w powstawaniu mięśni szkieletowych, GATA-1 (czynnik transkrypcyjny obecny w wielu komórkach szpiku oraz krwi) w erytro- oraz limfopoecie. Brak genu dla IGF II (Insulinopodobny czynnik wzrostu II) okazał się przyczyną hipotrofii wewnętrznej.

Neurologom konstrukcja myszy pozbawionej kinazy kalmoduliny II pozwoliła na rozstrzygnięcie, co jest przyczyną ubytku w pamięci krótkotrwałej. Usunięcie największego znanego genu u człowieka, kodującego białko sarkolemmy - dystrofinę umożliwiło studiowanie dystrofii mięśniowej typu Duchenne. Niestety nie udało

się stworzyć modelu płasawicy Huntingtona, gdyż mysz pozbawiona sekwencji związanej z tą chorobą ginie we wczesnych etapach życia płodowego.

Pulmonolodzy skonstruowali mysz pozbawioną białka regulującego aktywność kanału chlorkowego - CFTR, którego dysfunkcja powoduje mukowiscydozę. Gastrologom udało się wykazać, że przyczyną choroby Hirschsprunga jest mutacja w receptorze dla endoteliny. W hematologii istnieją mysie modele talasemii oraz hemofilii A [15].

### Alergia atopowa i astma

Metoda knock-out'u genowego wykorzystywana jest również do badania patogenezy astmy oskrzelowej. Niezwykle intrygującym jest fakt, że u myszy nie wykazujących ekspresji protoonkogenu c-kit (co wiąże się z brakiem komórek tucznych) [23] oraz myszy pozbawionych IgE [24] można wywołać wstrząs anafilaktyczny z następczym napływem eozynofików do tkanki płucnej. Wycięcie genu kodującego receptor dla immunoglobuliny G (Fc $\gamma$ R2) powoduje wzmoczoną wrażliwość komórek tucznych na bodźce wyzwalające degranulację [25]. Wiadomo również, iż IgG po związaniu receptora o niskim powinowactwie hamują sekrecję przeciwciał przez limfocyty B a brak tego receptora jest związany ze zwiększeniem stężenia przeciwciał. U myszy pozbawionej IL-4 [23], IL-5 [26] lub MHC II [23] obserwuje się redukcję zapalenia alergicznego i nadreaktywności oskrzelowej. Brak antygenów HLA koreluje z niskim poziomem limfocytów CD 4. Histologiczna analiza tkanki płucnej immunizowanej owalbuminą myszy z wyciętym genem dla IL-4 wykazała znamienne niższą, w porównaniu z myszą kontrolną, ilość komórek odczynu zapalnego, którymi były głównie limfocyty oraz nieliczne eozynofile. W popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL) również obserwowano wyraźną redukcję liczby granulocytów obojętnochłonnych, natomiast liczba limfocytów, makrofagów oraz neutrofilów była porównywalna z kontrolą. Poziom IgE całkowitych jak również IgE specyficznych dla owalbuminy pozostawał poniżej poziomu mierzalności. U immunizowanej owalbuminą myszy pozbawionej IL-5 procentowa zawartość eozynofików we krwi wynosiła ok. 1 i była porównywalna z ich stężeniem przed immunizacją. Analiza BAL-u dała te same wyniki, jak w przypadku myszy knock-out dla IL-4. Poziom IgE natomiast był podniesiony (odbiegał od kontroli), wskazując, że regulacja stężenia IgE oraz liczby eozynofików jest niezależna. U myszy z wyciętym genem dla IL-5 zniesiona była również nadreaktywność oskrzelowa, wywołana u myszy kontrolnej przez immunizację.

### Myszy knock-out w immunologii

Do tej pory skonstruowano kilkadziesiąt myszy knock-out o fenotypie mającym znaczenie w badaniu zjawisk immunologicznych.

Dla zrozumienia patomechanizmu chorób z autoagresji ważne dane uzyskano badając myszy, u których dokonano inaktywacji genów dla antygeny Fas lub jego ligandu. Antygen Fas przewodzi sygnalizację związaną z apoptozą limfocytów, biorąc udział w delecji klonów autoreaktywnych. Myszy pozbawione tego białka lub jego receptora wykazują cechy charakterystyczne dla tocznia układowego [16]. Myszy z wyciętym genem dla IL-10 [17], IL-2 [18,19] lub łańcucha  $\alpha$ ,  $\beta$  jej receptora [20] mają nieswoiste zapalenie jelit (wrzodziejące zapalenie jelita grubego). Interleukina 2 odgrywa zatem w grudkach chłonnych jelita grubego rolę immunosupresora, a nie tylko jak dotąd sądzono, czynnika wzmagającego proliferację i wydłużającego życie limfocytów. Ciekawym jest również fakt, że mysz pozbawiona genu dla łańcucha  $\gamma$  receptora dla interleukiny 2 wykazuje cechy niedoboru odpornościowego, podobnie jak mysz pozbawiona łączącej się z omawianym łańcuchem kinazy JAK 3. Receptor dla IL-2 przewodzi więc dwa różne sygnały owocujące

początkową proliferacją, a następnie limfocytów w przebiegu zapalenia. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że łańcuch  $\gamma$  wchodzi również w skład receptorów dla IL-4, 7, 9, 15. U zwierząt z nieczynnym genem dla znanego immunosupresora - TGF  $\beta$ 1 powstają wielonarządowe zmiany zapalne [21].

W zakresie niedoborów immunologicznych skonstruowano myszy model agammaglobulinemii Brutona (mutacja genu kinazy btk), SCID-ciężkiego złożonego niedoboru odporności (mutacja JAK 3, IL-2R $\gamma$ , RAG-1, 2), niedoboru odporności związanego ze zwiększonym stężeniem IgM (mutacja CD 40 L) oraz przewlekłej choroby ziarniniakowej (cytochrom b - 245) [15,20,22]. Rekombinazy RAG katalizują reakcję łączenia się segmentów genów dla łańcuchów białkowych wchodzących w skład przeciwciał oraz receptora limfocytów T - TCR. Enzymy te zatem stymulują różnicowanie limfocytów T i B. U myszy knock-out dla RAG-1 lub 2 komórki limfoidalne a także inne tkanki wykazują wzmożoną wrażliwość na promieniowanie  $\gamma$ .

Tabela I. Przykłady zastosowania metody knock-out'u genowego w badaniach medycznych

DZIEDZINA MEDYCZYNY	USUNIĘTY GEN	SKUTEK USUNIĘCIA GENU
endokrynologia	predsionkowy peptyd natriuretyczny receptor adrenergiczny b3 apolipoproteina E, receptor dla LDL	nadciśnienie otyłość miażdżyca
onkologia	p53 NF - 1 Rb	zespół Li - Fraumeni nerwiakowłókniakowatość retinoblastoma
neurologia	kinaza kalmoduliny II dystrofina	ubytek w pamięci krótkotrwałej dystrofia mięśniowa typu Duchenne
pulmonologia	CFTR	mukowiscydoza
gastrologia	receptor dla endoteliny	choroba Hirschsprunga
hematologia	a - globina czynnik VIII	talasemia hemofilia A
embriologia	WT - 1 ST - 1 miogenina GATA - 1 bcl - 2 bcl - x bax IGF - II	upośledzony rozwój: nerek gonad, nadnerczy mięśni szkieletowych komórek hemopoetycznych nerek, jelita, limfocytów, spermatocytów układu nerwowego, limfocytów, spermatocytów limfocytów, spermatocytów, komórek warstwy ziarnistej jajnika płodu, jako całości

Tabela II. Przykłady zastosowania knock-out'u genowego w badaniu chorób o podłożu immunologicznym

DZIAŁ IMMUNOLOGII	GEN	SKUTEK USUNIĘCIA GENU
choroby z autoagresji	FAS, FAS ligand IL-10, IL-2, IL-2R $\alpha$ , $\beta$ TGF- $\beta$ 1	toczeń układowy wrzodziejące zapalenie jelita grubego wielonarządowe zmiany zapalne
niedobory immunologiczne	kinaza btk JAK 3, IL-2R $\gamma$ , RAG-1,2 CD 40L cytochrom b-245	agammaglobulinemia Brutona SCID niedobór odporności związany ze zwiększonym poziomem IgM przewlekła choroba ziarniniakowa
choroby alergiczne	c-kit, IgE Fc $\gamma$ R2  IL-4, IL-5, MHC II	wstrząs anafilaktyczny nadal możliwy wzmożona czułość komórek tucznych na bodźce, hipergammaglobulinemia redukcja zapalenia

Obserwuje się również zwiększoną liczbę pęknięć DNA w omawianych komórkach. Wskazuje to po pierwsze na rolę rekombinaz w naprawie DNA i protekcji przed apoptozą, po drugie na ich szeroką dystrybucję narządową.

Problem programowanej śmierci komórki budzi duże zainteresowanie. Głównym białkiem zaangażowanym w ochronę komórki przed programowaną śmiercią jest produkt protoonkogenu *bcl-2*, mutującego w chłoniakach oraz jego analogi (*bcl-x1*, *mcl-1* itp.). We wczesnych etapach rozwoju embrionalnego jest on obecny w komórkach wszystkich trzech listków zarodkowych. Później jednak, liczba miejsc jego ekspresji ulega znacznemu zmniejszeniu. U dorosłych produkt genu *bcl-2* znajdujemy w komórkach, które odnawiają się z macierzystej komórki wielopotencjalnej, mają dużą zdolność do proliferacji oraz są długowieczne. U myszy pozbawionych genu dla *bcl-2* limfocyty posiadają zwiększoną wrażliwość na bodźce indukujące apoptozę. Wkrótce znikają a śledziona i grasica ulegają inwolucji. Inne nieprawidłowości rozwoju to nerki wielotorbielowate, hipopigmentacja oraz przyspieszone złuszczenie się nabłonka jelitowego. Mysz pozbawiona *bcl-x* umiera w 13 dniu życia embrionalnego. Komórki hemopoetyczne obecne w płodowej wątrobie znikają, natomiast w mózgu i w rdzeniu kręgowym obserwujemy niedojrzałe postmitotyczne neurony. Z odwrotną sytuacją mamy do czynienia, gdy delecji ulegnie inhibitor białka *bcl-2* - *bax*. U myszy takiej dostrzec można hiperplazję tymocytów i limfocytów B oraz nadmierną liczbę komórek warstwy ziarnistej pęcherzyków jajnikowych. Potomstwo męskie jest bezpłodne, gdyż plemniki wykazują niedojrzałość a ich prekursorzy, co przemawia raczej za regulacją pozytywną apoptozy przez *bax*, podlegają masywnej delecji. Interesującym przykładem rozbieżności pomiędzy modelem teoretycznym a sytuacją doświadczalną okazała się mysz nie posiadająca genu dla ICE (Interleukin 1 $\beta$  Converting Enzyme - enzym

konwertujący interleukinę 1 $\beta$ ), którego produkt - proteaza cysteinowa jest uważany za główne białko indukujące apoptozę. Enzym ten, a także inne proteazy należące do rodziny ICE rozczepiają i inaktywują wiele niezbędnych dla życia komórki białek takich jak polimeraza poli (ADP-rybozy), zaangażowana w naprawę DNA, rybonukleoproteina U1, niezbędna dla prawidłowej obróbki mRNA i wiele innych. Wbrew oczekiwaniom fenotyp myszy knock-out dla ICE, nie odbiega jednak od normy. Rodzinę enzymu konwertującego interleukinę 1 $\beta$  należy więc traktować jako pewną funkcjonalną całość. Jedyne jednoczesna inaktywacja wszystkich enzymów tej grupy może jednoznacznie określić ich rolę w komórce.

### Podsumowanie

Metoda knock-out'u genowego wniosła potężny zastrzyk wiedzy dostarczając narzędzie do oceny wybranych mechanizmów wielu schorzeń. Ogólne zasady metodologii nauk biologicznych nakazują jednak ostrożność w przenoszeniu wyników eksperymentów na zwierzętach na kliniczną patologię człowieka. Przykładem skłaniającym do takiej ostrożności i pokazującym ograniczenia związane ze studiowaniem na modelach zwierzęcych chorób u ludzi mogą być badania nad mukowiscydozą. Ta śmiertelna choroba jest wynikiem mutacji genu dla białka CFTR regulującego w warunkach fizjologicznych transport jonów Cl<sup>-</sup> w nabłonku. Jednakże rozbicie genu dla CFTR u myszy choć związane jest z chorobą jelit podobną do występującej u ludzi, nie wywołuje żadnych zmian w czynności trzustki i płuc, narządów objętych procesem chorobowym u ludzi [27]. Choć więc nowe techniki genetycznych manipulacji niosą duże nadzieje, spełnienie naszych oczekiwań wymagać będzie jeszcze wielu lat badań. Aby udowodnić istotność wykazanych tą techniką zjawisk należy przeprowadzić wiele uzupełniających badań zarówno *in vivo* jak i *in vitro*.

### Piśmiennictwo

1. Te Riele H., Maandag E.R., Berns A.: Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 1992, 89: 5128-32.
2. Thomas K.R., Capecchi M.R.: Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 1987, 51: 503-12.
3. Galli-Taliadoros L.A., Sedgwick J.D., Wood S.A., Korner H.: Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice. *J.Immunol.Methods*, 1995, 181: 1-15.
4. Mansour S.L., Thomas K.R., Capecchi M.R.: Disruption of the proto-oncogene in - 2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature*, 1988, 336: 348-352.
5. Gu H., Zou Y.R., Rajewsky K.:Independent control of immunoglobulin switch regions evidenced through Cre-loxP mediated gene targeting. *Cell*, 1993, 73: 1155-64.
6. Orban P.C., Chui D., Marth J.D.:Tissue and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.*, 1992, 89: 6861-5.
7. Bradley A., Evans M., Kaufman M.H., Robertson E.J.: Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma stem cells. *Nature*, 1984, 309: 255-6.
8. Robertson E.J.: Embryo-derived stem cell lines. w: E.J.Robertson (red.) *Teratocarcinomas and Embryonic stem cells: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, 1987: 71-112.
9. Evans M.J., Kaufman M.H.:Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292: 154-6.
10. Fung-Leung W.P., Mak T.W.:Embryonic stem cells and homologous recombination. *Curr.Opin.Immunol.*, 1992, 4: 189-94.

11. Williams R.L., Hilton D.J., Pease S., Willson T.A., Stewart C.L., Gearing D.P., Wagner E.F., Metcalf D., Nicola N.A., Gough N.M.: Myeloid Leukaemia Inhibitory Factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 1988, 336: 684-7.
12. Kim H.S., Smithies O.: Recombinant fragment assay for gene targeting based on polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.*, 1988, 16: 8887-903.
13. Nitschke L., Kopf M., Lamers M.C., Quick nested PCR screening of ES cells clones of gene targeting events. *Biotechniques*, 1993, 14: 914-6.
14. Bradley A.: Production and analysis of chimaeric mice. w: E.J. Robertson (red.) *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, 1987: 113-151.
15. Majzoub J.A., Muglia L.J.: Knock-out mice. *N.Eng.J.Med.*, 1996, 334: 904-907.
16. Singer G.G., Carrera A.C., Marshak-Rothstein A., Martinez A.C., Abbas A.K.: Apoptosis, Fas and autoimmunity; the MRL - lpr/lpr model. *Curr.Opin.Immunol.*, 1994, 6: 913-920.
17. Kuhn R., Lohler J., Rennick D., Rajewsky K., Muller W.: Interleukin 10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 1993, 75: 263-74.
18. Sadlack B., Merz H., Schorle H., Schimpl A., Feller A.C., Horak I.: Ulcerative colitis-like disease in mice with the disrupted interleukin 2 gene. *Cell*, 1993, 75: 253-61.
19. Schorle H., Holschke T., Hunig T., Schimpl A., Horak I.: Development and function of T cells in mouse rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature*, 1991, 352: 621-4.
20. Theze J., Pedro M., Bertoglio A., Bretoglio J.: Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological function. *Immunol.Today*, 1996, 17: 481-6.
21. Shull M.M., Ormsby I., Kier A.B., Pawlowski S., Diebold R.I., Yin M., Allen R., Sidman C., Proetzel G., Calvin D., Doetschman T.: Target disruption of the mouse transforming growth factor beta-1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*, 1992, 359: 693-9.
22. Mombaerts P., Iacomini J., Johnson R.S., Herrup K., Tonegawa S., Papaioannou V.E.: Rag-1 deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*, 1992, 68: 869-77.
23. Brusselle G.G., Kips J.C., Tavernier J.H., van der Heyden J.G., Cuvelier C.A., Pauwels R.A., Bluethmann H.: Attenuation of allergic inflammation in Il-4 deficient mice. *Clin.Exp.Allergy*, 1994, 24: 73-80.
24. Oettgen H.C., Martin T.R., Wynshaw-Boris A., Deng C., Drazen J.M., Leder P.: Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature*, 1994, 370: 367-70.
25. Takai T., Ono M., Hikida M., Ohmori H., Ravetch J.V.: Augmented humoral and anaphylactic responses in FcγRII-deficient mice. *Nature*, 1996, 379: 346-9.
26. Foster P.S., Hogan S.P., Ramsay A.J., Matthaei K.I., Young I.G.: Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airway hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J.Exp.Med.*, 1996, 183: 195-201.
27. Glasser S.W., Korfhagen T.R., Wert S.E., Whisett J.A.: Transgenic models for study pulmonary development and disease. *Am.J.Physiol.*, 1994, 267: 489-97.

## Gene knock-out - application in experimental medical research

MAGDALENA GÓRSKA, MAREK L.KOWALSKI

### Summary

Gene knock-out technology is a new field of molecular biology, which involves the removal of some DNA sequence from the genome, what is equivalent with the absence of the gene product (protein) in the cell. If embryonic cells are used one can build the whole new organism which is deprived of the gene. Animals, which have been genetically engineered in that way, that none of their cells can express gene of interest are known as knock-out animals. Now, gene knock-out technology finds its place in every field of medicine and biology. In relatively simple way it allows to study complex functions of the protein in living organism, to build different models of diseases and also to create new methods of therapy. It brought a lot of new informations into immunology and allergology.