

Evolution på ett kick med genteknik: Tekniken då och nu.

Linnea Bäckström

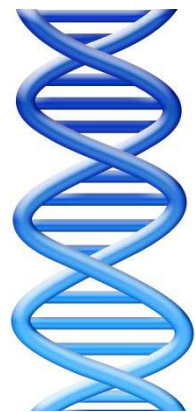
Populärvetenskaplig sammanfattning av Självständigt arbete i biologi 2013

Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet.

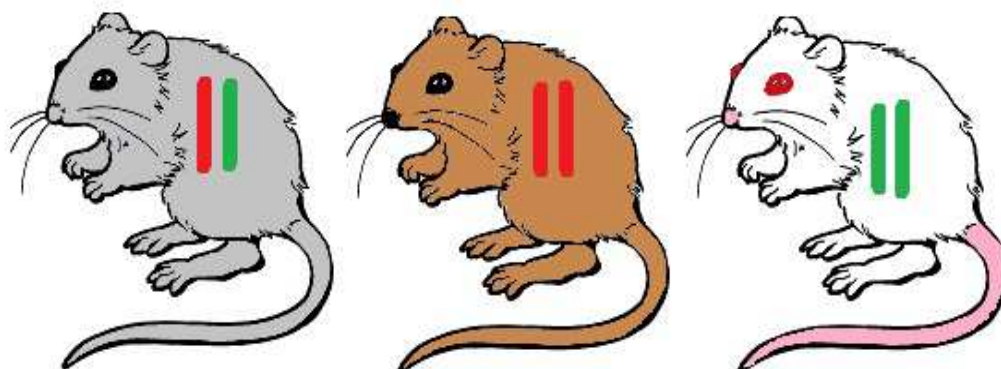
Genteknik innebär modifiering av organismens DNA, koden som bär den genetiska informationen. Genteknik kan användas genom att DNA:t ändras så att genen får ett annat uttryck eller stängs av helt. På så vis går det att undersöka vilka gener som är ansvariga för olika uttryck och sjukdomar. Forskaren kan då studera vilken effekt en modifiering i just den genen har på organismen. Idag finns flertalet olika tekniker för att ändra den genetiska koden hos flertalet däggdjursarter, det kan handla om att injicera nytt DNA direkt in i kärnan på en nyligen befruktad äggcell, att inkubera spermier med virusvektorer eller att spruta in nytt DNA direkt in i äggstocken på ett djur för att skapa genmodifierade ägg. Tillvägagångssätten skiljer sig vida i både svårighetsgrad och hur framgångsrika de är. Det visar sig att den klassiska och mest använda tekniken av alla, pronukleär mikroinjektion, kanske inte är så utvecklad och effektiv i jämförelse med nyare metoder. Den stora frågan är då: Vilken metod är egentligen mest effektiv och mest användbar?

Skillnad på mutationer och genteknik

Mutationer är spontana förändringar i DNA-koden (Figur 1). Det kan gälla stora eller små förändringar med stora, små eller inga konsekvenser alls för organismen. Det är dessa små mutationer som i förlängningen är evolution. För att studera geners uttryck och funktion är det mycket användbart att ändra i genen eller helt stänga av den och sedan se vad som har ändrats hos organismen. Man talar då om att modifiera generna, genotypen, för att se skillnader rent kroppsligt på fenotypen (Figur 2). På 1980-talet användes muterande ämnen för att skapa stora mängder muterade möss. När en avvikande fenotyp upptäcktes hos de behandlade fostren så kunde genotypen undersökas och man kunde bestämma vilken gen som hade muterats och vad den orsakade för förändringar hos djuret. Detta tillvägagångssätt har skapat en stor förståelse för genomet hos framför allt möss. Men när forskarna ville skapa en specifik mutation i en specifik gen kunde de inte längre använda denna metod. Specificitet är nyckeln för framgången av dagens genteknik. Istället för att vänta på att organismer ska föda muterad avkomma så innebär gentekniken att forskaren kan skapa specifika mutationer i önskad gen.



Figur 1. Dubbelsträngat DNA bär all genetisk information.



Figur 2. Genotyp och fenotyp: De två linjerna i mössen symboliserar två kopior (alleler) av samma gen. De olika kombinationerna av gener, genotypen, ger upphov till olika pälsfärger som är ett exempel på en fenotyp.

Rekombination – Lagningssystemet som gör genteknik möjligt.

Hur kan det vara möjligt att sätta in nya DNA-sekvenser i ett redan komplett genom? Jo, det har att göra med cellernas inbyggda DNA-lagningssystem, så kallad homolog rekombination. Två homologa DNA-sekvenser kan vara två upplagor av samma gen, två alleler. Det kan skilja en eller ett par baspar i generna, men de har ändå samma funktion. Vid homolog rekombination parar de två genupplagorna ihop sig och byter DNA-sekvenser med varandra, något som ökar den genetiska diversiteten. Det är bra för organismen och för eventuell framtida avkomma. Forskarna kan dra nytta av detta system när de vill sätta in en helt annan version av en gen i genomet. Först gör de väldigt många kopior av sin manipulerade gen, som sedan injiceras i cellen där de kommer i kontakt med de homologa genversionerna som redan finns i värdens genom. Då kan de paras ihop och byta material med varandra, som gör att den nya genen kommer in i värdens DNA. Forskare använder sig även av plasmider och virusvektorer som gör att de kan lägga till gener som inte har någon homolog sekvens i värdens DNA från början (se nedan).

DNA i plasmider, transposoner och virusvektorer

När nytt DNA ska föras in i en kromosom finns det olika sätt att packa in det nya DNA:t för att effektivt kunna leverera det till mottagarcellens kärna, de vanligaste är:



Plasmider: En plasmid har oftast sitt ursprung ur bakteriernas genom. De är ett cirkulärt dubbelsträngat DNA-fragment som innehåller gener för att inkorporera sig själva i värdens genom och på så vis bli en del av det.



Transposoner: De kallas också för ”hoppande gener” och är DNA-fragment som kan hoppa runt i ett genom och sätta sig på olika platser. Det finns även transposoner som kopierar sig och sätter in kopian på en annan plats i genomet istället. Detta ger flera kopior av samma gen på olika ställen i ett genom.



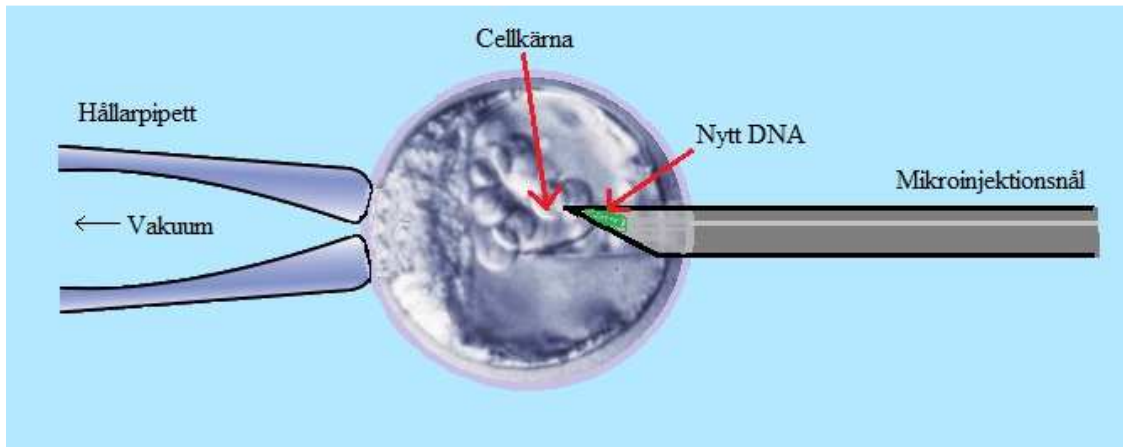
Virusvektorer: Som namnet antyder kommer dessa ursprungligen från virus. Det är enkelsträngat DNA som kan göra om sig självt till vanligt dubbelsträngat DNA och sedan rekombinera in sig självt in i värdens genom.

Olika metoder – Samma mål.

Pronukleär mikroinjektion – Den klassiska metoden

Den genmodifieringsmetod som funnits allra längst och fortfarande är den mest använda av forskarlag världen över är pronukleär mikroinjektion. Metoden går ut på att man injicerar nytt DNA in i kärnan på en nyligen befruktad äggcell, en så kallad zygot (Figur 3). Äggceller är mycket små och nålen som används för injektionen är bara 0,5 till 5 µm tjock. Äggcellen hålls fast med hjälp av en hållarpipett med vakuum under mikroskopet och sedan görs själva injektionen med en stadig hand. Detta tillvägagångssätt är tekniskt mycket svårt och det är

mycket vanligt att cellkärnan skadas så zygoten dör. Studier visar att endast ca 20 % av de injicerade zygoterna av möss är framgångsrika, medan siffran är mindre än 1 % för övriga däggdjur. Metoden kräver därför att ett stort antal äggceller injiceras och sedan inplanteras i en surrogatmamma för att få ett tillräckligt antal transgena djur som resultat. Pronukleär mikroinjektion är en dyr metod som kräver stora mikroskop, smala nålar och oändligt tålamod.



Figur 1. Pronukleär mikroinjektion med en mikroinjektionsnål på 0,5-5 μm och en hållarpipett med vakuum som håller fast äggcellen under mikroskopet.

Genöverföring med könsceller

På senare tid har forskare gjort försök att genmanipulera ägg och spermier innan de används för avel. Könscellerna innehåller en kopia av varje gen, en så kallad allel. När sedan en spermie och ett ägg smälter samman får den bildade zygoten de två uppsättningar av varje allel som behövs för ett fungerande genom. Avkomman blir alltså *halvt* transgen eller heterozygot för genmodifieringen.

Genmodifiering med hanliga könsceller

Spermier kan skördas ur testikeln och inkuberas tillsammans med naket DNA eller DNA-liposomkomplex. När säden sedan insemineras i en fertil hona kommer hon att föda en viss andel transgena ungar. Ungarna blir dock heterozygoter för transgenen, de har bara fått en kopia av den från sin far, den andra genkopian från modern är en vanlig kopia. Därför måste dessa ungar sedan paras med varandra innan forskaren kan få fram djur som har två kopior av den manipulerade genen, som då är så kallade homozygoter för genen. Istället för att inkubera spermerna i en petriskål på labbet så kan forskare injicera modifierat DNA direkt in i testikeln. Spermerna kommer då på samma sätt få ändrat DNA och vanlig parning kan användas.

Genmodifiering med honliga könsceller

Det är också möjligt att modifiera däggdjurs äggceller innan de befruktas av en spermie. Precis som med hanliga könsceller så kan detta göras på två sätt: Antingen skördas de omogna äggen från äggstocken och inkuberas tillsammans med DNA inneslutna i vektorer. De får då delvis nytt DNA och kan fertiliseras direkt i petriskålen innan de inplanteras i livmodern på en surrogathona. Det andra sättet är att vektorer med nya DNA-sekvenser injiceras direkt in i äggstocken. De omogna äggen tar då upp det nya DNAt innan de mognar och släpps i

äggladaren där de kan befruktas på vanligt sätt. Precis som med de modifierade spermerna ger detta tillvägagångssätt också heterozygot avkomma som måste korsas med varandra för att få individer som är homozygoter för genmodifieringen.

Ny teknik – Enklare, bättre, billigare och mer specifikt

Den gamla tekniken med pronukleär mikroinjektion kommer troligen snart vara helt utdaterad då protokollet är både svårt att genomföra rent praktiskt, ger en låg andel transgen avkomma och dessutom är väldigt dyr. Metoder där man använder olika slag av inkubering, som de beskrivna där könsceller inkuberas med virusvektorer eller naket DNA innan de används för avel kommer troligen att ersätta mycket av mikroinjektionerna i framtiden. För att DNA lättare ska ta sig in i cellerna kan de få bilda DNA-liposomkomplex där liposomerna hjälper DNAt att ta sig över det fettrika cellmembranet och in i cellkärnan. DNA kan också lättare tas upp om inkuberingen utsätts för en lätt elektrisk ström, en så kallad elektroporering, som gör att cellens porer öppnar sig och DNAt kan ta sig in i cellen. Att utsätta blandningen för en värmechock kan också öka chanserna för att nytt DNA ska tas upp av värdcellen.

Svårigheterna ligger egentligen inte längre i *hur* DNAt ska ta sig in i cellen, utan snarare *hur rätt* gen ska kunna modifieras. Här återkommer möjligheterna med DNA-lagningsystemet homolog rekombination. Detta är något som i framtiden kan utnyttjas hög grad med utvecklingen av bättre plasmider, transposoner och virusvektorer. Att kunna modifiera rätt gen vid rätt tillfälle kommer effektivisera gentekniken enormt mycket och det är bara en tidsfråga innan vi vet tillräckligt för att kunna modifiera mänskliga celler på ett säkert sätt. Att genteknik är framtiden är det ingen fråga om. Frågan är istället hur långt den kan ta den moderna människan. Vem vet, snart kanske vi kan skapa vår egen evolution?

Mer information:

Bäckström L. 2013. Evolution på ett kick med genteknik. Självständigt arbete i biologi. Uppsala Universitet

Miao X. 2012. Recent advances in the development of new transgenic animal technology. Cellular Molecular Life Science. **70**: 815–828.