

Transgeneza ryb, również w akwarium

Piotr Łapa¹

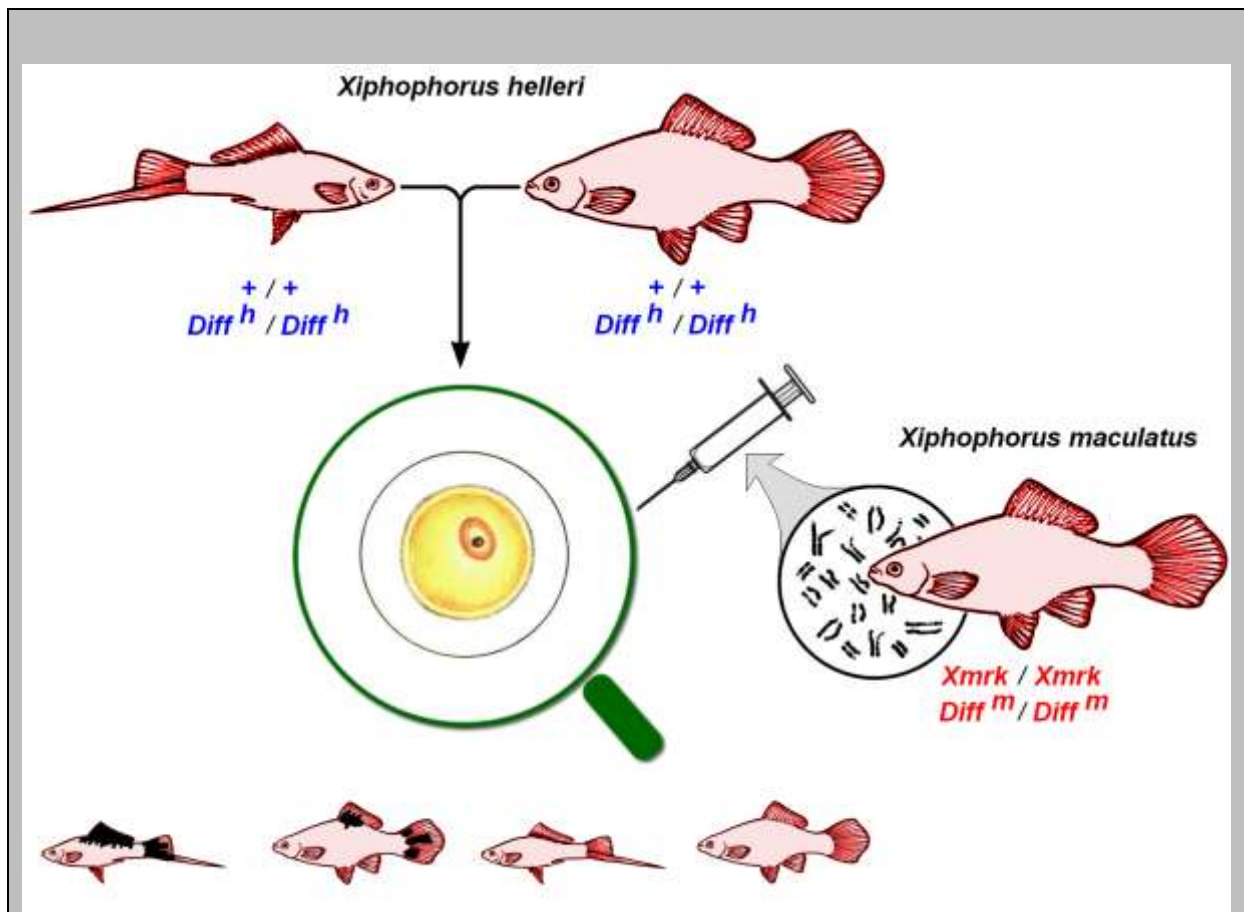
¹Towarzystwo Naukowe Branży Zoologicznej „Animalian”

Człowiek od zarania hodowli zwierząt dążył do uzyskiwania u nich pożądanych dla siebie cech. Stosunkowo niedawno wraz z rozwojem naukowych podstaw hodowli, możliwe stało się uzyskiwanie oczekiwanych cech u zwierząt hodowlanych, oparte o metody genetyczne. Przełomowe w tej dziedzinie stały się prace Grzegorza Mendla, który odkrył podstawowe zasady dziedziczenia cech warunkowanych przez geny. Od tego momentu zaczęła się rozwijać nauka o dziedziczności, opierająca się o dokładne analizy podobieństwa rodziców i potomstwa oraz badająca zmienność cech u mieszańców w kolejnych pokoleniach. Nauka ta to genetyka klasyczna, a metody takie jak selekcja oraz planowe kojarzenia i krzyżowania to jedynie fragment klasycznych metod modyfikacji genomu zwierząt hodowlanych. W akwarystyce skrajnym przykładem mogą być niezwykle zróżnicowane formy złotych rybek (*Carassius auratus auratus* (Linnaeus, 1758)) czyli m.in. teleskopy, lwie główki, niebowidy, pyzatki, kogutki, które z powodu znacznego upośledzenia, nigdy nie przetrwałyby w środowisku naturalnym. Selekcja naturalna eliminuje takie upośledzone osobniki, natomiast selekcja ręką człowieka bardzo często faworyzuje takie „odmieńce”. Innym sposobem otrzymywania nowych form ryb akwariowych jest krzyżowanie blisko spokrewnionych gatunków stosowane np. w obrębie rodzaju mieczonoszy (*Xiphophorus*). Niezależnie od wykorzystywanej metody istotne jest to, że w celu uzyskania pożądanego efektu, człowiek od dawna i w każdy znany sobie sposób ingeruje w genom gatunków, które hoduje.

Obecnie często zastosowanie znajdują procedury umożliwiające uniknięcie trudów organizacyjnych i kosztów długotrwałych technik klasycznych. Dzięki metodom inżynierii genetycznej, uzyskuje się tzw. organizmy modyfikowane genetycznie – GMO (ang. **Genetically Modified Organisms**). Metody te nadal są bardzo skomplikowane i kosztowne, przez co nie dla wszystkich w pełni dostępne. Jednak pozwalają one osiągać zamierzone efekty znacznie szybciej niż metody klasyczne, bądź umożliwiają otrzymanie rezultatów nieosiągalnych innymi technikami. W związku z tym, coraz częściej przeprowadza się

zabiegi skutecznej transgenezy w odniesieniu nie tylko do roślin, ale i do zwierząt w tym kręgowców. Popularnymi dla takich badań organizmami modelowymi są ryby, które okazały się względnie łatwe do manipulacji przy stosunkowo niskich nakładach finansowych. Dlatego też transgeneza zwierząt, została najlepiej opanowana właśnie u ryb i w przypadku tych organizmów podjęto pierwsze próby wdrożenia uzyskanych efektów w praktycznym zastosowaniu m.in. w żywieniu człowieka.

Transgeniczne ryby to organizmy do genomu których, wprowadzono różnymi metodami obce DNA, które zintegrowało się z wyjściowym materiałem genetycznym, a zmiany te dziedziczą się zgodnie z podstawowymi prawami genetyki. Pod pojęciem „obcego DNA” kryje się każdy fragment DNA, który wprowadzono do genomu danego organizmu. Może to być zarówno odcinek naturalnie występujący u innego gatunku, bądź też pobrany od innego osobnika tego samego gatunku. Z tego też powodu stosowane jest rozróżnienie na autotransgenezę, która ma miejsce wtedy, gdy np. zwiększamy w genomie ilość kopii genu, który jest specyficzny dla tego gatunku. Jest to np. manipulacja polegająca na zwiększeniu ilości genów warunkujących hormon wzrostu, co zwiększy ilość syntetyzowanego produktu. Drugi rodzaj transgenezy wzbudza więcej negatywnych emocji i jest to allotransgeneza, czyli wprowadzanie do genomu odcinków DNA pochodzącego od innego gatunku, np. przenoszenie genu warunkującego hormon wzrostu łososa atlantyckiego (*Salmo salar* Linnaeus, 1758) do genomu ryżówki (*Oryzias latipes* (Temminck & Schlegel, 1846)). Wprowadza to pewne zamieszanie, gdyż podejmowane są próby manipulacji genetycznych bez udziału DNA innych gatunków. Na drodze autotransgenezy dokonano manipulacji na genomie poskoczka gigantycznego (*Periophthalmodon schlosseri* (Pallas, 1770)) podczas której naturalny promotor dla genu warunkującego hormon wzrostu, został podmieniony na promotor innego genu tej samej ryby. Niektórzy obstawali za stanowiskiem, że nie jest to organizm transgeniczny, gdyż nie zawiera żadnych obcych genów, co stanowiło trudną sytuację dla instytucji nadzorujących naukę z ramienia rządów. Należy w tym miejscu podkreślić, że z naukowego punktu widzenia organizmy transgeniczne powstają w wyniku allotransgenezy jak i autotransgenezy czyli osobnik będzie transgeniczny niezależnie od tego czy nowa sekwencja DNA pochodzi od osobnika innego gatunku, czy też od tego samego organizmu. Jednak dla wyróżnienia sytuacji w której przeniesienie genów dotyczy organizmów w naturze mogących się krzyżować wprowadzono pojęcie cisgenezy.



Pionierskiego eksperymentu w dziedzinie transgenezy zwierząt wyższych, dokonano na popularnych mieczonoszach (rodzaj *Xiphophorus*). Zmienniaki są nosicielami dominującego genu *Tu*, w którego skład wchodzi onkogen *Xmrk*, regulujący wytwarzanie melaniny. Jednocześnie gatunek ten wyposażony jest w epistatyczny gen ograniczający zasięg występowania tego barwnika. Jeśli nie ma genu regulatorowego $Diff^m$ to dochodzi do rozrostu komórek barwnikowych, prowadzącego w konsekwencji do rozrostu niebezpiecznego nowotworu zwanego czerniakiem. Mieczyki nie są wyposażone ani w dominujący gen *Tu* ani jego inhibitora $Diff^m$.

Podczas tego doświadczenia do zarodków mieczyka hellera (*Xiphophorus helleri*) wstrzyknięto całkowity genomowy DNA wyizolowany z komórek zmienniaka plamistego (*Xiphophorus maculatus*). Po wstrzyknięciu DNA nastąpiła jego inkorporacja do dzielących się komórek. Choć nic nie wiadomo o szczegółach integracji obcego DNA w zarodkach mieczyków, to dzięki wystąpieniu przypadków nowotworzenia można było łatwo udowodnić ekspresję obcych genów w genomie mieczyków [Vielikind i in. 1982].

Badania transgenezy ryb już dawno wyszły poza laboratoryjne badania podstawowe przy użyciu organizmów modelowych takich jak ryżówka i danio pręgowany (*Danio rerio* (Hamilton, 1822)). Prócz ryb laboratoryjnych w eksperymentach nad transgenezą coraz szerzej wykorzystuje się gatunki, będące głównym źródłem białka pochodzenia rybiego. Jednym z podstawowych zagadnień towarowej produkcji ryb, jest szybkość ich wzrostu oraz ostateczna masa osobników odławianych do konsumpcji, stąd też szczególnie na tym aspekcie skoncentrowali swą uwagę naukowcy. Efektem ich pracy są m.in. łososie, tilapie, karpie, sumy i inne ryby „ulepszane” metodą transgenezy. Łącznie badaniami w kierunku poprawy wzrostu, poprzez wprowadzanie dodatkowych kopii genów warunkujących syntezę hormonu wzrostu, objęto co najmniej kilkanaście gatunków ryb konsumpcyjnych. Badaniami nad autotransgenezą genów warunkujących hormon wzrostu, zainteresowani są szczególnie naukowcy Indyjscy i Chińscy, widząc w tym możliwość zmniejszenia głodu panującego w niektórych rejonach azjatyckich i nie tylko.

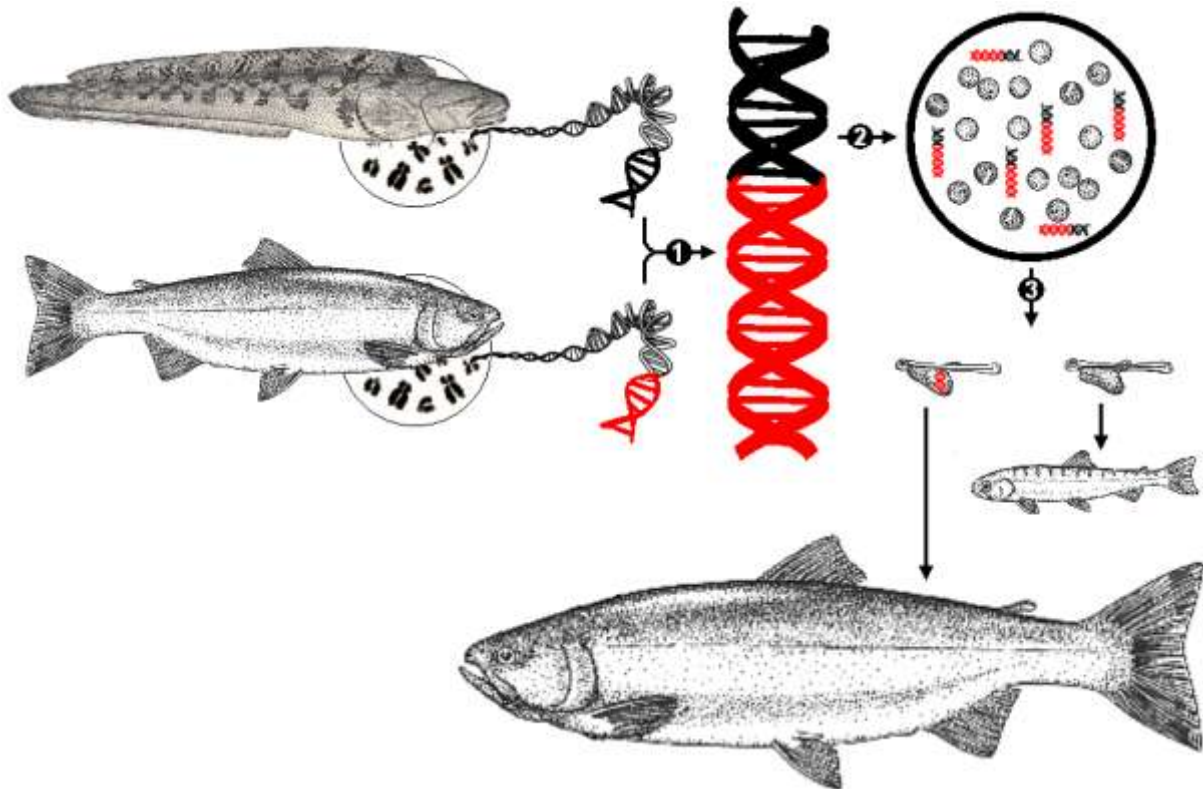
Przeniesienie genu może dotyczyć bliskich ewolucyjnie gatunków takich jak łosoś atlantycki (*Salmo salar* Linnaeus, 1758) i łosoś pacyficzny (*Oncorhynchus sp.*). Stosowane manipulacje genetyczne dotyczą również różnych form łososia pacyficznego, u którego przeniesiono gen hormonu wzrostu od czerwonego łososia „sockeye” (*Oncorhynchus nerka* (Walbaum, 1792)) do srebrnego łososia „coho” (*Oncorhynchus kisutch* (Walbaum, 1792)). Transgeniczny srebrny łosoś rósł średnio 11 razy szybciej od swoich niezmodyfikowanych pobratymców, lecz zdarzały się okazy rosnące aż 37 razy szybciej. Tak ogromne przyspieszenie wzrostu wynoszące ponad 1000%, udało się do tej pory w przypadku gatunków z rodzajów; *Salmo*, *Salvelinus* i *Oncorhynchus*. Jednak w większości przypadków przyspieszenie wzrostu osobników transgenicznych wynosi od około 20%-60% w przypadku karpia do około 200% odnotowywanych u transgenicznych tilapii.

Typowe geny przed właściwą sekwencją genu kodującą cząsteczkę mRNA, posiadają odcinek regulatorowy odpowiedzialny za rozpoczęcie lub nie transkrypcji właściwego genu. Taki regulatorowy odcinek, który reaguje na specyficzne bodźce nazywany jest promotorem. Wiążąc specyficzne białka transkrypcyjne m.in. polimerze RNA, umożliwia rozpoczęcie procesu transkrypcji tj. syntezy nici matrycowego RNA. W znacznym stopniu uwaga naukowców skoncentrowała się właśnie na tym regulatorowym odcinku, którego kontrola pozwala kontrolować i modyfikować ekspresję całego genu. Dlatego też wprowadzając do genomu nowy gen, wyposaża się go wcześniej w odpowiedni promotor, pozwalający na jego kontrolowaną ekspresję, a co za tym idzie uzyskuje się zaplanowany efekt fenotypowy. Można też wprowadzić do genomu nowy promotor dla typowego genu, w celu zmiany

mechanizmów odpowiedzialnych za bodźce, na które komórka reaguje syntezą określonego białka. W ten sposób nowy promotor może kontrolować produkcję określonego białka, niezależnie od typowego dla tej komórki systemu regulowania. Przykładowo, jeden z projektów naukowych dotyczył wprowadzenia do genomu łosia takiego promotora, który podtrzymuje pełną syntezę hormonu wzrostu nawet przy niskiej temperaturze środowiska. W sekwencji odpowiednich promotorów, wyposażone są gatunki ryb żyjących w wodach dalekiej północy. Ryby żyjące w takim środowisku, posiadają specjalne mechanizmy zabezpieczające je przed zamarzaniem oraz umożliwiające normalny metabolizm przy niskich temperaturach. Niektóre gatunki ryb przystosowały się do życia w środowisku wód okołobiegunowych, które okresowo mają temperaturę poniżej 0° C. Pomimo tak nieprzyjanych warunków ryby te nie zamarzają dzięki obecności we krwi specyficznych białek AFP (ang. **Antifreeze Proteins**). Białka te pełnią bardzo ważną rolę, wiążąc pojawiające się kryształki lodu i uniemożliwiając w ten sposób ich dalszy wzrost, co zapobiega uszkodzeniom tkanek. Proces ten jest na tyle skuteczny, że ryby te są w stanie żyć w temperaturze zamarzania wody morskiej tj. przy temperaturze blisko -1,9° C. Udało się wyizolować białka zapobiegające zamarzaniu oraz odnaleziono warunkujące je geny, które to bardzo szybko stały się obiektem transferu do genomów ryb dotychczas nieposiadających takich właściwości. Odpowiednie sekwencje DNA dla glikoproteiny typu I wyizolowano z genomu antara polarnego (*Dissostichus mawsoni* Norman, 1937), typu II wyizolowano ze storni amerykańskiej (*Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum, 1792)) i typu III z genomu kura amerykańskiego (*Hemirhamphys americanus* (Gmelin, 1789)), by przekazać je m.in. łososiowi atlantyckiemu. Innym podejściem do tego zagadnienia, jest wprowadzenie do genomu łosia promotora genu warunkującego hormon wzrostu, który umożliwia syntezę tego hormonu w niskich temperaturach. Zmodyfikowane w ten sposób łosie, nadal żerowały i rosły mimo okresowego spadku temperatury wody w której żyją, co w naturalnych warunkach powoduje zahamowanie wzrostu. Dzięki takiemu podejściu udało się uzyskać linię łosia, która nieprzerwanie rośnie w niskich temperaturach, a chłodna woda dodatkowo wpływa na poprawę pożądanego smaku mięsa łosia. W przypadku osobników transgenicznych osiągnięcie tej samej masy ciała wymagało o połowę mniej czasu, niż w przypadku ich naturalnych krewnych.

W jednym z eksperymentów z transgenicznymi łosiami zastosowano bardziej złożoną technikę manipulacji genetycznych. Obiektem manipulacji był łosoś atlantycki, który otrzymał odcinek kodujący hormon wzrostu od łosia pacyficznego (*Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum, 1792)) ale jednocześnie promotorem dla tego genu była sekwencja

DNA pochodząca z genomu węgorzycy amerykańskiej (*Zoarces americanus* (Bloch & Schneider, 1801)). Innym przykładem takiej złożonej modyfikacji jest gen hormonu wzrostu z genomu tilapi z promotorem β -aktyny od karpia przeniesione do genomu ryżówki.



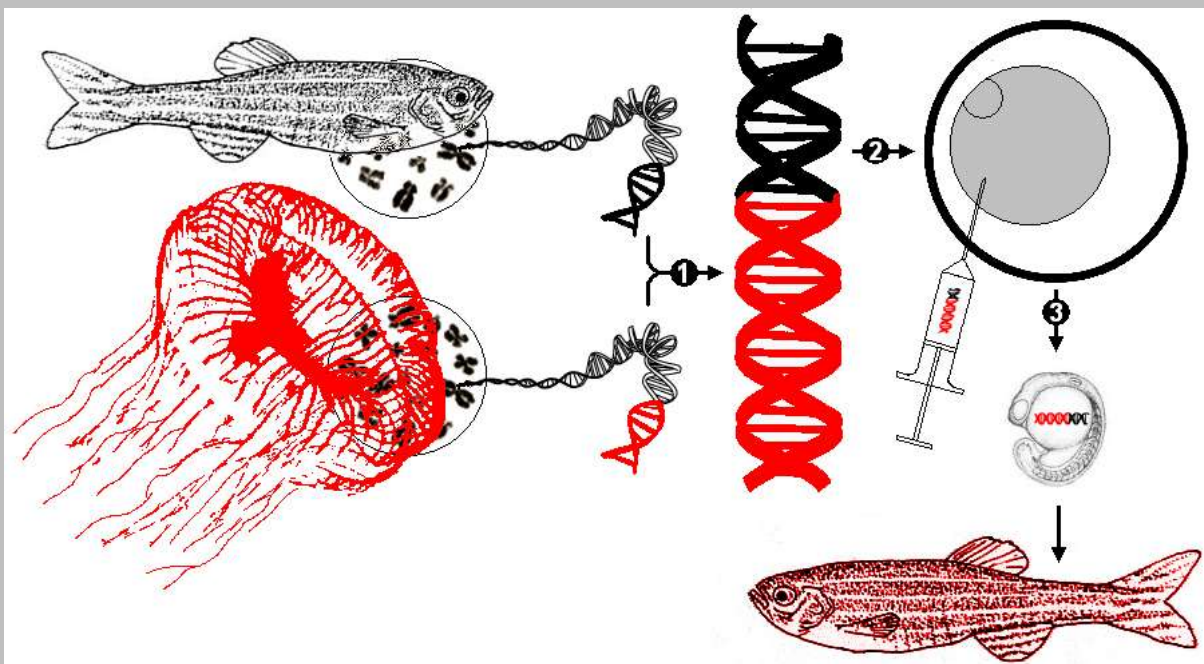
Rycina 1. Transgeniczny łosoś atlantycki który otrzymał odcinek kodujący hormon wzrostu od łososia pacyficznego ale jednocześnie promotorem dla tego genu była sekwencja DNA pochodząca z genomu węgorzycy amerykańskiej.

Jednakże badania nad modyfikacjami genetycznymi ryb, nie kończą się jedynie na wykorzystaniu genów w odpowiedzialnych za syntezę hormonów wzrostu. Prowadzone eksperymenty mają na celu zbadanie przydatności transgenezy, wykorzystującej sekwencje DNA odpowiedzialne m.in. za odporność na zasolenie środowiska i choroby oraz sterylność. Ryby wykorzystywane są często jako bioindykatory do kontroli i oceny stanu wód oraz m.in. w toksykologii. Bardzo wrażliwe na zanieczyszczenia są m.in. pstrąg potokowy, płoć oraz sandacz. Wśród obowiązujących w Polsce norm znajdują się i takie, które wykorzystują danio przegowane do oznaczania ostrej, letalnej toksyczności substancji.

Kolejna grupa badań ma na celu taką modyfikację metabolizmu transgenicznych ryb, by możliwe stało się ich wykorzystanie, jako bioreaktory służące do produkcji substancji ważnych gospodarczo lub w medycynie ludzkiej. Grupie badaczy udało się uzyskać niezbędny w leczeniu hemofilii, ludzki czynnik koagulacji VII (hFVII) w embrionach danio

pręgowanego, tilapi i suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus* (Burchell, 1822)). Jako promotora użyto w tych doświadczeniach odcinek regulatorowy cytomegalowirusa – CMV (ang. **cytomegalovirus**). Zgodnie z obecnym stanem wiedzy szacuje się, że około dwudziestu ludzkich chorób mogłoby być leczonych dzięki wykorzystaniu ryb jako bioreaktorów wytwarzających specyficzne białka.

Badania nad wykorzystaniem transgenicznych ryb jako bioreaktorów służących do produkcji białek niezbędnych w medycynie ludzkiej, należą do szerokiej grupy eksperymentów sprawdzających możliwość integracji w genom ryby genów, pochodzących z odległych jednostek systematycznych. Do genomu ryb wprowadzono m.in. sekwencje kodującą ludzki i świński hormon wzrostu. Gen kodujący hormon wzrostu człowieka wprowadzono do genomu złotej rybki (*Carassius auratus auratus* (Linnaeus, 1758)) już w 1985 roku. Wyhodowano również ryżówkę, która dzięki odcinkowi DNA pochodzącemu od śmy *Hyalophora columbia* stała się odporna na zakażenia bakteryjne. Bardzo ciekawe efekty uzyskano w przypadku transgenezy polegającej na wprowadzeniu do genomów ryżówki i danio pręgowanego, genów pochodzących od tak odległych ewolucyjnie gatunków jak meduzy (*Aequorea sp.*) i koralowce (*Discosoma sp.*). Organizmy te posiadają zdolność syntezy białek fluorescencyjnych wywołujących efekt bioluminescencji. Już od dawna w laboratoriach stosuje się techniki mające na celu wizualizację tkanek oraz śledzenie losów pojedynczych komórek *in vivo* w organizmie. Służą temu m.in. białka fluorescencyjne pochodzące z genomu meduzy *Aequorea victoria*, u której występuje zielone białko fluorescencyjne – GFP (ang. **Green Fluorescent Protein**). Z kolei od koralowca *Discosoma sp.* uzyskać można gen czerwonego białka fluorescencyjnego – RFP (ang. **Red Fluorescent Protein**). Dzięki manipulacjom, polegającym na zmianie sekwencji nukleotydowej występujących w naturze genów, możliwa stała się synteza zmienionych białek fluorescencyjnych zwiększając w ten sposób spektrum dostępnych barw. Uzyskane warianty emitujące światło innego koloru niż wyjściowa zieleń i czerwień to żółty (YFP), niebieski (BFP) i turkusowy (CFP). Cząsteczki tego specyficznego białka, posiadają zdolność pochłaniania energii zawartej w fotonach tzn. jednostkach światła i jednoczesnego magazynowania pochłoniętej energii. Uwalnianie zmagazynowanej energii następuje z pewnym opóźnieniem, objawiając się emisją promieniowania świetlnego o charakterystycznej dla białka długości fali tzn. barwie.



Transgeniczne linie danio pręgowanego powstały drogą mikroiniekcji DNA odpowiedzialnego za fluorescencyjne białko do komórek jajowych. Wstrzyknięcie wprowadzanego fragmentu do zapłodnionej komórki jajowej miało miejsce zanim jeszcze nastąpił pierwszy podział komórkowy. Metoda ta jest obok elektropalacji i infekcji przy pomocy retrovirusów jedną z najpopularniejszych i wydajniejszych w transgenezie ryb.

Eksperyment z fluorescencyjnymi danio pręgowanymi dowiódł również przydatności ryb jako bioreaktorów, gdyż w mięśniach tej ryby uzyskano bardzo wysoki poziom ekspresji transgenicznego białka, którego udział wyniósł 27 mg na 1 gram, świeżej tkanki mięśniowej, co stanowiło 17% w stosunku do całego białka zawartego w tej tkance. Jest to wysoki poziom ekspresji obcego białka produkowanego przez zwierze transgeniczne, gdyż dotychczasowe wyniki w przypadku transgenicznych ssaków które wynosiły 10 mg/ml w gruczole mlecznym i 1 µg/ml w białku jajka kurzego (Gong i in. 2003).

Zgodnie z założeniem transgeniczne danio pręgowane, posiadające geny warunkujące białka fluorescencyjne mają zrewolucjonizować tradycyjne metody badania i monitoringu jakości wody. Ryby te pod wpływem obecnych w wodzie określonych zanieczyszczeń, natychmiast miały wysyłać czytelny sygnał „rozświetlając się”. Umożliwiający bioindykację zanieczyszczeń, wybiórcze uruchamianie ekspresji białek fluorescencyjnych, wymaga zastosowania takich promotorów, które włączać będą syntezę fluorescencyjnego białka tylko w wypadku zaistnienia określonego bodźca. Udało się zastosować kilka promotorów przydatnych do tego celu, i są to np. promotor uruchamiający syntezę w obecności estrogenów, retinoidów, węglowodorów i metali ciężkich (Hg, Cu, Ni, Cd, Zn). Planowano umieszczenie w pojedynczym osobniku, białek różnych barw połączonych z promotorami uaktywniającymi się pod wpływem odmiennych czynników. Pozwoliłoby to na detekcję przez tego samego osobnika reagującego odpowiednim wariantem zabarwienia na różnego rodzaju zanieczyszczenia. Ryba taka byłaby czymś w rodzaju żywego „papierka lakmusowego” sygnalizując zanieczyszczenie wody różnymi chemikaliami. Można też wyposażyć jednego osobnika w promotory reagujące na różną temperaturę wody, wtedy ryby przybierałyby różne kolory w zależności od aktualnej ciepłoty wody, stając się „żywymi termometrami”. Okazało się jednak, że stworzenie takiego nowoczesnego bioindykatora nie jest łatwe, ale sama technika transgenezy została opanowana i powstały ryby, które produkowały w swych komórkach białko fluorescencyjne. Początkowo zastosowano tylko jeden promotor genu odpowiedzialnego za syntezę lekkiego łańcucha miozyny – myl2 (ang. **Myosin Light Chain 2**). Zastosowanie właśnie tej sekwencji jako „włącznika” dla produkcji fluorescencyjnego białka, umożliwiło uzyskiwanie go we wszystkich mięśniach szkieletowych transgenicznych danio pręgowanych. Gdy rybą taką zainteresowali się akwaryści, możliwe stało się uzyskanie dochodu ze sprzedaży okazów dla potrzeb amatorskiej akwarystyki, co skrzętnie wykorzystano pomimo wielu głosów sprzeciwu. W ten sposób na rynku pojawiła się linia danio pręgowanych nazwanych handlowo „GloFish”. W ten sposób powstała pierwsza transgeniczna ryba ozdobna przeznaczona do hodowli w akwariach. Szczególnie przydatne okazały się złote danio czyli odmiana barwna, która cechuje się ograniczoną liczbą i wielkością komórek barwnikowych w skórze, dzięki czemu bardziej widoczne są tkanki produkujące fluorescencyjne białko. Nowością jest uzyskanie również fluorescencyjnych żalobniczek (*Gymnocorymbus ternetzi* (Boulenger, 1895)) i brzanek sumatrzeńska (*Puntigrus tetrazona* (Bleeker, 1855)). Kolejna transgeniczna fluorescencyjna ryba to skalar (*Pterophyllum scalare* (Schultze, 1823)).



Rycina 2 Transgeniczne fluorescencyjne ryby znane pod nazwa „GloFish” (<http://www.glofish.com/images/>)

Zagadnienie transgenezy ryb jest wielowątkowe. Prócz kwestii naukowych związane jest ono również z zagadnieniami prawnymi, ekonomicznymi i etycznymi. W powyższym tekście próbowano jedynie przybliżyć zagadnienie transgenicznych ryb, pozostawiając czytelnikowi swobodę ich oceny. To czy kontrowersyjne fluorescencyjne ryby będą dostępne w handlu, zależy głównie od tego czy będą chętni na ich zakup.

Literatura:

1. Essner J.J.: 2003. Re: Temperature Sensitivity of Fluorescent Transgenic Zebrafish. Discovery Genomics, Inc., October 14.
2. Gong Z., Wan H., Leng Tay T., Wang H., Chen M., Yan T.: 2003. Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 308 (2003) 58–63.
3. Kimura Y., Hisano Y., Kawahara A., Higashijima S.: 2014. Efficient generation of knock-in transgenic zebrafish carrying reporter/driver genes by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Scientific Reports* 4, Article number: 6545
4. Tanaka M., Kinoshita M., Kobayashi D., Nagahama Y.: 2001. Establishment of medaka (*Oryzias latipes*) transgenic lines with the expression of green fluorescent protein exclusively in germ cells: a useful model to monitor germ cells in a live vertebrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 2544-2549.
5. Vielkind J., Haas-Andela H., Vielkind V., Anders F.: 1982. The induction of a specific pigment cell type by total genomic DNA injected into the neural crest region of fish embryos of the genus *Xiphophorus*. *Mol. Gen. Genet.*, 185, 379-389.

