

Ocena jakości nasienia transgenicznych knurów przy zastosowaniu markerów apoptotycznych

Monika Trzcńska, Magdalena Bryła,
Zdzisław Smorąg

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy w Krakowie

Rozwój transgenezy zwierząt gospodarskich, jaki ma miejsce już od blisko 20 lat, jest ukierunkowany na osiągnięcie dwóch głównych celów. Pierwszy z nich dotyczy poprawy cech użytkowych zwierząt oraz ich odporności na choroby, natomiast drugi – przybierający w ostatnich latach na znaczeniu, odnosi się do wykorzystania transgenicznych zwierząt w biomedycynie. Dotyczy to z jednej strony użycia zmodyfikowanych genetycznie zwierząt jako bioreaktorów do produkcji cennych białek o znaczeniu terapeutycznym, z drugiej zaś – do wykorzystania ich jako modeli chorób człowieka oraz użycia komórek, tkanek i narządów do ksenotransplantacji. Szczególne nadzieje pokłada się w modyfikacji genomu świni, w celu wykorzystania jej narządów do ksenotransplantacji u człowieka.

W Polsce realizowany jest projekt z zakresu ksenotransplantacji. W pierwszym etapie jego realizacji uzyskano m.in. transgenicznego knura, z wbudowanym genem $\alpha 1,2$ -fukozylotransferazy człowieka. Konstrukcja genu $\alpha 1,2$ -fukozylotransferazy człowieka, została przygotowana

przez zespół prof. Ryszarda Słomskiego z Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. Wprowadzenie do genomu świni genu ludzkiej fukozylotransferazy miało spowodować obniżenie immunologicznej bariery w układzie świnia–człowiek i zminimalizować ryzyko odrzucenia przeszczepu. Nabyta przez transgenicznego knura cecha wbudowała się trwale w jego genom i jest przekazywana na potomstwo. Transgeniczny knur został założycielem linii transgenicznych świń, które wykorzystywane są do celów biomedycznych. Tworzenie zwierząt transgenicznych ma ogromne znaczenie aplikacyjne, jednak rodzi również wiele pytań i wątpliwości. Dlatego też monitorowanie stanu zdrowia zwierząt transgenicznych i ich płodności stanowi istotny element prac nad zmodyfikowanymi genetycznie organizmami.

W Instytucie Zootechniki PIB badano jakość nasienia knurów wykazujących ekspresję rekombinowanej $\alpha 1,2$ -fukozylotransferazy. Ocena jakości nasienia samców transgenicznych stanowi ważny element badań nad genetycznie zmodyfikowanymi organizmami. Z dotychczasowych prac wynika, że u zmodyfikowanych genetycznie myszy, świń i owiec obserwowano zaburzenia płodności. Dotyczyły one głównie nieprawidłowych zachowań płciowych, jak również strukturalno-funkcjonalnych defektów plemników [2, 3, 5, 6]. W doświadczeniach własnych, oprócz standardowej oceny nasienia obejmującej koncentrację, ruchliwość i ocenę morfologiczną plemników, zastosowano dodatkową ocenę polegającą na wykrywaniu zmian apoptotycznych w plemnikach. Badania miały na celu sprawdzenie, czy wprowadzona modyfikacja genomu knurów powoduje zaburzenia w procesie spermatogenezy i wzrost odsetka plemników apoptotycznych w ejakulacie.

Jak wiadomo, apoptoza komórek plemnikotwórczych jest podstawowym mechanizmem prawidłowej spermatogenezy [4]. Dotychczasowe badania w tym zakresie doprowadziły do sformułowania pojęcia *abortive apoptosis*, tłumaczącego uwalnia-



*Serdeczne życzenia zdrowych i spokojnych
Świąt Bożego Narodzenia
oraz pomyślnego Nowego Roku 2011
składa swoim Czytelnikom
Redakcja*

nie z gonady komórek apoptotycznych i – jak można oczekiwać – ciałek apoptotycznych nefagocytowanych przez komórki Sertoliego wskutek braku synchronizacji spermatogenezy z apoptozą, która w takim przypadku może być procesem niekompletnym i nie spełniającym swojej roli, czyli nie eliminującym uszkodzonych komórek. Badania przeprowadzone przez Anzara i wsp. [1] wykazały, że obecność plemników apoptotycznych w świeżym nasieniu może być przyczyną obniżonej płodności buhajów hodowlanych.

Przeprowadzone badania własne opierały się na wykrywaniu wczesnych stadiów apoptozy w nasieniu 7 transgenicznych knurów wykazujących ekspresję rekombinowanej α 1,2-fukozylotransferazy w porównaniu z grupą kontrolną, którą stanowiło nasienie 4 nietransgenicznych knurów. Nasienie pobierano metodą manualną (po 5 ejakulatów od każdego knura). Po oddzieleniu frakcji galaretowatej przeprowadzano ocenę makroskopową nasienia, w celu określenia objętości ejakulatu oraz mikroskopową (ruchliwość, koncentracja i morfologia plemników). W wyniku przeprowadzonej oceny morfologicznej plemników stwierdzono, że ejakulatory pochodzące od transgenicznych i nietransgenicznych knurów charakteryzowały się ponad 80% odsetkiem plemników prawidłowych. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w morfologii plemników knurów transgenicznych i nietransgenicznych. W tabeli 1 zestawiono dane dotyczące objętości ejakulatów, koncentracji oraz ruchliwości plemników knurów transgenicznych i nietransgenicznych. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic ocenianych parametrów pomiędzy nasieniem badanych knurów ($P > 0,05$; test t-Studenta).

Tabela 1

Średnia objętość ejakulatu, koncentracja oraz ruchliwość plemników ($x \pm SD$) knurów transgenicznych (TG) i nietransgenicznych (NTG)

Knury	Liczba ejakulatów	Objętość ejakulatu (ml)	Koncentracja plemników (mln/ml)	Ruchliwość plemników (%)
TG	35	293 \pm 15,21	381,3 \pm 7,91	77,9 \pm 6,42
NTG	20	287 \pm 16,33	382,1 \pm 8,11	78,3 \pm 7,35

W kolejnym etapie doświadczeń, po rozrzedzeniu w rozcieńczalniku *Biosolwens Plus* (Biocheffa, Polska) nasienie poddawano analizie fluorescencyjnej za pomocą dwóch metod. Mikropory powstające w zewnętrznej warstwie identyfikowano przy wykorzystaniu fluorochromu YO-PRO-1. Fluorochrom dyfunduje przez mikropory/mikrokanaly w plazmolemie i łączy się z

Tabela 3

Odsetek ($x \pm SD$) plemników żywych (Ann V-FITC/PI⁻), wczesnoapoptotycznych (Ann V-FITC⁺/PI⁻), wczesnonekrotycznych (Ann V-FITC⁺/PI⁺) oraz nekrotycznych (Ann V-FITC⁻/PI⁺) w nasieniu transgenicznych (TG) i nietransgenicznych (NTG) knurów po zastosowaniu barwienia aneksyną V-FITC i PI

Knury	Liczba ejakulatów	Ann V-FITC/PI ⁻ (%)	Ann V-FITC ⁺ /PI ⁻ (%)	Ann V-FITC ⁺ /PI ⁺ (%)	Ann V-FITC ⁻ /PI ⁺ (%)
TG	35	74,2 \pm 9,42	2,7 \pm 1,34	18,2 ^a \pm 7,12	4,9 ^a \pm 1,62
NTG	20	75,4 \pm 8,34	2,0 \pm 0,92	11,7 ^b \pm 6,34	10,9 ^b \pm 4,46

a, b – średnie wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $P \leq 0,05$

DNA komórki, podczas gdy sama błona komórkowa ma jeszcze zachowaną strukturalną integralność. Dodatkowe zastosowanie w tej metodzie jodku propydydy (PI) umożliwiło detekcję komórek nekrotycznych. Przeprowadzając analizę zawiesiny komórek w mikroskopie fluorescencyjnym wyróżniono trzy subpopulacje komórek. Pierwszą z nich stanowiły komórki żywe (YO-PRO-1⁻/PI⁻), które nie emitowały fluorescencji, drugą komórki apoptotyczne YO-PRO-1-pozytywne (YO-PRO-1⁺/PI⁻) – fluoryzujące na zielono, natomiast trzecią grupę stanowiły komórki martwe, nekrotyczne, emitujące zarówno zieloną, jak i czerwoną fluorescencję (YO-PRO-1⁺/PI⁺). Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2

Odsetek ($x \pm SD$) plemników żywych (YO-PRO-1⁻/PI⁻), apoptotycznych (YO-PRO-1⁺/PI⁻) oraz nekrotycznych (YO-PRO-1⁺/PI⁺) w nasieniu transgenicznych (TG) i nietransgenicznych knurów (NTG) po zastosowaniu barwienia fluorochromem YO-PRO-1 i PI

Knury	Liczba ejakulatów	YO-PRO-1 ⁻ /PI ⁻ (%)	YO-PRO-1 ⁺ /PI ⁻ (%)	YO-PRO-1 ⁺ /PI ⁺ (%)
TG	35	78,4 \pm 7,23	3,2 \pm 1,95	18,4 \pm 6,42
NTG	20	79,6 \pm 3,51	3,5 \pm 1,47	16,9 \pm 4,26

Drugą metodą pozwoliła na wykrywanie reszt fosfatydyloseryny na powierzchni błony cytoplazmatycznej za pomocą aneksyny V, sprzężonej z izotiocyanianem fluoresceiny (FITC, ang. fluorescein isothiocyanate). W czasie apoptozy zachodzi translokacja fosfatydyloseryny z powierzchni wewnątrzkomórkowej na zewnętrzną. Aneksyna V w obecności jonów Ca²⁺ łączy się z ujemnie naładowanymi fosfolipidami, takimi jak fosfatydyloseryna, dzięki czemu stosuje się ją jako marker apoptozy. Oznaczenie na powierzchni błony komórek reszt PS przy użyciu aneksyny V sprzężonej z FITC oraz weryfikacja stopnia przepuszczalności błony plazmatycznej dla PI, barwiącego DNA i RNA komórek o zaburzonej integralności błony, umożliwiła odróżnienie komórek żywych, nieapoptotycznych (Ann V-FITC/PI⁻) od komórek wczesnoapoptotycznych (Ann V-FITC⁺/PI⁻) oraz wczesnonekrotycznych (Ann V-FITC⁺/PI⁺), a także od komórek martwych, nekrotycznych (Ann V-FITC⁻/PI⁺). Wyznakowane aneksyną V-FITC komórki emitowały zieloną, a barwiące się jodkiem propydydy – czerwoną fluorescencję. Plemniki analizowano w mikroskopie fluorescencyjnym przy użyciu odpowiednich filtrów. Uzyskane wyniki zamieszczono w tabeli 3.

Z danych zestawionych w tabeli 2 i 3 wynika, że zarówno nasienie transgenicznych i nietransgenicznych knurów charakteryzowało się niskim odsetkiem plemników apoptotycznych (YO-PRO-1⁺/PI⁻) oraz wczesnoapoptotycznych (Ann V-FITC⁺/PI⁻). Po zastosowaniu barwienia YO-PRO-1/PI nie wykazano statystycznie istotnych różnic w odsetku plemników apoptotycznych, nekrotycznych i żywych pomiędzy nasieniem transgenicznych i nietransgenicznych knurów. Jednocześnie po zastosowaniu barwienia aneksyną V-FITC i PI wykazano istotne różnice w odsetku plemników wczesnonekrotycznych (Ann V-FITC⁺/PI⁺) oraz nekrotycznych (Ann V-FITC⁺/PI⁺) pomiędzy nasieniem transgenicznych i nietransgenicznych knurów.

Z przeprowadzonych badań wynika, że wprowadzona modyfikacja genomu knurów przy użyciu transgeny pCMVFUT nie powoduje zaburzeń w procesie spermatogenezy i nie prowadzi do wzrostu odsetka plemników apoptotycznych w nasieniu.

Literatura: 1. Anzar M., He L., Buhr M.M., Kroetsch T.G., Pauls K.P., 2002 – Biol. Reprod. 66, 354-360. 2. Maleszewski M., Kuretake C., Evenson D., Yanagimachi H., Bjordahl J., Yanagimachi R., 1998 – Biol. Reprod. 58, 8-14. 3. Meliska C.J., Bartke A., 1997 – J. Androl. 18, 305-311. 4. Print C.G., Loveland K.L., 2000 – Bioessays 22, 423-430. 5. Pursel V.G., Bolt D.J., Miller K.F., Pinkert C.A., Hammer R.E., Palmiter R.D., Brinster R.L., 1990 – J. Reprod. Fert. (Suppl.) 40, 235-242. 6. Rexroad C.E., Hammer R.E., Bolt D.J., Mayo K.E., Frohman L.A., Palmiter R.D., Brinster R.L., 1989 – Mol. Reprod. Dev. 1, 164-169.

Polimorfizm białek zwierzęcych – krwi, mleka, nasienia, treści jaja

Joanna Szymańska, Jadwiga Miszkiewicz,
Daniel Rogoźnicki, Elżbieta Smalec

Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach

Podobnie, jak w innych dziedzinach życia, w nauce również zachodzą ciągłe zmiany. Koniec wieku XIX i wiek XX przyniosły ogromny postęp nauki, zwłaszcza dzięki wielu wynalazkom umożliwiającym doskonalenie technik badawczych. Zanim nastąpił rozwój badań nad grupami krwi i polimorfizmem białek, kalkulację stopnia homozygotyczności opierano na cechach takich jak umaszczenie zwierząt lub niektórych cechach ilościowych, warunkowanych zwykle przez kilka genów, co zmniejszało dokładność oceny [58]. Polimorfizm genetyczny, czyli genetyczna wielopostaciowość, to występowanie dwóch lub więcej alleli tego samego genu w populacji, uwarunkowane genetycznie, hormonalnie lub środowiskowo. Polimorfizm dostarcza informacji dotyczących struktury różnych populacji, dzielącego je dystansu genetycznego, pozwala śledzić skutki selekcji, inbrodu, dryfu genetycznego oraz odpowiedzi populacji na zmiany zachodzące w środowisku [50, 59].

Od lat 50. ubiegłego stulecia prowadzone były badania nad markerami genetycznymi cech produkcyjnych zwierząt. Początkowo analizowano antygeny grupowe krwi, białka surowicy krwi i białka mleka. Przypuszczano, że na podstawie obecności różnych wariantów genetycznych białek można przewidzieć predyspozycje zwierzęcia do wysokiej produkcji mleka, mięsa czy jaj. Marker genetyczny to prosta cecha jakościowa, zauważalna w fenotypie osobnika lub dająca się łatwo zidentyfikować za pomocą metod analitycznych, na przykład elektroforezy, wyzna-

czana zazwyczaj przez geny sprzężone z grupą genów determinujących selekcjonowaną cechę ilościową. Markery genetyczne podlegają dziedziczeniu według praw Mendla, same nie wpływają na poziom cechy ilościowej, są z nią tylko związane przez lokalizację w tym samym chromosomie [28].

Rozwój nauk biologicznych w drugiej połowie XX wieku związany był z rozwojem genetyki molekularnej, izolowaniem i poznawaniem genów odpowiadających za różne funkcje komórek. Jednym z przełomowych momentów było opracowanie metody pozwalającej na szybkie i wydajne sekwencjonowanie, czyli odczytywanie kolejności nukleotydów decydującej o zapisie informacji genetycznej. Kolejnym etapem badania funkcjonowania genomu jest analiza białek w komórce. Dawniej badano związek polimorfizmu białek płynów ustrojowych z cechami produkcyjnymi zwierząt, obecnie bada się polimorfizm genów kodujących te białka. Pojęcie proteomiki, czyli analizy proteomu, zostało wprowadzone w połowie lat 90. i oznacza globalną analizę białek danej komórki lub organizmu. Termin proteom pochodzi od angielskiego określenia PROTein complement of the genOME. Proteomika łączy techniki służące do jednoczesnej analizy setek lub tysięcy białek zawartych w komórkach. Umożliwia to szybsze uzyskiwanie wyników, ale otrzymane w ten sposób dane są mniej szczegółowe niż te pochodzące z klasycznej analizy pojedynczych białek. Proteomika jest dziedziną znacznie szerszą i bardziej złożoną niż genomika, ponieważ genom jest obiektem zmieniającym się w bardzo małym stopniu, natomiast wachlarz białek obecnych w komórce zmienia się nieustannie wskutek interakcji z czynnikami środowiskowymi oraz z innymi komórkami w organizmie. Ekspresja białek w komórkach może być różna zależnie od lokalizacji, fazy cyklu komórkowego oraz warunków w otaczającym środowisku. Ponadto, białka są polimerami 20 różnych typów aminokwasów, natomiast DNA jest polimerem 4 różnych typów nukleotydów, dlatego też odmiany sekwencji są znacznie większe w przypadku białek.

ROZDZIAŁ BIAŁEK

Podstawą analiz proteomicznych są techniki pozwalające na identyfikację pojedynczych polipeptydów w mieszaninach zawierających tysiące różnych białek. Do rozdziału białek stosuje się