

enchen, Niemcy), prof. Marek Świtoński; IFiZZ PAN w Jablonnie – dr hab. Alina Gajewska, prof. Kazimierz Kochman, dr Marek Snochowski; Wydział Nauk Weterynaryjnych SGGW, Warszawa – dr Michał Jank, prof. Tomasz Motyl i wsp.; Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn – dr Grzegorz Panasiewicz, prof. Bożena Szafrńska.

Literatura: 1. Adamowicz T., 2005 – Polimorfizm wybranych genów bydła: badania filogenetyczne ras oraz związek z wartością hodowlaną cech mlecznych i użytkowością rozplodową buhajów. Rozprawa doktorska, AR w Poznaniu. 2. Adamowicz T., Flisikowski K., Starzyński R., Świtoński M., Zwierzchowski L., 2006 – Mamm. Gen. 17 (1), 77-82. 3. Blott S., Kim J.J., Moisis S., Schmidt-Kuntzel A., Cornet A., Berzi P., Cambisano N., Ford C., Grisart B., Johnson D., Karim L., Simon P., Snell R., Spelman R., Wong J., Viikki J., Georges M., Farnir F., Coppeters W., 2003 – Genetics 163, 253-266. 4. Flisikowski K., 2004 – Wpływ polimorfizmu w regionie regulatorowym i kodującym genu STAT5A bydła na jego ekspresję i funkcję. Rozprawa doktorska, IGiHZ PAN w Jastrzębcu. 5. Flisikowski K., Starzyński R., Zwierzchowski L., 2004 – Biochimica et Biophysica Acta – Gene Structure and Expression 1679 (2), 195-199. 6. Flisikowski K., Szymanowska M., Zwierzchowski L., 2003 – Cel. Mol. Biol. Let. 8, 831-840. 7. Grisart B., Coppeters W., Farnir F., Karim L., Ford C., Berzi P., Cambisano N., Mni M., Reid S., Simon P., Spelman R., Georges M., Snell R., 2002 – Genome Research 12 (2), 222-231. 8. Grobet L., Martin L.J.R., Poncelet D., Royo L.J., Brouwers B., Pirrotin D., Michaux C., Mcnissier F., Zanotti M., Dunner S., Georges M., 1998 – Mamm. Gen. 9, 210-213. 9. Grochowska R., Gajewska A., Snochowski M., Zwierzchowski L.,

2002 – J. Anim. Feed Sci. 11, 223-236. 10. Jank M., Zwierzchowski L., Siadkowska E., Budasz-Świdarska M., Sadek T., Motyl T., 2006 – J. Anim. Feed Sci. 15, 381-391. 11. Kamiński S., 1996 – J. Appl. Genet. 37, 179-196. 12. Klauzińska M., 2002 – Polimorfizm regionów 5'-flankujących genów GH, GHR, prolaktyny i miostatyny bydła. Rozprawa doktorska, IGiHZ PAN w Jastrzębcu. 13. Klauzińska M., Zwierzchowski L., 2001 – 27th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, 30 June – 5 July 2001, Lisbon, Portugal, The FEBS Journal, p. 85, Abstr. PS3-100. 14. Maj A., 2004 – Polimorfizm w regionie regulatorowym i kodującym genu receptora hormonu wzrostu (GHR) bydła i jego wpływ na ekspresję genu i funkcję receptora. Rozprawa doktorska, IGiHZ PAN w Jastrzębcu. 15. Maj A., Gajewska A., Pierzchała M., Kochman K., Zwierzchowski L., 2007 – Neuroendocrinol. Letters 28(4) [Epub ahead of print]. 16. Maj A., Pareek C.S., Klauzińska M., Zwierzchowski L., 2005 – Anim. Breed. Genet. 122, 414-417. 17. Martin P., Szymanowska M., Zwierzchowski L., Leroux C., 2002 – Rep. Nut. Develop. 42, 433-459. 18. Szreder T., 2007 – Polimorfizm genu receptora estrogenu (ER) bydła i jego wykorzystanie jako markera cech produkcyjnych i rozrodu. Rozprawa doktorska, IGiHZ PAN w Jastrzębcu. 19. Szreder T., Zwierzchowski L., 2004 – Applied Genet. 45 (2), 225-236. 20. Szreder T., Żelazowska B., Oprządek J., Zwierzchowski L., 2007 – Mol. Biol. Rep. [Epub ahead of print]. 21. Szymanowska M., 2001 – Wpływ polimorfizmu w regionie 5'-flankującym genów kazeiny bydła na wiązanie czynników transkrypcyjnych i ekspresję genów w gruczole mlekowym. Rozprawa doktorska, IGiHZ PAN w Jastrzębcu. 22. Szymanowska M., Malewski T., Zwierzchowski L., 2004 – Int. Dairy J. 14 (2), 103-115. 23. Szymanowska M., Siadkowska E., Łukaszewicz M., Zwierzchowski L., 2004 – Le Lait 84, 579-590.

Uzyskiwanie zarodków bydłych *in vitro* jako model do badań wdrożeńiowych, biotechnologicznych i podstawowych

Anna M. Duszewska

IGiHZ PAN w Jastrzębcu

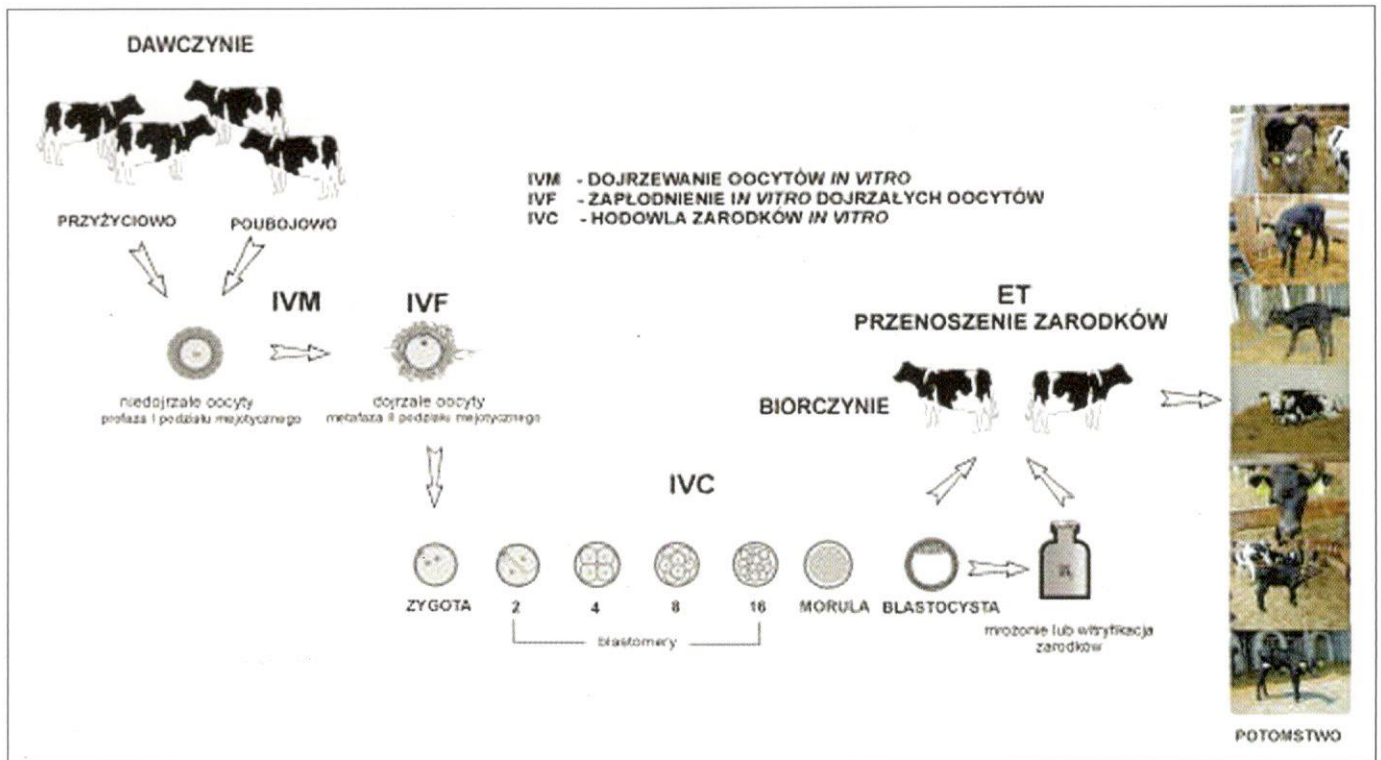
W zespole prowadzonym przez Profesora Z. Reklewskiego, w skład którego wchodzi: doc. dr hab. A.M. Duszewska, lek. wet. J. Wojdan, lek. wet. W. Gawron, mgr A. Rynkowska, mgr inż. E. Muchalska-Wenta, mgr inż. B. Waś i M. Cybulska prowadzone są badania nad uzyskaniem zarodków *in vitro* oraz wykorzystaniem tej biotechniki w hodowli bydła, biotechnologii oraz w badaniach podstawowych.

Uzyskiwanie zarodków bydłych *in vitro* jest podstawową biotechniką, ponieważ umożliwia ona stosowanie pozostałych, takich jak klonowanie, tworzenie transgenicznych osobników i ich klonowanie, a także tworzenie chimer. Uzyskiwa-

nie zarodków *in vitro* jest procedurą wieloetapową (rys.). W pierwszym etapie, zwanym dojrzewaniem oocytów, od dawczyń pobierane są niedojrzałe oocyty. Mogą one być pobierane przyżyciowo lub poubojowo. Proces dojrzewania oocyty przechodzą w warunkach *in vitro*. W kolejnym etapie, zwanym zapłodnieniem *in vitro*, dojrzałe oocyty inkubowane są z plemnikami. Trzecim etapem jest hodowla zarodków *in vitro*. Powstałe w wyniku zapłodnienia zygoty najczęściej hodowane są do stadium blastocysty. W tym stadium zarodki mogą być przeniesione do biorczyń lub też mogą być zamrożone albo wityfikowane i wykorzystane w późniejszym okresie [7]. Po przeniesieniu do biorczyń zarodków otrzymanych *in vitro* otrzymano potomstwo u wszystkich gatunków zwierząt gospodarskich: od owiec w 1987 roku [10], bydła w 1988 [18], świń w 1989 [19], kóz w 1993 [6], koni w 2002 [23]. Również i nasz Zespół uzyskał cielęta po przeniesieniu do biorczyń zarodków uzyskanych *in vitro* [7].

Istnieje wiele możliwości wykorzystania procedury uzyskiwania zarodków *in vitro*. Z pewnością procedura ta może być stosowana komercyjnie, w celu zwiększenia liczby potomstwa. W takich przypadkach mówimy o produkcji zarodków *in vitro* [30]. Jednak, biorąc pod uwagę skuteczność inseminacji oraz programu MOET, stosowanie tej biotechniki nie jest uzasadnione. Natomiast wiele nadziei wiąże się z jej wykorzystaniem w biotechnologii i badaniach podstawowych.

W biotechnologii, to przede wszystkim tworzenie transgenicznego bydła. Przykładem może być uzyskanie transgenicznych krów, charakteryzujących się zwiększonym poziomem β -kazeiny oraz κ -kazeiny w mleku [2] oraz krów odpornych na mastitis, których komórki nabłonkowe gruczolu mlekowego uwalniają lizostafinę działającą bakteriobójczo na



Rys. Uzyskiwanie zarodków bydlęcych *in vitro*

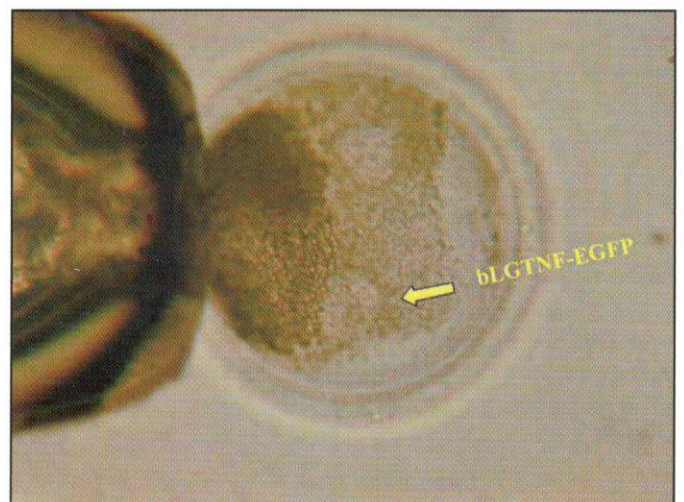
Staphylococcus aureus [33]. Jednak największe znaczenie ma wykorzystanie krów jako bioreaktorów do produkcji w mleku ważnych białek, mających zastosowanie w medycynie człowieka. Otrzymano już pierwsze krowy wytwarzające ludzkie białka o działaniu leczniczym, np. laktoferynę – w 2002 roku [31], albuminę – w 2002 roku [8] i hormon wzrostu – w 2005 roku [26].

Istnieje wiele metod tworzenia transgenicznego bydła [24, 34], z których do najczęściej stosowanych należy zaliczyć: wprowadzenie obcego DNA do przedjądrza zygot metodą mikroiniekcji [16, 25], transfekcję bydlęcych komórek somatycznych, a następnie wykorzystanie ich do klonowania [5] oraz wykorzystanie plemników jako wektorów do wprowadzenia obcego DNA [29]. Metodą mikroiniekcji uzyskano najpierw transgeniczne myszy – w 1980 roku [12], a następnie owce, świnię i króliki – w 1985 roku [13] oraz krowy – w 1991 roku [16].

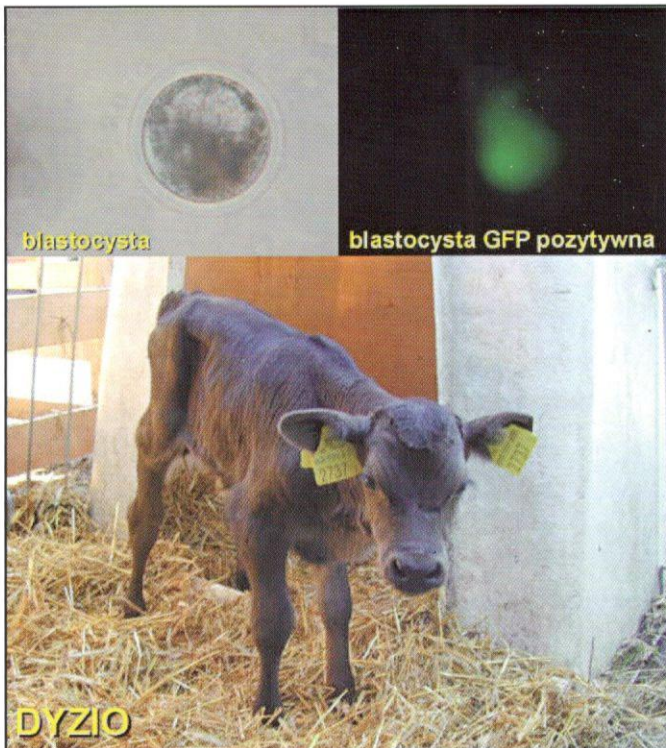
Od kilku lat badania w tym kierunku prowadzone są przez nasz Zespół, we współpracy z dr. D. Lipińskim z Katedry Biochemii i Biotechnologii Akademii Rolniczej w Poznaniu. W początkowej fazie dotyczyły one uzyskania cieląt z integracją genu ludzkiego czynnika martwicy nowotworowej alfa. Obcy DNA w postaci transgeny (pBLGTNF-EGFP) wprowadzano metodą mikroiniekcji do przedjądrza zygot (fot. 1). Transgen zawierał ludzki gen martwicy nowotworowej typu beta, natomiast jako promotora użyto genu bydlęcej beta-laktoglobuliny, odpowiedzialnego za ekspresję genu w komórkach wydzielniczych gruczołu mlekowego krowy. Transgen zawierał również gen reporterowy – *gfp*, którego produktem ekspresji jest białko świecące w komórce na zielono w świetle ultrafioletowym. GFP teoretycznie umożliwia wybór tylko tych zarodków, w których doszło do integracji transgeny z genomem gospodarza.

W wyniku wieloletnich doświadczeń, w jednym przypadku uzyskaliśmy zarodek w 100% GFP pozytywny, czyli całkowicie świecący na zielono. Po jego transferze do biorczyńki otrzymaliśmy buhajka (fot. 2). Jednak szczegółowa analiza molekularna (PCR) nie potwierdziła obecności transgeny w komórkach jego krwi i wybranych tkankach.

Obecne badania dotyczą uzyskania cieląt z integracją genu ludzkiego interferonu i realizowane są we współpracy z doktorem D. Lipińskim z Katedry Biochemii i Biotechnologii AR w Poznaniu w ramach grantu KBN 2PO6D05228. Interferon stosowany jest w leczeniu wielu chorób, szczególnie nowotworowych, stąd też ogromne zainteresowanie nowymi źródłami jego pozyskiwania. W dotychczasowych badaniach,



Fot. 1. Wprowadzenie transgeny do jednego z przedjądrzy bydlęcej zygoty



Fot. 2. Bydłęca blastocysta uzyskana po wprowadzeniu transgenu pbLGTNF-EGFP; po lewej – blastocysta pod mikroskopem świetlnym, po prawej – blastocysta w 100% GFP pozytywna pod mikroskopem fluorescencyjnym; pod spodem buhajek urodzony po przeniesieniu jej do biorczyni

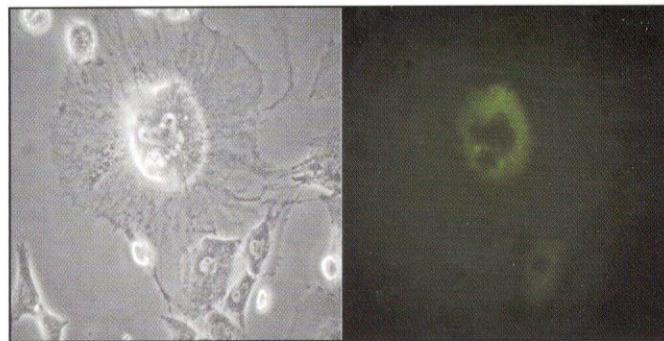
przy zastosowaniu mikroiniekcji, nie udało się uzyskać cieląt z integracją ludzkiego genu interferonu.

W związku z tym planowane jest uzyskanie transgenicznego bydła drogą klonowania somatycznego. Klonowanie somatyczne, a dokładnie przeszczepianie jąder komórek somatycznych, jest metodą powszechnie stosowaną [3]. Do tej pory sklonowano zarówno zwierzęta gospodarskie: owce w 1997 r. [35], bydło w 1998 r. [5], kozy w 1999 r. [1], świnię w 2000 r. [22], konie w 2003 r. [9], jak również koty – w 2002 r. [28] i psy – w 2005 r. [17] oraz zwierzęta laboratoryjne: myszy w 1998 r. [32], króliki w 2002 r. [4], szczury w 2003 r. [36], a także wiele innych gatunków.

Wykorzystanie klonowania somatycznego jest o wiele bardziej skuteczną metodą niż mikroiniekcja, czy też użycie plemników jako wektora do wprowadzenia transgenu [24]. Do tej pory tą drogą uzyskano transgeniczne owce – w 1997 r. [27], krowy – w 1998 r. [5], kozy – w 2001 r. [15] i świnię – w 2002 r. [21].

Badania nad uzyskaniem transgenicznych krow z wykorzystaniem klonowania rozpoczęliśmy od wyprowadzenia linii fibroblastów od krow rasy polskiej czerwonej. Izolowane z ucha jąłówek fibroblasty poddano transfekcji jedną z metod, zwaną lipofekcją. Szczegółowa analiza otrzymanych linii fibroblastów (fot. 3) metodą PCR i FISH (fot. 4) potwierdziła integrację transgenu (pbLGINF-GFPBsd) z genomem fibroblastów.

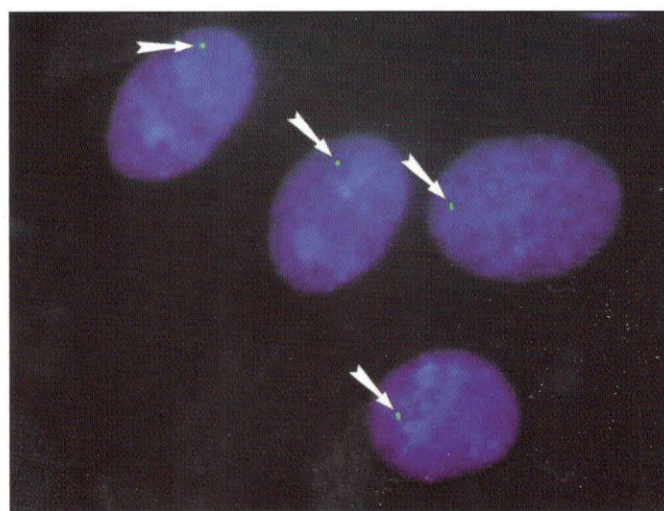
W najbliższym czasie planowane są doświadczenia z wykorzystaniem linii transgenicznych komórek jako dawców jąder do klonowania i uzyskanie tą drogą transgenicznych krow, z ekspresją genu ludzkiego interferonu w komórkach nabłonkowych gruczołu mlekowego krowy. Dalsza część ba-



Fot. 3. Linia bydłeczych transgenicznych fibroblastów uzyskana po wprowadzeniu transgenu pbLGINF-GFPBsd; po lewej – pod mikroskopem świetlnym, po prawej – pod mikroskopem fluorescencyjnym – komórki GFP pozytywne

dań jest uzależniona od dofinansowania przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Procedura uzyskiwania zarodków bydłeczych *in vitro* jest stosowana przez nasz Zespół nie tylko w hodowli oraz bio-



Fot. 4. Jądra interfazowe transgenicznych fibroblastów. Technika FISH z zastosowaniem sondy fluorescencyjnej zaobserwowano (strzałka) sygnał integracji transgenu pbLGINF-GFPBsd

technologii, ale również w badaniach podstawowych. Wczesny rozwój zarodków bydłeczych jest zbliżony do wczesnego rozwoju zarodków ludzkich, stąd bydło stanowi model do badań medycznych [20]. Spośród wielu kierunków badań prowadzonych przez nasz Zespół, na szczególną uwagę zasługują doświadczenia nad wpływem wysokich temperatur na płodność krow. Globalne ocieplenie powoduje u nich szok cieplny [11], co prowadzi do niekorzystnych zmian w funkcjonowaniu narządów rozrodczych, przebiegu cyklu płciowego oraz ma negatywny wpływ na dojrzewanie oocytów, zapłodnienie, a także prenatalny i postnatalny rozwój bydła [14].

Badania prowadzone przez nasz Zespół dotyczą ekspresji genów białek szoku cieplnego (HSP 70) we wczesnym rozwoju zarodków bydłeczych *in vitro*, w zależności od temperatury. Przeprowadzone będą doświadczenia nad interakcją między układem rozrodczym a wczesnym rozwojem zarodków bydła. Badania realizowane będą we współpracy z profesorem P. Sysą z Zakładu Histologii i Embriologii SGGW w Warszawie.

Literatura: 1. Baguisi A., Behboodi E., Melican D.T., Pollock J.S., Destremes M.M., Cammuso C., 1999 – Nature Biotechnology 17,

- 456-461. 2. Brophy B., Smolenski G., Wheeler T., Wells D., Huillier P., Laible G., 2003 – *Nature Biotechnology* 21, 157-162. 3. Campbell K.H.S., Fisher P., Chen W.C., Choi I., Kelly R.D.W., Lee J.-H., Xhu J., 2007 – *Theriogenology* 68, 214-231. 4. Chesne P., Adenot P.G., Viglietta C., Baratte M., Boulanger L., Renard J.P., 2002 – *Nature Biotechnology* 20, 366-369. 5. Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J., Kane J.J., Jerry J., Blackwell C., 1998 – *Science* 280, 1256-1258. 6. Crozet N., Smedt V., Ahmed-Ali M., Sevellec C., 1993 – *Theriogenology* 39, 206. 7. Duszewska A.M., 2005 – Uzyskiwanie zarodków bydłych *in vitro* i ocena rozwoju zarodków z wprowadzoną konstrukcją genową. Rozprawa habilitacyjna. Prace i Materiały Zootechniczne. Monografie i Rozprawy 13, 1-50. 8. Echelard Y., Destrempe M.M., Koster J.A., Blackwell C., Groen W., Pollock D., Williams J.L., Behboodi E., Pommer J., Meade H.M., 2002 – *Theriogenology* 57, 779. 9. Galli C., Lagutina I., Crotti G., Colleoni S., Turini P., Ponderato N., 2003 – *Nature* 424, 635. 10. Gandolfi F., Moor R.M., 1987 – *J. Reprod. Fertil.* 81, 23-28. 11. Garcia-Isperto I., López-Gatius F., Bech-Sabat G., Santolaria P., Yaniz J.L., Nogareda C., De Rensis F., López-Béjar M., 2007 – *Theriogenology* 67, 1379-1385. 12. Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J., Barbosa J.A., Ruddle F.H., 1980 – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7380-7384. 13. Hammer R.E., Pursel V.G., Rexroad C., Wall R.J., Bolt D.J., Ebert K.M., Palmeter R.D., Brinster R.L., 1985 – *Nature* 315, 680-683. 14. Hansen P.J., 2007 – *Theriogenology* 67, 1518-1529. 15. Keefer C.L., Baldassarre H., Keyston R., Wang B., Bhatia B., Bilodeau A.S., Zhou J.F., Leduc M., Downey B.R., Lazaris A., Karatzas C.N., 2001 – *Biology Reproduction* 64, 849-856. 16. Krimpenfort P., Rademakers A., Eyestone W., Van de Achans A., Van de Broek S., Koiman P., Kootwijk E., Platenbury G., Pieger F., Strijker R., de Boer H., 1991 – *Biotechnology* 9, 844-847. 17. Lee B.C., Kim M.K., Jang G., Oh H.J., Yuda F., Kim H.J., 2005 – *Nature* 436, 641. 18. Lu K.H., Gordon I., Chen H.B., Gallagher M., McGovern H., 1988 – *Vet. Rec.* 122, 539-540. 19. Mattioli M., Bacci M.L., Galeati G., Seren E., 1989 – *Theriogenology* 31, 1201-1207. 20. Niemann H., Wrenzycki C., 2000 – *Theriogenology* 53, 21-23. 21. Park K.W., Lai L., Cheong H.T., Cabot R., Sun Q.Y., Wu G., Rucker E.B., Durtschi D., Bonk A., Samuel M., Rieke A., Day B.N., Murphy C.N., Carter D.B., Prather R.S., 2002 – *Biology of Reproduction* 66, 1001-1005. 22. Polejaeva I.A., Chen S.H., Vaught T.D., Page R.L., Mullins J., Ball S., 2000 – *Nature* 407, 86-90. 23. Squires E.L., Carnevale E.M., McCue P.M., Bruemmer J.E., 2003 – *Theriogenology* 59, 151-170. 24. Robl J.M., Wang Z., Kasinathan P., Kuroiwa Y., 2007 – *Theriogenology* 67, 127-133. 25. Roschlau K., Rommel P., Andreeva L., Zackel M., Roschlau D., Zackel B., Schwerin M., Huhn R., Gazarjan K.G., 1989 – *Journal Reproduction and Fertility* 38, suppl., 153-160. 26. Salamone D., 2005 – *New Scientist* 2481, 15. 27. Schnieke A.E., Kind A.J., Ritchie W.A., Mycock K., Scott A.R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A., Campbell K.H.S., 1997 – *Science* 278, 2130-2133. 28. Shin T., Kraemer D., Pryor J., Liu L., Rugila J., Howe L., 2002 – *Nature* 415, 859. 29. Sperandio S., Lulii V., Bacci M.L., Forni M., Maione B., Spadafora C., Lavitrano M., 1996 – *Animal Biotechnology* 7, 59-77. 30. Thibier M., 2004 – *Embryo Transfer Newsletter* 22(4), 12-19. 31. Van Berkel P.H., Welling M.M., Geerts M., Van Veen H.A., Ravensbergen B., Salaheddine M., Pauwels E.K., Pieper F., Nuijens J.H., Nibbering P.H., 2002 – *Nature Biotechnology* 20, 484-487. 32. Wakayama T., Perry A.C., Zuccotti M., Johnson K.R., Yanagimachi R., 1998 – *Nature* 394, 369-74. 33. Wall R.J., Powell A.M., Paape M.J., Kerr D.E., Bannerman D.D., Pursel V.G., Wells K.D., Talbot N., Hawk H.W., 2005 – *Nature Biotechnology* 23(4), 445-451. 34. Wall R.J., 2002 – *Theriogenology* 57, 189-201. 35. Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H.S., 1997 – *Nature* 358, 810-813. 36. Zhou Q., Renard J.P., Le Friec G., Brochard V., Beaujean N., Cherifi Y., 2003 – *Science* 302, 1179.

Wpływ polimorfizmu wybranych genów na występowanie mastitis u krów

Grażyna Sender,
Karima Galal Abdel Hameed

IGiHZ PAN w Jastrzębcu

Prowadzona przez wiele lat w hodowli zwierząt selekcja koncentrowała się przede wszystkim na doskonaleniu cech produkcyjnych, natomiast ignorowała zdrowie zwierząt. Doprowadziło to do znacznego wzrostu produktywności, jednak zapomniano, że najważniejszymi cechami, preferowanymi w selekcji naturalnej, jest sukces rozrodczy i zdrowie zwierząt, a także, że wzrost osiągnięty przez selekcję jednej cechy powoduje często spadek w innych cechach. Konsekwencją wzrostu produktywności zwierząt, osiągniętej poprzez selekcję, było pogorszenie ich zdrowia. Jednak wysoka produkcja nie jest możliwa bez dobrego zdrowia zwierząt, więc aby je zapewnić uzależniono się od interwencji weterynaryjnych i stosowania antybiotyków. Konsekwencją tych działań było

pojawienie się problemów zdrowotnych u ludzi wynikających z chorób odzwierzęcych, jak zakażenia bakteriami z grupy *E. coli* czy *Salmonella* poprzez kontakt z chorymi zwierzętami lub produktami pochodzącymi od chorych zwierząt.

Wraz ze wzrostem niebezpieczeństwa wystąpienia chorób odzwierzęcych, wzrasta także presja publiczna na poświęcanie większej uwagi zdrowiu zwierząt. Dodatkowo wzrastają również wymagania konsumentów, którzy poszukują produktów pochodzenia zwierzęcego wyprodukowanych w sposób naturalny. Nie bez znaczenia jest również coraz mniejsza efektywność antybiotyków, będąca rezultatem występowania u zwierząt chorób wywołanych bakteriami opornymi na działanie antybiotyków. Wszystko to razem stanowi ważny powód do skoncentrowania wysiłków prowadzących do wyhodowania zwierząt charakteryzujących się lepszą naturalną odpornością na choroby.

W Zakładzie Doskonalenia Zwierząt IGiHZ PAN w Jastrzębcu od lat trwają prace nad wykorzystaniem metod genetycznych służących wyhodowaniu zwierząt odpornych na zapalenie wymienia. Dotychczasowe metody stosowane w celu ograniczenia występowania mastitis, a polegające głównie na poprawie warunków środowiskowych utrzymania krów mlecznych oraz stosowania antybiotyków w leczeniu chorych zwierząt, nie przyniosły oczekiwanych wyników. Najnowsze metody statystyczne, na przykład wykorzystanie „modelu zwierzęcia” do szacowania wartości hodowlanej (genetycznej) liczby komórek somatycznych (wskaźnik mastitis), pozwoliły na potwierdzenie genetycznych różnic w podatności (oporności) krów na zapalenie wymienia w populacji bydła