Chimery ptaków – nowe możliwości badawcze

Marek Bednarczyk

Technika transgenezy oznacza wprowadzenie funkcjonalnego materiału genetycznego do komórek szlaku płciowego organizmu. Zwierzęta transgeniczne, stwarzając unikalne możliwości badawcze, znajdują wiele aktualnych i potencjalnych zastosowań:

- w badaniach podstawowych;
- jako źródło organów dla ksenotransplantacji;
- jako model w badaniach nad chorobami człowieka;
- w produkcji białek o charakterze terapeutycznym (bioreaktory);
- w rolnictwie, np. w celu manipulacji poziomem cech produkcyjnych;
- do testowania szczepionek;
- do testowania substancji toksycznych, itd.

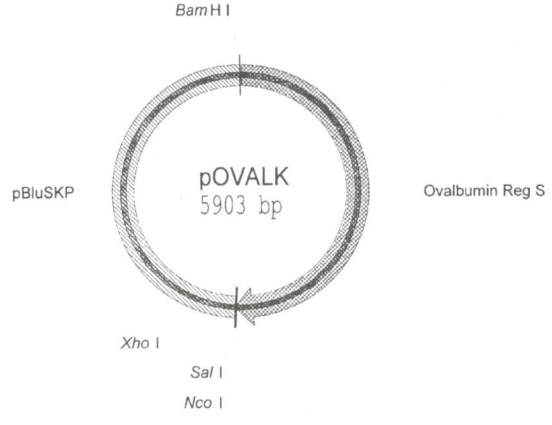
Ptaki, z uwagi na znaczne możliwości reprodukcyjne (np. w przypadku kur: 200-250 szt. piskląt w ciągu roku, po 6 miesiącach dojrzałość płciowa, po 3 tygodniach wylęg piskląt), znaczne zróżnicowanie genetyczne pomiędzy wyspecjalizowanymi, często homozygotycznymi rodami oraz niski koszt utrzymania, mogłyby stanowić doskonały model w wielu z wymienionych zastosowań. Jednak specyficzny cykl rozwojowy ptaków sprawia, że najczęściej stosowana w odniesieniu do ssaków metoda mikroiniekcji DNA do jednego z przedjądrzy nie znajduje zastosowania. Czynione próby mikroiniekcji DNA do cytoplazmy komórki w okolice domniemanego przedjądrza [7, 8, 14] okazały się mało przekonywujące, nawet jeśli niektóre z nich kończyły się sukcesem – jedno transgeniczne pisklę spośród siedmiu [5] lub spośród dwudziestu pięciu [7] wylężonych. W większości przypadków dochodziło bowiem do stopniowej eliminacji egzogennego DNA, w miarę rozwoju embrionalnego i kolejnych podziałów komórek. Przypuszcza się, że stwierdzane we wczesnych fazach rozwoju zarodków biorców obce sekwencje istnieją w formie episomalnej, a więc nie ulegają integracji w chromosomach biorcy [7, 14]. Ostatnio uzyskano jednak pewne sukcesy po iniekcji plazmidu, do którego włączono transpozon, element pochodzący od *Drosophila* [15].

Wykorzystanie retrowirusów do tworzenia ptaków transgenicznych nie ma perspektyw, mimo niewątpliwych sukcesów poznawczych [3, 13, 16]. Poza metodycznymi niedogodnościami (ograniczenia wprowadzanego konstruktu do zaledwie kilku kpz, konieczność odpowiedniego powinowactwa z infekowanymi komórkami) istnieją wobec tej metody znacznie poważniejsze zastrzeżenia. Manipulacje patogenami nie znajdują akceptacji społecznej, pomimo konstrukcji retrowirusów replikacyjnie defektywnych. Obawy te są uzasadnione, zważywszy przypadki uaktywnienia się patogenów lub ekspresji niektórych genów komórki (protoonkogenów) w wyniku interakcji obu genomów [1].

Od kilku lat rozwijają się badania nad wykorzystaniem komórek embrionalnych (komórek blastodermalnych – BCs lub pierwotnych komórek płciowych – PGCs) do wprowadzania egzogennego DNA do zarodka kury. Według aktualnego stanu wiedzy, tworzenie transgenicznych ptaków z wykorzystaniem komórek BCs może być metodą z wyboru. Decydują o tym właściwości BCs: mogą być przenoszone z zarodków dawców do zarodków biorców, brać udział w tworzeniu somatycznych tkanek i kolonizować gonady biorców, mogą być utrzymywane *in vitro* przez wiele dni, przechowywane po zamrożeniu, mogą być transfekowane i wykazywać ekspresję obcych genów *in vitro* i *in vivo* [2]. Metoda polega na tworzeniu chimer i odpowiednim ich krzyżowaniu w celu identyfikacji chimer płciowych, które mogłyby przekazywać pożądane cechy potomstwu, ewentualnie dać początek linii ptaków transgenicznych.

Dotychczasowe prace z omawianego zakresu mają jednak charakter fragmentaryczny, przede wszystkim z uwagi na wysoką śmiertelność na różnym etapie rozwoju chimer i potencjalnych chimer oraz ich niewielki odsetek w stosunku do traktowanych embrionów.

Celem badań prowadzonych od kilku lat w Oddziale Badawczym Drobiarstwa Instytutu Zootechniki jest opracowanie efektywnej metody tworzenia chimer kury, pozwalającej na regularne uzyskiwanie znacznej ich liczby, będącej materiałem wyjściowym do dalszych wielokierunkowych badań. Ponadto, wspólnie z Zakładem Biologii Molekularnej Centrum Onkologii Instytutu Marii Curie-Skłodowskiej w Gliwicach, pracowano nad skuteczną metodą transfekcji komórek BCs przy użyciu wektorów skonstruowanych w Instytucie Biotechnologii Antybiotyków w Warszawie.



Rys. Projekt wektora do transfekcji komórek blastodermalnych kury.

Jako sekwencje regulujące (Ovalbumin Reg S) wybrano promotor genu ovalbuminy kurzej (numer dostępu w GenBank: J00895 lub M24999, współrzędne: 15-3000). Wybrany gen został przekształcony za pomocą metody PCR poprzez dodanie odpowiednich sekwencji rozpoznawanych przez nukleazy restrykcyjne (NcoI i jeden z: *Xho* I lub *Sal* I) i włączony do plazmidu za pomocą ligazy DNA z faga 4

Tabela 1
Wpływ metody iniekcji komórek blastodermalnych na przeżywalność i wylęgowość zarodków biorców

Metoda	Powtórzenie	Liczba traktowanych zarodków	Przeżywalność (%) zarodków w kolejnych dobach lęgu: 4	8	12	18	Wylęgowość %
A	1	53	24	24	10	4	7,5
	2	22	12	4	1	1	4,5
	3	25	9	8	8	4	16,0
	4	43	17	17	9	7	11,6
	razem	143	62 (43,4)	53 (37,1)	28 (19,6)	16 (11,2)	9,8[A]
B	1	15	12	10	9	8	46,7
	2	17	14	14	12	12	35,3
	3	18	15	15	14	10	50,0
	4	16	12	12	10	4	25,0
	5	16	11	11	9	8	37,5
	6	23	15	14	14	11	47,8
	razem	105	79 (75,2)	76 (72,4)	60 (57,1)	53 (50,5)	41,0[B]

Metoda A – tradycyjna [10], metoda B – opracowanie własne
A, B – średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy P≤0,01

Efektem dotychczas przeprowadzonych badań jest określenie:

- optymalnych warunków pobierania, manipulacji i przetrzymywania *in vitro* BCs – określono morfologię oraz przeżywalność (barwiąc błękitem trypanu) komórek BCs w zależności od czasu i temperatury przetrzymywania;
- czynników wpływających na przeżywalność zarodków biorców – liczba i objętość komórek wprowadzana do zarodka biorcy, naświetlanie biorców promieniami γ, wielkość i umiejscowienie otworu w skorupie, przez który dokonywano iniekcji BCs dawcy oraz sposób jego zalepiania. Na podstawie uzyskanych wyników opracowano własną metodę iniekcji BCs. Podsumowanie tej części badań przedstawiono w tabeli 1;

Tabela 2
Wpływ pochodzenia dawcy komórek blastodermalnych na wylęgowość kurcząt chimer

Dawca	Biorca	Liczba traktowanych zarodków	Wylęgowość %	Liczba (%) chimer: potencjalnych	fenotypowych
barred plymouth rock	white leghorn	71	33,8	22 (91,7)	2 (8,3)
rhode island red	white leghorn	68	7,4	5 (100)	–
zielononóżka kuropatwiana	white leghorn	41	56,1	3 (13,0)	20 (86,9)

- czynników wpływających na odsetek chimer fenotypowych – pochodzenie komórek dawcy (barred plymouth rock, rhode island red lub zielononóżka kuropatwiana), kryteria oceny: barwa upierzenia potencjalnych chimer, markery DNA (amplifikacja metodą RAPD-PCR fragmentu DNA charakterystycznego dla dawcy – zielononóżki kuropatwianej), barwa skorup jaj znoszonych przez dojrzałe płciowo potencjalne chimery. Wyniki przedstawiono w tabeli 2 i 3;
- identyfikacja chimer płciowych – dojrzałe płciowo fenotypowe chimery obu płci kojarzono zgodnie z następującym schematem: samiec chimera fenotypowa x samica zielononóżka kuropatwina; samica chimera fenotypowa x samiec zielononóżka kuropatwiana. Wyniki krzyżowania zestawiono w tabeli 4;
- skonstruowanie specjalnych wektorów plazmidowych – przyjęto założenie, że do transfekcji komórek skonstruowane zostaną specjalne wektory plazmidowe, dzięki którym będzie możliwe umieszczenie genów pod kontrolą promotora genu owalbuminy kurzej, który powinien odznaczać się specyficznością tkankową (rys.). Wektor ten wykorzystany został, po włączeniu genów reporterowych (genu lucyferazy i GFP – green fluorescence protein) do sprawdzenia regulatorowych właściwości promotora genu owalbuminy w badaniach *in vitro*. Do opisanych wektorów plazmidowych włączone zostały także geny ludzkiego hormonu wzrostu i interferonu α2a, które będą wykorzystane w późniejszych badaniach nad tworzeniem ptaków bioreaktorów, produkujących w białku jaja ludzkie białka o charakterze leczniczym;

Tabela 3
Barwa skorupy jaj pochodzących od kur potencjalnych chimer (brak fenotypowego markera chimeryzmu) oraz BPR (dawców) i WL (biorców)

Numer potencjalnej chimery	Liczba jaj	Barwa skorupy	WL 85,0 ±0,9	BPR 52,5 ±7,9
1	27	79,1 ±1,0	xx	xx
2	29	84,4 ±0,8	ns	xx
3	30	78,8 ±1,0	xx	xx
4	24	84,5 ±1,3	ns	xx
5	27	79,7 ±1,2	xx	xx
6	23	84,0 ±0,6	x	xx
7	26	80,6 ±0,7	xx	xx

Potencjalne chimery oznaczają ptaki, u których nie stwierdzono fenotypowego markera chimeryzmu – ciemnych plam (BPR – barred plymouth rock) na białym upierzeniu (WL – white leghorn)
Barwę skorupy określano przy pomocy elektronicznego urządzenia i porównywano z charakterystycznym dla biorcy (WL – 85,0±0,9) i dawcy (BPR – 52,5±7,9)
ns – brak statystycznie istotnych różnic; x – różnica statystycznie istotna przy P≤0,05; xx – różnica statystycznie istotna przy P≤0,01

- określono optymalne warunki lipofekcji – uzależnione są one od rodzaju i koncentracji komórek, rodzaju stosowanego kompleksu lipidowego, stosowanego plazmidu DNA, proporcji lipid/DNA, warunków fizycznych reakcji, itp. Ich optymalizacja pozwoliła na uzyskanie wydajnej ekspresji genu lucyferazy w komórkach blastodermalnych kury *in vitro*. Trwają badania z GFP.

Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, że efektywność zaproponowanej metody tworzenia fenotypowych i płciowych chimer jest znacznie większa (średnio 41,0% wylęgu; 86,9% fenotypowych chimer; 30,0% chimer płciowych), w porównaniu z wynikami (5,0-30,2% wylęgu; 3,2-44,2% fenotypowych chimer; brak lub pojedyncze przypadki chimeryzmu płciowego) uzyskiwanymi przez innych autorów [6, 8, 9,

Tabela 4
Wyniki testu identyfikacji chimer płciowych

Numer chimery fenotypowej	Płeć	Numer nakładu					Razem piskląt	Procent chimeryzmu gonad
		1	2	3	4	5		
3368	samiec	1 (0)	1 (0)	3 (2)	10 (2)	5 (1)	20 (5)	25,0
3806	samica					5 (3)	5 (3)	60,0
3366	samica					10 (4)	10 (4)	40,0
3808	samica	0	4 (0)	9 (0)	9 (1)		22 (1)	4,5
3364	samica	0	2 (0)	2 (1)	8 (2)		17 (3)	17,6
Razem							74 (16)	21,6

Oceniane ptaki powstały po iniekcji komórek blastodermalnych zielononóżki kuropatwianej (ii) do zarodków leghorna (II); każdy z nich był fenotypową chimerą (posiadał ciemne plamy na upierzeniu). Po osiągnięciu dojrzałości płciowej każdy z nich został poddany krzyżowaniu wstecznemu, według następującego schematu: samiec chimera fenotypowa x samica zielononóżka kuropatwiana; samica chimera fenotypowa x samiec zielononóżka kuropatwiana. Pojawienie się zielononóżek, wśród piskląt wylężonych w wyniku tego krzyżowania, było dowodem na chimeryzm płciowy jednego z rodziców, zgodnie z następującym założeniem: zielononóżka kuropatwiana samica (ii) x samiec chimera (II, ii); zielononóżka kuropatwiana samiec (ii) x samica chimera (II, ii)

10, 11, 12, 17, 18]. Wyniki wylęgu (od 25,8 do 40,7%) porównywalne z naszymi udało się uzyskać jedynie Kino i wsp. [4], którzy przenosili traktowane zarodki, po kilku dniach tradycyjnej inkubacji, do skorup zastępczych. Zabieg ten jest pracochłonny i wiąże się ze stratą pewnej liczby osobników (nie wszystkie iniekowane nadają się do przeniesienia).

Należy podkreślić, że opracowana metoda umożliwia uzyskanie wysokich wskaźników na każdym z jej etapów, począwszy od przeżywalności komórek blastodermalnych *in vitro*, po liczbę identyfikowanych chimer płciowych. W pracach cytowanych autorów, często wysokiemu wskaźnikowi wylęgu (30,2%) towarzyszył niski procent fenotypowych chimer (3,2%) i brak chimer płciowych [18], natomiast uzyskanie 36 szt. fenotypowych chimer, z których żadna nie wykazała chimeryzmu płciowego, wymagało manipulacji na 1729 zarodkach [17]. Podobnie, jak przetestowanie 1110 piskląt pozwoliło na identyfikację jednej chimery płciowej w badaniach Ono i wsp. [9].

Poza aspektem praktycznym, najważniejszą konkluzją dotychczasowych badań jest wykazanie po iniekcji BCs chimeryzmu różnych komórek biorców: melanocytów (barwa upierzenia), erytrocytów (marker DNA), gruczołu skorupowego (barwa skorupy), komórek płciowych – plemniki i oocyty (chimery płciowe – kogut i kury). Stwierdzono także nowe fakty dotyczące interakcji pomiędzy komórkami biorcy i dawcy. Wykazano, że odpowiednie naświetlanie zarodków biorców połączone z ich przetrzymywaniem przed iniekcją powoduje niemal 100% śmiertelność do 10 doby życia, o ile nie nastąpi iniekcja BCs. Sugeruje to, że wszystkie podobnie traktowane zarodki, po iniekcji BCs są w rzeczywistości chimerami, pozostaje jedynie ich identyfikacja na podstawie odpowiedniego markera. Potwierdzeniem jest ciemna barwa skorupy jaj (charakterystyczna dla dawców) znoszonych przez większość potencjalnych chimer (brak oznak upierzenia dawcy).

Istnieje niewiele informacji dotyczących hodowli *in vitro* i transfekcji komórek blastodermalnych. Konstrukcja odpowiednich wektorów i uzyskanie znaczącej ekspresji genu reporterowego w komórkach BCs stwarza dalsze możliwości badawcze. Opracowanie efektywnej, powtarzalnej metody produkcji fenotypowych i płciowych chimer kury oraz transfekcji komórek blastodermalnych, pozwoliło na uzyskanie licznej, unikalnej populacji tych ptaków, mogących stanowić podstawę rozwoju różnorodnych, często potencjalnych do tej pory kierunków badawczych, umożliwiających np.: analizę pochodzenia komórek w poszczególnych tkankach, analizę wpływu mikrośrodowiska na komórki, ich wzajemnego oddziaływania i migracji w organizmie, studia rozwoju systemu immunologicznego, nerwowego, erytropoezy, studia wczesnych anomalii rozwojowych zarodków, przechowywania genotypów metodą kriokonserwacji, a przede wszystkim tworzenie ptaków transgenicznych lub bioreaktorów.

Uzyskana wiedza okazała się przydatna w realizowanych obecnie przez nasz zespół badaniach nad tworzeniem ptaków bioreaktorów, o zmodyfikowanym składzie białka jaja, umożliwiającym produkcję cennych, ludzkich białek leczniczych.

Literatura: 1. Crittenden L.B., Salter D.: Poultry Sci. 71, 799-806, 1992; **2. Etches, R.J., Clark M.E., Zajchowski L., Specksnijder G., Gibbins A.M.V., Kino K., Pain B., Samarut J.:** Poultry Sci. 76, 1075-1083, 1997; **3. Itoh N., Miwa T., Mikawa T.:** Development 122, 291-300, 1996; **4. Kino K.B., Pain B., Leibo M., Cochrans M., Clark M.E., Etches R.J.:** Poultry Sci. 76, 753-760, 1997; **5. Love J., Gribbin C., Mather C., Sang H.:** BioTechnology 12, 60-63, 1994; **6. Maeda T., Yamakawa Y., Masuda K., Terada T.:** British Poultry Sci. 38, 241-244, 1997; **7. Naito M., Sasaki E., Ohtake M., Sakurai M.:** Mol. Reprod. Develop. 37, 167-171, 1994; **8. Naito M., Watanabe W., Kinutani M., Nirasawa K., Oishi T.:** Brit. Poultry Sci. 32, 79-86, 1991; **9. Ono T., Muto S., Matsumoto T., Yoshida M.:** J. Poultry Sci. 32 (4), 252-256, 1995; **10. Petitte J., Clark M.E., Liu G., Verrinder Gibbins A.M., Etches R.J.:** Development 108, 185-189, 1990; **11. Pokorny P.:** Uzyskiwanie chimer kurzych w wyniku mikroiniekcji komórek blastodermalnych po ich uprzednim poddaniu kriokonserwacji. Praca doktorska, AR Wrocław, 1999; **12. Reedy S.E., Leibo S.P., Clark M.E., Etches R.J.:** Proceedings of the First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry, Poultry Science Association, Savoy, IL, 251-261, 1995; **13. Salter D.W., Crittenden L.B.:** Theor. Appl. Genet. 77, 457-461., 1989; **14. Sang H., Perry M.:** Mol. Reprod. Dev. 1, 98-106, 1989; **15. Sherman A., Dawson A., Mather C., Gilhooley H., Li Y., Mitchell R., Finnegan D., Sang H.:** Nat. Biotechnol. 16, 1050-1053, 1998; **16. Shuman R.M., Shoffner R.N.:** Poultry Sci. 65, 1437-1444, 1986; **17. Thoraval P., Lasserre L., Coudert F., Dambrine G.:** Poultry Sci. 73, 1897-1905, 1994; **18. Varkonyi E., Hidas A., Szalay I.:** Zeszyty Naukowe Przeglądu Hodowlanego 31, 240-241, PTZ, Warszawa 1997.