

Nowe kierunki w klonowaniu ssaków

Jacek A. Modliński¹, Paweł Gręda¹,
Zdzisław Smorağ²,
Sandra Lencka-Ostrowska¹,
Jolanta Karasiewicz¹

¹IGiHZ PAN w Jastrzębcu; ²IZ-PIB w Balicach

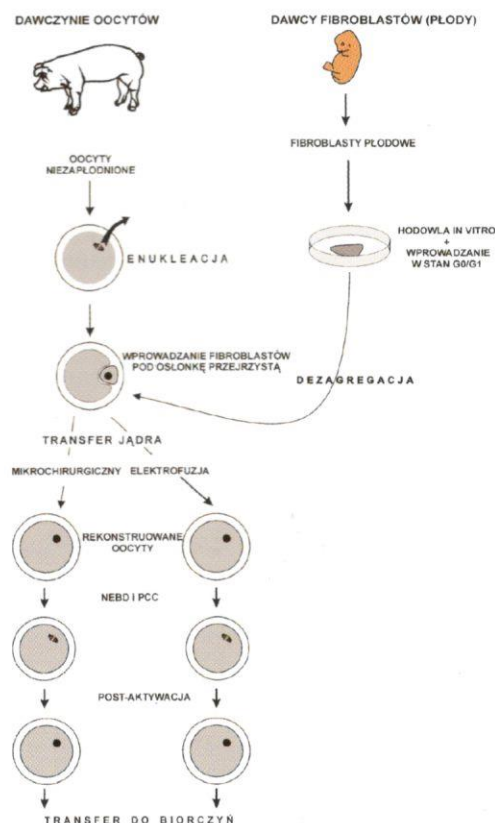
W bieżącym roku mija 10 lat od narodzin owcy Dolly i myszy Cumuliny – pierwszych ssaków powstałych w wyniku sklonowania dorosłych zwierząt. Uzyskano je na drodze transplantacji do wyjądrzonych (enukleowanych) niezapłodnionych komórek jajowych (oocytów) jąder pochodzących z komórek somatycznych dorosłych zwierząt. Ten typ klonowania – określany mianem klonowania somatycznego – szybko wyodrębnił się jako nowy kierunek badań i wkrótce stał się jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się dziedzin biotechnologii rozrodu.

W ciągu kilku lat, metodą klonowania somatycznego otrzymano urodzone osobniki wielu gatunków zwierząt, zarówno gospodarskich (bydło, owce, kozy, świnię, króliki), laboratoryjnych (myszy), domowych (kot, pies), jak również gatunków dzikich (jeleń wirginijski, kot nubijski, gaur, banteng oraz mufion – te trzy ostatnie gatunki są zagrożone wyginięciem). Problematyka klonowania somatycznego wzbudza ogromne i ciągle rosnące zainteresowanie. Przyczyny tego są wielorakie, zarówno poznawcze jak i czysto praktyczne. Analiza interakcji jądro-cytoplazmatycznych w komórkach, uzyskanych w wyniku transplantacji jąder komórek zróżnicowanych do „niezróżnicowanej” cytoplazmy oocytu, umożliwia lepsze zrozumienie mechanizmów różnicowania komórkowego, jak również przyczyni się – być może – do pełniejszego poznania mechanizmów starzenia się komórek i organizmu. Dla hodowli klonowanie somatyczne stwarza, przynajmniej teoretycznie, możliwości powielania zwierząt o szczególnej wartości genetycznej i użytkowej. Dla farmacji stwarza ono realne perspektywy znacznie efektywniejszego, a co za tym idzie znacznie tańszego uzyskiwania zmodyfikowanych genetycznie (transgenicznych) zwierząt, produkujących w mleku lub w moczu cenne ludzkie białka terapeutyczne. Dla medycyny wreszcie, klonowanie somatyczne otwiera drogę do uzyskania źródła narządów do ksenotransplantacji, jak również stwarza perspektywę komórkowej terapii wielu ciężkich chorób. Ostatnio zwraca się również coraz większą uwagę na możliwość wykorzystania metod embriologii doświadczalnej, w tym klonowania somatycznego, w ratowaniu ginących ras i gatunków ssaków, a nawet w restytucji gatunków już wymarłych.

Klonowanie somatyczne, które przeprowadzić można jedynie metodą transplantacji jąder komórkowych (SCNT – somatic cell nuclear transfer) polega na tym, że do komórek-biorców, z których mikrochirurgicznie usunięto ich własny materiał genetyczny wprowadzane jest – metodą mikrochirurgiczną lub metodą fuzji komórek w polu elektrycznym – jądro komórki somatycznej, a więc zróżnicowanej komórki pochodzącej z tkanek płodowych lub z tkanek dorosłego osobnika. Komórkami-biorcami mogą być niezapłodnione komórki jajowe (oocyty) będące w różnych stadiach dojrzewania mejo-

go, najczęściej jednak używane są dojrzałe już (*in vivo* lub *in vitro*) oocyty będące w metafazie II podziału mejozy (w tym stadium oocyty, określane jako oocyty MII, są owulowane u przeważającej większości gatunków ssaków). Z oocytów takich usuwane jest mikrochirurgicznie wrzeczono II podziału mejozy, zawierające chromosomy metafazy II. W chromosomach zawarty jest materiał genetyczny (żeński) oocytu. Schemat klonowania somatycznego przedstawiono na rysunku 1, na przykładzie przeszczepiania do oocytów MII jąder fibroblastów płodowych świni. Po wprowadzeniu do enukleowanego oocytu jądra somatycznego, oocyty takie określane są mianem oocytów rekonstruowanych. Aby mógł jednak zajść ich dalszy rozwój, muszą być one pobudzone (aktywowane). W procesie zapłodnienia rolę czynnika aktywującego spełnia plemnik, natomiast oocyty rekonstruowane muszą być pobudzone przy użyciu sztucznych czynników aktywujących. Czynniki te są bądź impulsy prądu stałego (stosowane najczęściej), bądź też różne związki chemiczne, z których najczęściej stosowanymi są jonomycyna, etanol i jony strontu.

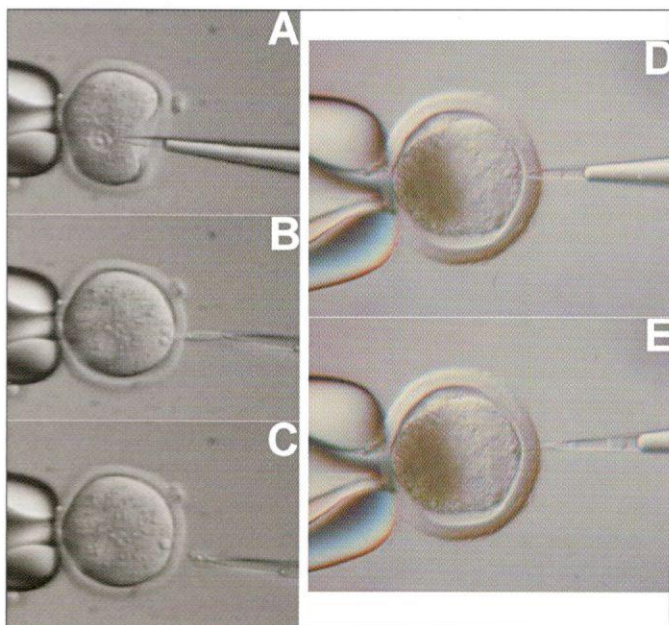
Efektywność klonowania, mierzona odsetkiem urodzonych zwierząt w stosunku do liczby rekonstruowanych oocytów, jest jednak wciąż bardzo niska. Przyczyny tego mogą być różnorakie, a za najważniejsze uważa się niepełne lub nieprawidłowe przemodelowanie i przeprogramowanie w cytoplazmie oocytu wprowadzonego jądra somatycznego oraz, odmienne nieco od naturalnych, mechanizmy sztucznej aktywacji oocytów. Przemodelowanie i przeprogramowanie wprowadzonych jąder jest warunkiem *sine qua non* prawidłowego rozwoju rekonstruowanych zarodków. Aby jądro zróżnicowa-



Rys. 1. Schemat klonowania somatycznego na przykładzie transferu jąder fibroblastów płodowych świni do enukleowanych oocytów MII. NEBD i PCC – zanik otoczki jądrowej i przedwczesna kondensacja chromatyny (zjawiska obserwowane po transferze jąder do cytoplazmy oocytu MII); post-aktywacja – sztuczna aktywacja oocytu po transferze obcego jądra

nej komórki somatycznej mogło pokierować od początku całym rozwojem zarodkowym, musi ono ulec odróżnianiu zarówno pod względem strukturalnym, jak i funkcjonalnym, i upodobnić się do niezróżnicowanych jąder (przedjądrzy) zygoty, a następnie jąder komórek wczesnych stadiów rozwojowych. Bardzo istotne jest, aby geny, które zostały „wylądzone” w czasie różnicowania komórkowego (wiele z nich funkcjonuje tylko we wczesnym okresie rozwoju) stały się znowu aktywne, zaś inne, funkcjonujące dopiero w późniejszym okresie, zostały „wyciszone”. Spośród innych czynników, które mogłyby mieć wpływ na zwiększenie efektywności klonowania, a którym poświęcano stosunkowo mało uwagi, istotny może być – naszym zadaniem – inny niż dotychczas dobór komórek-biorców jąder. Na przełomie lat 70. i 80., a więc w początkowym etapie badań nad klonowaniem ssaków, jako biorców jąder próbowano wykorzystywać zygoty, czyli zapłodnione komórki jajowe. Ich enukleację, czyli usunięcie obu przedjądrzy, przeprowadzano początkowo stosując metodę opracowaną przez jednego z autorów tego artykułu (J.A. Modlińskiego), a następnie metodę opracowaną przez McGratha i Soltera, która – jako łatwiejsza – została szybko przyjęta i jest do tej pory powszechnie stosowana. Ta ostatnia metoda polega na tym, że z zygoty usuwane są całe przedjądrza zawarte w „minikomórce” otoczonej błoną komórkową, będącą fragmentem błony komórkowej enukleowanej komórki. Tą metodą przeprowadza się również enukleację oocytów MII. Badania McGratha i Soltera wykazały jednak, że z tak enukleowanych zygót uzyskać można pełny rozwój jedynie po przeszczepieniu do nich jąder pochodzących z zarodków 2-komórkowych. Jądra pochodzące ze starszych zarodków podtrzymują rozwój jedynie przez pierwszych kilka podziałów zarodkowych. Badania te były wielokrotnie powtarzane przy użyciu jąder różnych rodzajów komórek (w tym również komórek somatycznych), a ich jednoznacznie negatywne wyniki spowodowały, że przed kilkoma laty definitywnie uznano zygoty za komórki nie nadające się jako biorcy jąder.

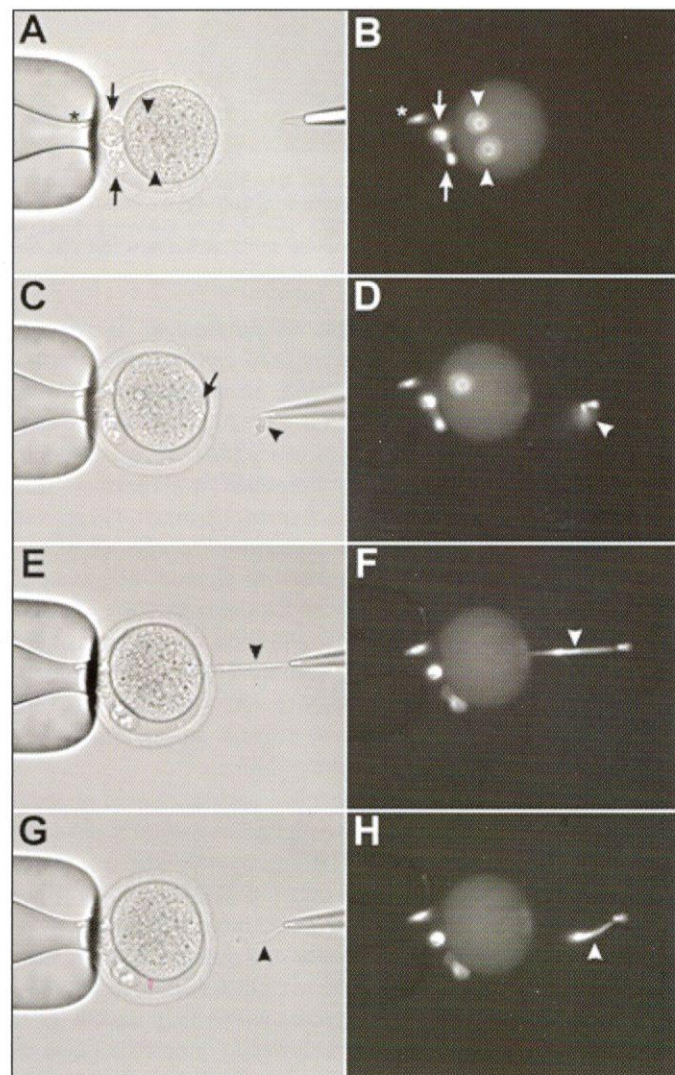
Zajmując się od wielu lat w Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu problematyką klonowania ssaków, już od dawna podejrzewaliśmy, że pogląd ten nie jest



Rys. 2. Selektywna enukleacja zygoty myszy (A, B, C) i świni (D, E)

do końca prawdziwy. Po zapłodnieniu oocyta MII, który jest powszechnie używany jako biorca jąder, i utworzeniu dwóch jąder zygoty (przedjądrze żeńskie i męskie), rosną one gwałtownie na skutek migracji do nich wielu związków z cytoplazmy. Założyliśmy, że niektóre z nich mogą być czynnikami niezbędnymi do przeprogramowania wprowadzonych obcych jąder. Przy enukleacji zygót metodą McGratha i Soltera (całkowita enukleacja) czynniki te, zawarte w przedjądrzach, są z zygoty usuwane. Opracowaliśmy więc nową metodę enukleacji zygót, opartą na wspomnianej już pierwszej metodzie enukleacji. W metodzie tej – w przeciwieństwie do stosowanej dotychczas metody całkowitej enukleacji, w której z zygoty usuwane były całe jądra – z komórek usuwana jest jedynie otoczka jądrowa z przytwierdzoną do niej chromatyną zawierającą jądrowy DNA, natomiast płynna zawartość jądra wraz z jąderkami pozostawiana jest w cytoplazmie (rys. 2 i 3).

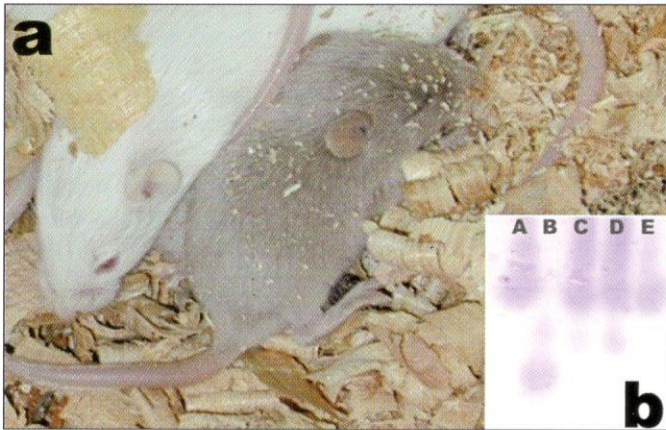
Po enukleacji zygót myszy tą metodą i po transferze do nich jąder blastomerów 1/8, uzyskano wysoki odsetek (70,5%) zarodków rozwijających się do stadium moruli/blas-



Rys. 3. Usuwanie podczas selektywnej enukleacji chromatyny jądrowej przytwierdzonej do otoczki jądrowej (mysz). A, C, E, G – obraz usuwanej otoczki przedjądrzy (krótkie czarne strzałki); B, D, F, H – ta sama selektywnie enukleowana zygota w mikroskopie fluorescencyjnym. Zygota przed enukleacją wybarwiona została barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst 33342 wiążącym się z DNA; B – wybarwione przedjądrza zygoty (krótkie białe strzałki); D, F, H – usuwana chromatyna obu przedjądrzy oznaczona jest krótkimi białymi strzałkami. Po selektywnej enukleacji brak jest fluorescencji wewnątrz zygoty, co świadczy o całkowitym usunięciu z niej DNA jądrowego

tocysty, a także urodzone zwierzęta (7,8%) – rysunek 4. Ich pochodzenie potwierdzone zostało umaszczeniem sierści oraz elektroforetyczną analizą izozymów glukofosfoizomerazy.

Był to pierwszy na świecie przypadek uzyskania urodzonych ssaków po transferze do enukleowanych zygot jąder pochodzących z zarodków starszych niż stadium 2-komórkowe. Uzyskano również rozwój do stadium blastocysty zygot SE po transferze do nich jąder pierwotnych komórek zarodkowych (embryonic stem cells). Wyniki te opublikowane zo-



Rys. 4. a – mysz (szara) urodzona po transferze jądra blastomeru zarodka 8-komórkowego do enukleowanej zygoty; b – elektroforogram izozymów glukofosfoizomerazy (C, D, E – izozymy obecne w tkankach sklonowanych osobników potwierdzające ich pochodzenie)

stały w amerykańskim czasopiśmie naukowym „Biology of Reproduction” (2005) oraz w brytyjskim czasopiśmie „Reproduction” (2006). Wykazano również, że metoda selektywnej enukleacji może być stosowana u innych gatunków ssaków. Po selektywnej enukleacji zygot świni (rys. 2), a następnie transferze do takich zygot jąder fibroblastów płodowych oraz jąder komórek pochodzących z wyprowadzonych przez nas linii świńskich komórek pochodzenia zarodkowego, uzyskano rozwój rekonstruowanych zarodków do stadium blastocysty. Niedawno podjęte zostały w Zakładzie Embriologii Doświadczalnej IGiHZ PAN w Jastrzębcu badania nad międzygatunkowym klonowaniem somatycznym przy wykorzystaniu metody selektywnej enukleacji. Do enukleowanych selektywnie zygot bydłęcych wprowadzane są jądra komórek pochodzących z fibroblastów skóry zębca.

Innym rodzajem komórek-biorców, testowanym w naszym Zakładzie, są niedojrzałe oocyty myszy w stadium pęcherzyka zarodkowego (oocyty GV; GV – germinal vesicle)). Materiał genetyczny usuwany jest z oocytów GV również przy zastosowaniu metody selektywnej enukleacji. Usuwana jest otoczka jądrowa tzw. pęcherzyka zarodkowego, czyli jądra oocyta GV (rys. 5). Wykazano po raz pierwszy, że oocyty GV enukleowane metodą SE i rekonstruowane przy użyciu jąder blastomerów 1/2 mogą, po ich aktywacji i hodowli w obecności komórek pęcherzykowych, rozwijać się do stadium blastocysty (rys. 6). Praca wysłana została do brytyjskiego czasopisma „Reproduction”. Uzyskane wyniki świadczą, że czynniki zawarte w pęcherzyku zarodkowym oocyta oraz w przedjądrach zygoty, uwalniane do cytoplazmy po selektywnej enukleacji, mają istotny wpływ na przeprogramowanie wprowadzonych obcych jąder komórkowych. Ponadto, zastosowanie zygot jako biorców jąder eliminuje potrzebę sztucznej aktywacji oocytów MII, bowiem zygoty są w naturalny sposób

aktywowane wniknięciem plemnika. Uprościć to może procedura klonowania ssaków.

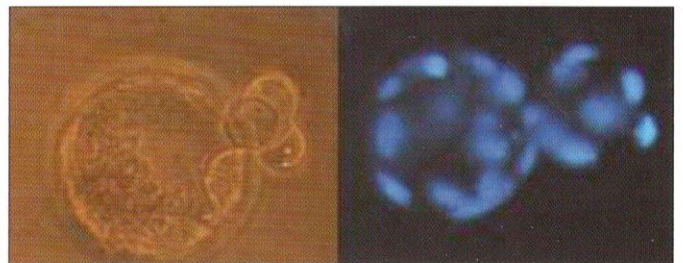
W artykule opublikowanym w lipcu w „Nature”, jednym z najbardziej prestiżowych czasopism naukowych na świecie, Davor Solter, który jest jednym z najwybitniejszych specjalistów w dziedzinie biologii rozwoju, omawiając naszą pracę opublikowaną w „Reproduction” stwierdził, że opracowana



Rys. 5. Selektywna enukleacja oocyta w stadium pęcherzyka zarodkowego

przez nas metoda enukleacji, pozwalająca na użycie zygot jako biorców jąder, otwiera nowe możliwości w dziedzinie klonowania ssaków.

Innym rodzajem komórek-biorców, które można wykorzystać w somatycznym klonowaniu ssaków są blastomery zarodków 2-komórkowych. Wprawdzie używane były one sporadycznie jako biorcy jąder komórek zarodkowych, jednak w klonowaniu somatycznym zastosowano je po raz pierwszy,



Rys. 6. Blastocysty uzyskane po transferze jądra blastomeru zarodka 2-komórkowego do selektywnie enukleowanego oocyta GV. Po lewej – przybliżony obraz blastocysty w mikroskopie świetlnym; po prawej – obraz blastocysty w mikroskopie fluorescencyjnym. Blastocysta wybarwiona była barwnikiem Hoechst 33342

z powodzeniem, w Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt IZ-PIB w Balicach. Po usunięciu jądra z jednego z dwóch blastomerów 2-komórkowego zarodka królika wprowadzono na jego miejsce jądro transformowanej genetycznie komórki somatycznej (fibroblasty) i po transferze tak zrekonstruowanego zarodka uzyskano urodzonego transgenicznego królika. Ten typ klonowania określić można mianem klonowania chimerowego, gdyż uzyskane zarodki są zarodkami chimerowymi – część komórek wywodzi się ze zrekonstruowanego blastomeru, część zaś z blastomeru „normalnego” nie zrekonstruowanego. Te ostatnie pełnią rolę komórek wspomagających

rozwój i, jak się wydaje, mogą być stopniowo eliminowane z tkanek w czasie rozwoju. W ten sposób urodzony osobnik wywodzi się całkowicie ze zrekonstruowanego blastomeru. Praca opublikowana została w 2006 r. w amerykańskim czasopiśmie „Biology of Reproduction”.

Pomimo dotychczasowych ograniczeń klonowania somatycznego, możliwości jakie stwarzałaby ta technika w hodowli i produkcji zwierzęcej są potencjalnie bardzo duże. Wprawdzie przyspieszenie postępu hodowlanego poprzez uzyskanie w krótkim czasie dużej liczby identycznych zwierząt o najbardziej wartościowych i ściśle określonych genotypach jest, jak na razie, ze względu na koszty (zwłaszcza dla przeciętnych hodowców) nieopłacalne i mało realne, tym niemniej jednak w niektórych krajach, zwłaszcza w USA, przeprowadzane jest u bydła klonowanie osobników o szczególnie wartościowych cechach genetycznych. W 2000 roku dokonano w Kanadzie udanej próby sklonowania jednego z najlepszych (w swoim czasie) buhajów, buhaja Hanoverhill Starbuck. Hanoverhill Starbuck II narodził się w dwa lata po śmierci jego „ojca”. Oprócz potencjalnych możliwości powielania u zwierząt gospodarskich szczególnie cennych okazów ras mlecznych i mięsnych, duże znaczenie dla hodowli miałyby uzyskanie klonów zwierząt cechujących się dużą odpornością na choroby, w tym również na choroby pasożytnicze. W USA podjęto próby klonowania osobników, u których stwierdzono naturalną, genetycznie uwarunkowaną odporność na brucellozę. Zainteresowaniem cieszą się także rasy bydła i owiec pochodzące z geograficznie izolowanych wysp, głównie nowozelandzkich, a także rzadka już dziś rasa owiec gulf coast

native, u których wytworzyła się duża, niespotykana u innych ras, odporność na choroby pasożytnicze.

Dla hodowli i produkcji mięsa bardzo istotna jest obecnie możliwość uzyskania, drogą tzw. sterowanej mutagenyzy oraz klonowania somatycznego, zwierząt ze znokautowanym (zinkaktywowanym) genem białka prionowego odpowiedzialnego za powstawanie pasażowalnych encefalopatii gąbczastych (TSEs – transmissible spongiform encephalopathies), zwłaszcza scrapie u owiec i BSE (bovine spongiform encephalopathy) u bydła. Ma to o tyle istotne znaczenie, oprócz powodów czysto ekonomicznych, że istnieją uzasadnione podejrzenia o zoonotyczne powiązania pomiędzy BSE a nową odmianą choroby Creutzfeldta-Jakoba (nvCJD – new variant Creutzfeldt-Jakob Disease) u ludzi. Pierwsze tak zmodyfikowane genetycznie osobniki u bydła uzyskali niedawno badacze japońscy i amerykańscy.

Niska efektywność klonowania somatycznego (najliczniejsze klony somatyczne liczą u bydła najwyżej 10-13 osobników) z jednej strony, z drugiej zaś możliwości, jakie ta technika stwarza, powodują, że poznanie mechanizmów, które odpowiedzialne są za prawidłowy rozwój rekonstruowanych zarodków jest sprawą absolutnie konieczną. Badania w tym zakresie prowadzone w IGiHZ PAN w Jastrzębcu oraz IZ-PIB w Balicach mogą wnieść istotny wkład w podwyższenie efektywności klonowania oraz poprawę jakości zarodków uzyskiwanych w wyniku klonowania somatycznego.

Badania przeprowadzone w IGiHZ PAN finansowane były z tematu statutowego S.III.1.3, projektu grantowego 2P06D 02626 oraz Sieci Naukowej Biotechnologia Rozrodu.

Funkcjonalna genomika bydła – polimorfizm i ekspresja genów kandydujących na markery genetyczne produkcji mlecznej i mięsnej

Lech Zwierzchowski

IGiHZ PAN w Jastrzębcu

Najważniejszym celem funkcjonalnej genomiki zwierząt gospodarskich jest poszukiwanie genetycznych markerów cech produkcyjnych. Poszukuje się także markerów dla innych cech ważnych z punktu widzenia hodowli zwierząt – płodności i plenności, odporności na choroby, długości użytkowania produkcyjnego, długowieczności.

W jednej z metod identyfikacji markerów cech ilościowych ocenia się wpływ polimorfizmu tzw. genów kandydujących (candidate genes) na fenotypową wartość określonych cech ilościowych. Badania takie dotyczą genów o znanej sekwencji

nukleotydowej i zdefiniowanym udziale w regulacji procesów biochemiczno-fizjologicznych, kształtujących określoną cechę. Występowanie zmienności allelicznej w częściach strukturalnych oraz regulatorowych genów kandydujących może wpływać na zróżnicowanie cech fenotypowych zwierząt.

Zidentyfikowano kilkanaście mutacji o bardzo dużym efekcie fenotypowym, związanym z cechami produktywności mlecznej lub mięsnej bydła, np. mutacje genów kazeiny κ [11], DGAT1 [7] i GHR [3]. Jednym z najbardziej efektywnych osiągnięć genomiki funkcjonalnej bydła było wykrycie „funkcjonalnych” mutacji w genie miostatyny (GD 8 – growth, differentiation factor 8, białko z rodziny czynników TGF β), która jest inhibitorem wzrostu i różnicowania mięśni [8]. W genie miostatyny bydła wykryto kilkanaście mutacji. Niektóre z nich, zlokalizowane w eksonach II i III, powodują powstanie przedwczesnych kodonów „stop” lub przesunięcie ramki odczytu, zatrzymanie translacji i powstanie skróconych, nieaktywnych białek. U niektórych ras bydła prowadzi to do powstania przerostu mięśni – tzw. fenotypu podwójnego umięśnienia (double muscled cattle). Takie bydło charakteryzuje się bardzo dużą produkcją mięsa o dobrej jakości. Mutacje o bardzo dużym efekcie fenotypowym wykryto w genach kozich kazein α S1, α S2 i β . Polimorfizm kazeiny α S1 wpływa na przebieg składowania transkryptu (alternative splicing), translację mRNA i na zawartość kazeiny α w mleku. Wykryto kilkanaście wariantów genu kazeiny α S1 kozy. Warianty „silne” – A, B, C – warunkują dużą zawartość kazeiny α w mleku, warianty „słabe” – małą zawartość, a wariant „0” – całkowity brak tej kazeiny w mleku kóz [17].

Postęp genomiki funkcjonalnej zależy w dużej mierze od poznania genomów zwierząt gospodarskich i innych zwierząt