

# Ochrona cennych zasobów genetycznych oraz restytucja ginących ras i gatunków zwierząt gospodarskich – potencjalne kierunki zastosowania klonowania somatycznego ssaków w praktyce hodowlanej

Marcin Samiec<sup>1</sup>, Maria Skrzyszowska<sup>1</sup>,  
Wojciech Witarowski<sup>2</sup>

Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy w Krakowie

<sup>1</sup>Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji

<sup>2</sup>Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt

Do ratowania i restytucji ginących ras i gatunków zwierząt gospodarskich wykorzystywane są nowoczesne technologie wspomaganego rozrodu zwierząt (ARTs; ang. *assisted reproductive technologies*), w tym genomowej inżynierii embrionalnej. Jedną z nich jest wewnątrzgatunkowe klonowanie międzyrasowe ssaków. Strategiczne i innowacyjne narzędzie biotechnologii reprodukcyjnej ssaków, jakim jest międzyrasowe klonowanie somatyczne, może być jedynym narzędziem reintrodukcji ginących ras zwierząt użytkowych dzięki możliwości wykorzystania obcorasowych oocytów pochodzących od osobników powszechnie bytujących ras do rekonstrukcji zarodków z jąder komórek somatycznych zagrożonych wyginięciem ras. Ponadto, ten kierunek badań może przyczynić się do poszerzenia wiedzy podnoszącej pozycję polskiego sektora badawczo-rozwojowego w zakresie genomowej inżynierii embrionalnej.

W artykule zostaną zaprezentowane główne założenia naukowe zrealizowanego w ramach projektu BIOSTRATEG2/297267/14/NCBR/2016 podzadania badawczego pt. „Zabezpieczenie i charakterystyka materiału biologicznego w postaci linii komórkowych na potrzeby klonowania zagrożonych wyginięciem ras zwierząt gospodarskich”.

Przedmiotem badań przeprowadzonych w Instytucie Zootechniki – PIB w Krakowie było:

1) utworzenie genetycznych rezerw w postaci kriogenicznie zabezpieczonych bioptatów tkanki skórno-po-

włokowej, pochodzących od wybranych gatunków i ras zachowawczych zwierząt gospodarskich (bydło rasy polskiej czerwonej, świnie rasy puławskiej, świnie rasy złotnickiej pstrej);

2) wyprowadzenie, kriokonserwacja i charakterystyka cytogenetyczna (kariotypowanie) linii komórek fibroblastycznych, pochodzących z bioptatów tkanki skórno-powłokowej osobników bydła polskiego czerwonego, świń rasy puławskiej i rasy złotnickiej pstrej;

3) zweryfikowanie potencjału rozwojowego *in vitro* zarodków uzyskanych techniką klonowania somatycznego z jąder kriokonserwowanych i kariotypowanych komórek fibroblastycznych, pochodzących od wybranych gatunków i ras zachowawczych zwierząt gospodarskich (bydło polskie czerwone, świnia puławska, świnia złotnicka pstra).

Heterologiczny model klonowania somatycznego zagrożonych wyginięciem ras bydła i świń, który jest przedmiotem realizowanego podzadania badawczego, stanowi nowatorskie rozwiązanie zarówno w skali krajowej, jak i ogólnoświatowej. Klonowanie międzygatunkowe lub międzyrasowe może być bowiem ostatnią szansą na podtrzymanie zagrożonego wyginięciem gatunku czy rasy zwierząt. W 1998 roku w Nowej Zelandii została genetycznie skopiowana przy wykorzystaniu techniki międzyrasowego klonowania somatycznego jedyna pozostała przy życiu krowa endemicznej rasy z wyspy Enderby [12]. Dlatego też, w realizowanym podzadaniu innowacyjnym kierunkiem badawczym jest zabezpieczenie materiału genetycznego od osobników rzadkich, rodzimych ras, tj. bydła polskiego czerwonego oraz świń rasy puławskiej i złotnickiej pstrej, co w przyszłości może znacznie ułatwić multiplikację i reintrodukcję subpopulacji tych prymitywnych ras hodowlanych. Z dotychczasowych badań z zakresu międzygatunkowego klonowania ssaków wynika, że możliwe jest uzyskanie zarówno hybrydowych zarodków (morul i blastocyst), jak i potomstwa klonalnego, jeśli pokrewieństwo filogenetyczne między osobnikami-dawcami komórek somatycznych a osobnikami-dawcami oocytów pozostaje stosunkowo bliskie. Potwierdzeniem tego jest otrzymanie zarodków klonalnych oraz sklonowanie wolno żyjących gatunków ssaków zagrożonych wyginięciem, jak i wymarłych (†) w układzie wewnątrzrodzinowym i wewnątrzrodzajowym: gaur→bydło domowe [11], banteng→bydło domowe [9], jak→bydło domowe [2, 13, 14], a także koziorożec pirenejski (†)→koza domowa [1]. Innym przykładem może być uzyskanie zarodków (3% do 30% blastocyst) w wyniku wewnątrzrodzajowego klonowania międzyrodzajowego, np. chiński bawół błotny→bydło domowe [3], takin→bydło domowe [2].

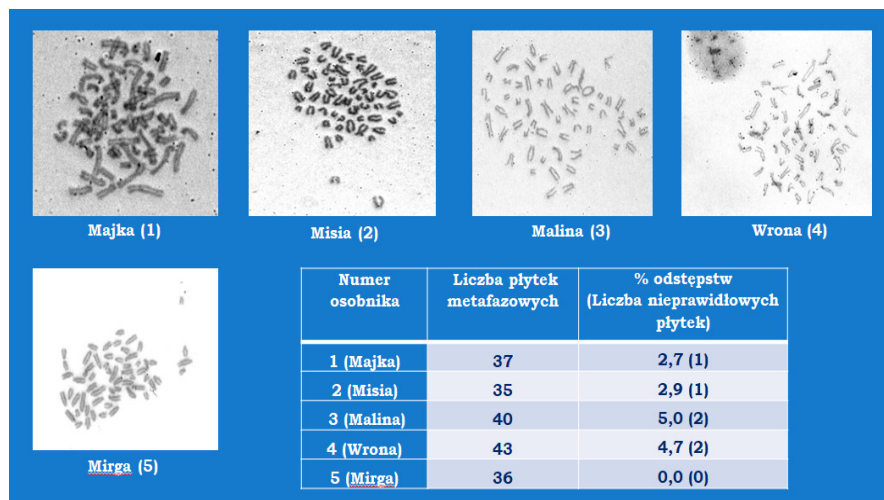
W następstwie realizacji prac badawczych założono hodowle pierwotne komórek fibroblastycznych uzyskanych z bioptatów tkanki skórno-powłokowej wybranych gatunków i ras zachowawczych zwierząt gospodarskich (bydło rasy polskiej czerwonej, świnie rasy puławskiej, świnie rasy złotnickiej pstrej). Ponadto, wyprowadzono i kriogenicznie zabezpieczono linie komórek fibroblastycznych pochodzących z tkanki skórno-powłokowej

ucha osobników była polskiego czerwonego, świni rasy puławskiej i złotnickiej pstrej.

Z fragmentów (eksplantów) tkanki skórno-powłokowej ucha, które pobrano od 5 krów-dawczyń, założono pierwotne hodowle fibroblastów pochodzenia dermalnego (15 subpopulacji komórkowych). Z uzyskanych hodowli pierwotnych wyprowadzono klonalne linie komórek fibroblastycznych. Łącznie zabezpieczono kriogenicznie 45 probówek subpopulacji komórkowych (pasaż 1 i 2). Z kolei z eksplantów tkanki skórno-powłokowej ucha, które pobrano od wyselekcjonowanych 6 świni rasy puławskiej i 6 świni rasy złotnickiej pstrej, założono pierwotne hodowle komórkowe, z których wyprowadzono klonalne linie komórek fibroblastycznych. Ogółem zabezpieczono kriogenicznie 25 probówek subpopulacji komórkowych (pasaż 1 i 2) pochodzących od loszek lub knurków rasy puławskiej i 22 probówki subpopulacji komórkowych (pasaż 1 i 2) pochodzących od loszek (pełnego rodzeństwa)

rasy złotnickiej pstrej. Kriokonserwowane i rozmrożone linie klonalne fibroblastów dermalnych, które wyprowadzono zarówno z bioptatów tkanki skórno-powłokowej bydła rasy polskiej czerwonej, jak i z bioptatów tkanki skórno-powłokowej świni rasy puławskiej oraz złotnickiej pstrej, charakteryzowały się wysoką przeżywalnością i zdolnością adhezji komórkowej do polistyrenowego substratu naczynek hodowlanych. Ponadto, znamioną cechą hodowanych *in vitro* komórek fibroblastycznych, wywodzących się od osobników wyżej wspomnianych gatunków i ras zwierząt gospodarskich, był wysoki potencjał proliferacyjny. Potencjał ten znajdował odzwierciedlenie nie tylko w dynamicznej i stabilnej kinetyce podziałów mitotycznych, lecz również w szybkim tempie synchronizacji cyklu mitotycznego komórek w fazach G1/G0 wskutek zahamowania, czyli inhibicji kontaktowej ich migracji oraz aktywności podziałowej po osiągnięciu stanu pełnej konfluencji, tj. stanu, w którym gęstość hodowanych komórek limituje ich proliferacyjny wzrost.

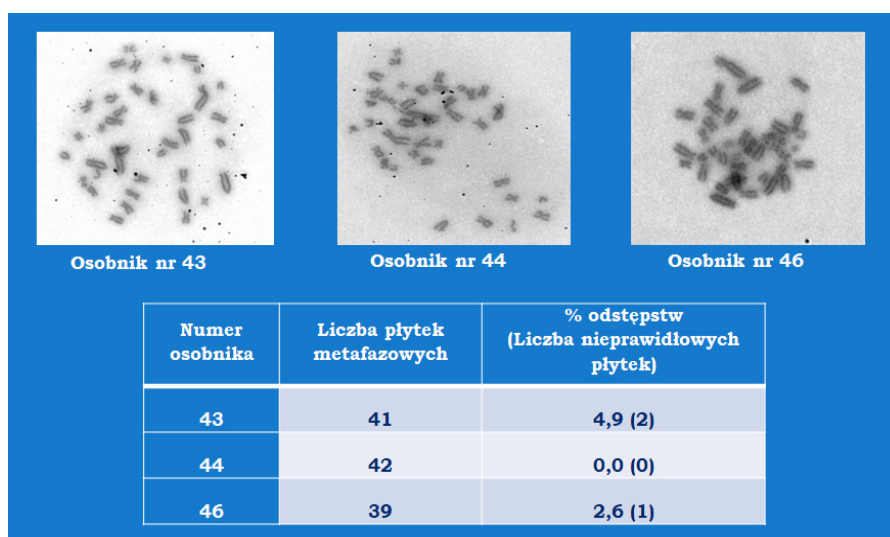
Kolejny kierunek przeprowadzonych prac badawczych dotyczył oznaczenia kariotypów hodowa-



U poszczególnych krów rasy polskiej czerwonej analizie poddano 35 do 43 płytek metafazowych, co umożliwiło ocenę kariotypu komórek fibroblastycznych tkanki skórno-powłokowej ucha badanych osobników. Wykazano prawidłową ploidalność komórek ( $2n=60$  chromosomów), przy błędach w liczbie chromosomów  $\leq 5\%$  (mierzonych jako  $x = \text{liczba nieprawidłowych płytek} / \text{liczba prawidłowych płytek metafazowych}$ )

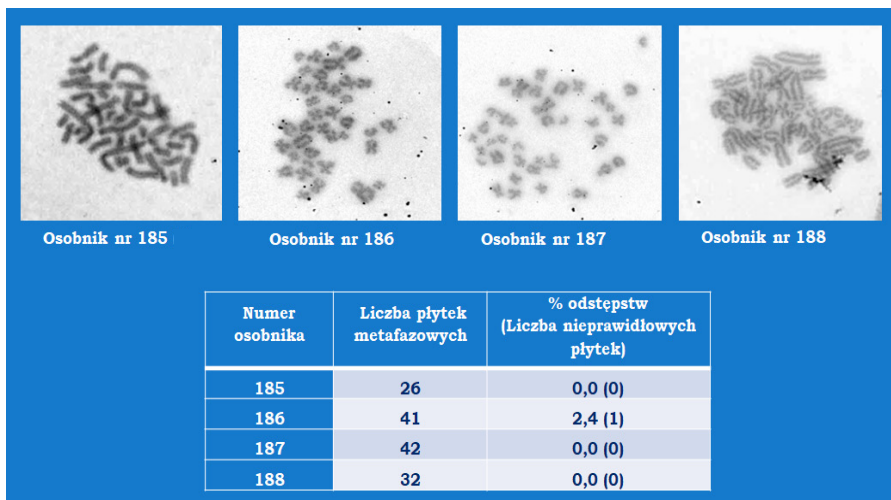
**Rys. 1. Kariotypowanie fibroblastów wywodzących się z linii komórkowych wyprowadzonych z eksplantów tkanki skórno-powłokowej krów rasy polskiej czerwonej**

nych *in vitro* komórek fibroblastycznych z poszczególnych linii klonalnych wyprowadzonych z bioptatów tkanki skórno-powłokowej wybranych ras zachowawczych bydła i świni (bydło polskie czerwone – rys. 1, świnka puławska – rys. 2, świnka złotnicka pstra – rys. 3). Analiza



U poszczególnych osobników świni rasy puławskiej (nr 43 i 44 – loszki, nr 46 – knurek) analizie poddano każdorazowo ok. 40 płytek metafazowych, co umożliwiło ocenę kariotypu komórek fibroblastycznych tkanki skórno-powłokowej ucha badanych zwierząt. Wykazano prawidłowy stopień ploidii komórek ( $2n=38$  chromosomów), przy błędach w liczbie chromosomów  $< 5\%$  (mierzonych jako  $x = \text{liczba nieprawidłowych płytek} / \text{liczba prawidłowych płytek metafazowych}$ )

**Rys. 2. Kariotypowanie fibroblastów wywodzących się z linii komórkowych wyprowadzonych z eksplantów tkanki skórno-powłokowej loszek lub knurków rasy puławskiej**



U poszczególnych osobników świń rasy złotnickiej pstrej analizie poddano 26 do 42 płytek metafazowych, co umożliwiło ocenę kariotypu komórek fibroblastycznych tkanki skórno-powłokowej ucha badanych zwierząt. Wykazano prawidłowy stopień ploidii komórek ( $2n=38$  chromosomów), przy błędach w liczbie chromosomów  $<5\%$  (mierzonych jako  $x = \text{liczba nieprawidłowych płytek} / \text{liczba prawidłowych płytek metafazowych}$ )

**Rys. 3. Kariotypowanie fibroblastów wywodzących się z linii komórkowych wyprowadzonych z eksplantów tkanki skórno-powłokowej loszek rasy złotnickiej pstrej**

kariotypów kriogenicznie zabezpieczonych i rozmrożonych linii komórek fibroblastycznych bydła rasy polskiej czerwonej oraz świń rasy puławskiej i złotnickiej pstrej potwierdziła prawidłową liczbę chromosomów  $2n=60$  oraz  $2n=38$  w ekspandujących *ex vivo* subpopulacjach komórkowych (w przypadku obu gatunków zwierząt gospodarskich).

Ostatni etap realizacji badań obejmował uzyskanie i ocenę potencjału rozwojowego *in vitro* klonalnych zarodków bydła polskiego czerwonego, świni puławskiej oraz świni złotnickiej pstrej. Zarodki klonalne uzyskano przy wykorzystaniu – jako źródła dawców jąder – linii komórek fibroblastycznych tkanki skórno-powłokowej, które poddano kariotypowej ocenie stopnia euploidii/aneuploidii metodami cytogenetyki molekularnej. Zastosowana technika klonowania somatycznego bydła polskiego czerwonego skutkowała relatywnie wysoką zdolnością jąder kariotypowanych komórek fibroblastycznych do pokierowania rozwojem *in vitro* zarodków klonalnych do stadiów moruli i blastocysty (odpowiednio: 55,5% i 30,1%). Podobnie, kompetencje jąder kariotypowanych komórek fibroblastycznych świń rasy puławskiej oraz złotnickiej pstrej do pokierowania rozwojem *in vitro* zarodków klonalnych utrzymywały się na stosunkowo wysokim i zbliżonym poziomie (odpowiednio: 52,3% moruli i 34,1% blastocyst oraz 48,6% moruli i 27,9% blastocyst). Technika wewnątrz- lub międzyrasowego klonowania somatycznego może być atrakcyjnym narzędziem w badaniach podstawowych ukierunkowanych na identyfikację czynników warunkujących interakcje między genomem jądrowym komórki somatycznej a cząsteczkami mitochondrialnego DNA komórki-dawcy jądra oraz oocyty-biorcy jądra, jak również pełniejszego poznania mole-

kularnych mechanizmów determinujących epigenetyczne przeprogramowanie genomu jądrowego komórki somatycznej w cytoplazmie oocyty-biorcy, a następnie w cytoplazmie blastomerów rozwijających się zarodków klonalnych [4, 5, 7, 8]. Ponadto, w efekcie precyzyjnego i dogłębnego rozpoznania wyżej wymienionych czynników i mechanizmów, a w rezultacie zwiększenia wydajności, technika klonowania somatycznego może stanowić idealne narzędzie wykorzystywane w praktyce hodowlanej, w szczególności dla potrzeb uzyskiwania i powielania osobników o wysokiej wartości genetycznej i użytkowej oraz w programach odtwarzania rezerw genetycznych, a także ratowania i restytucji ginących ras i gatunków zwierząt gospodarskich [6, 10].

Podsumowując, wymiernym efektem zrealizowanych badań jest poszerzenie możliwości ochrony zasobów genetycznych endemicz-

nych ras zwierząt gospodarskich (bydło, świnię) przy wykorzystaniu nowoczesnych technologii wspomaganego rozrodu opartych na metodach genetycznej/genomowej inżynierii embrionalnej. W celu zachowania bioróżnorodności rzadkich ras, wyprowadzone i kriogenicznie zabezpieczone w banku materiałów biologicznych linie komórek fibroblastycznych zostały wykorzystane jako źródło dawców jąder w procedurach uzyskiwania i multiplikacji zarodków bydła polskiego czerwonego, świni puławskiej oraz świni złotnickiej pstrej na drodze klonowania somatycznego, które może stanowić w przyszłości podstawowy instrument w programach odtwarzania stad zarodkowych zagrożonych wyginieciem ras zwierząt hodowlanych.

Rezultaty prowadzonych prac badawczych z zakresu rozwoju nowych strategii, które służą zwiększaniu efektywności uzyskiwania i powielania zarodków wybranych gatunków i ras zwierząt gospodarskich (bydło, świnię) metodami biotechnologii rozrodu oraz genomowej inżynierii zarodkowej (klonowania somatycznego) mogą w przyszłości przyczynić się do:

1) ochrony zasobów genetycznych i tworzenia rezerw genetycznych zagrożonych wyginieciem rodzimych ras zwierząt gospodarskich wybranych gatunków (bydło, świnię);

2) restytucji (odtworzenia) oraz multiplikacji subpopulacji ginących i rzadkich ras bydła polskiego czerwonego, świni puławskiej i świni złotnickiej pstrej, w celu zachowania bioróżnorodności oraz podwyższenia stopnia wewnątrzpopulacyjnej i międzyosobniczej zmienności genetycznej;

3) poprawy wskaźników wartości hodowlanej (genetycznej) i użytkowej zwierząt gospodarskich, w tym



zwiększenia ich wydajności mlecznej, mięsnej i rozplodowej (plenności i płodności);

4) przełożenia (translacji) wyników badań podstawowych na wdrożenia w dziedzinach nauk interdyscyplinarnych z zakresu tworzenia odzwierzęcych produktów biotechnologicznych (transgenicznych) dla przemysłu biofarmaceutycznego oraz medycyny transplantacyjnej i regeneracyjnej tkanek i organów człowieka, a także przedklinicznych i klinicznych testów w terapiach genetycznie uwarunkowanych lub nabytych chorób człowieka.

*Prezentowana praca naukowa uzyskała wsparcie finansowe z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (umowa nr BIOSTRATEG2/297267/14/NCBR/2016) w ramach strategicznego programu badań naukowych i prac rozwojowych „Środowisko naturalne, rolnictwo i leśnictwo” – BIOSTRATEG jako projekt badawczy pt. „Kierunki wykorzystania oraz ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w warunkach zrównoważonego rozwoju”.*

**Literatura:** 1. Folch J., Cocero M.J., Chesné P., Alabart J.L., Domínguez V., Cognié Y., Roche A., Fernández-Arias A., Martí J.I., Sánchez P., Echegoyen E., Beckers J.F., Bonastre A.S., Vignon X., 2009 – First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology* 71 (6), 1026-1034. 2. Li Y., Dai Y., Du W., Zhao C., Wang H., Wang L., Li R., Liu Y., Wan R., Li N., 2006 – Cloned endangered species takin (*Budorcas taxicolor*) by inter-species nuclear transfer and comparison of the blastocyst development with yak (*Bos grunniens*) and bovine. *Molecular Reproduction and Development* 73 (2), 189-195. 3. Lu F., Shi D., Wei J., Yang S., Wei Y., 2005 – Development of embryos reconstructed by interspecies nuclear transfer of adult fibroblasts between buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle (*Bos indicus*). *Theriogenology* 64 (6), 1309-1319. 4. Samiec M., Skrzyszowska M., 2016 – Monografia naukowa „Epigenetyczne podłoże przemodelowania chromatyny jądrowej oraz przeprogramowania aktywności transkrypcyjnej genomu komórek somatycznych w ontogenetycznym rozwoju ssaków klonalnych. Zespół Wydawnictw i Poligrafii, Instytut Zootechniki – PIB, Balice/Kraków, ISBN 978-83-7607-294-4, ss. 1-108.

5. Samiec M., Skrzyszowska M., 2018 – Intrinsic and extrinsic molecular determinants or modulators for epigenetic remodeling and reprogramming of somatic cell-derived genome in mammalian nuclear-transferred oocytes and resultant embryos. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 21 (1), 217-227.

6. Samiec M., Skrzyszowska M., 2018 – Can reprogramming of overall epigenetic memory and specific parental genomic imprinting memory within donor cell-inherited nuclear genome be a major hindrance for the somatic cell cloning of mammals? *Annals of Animal Science* 18 (3), 623-638. 7. Samiec M., Skrzyszowska M., 2019 – Dziedziczenie mitochondrialnego DNA i epigenetyczne przeprogramowanie telomerów chromosomów w klonowaniu somatycznym ssaków. *Wiadomości Zootechniczne* 3 (303), 80-109. 8. Samiec M., Romanek J., Lipiński D., Opiela J., 2019 – Expression of pluripotency-related genes is highly dependent on trichostatin A-assisted epigenomic modulation of porcine mesenchymal stem cells analysed for apoptosis and subsequently used for generating cloned embryos. *Animal Science Journal* 90 (9), 1127-1141.

9. Sansinena M.J., Hylan D., Hebert K., Denniston R.S., Godke R.A., 2005 – Banteng (*Bos javanicus*) embryos and pregnancies produced by interspecies nuclear transfer. *Theriogenology* 63 (4), 1081-1091. 10. Skrzyszowska M., Samiec M., 2019 – Możliwości wykorzystania technik klonowania we wspomaganym rozrodzie bydła, technologii żywności, przemyśle biofarmaceutycznym, biomedycynie oraz restytucji ginących lub wymarłych ras i gatunków zwierząt. *Wiadomości Zootechniczne* 4 (304), 78-92. 11. Srirattana K., Imsoonthornruksa S., Laowtammathron C., Sangmalee A., Tunwattana W., Thongprapai T., Chaimongkol C., Ketudat-Cairns M., Parnpai R., 2012 – Full-term development of gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos: effect of trichostatin A treatment. *Cellular Reprogramming* 14 (3), 248-257. 12. Wells D.N., Misica P.M., Tervit H.R., Vivanco W.H., 1998 – Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reproduction, Fertility, and Development* 10 (4), 369-378. 13. Xiong X., Lan D., Li J., Zhong J., Zi X., Ma L., Wang Y., 2013 – Zebularine and scriptaid significantly improve epigenetic reprogramming of yak fibroblasts and cloning efficiency. *Cellular Reprogramming* 15 (4), 293-300. 14. Xiong X.R., Li J., Fu M., Gao C., Wang Y., Zhong J.C., 2013 – Oocyte extract improves epigenetic reprogramming of yak fibroblast cells and cloned embryo development. *Theriogenology* 79 (3), 462-469.

## Conservation of valuable genetic resources and restitution of endangered livestock breeds and species – potential targets of somatic cell cloning of mammals in livestock breeding practice

### Summary

Development of innovative strategies of assisted reproductive technology (ART), such as cloning of mammalian species by somatic cell nuclear transfer (SCNT), can lead to genetic rescue of endangered or extinct breeds and species of livestock animals, including cattle and pigs. This paper presents the main scientific foundations and goals of the research subtask entitled 'Conservation and characterization of biological material in the form of cell lines for the purpose of cloning of endangered livestock breeds', implemented as part of research project number BIOSTRATEG2/297267/14/NCBR/2016, which is financially supported by the National Centre for Research and Development.

**KEY WORDS:** cattle, pigs, livestock breed, somatic cell cloning, SCNT, genetic resource, fibroblast cell line, cryoconservation, nuclear donor cell, nuclear-transferred embryo