

**Jacek Jura**

Zakład Fizjologii Rozrodu  
i Sztucznego Unasieniania Zwierząt  
Instytut Zootechniki  
Balice k. Krakowa

## Transgeniczne zwierzęta hodowlane – formowanie nowych genotypów metodami laboratoryjnymi

Głównym zadaniem embriologii jest danie odpowiedzi na pytanie, jak to się dzieje, że z pojedynczej komórki, jaką jest zapłodnione jajo, powstaje wielokomórkowy organizm zdolny do samodzielnego życia? Odpowiadając na to pytanie embriolodzy opracowali złożone metody doświadczalne, które okazały się szczególnie przydatne w przypadku świadomej zmiany cech zwierząt na poziomie materiału genetycznego, a więc znalazły zastosowanie w najbardziej dynamicznie rozwijającej się obecnie dziedzinie, jaką jest biologia kreatywna.

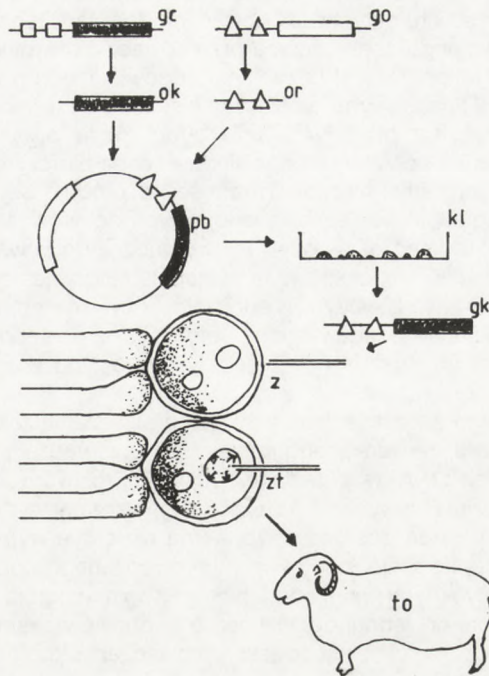
Biologia kreatywna, a w jej ramach, tworzenie przez człowieka nowych, nie występujących w naturze genomów, posługuje się metodami inżynierii genetycznej, szczególnie takimi narzędziami jak enzymy modyfikujące kwasy nukleinowe (NAME – z j. ang. *Nucleid Acid Modification Enzymes*). Stworzyła już wiele nowych szczepów bakterii, które wykorzystywane są do produkcji substancji dotychczas możliwych do otrzymania tylko w małych ilościach. Bakterie wyposażone w nowe geny, za pomocą inżynierii genetycznej, wytwarzają już ludzkie hormony, enzymy, a nawet składniki przydatne do produkcji tworzyw sztucznych.

Wytwarzanie zwierząt transgenicznych, to jest organizmów mających świadomie zmieniony przez człowieka lub wzbogacony genom, postępuje wolniej, gdyż jest to problem bardziej złożony niż w przypadku bakterii. Niemniej urodziły się już ssaki, które sztucznie wzbogacono o pożądane geny. Zarysowała się możliwość przekraczania granic (określonych przez naturę) oddzielających od siebie gatunki. Połączenie metod inżynierii genetycznej i embriologii eksperymentalnej, pozwala dziś na wprowadzenie do genomu zwierząt, genów z form filogenetycznie od nich odległych, takich jak rośliny, bakterie czy wirusy. Przenosząc geny do materiału dziedzicznego zarodków zwierząt udokumentowano, że obce DNA może się włączać w substancje dziedziczną komórek prapłciowych. Nowe geny mogą być przekazywane kolejnym pokoleniom i to zgodnie z zasadami segregacji mendelowskiej. Powstała szansa uzyskiwania u zwierząt cech, w stosunkowo krótkim czasie, które przy zastosowaniu tradycyjnych metod krzyżowania i selekcji były dotąd niemożliwe.

Pierwsze eksperymenty, w których uzyskano transgeniczne ssaki, w wyniku zastosowania połączenia metod inżynierii genetycznej i embriologii eksperymentalnej, przeprowadził w 1982 r. Palmiter ze współpracownikami (1). Zespół ten przeszczepił, metodą mikroiniekcji, do męskiego przedjądrza zapłodnionej komórki jajowej myszy, gen hormonu wzrostu szczura. Był to pionierski eksperyment w otrzymywaniu transgenicznych ssaków. Laboratoryjnie skonstruowany gen składał się z promotora kodującego u myszy metalotioneinę (mMT – z j. ang. *mouse Metalotionine*) i sekwencji nukleotydów odpowiedzialnych u szczura za produkcję hormonu wzrostu (rGH – z j. ang. *rat Growth Hormone*). Taka konstrukcja genu miała za zadanie ułatwienie ekspresji sztucznego genu. Do diety transgenicznego potomstwa dodano dwa metale: cynku i kadmu, w wyniku czego uczyniono promotor. U części potomstwa obcy gen uległ ekspresji, a wytworzone osobniki okazały się prawie dwa razy większe i cięższe, w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Technika mikroiniekcji, zastosowana przez Palmitera i wsp., należy obecnie do podstawowych metod przy otrzymywaniu transgenicznych ssaków. Posługując się tą metodą uzyskano także transgeniczne króliki, owce, świnię i bydło (2).

Najlepsze rezultaty, przy otrzymywaniu transgenicznych zwierząt hodowlanych, otrzymuje się przeszczepiając metodą mikroiniekcji obce DNA do przedjądrzy zapłodnionej komórki

Rys.1. Schemat uzyskiwania transgenicznych zwierząt hodowlanych – zastosowanie techniki mikroiniekcji DNA do przedjądrza zygoty: gc – wyizolowany gen człowieka, go – wyizolowany gen owcy, ok – odcinek kodujący, or – odcinek regulatorowy, pb – plazmid bakteryjny, kl – klonowanie, gk – czysty gen kombinowany, z – zygota owcza przed zabiegiem mikroiniekcji, zt – zygota owcza po zabiegu mikroiniekcji; strzałki obrazują zwiększenie objętości przedjądrza po wprowadzeniu buforu zawierającego kopie DNA.



jajowej (2,3). Zlokalizowanie przedjądrzy w zapłodnionej komórce jajowej myszy, czy królika, posługując się mikroskopem odwróconym z urządzeniem Nomarskiego, nie przedstawia większych trudności. Natomiast, zlokalizowanie przedjądrzy w komórkach jajowych owcy sprawia poważne kłopoty. Zygota owcy ma specyficzną budowę, utrudniającą obserwację. Stosując mikroskop z urządzeniem Nomarskiego, udaje się zlokalizować przedjądrza nie więcej jak u 80% zygot owczych. Procent ten można powiększyć stosując metody fluorescencyjne. Uwidaczniają one lepiej przedjądrza, ale wymagają jednocześnie krótkotrwałego naświetlania zygot promieniami ultrafioletowymi. A to z kolei zwiększa procent zygot obumierających i nie nadających się do dalszych doświadczeń. Próbowano także stosować wirowanie zygot owczych, podobnie jak to się praktykuje w odniesieniu do zygot świni, przed zabiegiem mikroiniekcji, ale nie poprawia to jednak stopnia uwidocznienia przedjądrzy (2). Ponadto, wirowanie również wydatnie podnosi procent zygot obumierających. Dobra wizualizacja przedjądrzy u zygot owczych pozostaje kwestią otwartą.

W przypadku komórek jajowych świni, u których ooplazma zawiera liczne nieprzejrzyste komórki granulozy, wirowanie znacznie ułatwia lokalizację przedjądrzy. Wirowanie zygot świni, przed zabiegiem mikroiniekcji DNA, stosuje się obecnie powszechnie.

Dogodnym materiałem okazały się zygoty bydła. Starając się uwidocznić przedjądrza można zygoty bydłace wirować, a także można je traktować fluorochromami i promieniami ultrafioletowymi, nie powodując uszkodzeń i obniżenia żywotności (2).

Niemniej przy wszystkich wymienionych metodach, a także u wszystkich zwierząt hodowlanych, sam zabieg mikroiniekcji DNA do przedjądrzy jest trudny do przeprowadzenia i udaje się w stosunkowo niskim procencie. Mikroiniekcje przeżywa od 20 do 40% doświadczalnych zygot. Poziom integracji obcych genów z genomem zygoty jest jeszcze niewielki i nie przekracza 2% (2,3,4).

W ostatnich latach próbowano także przeprowadzić mikroiniekcję obcego DNA nie do przedjądrzy, a do ooplazmy zapłodnionego jaja, albo do jąder komórkowych bruzdkującego

zarodka, w stadium dwu- lub czteroblastomerowym (2). Na razie efekty tych zabiegów są nikłe. Przy wszystkich, dotychczas opisanych doświadczeniach, ciągle jeszcze dla uzyskania jednego transgenicznego ssaka, trzeba przeprowadzić mikroiniekcję do kilkuset, a nawet tysiąca zygot. Wymaga to oczywiście utrzymania odpowiedniego pogłowia zwierząt, co wiąże się z wysokimi nakładami finansowymi. Konieczne jest także dysponowanie właściwymi hormonami, złożonymi pożywkami dla przetrzymywania zygot poza organizmami dawczyń. Dalej, dysponowania odpowiednim sprzętem i odpowiednią liczbą biorczyń, dla zabezpieczenia rozwoju zarodkowego transgenicznych zygot. Trudności te próbuje się ominąć stosując mikroiniekcję DNA do jąder, względnie ooplazmy, niedojrzałych oocytów, które można uzyskać nie stosując superowulacji. Hodując takie oocyty *in vitro*, można doprowadzić do osiągnięcia przez nie dojrzałości, przeprowadzić mikroiniekcję, a następnie można je zapłodnić *in vitro* i w końcu można je przenieść do macic biorczyń. Niedojrzałe oocyty owiec, świń i bydła można pozyskiwać w rzeźniach, od samic poddawanych ubojowi. Takie postępowanie, w dużym stopniu wyrównuje niską efektywność i kosztowność metody. Tego typu prace realizowane są w Zakładzie Fizjologii Rozrodu IZ.

Istotnym zagadnieniem, przy przeprowadzaniu zabiegu mikroiniekcji, jest określanie objętości roztworu, zawierającego kopię genu wprowadzanego do przedjądra. Ważne jest także stężenie kopii DNA w określonej objętości roztworu. Natomiast przy przekroczeniu wartości, roztwór działa toksycznie na zygoty (2). Optymalne stężenie kopii DNA wynosi 1 ng/ml buforu.

Należy także podkreślić, że jak na razie, nie wypracowano jeszcze żadnej metody zabezpieczającej kontrolę liczby kopii, wprowadzanego do zygoty DNA, integrującego się z materiałem genetycznym przedjądra biorcy. Kopie integrują się dowolnie, w bardzo zmiennej liczbie, wynoszącej od jednej do kilkuset, u osobników eksperymentalnych tego samego gatunku.

Oprócz mikroiniekcji, to jest wprowadzania kopii DNA za pomocą szklanej mikropipety do przedjądra, stosuje się u ssaków, jako nośniki DNA retrowirusy (4). Są one najpierw poddawane laboratoryjnej obróbce. W ich genom, metodami inżynierii genetycznej, wprowadza się wybrany gen, a następnie tak zmodyfikowanymi wirusami zakaża się zarodek ssaka, będący w odpowiednim stadium rozwoju. Okazało się, że najlepsze rezultaty uzyskuje się zakażając zarodki w stadium poza ustrojem samicy, w środowisku płynnym, zawierającym odpowiednie stężenie retrowirusów. Wirusy przenikają do komórek zarodka, integrują się z substancją dziedziczną jąder komórkowych i wbudowują nową informację. Stopień wbudowania nowych genów w genom biorcy jest wysoki (4). Metoda ta ma jednak szereg ograniczeń i ubocznych skutków. Pojemność kapsuły wirusa jest ograniczona, można do niej wprowadzać tylko stosunkowo krótkie łańcuchy nukleotydów, co jest poważnym ograniczeniem, gdyż geny ssaków są długie. Dla prawidłowego funkcjonowania wirus musi zawierać swój genom w całości. Wbudowana nowa informacja często powoduje nieprawidłowe funkcjonowanie genomu wirusa, a więc wpływa na ekspresję wbudowanego genu w przypadku uzyskanego zwierzęcia transgenicznego.

Trudno przewidzieć, czy w efekcie samorzutnej rekombinacji zmodyfikowany wirus nie przekształci się w czynnik chorobotwórczy, atakujący pokolenia transgenicznych zwierząt, a nawet zwierzęta doświadczalne. Doświadczenia z wirusami muszą być prowadzone ze szczególną ostrożnością. Stosując retrowirusy uzyskano kilka linii transgenicznych myszy. Aktualnie prowadzone są prace nad skonstruowaniem modelu uniwersalnego retrowirusa, nośnika pożądaných podjednostek DNA, wnikającego bez ubocznych skutków do różnego rodzaju komórek zarodkowych (3,4).

W zakresie metod embriologicznych, przeznaczonych do przenoszenia obcego DNA do komórek zarodków, ostatnio zainteresowanie badaczy skupiło się na komórkach twórczych krwi zarodków i komórkach nowotworowych teratokarcinomy. Komórki te łatwo można rozmnażać w hodowli, a także można je wyposażać w nową informację genetyczną. Wyizolowane komórki z organizmu zarodka, w przypadku komórek twórczych krwi, hoduje się w pożywce zawierającej fosforan wapnia i odpowiednie kopie sekwencji nukleotydów DNA. Następnie, z hodowli

wybiera się te komórki, u których stwierdzono wbudowanie w ich genom nowego DNA. Klonując wybrane komórki, uzyskuje się dużą liczbę zmienionych, identycznych nośników określonych genów. Sklonowane komórki, wprowadza się mikropipetą do jamy zarodka w stadium blastocysty. Część komórek różnicuje się, staje się komórkami pluripotencjalnymi i integruje się z komórkami węzła zarodkowego. Następnie, komórki pluripotencjalne włączają się w normalne procesy rozwojowe, w tym również w procesy różnicowania się tkanek. Posługując się komórkami twórczymi krwi i komórkami teratokarcinomy jako wektorami, uzyskano już drugie pokolenie u transgenicznym myszy, w którym wystąpiła ekspresja sztucznie wprowadzonego genu ludzkiego, odpowiedzialnego za kodowanie  $\beta$ -globiny (3,5,6). Posługiwanie się komórkami twórczymi krwi jako wektorami genów, w przypadku zwierząt hodowlanych, jest jeszcze w stadium opracowywania, niemniej jednak kilka ośrodków badawczych zajmuje się tymi zagadnieniami.

Na podstawie rozważań, które dotychczas zostały przedstawione widać, że dawne marzenia biologów i hodowców związane z możliwością kreowania zwierząt nie występujących w naturze, o pożądanych cechach genetycznych, spełniają się. Jednakże prace te są jak dotąd bardzo kosztowne. Nadal nie rozumiemy w pełni mechanizmów regulacji funkcji genomu. Metody wprowadzania nowych genów, zwłaszcza w przypadku zwierząt hodowlanych, są niedoskonałe, a efekty trudne do przewidzenia. Konieczne jest opracowanie pełnych map genomu zwierząt hodowlanych, a także zakładanie i prowadzenie bibliotek genów. Najtrudniejszym zagadnieniem jest uzyskiwanie kierowanej, pożądanej ekspresji nowego genu, wprowadzonego do genomu zwierzęcia hodowlanego. Dotychczas problem ten nie został skutecznie rozwiązany.

W oparciu o doświadczenia przeprowadzone na myszach laboratoryjnych, za pomocą techniki już opisanej, przeszczepiono gen odpowiedzialny za syntezę hormonu wzrostu u człowieka do takich zwierząt hodowlanych jak świnie i owce. Pierwsze pokolenie transgenicznym świń nie cechowało się zwiększonym wzrostem. Zauważono natomiast zmniejszenie się otłuszczenia mięśni w tylnych partiach ciała (3). Tak zatem wynik eksperymentu był inny aniżeli w przypadku transgenicznym myszy i odmienny od zaplanowanego. Podobne zabiegi przeprowadzone na owcach nie dały żadnych sprawdzalnych efektów (4). Co więcej, u zwierząt doświadczalnych, poddanych zabiegowi wzbogacenia genomu nowymi genami, zanotowano różne uboczne skutki, dalekie od zamierzonych. U osobników transgenicznym zauważono nienormalności w przebiegu morfogenezy, a szczególnie nieprawidłowe wykształcanie się narządów ruchu. Po zabiegu mikroiniekcji nowego DNA, jego kopie włączają się losowo w genom komórki jajowej, w przypadkowy chromosom i w przypadkowy jego obszar. Stąd, na przykład przy wprowadzeniu genów odpowiedzialnych za produkcję hormonu wzrostu, występują niezamierzone efekty, świadczące o nieprawidłowej funkcji nowego genu, mimo że wystąpiła jego ekspresja.

Najpoważniejszym problemem związanym z produkcją transgenicznym zwierząt hodowlanych jest wypracowanie metody pozwalającej na ukierunkowane włączanie nowego genu do odpowiedniego chromosomu i do odpowiedniego jego obszaru, tak, ażeby wystąpiła prawidłowa, pożądana jego ekspresja. Mamy nadzieję, że zostanie to opanowane, gdyż prawidłową ekspresję, wykorzystywaną na przemysłową skalę, uzyskuje się w przypadku mikroorganizmów (np. produkcja przez bakterie ludzkiej insuliny), a nawet udało się kierować tym procesem u bezkręgowców (muszki owocowej). Jeżeli to zagadnienie zostanie rozwiązane w przypadku ssaków, to hodowcy otrzymają narzędzia, których skutki zastosowania są na razie trudne do wyobrażenia. Wiele problemów, z którymi teraz borykają się hodowcy zostanie wówczas rozwiązanych.

Istotnym zagadnieniem hodowlanym jest uzyskiwanie zwierząt gospodarskich odpornych na choroby. Metody przenoszenia genów za pomocą embriologii eksperymentalnej, budzą już nadzieje na rozwiązanie tego problemu, przynajmniej odnośnie do niektórych chorób. Poznano już niektóre geny i ich strukturę, odpowiedzialne za odporność na choroby. Określa się je umownym symbolem MX (3). Aktualnie prowadzone są doświadczenia nad pozyskaniem transgenicznym świń, mających wprowadzony do genomu łańcuch nukleotydów odpowiedzialnych

za odporność na zakażenie wirusem grypy świńskiej (3). Badacze spodziewają się zwiększenia odporności u transgenicznego potomstwa.

Innym kierunkiem badań jest wyprodukowanie transgenicznych zwierząt hodowlanych zdolnych do produkcji farmaceutyków, czy produkujących różne substancje przydatne w medycynie. W kilku ośrodkach prowadzone są prace nad uzyskaniem transgenicznych owiec, zdolnych do produkcji mleka o obniżonej ilości laktozy (3,7). Uzyskano także transgeniczne myszy, których mleko zawiera owczą  $\beta$ -laktoglobulinę,  $\beta$ -glukozę właściwą dla organizmu człowieka oraz transgeniczne owce, których krew zawiera ludzką  $\alpha$ -hymotrypsynę. Planuje się stworzyć transgeniczne owce, których krew zawierać będzie czynniki VII i IX odpowiedzialne za krzepliwość krwi u ludzi (7).

Trwają prace nad zidentyfikowaniem i wyizolowaniem genów odpowiedzialnych za niektóre szlaki metaboliczne. Przeszczepienie takich genów pozwoliłoby u transgenicznych zwierząt, wprowadzić cechy bardzo ważne z punktu widzenia gospodarczego. Transgeniczne owce, z genomami wzbogaconymi o sekwencje DNA odpowiedzialne za kodowanie aminokwasu cysteiny, dałyby podwyższoną produkcję wełny (3,4).

Niezwykle ważnym zagadnieniem jest prawidłowe skarmianie zwierząt hodowlanych. Nakłady na produkcję pasz wysokoenergetycznych i w pełni przyswajalnych przez zwierzęta są obecnie bardzo duże. Także prace selekcyjne prowadzone w celu uzyskania ras, które w sposób optymalny mogłyby konsumować pasze są bardzo kosztowne i czasochłonne. Wprowadzenie do genomu odpowiednich odcinków DNA, odpowiedzialnych za określone szlaki metaboliczne zwierząt hodowlanych mogłoby znacznie przyspieszyć możliwość uzyskania pogłowa odpowiednio przyswajającego tanie pasze (8). Opanowanie tych możliwości można by połączyć z wprowadzaniem do genomów zespołu genów, które działałyby łącznie. To jest, np. genów odpowiedzialnych zarówno za produkcję enzymów trawiennych jak i hormonu wzrostu.

Dotychczas hodowcy, stosując tradycyjne metody krzyżowania i selekcji, kierowali się głównie uzyskaniem wybranej, pojedynczej cechy, rzadziej koncentrowali się na kilku pożądanym cechach użytkowych. Często hodowcy stoją przed problemem wyboru cechy, gdyż utrwalenie jednej zazwyczaj łączy się z utratą innej, równie pożytecznej. Zwłaszcza, często uzyskane metodą selekcji wysoko produkcyjne rasy zwierząt gospodarskich cechuje obniżenie odporności na choroby. Metody pozyskiwania transgenicznych zwierząt, o genomach wzbogaconych o szereg poświadanych genów, mogłyby się przyczynić do rozwiązania tych problemów. Tym bardziej, że na podstawie dotychczasowych eksperymentów widać wyraźnie, że czas uzyskiwania transgenicznego potomstwa F2 jest stosunkowo krótki. Dla królika wynosi 1,5 roku, dla owcy 4,5 roku, dla świni 3 lata, a dla bydła 8,5 roku (3).

W hodowli ważne jest także pozyskiwanie potomstwa cechującego się zwiększoną plennością samic. Metody selekcyjne prowadzone w tym kierunku, mają ograniczenia, które zostały już opisane. Natomiast klonowanie nie wyszło jeszcze poza eksperymenty laboratoryjne. Metody uzyskiwania transgenicznych zwierząt, wzbogaconych o geny zapewniające mnogą owulację, otwartyby całkowicie nowe perspektywy dla nauki i praktyki. Embriologowie eksperymentalni mieliby nowy materiał badawczy, pozwalający na pominięcie wywoływania superowulacji z zastosowaniem hormonów.

Wreszcie należy podkreślić, że inżynieria genetyczna opanowała metody pozwalające na częściowe blokowanie ekspresji określonego genu, albo na całkowite wyeliminowanie funkcji danego genu w genomie naturalnie funkcjonującym u mikroorganizmów. Opanowała metody uzyskiwania transgenicznych mikroorganizmów, o tak zmodyfikowanych genomach, że produkują zaplanowane substancje przydatne w przemyśle, medycynie oraz różnej działalności gospodarczej człowieka. Opanowanie metod uzyskiwania transgenicznych zwierząt hodowlanych, o tak skonstruowanych genomach, które będą odpowiadać w sposób określony, bez ubocznych skutków, otworzy dla hodowców wielkie możliwości. Pierwsze kroki zostały już w tym kierunku zrobione.

## Literatura

1. Palmiter R. D., Brinster R. L., Hammer R. E., Trumbaer M. E., Rosenfeld M. G., Brinberg N. C. and Evans R. M., (1982), *Nature*, 300, 611.
2. Jura J., (1989), *Medycyna Weterynaryjna*, 45 (3), 177. 3. Brem G., (1989), manuskrypt, dane nie publikowane.
4. Murray J. D., Nancarrow C. D. and Ward K. A., (1988), 11<sup>th</sup> Int. Cong. on Anim. Reprod. and AI., Dublin, 5, 20.
5. Handyside A., Hooper M. L., Kaufman M. H., Wilmot I., (1987), *Developmental Biology*, 196, 185.
6. Hollands P., (1988), *Development*, 102, 135.
7. Clark A. J., Simons P., Wilmot I., Lothe R., (1987), *TiBTECH*, 5, 20.
8. Hodges J., (1986), *World Animal Review*, 59, 2.

## Transgenic farm animals – new genotypes obtained by laboratory technique

### Summary

Revolutionary new methods for changing the genotypes of microorganisms and animals have been developed over the last few years.

A single gene can be isolated, altered in the laboratory and introduced into individuals, of the same or a different species and became incorporated into the genome. Animals which have received new gene in this way are called "transgenic". This new method opened fully new opportunity to produce animals with entirely novel properties, unattainable by conventional selection methods. Transgenic methodology may be applied to the production of transgenic farm animals.

In not very distant future, new methods to modify the genome of animals by using gene constructs will be developed.

Jacek Jura, Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt, Instytut Zootechniki, 32-083 Balice k. Krakowa.

## NOWOŚCI!

### AIDS

Alexandra Levine, profesor University of Southern California, przedstawiła w trakcie V Międzynarodowej Konferencji nt. AIDS, w czerwcu 1989 r. w Montrealu, wyniki leczenia pacjentów przy zastosowaniu nowej szczepionki przeciwko AIDS. Szczepionka (otrzymana przez Jonasa Salk) niszczy wirus, jest bezpieczna i stymuluje odzyskiwanie właściwości odporności immunologicznej u chorego. W ciągu rocznej obserwacji u 19 pacjentów-ochotników, którym aplikowano nowy preparat, nie stwierdzono żadnych skutków ubocznych, natomiast zaobserwowano jednoznaczną poprawę stanu zdrowia chorych. W opinii ekspertów preparat ten może być podstawą do dużego optymizmu, aczkolwiek autorzy szczepionki zachowują dyskrecję i podają niewiele danych charakteryzujących lek, a głównie oceniają wyniki wstępnych badań klinicznych.

T.T.

Opracowano na podstawie: (1989), July, *Research & Development*, 5.