



Ekspresja genu WAP-Fuc u transgenicznych zwierząt gospodarskich – efektywność transgenezy przy zastosowaniu metody mikroiniekcji

Jacek Jura¹, Zdzisław Smorąg¹, Barbara Gajda¹, Wiesław Kareta¹, John J. Kopchick², Bruce Kelder², Pedro A. Prieto³

¹Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki, Balice k. Krakowa

²Edison Biotechnology Institute, Ohio University, The Ridges, Athens OH, USA

³Abbott Laboratories, Ross Products Division, Department of Pediatric Strategic Research, Columbus, Ohio, USA

The expression of WAP-Fuc gene in genotypes of transgenic farm animals – effectiveness of transgenesis with the use of DNA microinjection

Summary

There are two principal applications of transgenic animals. Best known and most advanced application is to use transgenic animals (called bioreactors or molecular farms) for the production of various proteins or biopolymers of medical significance. The second application concerns efforts to improve the productivity traits of breeding animals. We have worked out methods which allow somatic cloning of mammals and gene knockout methods. These methods have been developing very rapidly in recent years and their efficiency will soon be improved to the extent that they will become profitable. For the time being, DNA microinjection with all its disadvantages, remains the principal method of producing transgenic bioreactors. In this paper, the effectiveness of production of transgenic rabbits, goats and pigs with the use of WAP-Fuc gene construct is presented.

Adres do korespondencji

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

biotechnologia

1 (60) 216–222 2003

Key words:

transgenesis, WAP-Fuc gene, rabbit, goat, pig.

1. Wstęp

W modyfikacjach genetycznych zwierząt gospodarskich wykrystalizowały się dwa zasadnicze kierunki, które mają na celu: poprawę cech użytkowych oraz wykorzystanie zmodyfikowanych zwierząt jako żywych bioreaktorów. Pierwszy z kierunków obejmuje szeroko rozumiane zmiany zmierzające do podniesienia efektywności produkcji zwierzęcej poprzez spowodowanie ekspresji określonych białek mających wpływ na zwiększenie masy ciała zwierząt, np. nadekspresja hormonu wzrostu wywoływana w określonych tkankach (głównie w tkance mięśniowej) oraz modyfikacje szlaków metabolicznych, za które odpowiedzialne są pojedyncze geny. Drugi, cieszący się obecnie znacznie szerszym zainteresowaniem ze względu na potencjalnie bardziej spektakularne i bardziej wymierne finansowo korzyści, ukierunkowany jest na wykorzystanie zwierząt gospodarskich jako najdoskonalszego źródła wielu istotnych w medycynie, przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym białek (4,5). Granica pomiędzy wymienionymi kierunkami, coraz częściej się zaciera. Związane jest to z tym, że często zmiany w genotypach, jakie wywołuje się u transgeniczných zwierząt gospodarskich, są tak pomyślane aby suma efektów modyfikacji miała jak najszersze, możliwe do przewidzenia i korzystne efekty.

Przykładem takiego postępowania jest omówiona modyfikacja z wykorzystaniem genu fukozyltrazferazy (Fuc) połączonego z promotorem białka kwaśnej serwatki (WAP, *Whey Acidic Protein*) (3). Zastosowanie tego konstruktów genowego miało na celu spowodowanie obniżenia ilości laktozy w mleku, będącej głównym czynnikiem alergennym mleka oraz spowodowanie bakteriostatycznego działania mleka, którego skład został wzbogacony o białko enzymu fukozyltrazferazy.

Celem prezentowanych badań było uzyskanie transgeniczných królików, kóz i świń o potwierdzonej ekspresji genu WAP-Fuc. Do przeprowadzenia transgenezy posłużono się standardową metodą mikroiniekcji DNA do przedjądrza zygot (6). Metoda ta, choć jej wydajność jest stosunkowo niska, ciągle jest metodą, która w przypadku zabiegów uzyskiwania transgeniczných osobników wymienionych gatunków, daje najlepsze rezultaty (7,8). W ostatnich doniesieniach naukowych sugeruje się, że lepszą wydajność procesu transgenezy można będzie uzyskać jedynie stosując metodę transfekcji komórek (hodowla linii transgeniczných komórek dawców jąder komórkowych) połączoną z klonowaniem (1,2,9). Pozytywne i bardzo obiecujące rezultaty takiego postępowania udało się, co prawda, uzyskać zarówno u królika, kozy i świni, ale wydajność takiego postępowania jest niewspółmiernie niska w odniesieniu do poniesionych nakładów finansowych i pracy (1,2,9). Pojedyncze, uwieńczone sukcesem eksperymenty, gdzie zastosowano takie postępowanie świadczą o możliwym do wykorzystania w przyszłości potencjale metody, jednak analiza efektywności i poniesionych nakładów nadal przemawia za stosowaniem tradycyjnego podejścia – mikroiniekcji DNA.

2. Materiał i metody

Zastosowany konstrukt genowy składał się promotora mysiego genu kwaśnej serwatki białka (mWAP, *mouse Whey Acidic Protein*) oraz części kodującej genu fukozyltransferazy połączonej z fragmentem bGH PolyA (*bovine Growth Hormone Polyadenylation signal*).

2.1. Uzyskiwanie zygot. Superowulacja i synchronizacja cyklu rujowego

2.1.1. Królik

Dawczynię zygot przygotowywano stosując standardowe postępowanie. Zygoty królika uzyskiwano od samic dawczyń, którym podawano domięśniowo 100 j.m. PMSG (Serogonadotropin, Biowet). Po 72 godzinach od podania PMSG, dawczyniom podawano dożylnie 100 j.m. HCG (Biogonadyl, Biomed) i inseminowano. Zygoty uzyskiwano przez przepłukiwanie wypreparowanych jajowodów płynem PBS z dodatkiem 4% albuminy bydlęcej (Sigma, USA), po 18 godzinach od podania HCG.

2.1.2. Koza

Dawczynię zygot synchronizowano przez zastosowanie gąbek domacicznych. Superowulację wywoływano przez domięśniowe podanie 20 mg FSH (Shering, USA), w malejących dawkach, w odstępach 12-godzinnych. W ostatnim dniu podawania FSH, dawczyniom podawano dożylnie HCG. Zygoty wypłukiwano chirurgicznie 20-22 godziny od podania HCG, stosując PBS uzupełniony dodatkiem albuminy bydlęcej.

2.1.3. Świnia

Lochy dawczynię stymulowano (superowulacja) przez domięśniowe podanie 1500 j.m. PMSG. Po 72 godzinach dawczyniom podawano dożylnie 750 j.m. HCG. Zygoty wypłukiwano płynem PBS uzupełnionym albuminą z uzyskanych poubojowo jajowodów, po 18-20 godzinach od podania HCG.

Biorczynię zygot synchronizowano przez podanie odpowiedniej dla danego gatunku ilości HCG : królik – 100 j.m.; koza – 250 j.m.; świnia – 500 j.m. W celu zwiększenia ilości ciałek żółtych u biorczyń (koza i świnia) podawano PMSG, w ilościach odpowiednio – 500 i 750 j.m.

2.2. Mikroiniekcja

Uzyskane zygoty królika, kozy i świni oceniano morfologicznie pod mikroskopem stereoskopowym. Do zabiegu mikroiniekcji wybierano zygoty o prawidłowej budowie morfologicznej i z wyraźnie wykształconymi ciałkami kierunkowymi.

Do mikroiniekcji zygot królika, kozy i świni stosowano tę samą koncentrację wektora, wynoszącą 4 ng/ μ l. Wektor WAP-Fuc wprowadzono: do męskiego przedjądrza zygot królika, jednego z uwidocznionych po wirowaniu przedjądrzy w zygotach kozy i świni. Zygoty kozie i świńskie wirowano odpowiednio: 16 000 \times g przez 3 min; 20 000 \times g – 5 min.

Mikroiniekcję przeprowadzano w komorze manipulacyjnej, wypełnionej płynem PBS uzupełnionym 20% dodatkiem płodowej surowicy krwi cielęcej (Sigma, USA). Zabieg mikroiniekcji wykonywano pod mikroskopem odwróconym (Nikon, Diaphot), wyposażonym w system modulacji światła Hoffmana i obiektywy 10 \times oraz 40 \times . Manipulacje wykonywano dwoma jednostkami manipulatorów (Alcatel, Francja).

Po przeprowadzeniu mikroiniekcji DNA, zygoty wszystkich wymienionych gatunków, ponownie oceniano morfologicznie, eliminując uszkodzone w trakcie zabiegu. Przeszczepianie zygot, we wszystkich przypadkach przeprowadzano metodą chirurgiczną, wprowadzając je do jajowodów zsynchronizowanych biorczyń. Do jajowodów biorczyń wprowadzono: 20; 4-6; 25 zygot, odpowiednio u królika, kozy i świni.

2.3. Ocena ekspresji wprowadzonego genu

Ocenę integracji i ekspresji DNA przeprowadzano metodami PCR i Slot Blot, wykorzystując DNA wyizolowany z tkanek uzyskanego potomstwa. DNA izolowano z tkanki usznej metodą fenolowo-chloroformową. Po wyizolowaniu, DNA liofilizowano i wysyłano do USA, gdzie przeprowadzano analizy molekularne.

3. Wyniki i dyskusja

Mikroiniekcji genem WAP-Fuc poddano 816 zygot króliczych, 884 zygoty kozie i 1063 zygoty świńskie. Do przeszczepienia wybrano 720 zygot królika (88%); 661 zygot kozich (74,8%) oraz 918 zygot świńskich (86,4%). W rezultacie uzyskano następujące liczby młodych: 86 królików; 47 kóz i 75 prosiąt. Analizie molekularnej poddano DNA uzyskany od 63 królików; 36 kóz i 75 prosiąt. Przeprowadzone metodami PCR i Slot Blot analizy wykazały obecność genu WAP-Fuc w genomach 9 (14,3%) badanych królików oraz u 8 (22,2%) kóz i 9 (12,0%) świń. Efektywność transgenezy, liczona w procentach, w odniesieniu do przeszczepionych zygot dla królika, kozy i świni wyniosła odpowiednio: 1,25; 1,2 i 1,0%.

Uzyskane wyniki dotyczące superowulacji, mikroiniekcji oraz liczby uzyskanego potencjalnie transgenicznego potomstwa przedstawiono w tabeli 1. Natomiast wyniki dotyczące efektywności transgenezy zestawiono w tabeli 2.

Tabela 1

Efektywność superowulacji, mikroiniekcji oraz liczba uzyskanego potomstwa po transformacji zygot

Gatunek	Dawczynie	Zygoty	Zygoty po MI	Bioczyynie	*TPT zygoty	Potomstwo	*Efektywność (%)
królik	46	816	775	35	720	86	11,9
koza	138	884	798	190	661	47	7,1
świnia	61	1063	978	46	918	75	8,2

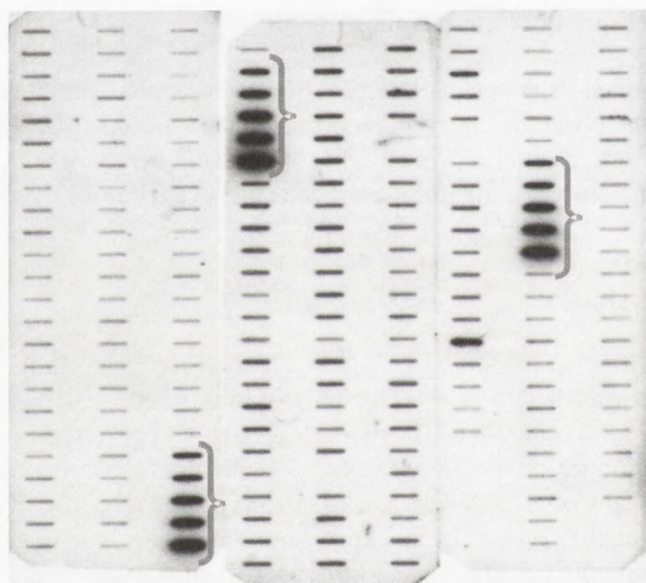
MI – mikroiniekcja, * efektywność odniesiono do liczby przeszczepionych zygot po mikroiniekcji.

Tabela 2

Efektywność transgenezy

Gatunek	TPT zygoty	Analizowane potomstwo	PCR pozytywne	Slot Blot pozytywne	Transgeny			Odniesienie efektywności w % do:	
						♂	♀	TPT zygot	urodzonego potomstwa
królik	720	63	9	9	9	5	4	1,25	14,3
koza	661	36	11	8	8	4	4	1,2	22,2
świnia	918	75	9	9	9	6	3	1,0	12,0

MI – mikroiniekcja.



Rys. 1. Slot Blot DNA królików, kóz i świń uzyskanych po mikroiniekcji genu WAP-Fuc do przedjądry zygot. Łącznikiem zaznaczone standardy kopii genu: 2; 5; 10; 15; 20 kopii.

Efektywność transgenezy u zwierząt gospodarskich, przy zastosowaniu techniki mikroiniekcji DNA zależy od wielu czynników (6). Jednym z nich jest wybór metody, która pozwala na spowodowanie zamierzonych zmian w genotypach zwierząt. Na dzień dzisiejszy do wyboru są dwie metody. Wykorzystanie transfekowanych komórek jako dawców transgeniczných jąder komórkowych w połączeniu z klonowaniem i określana mianem standardowej, technika mikroiniekcji DNA do przedjądra zapłodnionej komórki jajowej (1,10,11). Pierwsza z metod jest, jak na razie, w fazie początkowej. Pierwsze informacje literaturowe pozwalają na stwierdzenie, że dysponuje ona ogromnym potencjałem, gdyż pozwala na 100% skuteczność wprowadzania egzogennej informacji genetycznej do transformowanego organizmu ssaka (1,2). Natomiast, efektywność końcowa, mierzona liczbą transgeniczných osobników uzyskanych w odniesieniu do liczby wymaganych transplantacji transgeniczných jąder nie przekracza kilku promili (1,2). Niewspółmiernie mała liczba uzyskiwanych implantacji i jeszcze mniejsza liczba urodzonych zdrowych transgenów w odniesieniu do liczby przeszczepianych zrekombinowanych oocytów czy zarodków, jednoznacznie wykazują, że na tym etapie opanowania metoda ta jest mało wydajna i nieopłacalna. Możliwości „techniczne” metody znacznie przekraczają zrozumienie podstawowych zjawisk, leżących u podłoża tej metody (12).

Jednym z główných czynników mających wpływ na wydajność procesu transgenezy jest rodzaj zastosowanego promotora (13,14). Zastosowany w prezentowanych badaniach promotor WAP (*Whey Acidic Protein*) należy do rodzaju promotorów o średniej wydajności. Jest znacznie słabszy od promotorów kazeinowych, ale nie powoduje efektów ubocznych, określanych mianem „wycieku genu” (*gene leakage* – ekspresja genu następuje nie tylko w tkankach docelowych, co może powodować obniżenie wydajności bioreaktora) (13,14). Promotor WAP ukierunkowuje transgenezę na gruczoł mlekowy, a ściślej na komórki apokrynowe nabłonka wydzielniczego gruczołu mlekowego, nie powodując efektów ubocznych (13,14). Wadą zastosowanego promotora jest to, że ekspresja następuje na stosunkowo niskim poziomie. Natomiast jeżeli dojdzie do ekspresji genu prowadzonego przez promotor WAP jest ona trwała i nabyta cecha jest przekazywana na następne pokolenia (7). W prezentowanych badaniach efektywność ekspresji wprowadzonego genu, mierzona odsetkiem transgeniczných osobników w odniesieniu do liczby badanego na integrację genu potomstwa nie przekroczyła 1,5%. Uzyskana efektywność transgenezy u królika mieści się w dolnej granicy teoretycznie możliwej do osiągnięcia efektywności (można uzyskać ~ 4%) (6). Natomiast wyniki uzyskane w przypadku kozy i świni są na poziomie zadowalającym.

Jednym z celów podjętych badań było uzyskanie bakteriostatycznego działania mleka pochodzącego od transgeniczných samic trzech omawianých w pracy gatunków. We wstępnych badaniach mikrobiologiczných wykazano, że uzyskane mleko od transgeniczných samic posiada działanie bakteriostatyczne (dane nie publikowane).

Uzyskana efektywność oraz stwierdzona ekspresja wprowadzonego genu, pozwalają stwierdzić, że metoda standardowego wprowadzania egzogennej DNA

techniką mikroiniekcji do przedjądrza zapłodnionej komórki jajowej (zygoty) jest metodą, która pozwala na uzyskanie zadowalającej efektywności w procesie transgenezy (15).

Badania częściowo finansowane z projektu badawczego nr PBZ-KBN-036/P06/2000/16.

Literatura

1. Eyestone W. H., Campbell K. H., (1999), *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 54, 489-497.
2. Colman A., (1999), *Genet Anal.*, 15(3-5), 167-173.
3. Larsen R. D., Ernst L. K., Nair R. P., Lowe J. B., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 6674-6678.
4. Janne J., Alhonen L., Hyttinen J. M., Peura T., Tolvanen M., Korhonen V. P., (1998), *Biotechnol. Annu. Rev.*, 4, 55-74.
5. Kopchick J. J., Jura J., Mukerji P., Kelder B., (1995), *Biotechnologia*, 4(31), 36.
6. Jura J., (1995), *Biotechnologia*, 3(30), 20-32.
7. Jura J., Smorąg Z., Gajda B., Kareta W., Kopchick J. J., Kelder B., Prieto P. A., (2000), *Ann. Anim. Sci.*, 27, 4, 105-113.
8. Castro F. O., Limonta J., Rodriguez A., Aguirre A., de la Fuente J., Aguilar A., Ramos B., Hayes O., (1999), *Genet Anal.*, 15(3-5), 179-187.
9. Harrison G. J., Cerniway R. J., Peart J., Berr S. S., Ashton K., Regan S., Matherne P. G., Headrick J. P., (2002), *Cardiovasc. Res.*, 53(1), 147-155.
10. Palmiter R. D., Brinster R. L., Hammer R. E., Trumbauer M. E., Rosenfeld M. G., Birnberg N. C., Evans R. M., (1982), *Nature*, 16, 300 (5893), 611-615.
11. Zinovieva N., Lassing C., Schams D., Besenfelder U., Wolf E., Muller S., Frenyo L., Seregi J., Muller M., Brem G., (1998), *Transgenic Res.*, 7(6), 437-447.
12. Science Service – nowości i ciekawostki ze świata nauki. Prof. Modliński J., *Klonowanie z komórki somatycznej jest możliwe*, <http://science.eu.org>
13. Janne J., Hyttinen J. M., Peura T., Tolvanen M., Alhonen L., Sinervirta R., Halmekyto M., (1994), *Int. J. Biochem.*, 26(7), 859-870.
14. Hyttinen J. M., Peura T., Tolvanen M., Aalto J., Alhonen L., Sinervirta R., Halmekyto M., Myohanen S., Janne J., (1994), *Biotechnology*, (NY), 12(6), 606-608.
15. Limonta J. M., Castro F. O., Martinez R., Puentes P., Ramos B., Aguilar A., Lleonaart R. L., de la Fuente J., (1995), *J. Biotechnol.*, 15, 40(1), 49-58.