

Mutagenеза mysich pierwotnych komórek zarodkowych (*Embryonic Stem Cells*)

Celina Grundland
Zakład Embriologii Doświadczalnej
Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt
Polska Akademia Nauk
Jastrzębiec

1. Wstęp

Podstawowym sposobem badania działania genów jest analiza konsekwencji utraty ich funkcji w wyniku mutacji spontanicznych lub indukowanych. Chociaż badania mutacji zidentyfikowanych dotychczas u myszy przyniosły wiele cennych informacji o funkcjonowaniu poszczególnych genów w rozwoju ssaków, to jednak stosunkowo długi czas generacji oraz rozmiary i złożoność genomu myszy wykluczały eksperymenty na skalę prowadzonych na bakteriach, drożdżach czy muszkach owocowych. Do tej pory sklonowano niewiele genów z istniejącego „banku” mutacji występujących u myszy. Pewien postęp w tej dziedzinie jest związany z projektem klonowania całego genomu myszy, jednak w praktyce oznacza to, że dostępnych jest więcej genów, dla których nie znamy fenotypu mutantów, niż mutacji powiązanych z genem o znanej sekwencji.

Dwa ważne odkrycia w latach osiemdziesiątych znacznie zwiększyły możliwości analizy znaczenia oraz funkcjonowania poszczególnych genów podczas rozwoju zarodkowego myszy. Pierwszym było otrzymanie linii pierwotnych komórek zarodkowych (komórek ES) z przedimplantacyjnych zarodków mysich (1,2). Drugim było wykazanie, że w komórkach ssaków sterowana mutagenеза (ang. *gene-targeting* lub *targeted mutagenesis*) może zachodzić dzięki homologicznej rekombinacji (3,4).

Po raz pierwszy występowanie homologicznej rekombinacji w hodowanych komórkach ssaków wykazano we wczesnych latach osiemdziesiątych. Komórki transfekowano wektorami plazmidowymi lub wirusowymi, noszącymi komplementarne mutacje w genie oporności na antybiotyk, np. neomycynę. Przypadkowa integracja wektorów, nawet komplementarnych, nie daje oporności na antybiotyk. Sporadycznie może jednak zachodzić rekombinacja pomiędzy zintegrowaną już sekwencją jednego wektora z komplementarną se-

kwencją innego, co prowadzi do uzyskania przez komórki oporności na marker selekcyjny.

Pierwsze kierunkowe, czyli zachodzące dzięki rekombinacji odcinków homologicznych, mutacje endogennych genów komórek ssaków opisał Smithies w 1985 r. (3). Gen oporności na neomycynę (*neo*) był włączany w *locus* β -globiny w dwóch różnych typach komórek: 1) pochodnych komórek krwi (*erythroleukemic cell derivative*), w których gen β -globiny ulega ekspresji, 2) komórkach linii raka pęcherza (*bladder carcinoma*), w których ekspresja tego *locus* nie następuje. Selekcję transfekowanych komórek przeprowadzano w obecności neomycyny, a homologię integracji badano za pomocą hybrydyzacji metodą Southerna. Wykazano, że rekombinacja zachodzi z podobną częstością w genach ulegających i nie ulegających ekspresji, wbrew wcześniejszym przypuszczeniom, że struktura genów nie ulegających ekspresji może zakłócać mechanizmy homologicznej rekombinacji. Jednak tylko znikomy procent włączonych wektorów uległ homologicznej rekombinacji z zaplanowanym *locus*. W doświadczeniach przeprowadzonych przez Smithiesa wykazano, że konieczne jest udoskonalenie mutagenezy sterowanej oraz selekcji i hodowli zmutowanych klonów komórek, zanim technika ta będzie rzeczywiście użyteczna. Warunki te zostały spełnione dzięki zastosowaniu do tworzenia kierunkowych mutacji pierwotnych komórek zarodkowych (komórek ES).

Pierwotne komórki zarodkowe są to pluripotentne komórki otrzymywane z węzła zarodkowego (ICM) normalnych zarodków mysich. Najważniejszymi cechami komórek ES jest zdolność do nieograniczonego wzrostu w stanie niezróżnicowanym, z zachowaniem wyjściowych potencji rozwojowych, oraz możliwość indukcji ich różnicowania w różne typy komórek zarodkowych *in vitro* lub *in vivo*. W związku z tym, że pierwotne komórki zarodkowe są zdolne do kolonizacji zarówno tkanek somatycznych jak i linii płciowej, po przeszczepieniu ich do przedimplantacyjnych zarodków biorców można otrzymać myszy chimerowe (częściowo pochodzące z komórek zarodka biorecy, a częściowo z komórek ES), w których część gamet będzie pochodziła z pierwotnych komórek zarodkowych (5). Pod koniec lat osiemdziesiątych wykazano, że możliwe jest zastosowanie metody homologicznej rekombinacji do wprowadzania zaplanowanych zmian w genach hodowanych komórek ES (6,7), a po utworzeniu myszy chimerowych zachodzi transmisja takich mutacji do linii płciowej (8).

Możliwość analizy ekspresji wprowadzonych zmian, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, w zwierzętach chimerowych oraz w następnym pokoleniu, przyczyniły się do eksplozji badań nad działaniem genów i ich produktów w rozwoju zarodkowym myszy. Możliwa jest całkowita lub częściowa inaktywacja badanych genów, naprawa genów uszkodzonych, wywołanie ektopicznej ekspresji wybranych genów, mutacje części regulatorowych genów lub punktowe mutacje wybranych eksonów. Sterowana mutageneza nie jest jedynym sposobem badań genetycznych otwartym przez zastosowanie pierwotnych komórek zarodkowych. Często obecnie stosowana jest mutageneza insercyjna komórek ES, która oprócz możliwości mutowania, ułatwia izolowanie genów dzięki wykorzystaniu sekwencji wektorów jako znaczników.

2. Właściwości pierwotnych komórek zarodkowych

Pierwotne komórki zarodkowe są to pochodzące z wczesnych zarodków niezróżnicowane i niezdeteminowane rozwojowo komórki, które pomimo długotrwałej hodowli *in vitro* zachowują pełną zdolność do różnicowania we wszystkie rodzaje tkanek zarodkowych oraz ograniczoną do tworzenia tkanek pozazarodkowych, zarówno w hodowli jak i u zwierząt chimerowych. Pierwszym etapem otrzymywania pierwotnych komórek zarodkowych jest izolacja niezróżnicowanych komórek z zarodków przedimplantacyjnych. Oprócz normalnych blastocyst można stosować także blastocysty opóźnione (9), izolowane immunochirurgicznie węzły zarodkowe (10), zdezagregowane morule (11), a nawet pierwotne komórki płciowe (12). W naszym laboratorium blastocysty umieszczane są w szalkach na warstwie odżywczej tworzonej przez pojedynczą warstwę płodowych fibroblastów mysich (PMEF). Blastocysty osiadają na warstwie odżywczej i następuje intensywny rozrost trofoblastu oraz węzła zarodkowego. Po trzech, czterech dniach izolowane węzły zarodkowe, poddaje się dezagregacji i umieszcza ponownie na warstwie odżywczej. Po następnych siedmiu dniach widoczne są kolonie komórek, z których, po kilkakrotnym pasażowaniu (dezagregacja i posiew na świeżą warstwę odżywcza), otrzymujemy liczne kolonie komórek jednorodnych morfologicznie, oraz co ważniejsze — genetycznie. Pierwotne komórki zarodkowe dzielą się bardzo intensywnie i wymagają częstego pasażowania. Na tym etapie większość komórek jest zamrażana, a tylko niewielka część hodowana dalej w celu określenia kariotypu, zdolności do różnicowania, tworzenia chimer oraz do dalszych doświadczeń.

Komórki ES mogą być hodowane przez wiele pasażów w stanie niezróżnicowanym, z zachowaniem pluripotentnych właściwości, w warunkach zapobiegających różnicowaniu, np. przez zastosowanie inaktywowanych fibroblastów mysich tworzących warstwę odżywcza lub pewnych czynników wzrostowych — najczęściej stosowanym jest LIF — *leukemia inhibitory factor* (9,13). Jeżeli hodowane są bez stosowania tych czynników, lub dojdzie do nadmiernego zagęszczenia hodowli, ulegają spontanicznemu różnicowaniu w wiele typów komórek zarodkowych (14-16). Wykazano wpływ pewnych czynników, np. kwasu retinowego czy DMSO na różnicowanie komórek ES w określonych kierunkach (pochodne endo-, ekto- czy mezodermalne), jednak zastosowanie tych metod do badania indukowanego różnicowania *in vitro* nie jest jeszcze zaawansowane (16,17). Potwierdzono ostatnio przypuszczenia, że aktywność transkrypcyjna niezróżnicowanych komórek ES odpowiada w znacznym stopniu aktywności komórek węzła zarodkowego, a aktywowanie lub represja genów zachodząca podczas różnicowania *in vitro* odpowiada zachodzącym podczas wczesnej morfogenezy (18,19).

Potencje rozwojowe pierwotnych komórek zarodkowych określano na podstawie stopnia kolonizacji tkanek w chimerach. Myszy chimerowe tworzone są przez łączenie komórek ES z zarodkami przedimplantacyjnymi, np. iniekcję do blastocyst lub agregację z morulami (9). W trakcie rozwoju zarodkowego komórki ES wykazują duże potencje do włączania we wszystkie ro-

dzaje tkanek zarodkowych chimer, w tym także linii płciowej (5) oraz pewne upośledzenie we włączaniu w struktury pozazarodkowe (20). O pluripotencji, a nawet totipotencji, pierwotnych komórek zarodkowych świadczy także otrzymanie myszy całkowicie się z nich wywodzących (21,22). Zastanawiająca jest jednak wysoka śmiertelność, tuż po urodzeniu, myszy pochodzących całkowicie z komórek ES. Powody nie są jasne, być może w trakcie długotrwałej hodowli pierwotnych komórek zarodkowych następuje akumulacja genetycznych lub epigenetycznych zmian, które wpływają na przeżywalność zarodków. Jednak zastosowanie komórek pochodzących z wczesnych pasażi (21), oraz opracowanie nowych metod otrzymywania zwierząt wywodzących się z komórek ES (23,24, Grundland, dane nie publikowane) pozwala na ominięcie tej przeszkody w praktyce.

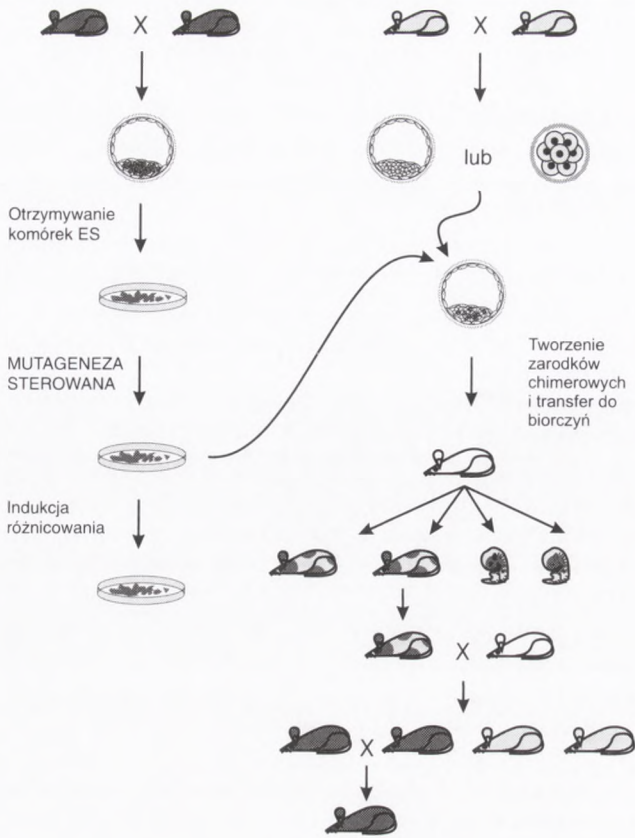
Pierwsze zaplanowane modyfikacje genomu pierwotnych komórek zarodkowych, z wykorzystaniem homologicznej rekombinacji, wprowadzono w zlokalizowanym na chromosomie X genie *Hprt* (6-8). Gen ten jest wyjątkowo dogodnym modelem ze względu na jego hemizygotyczność w komórkach męskich (XY), oraz możliwość selekcji jego ekspresji *in vitro*. Ważne było także wykazanie, że komórki ES ze zmienionym na drodze homologicznej rekombinacji genem *Hprt* biorą udział w tworzeniu linii płciowej w chimerach (8). Locus *Hprt* był następnie wykorzystywany w wielu pracowniach do określenia optymalnych parametrów sterowanej mutagenyzy pierwotnych komórek zarodkowych. Wykazano, że możliwe jest otrzymanie myszy, pochodzących całkowicie ze zmienionych genetycznie pierwotnych komórek zarodkowych, w sposób bezpośredni, lub też poprzez krzyżowanie potomstwa zwierząt chimerowych, w których komórki ES uczestniczyły w tworzeniu linii płciowej. Umożliwia to badanie wpływu wprowadzonych modyfikacji genetycznych, w myszach hetero- lub homozygotycznych dla badanej mutacji, na różne etapy embriogenezy.

3. Modyfikacje genetyczne komórek ES — zastosowanie w badaniach regulacji ekspresji oraz funkcji genów podczas embriogenezy

Istnieje obecnie kilka metod wykorzystujących pierwotne komórki zarodkowe do badań funkcjonowania genów podczas rozwoju zarodkowego. Stosowana strategia zależy od tego czy badamy rolę genu już znanego, czy też genów zaangażowanych w procesach wzrostu i różnicowania dopiero szukamy.

3.1. Mutageniza sterowana

Rozwój zarodkowy jest związany z postępującym różnicowaniem komórek, które jest skutkiem regulowanej, sekwencyjnej represji bądź ekspresji specyficznych genów, z których część to geny związane z funkcjonowaniem zróżnicowanych komórek, a część z procesem zwanym indukcją embrionalną.



Rys. 1. Mutageneza sterowana pierwotnych komórek zarodkowych.

Wpływ wprowadzonych, z zastosowaniem rekombinacji homologicznej, określonych modyfikacji genów na rozwój zarodkowy może być analizowany podczas różnicowania komórek ES *in vitro* (tworzenie kul zarodkowych — ang. *embryoid bodies*, lub indukcja różnicowania w wybrane typy komórek), lub *in vivo* podczas rozwoju zarodkowego myszy chimerowych i ich potomstwa.

Wszystkie Metazoa mają podobny system cząsteczek (ligandów) sygnałowych, receptorów i czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w procesach indukcji embrionalnej. Geny ważne w rozwoju są często ewolucyjnie konserwowane, stąd można stosować geny o znanej sekwencji, pochodzące z organizmów łatwiej poddających się analizie genetycznej, do poszukiwania ich odpowiedników u ssaków. Do tej pory wykazano występowanie wielu genów, a nawet rodzin (np. genów *Hox*, *POU*, *Pax*), homologicznych do biorących udział w kontroli rozwoju *Drosophila*, których ekspresja jest regulowana podczas rozwoju zarodkowego myszy (25-27). Jednakże często brak odpowiednich mutantów uniemożliwiał wykazanie wpływu poszczególnych genów na morfogenezę ssaków. Rozwój sterowanej mutagenezy genomu pierwotnych komórek zarodkowych zmienił tę sytuację radykalnie. Zastosowanie komórek ES i homologicznej rekombinacji umożliwiło otrzymanie mutacji wybranych

genów (26) oraz badanie efektów podczas rozwoju zarodkowego. W badaniach tych udowodniono m.in. podstawową rolę genów *Hox* w organizacji planu budowy ciała myszy, szczególnie wzoru segmentacji (27,28) i tworzenia kończyn (29). Podobne metody stosowane są do mutowania innych genów, których produkty zaangażowane są w różnych procesach komórkowych takich jak: adhezja komórkowa, regulacja cyklu komórkowego, działanie czynników wzrostowych, transdukcja sygnałów, działanie czynników transkrypcyjnych, a także indukcji różnicowania komórkowego, np. hematopoezy, miogenezy (30-32).

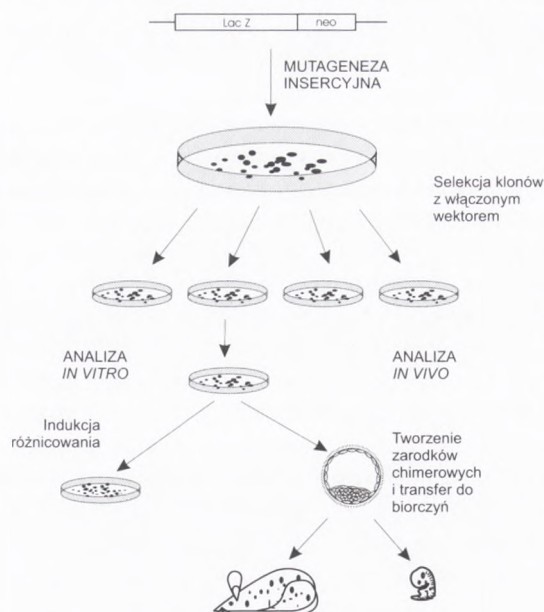
W doświadczeniach mających na celu poznanie roli genu o znanej sekwencji, tworzone są klony pierwotnych komórek zarodkowych noszących zaplanowane mutacje, dzięki zastosowaniu wektorów kierunkowych włączających się do genomu komórek w sposób homologiczny. Wektory kierunkowe (plazmidowe lub retrowirusowe), zawierające sekwencje komplementarne do badanego locus, mogą być zaplanowane do zastąpienia wybranego fragmentu genu lub do włączenia w określone miejsce. Transfekcję komórek ES przeprowadza się najczęściej przez zakażanie retrowirusami lub elektroporację. Możliwa jest, za pomocą odpowiednich pożywek, selekcja komórek, w których wprowadzone zostały zaplanowane modyfikacje, oraz namnożenie ich do dalszych badań. Tak zmienione, wyselekcjonowane klony pierwotnych komórek zarodkowych można następnie stosować do badania ekspresji genów w komórkach nieodróżnionych, zmian ekspresji po indukcji różnicowania *in vitro* oraz *in vivo*, a także do badania efektów fenotypowych mutacji w uzyskanych, heterozygotycznych lub homozygotycznych, zwierzętach transgenicznych.

Duże zainteresowanie wzbudza zastosowanie pierwotnych komórek zarodkowych do homologicznego włączania recesywnych mutacji powodujących utratę funkcji badanych genów. W opracowanych najwcześniej metodach (33) endogenne allele są rozcinane przez włączenie wektorów noszących markery selekcyjne (np. gen oporności na neomycynę) do sekwencji kodujących. Klony noszące zaplanowane zmiany można wyselekcjonować stosując konstrukcje genowe bez promotora (34) lub selekcję pozytywno-negatywną (35), a potwierdzenie homologii włączenia za pomocą hybrydyzacji metodą Southerna. Całkowita inaktywacja genów biorących udział w regulacji rozwoju zarodkowego czyli *knock out* jest często letalna już we wczesnych etapach rozwoju i w związku z tym niemożliwe jest zastosowanie tej metody do badania wpływu zakłóceń ekspresji genu na kolejne stadia morfogenezy. Pomoc w tym może rozwój metod wykorzystujących rekombinację homologiczną do wprowadzania mutacji częściowo zakłócających ekspresję badanego genu. Przykładem takiego podejścia może być badanie funkcji protoonkogenu jądrowego *N-myc* (36), który ulega ekspresji w wielu liniach komórkowych podczas mysiej embriogenezy. Po uzyskaniu mutacji inaktywującej ten gen (37) okazało się, że myszy homozygotyczne obumierały około 9-10 dnia rozwoju, w stadium trudnym do określenia efektów działania mutacji. Utworzono zatem zmutowane linie pierwotnych komórek zarodkowych, w których gen *neo* był włączony do pierwszego intronu *N-myc*. Umożliwiło to tworzenie normalnego

transkryptu *N-myc*, jeżeli wycinany był intron zawierający gen *neo*. Analiza poziomu ekspresji *N-myc* wykazała obecność 15-50% poziomu normalnego transkryptu. Porównanie rozwoju myszy homozygotycznych dla tej mutacji, oraz heterozygotycznych noszących obie mutacje, wykazały wpływ genu *N-myc* m.in. na proliferację komórek, rozwój serca oraz płuc.

Zastosowana strategia umożliwiła ujawnienie funkcji produktu genu *N-myc* w różnych stadiach rozwojowych, jednakże włączanie wektora w sekwencje niekodujące nie gwarantuje powstawania mutacji przydatnych do tego typu badań. Obecnie, możliwe jest tworzenie klonów pierwotnych komórek zarodkowych noszących specyficzne, punktowe mutacje sekwencji kodujących, które mogą pomóc w poznaniu funkcji poszczególnych domen białkowych, oraz mutacje sekwencji regulatorowych, które wpływają na zmiany wzoru ekspresji genów. Możliwe jest też wpływanie na poziom ekspresji przez włączenie dodatkowych kopii genu, czy też wywołanie ekspresji w miejscach nietypowych, przez połączenie z silnym promotorem genu ulegającego ekspresji w wybranych rodzajach komórek lub tkanek w uzyskanych zwierzętach transgenicznym. Opracowano także metodę mutowania pierwotnych komórek zarodkowych w wybranym *locus* bez włączania sekwencji selekcyjnych, których obecność może zakłócać ekspresję, z zastosowaniem wektorów nazywanych *hit and run* lub *in — out* (38,39). Wektory takie zawierają pozytywny i negatywny marker selekcyjny oraz mutację, którą chcemy wstawić do genomu komórki. Selekcja pozostawia takie komórki, w których wektor „wyrekombinował” z genu pozostawiając mutację. Podobnie, zastosowanie specyficznych, pochodzących z drożdży, rekombinaz w komórkach ES (40) może ułatwić eliminowanie genów markerowych jeżeli są one oflankowane odpowiednimi sekwencjami.

Analiza fenotypowych efektów otrzymanych mutacji komórek ES pozwala określić wzór ekspresji poszczególnych genów oraz funkcje genów związanych z rozwojem zarodkowym. W wielu jednak przypadkach ekspresja genu w danym typie komórek nie jest skorelowana z funkcjonowaniem jego produktu. Przykładem może być gen kodujący LEF-1 (*lymphoid enhancer factor 1*), którego unieczynnienie zakłóca rozwój organów wymagających indukcji nabłonkowo-mezenchymatycznej, a jednocześnie nie zakłóca rozwoju innych organów, w których także następuje ekspresja tego genu. Możliwym wytłumaczeniem jest hipoteza w której zakłada się, że zbędna ekspresja niektórych genów jest tolerowana dopóki nie jest szkodliwa. Ze względów ekonomicznych jest to bardziej właściwe niż tworzenie dodatkowych mechanizmów kontrolnych (41). Innym powodem braku fenotypowych efektów mutacji genu może być ekspresja innych genów, których produkty spełniają podobne fizjologiczne funkcje (ang. *functional redundancy*, por. 42). Przykładem mogą być *Myo-D* i *Myf-5*, należące do rodziny czynników transkrypcyjnych kierujących rozwojem mięśni szkieletowych. Myszy, ze znokautowanym genem kodującym jeden z tych czynników, nie wykazują żadnych anomalii, a dopiero uszkodzenie obu genów powoduje całkowity brak rozwoju mięśni szkieletowych. Wyniki te sugerują, że *Myf-5* i *Myo-D* mogą samodzielnie kierować rozwojem mięśni szkieletowych, co może być potwierdzeniem hipotezy funkcjonalnego nadmiaru niektórych genów (43).



Rys. 2. Mutageneza insercyjna pierwotnych komórek zarodkowych.

Komórki ES, w których nastąpiło włączenie wektora do genomu są selekcjonowane. „Złapane” geny są klonowane i identyfikowane, a konsekwencje ich mutacji badane podczas różnicowania *in vitro* oraz *in vivo* podczas rozwoju zarodkowego.

3.2. Mutageneza insercyjna

Sterowana mutageneza umożliwia badanie roli genów o znanej sekwencji, jednak nie wszystkie geny aktywne w embriogenezie są dostępne w postaci sklonowanych produktów. Ważne jest zatem szukanie nowych genów i mutacji wpływających na poszczególne etapy morfogenezy. W organizmach takich jak *Drosophila* prowadzone są na dużą skalę poszukiwania nowych mutacji z zastosowaniem chemicznych mutagenów. W przypadku myszy rozmiary zwierząt oraz ograniczona liczba potomstwa czyni taką metodę zbyt powolną i drogą. Uwaga badaczy jest zatem skierowana na mutagenezę typu insercyjnego, która ma tę zaletę, że wstawiona sekwencja DNA może być identyfikatorem dla klonowania zmutowanych genów (strategia pułapek genowych).

Istnieje wiele metod indukcji mutacji insercyjnych u myszy, np. infekcja zarodków retrowirusami (44) czy mikroiniekcja DNA do zygoty (45). Jednak zastosowanie pierwotnych komórek zarodkowych do poszukiwania genów aktywnych podczas rozwoju zarodkowego znacznie usprawniło tę metodę i umożliwiło identyfikację wielu nowych mutacji rozwojowych (46). Hodowane pierwotne komórki zarodkowe transfekowane są wektorami plazmidowymi lub retrowirusowymi, które włączając się w sekwencje różnych genów zakłócają ich funkcjonowanie. Wykorzystywane są trzy zasadnicze typy wektorów,

które zawierają sekwencje umożliwiające preselekcję integracji w genach ulegających ekspresji w komórkach ES (np. *neo*), a także ich wizualizację (np. *lacZ*).

Wektory typu *enhancer-trap* zawierają gen *lacZ* pod kontrolą słabego promotora (47). Integracja nie zawsze zachodzi w sekwencjach transkrybowanych, dlatego też nie musi być mutageniczna, a ekspresja *lacZ* nie pokrywa się z wzorem ekspresji genów w pierwotnych komórkach zarodkowych.

Wektory typu *gene-trap* lub *promotor-trap* nie zawierają promotora, dlatego też aktywacja genu *lacZ* zachodzi, gdy integracja miała miejsce w obrębie sekwencji transkrybowanych. Oba rodzaje wektorów mogą powodować rozerwanie genów stąd są wysoce mutageniczne (48-50). Jeżeli wektor-pułapka zostanie włączony do aktywnego genu we właściwej fazie odczytu, powstaje połączony transkrypt zawierający sekwencje genu „złapanego” oraz genu markerowego *lacZ*. Są trzy ważne konsekwencje takich połączeń: 1) ekspresja *lacZ* jest regulowana przez sekwencje regulatorowe złapanego genu; 2) złapani gen może być sklonowany z zastosowaniem metod inżynierii genetycznej, 3) taka insercja jest potencjalnie mutageniczna i jej biologiczne konsekwencje mogą być analizowane w zwierzętach chimerowych, a także w następnych pokoleniach po transmisji do linii płciowej. Wymienione czynniki wskazują, że wektory te są bardzo efektywnym sposobem na mutowanie i identyfikację nieznanymi genów ulegających ekspresji podczas rozwoju zarodkowego. Z zastosowaniem strategii pułapek genowych może być uszkodzona większość genów ulegających ekspresji w komórce, zarówno genów ulegających ekspresji we wszystkich typach komórek, jak i specyficznych — odpowiedzialnych za utrzymanie stanu pluripotencji lub biorących udział w regulacji różnicowania. Dodatkowo komórki, w których następuje ekspresja genu reporterowego pod kontrolą naturalnego promotora genu, mogą być stosowane do badań czynników regulujących transkrypcję.

Scherer i wsp. (18) badali specyfikę ekspresji genów w pierwotnych komórkach zarodkowych podczas hodowli *in vitro* oraz wczesnej embriogenezy. Komórki ES infekowano wektorem retrowirusowym zawierającym gen *neo* oraz gen *lacZ*. Komórki, w których nastąpiła integracja wektora powodująca rozerwanie sekwencji ulegających ekspresji genów komórkowych, były selekcionowane w obecności antybiotyku G418. Klony pierwotnych komórek zarodkowych, z regulowaną ekspresją włączonego wektora, były identyfikowane przez zmianę poziomu barwienia X-gal podczas różnicowania *in vitro*. Wiele z testowanych linii komórek wykazywało regulowaną ekspresję, a część z nich przeszło do linii płciowej tworzonych chimer i ekspresja zmutowanych genów była analizowana *in vivo*. W każdym przypadku geny „złapanie” w hodowanych komórkach ES ulegały także ekspresji w ICM przedimplantacyjnych zarodków, a zmiany poziomu ekspresji *lacZ* podczas różnicowania *in vitro* były analogiczne do obserwowanych podczas wczesnego rozwoju. Potwierdziło to hipotezę, że pierwotne komórki zarodkowe wykazują specyfikę transkrypcyjną zbliżoną do pluripotentnych komórek z zarodków przedimplantacyjnych. Preselekcja *in vitro* klonów zmutowanych komórek ES umożliwia szybszą i dokładniejszą identyfikację integracji wektorów w genach aktywnych

we wczesnych etapach rozwoju zarodkowego, co znacznie ułatwia dalsze badania *in vivo*.

W dotychczasowych badaniach potwierdzono, że „złapane w pułapkę” geny aktywne w pierwotnych komórkach zarodkowych ulegają ekspresji nie w wyniku zastosowanych warunków hodowli, czy z powodu rozprzestrzenionej demetylacji w genomie pierwotnych komórek zarodkowych, lecz są to geny kodujące cząsteczki wymagane do oddziaływań międzykomórkowych, transdukcji sygnałów, czy kontroli transkrypcji podczas wczesnej embriogenezy. Wyniki te stwarzają podstawę badań *in vitro* mających na celu identyfikację genów aktywnych w rozwoju zarodkowym. Jeżeli rozwinięte zostaną metody kontroli różnicowania komórek ES w poszczególne typy komórek, podobne sposoby można zastosować do genetycznej analizy specyficznych procesów morfogenetycznych. Przykładem może być zastosowanie kwasu retinowego (RA) do badań regulacji wzoru ekspresji podczas embriogenezy (19). Stosując *lacZ* do preselekcji integracji w genach zaangażowanych w odpowiedzi na indukcję RA, zidentyfikowano integracje w wielu genach, z których część była indukowana, a część ulegała represji po zadziałaniu kwasem retinowym. Prawie wszystkie wykazywały czasowo lub przestrzennie specyficzny wzór ekspresji pomiędzy 8,5 a 11,5 dniem embriogenezy. Co więcej, obserwowana ekspresja zachodziła w tkankach, które są naturalnie wrażliwe na zmiany poziomu RA podczas rozwoju.

Zdarzenia, zachodzące podczas wczesnego rozwoju ssaków, były dotychczas trudne do analizowania z powodu kłopotów jakie stwarza badanie zarodków implantowanych. W związku z tym, zastosowanie mysich pierwotnych komórek zarodkowych, indukowanych do różnicowania *in vitro*, jako modelu do badania wczesnego rozwoju stwarza nowe perspektywy przed badaczami zjawisk zachodzących podczas wczesnej embriogenezy. Komórki ES mogą być także stosowane do badań molekularnych determinantów stanu pluripotencji i totipotencji (a także stanu immortalizacji komórek niezróżnicowanych) oraz procesów, w których wczesne, niezdefiniowane rozwojowo komórki nabywają kompetencji do specyficznych programów różnicowania podczas rozwoju zarodkowego.

Literatura

1. Martin G. R., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 7634-7638.
2. Evans M. J., Kaufman M. H., (1981), *Nature, Lond.*, 292, 154-156.
3. Smithies O., Gregg R. G., Boggs S. S., Kowaleski M. A., Kucherlapati R., (1985), *Nature, Lond.*, 317, 230-234.
4. Thomas K. R., Folger K. R., Capecchi M. R., (1989), *Cell*, 44, 419-428.
5. Bradley A., Evans M., Kaufman M. H., (1984), *Nature, Lond.*, 309, 255-256.
6. Thomas K. R., Capecchi M. R., (1987), *Cell*, 51, 503-512.
7. Doetschman T., Maeda N., Smithies O., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8583-8587.
8. Thompson S., Clarke A. R., Pow A. M., Hooper M. L., Melton D. W., (1989), *Cell*, 56, 313-321.
9. Robertson E. J., (1987), *Embryo-derived stem cell lines*, in: *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells*, Ed. Robertson E. J., Oxford, Washington, IRL Press, 71-112.

10. Tokunaga T., Tsunoda Y., (1989), *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 35, 173-178.
11. Eistretter H. R., (1989), *Develop. Growth & Differ.*, 31, 275-282.
12. Matsui Y., Zsebo K., Hogan B. L. M., (1992), *Cell*, 70, 841-847.
13. Smith A. G., Heath J. K., Donaldson D. D., Wong G. G., Moreau J., Stahl M., Rogers D., (1988), *Nature, Lond.*, 336, 688-690.
14. Doetschman T. G., Eistetter M., Katz M., Schmidt W., Kemler R., (1985), *J. Embryol. Exp. Morph.*, 87, 27-45.
15. Sanchez A., Jones W. K., Gulick J., Doetschman T., Robbis J., (1991), *J. Biol. Chem.*, 266, 22419-22426.
16. Chen U., (1993), *Dev. Immunol.*, 2, 29-50.
17. Chen U., Kosco M., (1992), *Dev. Dynam.*, 197, 217-226.
18. Scherer Ch. A., Jin Ch., Nachabeh A., Hopkins N., Ruley H. R., (1996), *Cell Growth & Differ.*, 7, 1393-1401.
19. Forrester L. M., Nagy A., Sam M., Watt A., Stevenson L., Bernstein A., Joyner A. L., Wurst W., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 1677-1682.
20. Beddington R. S. P., Robertson E. J., (1989), *Development*, 105, 733-737.
21. Nagy A., Gocza E., Diaz E. M., Prideaux V. R., Jvanyi E., Markkula M., Rossant J., (1990), *Development*, 110, 815-821.
22. Modliński J. A., Reed M., Wagner T. E., Dishong S., Modlińska M. K., (1993), *Animal Science Papers and Reports*, 11, 135-139.
23. Wang Z.-Q., Kifer F., Urbanek P., Wagner E. F., (1997), *Mechanisms of Development*, 62, 137-145.
24. Khillan J. S., Bao Y., (1997), *BioTechniques*, 22, 544-549.
25. Babinet C., (1997), *Transgenic strategies for the study of mouse development*, in: *Transgenic Animals*, Ed. Houdebine L. M., Horwood Academic Publishers, 371-386.
26. Kessel M., Gruss P., (1990), *Science*, 249, 374-379.
27. Krumlauf R., (1994), *Cell*, 78, 191-201.
28. Wilkinson D. G., (1993), *BioEssays*, 15, 499-505.
29. Duboule D., (1994), *Science*, 266, 575-576.
30. Brem G., (1993), *Transgenic Animals*, in: *Genetic Engineering of Animals*, Ed. Puhler A. VCH, Weinheim, New York, 98-103.
31. Pedersen R. A., (1994), *Reprod. Fertil. Dev.*, 6, 543-552.
32. Bradley A., Hasty P., Davis A., Ramirez-Solis R., (1992), *Biotechnology*, 10, 534-539.
33. Capecchi M. R., (1989), *Science*, 244, 1288-1292.
34. Te Riele H., Maandag E. R., Clarke A., Hooper M., Berns A., (1990), *Nature, Lond.*, 348, 649-651.
35. Mansour S. L., Thomas K. R., Capecchi M. R., (1988), *Nature, Lond.*, 336, 348-352.
36. Bernolt-Moens C., Auerbach B. A., Conlon R. A., Joyner A. L., Rossant J., (1992), *Genes Dev.*, 6, 691-704.
37. Charron J., Malynn B. A., Roberson E. J., Goff S. P., Alt F. W., (1990), *Molec. Cell Biol.*, 10, 1799-1804.
38. Hasty P., Ramirez-Solis R., Krumlauf R., Bradley A., (1991), *Nature, Lond.*, 350, 243-246.
39. Valancius U., Smithies O., (1991), *Molec. Cell Biol.*, 11, 1402-1408.
40. O'Gorman S., Fox D. T., Wahl G. M., (1991), *Science Wash.*, 251, 1351-1355.
41. Erickson H. P., (1993), *J. Cell Biol.*, 120, 1079-1081.
42. Thomas J. H., (1993), *Trends Genet.*, 9, 395-399.
43. Rudnicki M. A., Schnegelsberg P. N., Stead R. H., Broun T., Arnold H. H., Jaenisch R., (1993), *Cell*, 75, 1351-1359.
44. Jaenisch R., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 1260-1264.
45. Jaenisch R., (1988), *Science*, 240, 1468-1674.
46. Conlon F. L., Barth K. S., Robertson E. J., (1991), *Development*, 111, 969-981.
47. Gossler A., Joyner A. L., Rossant J., Skarnes W. C., (1989), *Science*, 244, 463-465.
48. Friedrich G., Soriano P., (1991), *Genes Dev.*, 5, 1513-1523.
49. von Melchner H., de Gregori J. V., Rayburn H., Reddy S., Friedel C., Ruley H. E., (1992), *Genes Dev.*, 6, 919-927.

50. Skarres W. C., Auerbach B. A., Joyner A. L., (1992), *Genes Dev.*, 6, 903-918.

Mutagenesis of mouse embryonic stem (ES) cells

Summary

Embryonic stem (ES) cells derived from preimplantation mouse embryo provide a powerful tool for genome manipulation in mammals. The two principal genetic approaches are used to modify genomes of embryonic stem cells, which may be introduced into blastocyst to produce chimeras, and these animals transmit the genetic alteration into the next generation. One approach, targeted mutagenesis, is designed to disrupt the function of specific murine genes that are known by their homology to genes of other organisms. The other approach, gene trapping by randomly insertional mutagenesis, is designed to identify novel, developmentally regulated genes in mouse embryos. *In vivo* screens allow for the identification and studying of genes that are expressed either within specific tissue or in spatiotemporal patterns. As an alternative to *in vivo* gene study, gene expression within specific cell types may be monitored in different ES cell cultures.

Key words:

embryonic stem cells, genome manipulation, development, gene expression.

Adres do korespondencji:

Celina Grundland, Zakład Embriologii Doświadczalnej, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec.