

Pierwotne komórki zarodkowe myszy — narzędzie klonowania ssaków

Jolanta Karasiewicz

Jacek A. Modliński

Zakład Embriologii Doświadczalnej
Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN
Jastrzębiec

1. Liczebność klonów ssaków

Klonowanie ssaków jest właściwie klonowaniem zarodków ssaków: polega na otrzymywaniu identycznych genetycznie osobników wywodzących się z jednego zarodka.

Dawcą klonu może być cały zarodek. Ma to miejsce przy stosowaniu techniki dzielenia zarodka w stadium moruli lub blastocysty, co prowadzi do urodzenia bliźniąt, z których każde powstało z około połowy komórek zarodka. Przy technice izolacji blastomerów, każda komórka zarodka (blastomer) daje początek jednemu z monozygotycznych wieloraczków. Z racji znacznie ograniczonych możliwości rozwojowych coraz mniejszych blastomerów, ich liczba nie przekracza pięciu. (Dokładny opis i dyskusja nad stosowaniem tych metod, a także techniki reagregacji blastomerów były już publikowane w języku polskim) (1,2).

Przy zastosowaniu techniki transplantacji jąder, nie cały zarodek, a tylko jądra komórkowe zarodka są wspólne dla klonu wieloraczków. Cytoplazma pochodzi od biorców, którymi są najczęściej wyjądrzone oocyty lub blastomery dwukomórkowego zarodka. W dotychczasowych próbach udaje się wykorzystać jako dawców jąder zarodki liczące do 32 komórek. (Zarodki o większej

* (ESC) *embryonal stem cells*. W polskim żargonie paranaukowym określane jako „komórki stem”, a nawet „stim”. W języku angielskim umieszczane są w indeksach (np. *Current Contents Life Science*) pod hasłem „stem cells”, dzięki czemu współwystępują z innymi komórkami macierzystymi, a w szczególności komórkami macierzystymi układu krwiotwórczego i nader często bywają z nimi mylone.

Embryonal stem cells otrzymały polską nazwę „zarodkowe komórki pnia”. Termin ten proponujemy zastąpić nazwą „pierwotne komórki zarodkowe”. Nazwa ta nawiązuje do funkcjonującego terminu „pierwotne komórki płciowe” oznaczającego „komórki, z których powstają — wszystkie, i tylko — komórki płciowe”.

liczbie komórek są już zróżnicowane na węzeł zarodkowy i trofoblast; jako dawcy jąder mogą służyć tylko komórki węzła.) Nawet gdyby udało się wykorzystać jądra wszystkich komórek jednego zarodka — co z powodów metodycznych jest trudno osiągalne u bydła i owcy, a z powodów zasadniczych jest niemożliwe u myszy — to i tak klon ssaków miałby tylko 32 osobniki. Spośród technik klonowania ssaków właśnie technika transplantacji jąder jest obecnie najbardziej badana i rozwijana. W centrum uwagi znajdują się szczegółowe zagadnienia teoretyczne i metodyczne: synchronia między biorcą i wprowadzonym jądrem, zapewnienie prawidłowego rozwoju rekonstruowanych zarodków, itp. Istnieją już publikacje w języku polskim (3,5).

Drogą do masowej produkcji identycznych zarodków ssaków jest zwiększenie liczby dostępnych komórek zarodkowych (dawców klonu) ponad liczbę komórek obecnych w zarodku. Obecnie jest to możliwe tylko w odniesieniu do myszy. U tego gatunku udaje się spowodować, że zdolne do tworzenia klonów komórki węzła zarodkowego blastocysty masowo mnożą się w hodowli *in vitro*, osiągając liczby typowe dla linii komórkowych i sięgające milionów na szalkę. Takie „pierwotne komórki zarodkowe” można następnie wykorzystać zarówno do klonowania metodą transplantacji ich jąder do biorców (3,4,5), metodą klonowania chimerowego (6), jak budowania z nich całych zarodków (5).

Mimo pewnych ograniczeń, zastosowanie pierwotnych komórek zarodkowych do klonowania ssaków (myszy) zapewnia teoretycznie nieograniczoną liczbę osobników klonu.

2. Otrzymywanie pierwotnych komórek zarodkowych myszy z blastocyst

Pierwotne komórki zarodkowe myszy (PKZ) powstają w ten sposób, że zarodek lub jego część umieszcza się w hodowli *in vitro*, zapewniając określone jej warunki. W takiej sztucznie stworzonej sytuacji nie następuje kontynuacja normalnego rozwoju zarodka, lecz proliferacja niektórych jego komórek w kontakcie z podłożem hodowlanym. Namnożone komórki — przynajmniej w typowej sytuacji otrzymywania PKZ z blastocyst — tworzą zwartą bryłkę widoczną pod binokulem. Należy ją zdjąć mechanicznie z podłoża hodowlanego i przez trawienie enzymatyczne i pipetowanie spowodować jej rozdzielenie na pojedyncze komórki. Powstała zawiesina komórek ponownie umieszczona w hodowli tworzy, w wyniku proliferacji, nowe „bryłki” czyli ogniska czy skupienia komórek. Po kilku rozdzieleniach na pojedyncze komórki i przeniesieniach na nowe podłoże hodowlane („pasażach”), uzyskuje się liczne, rozległe ogniska PKZ.

W obu pionierskich pracach wprowadzających metodę otrzymywania PKZ myszy, podane są szczególne warunki hodowli, jakie trzeba stworzyć zarodkom, żeby otrzymać PKZ. Evans i Kaufman (7) zastosowali warstwę odżywczą, a Martin (8) zastosowała pożywkę uwarunkowaną przez komórki rosnące *in vi-*

tro. Znacznie później wyjaśniono dlaczego te warunki przyczyniają się do powstania PKZ. Warstwa odżywcza to jednowarstwowa hodowla komórek (u Evansa i Kaufmana — mysich fibroblastów STO), które inaktywowano, tzn. uniemożliwiano im syntezę DNA i proliferację. Komórki takie przez kilkanaście dni utrzymują się *in vitro*, zachowując wiele funkcji, np. produkcję i wydzielanie czynników wzrostowych. Właśnie czynniki wzrostowe, a w szczególności LIF (ang. *leukemia inhibitory factor* — czynnik przeciwbiałaczkowy) jest niezbędny do powstawania PKZ z blastocyst myszy. Wykazano to, otrzymując PKZ bez warstwy odżywczej, tylko w obecności czynnika przeciwbiałaczkowego (9,10). Jednak w praktyce warstwy odżywcze nadal są używane (11) i zalecane (12).

Drugi sposób wprowadzenia czynników wzrostowych, ten zastosowany przez Martin (8), polega na dodaniu do hodowli blastocyst pożywki uwarunkowanej przez komórki hodowane *in vitro*. Kiedy komórki pokryją całe dno naczynia (osiągną „konfluencję”) dodaje się do nich świeżą pożywkę, którą po dobie (lub później) zbiera się jako „uwarunkowaną”, tzn. zawierającą czynniki wydzielone przez komórki. Martin (8) wykorzystwała komórki mysiej teratocarcinomy; w najnowszym poradniku metodycznym (13) zaleca się komórki 5637, ludzkiego raka pęcherza.

Wydaje się, że dobór warstw odżywczych, pożywek uwarunkowanych lub czynników wzrostowych bezpośrednio dodawanych do pożywki, w największym stopniu wpływa na skuteczność otrzymywania linii PKZ. Same pożywki są formami zmodyfikowanej przez Dulbecco pożywki minimalnej (ang. *Dulbecco modified essential medium* — DMEM) z dodatkami aminokwasów lub nukleotydów oraz płodowej surowicy cielęcej.

Oprócz warunków stworzonych *in vitro*, wpływ na efektywność otrzymywania linii PKZ mają właściwości samych blastocyst. Uważa się, za Robertson (14), że blastocysty powinny być opóźnione, tzn. zahamowane w rozwoju zarodkowym (różnicowanie węzła zarodkowego i trofoblastu) bez spowolnienia podziałów komórek. Osiąga się to wykonując dawczyni blastocyst obustronną owariektomię i podając analog progesteronu, a następnie wypłukując blastocysty dwa dni później niż normalnie. Drugim czynnikiem decydującym o otrzymywaniu PKZ jest przynależność szczepowa blastocyst. Blastocysty różnych szczepów tworzą linie PKZ z różną częstością i o nieco różnej morfologii (11).

Od czasu uzyskania PKZ myszy z blastocyst w 1981 r., opisano otrzymywanie PKZ z izolowanych węzłów zarodkowych (15), a nawet z morul (16).

3. Ograniczenia użyteczności pierwotnych komórek zarodkowych do klonowania

Mysie PKZ są liniami komórkowymi, tzn. są nieśmiertelne i mogą bez ograniczeń proliferować *in vitro*, zachowując swoje właściwości (w tym także kariotyp). Istnieją wszakże odstępstwa od tej charakterystyki: PKZ względnie często podlegają mutacjom chromosomowym, a jedna z ich właściwości, mia-

nowicie totipotencja, jak się wydaje, jest ograniczona do wcześniejszych pasażów lub tylko niektórych podlinii danej linii.

Częstość mutacji chromosomowych wymaga od badaczy regularnego sprawdzania kariotypu posiadanych linii, a w przypadku stwierdzenia odstępstw od charakterystycznej dla myszy liczby 40 chromosomów — pozostaje pozyskiwanie nowych linii lub samodzielna ich produkcja.

Drugie ograniczenie ma bardziej zasadniczy charakter. Okazało się mianowicie, że zarodki utworzone eksperymentalnie z PKZ niskich pasażów (do czternastego) rozwijają się, rodzą i przeżywają, natomiast te z PKZ wyższych pasażów nie przeżywają po urodzeniu (17). Sugerowałoby to, że w trakcie hodowli *in vitro* PKZ jednak tracą totipotencję, a zatem przydatność do tworzenia klonów. Gdyby tak było, to wymagałoby to częstszego zakładania nowych linii PKZ niż początkowo sądzono. Istnieje jednak drugie możliwe wyjaśnienie różnic w przeżywalności myszy urodzonych z zarodków sztucznie utworzonych z PKZ różnych pasażów. W opisywanych badaniach Nagy'a (17), z jednej z użytych linii PKZ wyodrębniono podlinię, z której jedna zachowywała totipotencję do dwudziestego czwartego pasażu. Może zatem linie PKZ są mieszaniną podlinii o różnej wrażliwości na utratę totipotencji (a jej spadek po czternastym pasażu w całej linii odzwierciedla tylko selekcję podlinii bardziej wrażliwych). Gdyby tak było, to zamiast linii PKZ do klonowania powinno się używać izolowanych, przetestowanych pod kątem totipotencji, podlinii PKZ.

4. Pierwotne komórki zarodkowe myszy uzyskane z pierwotnych komórek płciowych

Odkrycie to i zastosowana metodyka wynikły z badania szczegółowych problemów embriologicznych, związanych z pochodzeniem i rozwojem linii płciowej u myszy (18). Jednak w swej końcowej postaci (19,20) cytowane badania dostarczyły metody otrzymywania PKZ myszy, będącej jakby logiczną kontynuacją omawianych poprzednio.

Tak jak już wspomniano, źródłem PKZ jest proliferacja niektórych komórek zarodka, który umieszczony w określonych warunkach hodowli nie zachowuje się jak w normalnym rozwoju. W metodzie tej, zarodek jest o pięć dni starszy niż blastocysta, jest od niej ok. 200 razy większy, i wygląda jak zarodek nawet dla laika (fałdy główne, cewka nerwowa, kilka somitów, jelito przednie i tylne). Ogonową część takich zarodków odcina się igłą szklaną, umieszcza w roztworze enzymu i następnie pipetuje w celu rozdzielenia na pojedyncze komórki. Tak otrzymaną zawiesinę umieszcza się na warstwie odżywczej w obecności czynników wzrostowych i hoduje do uzyskania skupisk komórek. Po kilku pasażach namnożone komórki mają właściwości PKZ, a w szczególności w chimerach tworzą funkcjonalne gamety (21).

Na podstawie pozytywnej reakcji na obecność fosfatazy zasadowej, enzymu typowego dla obecnych w tylnej części zarodków komórek zwanych pierwotnymi komórkami płciowymi, uważa się otrzymane PKZ za powstałe z pier-

wotnych komórek płciowych. Twórcy i komentatorzy metody na określenie komórek wyhodowanych z pierwotnych komórek płciowych używają terminu *embryonal germ cells* (w odróżnieniu od wyhodowanych z blastocyst *embryonal stem cells*). W języku polskim proponujemy stosować pojemny termin pierwotne komórki zarodkowe dla obu form.

Zawiesinę z tylnych części zarodków hoduje się na warstwach odżywczych (mysie fibroblasty STO) w obecności czynnika przeciwbiałaczkowego, identycznie jak przy hodowli PKZ z blastocyst. Podobne są również pożywki hodowlane. Dodatkowo potrzebne są, dla podtrzymania proliferacji pierwotnych komórek płciowych, dwa inne czynniki wzrostowe: komórek macierzystych (ang. *stem cell factor*) i zasadowy czynnik wzrostowy fibroblastów (ang. *basic fibroblast growth factor*).

Jeżeli metoda okaże się bardziej efektywna niż ta z blastocyst lub jeśli otrzymane PKZ będą bardziej stabilne jako linia komórkowa niż te z blastocyst, to nowa metoda ma szansę wyprzedzić poprzednią. Tymczasem, otrzymywanie PKZ z pierwotnych komórek płciowych wymaga nieco większego doświadczenia embriologicznego niż oryginalna metoda.

W naszym laboratorium podejmujemy wstępne próby otrzymania PKZ z pierwotnych komórek płciowych myszy.

5. Otrzymywanie PKZ u innych drobnych ssaków

Od czasu uzyskania w 1981 r. PKZ z blastocyst myszy, trwają próby powtórzenia procedury u innych gatunków. Prawdopodobnie udało się to u chomika (22), gdzie uwiarygodniono tożsamość PKZ przez otrzymanie chimer, oraz u szczura (23), ze względu na ogromne podobieństwo rozwoju zarodkowego myszy i szczura, a zatem nieomal identyczną sytuację wyjściową do otrzymywania PKZ. Doniesienia o otrzymaniu PKZ u norki amerykańskiej (24,25) i królika (26) oczekują uwiarygodnienia przez tworzenie chimer.

6. Otrzymywanie PKZ zwierząt gospodarskich

Opublikowano już wiele prac, których autorzy sugerują, że otrzymali PKZ bydła (27), owcy (28-30), świni (28,29,31,32). Ostrożniejsi autorzy nazywają otrzymane przez siebie komórki „ESC-like”, czyli „podobne do PKZ”. Nie doniesiono o zdolności którychkolwiek z nich do tworzenia chimer. Generalnie, w wymienionych publikacjach niewiele jest informacji na temat przebiegu prowadzonych hodowli w czasie, a w szczególności morfologii proliferujących komórek. Jednak można pokusić się o syntezę: komórki o pożądanej morfologii najczęściej przestają się dzielić („stopniowo zanikają”) (28), a te które masowo proliferują — nie są pierwotnymi komórkami zarodkowymi (przeważnie są to komórki nabłonkowe).

Otrzymanie PKZ zwierząt gospodarskich pozostaje zatem sprawą otwartą.

7. Próby otrzymywania PKZ owcy: badania własne

W ciągu ostatnich czterech lat podejmowaliśmy kolejne próby uzyskania PKZ owcy. Początkowo używano 7-dniowych blastocyst i izolowanych z nich węzłów zarodkowych. Kolejno, używano węzłów i tarczki zarodkowych odcinanych z 10- do 12-dniowych blastocyst. Obecnie (w nawiązaniu do metody otrzymywania PKZ z pierwotnych komórek płciowych myszy) hodowana jest zawiesina części ogonowych 15-dniowych (kilkusomitowych) zarodków.

Stosowane warstwy odżywcze obejmowały: fibroblasty zarodkowe owcy, fibroblasty STO myszy oraz STO wzbogacone komórkami Sl/m220 (zawierającymi błonową formę czynnika komórek macierzystych).

Liczbę używanych czynników wzrostowych coraz bardziej zwiększano, aż do stosowanych w obecnej wersji: rekombinacyjny myszy czynnik przeciwbiałaczkowy, zasadowy czynnik wzrostowy fibroblastów i insulina.

W naszych badaniach, z hodowanego materiału otrzymujemy regularnie „komórki nabłonkowe”. Nie były one testowane na tworzenie chimer, jednak ze względu na morfologię różną od mysich PKZ, nie mieszczą się one w definicji PKZ. Zastosowaliśmy ostatnio metodę pozwalającą zidentyfikować potencjalne PKZ, tj. test na obecność fosfatazy zasadowej. Wykazano, że w pierwotnych i wtórnych hodowlach zawiesiny z tylnych części 15-dniowych zarodków występują komórki pozytywne. Są one jednak niezbyt liczne, rozproszone wśród innych, proliferujących komórek zarodka. Dalsze próby będą zmierzać w kierunku znalezienia metody pobudzenia proliferacji komórek zawierających fosfatazę zasadową.

Badania własne opisane w tej pracy były finansowane przez KBN (grant nr 5.5370.91.02).

Literatura

1. Modliński J. A., (1990), *Biotechnologia* 1, 4-13.
2. Smoraż Z., Wierzbowski S., Kątska L., Skrzyszowska M., Gajda B., Błasiak J., (1990), *Biotechnologia*, 1, 20-34.
3. Modliński J. A., Karasiewicz, J., (1992), *Przegląd Hodowlany*, 6, 133-145.
4. Modliński J. A., Reed M. A., Dishong S., Modlińska M. K., Wagner T. E., (1993), *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 11, 135-140.
5. Modliński J. A., (1995), praca hab. Inst. Genet. Hod. Zwierz. PAN, Jastrzębiec.
6. Nagy A., Gocza E., Diaz E. M., Prideaux V. R., Ivanyi E., Markkula M., Rossant J., (1990), *Development*, 110, 815-821.
7. Evans M. J., Kaufman M. H., (1981), *Nature*, 292, 154-156.
8. Martin G. R., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 7634-7638.
9. Nichols J., Evans E. P., Smith A. G., (1990), *Development*, 110, 1341-1348.
10. Pease S., Braghetta P., Gearing D., Grail D., Williams R. L., (1990), *Dev. Biol.*, 141, 344-352.
11. Kawase E., Suemori H., Takahashi N., Okazaki K., Hashimoto K., Nakatsui N., (1994), *Int. J. Dev. Biol.*, 38, 385-390.
12. Brown D. G., Willington M. A., Findlay I., Muggleton-Harris A. L., (1992), *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 28A, 773-778.

13. Abbondanzo S. J., Gadi I., Stewart C. L., (1993), *Meth. Enzymol.*, 225, 803-823.
14. Robertson E. J., (1987), *Embryo-derived stem cell lines*, in: *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, Ed. Robertson E. J., Oxford, IRL Press, 71-112.
15. Tokunaga T., Tsunoda Y., (1989), *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 35, 173-178.
16. Eistetter H. R., (1989), *Dev. Growth Differ.*, 31, 275-282.
17. Nagy A., Rossant J., Nagy R., Abramow-Newerly W., Roder J. C., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8424-8428.
18. Donovan P. J., Stott D., Cairns L. A., Heasman J., Wylie C. C., (1986), *Cell*, 44, 831-838.
19. Resnick J. L., Bixler R. S., Cheng L., Donovan P. J., (1992), *Nature*, 359, 550-551.
20. Matsui Y., Zsebo K., Hogan B. L. M., (1992), *Cell*, 70, 841-847.
21. Stewart C. L., Gadi I., Bhatt H., (1994), *Dev. Biol.*, 161, 626-628.
22. Doetschman T., Williams P., Maeda N., (1988), *Dev. Biol.*, 127, 224-227.
23. Iannaccone P. K., Taborn G. U., Garton R. L., Caplice M. D., Brenin D. R., (1994), *Dev. Biol.*, 163, 288-292.
24. Sukoyan M. A., Golubitsa A. N., Zhelezova A. I., Skilov A. G., Vatolin S. Y., Maximowsky L. P., Andreeva L. E., McWhir J., Pack S. D., Bayborodin S. I., Kerkis A. Y., Kizilova H. I., Serov O. L., (1992), *Molec. Reprod. Dev.*, 33, 418-431.
25. Sukoyan M. A., Vatolin S. Y., Golubitsa A. N., Zhelezova A. I., Semenova L. A., Serov O. L., (1993), *Molec. Reprod. Dev.*, 36, 148-158.
26. Graves K. H., Moreadith R. W., (1993), *Molec. Reprod. Dev.*, 36, 424-433.
27. Saito S., Strelchenko H., Niemann H., (1992), *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 201, 134-141.
28. Piedrahita J. A., Anderson G. B., Bondurant R. H., (1990), *Theriogenology*, 34, 879-901.
29. Notarianni E., Gali C., Laurie S., Moor R., Evans M. J., (1991a), *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 43, 255-260.
30. Karasiewicz J., Reed M., Modliński J., (1993), *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 11, 131-134.
31. Strojek R. M., Reed M. A., Hoover J. L., Wagner T. E., (1990), *Theriogenology*, 33, 901-914.
32. Notarianni E., Laurie S., Moor R., Evans M. J., (1991b), *J. Reprod. Fert., Suppl.* 41, 51-56.

Mouse embryonal stem cells — a tool of cloning mammals

Summary

Mouse embryonal stem cells (ESCs) are embryo-derived totipotent cells which can be used to massively clone mice. The methods of obtaining ECSs are described and their applications and limitations in cloning are discussed.

Attempts to obtain ECSs from farm animals are mentioned.

Key words:

embryonal stem cells.

Adres dla korespondencji:

Jolanta Karasiewicz, Zakład Embriologii Doświadczalnej,
Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec, 05-551 Mroków.