



Uzyskiwanie świń wykorzystywanych w ksenotransplantacji

Jacek Jura¹, Ryszard Słomski^{2,3}, Zdzisław Smorąg¹, Barbara Gajda¹,
Jarosław Wieczorek¹, Daniel Lipiński³, Robert Kalak²,
Wojciech Juzwa², Joanna Zeyland³

¹Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki, Balice k. Krakowa

²Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza, im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań

³Instytut Genetyki Człowieka, Polska Akademia Nauk, Poznań

Production of pigs used in xenotransplantation

Summary

There are four main trends in the use of transgenic animals. One of the most interesting is the use of transgenic animals as the donors of tissue or organs suitable for transplantation in human – xenotransplantation. This field of research has been undergoing intensive and increasing study during the past few years, and some encouraging progress is being made. A pig has been identified as the most suitable donor animal. The aim of the presented experiment was to produce transgenic pigs which tissues and organs could be used for the xenotransplantation needs. To target the goal, a competitive gene construct coding the same substrate as the endogenous enzyme of organ donor was introduced. In effect, transgenic boar was produced with confirmed integration of human $\alpha 1,2$ fucosyltransferase gene. Also, F1 generation of transgenic pigs was generated to preserve ongoing needs of preliminary research of xenotransplantation project.

Key words:

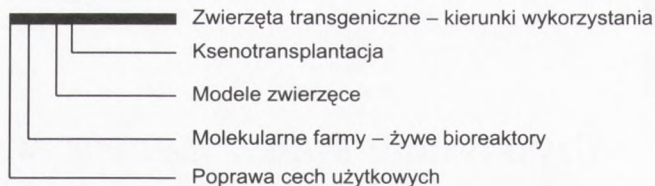
xenotransplantation, transgenesis, pig, human $\alpha 1,2$ fucosyltransferase gene, DNA microinjection, F1 generation.

Adres do korespondencji

Jacek Jura,
Dział Biotechnologii
Rozrodu Zwierząt,
Instytut Zootechniki,
32-083 Balice k. Krakowa

1. Wstęp

Można wyróżnić cztery główne kierunki wykorzystania zwierząt transgenicznych. Pierwszy, to wykorzystanie transgenicznych zwierząt – świń domowych, jako dawców tkanek i na-



Rys. 1. Kierunki wykorzystania usystematyzowane od najnowszego do najstarszego.

rządów do transplantacji u człowieka – ksenotransplantacja. Drugi, to tworzenie i wykorzystanie transgenicznych zwierząt modelowych naśladujących ludzkie choroby do szeroko rozumianych badań, mających na celu poznanie przyczyn, przebiegu danej jednostki chorobowej i jej konsekwencji. W efekcie ma to służyć wypracowaniu skutecznej i bezpiecznej terapii. Trzeci, najbardziej zaawansowany i znany, to wykorzystanie transgenicznych zwierząt, nazwanych bioreaktorami lub molekularnymi farmami, do produkcji różnego rodzaju białek lub biopolimerów, istotnych w medycynie. Czwarty z kierunków dotyczy badań nad poprawą cech użytkowych zwierząt hodowlanych.

Transgeniczne zwierzęta, którym zmodyfikowano system immunologiczny w niedalekiej przyszłości staną się „żywymi bankami tkanek i narządów” wykorzystywanych do przeszczepów u ludzi. Ksenotransplantacja, (ang. *xenotransplantation*) to zabieg przeszczepiania tkanek lub organów między osobnikami pochodzącymi z różnych gatunków. W odniesieniu do człowieka, termin ten oznacza przeszczepienie tkanki lub narządu od dawcy, którym jest zwierzę (1).

W samych Stanach Zjednoczonych Ameryki co roku liczba pacjentów oczekujących na przeszczep nerek, wątroby lub serca, sięga dziesiątków tysięcy, lecz tylko niewielki ich odsetek, można poddać operacji ratującej życie, gdyż liczba dostępnych organów jest znikoma. Pochodzą one głównie od osób, które zginęły w wypadkach komunikacyjnych i których rodziny, bądź one same wcześniej wyraziły na to zgodę (1). Ponadto, nie wszystkie te narządy nadają się do przeszczepu, bądź ze względu na niezgodność immunologiczną dawcy i biorcy oczekującego w kolejce na zabieg; bądź dlatego że pobranie organu wykonano zbyt późno po zdarzeniu – pobranie i przeszczep musi być wykonane w jak najkrótszym czasie; bądź też inne błędy w sposobie pobrania lub transporcie narządu, który uzyskiwany jest w sytuacji silnie stresowej (1). Podobny problem dotyczy naszego kraju i innych państw europejskich. W tej sytuacji, stworzenie linii zwierząt, które byłyby potencjalnymi dawcami organów dla ludzi wymagających zastąpienia ich własnych źle funkcjonujących, byłoby milowym krokiem w rozwiązaniu tego problemu.

Z przeprowadzonych do tej pory badań klinicznych wynika, że świnia domowa, a nie jak wcześniej sądzono najbliżej z człowiekiem spokrewnione małpy naczelne, najlepiej spełnia kryteria przydatności organów do ksenotransplantacji. Wielkość narządów, ich wydolność fizjologiczna jest niemal identyczna z ludzkimi. Za wybo-

rem świni jako potencjalnego dawcy organów do ksenotransplantacji przemawiają również następujące fakty: świnia jest gatunkiem o wysokiej plenności i płodności, tanim i łatwym w utrzymaniu, rośnie szybko, a jej organy w stosunkowo krótkim czasie osiągają pełną wielkość i wydolność fizjologiczną, stosowną do potrzeb ksenotransplantacji. Ponadto, świnia jest gatunkiem u którego, dosyć łatwo można przeprowadzić modyfikacje genowe i jako gatunek jest praktycznie wolna od chorób, które mogłyby być przeniesione wraz z przeszczepianym organem na człowieka. Jedyne, dosyć poważne zagrożenie stanowią endogenne świńskie retrowirusy (PERV, ang. *porcine endogenous retroviruses*) (1).

Modyfikacji genomu świni w celu wykorzystania jej narządów do ksenotransplantacji u człowieka poświęca się wiele uwagi ze względu na opisane problemy. Użycie organów zwierzęcych dla potrzeb człowieka, czyli ksenotransplantacja, może się zatem przyczynić w zasadniczym stopniu do rozwiązania poważnego problemu społecznego.

Jednym ze sposobów uniknięcia nadostrego odrzucenia przeszczepów ksenogenicznych jest modyfikacja antygenów powierzchniowych komórki dawcy (1,2).

Celem badań było uzyskanie transgenicznych świń z genem ludzkiej fukozylotransferazy przy zastosowaniu standardowej techniki mikroiniekcji DNA do zapłodnionych komórek jajowych świni. W tym celu przygotowano konstrukcję genową o charakterze konkurencyjnym, której zadaniem jest wprowadzenie do komórek świni genów kodujących enzymy swoiste dla tego samego substratu, co endogenne enzymy dawcy (3,4). Przygotowana konstrukcja genowa, zawierająca gen $\alpha 1,2$ -fukozylotransferazy człowieka, konkuruje z $\alpha 1,3$ -galaktozylotransferazą o ten sam substrat N-acetyloaktozoaminę. Wprowadzenie do genomu świni genu ludzkiej fukozylotransferazy ma spowodować maskowanie epitopu poprzez zmniejszenie powinowactwa przeciwciał anty-Gal. Zmniejszenie powinowactwa przeciwciał anty-Gal w układzie świnia-człowiek może obniżyć immunologiczną barierę międzygatunkową i zminimalizować ryzyko odrzucenia przeszczepu (3-5). Następnym celem badawczym było uzyskanie pokolenia F1 transgenicznych świń o potwierdzonej ekspresji genu wprowadzonego metodą mikroiniekcji, których organy będą wykorzystane we wstępnych badaniach nad ksenotransplantacją.

2. Materiał i metody

Do zabiegów mikroiniekcji DNA zastosowano konstrukcję genową CMV-Fut II z genem $\alpha 1,2$ -fukozylotransferazy sklonowanym w plazmidzie pGT-N29, przygotowaną przez Zespół R. Słomskiego z Katedry Biochemii i Biotechnologii Akademii Rolniczej w Poznaniu.

Zygoty do zabiegu mikroiniekcji były uzyskiwane od superowulowanych świń dawczyń ras Landrace, Duroc, Hampshire i PBZ 990, przygotowanych według następującego schematu:

Dzień	Godzina	Traktowanie
1	8 ⁰⁰	Serogonadotropin, 1500 j.m./szt., domięśniowo
3	8 ⁰⁰	Biogonadył, 1000 j.m./szt., domięśniowo
4	8 ⁰⁰ i 20 ⁰⁰	badanie objawów rui, selekcja dawczyń, AI
5	10 ⁰⁰	uzyskiwanie zarodków

Po uzyskaniu zygoty oceniano morfologicznie, wybierając do zabiegu mikroiniekcji tylko zygoty z cytoplazmą morfologicznie prawidłową, posiadające dwa wyraźnie uformowane ciała kierunkowe. Przed wprowadzeniem DNA, w celu uwidocznienia przedjądrzy, zygoty były poddane wirowaniu (19 000 g, przez 5 minut) (6-8).

Zabieg mikroiniekcji przeprowadzano pod mikroskopem odwróconym, wyposażonym w system kontrastowej modulacji światła Hoffmana, z użyciem mikromanipulatorów. DNA wprowadzano do jednego z przedjądrzy. Po zabiegu mikroiniekcji DNA zygoty były ponownie oceniane morfologicznie. Transformowane zygoty przenoszono chirurgicznie do jednego z jajowodów zsynchronizowanych biorczyń będących w pełnej narkozie operacyjnej. Do jajowodu wprowadzano co najmniej 20 transformowanych zygot. Biorczynie zarodków synchronizowano z cyklem rujowym dawczyń według schematu:

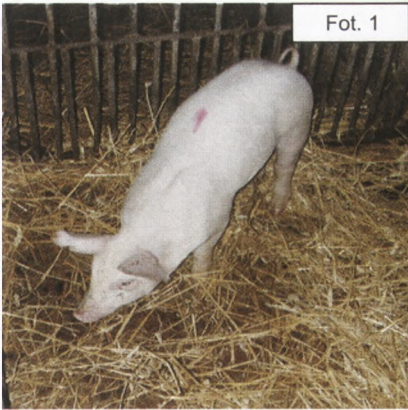
Dzień	Godzina	Traktowanie
1	8 ⁰⁰	Serogonadotropin, 750 j.m./szt., domięśniowo
3	8 ⁰⁰	Biogonadył, 500 j.m./szt., domięśniowo
4	8 ⁰⁰ i 20 ⁰⁰	sprawdzanie objawów rujowych, selekcja biorczyń
5	ok. 12 ⁰⁰	transplantacje zarodków

U samic biorczyń po zabiegu transplantacji wykrywano ciążę około 50. dnia od wykonania zabiegu. Integrację wprowadzonego genu badano w DNA wyizolowanym z tkanki usznej lub krwi uzyskanym od potencjalnie transgenicznych osobników za pomocą techniki PCR i FISH. Badania wykonał zespół, który przygotował konstrukcję genową.

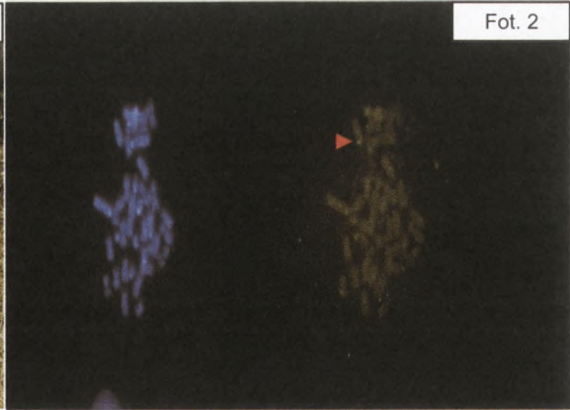
W celu wyprodukowania pokolenia F1 transgenicznych osobników, wyselekcjonowane loszki inseminowano nasieniem transgenicznego knura TG 1154. Zabiegowi inseminacji poddano 30 wyselekcjonowanych loszek.

3. Wyniki

Zabiegowi mikroiniekcji genem CMV-Fut II poddano 1870 zapłodnionych komórek jajowych świni uzyskanych od 135 dawczyń (14 zygot/szt.). Zygoty przeszczepiono do jajowodów 57 zsynchronizowanych biorczyń (średnio 32 zygoty/szt.). Od 26 loch (46%) uzyskano 117 prosiąt. Na podstawie analizy molekularnej genomowego DNA potencjalnie transgenicznych osobników wykazano obecność wprowadzo-



Fot. 1



Fot. 2

→ Transgen na chromosomie 14q28 – knur 1154. FISH wykonany przez E. Michalak i R. Słomskiego, Katedra Biochemii i Biotechnologii AR Poznań

Fot. 1. Transgeniczny knur TG-1154; fot. 2. Analiza FISH genomu knura TG-1154.

nego genu u jednego knura – TG 1154 (fot. 1). Badania integracji wprowadzonego genu zostały potwierdzone przez wykonanie analizy metodą FISH, gdzie lokalizację transgeny stwierdzono na chromosomie 14q28 u knura TG 1154 (fot. 2).

Tabela

Efektywność transgenezy – gen CMV-FUT II

Gen	Liczba dawczyń	Liczba owulacji	Liczba uzyskanych komórek jajowych	Liczba biorczyń	Liczba TPT zygot	Liczba prośnych	Liczba prosiąt	TG
FUT II	135	3752	2776	57	1870	26	117	1



Fot. 3



Fot. 4

Fot. 3 i 4. Transgeniczne świny pokolenia F1.

W rezultacie prac nad uzyskaniem pokolenia F1 transgeniczných świń uzyskano 200 potencjalnie transgeniczných prosiąt. Na podstawie analizy molekularnej wykazano, że 87 (43,5%) sztuk prosiąt ma wbudowany gen ludzkiej fukozylotransferazy.

4. Dyskusja

Transgeneza zwierząt gospodarskich, ze względu na potencjał jakim dysponuje, jest ciągle jednym z kierunków współczesnej biotechnologii, który cieszy się nie słabnącym zainteresowaniem. Podstawowym i ciągle nie rozwiązany problem jest jej efektywność, nadal niewspółmiernie niska w odniesieniu do poniesionych nakładów finansowych i pracy (8,9). Poprawie efektywności procesu transgenezy poświęcono wiele opracowań, w których opisuje się nowe podejścia badawcze czy techniki mające poprawić wydajność procesu. Na efektywność procesu transgenezy składa się wiele czynników. Większość z nich jest dobrze poznana, co pozwala na standaryzację określonych procedur. Najmniej wiemy o podstawowym dla tego procesu zachowaniu się transgeny po wprowadzeniu do zapłodnionej komórki jajowej lub oocytu. Ma to szczególne znaczenie, wtedy gdy do uzyskania transgeniczných osobników stosuje się technikę mikroiniekcji DNA. Mikroiniekcja DNA jest najstarszą, najczęściej stosowaną z przyczyn metodycznych i, jak do tej pory, najbardziej efektywną w przypadku zwierząt gospodarskich techniką produkowania genetycznie zmodyfikowanych osobników. Najtrudniejszy do rozwiązania problem, jak wskazano, dotyczy zachowania się transgeny po wprowadzeniu do zygoty, a mówiąc ściślej, tyczy możliwości sterowania tym procesem w celu ułatwienia jego integracji. Ideałem byłaby możliwość precyzyjnego ukierunkowania określonego transgeny w określone miejsce na chromosomie i jego trwałe wbudowanie. Jeśli zastosujemy rekombinację homologiczną możliwości takie istnieją. Podstawowe ograniczenie to brak odpowiednich technik w przypadku zwierząt gospodarskich. Jedynym gatunkiem u którego z powodzeniem można stosować tę technikę jest mysz. Klonowanie połączone z wykorzystaniem transformowanych – transgeniczných komórek czy jąder komórkowych w celu wyprodukowania transgeniczných osobników jest nadal techniką mniej wydajną niż standardowa mikroiniekcja (10). Próbą rozwiązania tego najbardziej istotnego problemu w przypadku mikroiniekcji DNA jest stosowanie coraz bardziej wyrafinowanych konstrukcji genetycznych, zawierających elementy ułatwiające wbudowanie transgeny (np. MAR, ang. *matrix attachment region*) czy stosowanie wydajniejszych promotorów.

Największe wyzwanie w przypadku transgenezy stanowi fakt, że każda planowana modyfikacja genetyczna musi być rozpatrywana indywidualnie. Dla jej potrzeb musi zostać skonstruowany odpowiedni wektor, który będzie powodował określone modyfikacje genotypu. Najtrudniejsze do przewidzenia są skutki zastosowania w konstrukcji genowej promotora, który powoduje ekspresję określonego transge-

nu we wszystkich tkankach modyfikowanego organizmu, tzw. promotora ogólnoustrojowego. W prezentowanych badaniach, ze względu na ich cel – wykorzystanie organów transgenicznych świń do ksenotransplantacji u ludzi – zaistniała konieczność zastosowania właśnie takiego promotora.

Celem badań było uzyskanie transgenicznych świń z genem ludzkiej fukozylotransferazy. Przygotowano zatem konstrukcję genową o charakterze konkurencyjnym, której zadaniem jest wprowadzenie do komórek świni genów kodujących enzymy swoiste dla tego samego substratu, co endogenny enzym dawcy. Konstrukcja genowa konkurencyjna ma wprowadzić do komórek dawcy dodatkowe kopie genów kodujących enzymy swoiste dla tego samego substratu, co enzym endogenny dawcy. Przygotowana konstrukcja genowa, zawierająca gen α 1,2-fukozylotransferazy człowieka, konkuruje z α 1,3-galaktozylotransferazą o ten sam substrat N-acetylo-laktozoaminę. Wprowadzenie do genomu świni genu ludzkiej fukozylotransferazy ma spowodować maskowanie epitopu poprzez zmniejszenie powinowactwa przeciwciał anty-Gal. Zmniejszenie powinowactwa przeciwciał anty-Gal w układzie świnia-człowiek może obniżyć immunologiczną barierę międzygatunkową i zminimalizować ryzyko odrzucenia przeszczepu.

Uzyskana w prezentowanych badaniach efektywność transgenezy liczona w odniesieniu do poddanych mikroiniekcji zygot wyniosła zaledwie 0,05%. Liczona w odniesieniu do uzyskanych osobników 0,9%. Jest to znacznie poniżej teoretycznie zakładanej efektywności transgenezy u świń, którą określa się w granicach 2% w odniesieniu do transformowanych zygot (8,9). Przyczyną tak niskiej efektywności może być fakt zastosowania silnego promotora ogólnoustrojowego, którego ekspresja mogła powodować obumieranie zarodków we wczesnych stadiach rozwojowych, na co wskazywałaby liczba uzyskanych prosiąt. Z ogólnej liczby 1870 przeszczepionych zygot uzyskano 117 prosiąt – 6,3%.

Należy jednak podkreślić to, że nabyta przez transgenicznego knurka cecha, wprowadzona w wyniku przeprowadzonych prac, wbudowała się trwale w jego genom. Świadczy o tym niezbicie analiza przeprowadzona metodą FISH oraz fakt przekazywania nowo nabytej przez niego cechy na potomstwo. 43,5% osobników pokolenia F1 uzyskanych w rezultacie inseminacji nasieniem knura TG 1154 posiada odziedziczoną po ojcu cechę. Transgenicznego osobnika TG 1154 uzyskano w stosunkowo krótkim czasie, bo zaledwie w rok od rozpoczęcia prac. Niska efektywność transgenezy w odniesieniu do możliwości jakie stwarza, całkowicie rekompensuje poniesione nakłady. Rekompensata jest tym bardziej satysfakcjonująca, gdyż badania opublikowane we wrześniu 2004 r. rozwiewają obawy dotyczące endogennych retrowirusów świni jako potencjalnego źródła zakażeń po przeszczepie transgenicznych organów (11-13).

Praca zrealizowana w ramach projektu badawczego „Wykorzystanie transgenezy w genetycznej modyfikacji świń dla pozyskiwania organów do transplantacji – PBZ/KBN/048/PO5/2001”, finansowanego przez KBN.

Literatura

1. Bühler L., Friedman T., Iacomini J., Cooper D. K. C., (1999), *Frontiers in Bioscience*, 4, d416-432.
2. Kadner A., Chen R., Adams D. H., (2000), *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, 17, 474-481.
3. Lipiński D., Szalata M., Kalak R., Pławski A., Nuc K., Kala M., Juzwa W., Słomska K., Groniek P., Jura J., Jura J., Smorąg Z., Pieńkowski M., Słomski R., (2003), *Biotechnologia*, 1(60), 48-73.
4. Słomski R., Szalata M., Lipiński D., Groniek P., (2003), *Medycyna Weterynaryjna*, 59, 961-965.
5. Jura J., Gajda B., Wieczorek J., Smorąg Z., Lipiński D., Kalak R., Juzwa W., Zeyland J., Słomski R., (2004), *Genetyczne modyfikacje świń w celu uzyskiwania organów do transplantacji u człowieka*, w: *Biologia rozrodu oraz zdrowie reprodukcyjne człowieka*, pod redakcją Waldemara Kuczyńskiego, Wyd. Akad. Med., Białystok, 185.
6. Smorąg Z., Jura J., Kopchick J. J., Gajda B., Skrzyszowska M., Różycki M., Pasięka J., (1998), *Biotechnologia*, 2(41), 145-153.
7. Smorąg Z., Gajda G., Jura J., Skrzyszowska M., Pasięka J., (1999), *Ann. Anim. Sci.*, Vol. 26, 4, 155-161.
8. Jura J., Smorąg Z., Gajda B., Skrzyszowska M., Kopchick J. J., Kelder B., Prieto P. A., Kareta W., Pasięka J., (2000), *Roczniki Naukowe Zootechniki*, 5, 246-250.
9. Jura J., Smorąg Z., Kątska L., Skrzyszowska M., Gajda B., Ryńska B., (1998), *Biotechnologia*, 2(41), 101-110.
10. Palejaeva I. A., Chen S-H., Vaught T. D., Page R. L., Mullins J., Bell S., Dai Y., Bogtto J., Walker S., Ayares D. L., Colman A., Campbell K., (2000), *Nature*, 407, 86-90.
11. Yang Y-G., Wood J. C., Lan P., Wilkinson R. A., Sykes M., Fishman J. A., Patience C., (2004), *J. Clin. Invest.*, 114, 695-700.
12. Weiss R. A., (1998), *Nature*, 391, 327-328.
13. Bosch S., Arnauld C., Jestin A., (2000), *J. Virol.*, 74(18), 8575-8581.