



Chimerowe zarodki ssaków: powstawanie i wykorzystanie

Anna Piliszek

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

The production and use of mammalian chimeric embryos

Summary

Chimera is a composite organism, consisting of cells derived from more than one embryo. The first experimental chimera was produced in 1961 and until today, chimeric animals have been widely used in mammalian experimental embryology. Numerous aggregation and injection techniques have been used to produce chimeras. Although most experimental chimeras were made of murine embryos, chimeric animals have been also produced in such species as: rat, hamster, deer mouse, rabbit, pig, sheep and in cattle. Some successful attempts to produce interspecific chimeras have been also made. Pigmentation is still widely used as a marker of chimerism, but new transgenic markers are now available. New methods employing chimeric technique, like blastocyst complementation assay and lethal phenotypes rescue, provide new insights into developmental genetics. Nowadays, chimeric embryos are also likely to play a major role in the production of transgenic animals with the help of chimeric cloning technique.

Key words:

aggregation and injection methods, chimera, embryo, mammal.

Adres do korespondencji

Anna Piliszek,
Zakład Embriologii
Doświadczalnej,
Instytut Genetyki
i Hodowli Zwierząt,
Polska Akademia Nauk,
Jastrzębiec
05-552 Wólka Kosowska.

biotechnologia

1 (64) 142-155 2004

1. Wstęp

Chimera, według definicji podanej przez McLaren (1), jest wielokomórkowym organizmem złożonym z populacji komórek pochodzących z przynajmniej dwóch różnych genetycznie zygot. Nazwa „chimera” została po raz pierwszy użyta przez Tarkowskiego (2). Mintz proponowała nazwę „allofeniczne” (3) na określenie zwierząt powstałych w wyniku agregacji zarodków, ale

nazwa ta była już wcześniej używana w innym znaczeniu. Dawniej stosowano również termin „zwierzęta czterorodzicielskie”, ale ponieważ określenie to nie odnosi się do wszystkich chimer, nie może być stosowane powszechnie.

Organizmy, w których współlistnieją co najmniej dwie populacje różnych genetycznie komórek wywodzących się od jednej zygoty, dla odróżnienia od chimer nazywane są mozaikami (organizmami mozaikowymi).

2. Chimeryzm pierwotny i wtórny

Ze względu na etap rozwoju osobniczego, w którym powstały, chimery można podzielić na pierwotne i wtórne (4).

2.1. Chimeryzm pierwotny

Chimery pierwotne to organizmy, które powstały w wyniku połączenia komponentów już w rozwoju zarodkowym. Różne genetycznie populacje komórek współistnieją od bardzo wczesnego etapu embriogenezy, nawet już od momentu zapłodnienia, zatem chimeryzm może dotyczyć wszystkich tkanek.

Chimery pierwotne bardzo rzadko powstają spontanicznie, a to ze względu na obecność osłonki przejrzystej. Chroni ona zarodki przed sklejaniem się sobą, a także przywieraniem do ścianki jajowodu (5). Kilka znanych przypadków spontanicznych chimer pierwotnych u ssaków – myszy (6) i człowieka (7,8) – powstało prawdopodobnie w wyniku zapłodnienia dwóch haploidalnych produktów mejozy przez różne plemniki (chimery dispermiczne). Teoretycznie możliwy jest rozwój zarodka chimerowego z zapłodnionych oocytu i ciała kierunkowego, bardziej prawdopodobne jednak jest, jak się wydaje, zapłodnienie dwóch podobnej wielkości komórek. Mogą one powstać w wyniku pierwszego lub – co mniej prawdopodobne – drugiego podziału mejotycznego o nieprawidłowym przebiegu (tzw. podział bezpośredni).

2.2. Chimeryzm wtórny

Chimery wtórne pochodzą z więcej niż jednego dorosłego organizmu lub płodu po rozpoczęciu okresu organogenezy, zatem chimeryzm jest u nich ograniczony do określonych tkanek lub narządów. Mogą one powstać w wyniku przeszczepu w dorosłych organizmach lub w okresie płodowym dzięki migracji komórek między płodami w ciąży mnogiej.

Chimery wtórne można spotkać dość często u zwierząt gospodarskich, a czasem również u ludzi. Mogą one powstawać spontanicznie w okresie płodowym w ciąży bliźniaczej. W niektórych przypadkach w takiej ciąży powstają anastomozy naczy-

niowe pomiędzy łożyskami płodów, przez które może następować wymiana komórek krwiotwórczych. Powoduje to powstanie chimeryzmu leuko- i erytrocytarnego u dorosłych zwierząt i ludzi, ponieważ ich szpik kostny w życiu płodowym zostaje zasiedlony przez dwie populacje komórek krwiotwórczych (9). Obserwowano również przypadki chimeryzmu spermatogoniów (10) w różnopłciowych ciążyach bliźniaczych u bydła. Chociaż 30. dnia ciąży, kiedy tworzą się anastomozy, migracja pierwotnych komórek płciowych do gonad jest już w większości przypadków zakończona, to jednak może się zdarzać, że nastąpi wymiana tych komórek między płodami. Wcześniej sądzono, że obce genotypowo pierwotne komórki płciowe są eliminowane, jednak w jądrach buhaja znaleziono również spermatogonia o kariotypie XX (około 10%) i genotypie różniącym się od genotypu biorcy. Nie wiadomo, czy powoduje to obniżenie płodności zwierząt: zbadano jedynie, że spermatogonia o kariotypie XX rozwijały się *in vitro*. Wcześniejsze dane wskazują, że w potomstwie chimerowych buhajów XX/XY stosunek płci był normalny (11)*.

3. Metody otrzymywania chimer

3.1. Otrzymywanie chimer pierwotnych

Współcześnie stosowane metody otrzymywania chimer można podzielić na agregacyjne i wykorzystujące mikroiniekcję komórek. Metody mikroiniekcji pozwalają na rozwój zarodka w naturalnych warunkach, w osłonce przejrzystej. Pozbawione osłonki zarodki po agregacji wymagają hodowli *in vitro* przynajmniej do stadium późnej moruli, gdyż przeszczepione wcześniej do jajowodu przyklejają się do jego ścianek (5). Jednocześnie metody agregacyjne są wydajniejsze i mniej pracochłonne, ponieważ nie wymagają przygotowania skomplikowanych narzędzi i opanowania technik mikromanipulacji. Dlatego ostatnio zyskują one na popularności.

3.1.2. Agregacyjne metody tworzenia chimer

Pierwsze doświadczalne chimery zostały uzyskane przez Tarkowskiego (2) metodą agregacji bruzdkujących zarodków mysich. Technika ta, nieco uproszczona, została zastosowana także przez Mintz (12). Jest ona do tej pory z powodzeniem stosowana do produkcji chimer u wielu gatunków zwierząt. Cztero- lub ośmiobla-

* W różnopłciowych ciążyach bliźniaczych bydła obserwuje się również zjawisko frymartyzmu – niepłodności samic. Jest to spowodowane działaniem męskich hormonów na płód żeński, wskutek czego żeńskie narządy rozrodcze nie mogą się prawidłowo rozwinąć. Anomalie takie nie występują u ludzi, gdyż w momencie powstawania anastomoz narządy rozrodcze człowieka są już w dostatecznym stopniu ukształtowane.

stomerowe zarodki pozbawione osłonek przejrzystych (przy użyciu kwaśnego roztworu Tyrode'a, pronazy, lub mechanicznie przez pipetowanie), umieszczane są parami w mikrokroplach pożywki, tak aby pozostawały w kontakcie, i hodowane do osiągnięcia stadium w którym mogą być przeszczepione do macicy matek zastępczych będących w ciąży rzekomej.

Oprócz agregacji bruzdkujących zarodków (2,12) opisano też agregację izolowanych blastomerów pochodzących z bruzdkujących zarodków (13) oraz agregację bruzdkujących zarodków z komórkami z hodowli *in vitro* (14,15). Agregacji z komórkami można dokonać „w dołkach” lub we współhodowli. Metoda „dołków” (dziurek) (ang. *darning needle*) wymaga zrobienia w dnie plastikowej szalki zagłębień za pomocą igły. Następnie w każdym dołku umieszcza się jedną pozbawioną osłonki przejrzystej morulę i grudkę pierwotnych komórek zarodkowych. Współhodowla (ang. *coculture*) polega na tym, że pozbawione osłonki przejrzystej morule hodowane są na „murawie” („darni”) (ang. *lawn*), czyli warstwie pierwotnych komórek zarodkowych pokrywających dno szalki.

Pierwotne komórki zarodkowe (oraz komórki raka zarodkowego) łatwo agregują z pozbawionymi osłonki przejrzystej morulami i prawie w 100% ulegają internalizacji. W obu podanych metodach inkubacja z komórkami trwa około 2-3 godzin, a następnie już zagregowane z komórkami zarodki przenoszone są do hodowli.

Metody agregacyjne nie nastęrczają trudności w przypadku zarodków mysich i szczurzych. Stawiają jednak przed wieloma problemami badaczy zajmujących się innymi ssakami, ponieważ wymagają usunięcia osłonki przejrzystej. Brak osłonki przejrzystej nie upośledza rozwoju mysich zarodków *in vitro* (2,12), również świńskie zarodki, pozbawione osłonki przejrzystej aż do stadium wczesnej blastocysty rozwijają się podobnie *in vivo* i *in vitro* (16). Jednak w przypadku niektórych gatunków hodowla *in vitro* nie jest możliwa, np. 1-2-blastomerowe zarodki królika po usunięciu osłonki przejrzystej dzielą się, ale blastomery potomne ulegają rozproszeniu (17). W przypadku zarodków owcy również następuje rozdzielenie blastomerów i zahamowanie rozwoju (18). Zarodki chimerowe tych gatunków powstałe w wyniku agregacji trzeba umieszczać ponownie w osłonkach (uzyskanych z tego samego lub innego gatunku), a następnie zatapiać w bloczkach agarowych, aby zapobiec wypadnięciu zarodka z osłonki (ang. *agar chip procedure*) (19,20) lub w specjalnie przygotowanych agarowych kapsułach. Zabiegi takie są możliwe i wykonywane z powodzeniem, są jednak czasochłonne i pracochłonne. Powoduje to, że w przypadku większości zwierząt gospodarskich, metody agregacyjne nie są konkurencyjne pod względem wydajności dla mikroiniekcji. Na ich korzyść przemawia to, że nie wymagają używania drogiego sprzętu.

3.1.3. Metody mikroiniekcyjne

Najstarszą metodą mikroiniekcyjną jest mikroiniekcja komórek do jamy blastocysty. Skutkuje ona inkorporacją komórek do wężła zarodkowego (21,22). Inne manipulacje na blastocystach to wymiana całego wężła zarodkowego, żeby stworzyć

chimerę typu „węzeł-trofoblast” (ang. *inner cell mass-trophoblast chimera* lub *blastocyst reconstitution chimaera*) (25-27) i wprowadzanie węzła zarodkowego do sztucznie uzyskanego pęcherza trofoblastycznego (28). Chimery można też uzyskać przez mikroiniekcję komórek pod osłonkę przejrzystą 8-komórkowych zarodków (23,24) i selektywną wymianę niektórych komórek na stadium moruli (29).

Jednym z najczęściej stosowanych sposobów uzyskiwania chimer są manipulacje na zarodkach w stadium blastocysty. Zaletą tej metody jest możliwość skrócenia czasu hodowli *in vitro*, gdyż zarodki można przeszczepiać do matek zastępczych wkrótce po zakończeniu mikromanipulacji. Pierwszy technikę mikroiniekcji do blastocysty zastosował Gardner (21). Technika ta wymagała używania przez operatora jednocześnie 5 narzędzi mikrochirurgicznych. Stopniowo została ona ulepszona, i 4 z nich zostały zastąpione przez 1 pipetę iniekcyjną o odpowiednio wyprofilowanym zakończeniu (30-32). Za pomocą mikropipety komórki z hodowli *in vitro* lub izolowane blastomery są umieszczane w jamie blastocysty, gdzie wbudowują się w węzeł zarodkowy, a nie w trofoblast. Dlatego struktury pozazarodkowe zawsze pochodzą w całości z blastocysty-biorcy, zaś ciało zarodka może zawierać w sobie pochodne węzła zarodkowego blastocysty-biorcy i komórek wszczepionych. Możliwe jest również uzyskiwanie zarodków w których trofoblast pochodzi całkowicie od jednego zarodka, podczas gdy węzeł zarodkowy od zarodka drugiego (chimery węzeł-trofoblast). W tym celu z blastocysty usuwa się węzeł zarodkowy pozostawiając pusty pęcherz trofoblastyczny, do którego następnie wszczepia się obce komórki. Aby uzyskać pęcherz trofoblastyczny w osłonce przejrzystej otaczającej blastocystę robi się nacięcie tuż nad węzłem zarodkowym. Przez otwór ten wydostaje się fragment blastocysty: węzeł zarodkowy wraz z trofoblastem biegunowym. Fragment jest odcinany, a przez ten sam otwór w osłonce przejrzystej wprowadzany jest fragment węzła zarodkowego pochodzącego z innej blastocysty (33).

3.2. Tworzenie chimer wtórnych

Postimplantacyjne metody tworzenia chimer nie są szeroko stosowane, ze względu na trudności związane z manipulacjami na zaimplantowanych zarodkach. Manipulacje takie muszą być wykonywane *in utero*, gdyż nie jest możliwa ponowna implantacja zarodka raz usuniętego z macicy. Chimeryzm w takim organizmie może dotyczyć tylko małego obszaru lub jednego organu, ze względu na brak masowych migracji komórek, ponieważ na tym etapie rozwoju zdolności regulacyjne zarodka są znacznie ograniczone. Nadal jednak doświadczenia takie mają przewagę nad transplantacjami do w pełni rozwiniętego organizmu, gdyż pozwalają śledzić dalsze etapy rozwoju płodowego. Przeszczep taki, w obrębie jednego gatunku, nie wywołuje odpowiedzi immunologicznej i nie jest odrzucany.

Eksperymentalnie tworzy się najczęściej wtórne chimery krwi. Zwierzęta są napromieniowywane letalną lub subletalną dawką promieniowania X, a następnie prze-

szczepiane są im obce komórki, zwykle pochodzące ze szpiku kostnego. U ludzi metoda ta jest szeroko stosowana w terapii nowotworów krwi. Doświadczalnie stosuje się przeszczep do myszy SCID (ang. *severe combined immunodeficiency*, ciężki złożony niedobór odporności). Myszy tego szczepu pozbawione są odporności, co zapobiega odrzuceniu przeszczepu.

Metody tworzenia zarodków chimerowych zostały opracowane przede wszystkim u myszy. Również znakomitą większość doświadczeń wymienionych w tym rozdziale przeprowadzono na tym gatunku. Szeroki przegląd literatury dotyczącej powstawania i wykorzystania mysich zarodków chimerowych znajdzie czytelnik w pracy przeglądowej J. D. Westa (34).

4. Zwierzęta doświadczalne

Najczęściej wykorzystywanym zwierzęciem w badaniach nad chimeryzmem ssaków jest mysz domowa (*Mus musculus*). Jest to najlepszy model do badań podstawowych, ze względu na wielość wyprowadzonych szczepów, łatwość hodowli zwierząt i szybką wymianę pokoleń, łatwość hodowli zarodków i komórek *in vitro*. Jednak interesująca jest również możliwość prowadzenia takich badań na zwierzętach gospodarskich, co pozwala na ewentualne praktyczne wykorzystanie uzyskanych wyników. Do tej pory uzyskano urodzone, żywe chimerowe zwierzęta u takich gatunków laboratoryjnych jak mysz, chomik (35) i szczur (36,37), a także u myszaka (*Peromyscus maniculatus bairdi*; (38) i królika (39,40) oraz zwierząt gospodarskich: owcy (41), bydła (42), świni (43); (tab. 1).

Tabela 1

Chimery ssaków*

Gatunek 1	Metoda 2	Wynik 3	Źródło 4
chomik	agregacja 2 pozbawionych osłonki przejrzystej zarodków 8-blastomerowych	urodzone zwierzęta: chimeryzm sierści	(35)
szczur	agregacja 2 pozbawionych osłonki przejrzystej zarodków 8-blastomerowych	dorośle zwierzęta: chimeryzm sierści (pigmentacja i badanie histologiczne mieszków włosowych)	(37)
myszak	agregacja 2 pozbawionych osłonki przejrzystej zarodków 4-8-blastomerowych	dorośle płodne zwierzęta: chimeryzm sierści	(38)
królik	iniekcja węzła zarodkowego do jamy blastocysty lub do morula w osłonce przejrzystej	płody w połowie ciąży: chimerowa pigmentacja oka, chimeryzm potwierdzony analizą izozymów ADA	(39)
	iniekcja komórek zarodkowych do jamy blastocysty	urodzone zwierzęta: chimeryzm sierści, brak chimeryzmu w linii płciowej	(40)
świnia	iniekcja węzła zarodkowego do jamy blastocysty	urodzone zwierzęta: chimeryzm sierści i białek krwi	(43)
owca	agregacja par zarodków po 16-32 komórki	urodzone martwe młode: prawdopodobnie chimera	(41)

1	2	3	4
owca	iniekcja 1-4 blastomerów pochodzących z 8-blastomerowego zarodka do zarodków 8-blastomerowych	urodzone zwierzęta: chimeryzm krwi; jedno zwierzę: we krwi tylko pochodne wprowadzonego blastomeru	(77)
	iniekcja wężła zarodkowego do jamy blastocysty	liczne urodzone zwierzęta: chimeryzm sierści i białek krwi, kilka jagniąt prawdopodobnie pochodziło tylko z komórek wszczepionych	(78)
krowa	agregacja 4 połówek zarodków 8-blastomerowych w osłonce przejrzystej	urodzone zwierzę: chimeryzm sierści	(42)
	iniekcja 8-10 transgenicznych komórek zarodkowych do zarodka 8-16-blastomerowego	chimerowe płody: w gonadach transgeniczne pierwotne komórki płciowe	(79)
	agregacja węzłów zarodkowych z morulami	urodzone zwierzęta: chimeryzm sierści i chromosomów płci	(80)
	agregacja komórek zarodkowych z 2 tetraploidalnymi zarodkami pozbawionymi osłonki przejrzystej	urodzone zwierzęta: chimeryzm potwierdzony analizą mikrosatelitarną	(81)

* W tabeli nie umieszczono danych dotyczących chimeryzmu u myszy.

Interesującym modelem doświadczalnym są zarodki chimerowe, stworzone przez połączenie komórek dwóch różnych gatunków (tab. 2). Chimeryzm nie zaburza w widoczny sposób rozwoju jeśli komponenty pochodzą z blisko spokrewnionych gatunków (ten sam rodzaj), a jednocześnie takie międzygatunkowe chimery pozwalają na identyfikowanie wielu markerów, we wszystkich tkankach. W obrębie tego samego rodzaju uzyskano chimery pomiędzy zarodkami *Mus musculus* i *Mus caroli* (44), *Mus musculus* i *Mus spretus* (Modliński i Szollosi, informacja ustna), *Mus caroli* i *Mus spretus* (Modliński i Szollosi, informacja ustna), konia i osła (45), *Bos taurus* i *Bos indicus* (46).

Uzyskano również zarodki i zwierzęta chimerowe pomiędzy dalej spokrewnionymi gatunkami: myszą i nornicą rudą (47), myszą i szczurem (48), koźlą i owcą (49,50) oraz krową i owcą (Willadsen, Miller i Lenn, dane nie publikowane, cyt. w: 51).

Tabela 2

Chimery międzygatunkowe ssaków

Gatunki	Metoda	Wynik	Źródło
1	2	3	4
mysz – nornica ruda	agregacja 8-16-blastomerowych zarodków: 1 zarodek nornicy pomiędzy 2 zarodkami myszy	zarodek w stadium 4 somitów: chimeryzm potwierdzony przez analizę chromosomową	(47)
mysz – szczur	iniekcja szczurzych węzłów zarodkowych do jamy mysiej blastocysty	zarodek w stadium 30 somitów: chimeryzm potwierdzony przez analizę chromosomową	(25)
	agregacja pozbawionych osłonki przejrzystej zarodków na stadium 4-8 blastomerów lub wczesnej moruli	rozwój do stadium blastocysty: chimeryzm nie był potwierdzony	(48)
<i>Mus musculus</i> – <i>Mus caroli</i>	iniekcja węzłów zarodkowych <i>M. caroli</i> do blastocyst <i>M. musculus</i> , przeszczepianie do matek zastępczych <i>M. musculus</i>	urodzone żywe zwierzęta: chimeryzm sierści, chimeryzm potwierdzony analizą GPI i innych markerów	(44)

1	2	3	4
koza – owca	agregacja po 1 blastomerze 1/4 w pustej osłonce przejrzystej; agregacja 4 zarodków 8-blastomerowych (3:1) bez osłonki przejrzystej; iniekcja węzła zarodkowego do jamy blastocysty	urodzone żywe zwierzęta: widoczny zewnętrzny chimeryzm, w jednym przypadku również chimeryzm białek krwi	(49)
	agregacja blastomerów pochodzących z zarodków 8-12-blastomerowych (w sumie ~ 10, w stosunku 1:1), w bydłych osłonkach przejrzystych	urodzony żywy samiec: widoczny zewnętrzny chimeryzm, chimeryzm białek krwi	(50)
koń – osioł	agregacja pojedynczych blastomerów lub grup blastomerów pochodzących z zarodków 2-8-blastomerowych, w bydłych osłonkach przejrzystych	rozwój opóźnionego pęcherzyka zarodkowego do 60. dnia ciąży: chimeryzm nie był potwierdzany	(45)
krowa – owca	agregacja blastomerów 1/8; agregacja blastomerów 1/8 + 1/4	urodzone żywe zwierzęta: chimeryzm sierści i tkanek wewnętrznych	(51)
<i>Bos taurus</i> – <i>Bos indicus</i>	iniekcja blastomerów do jamy blastocysty	urodzone zwierzę: chimeryzm białek krwi	(46)

Uzyskano również chimery między normalnymi a hybrydowymi (owczo x kozimi) zarodkami: urodziły się zwierzęta chimerowe, z udziałem komórek hybrydowych, podczas kiedy same zarodki hybrydowe nie mogą się rozwijać aż do urodzenia (52). Stworzenie chimery owczo-koziej umożliwiło zniesienie bariery reprodukcyjnej między tymi gatunkami, ponieważ dzięki chimeryzmowi zarodek-łożysko możliwe jest urodzenie koźląt z owczej matki (53) i jagniąt urodzonych przez kozę (49).

5. Markery chimeryzmu

Aby stwierdzić czy zarodek lub dorosły organizm podejrzewany o chimeryzm jest rzeczywiście chimera, konieczna jest identyfikacja markerów specyficznych dla jego komponentów. Pozwalają one ponadto ocenić, jakie są proporcje różnych składników organizmu chimerowego oraz jaki jest ich rozkład przestrzenny.

Już w latach siedemdziesiątych Anne McLaren postulowała czym powinien się odznaczać idealny marker. Powinien on być niespecyficzny tkankowo (występować we wszystkich komórkach ciała zwierzęcia), autonomiczny komórkowo (nie ulegać sekcji na zewnątrz), łatwy do wykrycia (zarówno *in vitro* jak *in vivo*), występujący w wielu wariantach, pozwalając na rozróżnienie np. zwierząt różnych szczepów oraz nie wpływać na rozwój (w przypadku markerów sztucznie wprowadzanych do komórek). McLaren zauważyła, że taki marker nie istnieje. Dlatego w zależności od gatunku i poszukiwanej informacji stosuje się tak różnorodne metody jak analiza mikrosatelitarna DNA genomowego, badanie różnic w ekspresji antygenów zgodności tkankowej (rozpoznawanie przez wyznakowane przeciwciała lub sprawdzanie przez przyjęcie lub odrzucenie przeszczepu skóry), identyfikacja markerów chromosomowych i wiele innych.

Pierwszym zastosowanym i zarazem wciąż bardzo dobrym markerem jest pigmentacja, ponieważ umaszczenie i kolor oczu są łatwe do zaobserwowania wkrótce po urodzeniu. Kolor sierści potomstwa zwierząt podejrzewanych o chimeryzm wskazuje czy chimeryzm dotyczy linii płciowej. Ważnym markerem, szczególnie w przypadku chimer międzygatunkowych, są różnice morfologiczne – wygląd zewnętrzny dorosłych organizmów, a także komórek we wczesnych zarodkach.

Ze stosowanych wspólnie markerów warto wymienić elektroforetyczne warianty enzymów – przede wszystkim izozymy GPI (ang. *glucose phosphate isomerase*, izomeraza glukozyfosforanowa), enzymu szlaku glikolizy (54). Dużą popularność zyskują obecnie markery transgeniczne. Nie występują one zwykle w wielu wariantach, ale są wprowadzane metodami transgenezy do konkretnych zarodków bądź linii komórek, które w ten sposób są łatwe do odróżnienia od linii dzikich. Wymienić tu należy przede wszystkim komórki z wprowadzonym bakteryjnym genem *lacZ* (ROSA β – geo 26, ang. *reverse orientation splice acceptor* β -gal), którego ekspresja jest łatwa do wykrywania metodami histochemicznymi na preparatach histologicznych. Gen ten ulega ekspresji we wszystkich tkankach myszy szczepu ROSA26 (55). Na szczególną uwagę zasługuje gen białka GFP (ang. *green fluorescent protein*, białko zielono fluoryzujące) ponieważ jego ekspresja może być wykrywana na podstawie fluorescencji zarówno *in vitro* jak *in vivo*, a jednocześnie nie wpływa on na rozwój zarodków ssaków (56-58). Jest on zatem bardzo bliski definicji idealnego markera. Ekspresja wielu innych transgenów, jak np. TgN(Hbb-b1)83Clo (59) może być wykrywana *in situ* metodą hybrydyzacji DNA-DNA. Warto również wspomnieć o barwniku PKH26, cząsteczce alifatycznej, wbudowującej się w błony komórkowe, łatwo wykrywanej przez kilka dni zarówno *in vitro* jak *in vivo* (60). Znacznik ten jest z powodzeniem stosowany jako krótkotrwały marker chimeryzmu w zarodkach bydłych (61), a także w prowadzonych w naszym laboratorium badaniach nad możliwością uzyskania u myszy chimer przy udziale komórek somatycznych.

Tworzenie chimer międzygatunkowych pozwala na identyfikację wielu markerów, we wszystkich tkankach, a jeśli gatunki te są blisko spokrewnione, to „różnogatunkowość” nie upośledza rozwoju zwierzęcia.

6. Wykorzystanie zwierząt chimerowych

Pierwsze doświadczenia wykorzystujące zarodki chimerowe były jednym z powodów na działanie regulacyjnego modelu rozwoju zarodka ssaków (na przykładzie myszy). Dalsze prace wniosły nowe informacje na temat liczby komórek koniecznych do powstania zarodka, czynników różnicowania komórek węzła zarodkowego i trofoblastu (hipoteza inside – outside; [62]), regulacji wielkości zarodka oraz determinacji płci.

Obecnie chimery są wykorzystywane nie tylko w badaniach podstawowych, ale również w naukach stosowanych – medycynie i hodowli zwierząt. Wciąż są bardzo

użytecznym narzędziem w badaniach nad rozwojem ssaków, szczególnie możliwości rozwojowych i losów komórek w zarodku, ale oddają również usługi w genetyce, pozwalając na identyfikację działania genów (63).

Eksperymentalne tworzenie wtórnego chimeryzmu szpiku kostnego u zwierząt laboratoryjnych przyczyniło się do poznania możliwości adaptacyjnych i rozwojowych komórek macierzystych szpiku. Dzięki temu możliwe jest dzisiaj powszechne stosowanie przeszczepów szpiku kostnego (a tym samym tworzenie chimeryzmu szpikowego) w medycynie ludzkiej.

Najważniejszym zastosowaniem dla chimerowych zarodków ssaków jest obecnie, jak się wydaje, otrzymywanie zwierząt transgenicznych. Komórki (pierwotne komórki zarodkowe, komórki macierzyste) w hodowli *in vitro* można stosunkowo łatwo poddawać transfekcji (metoda ta jest bardziej wydajna niż mikroiniekcja transgenu do przedjądrzy zygot), a następnie tworzyć chimery z ich udziałem (64). Jeśli wprowadzone komórki dadzą początek linii komórek płciowych, to w potomstwie otrzymanych zwierząt chimerowych znajdą się osobniki w pełni transgeniczne.

Dzięki zastosowaniu technik klonowania chimerowego można uzyskać zwierzęta transgeniczne bezpośrednio z komórek z hodowli *in vitro*, bez potrzeby oczekiwania na potomstwo chimer. Pierwsze tego typu doświadczenia (13) polegały na agregacji blastomerów 1/4 lub 1/8 z blastomerami pochodzącymi z innych zarodków w tym samym stadium, jednak w ten sposób, że blastomery „klonowane” znajdowały się w środku agregatu, i to one z większą częstością tworzyły tkanki zarodka. Obecnie do tego celu używa się chimer złożonych z komponentu normalnego oraz tetraploidalnego lub partenogenetycznego. Zarodki partenogenetyczne (65,66) i tetraploidalne (67-69) mogą się rozwijać do stadium poimplantacyjnego, ale nigdy aż do momentu urodzenia. Dlatego są one dobrym nośnikiem dla pierwotnych komórek zarodkowych, zapewniając im odpowiednie środowisko dla rozwoju na wczesnym etapie. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że przydatniejsze są do tego celu zarodki tetraploidalne (np. otrzymywane przez fuzję obu blastomerów 1/2 lub blokowanie cytokinezy jednego z podziałów bruzdkowania). W chimerach diploidalno-tetraploidalnych komórki tetraploidalne są stopniowo eliminowane z tkanek pochodzących z węzła zarodkowego (70). W dojrzałym płodzie pozostają one jedynie w strukturach pozazarodkowych pochodzących z trofoblastu, podczas gdy nawet w dorosłym organizmie chimer partenogenetyczno normalnych pozostaje część komórek partenogenetycznych (71). Inną metodą klonowania chimerowego może być tworzenie chimer „węzeł-trofoblast” przez wprowadzanie fragmentów morul, węzłów zarodkowych lub komórek z hodowli *in vitro* do pęcherzy trofoblastycznych (28,72,73).

Tworzenie zarodków chimerowych umożliwia analizowanie przebiegu różnicowania komórek w normalnym rozwoju, jak również ich ewentualnego odróżnicowania i transdyferencjacji. W wyniku agregacji pierwotnych komórek zarodkowych z blastomerami tetraploidalnymi (74), a także wprowadzania komórek pierwotnych do pęcherzy trofoblastycznych, uzyskano myszy wywodzące się całkowicie z tych

komórek, co dowodzi ich totipotencji. W ostatnich latach przeprowadzono badania z wykorzystaniem metodyki klonowania chimerowego, które rzucają nowe światło na możliwości rozwojowe komórek macierzystych, pochodzących z dorosłych tkanek. Macierzyste komórki nerwowe pochodzące z mózgu dorosłych myszy po wprowadzeniu do jamy owodni zarodka kury i jamy blastocysty zarodka mysiego uczestniczyły w tworzeniu płodów, a potomstwo tych komórek znajdowano w tkankach pochodzących ze wszystkich listków zarodkowych (75). Ostatnio dowiedziono, poprzez wstrzykiwanie komórek MAP (ang. *multipotent adult progenitor cells*) do mysich blastocyst, że komórki te mogą uczestniczyć w tworzeniu tkanek wywodzących się ze wszystkich listków zarodkowych (76).

Genetycy dysponują już wieloma szczepami mutantów, ale konieczne jest znalezienie sposobu na analizę fenotypu. Obserwowanie mutantów typu „knock-out” nie zawsze daje pełny obraz działania genu, możliwe jest jednak tworzenie chimer pomiędzy zarodkami o fenotypie zmutowanym a dzikim. Analiza chimerowa może ujawnić pierwotne miejsca działania genu, bez konieczności przyjmowania założeń *a priori* w oparciu na wzorcu ekspresji danego genu. Wyparcie zmutowanych komórek z jednej tkanki w organizmie chimerowym oznacza prawdopodobnie, że w tej tkance zachodzi ekspresja tego genu w normalnym rozwoju. Jeśli defekt genetyczny powoduje śmierć zarodka lub nienormalny rozwój całego organu, to analiza fenotypu samego mutantu nie jest wystarczająca, gdyż fenotyp takiego organizmu odzwierciedla już pierwsze zaburzenia w funkcjonowaniu genu w rozwoju. W przypadku mutacji letalnych, szczególnie tych, które powodują zatrzymanie rozwoju na wczesnym etapie, połączenie komponentu zmutowanego z dzikim pozwala na rozwój takiego zarodka, a tym samym na badanie dalszego losu komórek zmutowanych. Procedura taka nazywa się „ratowaniem letalnych fenotypów”. Umożliwia ona również sprawdzenie czy wczesna letalność zarodków związana jest z tkankami zarodka czy ze strukturami pozazarodkowymi (dzięki tworzeniu chimer węzeł-trofoblast), w jakiej tkance lub organie działa badany gen, a także czy jego działanie jest autonomiczne komórkowo. Jest to ważna informacja, której nie można uzyskać przez obserwację fenotypu zmutowanych zwierząt, gdyż często efekt działania genu obserwuje się w innej tkance lub narządzie niż w tej, w której następuje jego ekspresja.

Dokładniejszą, ale bardziej skomplikowaną modyfikacją tego systemu jest metoda komplementacji blastocyst (ang. *blastocyst complementation assay*). Komórki wprowadzane są do zarodków, które są niezdolne do tworzenia pewnych linii komórek. Te właśnie linie pochodzą w dorosłym zwierzęciu tylko z wprowadzonych komórek, podczas gdy inne mogą mieć pochodzenie mieszane.

Chociaż pierwsze chimerowe zarodki ssaków uzyskano eksperymentalnie ponad 40 lat temu, badania nad chimeryzmem wciąż zajmują ważne miejsce w biologii. Niektóre z pierwszych, doskonałych w swej prostocie technik, są wciąż stosowane, inne zostały z biegiem czasu udoskonalone. Przez wiele lat doświadczenia przeprowadzane na organizmach chimerowych dostarczały przede wszystkim informacji na

temat rozwoju zarodkowego i różnicowania. Dysponując metodami współczesnej biotechnologii możemy obecnie prowadzić nowe badania nad chimeryzmem, poszerzając wiedzę z innych dziedzin biologii eksperymentalnej i pracując nad jej wdrożeniem w naukach stosowanych.

Podziękowania

Bardzo dziękuję Pani doktor Karasiewicz i Panu profesorowi Modlińskiemu za krytyczne uwagi dotyczące tego artykułu.

Literatura

1. McLaren A., (1976), in: *Mammalian chimeras*, Cambridge Univ. Press, England.
2. Tarkowski A. K., (1961), *Nature*, 190, 857-860.
3. Mintz B., (1967), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 58, 344-351.
4. Ford C. E., (1969), *Br. Med. Bull.*, 25, 104-109.
5. Modliński J. A., (1970), *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 23, 539-547.
6. Russel L. B., Woodiel F. N., (1966), *Cytogenetics*, 5, 106-119.
7. Zuelzer W. W., Beattie K. M., Reisman L. E., (1964), *Am. J. Hum. Genet.*, 16, 38-51.
8. Gartler S. M., Waxman S. H., Giblett R., (1962), *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, 48, 332-335.
9. Owen R. D., (1945), *Science*, 102, 400-401.
10. Rejduch B., Słota E., Gustavson I., (2000), *Theriogenology*, 54, 621-627.
11. Fejer T., Kovacs A., (1980), in: *Proceedings of 4th Eur Colloq Cytogenet Domest Anim*, Uppsala Sweden, 94-98.
12. Mintz B., (1962), *Am. Zool.*, 2, 432.
13. Kelly S. J., (1977), *J. Exp. Zool.*, 200, 365-376.
14. Stewart C. L., (1982), *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 67, 167-179.
15. Fuji J. T., Martin G. R., (1983), *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 74, 79-90.
16. Menino A. R., Wright R. W. Jr., (1983), *Biol. Reprod.*, 28, 433-436.
17. Modliński J. A., (1997), w: *Biotechnologia zwierząt*, red. Zwierzchowski L., Jaszczak K., Modliński J. A., 353-430, PWN, Warszawa.
18. Moor R. M., Cragle R. G., (1971), *J. Reprod. Fertil.*, 27, 401-404.
19. Willadsen S. M., (1979), *Nature*, 277, 298-300.
20. Willadsen S. M., (1982), in: *Mammalian egg transfer*, Eds. Adams C. E., 185-210, CRC Press, Boca Raton, USA.
21. Gardner R. L., (1968), *Nature*, 220, 596-597.
22. Gardner R. L., (1998), *BioEssays*, 20, 168-180.
23. Rossant J., Vijn K. M., (1980), *Dev. Biol.*, 76, 475-482.
24. Thomson J. A., Solter D., (1988), *Genes. Dev.*, 2, 1344-1351.
25. Gardner R. L., Johnson M. H., (1973), *Nature New Biol.*, 246, 86-89.
26. Gardner R. L., Papaioannou V. E., Barton S. C., (1973), *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 30, 561-572.
27. Papaioannou V. E., (1982), *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 68, 199-209.
28. Modliński J. A., (1995), *Pr. i Mater. Zoot. Zesz. Spec.* 4.
29. Gardner R. L., Nichols J., (1991), *Hum. Reprod.*, 6, 25-35.
30. Moustafa L. A., Brinster R. L., (1972), *J. Exp. Zool.*, 181, 181-192.
31. Moustafa L. A., Brinster R. L., (1972), *J. Exp. Zool.*, 181, 193-202.
32. Babinet C., (1980), *Exp. Cell Res.*, 130, 15-19.
33. Papaioannou V. E., (1981), *Tech. Life Sci.: Physiol.*, P1, 116/1-27.
34. West J. D., (1999), *Curr. Topics in Dev. Biol.*, 44, 21-67.

35. Piedrahita J. A., Gillespie L., Maeda N., (1992), *Biol. Reprod.*, 47, 347-354.
36. Mayer J. F. Jr, Fritz H. I., (1974), *J. Reprod. Fertil.*, 39, 1-9.
37. Yamamura K., Markert C. L., (1981), *Dev. Genet.*, 2, 131-146.
38. Klein M. S., Markert C. L., (1981), *J. Exp. Zool.*, 218, 183-193.
39. Giles J. R., Yang X., Mark W., Foote R. H., (1993), *Mol. Reprod. Dev.*, 36, 130-138.
40. Schoonjans L., Albright G. M., Li J-L., Collen D., Moreadith R. W., (1996), *Mol. Reprod. Dev.*, 45, 439-443.
41. Pighills E., Hancock J. L., Hall J. G., (1968), *J. Reprod. Fert.*, 17, 543-547.
42. Brem G., Tenhumberg H., Kraußlich H., (1984), *Theriogenology*, 22, 609-613.
43. Onishi A., Takeda K., Akita T., Hanada H., (2000), *Theriogenology*, 50, 237.
44. Rossant J., Frels W. I., (1980), *Science*, 208, 419.
45. Pashen R. L., Willadsen S. M., Anderson G. B., (1987), *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 35, 693-694.
46. Summers P. M., Shelton J. N., Bell K., (1983), *Anim. Reprod. Sci.*, 6, 91-102.
47. Mystkowska E. T., (1975), *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 33, 731.
48. Stern M. S., (1973), *Nature*, 243, 472.
49. Fehilly C. B., Willadsen S. M., Tucker E. M., (1984), *Nature*, 307, 634-636.
50. Członkowska M., Guskiewicz A., Papis K., Kossakowski M., Dziak J., Stężycka E., (1988), *Med. Wet.*, 44, 414-416.
51. Fehilly C. B., Willadsen S. M., (1986), in: *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, 8, Ed. Clarke C. L., 379-413.
52. Roth T. L., Anderson G. B., Bon-Durant R. H., Pashen R. L., (1989), *Biol. Reprod.*, 41, 675-682.
53. Meinecke-Tillmann S., Meinecke B., (1984), *Nature*, 307, 637-638.
54. Chapman V. M., Ansell J. D., McLaren A., (1972), *Dev. Biol.*, 29, 48-54.
55. Friedrich G., Soriano P., (1991), *Genes Dev.*, 5, 1513-1523.
56. Ikawa M., Kominami K., Yoshimura Y., Tanaka K., Nishimune Y., Okabe M., (1995), *Dev. Growth Differ.*, 37, 455-459.
57. Takada T., Iida K., Awaji T., Itoh K., Takahashi R., Shibui A., Yoshida K., Sugano S., Tsujimoto G., (1997), *Nature Biotechnol.*, 15, 458-461.
58. Żernicka-Goetz M., Pines J., Hunter S. M., Dixon J. P. C., Siemering K. R., Haseloff J., Evans M. J., (1997), *Fertil. Steril*, 40, 841-843.
59. Lo C., (1983), *Mol. Cell. Biol.*, 3, 1803-1814.
60. Horan P. K., Slezak S. E., (1989), *Nature*, 340, 167.
61. Rho G.-J., Kang T. Y., Kochhar H. P. S., Hahnel A. C., Betteridge K. J., (2001), *Mol. Reprod. Dev.*, 60, 202-207.
62. Tarkowski A. K., Wróblewska J., (1967), *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 18, 155-180.
63. Rossant J., Spence A., (1998), *Trends Genet.*, 14, 358-363.
64. Bishop J., (1999), in: *Transgenic mammals*, Pearson Education Limited, Harlow.
65. van Blerkom J., Runner M. N., (1976), *J. Exp. Zool.*, 196, 113-123.
66. Kaufman M. T., Barton S. C., Surani M. A., (1977), *Nature*, 265, 53-55.
67. Snow M. H. L., (1973), *Nature, Lond.*, 244, 513-515.
68. Snow M. H. L., (1975), *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 35, 81-86.
69. Tarkowski A. K., Witkowska A., Opas J., (1977), *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 41, 47-64.
70. Lu T-Y., Markert C. L., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 6012-6016.
71. Stevens L. C., Varnum D. S., Eicher E. M., (1977), *Nature*, 269, 515-517.
72. Modliński J. A., Ozil J-P., (1987), in: *Future Aspects in Human in vitro Fertilization*, Ed. Feichtinger W., Kemeter P., 225-231, Springer Verlag Berlin, Heidelberg.
73. Modliński J. A., Górniewska M., Modlińska M. K., Reed M. A., Wagner T. E., Karasiewicz J., (2003), *Theriogenology*, 59, 357.
74. Nagy A., Gocza E., Merentes Diaz E., Prideaux V.R., Ivanyi E., Markkula M., Rossant J., (1990), *Development*, 110, 815-821.
75. Clarke D. L., Johansson C. B., Wilbertz J., Veress B., Nilsson E., Karlstrom H., Lendahl U., Frisen J., (2000), *Science*, 288, 1660-1663.

76. Jiang Y., Jahagirdar B. N., Reinhardt R. L., Schwartz R. E., Keene C. D., Ortiz-Gonzalez X. R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W. C., LargaEspada D. A., Verfaillie C. M., (2002), *Nature*, 418, 41-49.
77. Tucker E. M., Moor R. M., Rowson L. E. A., (1974), *Immunology*, 26, 613-621.
78. Butler J. E., Anderson G. B., BonDurant R. H., Pashen R. L., Penedo M. C. T., (1987), *J. Anim. Sci.*, 65, 317-324.
79. Cibelli J. B., Stice S. L., Kane J. J., Golueke P. G., Jerry J., Dickinson E. S., Gao X. Y., Ponce de Leon A., Robl J. M., (1997), *Theriogenology*, 47, 241.
80. Picard L., Chartrain I., King W. A., Betteridge K. J., (1990), *Mol. Reprod. Dev.*, 27, 295-304.
81. Iwasaki S., Campbell K. H. S., Galli C., Akiyama K., Iwasaki S., (2000), *Biol. Reprod.*, 62, 470-475.