



## Różnice gatunkowe w klonowaniu somatycznym zwierząt gospodarskich

Maria Skrzyszowska

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

### Species differences in somatic cloning of farm animals

#### Summary

Similar schemes of nuclear transfer technique are applied for farm animal cloning, however, there are some differences between particular species. These differences concern not only procedural aspects, but also the "genetic age" of cloned animals.

#### Key words:

somatic cloning, farm animals, specific differences.

### 1. Wprowadzenie

Spektakularny wynik eksperymentu Wilmuta i wsp. (1) jakim było uzyskanie owcy z zarodka zrekonstruowanego z jądra komórki somatycznej wywołał powszechne zainteresowanie klonowaniem somatycznym jako dziedziną biotechnologii. Okazało się bowiem, że możliwe jest przeprogramowanie jądra zróżnicowanej komórki somatycznej i przywrócenie mu statusu jądra sprzed rozpoczęcia procesu różnicowania, a zatem jądra w pełni totipotentnego, zdolnego do pokierowania rozwojem zrekonstruowanego zarodka. Świadczy to, że inaktywowane w procesie różnicowania komórkowego geny mogą być ponownie reaktywowane w środowisku cytoplazmatycznym oocytu-biorcy. Tym samym obalony został dogmat o nieodwracalności procesów różnicowania komórkowego.

Technika klonowania somatycznego wykorzystywana jest obecnie na wielu gatunkach ssaków, w tym na gatunkach zwie-

#### Adres do korespondencji

Maria Skrzyszowska,  
Zakład Fizjologii Rozrodu  
Zwierząt,  
Instytut Zootechniki,  
32-083 Balice,  
k. Krakowa.

rząt gospodarskich. Wykorzystywanie tej techniki do klonowania zwierząt gospodarskich ma ścisły związek nie tylko z możliwością multiplikacji genetycznie identycznych osobników szczególnie tych o wartościowych dla hodowli genotypach, ale przede wszystkim z możliwością uzyskiwania zwierząt transgenicznych, czyli zwierząt o zmodyfikowanych genomach, cennych ze względu na produkt ekspresji zmodyfikowanych genów. Atrakcyjność poszczególnych gatunków zwierząt gospodarskich uzależniona jest w tym przypadku od możliwości aplikacyjnych produktu zmodyfikowanego genu. Od tego bowiem przede wszystkim zależy skala i zasięg prowadzonych badań. Mimo że pierwszym sklonowanym zwierzęciem była owca to znacznie większy zasięg miały badania prowadzone na bydło (2-5), a w ostatnich dwóch latach badania koncentrują się głównie na świniami (6-8). Transgeniczne krowy (9), owce (10,11) i kozy (12) mogą i powoli stają się żywymi fabrykami produkującymi i dostarczającymi ludzkie białka terapeutyczne. Natomiast atrakcyjność klonowania świń wiąże się z możliwością wykorzystania organów transgenicznych świń jako alternatywnego źródła organów w transplantologii u ludzi. Ksenotransplantacja z wykorzystaniem świńskich organów, najbardziej kompatybilnych z organami ludzkimi ze względu na wielkość i wydolność fizjologiczną, jest niezwykle obiecującą perspektywą transplantologii. Jednak główną barierą w uzyskaniu znaczącego postępu w transplantacji organów świńskich jest obecność  $\alpha$ -1,3-galaktozylowych epitopów na powierzchni świńskich komórek odpowiedzialnych za nadostre odrzucanie ksenoprzeszczepów. Próby unieczynnienia genu  $\alpha$ -1,3-galaktozylowej transferazy (GGTA1) prowadzono już na innych gatunkach zwierząt. Udało się na przykład uzyskać żywe myszy ze znokautowanym genem  $\alpha$ -1,3-galaktozylotransferazy przy wykorzystaniu zmodyfikowanych komórek macierzystych (13). U owiec również możliwa była skuteczna delecja dwóch niezależnych *loci* tego genu w fibroblastach płodowych wykorzystanych w procedurze klonowania jako dawców jąder komórkowych (14). Z wymienionych powodów podstawę do optymizmu stwarzają ostatnie doniesienia Lai i wsp. (15), a także Dai i wsp. (16). Autorzy z obu zespołów uzyskali ogółem 9 sklonowanych prosiąt, u których locus jednego allele genu GGTA1 udało się znokautować w fibroblastach płodowych i wykorzystać tak zmodyfikowane komórki somatyczne w procedurze klonowania. Implikacją nokautu określonych genów świńskich będzie zatem obniżenie bariery immunologicznej u biorcy ksenogenicznego organu, co w oczywisty sposób przyczynić się może do osłabienia reakcji odrzucania ksenoprzeszczepu.

Efektywność klonowania somatycznego jest wciąż mało satysfakcjonująca, nie przekracza na obecnym etapie 1-3% urodzonych zwierząt w stosunku do liczby zrekonstruowanych zarodków. Występują jednak pewne różnice w podatności na stosowane procedury klonowania między poszczególnymi gatunkami zwierząt gospodarskich. Do niedawna świnia uważana była za gatunek szczególnie trudny do wszelkich pozaustrojowych manipulacji embriologicznych czy genetycznych. Mimo ogromnego postępu osiągniętego w ostatnich dwóch latach, rezultaty osiągane w rekonstrukcji zarodków świńskich w dalszym ciągu są znacznie gorsze niż u bydła, owcy

i kozy, a jakość zarodków świńskich oceniana na podstawie liczby komórek w blastocystyce ustępuje znacznie jakości zarodków u pozostałych gatunków zwierząt gospodarskich.

## 2. Inicjacja zarodkowej aktywności transkrypcyjnej

Przy rozważaniu efektywności klonowania początkowo zwracano uwagę na moment aktywacji genomu zarodkowego czyli moment wyjścia spod kontroli matczynej i rozpoczęcia własnej aktywności transkrypcyjnej. Uważano, że przekroczenie tego progu powoduje poważne restrykcje ograniczające w istotny sposób możliwość przemodelowania egzogennych jąder komórkowych. U różnych gatunków zwierząt gospodarskich moment rozpoczęcia transkrypcji zarodkowej ma miejsce na nieco innym etapie rozwoju zarodkowego. Najwcześniej uaktywnia się genom zarodka świńskiego, bo już na etapie 4-komórkowego stadium, natomiast u bydła, owcy czy kozy ma to miejsce po kolejnych, jednym lub dwóch, cyklach podziałowych (stadium 8-16-komórkowe). Dość długo przyjmowano ten moment jako istotny czynnik limitujący efektywność klonowania, praktycznie wykluczający możliwość pełnego rozwoju rekonstruowanych zarodków. Aktywacji genomu zarodkowego towarzyszy pojawienie się bloku rozwojowego, który jakkolwiek ma charakter odwracalny, bywa jednak dla rekonstruowanych zarodków trudny do pokonania. Do jego utrwalenia przyczynić się mogą suboptymalne warunki hodowli *in vitro*, które indukują wadliwy czy niekompletny wzorzec ekspresji genów w rekonstruowanych zarodkach. Przykłady pełnego przemodelowania i przeprogramowania jąder komórek somatycznych potwierdzone u wszystkich gatunków zwierząt gospodarskich świadczą jednak, że moment rozpoczęcia aktywności transkrypcyjnej przez zarodek nie może być czynnikiem limitującym rozwój rekonstruowanych zarodków i raczej w sferze dotyczącej innych czynników należy szukać przyczyn niskiej efektywności procedur klonowania somatycznego.

## 3. Typy komórek somatycznych dawców jąder komórkowych

Różnice gatunkowe w procedurze klonowania somatycznego zwierząt gospodarskich odnoszą się m.in. także do rodzaju komórek somatycznych wykorzystywanych jako dawcy jąder komórkowych. Pod tym względem najwięcej rodzajów komórek somatycznych przetestowanych było w klonowaniu somatycznym bydła. Były to komórki zarówno o zdefiniowanym fenotypie, np. komórki pęcherzykowe – w tym komórki wzgórka jajonośnego (4,17,18), komórki ziarniste pochodzące ze ściennej warstwy pęcherzyka jajnikowego (2), komórki nabłonkowe jajowodu i macicy (4,18) oraz komórki nabłonkowe gruczołu mlecznego wyizolowane z siary (19), a także leukocyty krwi obwodowej (20) – jak też komórki, których fenotyp i pochodzenie

nie zawsze były dokładnie zdefiniowane. Na ogół były to komórki o morfologii fibroblastów, wyprowadzane z różnych tkanek osobników dorosłych, głównie z fragmentów tkanki usznej czy skóry (18,19), mięśnia najdłuższego grzbietu (17,21) i narządów (22), jak również z fragmentów tkanek płodowych (23).

Stosunkowo niewiele rodzajów komórek somatycznych przetestowano u pozostałych gatunków zwierząt gospodarskich. Zarówno u owiec, kóz i świń najczęściej wykorzystywane były fibroblasty płodowe (10,12, 24-26), w znacznie mniejszym zakresie wykorzystywano komórki pochodzące z tkanek osobników dorosłych, u owcy były to komórki wyprowadzone z gruczołu mlecznego (1), u świń wybór ograniczał się do komórek pęcherzykowych (27,28). W badaniach własnych (29) do rekonstrukcji oocytów kozich użyto komórek fibroblastycznych wyprowadzonych z tkanki usznej dorosłego osobnika. Fibroblasty płodowe posiadają jednak tę zaletę, że ich żywotność w hodowli *in vitro* jest znacznie dłuższa w porównaniu z komórkami wyprowadzonymi z dorosłych organizmów, ma to istotne znaczenie w przypadku poddawania komórek modyfikacjom genetycznym (transfekcjom na poziomie hodowli *in vitro*) wymagających długotrwałych hodowli *in vitro* wynikających z konieczności selekcji populacji komórek o sprawdzonej ekspresji modyfikowanego genu i kolejnego ich namnażania w hodowli *in vitro*.

#### 4. Synchronizacja cykli komórkowych dawców jąder komórkowych

Synchronizacja cyklu komórkowego w fazie G0/G1 populacji komórek somatycznych dawców jąder komórkowych w procedurze klonowania somatycznego odgrywa istotną rolę w prawidłowym przeprogramowaniu egzogenego jądra w środowisku cytoplazmatycznym oocytu-biorcy (30). Wprowadzenie komórki somatycznej w fazę spoczynkową jaką jest faza G0, przy wykorzystaniu różnych metod synchronizacji cyklu komórkowego, powoduje „wyciszenie” jej genów wskutek zahamowania ich aktywności transkrypcyjnej. Represja transkrypcyjna genów może być spowodowana czynnikami zadanymi eksperymentalnie lub występować naturalnie po osiągnięciu przez komórkę stanu pełnego zróżnicowania. „Wyciszone” geny po wprowadzeniu do oocytu-biorcy prawidłowo reagują na sygnały płynące ze środowiska cytoplazmatycznego, co umożliwia pełne przeprogramowanie egzogenego jądra (31). Obecnie opracowanych jest już kilka sposobów synchronizacji komórek w określonej fazie cyklu komórkowego. Jednym z najczęściej stosowanych sposobów synchronizacji cyklu komórkowego w fazie G0/G1 jest „głodzenie” komórek somatycznych w hodowli *in vitro* poprzez drastyczne obniżenie poziomu surowicy w medium hodowlanym. Ta metoda synchronizacji cyklu komórkowego wykorzystywana była w procedurze klonowania wszystkich opisywanych w tym artykule gatunków zwierząt gospodarskich (1,30,34). Jednakże u świń, profil metylacji DNA w głodzonych komórkach somatycznych zmienia się tak zasadniczo, że przywrócenie prawidłowego wzorca metylacji po wprowadzeniu jądra komórkowego do cytoplazmy

oocytu-biorcy staje się niemożliwe, a tym samym niemożliwe staje się pełne prze-programowanie egzogenego jądra (cyt. za 32). Głodzone komórki wykorzystywane były jednak pomyślnie do klonowania zarówno owcy (1,10), kozy (12,24,33), jak i bydła (2,34). Być może to właśnie specyfika gatunkowa objawiająca się wyjątkową wrażliwością świńskich komórek sprawiła, że u tego gatunku metoda głodzenia powodowała znaczne obniżenie żywotności komórek poprzez nieodwracalne blokowanie ich jąder w interfazie. Onishi i wsp. (35) zaproponowali alternatywną do głodzenia metodę synchronizacji świńskich komórek somatycznych w fazie G0/G1 polegającą na ich hodowli *in vitro* do stanu pełnej konfluencji. Inhibicja kontaktowa pojawiająca się z chwilą całkowitego opanowania powierzchni hodowlanej naczynia przez komórki somatyczne, uniemożliwiająca dalsze podziały komórkowe, doprowadza do synchronizacji ich jąder w fazie G0/G1. Inni autorzy wykorzystywali tę metodę z równie dobrym skutkiem (5,6). Do synchronizacji cyklu komórkowego populacji komórek somatycznych wykorzystywane są również metody cytometrii przepływowej umożliwiające odsortowanie populacji komórek G0/G1 od komórek pozostających w innych fazach cyklu komórkowego. Ta metoda wykorzystywana była zarówno na bydłowych (36) jak i świńskich komórkach somatycznych (37). Kolejną możliwość wykorzystania do klonowania somatycznego komórek w fazie G0/G1 stwarzają populacje komórek w naturze występujące w tej fazie cyklu komórkowego. Takimi komórkami są komórki wzgórka jajonośnego jak i leukocyty krwi obwodowej wykorzystane w klonowaniu bydła (4,17,18,20).

## 5. Wprowadzanie jądra komórkowego do cytoplazmy enukleowanego oocytu

Niezwykle istotnym elementem procedury klonowania somatycznego jest wprowadzanie jądra komórki somatycznej do środowiska cytoplazmatycznego oocytu-biorcy. Także i na tym etapie, u poszczególnych gatunków zwierząt gospodarskich można zaobserwować pewne preferencje odnośnie do techniki wprowadzania egzogenego jądra. Wybór techniki niesie za sobą określone konsekwencje, które niewykluczone, że mogą mieć wpływ na potencjał rozwojowy rekonstruowanych zarodków. Pierwszy sposób wprowadzania jądra oparty na fuzji błon plazmatycznych komórki somatycznej i cytoplądu, indukowanej impulsami elektrycznymi powoduje wchłonięcie całej komórki somatycznej w strukturę cytoplądu, co doprowadza do wymieszania cytoplazmy enukleowanego oocytu z cytoplazmą komórki somatycznej wraz z całym „dobrodziejstwem” czynników w nich występujących. Metoda elektrofuzji powszechnie stosowana dotychczas u bydła (2-4,17), owiec (1,10) i kóz (12,24,29), u świń stosowana jest rzadziej (7,16,26). Częściej natomiast u tego gatunku stosowany jest drugi sposób wprowadzania egzogenego jądra, a mianowicie bezpośrednia mikroiniekcja wyizolowanego karioplastu do cytoplazmy enukleowanego oocytu (15,35). W tym przypadku liczba czynników cytoplazmatycznych po-

chodzących z komórki somatycznej jest ograniczona z powodu śladowej ilości wprowadzanej cytoplazmy. Onishi (35), autor pierwszej sklonowanej świni swój sukces upatruje właśnie w ograniczonym wpływie tych czynników na rozwój rekonstruowanych oocytów. Zastosowanie mikroiniekcji jako sposobu do wprowadzenia jądra komórki somatycznej nie pozostaje bez wpływu na czasochłonność całej procedury klonowania. Skraca czas manipulacji, co może mieć również wpływ na kondycję rekonstruowanych zarodków.

## 6. Sztuczna aktywacja rekonstruowanych oocytów

W procedurze klonowania somatycznego szczególnie istotne znaczenie odgrywa sztuczna aktywacja rekonstruowanych oocytów. Występują określone preferencje dotyczące protokołów aktywacyjnych odnoszących się do poszczególnych gatunków zwierząt gospodarskich. Protokoły aktywacyjne dotyczą nie tylko czynnika aktywującego (aktywatora), ale także właściwego momentu zastosowania wybranego aktywatora. Właściwy moment do zainicjowania aktywacji oocytów może zależeć zarówno od czasu wymaganego do ukończenia mejozy i uzyskania cytoplazmatycznej dojrzałości, jak i czasu pojawienia się pierwszych sygnałów starzenia się oocytu. Cytoplazmatyczne dojrzewanie obejmuje prawdopodobnie zmiany właściwości, wielkości i gęstości cytoplazmatycznych kanałów wapniowych koniecznych do wywołania oscylacyjnych fal wapniowych w odpowiedzi na zadziałanie bodźca indukującego aktywację. Aktywacja podobnie jak synchronizacja cykli komórkowych dawców i biorców egzogennych jąder komórkowych należy bowiem do czynników istotnie wpływających na kompetencje rozwojowe rekonstruowanych zarodków. Czynnikiem aktywujący powoduje uwalnianie jonów wapniowych z depozytów wewnątrzkomórkowych lub/i ze środowiska zewnętrznego, które aktywują receptory kinazy tyrozynowej, a ta z kolei aktywuje fosfolipazy, przecinające fosfatydyloinozytolo-4,5-dwufosforan, związek znajdujący się w wewnętrznej błonie komórkowej w wyniku czego powstaje inozytolo-1,4,5-trójfosforan i 1,2-diacetyloglicerol. Trójfosforan inozytolo indukuje otwarcie kanałów wapniowych. Uwolniony wapń wiąże się aktywując kalmodulinę, która z kolei reguluje aktywność wielu enzymów m.in. fosfatazy, kinazy białkowej czy ATP-azy. Optymalnym wzorcem sztucznej aktywacji byłby wzorec zbliżony do naturalnej aktywacji oocytu inicjowanej przez penetrujący plemnik podczas zapłodnienia, który powoduje uwalnianie jonów wapnia w postaci serii powtarzalnych wyrzutów. U różnych gatunków zwierząt gospodarskich stosowane są różne protokoły aktywacji. Różnice dotyczą przede wszystkim preferencji określonych typów aktywatorów. Czy sztuczne metody dostarczają adekwatnych sygnałów do aktywacji? Na pewno problem ten nie jest jeszcze rozstrzygnięty. U bydła dotychczas najczęściej stosowanym protokołem aktywacji była postaktywacja (inicjowana po 2-6 godzinach od wprowadzenia jądra komórkowego do cytoplazmy enukleowanego oocytu) indukowana chemicznie z wykorzystaniem głów-

nie jonomycyny (2) lub nieco rzadziej 7% etanolu (28) jako aktywatorów, po której następowała kilkugodzinna inkubacja w obecności inhibitorów kinaz cyklinozależnych (6-dimetyloaminopuryna; 6-DMAP) lub syntezy białek (cykloheksymid; CH). Jonomycyna mobilizuje w oocytach bydłowych, ale przede wszystkim w oocytach owczych (38) wyłącznie wewnątrzkomórkowe depozyty wapniowe gromadzone w siateczce śródplazmatycznej, inaczej w przypadku świńskich oocytów, tutaj bowiem oprócz uruchamiania zapasów wewnątrzkomórkowych wykorzystywane są także jony wapniowe ze środowiska zewnątrzkomórkowego (35). Etanol indukuje wyrzut wapnia wykorzystując częściowo zapasy wewnątrzkomórkowe jak i jony ze środowiska zewnętrznego oocytu. W przeciwieństwie do bydła u owiec (1), a także u kóz (12,33) przeważa model elektroaktywacji, tzn. te same impulsy elektryczne, które inicjują fuzję komórki somatycznej z beźjądrzastym cytoplazmem równocześnie dają sygnał do aktywacji rekonstruowanych oocytów. Elektroaktywacja powoduje tymczasowe otwarcie porów w błonie plazmatycznej (39), umożliwiające napływ zewnątrzkomórkowego wapnia do komórki, ma to miejsce tylko wówczas gdy pozytywny gradient wapnia występuje. Innymi słowy elektroaktywacja jest możliwa tylko w obecności jonów wapnia w środowisku zewnątrzkomórkowym. Zaskakujące jest to, że pojedynczy wyrzut wapnia indukowany elektroaktywacją w odróżnieniu od powtarzającej się serii fal wapniowych generowanych podczas zapłodnienia jak się okazało był wystarczający dla uzyskania pełnego programu rozwojowego zrekonstruowanych zarodków, kończącego się uzyskaniem potomstwa (35). W znacznie mniejszym zakresie u owiec i kóz stosowana była postaktywacja indukowana czynnikami chemicznymi z wykorzystaniem jonomycyny lub etanolu (24,39). Podobny zresztą model elektroaktywacji jest preferowany u świń, jednakże w odróżnieniu od owiec czy kóz w tym przypadku stosowany jest protokół postaktywacji. Z doświadczeń Zhu i wsp. (40) wynika, że wyższy potencjał rozwojowy zrekonstruowanych świńskich zarodków uzyskano po zastosowaniu wielokrotnych impulsów elektrycznych z równoczesnym jednak obniżeniem parametrów natężenia pola elektrycznego. Impulsy elektryczne były ponadto zadawane w określonych przedziałach czasowych (od kilku do 30 minutowych) dla naśladowania oscylacji wapniowych mających miejsce podczas zapłodnienia. Autorzy ci zaproponowali hipotezę w myśl której założyli, że kombinacja wielokrotnych impulsów i niskiej siły pola elektrycznego może być prawdopodobnie mniej uszkadzająca dla błony plazmatycznej oocytu w porównaniu z jednym impulsem przy dużym natężeniu pola elektrycznego i dlatego taki wariant elektroaktywacji byłby zatem bardziej pożądany.

Stosowane dotychczas protokoły sztucznej aktywacji, mimo pewnej skuteczności, odbiegają jednak jeszcze od optymalnego wzorca aktywacyjnego, występującego podczas zapłodnienia. Nie jest również wykluczony szkodliwy efekt uboczny stosowania chemicznej aktywacji. Ciekawą propozycją pozwalającą na częściowe przynajmniej ominięcie sztucznej aktywacji jest metoda wymiany przedjądrzy (procedura reklonowania) zaproponowana przez Polejaevę (27) do klonowania świń. Efektem zastosowania takiej procedury było uzyskanie pięciu zdrowych prosiąt. Zapewne

jest kwestią czasu zweryfikowanie tej metody także na innych gatunkach zwierząt gospodarskich.

## 7. Hodowla *in vitro* rekonstruowanych zarodków

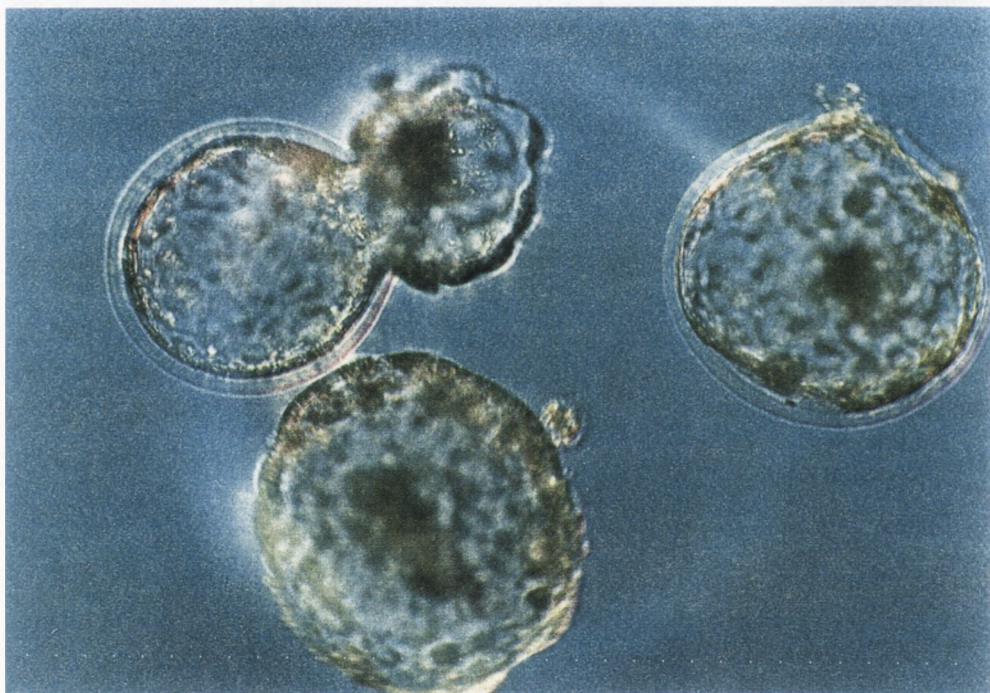
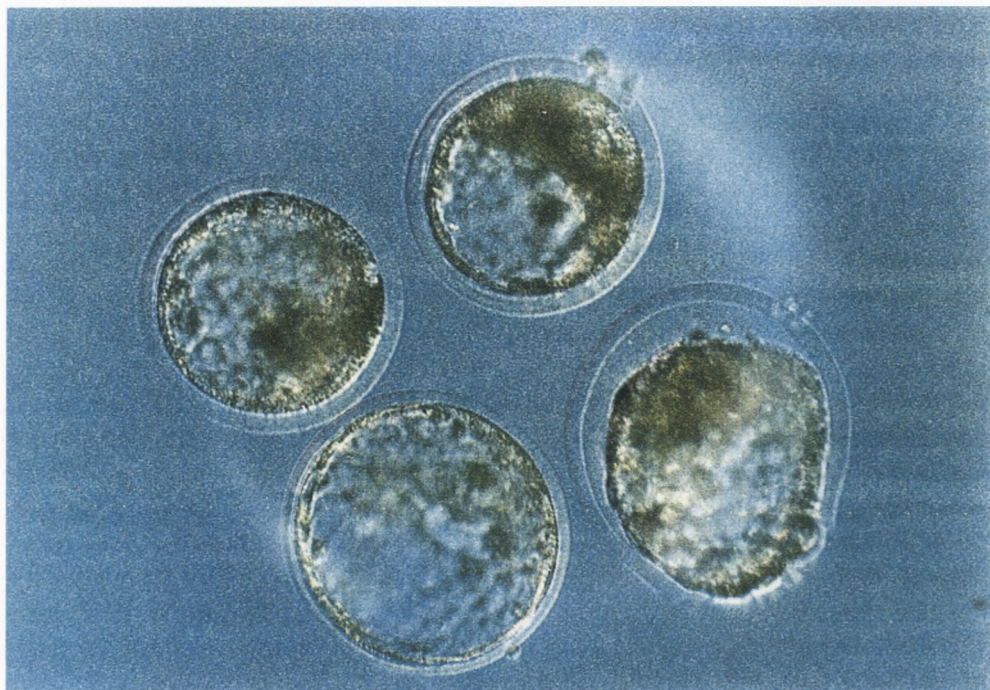
Kolejna istotna różnica występującą w procedurze klonowania somatycznego u poszczególnych gatunków zwierząt gospodarskich dotyczy hodowli *in vitro* zrekonstruowanych zarodków. U bydła cała procedura począwszy od dojrzewania oocytów, hodowli linii komórkowych wykorzystywanych jako dawcy jąder komórkowych, techniki klonowania i hodowli zrekonstruowanych zarodków przez 7-8 dni odbywa się w warunkach *in vitro*. Ta kompleksowa technologia *in vitro*, a zwłaszcza wielodniowa hodowla *in vitro* rekonstruowanych zarodków aż do stadium blastocysty, ma związek z niechirurgicznym sposobem przenoszenia zrekonstruowanych zarodków do macicy krów czy jałówek-biorczyń. U owiec i kóz procedura *in vitro* była znacznie skrócona w porównaniu do bydła. U tych gatunków, a także u świń w niektórych eksperymentach ważnych ze względu na uzyskane potomstwo biorcą egzogennych jąder komórkowych były poowulacyjne oocyty (1,6,21,30), w nielicznych tylko wykorzystano oocyty dojrzałe w warunkach *in vitro* (6,12). Ponadto, okres hodowli *in vitro* rekonstruowanych zarodków kozich i świńskich skrócony był do 33-48 godzin przed transferem zarodków do dróg rodnych samic-biorczyń. W przypadku owcy, hodowla *in vitro* została w wielu przypadkach całkowicie wyeliminowana na rzecz inkubacji zarodków zaraz po rekonstrukcji w podwiązanych jajowodach tzw. pośrednich owiec-biorczyń (1,39). U owiec bowiem i u bydła wcześniejsze badania wykazały występowanie istotnego problemu zwiększonej masy potomstwa po transferze zarodków hodowanych *in vitro* w obecności surowicy (41). Świadczy to o możliwym wpływie warunków hodowli *in vitro* na rozwój płodowy przynajmniej u tych gatunków. Wydaje się jednak, że dotyczy to także świń. Jakość zrekonstruowanych zarodków świńskich hodowanych *in vitro* jest zdecydowanie gorsza od jakości zarodków rozwijających się *in vivo*. Skracanie czasu hodowli *in vitro* do niezbędnego minimum poprawia jakość rekonstruowanych zarodków, a tym samym zwiększa ich kompetencję do pełnego rozwoju.

## 8. Postimplantacyjny rozwój sklonowanych zarodków/pre-i postnatalne problemy

Koza jest gatunkiem zwierząt gospodarskich, u których dotychczas nie zaobserwowano żadnych prenatalnych strat (12,24). W pewnym sensie potwierdzeniem tego są wcześniejsze badania Baguishi'ego i wsp. (33). Autorzy nie stwierdzili utraty płodów po upływie czterdziestu dni ciąży (po potwierdzeniu bicia serca), jakkolwiek przed trzydziestym dniem ciąży obserwowali w dość dużym odsetku formowa-



nie się pęcherzyków, które ulegały resorpcji. Być może u tego gatunku dochodzi do selekcji na znacznie wcześniejszym etapie, a być może brak prenatalnych strat jest związany z gatunkowym fenomenem, ze szczególną zdolnością cytoplazmy oocytów kozich do przeprogramowania egzogennych jąder komórkowych. Ostatnio jednakże, Behboodi i wsp. (42) sugerowali, że co prawda u kóz nie występuje syndrom nadmiernie dużych płodów czy problem anomalii łożyskowych, natomiast podobnie jak u innych gatunków występuje niski odsetek cięż i przypadki okołoporodowych, śmiertelnych powikłań, które mogą świadczyć o występowaniu nie rozpoznanych jeszcze czynników obniżających efektywność klonowania. U świń, potomstwo uzyskiwane z zarodków rekonstruowanych z jąder komórek nie poddawanych genetycznym modyfikacjom było zdrowe (27,35). W tych przypadkach, należy jeszcze wspomnieć, że biorąc egzogennych jąder komórkowych były oocyty dojrzałe *in vivo*. Użycie natomiast transfekowanych komórek somatycznych jako dawców jąder spowodowało pojawienie się śmiertelnych powikłań także u świń (6,15). Modyfikacje genetyczne przeprowadzane na poziomie *in vitro*, jak również system hodowli *in vitro* w znacznym stopniu, jak się wydaje, decydują o kondycji zdrowotnej sklonowanych zwierząt. W przeciwieństwie do tych gatunków, u bydła (43) w pierwszym tryestrze ciąży obserwuje się przeszło 50% straty, większość tych poronień spowodowana jest nieprawidłowym łożyskiem i łożyszczem (placentoma). Do tego dochodzą komplikacje postnatalne (pneumonia, krążeniowe anomalie). W badaniach prowadzonych przez Kato i wsp. (22) potwierdzono występowanie spontanicznych poronień i licznych anomalii rozwojowych u płodów bydłecy jak i nowo narodzonych zwierząt, częstotliwość których była pozytywnie skorelowana z wiekiem dawcy jąder komórkowych. Aczkolwiek jakość sklonowanych zarodków bydłecy ocenianych na poziomie hodowli *in vitro*, w oparciu na kryteriach morfologicznych, jak się wydaje, jest prawidłowa (fot. 1 i fot. 2; badania własne), to ich postimplantacyjny rozwój niesie jednak szereg nieprawidłowości. Na podstawie przeprowadzonej analizy wzorca metylacji DNA w bydłecy komórkach somatycznych, Kang i wsp. (44) sugerują, że występujące u bydła anomalie rozwojowe mogą być właśnie spowodowane niekompletnym epigenetycznym przeprogramowaniem genomu. Różnice występujące w przeżywaniu płodów i nowo narodzonego potomstwa między bydłem, owcą, kozą czy świnią mogą być wynikiem odrębności gatunkowej przejawiającej się specyficzną podatnością określonych gatunków zwierząt na stosowane procedury klonowania.



Fot. 1/Fot. 2. Blastocysty bydłęce uzyskane techniką klonowania somatycznego (fot. M. Skrzyszowska).

## 9. Problem długości telomerów

Nie wyjaśnionym dotychczas problemem pozostaje „genetyczny wiek” sklonowanych zwierząt, który skorelowany jest, jak się wydaje, z długością terminalnych odcinków DNA, określanych mianem telomerów. Skracanie się telomerów przyjmowano za jeden z przejawów starzenia się komórki. Problem wyniknął po ujawnieniu wyników badań Shielsa i wsp. nad chromosomami Dolly (45). Okazało się bowiem z jednej strony, że telomery w jej chromosomach były znacznie krótsze od długości telomerów w chromosomach osobników uzyskanych w grupie kontrolnej, a z drugiej, iż długość jej telomerów była zbliżona do długości telomerów w chromosomach komórek owcy wykorzystanej jako dawczyni komórek somatycznych w procedurze klonowania. Świadczyłoby to, że zwierzę sklonowane z komórki somatycznej, uzyskanej od dorosłego osobnika, obciążone jest genetycznie wiekiem dawcy jądra komórkowego, czyli w chwili narodzin genetycznie jest już znacznie starsze. Jednakże te informacje dotyczące owiec nie znalazły potwierdzenia w badaniach nad chromosomami bydłęcymi. Z badań Lanzy i wsp. (46) przeprowadzonych na chromosomach sklonowanych cieląt uzyskanych z rekonstrukcji jąder wywodzących się z długotrwałych hodowli komórkowych, wynikało, że ich telomery mają długość przekraczającą nawet długość telomerów w chromosomach zwierząt kontrolnych, mimo iż chromosomy komórek dawców jąder niemal całkowicie pozbawione były telomerów. W chromosomach uzyskanych cieląt były jednak zresyntetyzowane przy udziale aktywnych telomeraz. Podobnie Tian i wsp. (47) zauważyli, że długość telomerów w chromosomach czterech żyjących z dziesięciu uzyskanych cieląt z zarodków zrekonstruowanych z jąder fibroblastów skórnych i komórek pęcherzykowych, nie różniła się od długości telomerów występującej w chromosomach zwierząt kontrolnych. Z badań Kato i wsp. (22) wynika jednak, że u bydła do skracania długości telomerów dochodzi tylko w tych tkankach z których wyprowadzono linie komórkowe stanowiące źródło dawców jąder komórkowych.

Podsumowując można zauważyć, że technika klonowania somatycznego wykorzystywana jest w analogicznym schemacie u różnych gatunków zwierząt gospodarskich, ale efekty jej stosowania są zróżnicowane. Szczególnie istotne są różnice dostrzegane między poszczególnymi gatunkami zwierząt gospodarskich, które odnoszą się do kondycji zdrowotnej sklonowanych zwierząt, jak również ich „genetycznego wieku”.

### Literatura

1. Wilmut I., Schnieke A. E., McWhir J., Kind A. J., Campbell K. H. S., (1997), *Nature*, 385, 810-813.
2. Wells D. N., Misica P. M., Tervit H. R., (1999), *Biol. Reprod.*, 60, 996-1005.
3. Vignon X., Chesne P., Le Bourhis D., Flechon J. E., Heyman Y., Renard J.-P., (1998), *Reproduction Biology C. R. Acad. Sci Paris. Sciences de la vie/Life Sciences*, 321, 735-745.
4. Kato Y., Tani T., Sotomaru Y., Kurokawa K., Kato J.-Y., Doguchi H., Yasue H., Tsunoda Y., (1998), *Science*, 282, 2095-2098.

5. Kubota Ch., Yamakuch H., Todoroki J., Mizoshita K., Tabara N., Barber M., Yang X., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 990-995.
6. Betthausen J., Forsberg E., Augenstein M., Childs L., Eilertsen K., Enos J., Forsythe T., Golueke P., Jurgella G., Koppang R., Lesmeister, T., Mallon K., Mell G., Misica P., Pace M., Pfister-Genskow M., Strelchenko N., Voelker G., Watt S., Thompson S., Bishop M., (2000), *Nature Biotech.*, 18, 1055-1059.
7. Kühholzer B., Hawley, R. J., Lai L., Kolber-Simonds D., Prather R. S., (2001), *Biol. Reprod.*, 64, 1695-1698.
8. Cheong H. T., Ikeda K., Martinez Diaz M. A., Katagiri S., Takahashi Y., (2000), *Reprod. Fertil. Dev.*, 12, 15-20.
9. Cibelli J. B., Stice S. L., Goluece P. J., Kane J. J., Jerry J., Blackwell C., et al., (1998), *Science*, 280, 1256-1258.
10. Schnieke A., Kind A. J., Ritchie W. A., Mycock K., Scot A. R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A., Campbell K. H. S., (1997), *Science*, 278, 2130-2133.
11. McCreath K. J., Howcroft J., Campbell K. H. S., Colman A., Schnieke A. E., Kind A. J., (2000), *Nature*, 405, 1066-1067.
12. Keefer C. L., Baldassarre H., Keyston R., Wang B., Bhatia B., Bilodeau A. S., Zhou J. F., Leduc M., Downey B. R., Lazaris A., Karatzas C. N., (2001), *Biol. Reprod.*, 64, 849-856.
13. Tall A. D., Maly P., Lowe J. B., (1995), *J. Biol. Chem.*, 270, 21437.
14. Denning C., Burl S., Ainslie A., Bracken J., Dinnyes A., Fletcher J., King T., Ritchie M., Ritchie W. A., Rollo M., de Dousa P., Travers A., Wilmyt I., Clark A. J., (2001), *Nature Biotech.*, 16, 559-562.
15. Lai L., Kolber-Simonds D., Park K-W., Cheong H-T., Greenstein J. L., Im G-S., Samuel M., Bonk A., Rieke A., Day B. N., Murphy C. N., Carter D. B., Hawley R. J., Prather R. S., (2002), *Science*, 295, 1089-1092.
16. Dai Y., Vaught T. D., Boone J., Chen S-H., Phelps C. J., Ball S., Monahan J. A., Jobst P. M., McCreath K. J., Lamborn A. E., Cowell-Lucero J. L., Wells K. D., Colman A., Polejaeva I. A., Ayares D. L., (2002), *Nature Biotech.*, 20 (3), 251-255.
17. Skrzyszowska M., Shoya Y., Nagai T., Geshi M., Takenouchi N., (2000), *Theriogenology*, 53, 244.
18. Cho J. K., Lee B. C., Park J. I., Lim J. M., Shin S. J., Kim K. Y., Lee B. D., Hwang W. S., (2002), *Theriogenology*, 57, 1819-1829.
19. Kishi M., Itagaci Y., Takakura R., Imamura M., Sudo T., Yoshinari M., Tanimoto M., Yasue H., Kashima N., (2000), *Theriogenology*, 54, 675-684.
20. Galli C., Duchi R., Moor R. M., Lazzari G., (1999), *Cloning*, 1(3), 161-170.
21. Shiga K., Fujita T., Hirose K., Sasae Y., Nagai T., (1999), *Theriogenology*, 52, 527-535.
22. Kato Y., Tani T., Tsunoda Y. J., (2000), *Reprod. Fertil.*, 120, 231-237.
23. Hill J. R., Winger Q. A., Burghardt R. C., Westhusin M. E., (2001), *Anim. Reprod. Sci.*, 67, 17-26.
24. Reggio B. C., James A. N., Green H. L., Gavin W. G., Behboodi E., Echelard Y., Godke R. A., (2001), *Biol. Reprod.*, 65, 1528-1533.
25. Verma P. J., Du Z-T., Crocker L., Faast R., Grupen Ch. G., McIlfratrick S. M., Ashman R. J., Lyons I. G., Nottle M. B., (2000), *Mol. Reprod. Dev.*, 57, 262-269.
26. Tao T., Machaty Z., Boquest A. C., Day B. N., Prather R. S., (1999), *Anim. Reprod. Sci.*, 56, 133-141.
27. Polejaeva J. A., Chen S-H., Vaught T. D., Page R. L., Mullins J., Ball S., Dai Y., Boone J., Walker S., Ayares D. L., Colman A., Campbell K. H. S., (2000), *Nature*, 407, 86-90.
28. Park, K-W., Kühholzer B., Lai L., Machaty Z., Sun Q-Y., Day B. N., Prather R. S., (2001), *Anim. Reprod. Sci.*, 68, 111-120.
29. Skrzyszowska M., Smorąg Z., Kańska L., Ryńska B., Kania G., Gajda B., Kareta W., Jurkiewicz J., (2001), *Mat. II Zjazdu Towarzystwa Biologii Rozrodu*, 55-56.
30. Campbell K. H. S., Ritchie W. A., Wilmut I., (1993), *Biol. Reprod.*, 49, 933-942.
31. Campbell K. H. S., (1999), *Cloning*, 1, 3-15.
32. Prather R. S., (2000), *Science*, 289, 1886-1887.
33. Baguisi A., Behboodi E., Melican D. T., Pollock J. S., Destrempes M. M., Cammuso C. H., Williams J. L., Nims S. D., Porter C. A., Midura P., Palacios M. J., Ayres S. L., Denniston R. S., Hayes M. L., Zio-

- mek C. A., Meade H. M., Godke R. A., Gavin W. G., Overstrom E. W., Echelard Y., (1999), *Nature Biotech.*, 17, 456-461.
34. Zakhartchenko V., Durcova-Hills G., Stojkovic M., Schernthaner W., Prella K., Steinborn R., Muller M., Brem G., Wolf E. J., (1999), *Reprod. Fertil.*, 115, 325-331.
35. Onishi A., Iwamoto M., Akita T., Mikawa S., Takeda K., Awata T., Hanada H., Perry A. C. F., (2000), *Science*, 289, 1188-1190.
36. Hayes O., Badia T., Ramos B., Aguilar A., Castro F. O., (2002), *Theriogenology*, 57, 418.
37. Boquest A. C., Day B. N., Prather R. S., (1999), *Biol. Reprod.*, 60, 1013-1019.
38. Chang D. C., (1992), in: Chang D. C., et al., *Guide to electroporation and electrofusion*, Academic Press, New York, 9-27.
39. Loi P., Ledda S., Fulka Jr. J., Cappai P., Moor R. M., (1998), *Biol. Reprod.*, 58, 1177-1187.
40. Zhu J., Telfer E. E., Fletcher J., Springbett A., Dobrinsky J. R., de Sousa P. A., Wilmut I., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 635-641.
41. Young L. E., Sinclair K. D., Wilmut I., (1998), *Rev. Reprod.*, 3, 155-163.
42. Behboodi E., Ayres S. L., Reggio B. C., O'Coin M. D., Gawin W. G., Dennistren R. S., Landry A. M., Meade H. M., Echelard Y., (2002), *Theriogenology*, 57, 395.
43. Hill J. R., Burghardt R. C., Jones K., Long C. R., Looney C. R., Shin T., Spencer T. E., Thompson J. A., Winger Q. A., Westhusin M. E., (2000), *Biol. Reprod.*, 63, 1787-1794.
44. Kang Y-K., Koo D-B., Park J-S., Choi Y-H., Chung A-S., Lee K-K., Han Y-M., (2001), *Nature Genetic*, 28, 173-177.
45. Shiels P. G., Kind A. J., Campbell K. H., Waddington D., Wilmut I., Colman A., Schnieke A. E., (1999), *Nature*, 399, 316-317.
46. Lanza R. P., Cibelli J. B., Blackwell C., Cristofalo V. J., Francis M. K., Baerlocher G. M., Mak J., Schertzer M., Chavez E. A., Sawyer N., Lansdorp P. M., West M. D., (2000), *Science*, 288, 665-669.
47. Tian X. C., Xu J., Yang X., (2000), *Nature Genetics*, 26, 272-273.