

Wykorzystanie linii komórkowych i metod synchronizacji cyklu komórkowego w klonowaniu ssaków

Jacek A. Modliński

Jolanta Karasiewicz

Zakład Embriologii Doświadczalnej
Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt

Polska Akademia Nauk

Jastrzębiec

Do połowy lat dziewięćdziesiątych klonowanie ssaków obejmowało wyłącznie klonowanie ich zarodków. Stosowane w tym celu metody pozwalały jednak na uzyskanie klonów o stosunkowo niewielkiej liczebności. Wynika to zarówno z ograniczonych zdolności regulacyjnych zarodków (klonowanie metodą izolacji blastomerów oraz bisekcji morul i blastocyst), jak też z ograniczonej liczby (od 8 do 64) blastomerów w zarodkach, które wykorzystywane być mogą *per se* lub też jako dawcy jąder (klonowanie chimerowe i klonowanie metodą transplantacji jąder komórkowych). Bisekcja zarodków, jedyna — jak na razie — metoda klonowania, która jest stosowana na skalę komercyjną, pozwala na uzyskanie wyłącznie bliźniąt monogenetycznych, a próby jej dalszego udoskonalenia (1) mogą iść w kierunku zwiększenia jej efektywności, a nie otrzymania bardziej liczebnych klonów. Jedyną metodą umożliwiającą uzyskanie klonów o dużej liczebności jest metoda transplantacji jąder komórkowych pod warunkiem jednak, że obok pełniejszego poznania czynników warunkujących prawidłowe przeprogramowanie wprowadzonych do cytoplazmy oocyty jąder, istotnemu zwiększeniu ulegnie liczba komórek-dawców jąder.

Badania nad zwiększeniem liczby komórek-dawców jąder, których można by użyć do klonowania poszły w dwóch kierunkach. Pierwszym z nich jest wielokrotne klonowanie zarodków polegające na seryjnych pasażach jąder i uzyskaniu od 2 do 6 generacji sklonowanych zarodków-dawców jąder. Metoda ta jest szerzej omówiona w artykule Piotrowskiej i Modlińskiego zamieszczonym w tym numerze „Biotechnologii”. Drugim kierunkiem, stwarzającym dużo większe perspektywy, jest możliwość wykorzystania — jako dawców jąder — rosnących *in vitro* komórek pochodzenia zarodkowego (niezróżnicowanych i zróżnicowanych), a także — jak to wykazano ostatnio — również komórek płodów oraz komórek pochodzących z dorosłych osobników.

Po wprowadzeniu jądra (materiału genetycznego dawcy) do cytoplazmy enukleowanego oocyty, rozwój rekonstruowanych zarodków zależy od wielu czynników takich jak:

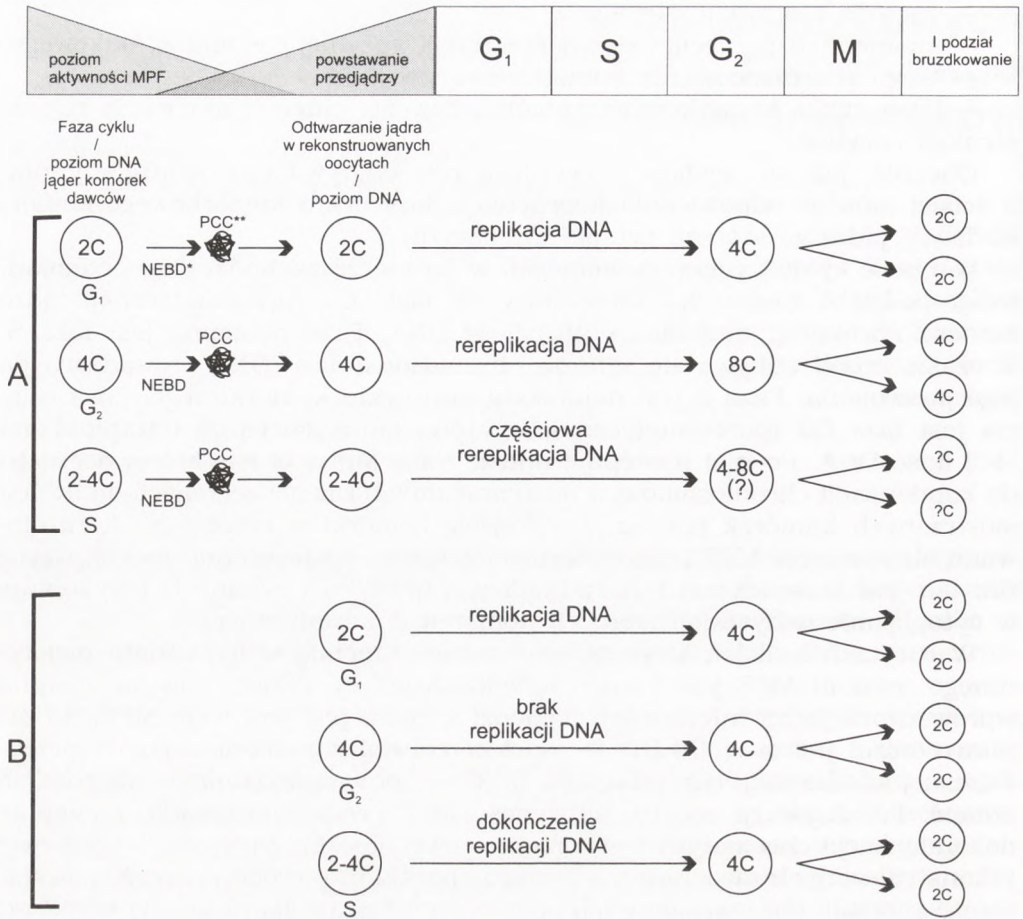
- metoda aktywacji oocytów,
- moment rozpoczęcia aktywności transkrypcyjnej genomu zarodkowego,
- stopień zróżnicowania komórek-dawców jąder,
- faza cyklu komórkowego komórek-dawców jąder w momencie rekonstrukcji oocytów.

Obecnie, jak się wydaje, decydującą rolę odgrywa ten ostatni czynnik, a ściślej mówiąc odpowiednia koordynacja fazy cyklu komórkowego komórki-dawcy jądra ze stanem cytoplazmy oocytu.

W czasie cyklu życiowego komórki, w jej jądrze zachodzi ciąg przemian, który podzielić można na cztery fazy. W fazie G1 (presyntetycznej) jądro zawiera normalną, diploidalną (2C) ilość DNA. Fazą następną jest faza S, w czasie której odbywa się synteza chromosomalnego DNA prowadząca do jego podwojenia. Faza S jest najdłuższą fazą cyklu komórkowego. Fazą trzecią jest faza G2 (postsyntetyczna), w której jądra zawierają tetraploidalną (4C) ilość DNA. Po niej następuje mitoz (faza M), w czasie której dochodzi do kondensacji chromosomów, a następnie do ich równej segregacji do dwóch siostrzanych komórek potomnych. Wejście komórki w mitozę jest kontrolowane aktywnością MPF (*maturation/mitosis/meiosis promoting factor*). Czynnik ten jest kompleksem kinazy białkowej (p^{34cdc2}) i cykliny B i występuje w cytoplazmie wszystkich znanych komórek eukariotycznych.

W oocytach ssaków, które są owulowane w metafazie II podziału mejotycznego, poziom MPF jest bardzo wysoki. Jeżeli do takich oocytów zostaną wprowadzone jądra interfazowe dochodzi w nich, pod wpływem MPF, do zaniku otoczki jądrowej (NEBD — *nuclear envelope break-down*) i do przedwczesnej kondensacji chromosomów (PCC — *premature chromosome condensation*). Po aktywacji oocytu, aktywność MPF gwałtownie spada, następuje dekondensacja chromatyny i utworzenie nowej otoczki. Wpływ MPF na rozwój rekonstruowanych zarodków ma dwojaki charakter; powodować może powstawanie anomalii chromosomowych oraz zmieniać prawidłową ploidię komórek. Wpływ ten zależy z jednej strony od poziomu aktywności MPF, z drugiej zaś od fazy cyklu, w jakim znajdują się jądra w momencie ich wprowadzenia do cytoplazmy oocytu (rys. 1). Kiedy do oocytów z wysokim poziomem aktywności MPF wprowadzone zostaną jądra w fazie S, częstotliwość pojawiania się różnorodnych uszkodzeń chromosomów jest bardzo duża. Uważa się, że powodem tego jest PCC „rozpulchnionej” (*pulverized*) w wysokim stopniu chromatyny jąder w fazie S. Jeśli natomiast PCC ulegną jądra w fazie G1 lub G2, kondensacja chromatyny prowadzi do utworzenia pojedynczych lub podwójnych chromatyd i nie obserwuje się wtedy uszkodzeń chromosomów.

Wprowadzanie jąder do oocytów z wysokim poziomem MPF ma również konsekwencje odnośnie do ploidii blastomerów powstałych po pierwszym podziale bruzdkowania. Po aktywacji oocytów następuje spadek aktywności MPF, odtworzenie otoczki jądrowej i wszystkie jądra, niezależnie od fazy ich cyklu komórkowego, podejmują na nowo syntezę DNA (rys. 1, grupa A). W jądrach, które w momencie ich wprowadzenia do cytoplazmy oocytu znajdowały się w fazie S i G2 dojdzie, odpowiednio, do częściowej lub całkowitej rereplikacji DNA. Efektem tego będzie zatem zwiększona zawartość DNA w jądrach obu



Rys. 1. Transplantacja jąder w różnych fazach cyklu komórkowego do enukleowanych oocytów z wysokim (grupa A) i niskim (grupa B) poziomem MPF; wpływ doboru faz cyklu komórek biorców i dawców jąder na syntezę DNA i ploidię rekonstruowanych zarodków (wg Campbella, 1997, zmodyfikowana).

*) NEBD (*nuclear envelope break-down*) — zanik otoczki jądrowej;

**) PCC (*premature chromatin condensation*) — przedwczesna kondensacja chromatyny;

A — wprowadzenie jąder do enukleowanych oocytów metafazowych;

B — wprowadzenie jąder do enukleowanych preaktywowanych oocytów.

potomnych blastomerów. Podwyższona pod koniec I cyklu komórkowego zawartość DNA w jądrze zrekonstruowanego oocyta może również wpływać na przebieg mitozy powodując zarówno zaburzenia w segregacji chromosomów jak też powstawanie anomalii chromosomowych (2).

Zupełnie inaczej natomiast zachowują się jądra wprowadzone do oocytów, po zaniku w ich cytoplazmie aktywności MPF. W jądrach takich nie zachodzi

NEBD i PCC, a tym samym, nie dochodzi do powstawania uszkodzeń chromosomów. Poza tym, synteza DNA jest w tych warunkach ściśle zależna od fazy cyklu komórkowego, w jakim znajdują się jądra w momencie ich fuzji z oocytem. W badaniach Campbella i wsp. (3) wykazano, że przeprowadzone na rekonstruowanych oocytach bydłęcych, jądra wprowadzone w fazie G1 rozpoczynają syntezę DNA, jądra w fazie S kontynuują syntezę, natomiast w jądrach w fazie G2 syntezy DNA nie stwierdzono (rys. 1, grupa B). Niezależnie zatem od fazy cyklu wprowadzonego jądra, zachowana zostaje, pod koniec I cyklu komórkowego, prawidłowa ilość DNA w jądrach rekonstruowanych oocytów.

Na podstawie przeprowadzonych badań nad zachowaniem się jąder w cytoplazmie oocytów o różnej aktywności MPF opracowano następujące systemy koordynacji faz cykli komórkowych komórki dawcy-, i komórki-biorcy jądra, które zapewniają prawidłowy rozwój znacznej części rekonstruowanych zarodków:

— do enukleowanych oocytów metafazowych wprowadzane być mogą jedynie jądra w fazie G1;

— jądra w dowolnej fazie cyklu komórkowego wprowadzane być mogą jedynie do enukleowanych, preaktywowanych oocytów, w których zaniknęła już aktywność MPF. Ooplasty takie określane są mianem „Uniwersalnych Biorców” (3).

Oba te systemy pozwalają uniknąć szkodliwego wpływu PCC na chromatyne, jak również zapewniają zachowanie prawidłowej ploidii w komórkach rekonstruowanych zarodków.

Komórkami pochodzenia zarodkowego, które wzbudziły (i nadal budzą) duże nadzieje na ich wykorzystanie w klonowaniu ssaków są pierwotne komórki zarodkowe (PKZ; ang. *embryonic stem cells*). Pluripotencję tych komórek wykazano u myszy (4,5,6) w otrzymanych przy ich użyciu chimerach. Wprowadzone do blastocyst uczestniczą w rozwoju wszystkich listków zarodkowych, a urodzone chimery przenoszą często linię płciową dawcy. Co więcej, u myszy komórki te (a przynajmniej ich część) są komórkami totipotentnymi, o czym świadczą wyniki uzyskane przez Nagy'ego i wsp. (7,8) oraz Modlińskiego i wsp. (9,10), którzy stosując dwie różne metody klonowania chimerowego otrzymali urodzone myszy wywodzące się całkowicie z pierwotnych komórek zarodkowych (tab. 1). Otrzymywanie, właściwości oraz potencjalne wykorzystanie pierwotnych komórek zarodkowych w klonowaniu ssaków omówione jest szczegółowo w pracach Modlińskiego i Karasiewicz (11), Modlińskiego i wsp. (10) oraz Modlińskiego (12). Linie pierwotnych komórek zarodkowych udało się, jak na razie, uzyskać jedynie u myszy, chomika oraz prawdopodobnie u norki amerykańskiej i makaka. Komórki te spełniają warunki jakie są wymagane dla PKZ (tab. 2). Intensywne próby zmierzające do wyprowadzenia linii PKZ z zarodków zwierząt gospodarskich (bydło, świnia, owca i koza) doprowadziły wprawdzie do uzyskania komórek określanych początkowo jako PKZ, później jednak zaczęto je określać mianem komórek zbliżonych do PKZ (*embryonic stem cell-like cells*), a ostatnio ostrożniej — jako hodowane komórki zarodkowe. Przyczyną tego jest ich morfologia (odmienna od morfologii typowych PKZ myszy), ograniczenia proliferacji

TABELA 1
TOTIPOTENCJA KOMÓREK/JĄDER KOMÓRKOWYCH USTABILIZOWANYCH LINII KOMÓRKOWYCH

Gatunek	Linia	Fenotyp	Pochodzenie – szczep (rasa)	Metoda klonowania	Otrzymano
mysz	α	PKZ	ICM – 129/SvJ	klonowanie chimerowe	myszy Nagy i wsp. 1990
	R1/R1-S3*	PKZ	ICM – 129/SvJ x 129SvJ – CP	klonowanie chimerowe	myszy Nagy i wsp. 1993
	D3	PKZ	ICM – 129/SvJ	klonowanie chimerowe	myszy Modliński i wsp. 1996
	D3	PKZ	ICM – 129/SvJ	transplantacja jąder	rozwój do 16 dnia ciąży Modliński i wsp. 1996
	E9	PKZ	ICM – C57B1/6J	klonowanie chimerowe	myszy Modliński i wsp. 1996
owca	TNT4	nabłonkopodobne	ED – Black Welsh Mountain	transplantacja jąder	jagnięta Campbell i wsp. 1996
	REF 38b	nabłonkopodobne	ICM – Romney x East Friesian	transplantacja jąder	jagnięta Wells i wsp. 1997
	BLWF1	fibroblasty płodowe	26-dniowe płody – Black Welsh Mountain	transplantacja jąder	jagnięta Wilmut i wsp. 1997
	PDFF2	transformowane genetycznie fibroblasty	35-dniowe płody – Poll Dorset	transplantacja jąder	transgeniczne jagnięta Schnieke i wsp. 1997
	OME	nie znany	gruczoł mleczny ciężarnej 6-letniej owcy – Finn Dorset	transplantacja jąder	jagnięta Wilmut i wsp. 1997

*R1-S3 podlinia wyprowadzona z linii R1;
ICM – węzeł zarodkowy blastocysty;
ED – tarczka zarodkowa.

in vitro oraz to, że nie udało się wykazać możliwości udziału tych komórek w powstawaniu chimer płciowych tzn. osobników chimerowych przenoszących linię płciową. Stwierdzony, jak dotychczas, brak kolonizacji listew płciowych i niezdolność do tworzenia linii płciowej przez hodowane *in vitro* komórki zarodkowe zwierząt gospodarskich nie oznacza jednak, że komórki te nie są komórkami pluripotencyjnymi. Gerfen i Wheeler (13) stwierdzili, że uzyskane przez nich z zarodków świni dwie linie nabłonkopodobnych komórek (D49-6E i M144-B) tworzą spontanicznie (jeśli hodowane są bez kontaktu z podłożem) złożone kule zarodkowe (*cystic embryooid bodies*) zawierające komórki ekto-, ento-, i mezodermalne, podobnie jak to ma miejsce w przypadku

mysich PKZ. Dalsza hodowla (na warstwie odżywczej) takich kul zarodkowych doprowadziła, również jak w przypadku mysich PKZ, do powstania fibroblastów, komórek nabłonkowych, nerwowych, mięśniowych oraz komórek tkanki łącznej. Podobne różnicowanie hodowanych *in vitro* komórek epiblastu uzyskano również u bydła (14). Co więcej, komórki te uczestniczyć mogą, po ich przeszczepieniu do jamy blastocysty, w tworzeniu tkanek somatycznych chimerowych płodów (15) i dorosłych osobników (16) u świni (15,16) i u owcy (rys. 2) (10). U bydła nie udało się w ten sposób — jak na razie — uzyskać chimer, a jedynym dowodem na prawdopodobną pluripotencję tych komórek u tego gatunku jest otrzymanie 12-tygodniowego chimerowego płodu (17).

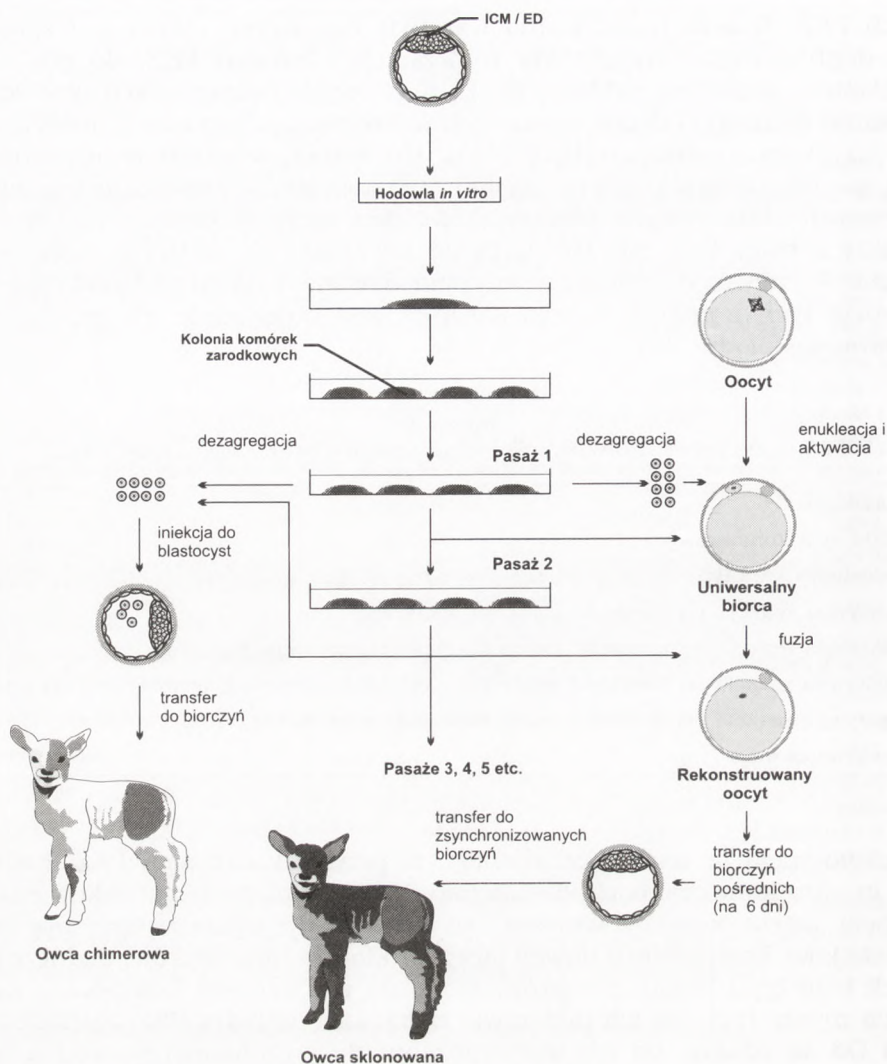
TABELA 2

WYMAGANE CECHY CHARAKTERYSTYCZNE DLA PIERWOTNYCH KOMÓREK ZARODKOWYCH

- morfologia
- krótki cykl komórkowy
- prawidłowy kariotyp
- pozytywna reakcja na obecność fosfatazy alkalicznej
- pozytywna reakcja na obecność znacznika powierzchniowego SSEA1
- negatywna reakcja na obecność znaczników cytoplazmatycznych (cytokeratyny 8 i 18)
- negatywna reakcja na obecność znaczników jądrowych (laminy A/C)
- pluri/totipotencja

Pluripotencja (a nawet totipotencja, w przypadku mysich PKZ) hodowanych *in vitro* komórek pochodzenia zarodkowego różnych gatunków ssaków nasunęła zatem logiczny wniosek, że komórki te wykorzystane być mogą również, jako kompetentni dawcy jąder, w klonowaniu ssaków. Jedne z pierwszych tego typu badań przeprowadzono na pierwotnych komórkach zarodkowych myszy (10). Na ich podstawie wykazano, że jądra PKZ pochodzących z linii D3 są zdolne, po ich wprowadzeniu do wyjądrzonego zarodka 2-komórkowego, do pokierowania rozwojem przynajmniej do szesnastego dnia ciąży. W doświadczeniach tych jednak wprowadzane jądra pochodziły z populacji niezsynchronizowanych komórek, co tłumaczyć może ograniczony i nieprawidłowy, w wielu przypadkach, rozwój rekonstruowanych zarodków.

U zwierząt gospodarskich, z powodu nieuzyskania u nich linii typowych PKZ, jako dawców jąder zaczęto wykorzystywać różnego rodzaju dostępne, hodowane *in vitro* komórki pochodzenia zarodkowego. Były to, w pierwszym rzędzie, komórki pochodzące z krótkotrwałych hodowli węzłów (ICM) i tarczki zarodkowych (ED). Totipotencję jąder komórek ICM wykazano już uprzednio, uzyskując po ich transplantacji do wyjądrzonych oocytów, urodzone jagnięta (18), cielęta (19) i króliki (20). Spodziewać się można było, że totipotencja komórek ICM i ED zachowana będzie również po ich hodowli *in vitro*. Uzyskanie czterech cieląt (21) po transplantacji jąder hodowanych komórek ICM



Rys. 2. Schemat wykorzystania linii komórkowych w klonowaniu ssaków.

i czterech jagniąt po transplantacji jąder hodowanych komórek ED (22) potwierdziło wprawdzie, że założenie to było słuszne, ujawniło jednak wiele istotnych ograniczeń odnośnie do praktycznych możliwości wykorzystania tych komórek w klonowaniu zarodków ssaków na szerszą skalę.

Metoda zastosowana przez Firsta i wsp. (21) do hodowli bydłych ICM różniła się znacznie od metod powszechnie stosowanych w badaniach nad wyprowadzeniem linii PKZ u bydła, które opierały się, w dużej mierze, na metodyce uzyskiwania i hodowli mysich PKZ. First i wsp. (21) dezagregowali izolowane ICM na pojedyncze komórki, które hodowali w postaci luźnej za-

wiesiny w pożywce CR 1aa (23) z dodatkiem selenu, insuliny, transferyny i 5% FCS. Hodowla w postaci zawiesiny miała, w założeniu, ograniczać bezpośrednio kontaktowanie się komórek ze sobą, co — jak się uważa — może być jednym z czynników powodujących ich różnicowanie. Przeżywalność tak hodowanych komórek ICM zależała wyraźnie od początkowej liczby komórek użytej do założenia hodowli. Jeżeli wyjściowa zawiesina pochodziła z trzech ICM, hodowlę (a ściślej mówiąc jedynie mniej niż 20% komórek w populacji) można było utrzymać przez około 3 miesiące. Jeżeli natomiast wyjściowa zawiesina wywodziła się z jednego ICM, tylko w sporadycznych przypadkach komórki przeżywały więcej niż jeden tydzień. Hodowane komórki ICM proliferowały wolno, jednakże po 2-3 tygodniach ich liczba w niektórych hodowlach sięgała 2000 komórek. Ze względu na totipotencję ich jąder wyrażającą się zarówno wysoką przeżywalnością rekonstruowanych zarodków (15% blastocyst) jak i znacznymi możliwościami ich dalszego rozwoju (1,6% urodzonych cieląt w stosunku do liczby przeprowadzonych transplantacji jąder, a 12% w stosunku do liczby przeszczepionych blastocyst), namnożone w ten sposób komórki ICM mogłyby być użyteczne w klonowaniu ssaków gdyby nie to, że wywodząc się ze współhodowli trzech ICM, nie stanowiły one jednorodnej genetycznie populacji komórek. Błędne jest zatem określanie przez autorów takich populacji komórek mianem linii komórkowych. Naszym zdaniem, jednorodne genetycznie populacje komórek ICM można by uzyskać tworząc wyjściową zawiesinę z węzłów zarodkowych pochodzących ze sklonowanych blastocyst. Rozwiązanie takie jest jednak, przynajmniej w chwili obecnej, mało opłacalne gdyż większość (ponad 80%) komórek ICM nie przeżywa, w zawieszynie, hodowli dłuższej niż 5 tygodni.

W przeciwieństwie do metody opracowanej przez Firsta i wsp. (21) metoda zastosowana przez Campbella i wsp. (22) do hodowli komórek owczych ED nie różniła się zasadniczo od metody hodowli mysich PKZ. Przez pierwsze dwa pasaże hodowane komórki, otrzymane z 9-dniowych ED, miały — przynajmniej pod względem ich morfologii — wygląd komórek niezróżnicowanych, przypominający mysie PKZ. Przejście do trzeciego pasażu wiązało się z wyraźną zmianą w wyglądzie komórek. Stawały się one bardziej płaskie, przyjmując charakter komórek nabłonkopobnych i zachowując go, w nie zmienionej postaci, przynajmniej przez następne 22 pasaże. Identyczne zachowanie komórek obserwowaliśmy również w prowadzonych przez nas hodowlach owczych ICM i ED (24). Uzyskane linie nabłonkopodobnych komórek hodowane były przez 7 pasaży, a następnie zostały zamrożone. Po rozmrożeniu zdolne były one do dalszej proliferacji, nadal zachowując charakter komórek nabłonkopodobnych. Wykorzystanie linii komórkowych wywodzących się z ICM/ED przedstawione jest na rysunku 2. W transplantacji jąder niesynchronizowanych komórek owczych ED, pochodzących z pierwszych pasaży do enukleowanych oocytów - „uniwersalnych biorców” wykazano, że tylko jądra komórek z pierwszych trzech pasaży są zdolne do pokierowania rozwojem rekonstruowanych oocytów do momentu urodzenia się jagniąt. Jądra komórek pochodzących z późniejszych pasaży (4-11) podtrzymywały rozwój jedynie do stadium blastocysty (22). W przeprowadzonej analizie komórek hodowanych ow-

czych ED wykazano, że — poczynając od trzeciego pasaży — zaczynają one wchodzić na drogę różnicowania, czego dowodem jest pojawienie się w nich cytokeratyn (znaczników typowych dla komórek nabłonkowych) oraz lamin jądrowych A/C, typowych znaczników komórek zróżnicowanych (22). Komórki niezróżnicowane, takie jak komórki wczesnych zarodków, macierzyste komórki raka zarodkowego (*embryonal carcinoma stem cells*) oraz mysie PKZ wykazują negatywną reakcję na obecność cytokeratyn i lamin A/C. Postępujące różnicowanie pierwotnych kolonii komórek wywodzących się z owczych i bydłych ICM, wyrażające się obecnością cytokeratyn i lamin A/C, wykazali również Galli i wsp. (25). Interesujące jest, że w przeciwieństwie do mysich ICM, izolowane owcze ICM nie są w stanie wytworzyć po ich przeszczepieniu pod torebkę nerkową myszy SCID (*severe combined immunodeficient mice*) populacji niezróżnicowanych, pluripotentnych komórek raka zarodkowego (25). Wszystkie nowotwory powstające po transplantacji owczych ICM są najprawdopodobniej potworniakami (*teratoma*), gdyż zawierają jedynie pochodne wszystkich trzech listków zarodkowych, natomiast brak w nich typowych dla potworniaka złośliwego (*teratocarcinoma*) komórek niezróżnicowanych.

Zastosowanie systemu „uniwersalnych biorców” zaowocowało wyraźnym zwiększeniem odsetka prawidłowo rozwijających się rekonstruowanych zarodków (39% morul i blastocyst w stosunku do liczby rekonstruowanych oocytów; 57% urodzonych jagniąt w stosunku do liczby przeszczepionych blastocyst uzyskanych po transferze jąder komórek ED z trzech pierwszych pasaży). Podstawowym jednak ograniczeniem w praktycznym stosowaniu tej metody pozostawała nadal, ze względu na szybko postępujące procesy różnicowania, liczba dostępnych komórek-dawców jąder oraz ograniczony czas ich wykorzystania.

Ten etap zamykał dotychczasowy rozdział w badaniach nad klonowaniem ssaków, stanowiąc w pewnym sensie *ultima Thule* możliwości jakie ta technika stwarzała. Rozdział następny mógłby zostać otworzony dopiero wtedy, gdyby udało się bądź opracować takie warunki hodowli, które pozwoliłyby na utrzymanie komórek przez wiele pasaży w stanie niezróżnicowanym, bądź też opracować uniwersalne metody warunkujące przeprogramowanie jąder różnych typów komórek.

Badania prowadzone w Roslin Institute w Szkocji poszły w tym ostatnim kierunku i doprowadziły do opracowania metody, która pozwala na pełne przeprogramowanie w cytoplazmie oocytów jąder (a przynajmniej ich części) wielu typów komórek, włączając w to również jądra pochodzące z komórek dorosłych osobników.

Na podstawie uzyskanych wyników w wielu przeprowadzanych badaniach nad procesami różnicowania komórkowego wskazuje się, że w czasie różnicowania komórki wychodzą z fazy G1 cyklu komórkowego i wchodzić w fazę spoczynkową (*quiescence*), określaną mianem fazy lub stanu G0. Następnie, w zależności od czynników i sygnałów zewnętrznych oraz od warunków pokarmowych, indywidualne losy komórek potoczyć się mogą w różnych kierunkach. Część z nich, wchodząc ponownie w cykl, ulegnie nekrozie lub apoptozie, inne natomiast wejdą na drogę różnicowania. Wiadomo, że w hodowli komórek można zmusić do wejścia w stan G0 poprzez obniżenie zawartości substancji

odżywczych (przede wszystkim surowicy) w pożywce hodowlanej. W komórkach takich, wyjście z cyklu wzrostu komórkowego związane jest z pojawieniem się wielu zmian takich jak: wyraźne obniżenie poziomu transkrypcji, degradacja większości rodzajów mRNA, zmiany w polirybosomach, kondensacja chromatyny (26), a także obecność histonu H1-0 (odmiany histonu H1), którego pojawienie się związane jest z różnicowaniem komórek i zachodzącymi w tym czasie zmianami w chromatynie (27), i który wykryto zarówno w komórkach wczesnych zarodków jak i w komórkach w stanie spoczynku. Keith Campbell założył, że ten specyficzny stan komórek i ich chromatyny w stanie G0, umożliwi prawidłową reakcję wszystkich genów wprowadzonego w tej fazie jądra na sygnały płynące z cytoplazmy oocyty, czyli, innymi słowy, umożliwi pełne przeprogramowanie jąder nawet tych komórek, które weszły na drogę różnicowania lub też są już zróżnicowane. Wprowadzenie komórek w stan spoczynkowy uzyskiwano poprzez ich hodowlę przez 5 dni w pożywce o znacznie obniżonej (z 10 do 0,5%) zawartości surowicy (22,28). W badaniach immunofluorescencyjnych przeprowadzonych przy użyciu przeciwciał antyPCNA i skoniugowanych z rodaminą przeciwciał na cykliny wykazano, że hodowane komórki nie są w fazie S (28,29). PCNA (*proliferating-cell nuclear antigen*) jest wskaźnikiem aktywnej replikacji DNA. Zastosowanie metody „głodzenia” komórek umożliwiło, w pierwszym etapie badań, uzyskanie pełnego rozwoju po transplantacji jąder komórek owczych ED pochodzących z 6-13 pasażu (jak wspomniano, stosowane dotychczas metody synchronizacji faz cyklu komórkowego pozwalały na uzyskanie jagniąt po trasplanatacji jąder komórek jedynie z trzech pierwszych pasaży). Interesujące jest, że w przypadku wprowadzania do oocytów jąder komórek w fazie G0, nie obserwuje się istotnych różnic w rozwoju rekonstruowanych oocytów w zależności od stanu ich cytoplazmy (poziomu MPF) w momencie fuzji z komórką dawcą-jądra. Oocyty preaktywowane, oocyty aktywowane w momencie fuzji i oocyty aktywowane po fuzji z komórką-dawcą jądra rozwijały się w podobnym procencie (odpowiednio: 11,7, 16,3 i 12,8%) do stadium moruli/blastocysty. Ze wszystkich tych kombinacji uzyskano również urodzenie się żywych jagniąt (22,28). Ponieważ, ze względów technicznych, najłatwiejszym i najbardziej wygodnym wariantem doświadczalnym jest aktywacja oocyty i jego fuzja z komórką-dawcą jądra za pomocą tych samych impulsów prądu elektrycznego, wariant ten został zastosowany do wprowadzania jąder pochodzących z owczych fibroblastów płodowych i komórek gruczołu mlecznego dorosłej owcy (28). Komórki płodowe (*fibroblast-like cells*) pochodziły z 26-dniowych płodów. Komórki hodowane były w pożywce BHK 1 wzbogaconej w L-glutaminę, pirogronian sodu i 0,5% FCS. Jako dawców jąder używano komórek pochodzących z 4-6 pasażu. Ze 172 rekonstruowanych oocytów, 47 (27%) osiągnęło stadium moruli/blastocysty. Po przeszczepieniu 40 blastocyst do 16 biorniczek uzyskano 5 ciąż (31,2%), z których 3 (18,7%) donoszone zostały do końca. Komórki gruczołu mlecznego uzyskane zostały od 6-letniej owcy będącej w ostatnim trymestrze ciąży. Fenotyp komórek-dawców jąder nie jest znany, autorzy nie podają również warunków ich hodowli. Hodowle pierwotne składały się w 90% z nabłonkowych komórek gruczołu mlecznego, a także z niewielkiej liczby fibroblastów i komórek mioepitelialnych (są to kurczliwe

komórki występujące pomiędzy komórkami nabłonkowymi gruczołów wydzielniczych a błoną podstawną, które przypominają komórki mięśni gładkich). Autorzy nie wykluczają, że wśród hodowanych komórek znajdować się mógł również niewielki odsetek stosunkowo mało zróżnicowanych komórek wspomagających regenerację gruczołu mlecznego w czasie ciąży. Sądzić można także, że nabłonkowe (lub nabłonkopodobne) komórki gruczołu mlecznego nie są komórkami jeszcze w pełni zróżnicowanymi, gdyż w obecności materiału pozakomórkowego pochodzącego z mysiego nowotworu Engelbertha — Holma-Swarma (EHS) i w obecności hormonów laktogennych (insulina, hydrokortyzon i prolaktyna) ulegają one ostatecznemu zróżnicowaniu w komórki o charakterze wydzielniczym (30). Natomiast przy braku EHS i w obecności EGF (czynnika wzrostu naskórka) zamiast prolaktyny zachowują one charakter komórek nie w pełni zróżnicowanych. Jako dawców jąder użyto komórek pochodzących z 3-6 pasażu. Z 277 rekonstruowanych oocytów uzyskano 29 (11,7%) zarodków w stadium moruli/blastocysty, z których, po ich przeszczepieniu do 13 biorczyń, uzyskano 1 donoszoną do końca ciąży, co stanowi 3,4% liczby morul/blastocyst i 0,39% ogólnej liczby zrekonstruowanych oocytów. Urodzone jagnię, nazwane na cześć Dolly Parton, imieniem Dolly jest pierwszym i — jak na razie — jedynym ssakiem uzyskanym przez sklonowanie dorosłego osobnika.

Wyniki uzyskane w Roslin Institute zostały wkrótce potwierdzone w innych ośrodkach badawczych. Wells i wsp. (31) z Rakuara Research Center w Nowej Zelandii uzyskali trzy jagnięta (jedno zmarło wkrótce po porodzie) w wyniku transplanatacji jąder komórkowych pochodzących ustabilizowanej linii (REF38b) nabłonkopodobnych komórek wyprowadzonej z ICM 8-dniowych blastocyst. Komórki hodowane były w pożywce DMEM/F12 z dodatkiem 2-merkaptetanolu, rekombinowanego ludzkiego LIF i wzbogaconej 15% FCS. Po pierwszym pasażu, hodowane komórki ICM nabierały charakteru komórek nabłonkopodobnych i w tej postaci utrzymywane były przez co najmniej 30 pasaży. Przeszczepiane jądra pochodziły z komórek 8-16 pasażu z tym, że urodzone jagnięta uzyskano jedynie po transplantacji komórek pochodzących z pasażu 8 i 9. Jediną modyfikacją metody synchronizacji komórek w fazie G0 (w porównaniu do metody opracowanej przez Campbella i wsp. (22) było to, że komórki hodowane były w pożywce o obniżonej zawartości FCS przez znacznie dłuższy czas (9-12 dni). Również Robl i Stice (dane nie publikowane, konferencja International Embryo Transfer Society, Boston, styczeń 1998) podali, że udało się im uzyskać dwa buhaje po transplantacji jąder (prawdopodobnie fibroblastów) pochodzących od dorosłych osobników. Ze względu jednak na brak, w chwili obecnej, dokładnych informacji, trudno określić jaka metoda została zastosowana. Wiadomo jedynie, że była ona zbliżona do metody opracowanej w Roslin Institute.*

* Według nie potwierdzonych jeszcze w czasopiśmie naukowym informacji modyfikacja metody zastosowana przez Robla i Stice'a polegała na tym, że odstęp pomiędzy wprowadzeniem jądra do enukleowanego oocytu a jego aktywacją wynosił aż 6 godzin. Zdaniem autorów, chromatyna jądra podlega w tym czasie działaniu czynników obecnych w cytoplazmie niezapłodnionego oocytu, co umożliwia lepsze przeprogramowanie wprowadzonego jądra.

Ze względu na koszty oraz na stosunkowo niską wydajność, klonowanie ssaków metodą transplantacji jąder komórek pochodzących z różnego rodzaju linii komórkowych oraz z osobników dorosłych jest, i prawdopodobnie będzie przez długi czas, techniką nieopłacalną z punktu widzenia praktyki hodowlanej zwierząt gospodarskich. Uzyskanie Dolly kosztowało prawie 800 tys. dolarów. W sierpniu ubiegłego roku amerykańska firma Infigen doniosła o uzyskaniu klonu kilku buhajów po transplantacji jąder komórek płodowych (typ użytych komórek nie został ujawniony). Koszt tej „operacji” wyniósł ok. 15 milionów dolarów. Technologia ta może być natomiast opłacalna przy otrzymywaniu i klonowaniu zwierząt transgenicznych. Uzyskiwanie transgenicznych zwierząt gospodarskich metodą iniekcji DNA do jednego z przedjądrzy zygoty jest zabiegiem kosztownym i mało wydajnym, w odniesieniu do liczby zwierząt wykazujących integrację (mniej niż 5%; 32), a tym bardziej ekspresję wprowadzonego genu. Poza tym, jeśli nawet wprowadzony gen zostanie przekazany potomstwu, istnieje możliwość, że jego ekspresja w kolejnych pokoleniach ulegnie osłabieniu. Uzyskanie z kolei nowego osobnika transgenicznego wykazującego ten sam, lub zbliżony, poziom ekspresji genu nie musi zakończyć się powodzeniem. W przeciwieństwie do iniekcji DNA, transformacja genetyczna hodowanych *in vitro* komórek jest zabiegiem stosunkowo prostym, szybkim i — co najważniejsze — dotyczy ogromnej liczby komórek. Pierwsze udane próby polegające na wprowadzeniu do enukleowanych oocytów owcy synchronizowanych w fazie G0 jąder pochodzących z komórek hodowanych i transformowanych genetycznie *in vitro* przeprowadzone zostały wspólnie przez Roslin Institute i komercyjną firmę PPL Pharmaceuticals (29). Jądra pochodziły z fibroblastów (uzyskanych z 35-dniowych owczych płodów), do których wprowadzono, wraz z markerowym genem odporności na neomycynę, ludzki gen IX czynnika krzepliwości krwi. Jako promotora użyto owczego genu beta-laktoalbuminy, który, jak wykazano, zapewnia wysoki poziom ekspresji transgenu w mleku myszy. U trzech, z 6 urodzonych jagniąt, stwierdzono obecność obu genów. U pozostałych trzech jagniąt wykryto jedynie obecność genu markerowego. Nie ujawniono, jak dotychczas, czy stwierdzona została ekspresja tego genu w mleku.

W badaniach prowadzonych przez PPL Pharmaceuticals od 1989 r. wykazano, że w produkcji transgenicznych owiec wykorzystanie jąder transformowanych genetycznie komórek somatycznych jest znacznie bardziej opłacalne niż stosowanie tradycyjnej metody iniekcji genu do przedjądrza. W pierwszym przypadku transgeniczną owcę uzyskuje się średnio z każdych 20,8 wyprodukowanych zwierząt, podczas gdy w drugiej metodzie uzyskanie jednej transgenicznej owcy wymaga wyprodukowania 51,4 zwierząt (29).

Badania nad wykorzystaniem jąder transformowanych genetycznie komórek płodowych do uzyskania klonów transgenicznych zwierząt prowadzone są również w innych firmach biotechnologicznych. W Advanced Cell Technology w Amherst (USA) użyto zmodyfikowanych genetycznie komórek płodowych świni i krowy do wyprodukowania transgenicznych płodów, z których pobierane są komórki nerwowe w celu ich ewentualnego wykorzystania w leczeniu choroby Parkinsona.

Firma nie ujawniła, jakie komórki były użyte jako dawcy jąder i jaki gen został do nich wprowadzony. Genzyme Transgenic Corporation (USA) używała tradycyjną metodą iniekcji DNA do przedjądrzy transgeniczne kozy, produkujące w mleku ludzką antytrombinę III, przeciwzakrzepowe białko, które może mieć duże zastosowanie w operacjach serca. Sądzić można, że jeżeli testy kliniczne, rozpoczęte niedawno nad uzyskiwaną z koziego mleka antytrombiną III wypadną pomyślnie, to podjęte zostaną próby sklonowania transgenicznych kóz produkujących to białko. Pod koniec ubiegłego roku Genzyme Transgenic Corporation zapowiedziała rozpoczęcie badań nad uzyskaniem, metodą transplantacji jąder modyfikowanych genetycznie komórek somatycznych, transgenicznych krów produkujących w mleku albuminę surowicy krwi ludzkiej. Według zapowiedzi przedstawicieli firmy pierwszych zwierząt należy się spodziewać w 2001 lub 2002 r.

Połączenie techniki transfekcji rosnących *in vitro* komórek z opracowaną przez Campbella i wsp. (22) metodą transplantacji jąder komórkowych, będzie miało — z całą pewnością — ogromny wpływ na produkcję zwierząt transgenicznych. Uzyskiwanie transgenicznych zwierząt metodą iniekcji DNA do przedjądrzy ma wiele wad ograniczających, zwłaszcza w odniesieniu do zwierząt gospodarskich, stosowanie tej techniki na szeroką skalę. Podstawowym problemem jest to, że wiele produkowanych zwierząt nie jest osobnikami transgenicznymi, co stwierdzić można dopiero po ich urodzeniu, a utrzymywanie ciężarnych bioczyń noszących nietransgeniczne płody znacznie podnosi ogólne koszty produkcji. Podejmowane są wprawdzie próby selekcji transgenicznych zarodków przed ich przeszczepieniem do bioczyń bądź metodą biopsji zarodków i wykrywania w blastomerach obecności transgeny metodą PCR, bądź też poprzez stwierdzanie w zarodkach współekspresji genów markerowych, są to jednak techniki często zawodne, w dużej mierze ze względu na obecność w zarodkach niezintegrowanego DNA, w okresie kiedy są one hodowane i analizowane. Natomiast transfekowane *in vitro* komórki mogą być poddane starannej analizie zanim zostaną wykorzystane jako dawcy jąder. Opóźniona integracja DNA wprowadzonego do przedjądrzy może również być przyczyną powstawania mozaikowych osobników Fo. Mozaicyzm linii płciowej zmniejsza szansę przekazania transgeny do potomstwa ograniczając, lub nawet uniemożliwiając, utworzenie linii zwierząt transgenicznych. Tego typu sytuacja nie występuje, jeżeli do oocytów wprowadzane są jądra pochodzące z transfekowanych komórek, gdyż uzyskane w ten sposób zwierzęta są całkowicie transgeniczne. Możliwość określenia płci linii komórkowych, z których pochodzą będą przeszczepiane jądra jest również ogromną zaletą, zwłaszcza gdy produkt transgeny uzyskiwany będzie z mleka.

Uzyskiwanie zwierząt transgenicznych metodą klonowania ma także podstawowe znaczenie dla medycyny, w przypadku gdy otrzymywane z tych zwierząt białka stosowane będą w terapii u ludzi. Metoda ta bowiem, jako jedyna, zapewnić może jednorodność uzyskiwanego i podawanego chorym leku.

Literatura

1. Skrzyszowska M., Smorąg Z., (1997), Materiały konferencji naukowej *Biotechnologia rozrodu zwierząt gospodarskich — stan badań oraz możliwości praktycznego zastosowania*, Balice, 13-15.
2. Campbell K. H. S., (1997), *Proceedings of International Conference on Animal Biotechnology*, Wien, 61-68.
3. Campbell K. H. S., Ritchie W. A., Wilmut I., (1993), *Biol. Reprod.*, 49, 933-942.
4. Gossler A., Doetschman T. C., Korn R., Serfling G., Kemler R., (1986), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 83, 9065-9069.
5. Robertson E., Bradley A., Kuehn M., Evans M., (1986), *Nature*, 323, 445-448.
6. Brenin D., Look J., Bader M., Hübner M., Levan G., Iannaconne P., (1997), *Transplant. Proc.*, 29, 1761-1765.
7. Nagy A., Gocza E., Diaz E. M., Prideaux V. R., Ivanyi E., Markula M., Rossant J., (1990), *Development*, 110, 815-821.
8. Nagy A., Rossant J., Nagy R., Abramow-Newerly W., Roder J. C., (1993), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 90, 8424-8428.
9. Modliński J., (1995), *Prace i Materiały Zootechniczne. Zeszyt specjalny*, 4, 1-98.
10. Modliński J. A., Reed M. A., Wagner T. E., Karasiewicz J., (1996), *Anim. Reprod. Sci.*, 42, 437-446.
11. Karasiewicz J., Modliński J. A., (1995), *Biotechnologia* 3(30), 84-90.
12. Modliński J. A., (1997), *Biotechnologia Zwierząt*, red. Zwierzchowski L., Jaszczak K., Modliński J. A., PWN, Warszawa, 353-430.
13. Gerfen R. W., Wheeler M. B., (1995), *Anim. Biot.*, 6, 1-14.
14. Talbot N. C., Powell A. M., Rexroad C. E., (1995), *Mol. Reprod. Dev.*, 42, 35-52.
15. Notarianni E., Laurie S., Ng A., Sathasivan K., (1997), *Int. J. Dev. Biol.*, 41, 537-540.
16. Wheeler M. B., (1994), *Reprod. Fertil. Dev.*, 6, 563-568.
17. Strelchenko N., (1997), *Transgenic Animals. Generation and Use*, Ed. Houdebine L. M., Harwood Academic Publisher, Amsterdam, 173-178.
18. Smith L. C., Wilmut I., (1989), *Biol. Reprod.*, 40, 1027-1035.
19. Keefer C. L., Stice S. L., Matthews D. L., (1994), *Biol. Reprod.*, 50, 935-939.
20. Collas P., Robl J., (1991), *Biol. Reprod.*, 43, 877-884.
21. First N. L., Sims M. M., Park S. P., Kent-First M. J., (1994), *Reprod. Fert. Dev.*, 6, 553-562.
22. Campbell K. H. S., McWhir J., Ritchie W. A., Wilmut I., (1996), *Nature*, 380, 64-66.
23. Rosenkrans C. F., First N. L., (1994), *J. Anim. Sci.*, 72, 434-437.
24. Karasiewicz J., Szablisty E., Guskiewicz A., Kossakowski M., Stefański G., Reed M., Modliński J. A., (1996), *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 205, 347-442.
25. Galli C., Lazari G., Flechon J., Moor R. M., (1994), *Zygote*, 2, 385-389.
26. Whitfield J. F., Boynton A. L., Rixon R. H., Youdale T., (1985), *Control of Animal Cell Proliferation*, 1, Eds. Boynton A. L., Leffert H. L., Academic Press, London, 331-365.
27. Rousseau D., (1996), *Biochem. Molec. Biol. Int.* 38, 5, 1023-1032.
28. Wilmut I., Schnieke A. E., McWhir J., Kind A. J., Campbell K. H. S., (1997), *Nature*, 285, 810-813.
29. Schnieke A. E., Kind A. J., Ritchie W. A., Mycock K., Scott A. R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A., Campbell K. H. S., (1997), *Science*, 78, 2130-2133.
30. Finch L. M. B., (1996), *Biochem. Soc. Trans.*, 24, 369.
31. Wells D. N., Misica P. M., Day A. M., Tervit H. R., (1997), *Biol. Reprod.*, 57, 385-393.
32. Eystone W. H., (1994), *Reprod. Fert. Dev.*, 6, 647-652.

The use of cell lines and the methods of cell cycle synchronization in mammalian cloning

Summary

Studies aimed at improving the effectiveness of cloning by nuclear transfer have shown that proper development of the majority of reconstituted embryos is secured by G1 phase of the donor nucleus or by using "universal recipients" i.e. enucleated pre-activated oocytes. Donor nuclei for cloning may be derived from cell lines of embryonic stem cells (mouse), embryonic cells after short *in vitro* culture (sheep, pig, cattle) or even from fetal cells or adult cells after *in vitro* culture and inducing quiescence in their nuclei (sheep).

The use of fetal cells for transgenesis *in vitro* and the production of transgenic sheep after nuclear transfer from these cells opens the way to profitable technology of cloning transgenic farm animals.

Key words:

nuclear transfer, cell cycle of donor cells, embryonic stem cells, epithelioid cells, quiescence.

Adres do korespondencji:

Jacek A. Modliński, Zakład Embriologii Doświadczalnej Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt Polska Akademia Nauk, Jastrzębiec, 05-551 Mroków.