

# Wielokrotne klonowanie zarodków zwierząt gospodarskich

Karolina Piotrowska

Jacek A. Modliński

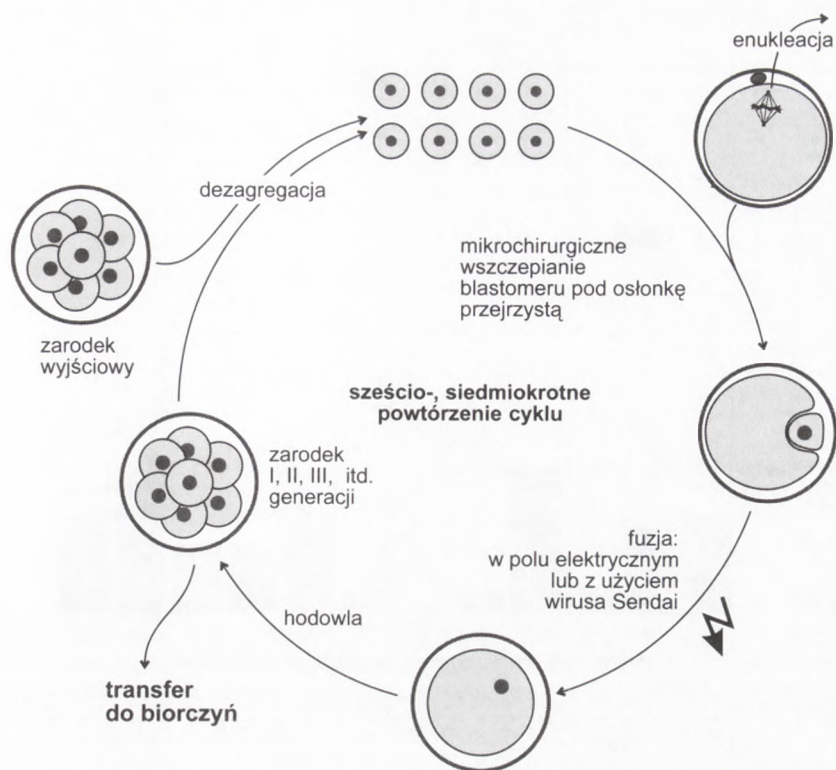
Zakład Embriologii Doświadczalnej  
Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt

Polska Akademia Nauk

Jastrzębiec

Głównym celem klonowania zarodków zwierząt gospodarskich jest uzyskanie jak największej liczby genetycznie identycznych osobników. Wśród wielu metod, które stosowane są do klonowania zarodków, najbardziej obiecująca jest metoda transplanatacji jąder komórkowych do enukleowanych oocytów, gdyż tylko ona daje możliwość uzyskania klonów o największej liczebności. Efektywność transplantacji jąder, mierzona liczbą urodzonych zwierząt, była początkowo bardzo niska, lecz w ostatnich latach uzyskano jej wyraźny wzrost, głównie dzięki udoskonaleniu metod mikromanipulacji jak i lepszemu poznaniu wielu czynników odpowiedzialnych za przeprogramowanie wprowadzonych do cytoplazmy oocyta obcych jąder komórkowych. Jednakże, nadal jednym z podstawowych ograniczeń warunkujących liczebność osobników klonu jest liczba komórek, które są dawcami jąder. U bydła i u owiec, jako dawców jąder, używa się najczęściej zarodków 8-64-komórkowych. Wprawdzie w pojedynczych przypadkach uzyskano z nich klony liczące powyżej 7 osobników, jednakże w większości przypadków liczba ta nie przekracza 5 zwierząt (2,4). Nie wydaje się również prawdopodobne aby liczba ta mogła ulec, przynajmniej w najbliższej przyszłości, istotnemu zwiększeniu. Z tego powodu, niezależnie od badań zmierzających do zwiększenia efektywności samej metody transplantacji, prowadzone są liczne prace, których celem jest opracowanie metod pozwalających na uzyskanie znacznie większej liczby komórek o charakterze komórek zarodkowych, które użyte być mogą do klonowania jako dawcy jąder. Pierwsza z tych metod polega na wykorzystaniu komórek pochodzących z hodowanych *in vitro* węzłów zarodkowych (ICM) i tarczek zarodkowych (ED) blastocyst owcy i bydła. Metoda ta jest omówiona bardziej szczegółowo w artykule Modlińskiego i Karasiewicza zamieszczonym w tym numerze „Biotechnologii”.

Drugą metodą pozwalającą na znaczne zwiększenie liczby komórek, które mogą być użyte jako dawcy jąder, jest metoda wielokrotnego klonowania zarodków (rys. 1). Polega ona na transplantacji jąder pochodzących z bruzd-

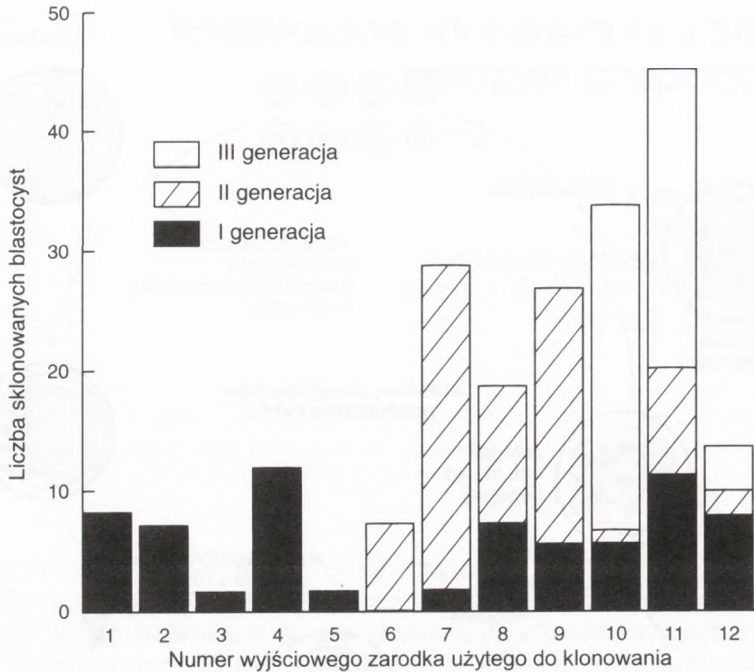


Rys. 1. Schemat wielokrotnego klonowania zarodków ssaków metodą seryjnej transplantacji jąder komórkowych wg Modlińskiego (10).

kujących zarodków do enukleowanych oocytów, hodowli zrekonstruowanych oocytów (*in vitro* lub *in vivo*) i uzyskania w ten sposób pewnej liczby sklonowanych zarodków I generacji. Zarodki te służą następnie, jako dawcy jąder, do uzyskania zarodków II, a te z kolei do uzyskania zarodków III generacji itd. Wielokrotne klonowanie zarodków przeprowadzono do tej pory jedynie u bydła (5-9) oraz na bardzo małą skalę u owiec (9).

Wielokrotne klonowanie zarodków bydłecych prowadzono używając bardzo niejednorodnego materiału doświadczalnego:

- oocytów dojrzewających *in vivo* lub dojrzewających *in vitro*,
- zarodków (dawców jąder) rozwijających się *in vivo* (po inseminacji superowulowanych jałówek) lub zarodków rozwijających się całkowicie *in vitro* (IVM/IVF/IVC),
- zarodków (dawców jąder) w różnych stadiach rozwojowych: od 8-16-komórkowych do 32-64-komórkowych (morule),
- oocytów i zarodków o różnym pochodzeniu (zwierzęta rzeźne i wysokiej klasy zwierzęta hodowlane).



Rys. 2. Liczba sklonowanych blastocyst uzyskanych z pojedynczych zarodków macierzystych (wyjściowych) wg Takano i wsp. (7).

Niejednorodność ta dotyczyła również oocytów, do których wprowadzane były jądra komórkowe. W jednych doświadczeniach (6) jądra wprowadzane były do oocytów bezpośrednio po ich enukleacji, a stosowane impulsy pola elektrycznego były jednocześnie czynnikiem fuzjogennym, powodującym połączenie się oocyty z komórką-dawcą jądra, jak i czynnikiem aktywującym oocyt. W tym przypadku jądra wprowadzane były do oocytów o wysokim poziomie aktywności MPF w cytoplazmie. W innych z kolei doświadczeniach (7), jądra wprowadzano do preaktywowanych oocytów. Odstęp pomiędzy aktywacją oocyty a jego fuzją z komórką-dawcą jądra wynosił ok. 9 godz., jądra zatem wprowadzane były do oocytów o bardzo niskiej aktywności MPF w cytoplazmie.

Niejednakowe były również warunki, jakie stosowano do hodowli rekonstruowanych oocytów w okresie rozwoju przedimplantacyjnego. W części doświadczeń (6) oocyty zatapiane były w bloczkach agarowych wprowadzanych następnie do podwiązanych jajowodów owcy (biorczyńce pośrednie). W innych przypadkach rozwój rekonstruowanych oocytów zachodził całkowicie w warunkach *in vitro* (5).

Nie ma dotąd, opracowanej i uniwersalnej metody wielokrotnego klonowania zarodków bydłęcych, gwarantującej wysoką efektywność tego zabiegu,

jak i jego powtarzalność. Jednakże, analiza uzyskanych do tej pory wyników pozwala na wyciągnięcie pewnych wniosków odnośnie do prawidłowości obserwowanych podczas zabiegów wielokrotnego klonowania zarodków, jak i strategii, którą należy obrać w dalszym doskonaleniu tej metody. Nie ulega przede wszystkim wątpliwości, że w porównaniu do „klasycznej” metody jednokrotnego klonowania, wielokrotne klonowanie pozwala na uzyskanie znacznie większej liczby genetycznie identycznych zarodków (rys. 2). Stice i Keefer (6) uzyskali w najlepszej serii 54 sklonowane zarodki (11 — I generacji, 16 — II generacji, 20 — III generacji i 7 — IV generacji). Podobne wyniki otrzymali Takano i wsp. (7) uzyskując w dwóch seriach 33 i 43 sklonowane blastocysty wywodzące się z pojedynczych zarodków, w tym 27 i 22 blastocysty — III generacji. Najbardziej jednak spektakularny wynik uzyskał Bondioli (1) produkując z jednego zarodka, po 6-krotnej retransplantacji jąder, ok. 200 blastocyst. Uważa się, że średnia liczba sklonowanych zarodków uzyskiwanych w kolejnych generacjach jest iloczynem liczby zarodków I generacji i liczby cykli retransplantacji jąder (7).

Nie zaobserwowano statystycznie istotnej różnicy jeśli chodzi o średnią liczbę komórek w blastocystach trzech pierwszych generacji. Była ona podobna u różnych autorów (5,7) jednak zawsze prawie dwukrotnie niższa niż w blastocystach kontrolnych rozwijających się z oocytów po IVF.

Większość autorów nie stwierdza również istotnych różnic w efektywności fuzji pomiędzy oocytami a blastomerami w kolejnych cyklach retransplantacji jąder.

Trudno natomiast w tej chwili określić jednoznacznie czy lepsze wyniki uzyskać można po transplantacji jąder pochodzących z zarodków rozwijających się *in vivo* czy też z zarodków po IVM/IVF/IVC. Jednak ze względów czysto komercyjnych produkcja *in vitro* zarodków-dawców jąder jest znacznie bardziej opłacalna. Otwartą sprawą jest również ile komórek powinny liczyć zarodki-dawcy jąder. Przeprowadzone kalkulacje (6) będące próbą określenia efektywności klonowania w zależności od stadium rozwojowego zarodków-dawców jąder, od odsetka rozwijających się sklonowanych zarodków oraz od liczby wchodzących w ich skład komórek, sugerują konieczność użycia jako dawców jąder zarodków liczących powyżej 16 komórek. Są to jednak wyliczenia czysto teoretyczne, nie pokrywające się zupełnie z uzyskiwanymi do tej pory wynikami.

Najbardziej istotna w metodzie wielokrotnego klonowania zarodków jest oczywiście liczba urodzonych zwierząt. Cieleta uzyskano po transferze blastocyst każdej z trzech pierwszych generacji. Ponieważ jednak we wszystkich doświadczeniach liczba transferowanych blastocyst była bardzo niewielka, trudno na tej podstawie wyciągnąć wnioski dotyczące skuteczności wielokrotnego klonowania zarodków jako metody służącej do uzyskania klonów o dużej liczebności. W większości przypadków uzyskano urodzenie tylko pojedynczych ciałąt, a jedynie Ectors i wsp., (5) donoszą o urodzeniu się bliźniąt płci męskiej oraz trojaczek płci żeńskiej po transferze sklonowanych blastocyst II generacji. Zastanawia natomiast to, że ciężar okołourodzeniowy ciałąt uzyskanych po transferze klonowanych zarodków był często znacznie

wiekszy niż cieląt otrzymanych po transferze zarówno świeżych zarodków jak i zarodków po IVM/IVF/IVC. W przypadku cieląt rasy „Japońskiej Czarnej” było to 36,4 kg vs 29,8 kg (Shimizu i wsp., dane nie publikowane), zaś w przypadku cieląt rasy „Holstein” różnica ta była jeszcze większa — 64,4 kg vs 33,4 kg (6). Próby uzyskania cieląt z zarodków powyżej III generacji są, jak do tej pory, negatywne. Jedynie Takano i wsp. (dane nie publikowane cyt. w (7)) uzyskali dwie ciąży zdiagnozowane w 35 i 40 dniu za pomocą USG. W obu jednak przypadkach doszło do spontanicznych poronień. Trudno w tej chwili jednoznacznie powiedzieć, co jest powodem braku rozwoju postimplantacyjnego zarodków IV-VI generacji. Naszym zdaniem, może to być zarówno skutkiem wzrostu częstości pojawiania się anomalii chromosomowych w kolejnych generacjach zarodków jak i znacznym wydłużeniem czasu hodowli *in vitro*. Wiadomo, że długa hodowla zarodków w suboptymalnych warunkach, jakimi są zawsze warunki hodowli *in vitro*, obniża potencje rozwojowe zarodków, a w przypadku zarodków V i VI generacji czas ten sięga 20-30 dni.

Doskonalenie metody wielokrotnego klonowania zarodków zwierząt gospodarskich powinno zmierzać w następujących kierunkach:

1. Ze względów komercyjnych zarówno dojrzałe oocyty jak i bruzdkujące zarodki powinny być produkowane *in vitro*. Wiąże się to jednak z koniecznością udoskonalenia techniki pobierania oocytów metodą USG-OPU, a także metod dojrzewania i zapłodnienia oocytów oraz hodowli zarodków.

2. W przypadku transplantacji do świeżo enukleowanych oocytów jądra powinny pochodzić z komórek zsynchronizowanych w fazie G1 cyklu komórkowego. W przypadku transplantacji jąder pochodzących z populacji komórek nie zsynchronizowanych, a zatem będących w dowolnej fazie cyklu komórkowego, jądra winny być wprowadzane do enukleowanych i preaktywowanych oocytów. Oocyty takie określane są mianem „uniwersalnych biorców” (3). Stosowanie tego typu koordynacji cykli jądrowo-cytoplazmatycznych obu fuzjowanych komórek pozwala uniknąć negatywnych efektów przedwczesnej kondensacji chromatyny (PCC) i rereplikacji chromosomalnego DNA.

3. Wyboru do produkcji kolejnych generacji zarodków pochodzących z najliczebniej klonów I generacji. W przeprowadzonej analizie liczebności klonów uzyskiwanych z poszczególnych zarodków w kolejnych generacjach sugeruje się istnienie, prawdopodobnie uwarunkowanego genetycznie, tzw. *clonal family effect*. Powoduje on, że wśród zarodków stanowiących wyjściowy materiał do klonowania, istnieją zarodki, które w każdej generacji dają klony o wysokiej liczebności oraz takie, z których w kolejnych generacjach uzyskuje się zawsze niewielką liczbę sklonowanych zarodków.

Dotąd przeprowadzono niewiele badań nad wielokrotnym klonowaniem zarodków zwierząt gospodarskich, a uzyskane wyniki są, jak już wspomniano, nader fragmentaryczne i niejednorodne. Ze względu na koszty jak i stosunkowo małą dostępność (w porównaniu do zwierząt laboratoryjnych) materiału zarodkowego, prowadzenie na szeroką skalę wstępnych badań, często o charakterze podstawowym, jest — w odniesieniu do zarodków zwierząt gospo-

darskich — sprawą trudną. Badania te powinny być zatem prowadzone na zarodkach zwierząt laboratoryjnych takich jak mysz, szczur czy królik. Jednak w badaniach nad klonowaniem zarodków, mysz jest wyjątkowo niedogodnym modelem doświadczalnym, ze względu na bardzo wczesne (w stadium 2-komórkowym) pojawienie się transkrypcyjnej aktywności genomu zarodkowego. Powoduje to, że uzyskanie pełnego rozwoju po transplantacji jąder pochodzących z zarodków liczących więcej niż dwa blastomery jest praktycznie niemożliwe. Idealnym natomiast modelem doświadczalnym w badaniach nad klonowaniem zarodków bydłęcych jest królik. Składa się na to wiele powodów:

1. Owulacja u królików jest indukowana. Regulując podanie hormonów i moment krycia ustalić można dokładnie czas owulacji.

2. Łatwo jest uzyskać dużą liczbę oocytów i zarodków.

3. Królik jest zwierzęciem stosunkowo niedrogim, o krótkim okresie ciąży (9 razy krótszym niż u bydła), a koszt uzyskania zarodka królika jest 30-50 razy niższy niż koszt uzyskania *in vivo* jednego zarodka bydłęcego.

4. Zarodki królika można łatwo hodować *in vitro*, a efektywność rozwoju jest podobna jak *in vivo*.

5. U królika, w przeciwieństwie do myszy, aktywność transkrypcyjna genomu zarodkowego rozpoczyna się w podobnym jak u zwierząt gospodarskich stadium rozwojowym.

6. Całkowite przeprogramowanie jąder komórkowych w cytoplazmie enukleowanych oocytów (zapewniające rozwój aż do momentu urodzenia) uzyskać można u królika (podobnie jak u bydła i owiec) przynajmniej do stadium 32-64-komórkowego (stadium dawcy jąder).

Z powodów tych rozpoczęliśmy badania nad optymalizacją warunków wielokrotnego klonowania zarodków bydłęcych używając do tego celu oocytów i zarodków królika. Badania te obejmują transplantację jąder pochodzących z 8-komórkowych zarodków do enukleowanych, preaktywowanych oocytów (preaktywacja dotyczy oocytów używanych do produkcji zarodków każdej generacji), a także transplantację do enukleowanych, metafazowych oocytów jąder synchronizowanych nokodazolem w fazie G1 cyklu komórkowego. Dość udało się uzyskać III generację sklonowanych blastocyst.

Ponieważ u zwierząt gospodarskich efektywność transplantacji jąder pochodzących zarówno z hodowanych *in vitro* epitelioidalnych komórek pochodzenia zarodkowego jak i płodowych fibroblastów oraz komórek dorosłych zwierząt jest, jak na razie, skrajnie niska i nie przekracza 1%, wielokrotne klonowanie zarodków jest atrakcyjną alternatywą uzyskania u bydła i owiec klonów o stosunkowo dużej liczebności.

## Literatura

1. Bondioli K. R., (1991), Proc. Inter. Symp. Anim. Biotech., Kyoto, Japan.
2. Bondioli K. R., Westhusin M. E., Looney C. R., (1990), Theriogenology, 33, 165-174.
3. Campbell K. H. S., Ritchie W. A., Wilmut I., (1993), Biol. Reprod., 49, 933-942.
4. Chesne P., Heyman Y., Peynot N., Renard J-P., (1993), C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Live Sciences, 316, 487-491.

5. Ectors F. J., Delval A., Smith L. C., Touati K., Remy B., Beckers J-F., Ectors F., (1995) *Theriogenology*, 44, 925-933.
6. Stice S. L., Keefer C. L., (1993), *Biol. Reprod.*, 48, 715-719.
7. Takano H., Kozai C., Shimizu S., Kato Y., Tsunoda Y., (1997), *Theriogenology*, 47, 1365-1373.
8. Westhusin M. E., Pryor J. H., Bondioli K. R., (1991), *Mol. Reprod. Dev.*, 28, 119-123.
9. Willadsen S. M., (1989), *Genome*, 31, 956-962.
10. Modliński J. A., (1997), *Mikromanipulacje na gametach i zarodkach ssaków*, w: *Biotechnologia zwierząt*, red. L. Zwierzchowski, K. Jaszczyk i J. A. Modliński, PWN, Warszawa, 386, 403.

## Multiple generational cloning of livestock embryos

### Summary

The main purpose of nuclear transfer in domestic species is to produce a large number of identical animals. There are two main ways to produce clones by nuclear transfer. One is to use the ICM and ED cells cultured under special conditions, as donor nuclei. The other way is to use the nuclear transfer embryo itself as the donor for the next generation of cloning (multiple generational cloning). The *in vitro* and *in vivo* developmental ability of nuclear transferred embryos is the same in the case of the first three generations. A limited number of multiple-generation clones were transferred into recipient heifers, resulting in offspring from I, II and III generation clones. The strategy to increase the efficiency of multiple generational bovine embryo cloning is discussed as well as the possible use of rabbit embryos as an experimental model.

### Key words:

nuclear transfer, cloning, multiple cloning, bovine.

### Adres do korespondencji:

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