

Uzyskanie cieląt po transferze zarodków, do których wprowadzono konstrukcję genową

ANNA M. DUSZEWSKA, JAROSŁAW WOJDAN*, WITOLD GAWRON*, DANIEL LIPIŃSKI**, ANNA PILISZEK, ELŻBIETA WENTA-MUCHALSKA, BOGUSŁAW WAŚ, RYSZARD SŁOMSKI**/**, ZYGMUNT REKLEWSKI*

Zakład Embriologii Doświadczalnej, *Zakład Doskonalenia Zwierząt IGIHZ PAN w Jastrzębcu, ul. Postępu 1, 05-552 Wólka Kosowska

**Instytut Genetyki Człowieka PAN, Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

***Katedra Biochemii i Biotechnologii Wydziału Rolniczego AR, ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań

Duszewska A. M., Wojdan J., Gawron W., Lipiński D., Piliszek A., Wenta-Muchalska E., Waś B., Słomski R., Reklewski Z.

Obtaining calves after transfer of the gene construct microinjected embryos

Summary

The aim of this study was to obtain calves after transferring GFP positive embryos to recipients (experimental group). The pBLGTNF-EGFP gene construct containing the human alpha gene (hTNFalpha) tumor necrosis factor and bovine β -lactoglobulin promoter in pCX-EGFP plasmid vector (pBLGTNF-EGFP) was introduced into the pronuclei of zygotes by microinjection. Twenty GFP positive embryos were transferred to recipients. Five calves were born (25%): two heifers (21.5 kg, 34.5 kg) and three bulls (31.5 kg, 35.7 kg, 40.5 kg). The integration of pBLGTNF-EGFP in the host genome has so far not been detected in any of the calves. Five in-vitro-produced embryos in the control group were transferred to recipients and four calves were born (80%), all of them bulls (27 kg, 33 kg, 35 kg, and 35.4 kg). These recipients (experimental and control groups) had a normal gestation period (from 277 to 283 days) and uncomplicated vaginal deliveries.

Keywords: cattle embryos, IVP, GFP, TNF, transgenic cattle

Tworzenie transgenicznego bydła jest oparte na produkcji zarodków bydłych *in vitro* (IVP – In Vitro Production). Obie te techniki mają ogromne znaczenie w biotechnologii, przede wszystkim ze względu na możliwość wykorzystania zwierząt gospodarskich jako bioreaktorów do produkcji ważnych białek, mających zastosowanie w medycynie człowieka (15). Jednak jednym z najpoważniejszych problemów w praktycznym wykorzystaniu tych technik jest otrzymanie zdrowego i prawidłowo rozwijającego się potomstwa, co jest związane z rozwojem prenatalnym i postnatalnym tych osobników. Zarodki wyprodukowane *in vitro* rozwijają się szybciej i różnią się pod względem morfologicznym i fizjologicznym od zarodków uzyskanych *in vivo* (1, 10, 16). Również odsetek ciąż potwierdzonych badaniami USG jest niższy niż w przypadku MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer) czy sztucznej inseminacji (8, 10). W okresie prenatalnym obserwowany jest wzrost odsetka resorpcji i poronień płodów, a także przypadki zaburzeń w ich rozwoju oraz dłuższe ciąże (17). Po transferze zarodków wyprodukowanych *in vitro* bardzo często potomstwo charakteryzuje się wieloma zaburzeniami, zwanymi syndromem dużego potomstwa (LOS – Large Offspring Syn-

drome). Najczęstszym objawem LOS jest zwiększona masa ciała tuż po urodzeniu, co jest przyczyną ciężkich porodów (1, 7). Obserwowana jest wysoka śmiertelność okołoporodowa cieląt oraz zwiększona liczba wrodzonych wad. O wiele więcej rodzi się buhajków niż jałówek po transferze zarodków wyprodukowanych *in vitro* (17). Ponieważ tworzenie transgenicznego bydła jest oparte na produkcji zarodków *in vitro*, stąd też potomstwo może nie tylko charakteryzować się powyższymi wadami, ale także mogą ujawnić się u niego wady spowodowane wprowadzeniem konstrukcji genowej. Wprowadzona konstrukcja może wbudować się między współdziałające geny, prowadząc do zaburzeń w ich ekspresji czy wręcz do wyłączenia tych genów. W konsekwencji prowadzi to może do zaburzeń w okresie prenatalnym i postnatalnym (13).

Celem badań było uzyskanie cieląt po transferze zarodków, do których wprowadzono konstrukcję genową.

Materiały i metody

Badania przeprowadzono wg metodyki opisanej szczegółowo w pracach: Chan (2), Duszewska (3-6) oraz Marguant-Le Guienne (12). Schemat badań przedstawiono na ryc. 1.

Jajniki pobierano od krów ubitych w rzeźni. Z pęcherzyków jajnikowych o średnicy od 2 do 6 mm izolowano oocyty, które dojrzewano w warunkach *in vitro* w płynie TCM 199 buforowanym Hepes z dodatkiem 10% (FBS), 0,02 IU/ml pFSH (SIGMA), 17β -estradolu (SIGMA), 0,2 mM pirogronianu sodu (MERCK) oraz 50 μ g/ml gentamycyny (SIGMA), 100 IU penicyliny (SIGMA) i 50 μ g/ml streptomycyny (SIGMA). Oocyty hodowano przez 24 godziny w temperaturze 38,5°C i 5% CO₂ w powietrzu.

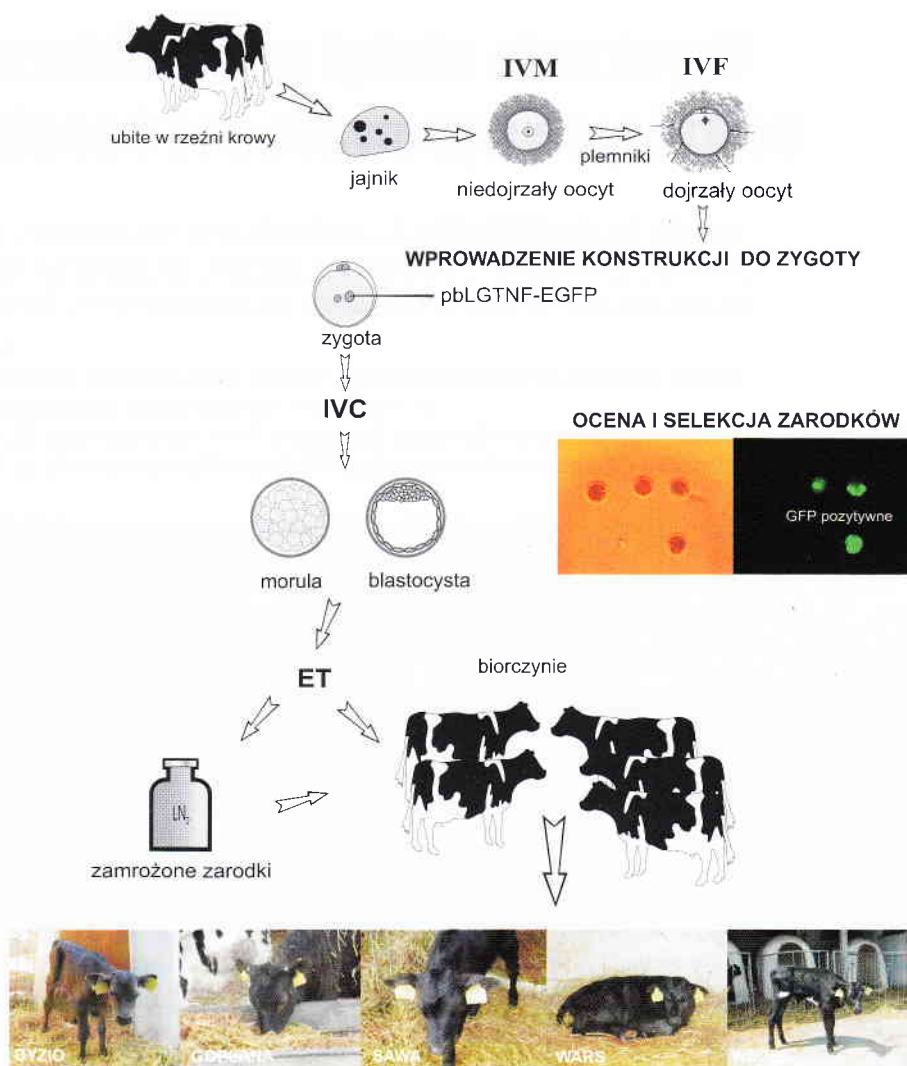
Do zapłodnienia *in vitro* użyto nasienia buhaja rasy Jersey. Nasienie rozmrażano w temperaturze 37°C, a następnie wirowano (200 × g) przez 10 min. i poddawano procesowi kapacytacji techniką swim-up w płynie Sp-TALP z dodatkiem 6 mg/ml BSA frakcja V (SIGMA). Dojrzałe oocyty były zapładniane w warunkach *in vitro* w płynie TALP z dodatkiem 6 mg/ml BSA FAF (SIGMA), 40 μ l/ml PHE (SIGMA) i 2 μ g/ml heparyny (SIGMA).

Po 18 godzinach od inseminacji zygoty oczyszczano i wirowano (12 000 × g przez 6 min.) w celu uwidocznienia przedjądrzy. Część zygot stanowiła grupę kontrolną, a część grupę doświadczalną. Do jednego z przedjądrzy zygot z grupy doświadczalnej wprowadzano konstrukcję genową (pBLGTNF-EGFP) zawierającą jako gen struktury – gen ludzkiego czynnika martwicy nowotworu typu alfa (hTNF α) oraz gen reporterowy – gen białka świecącego na zielono (GFP). Produkt genu GFP umożliwia przyżyciową ocenę i selekcję zarodków. Jako promotora użyto genu bydłczej β -laktoglobuliny, która jest specyficzna dla komórek nabłonka gruczołu mlekowego.

Zarodki z grupy doświadczalnej i kontrolnej były hodowane w obecności komórek Vero w 40 μ l kroplach utworzonych z pożywki Menez B2 z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydłczej (FBS), 100 IU penicyliny (SIGMA) i 50 μ g/ml streptomycyny (SIGMA). Hodowlę prowadzono przez 7 dni w temperaturze 38,5°C i 5% CO₂ w powietrzu. Następnie zarodki z grupy doświadczalnej były oceniane pod kątem ekspresji genu GFP i tylko te zarodki, które świeciły, czyli były GFP pozytywne, były przenoszone do biorczyń. Do biorczyń przeniesiono również kilka zarodków z grupy kontrolnej.

Ruja u biorczyń zarodków były synchronizowana co 11 dni przez domięśniowe podanie 2 ml (0,5 mg) Cloprostenu. W 7.-8. dniu po wystąpieniu rui zarodki przenoszono do biorczyń w płynie Embryo Transfer Medium (BioLife Transfer Medium, Agtech Inc. USA). Po transferze zarodków biorczyń codziennie obserwowano w celu wykluczenia rui. Po 5 tygodniach od transferu przeprowadzono badania ultraso-

SCHEMAT DOŚWIADCZENIA



Ryc. 1. Od poddanych ubojowi w rzeźni krów pobierano jajniki, z których izolowano oocyty. Izolowane oocyty dojrzewały w warunkach *in vitro* (IVM – in vitro maturation). Dojrzałe oocyty były zapładniane (IVF – in vitro fertilization), a do powstałych zygot wprowadzono konstrukcję genową (pBLGTNF-EGFP). Zarodki hodowano w warunkach *in vitro* (IVC – in vitro culture) do stadium moruli/blastocysty. Zarodki w tym stadium oceniano i selekcjonowano pod kątem ekspresji GFP i przenoszono do biorczyń (ET – embryo transfer). Po porodzie z urodzonych cieląt wyodrębniono stado

nograficzne. Dla potwierdzenia rozwoju płodów wykonano jeszcze trzykrotne badania USG w odstępach jednego miesiąca. W późniejszym okresie ciąży kontrolowano *per rectum*. Po porodzie cielęta ważono i badano w celu wykluczenia jakichkolwiek zaburzeń.

Wyniki i omówienie

U bydła w okresie prenatalnym najwyższa śmiertelność występuje w rozwoju zarodkowym, czyli od zapłodnienia do zakończenia organogenezy (od 1. do 42. dnia ciąży). W późniejszym okresie, czyli od ukończenia organogenezy do porodu (od 42. do 280. dnia ciąży) śmiertelność płodów jest o wiele niższa. W okresie postnatalnym najwyższa śmiertelność ma miejsce w okresie noworodkowym cieląt (od urodzenia do 28. dnia życia) (10). W przypadku transferu zarodków

Tab. 1. Wyniki transferu do biorecyń zarodków GFP pozytywnych i zarodków wyprodukowanych *in vitro*

Grupy	Liczba urodzonych cieląt/liczba transferowanych zarodków (%)	Długość ciąży (dni)	Masa ciała (kg)	Imię/płeć urodzonych cieląt
Zarodki GFP pozytywne	5/20 (25)	277	21,5	GOPLANA ♀
		282	31,5	DYZIO ♂
		277	34,5	SAWA ♀
		278	35,7	WEDEL ♂
		283	40,5	WARS ♂
Kontrola	4/5 (80)	278	27,0	BOLEK ♂
		284	33,0	CYPISEK ♂
		283	35,0	COLARGOL ♂
		278	35,4	LOLEK ♂

wyprodukowanych *in vitro* odsetek urodzonych cieląt jest niższy niż w przypadku programu MOET czy sztucznej inseminacji (8, 14). Najwyższa śmiertelność występuje między 14. a 15. dniem ciąży, czyli 7 dni po transferze zarodków do biorecyń (9, 14). Wysoka śmiertelność płodów obserwowana jest również w późniejszym okresie (między 42. a 280. dniem ciąży). W okresie postnatalnym wysoka śmiertelność cieląt występuje tuż po urodzeniu (10).

Wyniki badań zamieszczono w tab. 1. Najwyższy odsetek urodzonych cieląt uzyskano w przypadku transferu zarodków z grupy kontrolnej (80%). Wynik ten jest porównywalny, a nawet wyższy niż w przypadku MOET (1, 17), co należy tłumaczyć bardzo ostrą selekcją zarodków przeznaczonych do transferu. O wiele niższy odsetek urodzonych cieląt obserwowano w przypadku transferu zarodków GFP pozytywnych (grupa doświadczalna), (25%). Tak wyraźne różnice między grupą doświadczalną a kontrolną mogą być efektem negatywnego wpływu wprowadzonej konstrukcji genowej na funkcjonowanie genów gospodarza, co w skrajnych przypadkach może prowadzić do resorpcji płodów lub poronień (7).

Nie stwierdzono różnicy w długości ciąży, która w poszczególnych grupach mieściła się w okresie od 277 do 283 dni, co jest zgodne z normami dla tego gatunku. Porody przebiegały bez żadnych komplikacji, a wszystkie biorecynie wycieliły się w sposób naturalny. Urodzone cielęta były zdrowe i charakteryzowały się prawidłową masą ciała (od 21,5 do 40,5 kg). W celu wyeliminowania wystąpienia trudnych porodów celowo do zapłodnienia *in vitro* użyto nasienia buhaja rasy jersey, która charakteryzuje się niską masą ciała. Jednak niepokojącym przypadkiem jest najmniejsza jałówka, której masa urodzeniowa wyniosła tylko 21,5 kg. Jakkolwiek najpoważniejszym problemem związanym z produkcją zarodków *in vitro* jest duża masa urodzeniowa cieląt (7, 11, 17), to jednak zbyt niska masa urodzeniowa może również być zjawiskiem niekorzystnym. W grupie kontrolnej wszystkie urodzo-

ne cielęta są buhajkami. Natomiast w grupie doświadczalnej uzyskano porównywalny rozkład płci (3 buhajki i 2 jałówki).

Obecnie prowadzone są badania nad integracją wprowadzonej konstrukcji (pbLGTNF-EGFP) z genomem gospodarza. Zarówno cielęta po transferze zarodków wyprodukowanych *in vitro* (grupa kontrolna), jak i zarodków GFP pozytywnych (grupa doświadczalna) stanowią unikalne stado cieląt w Polsce. Ponieważ istnieją uzasadnione obawy, że wady u potomstwa mogą ujawnić się w późniejszym okresie, stąd też wszystkie osobniki pozostają pod ścisłą kontrolą w celu monitorowania ich dalszego rozwoju.

Piśmiennictwo

- Bertolini M., Mason J. B., Beam S. W., Carneiro G. F., Sween M. L., Kominek D. J., Moyer A. L., Famula T. R., Sainz R. D., Anderson G. B.: Morphology and morphometry of *in vivo*- and *in vitro*-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. *Theriogenology* 2002, 58, 973-994.
- Chan A. W. S., Chong K. Y. and Schatten G.: Transgenic bovine embryo selection using green fluorescent protein, [w:] Hicks B. W. (wyd.) *Methods in Molecular Biology*, t. 183: Applications and Protocols, Human Press Inc, NJ, Totowa, NJ, 2002, 3-15.
- Duszczyńska A. M., Reklewski Z., Pieńkowski M., Karasiewicz J., Modliński J. A.: Development of bovine embryos on VERO/BRL cell monolayers (mixed co-culture). *Theriogenology* 2000, 54, 1239-1247.
- Duszczyńska A. M., Reklewski Z.: Izolacja oocytów od cielných jałówek techniką OPU. *Med. Wet.* 2001, 57 (1), 41-43.
- Duszczyńska A. M., Reklewski Z., Wojdan J., Gawron W., Korwin-Kossakowski M., Cybulska M.: Ocena jałówek jako dawczyń oocytów wykorzystywanych do uzyskania zarodków w warunkach *in vitro*. *Medycyna Wet.* 2003, 59 (1), 58-60.
- Duszczyńska A. M., Rosochacki S. J., Kozikova L., Cybulska M., Korwin-Kossakowski M., Waś P., Poloszynowicz J., Wicińska K., Szydlik H.: The use of GFP to select bovine embryos. *J. Animal Feed Sciences* 2003, 12, 71-81.
- Eyestone W. H.: Production and breeding of transgenic cattle using *in vitro* embryo production technology. *Theriogenology* 1999, 51, 509-517.
- Farin P. W., Farin C. E.: Transfer of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*: survival and fetal development. *Biol. Reprod.* 1995, 52, 676-682.
- Farin P. W., Slennig B. D., Briit J. H.: Estimates of pregnancy outcomes based on selection of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Theriogenology* 1999, 52, 659-670.
- Farin P. W., Crosier A. E., Farin C. E.: Influence of *in vitro* systems on embryo survival; and fetal development in cattle. *Theriogenology* 2001, 55, 151-170.
- Jacobsen H., Schmidt M., Holm P., Sangild P. T., Vajta G., Greve T., Callesen H.: Body dimensions and birth and organ weights of calves derived from *in vitro* produced embryos cultured with or without serum and oviduct epithelium cells. *Theriogenology* 2000, 9, 1761-1769.
- Marguant-Le Guienne B., Gerard M., Solari A., Thibault C.: *In vitro* culture of bovine eggs fertilized either *in vivo* or *in vitro*. *Reprod. Nutr. Dev.* 1989, 29, 559-568.
- Mench J. A.: Ethics, Animal Welfare and transgenic farm animals. Murray J. D., Anderson G. B., Oberbauer A. M., McGloughlin M. M. (wyd.). *Transgenic animals in agriculture*. CABI Publishing, New York 1999, 251-268.
- Peterson A. J., Lee R. S. F.: Improving successful pregnancies after embryo transfer. *Theriogenology* 2003, 59, 687-697.
- Pinkert C. A., Murray J. D.: Transgenic farm animals. Murray J. D., Anderson G. B., Oberbauer A. M., McGloughlin M. M. (wyd.). *Transgenic animals in agriculture*. CABI Publishing, New York 1999, 1-18.
- Thompson J. G.: Comparison between *in vivo*-derived and *in vitro*-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reprod. Fert. Devel.* 1997, 9, 341-354.
- van Wagtenonck-de Leeuw A. M., Mullaart E., de Roos A. P. W., Merton J. S., den Daas J. H. G., Kemp B., de Ruigh L.: Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* 2000, 53, 575-597.