

Manipulacje na gametach i zarodkach ptaków

ANNA HRABIA, KIYOSHI SHIMADA*, JANUSZ RZĄSA

Katedra Fizjologii Zwierząt Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt AR, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

*Laboratory of Animal Physiology, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya, Aichi 464-8601, Japonia

Hrabia A., Shimada K., Rząsa J.

Manipulations of avian gametes and embryos

Summary

The techniques for gametes, embryos and genome manipulations are poorly developed in birds due at least in part to the difficulties of obtaining a sufficient number of oocytes for experiments and particular development of embryos. In the present study the possibilities of manipulations of avian gametes and embryos, such as multiple ovulations, in vitro ovulation and fertilisation, embryo culture and obtaining transgenic birds, are reviewed. Presently, it is possible to carry out (1) in vitro maturation, ovulation and fertilisation of avian oocytes, (2) embryo culture from one-cell to hatching, (3) producing of chimeras by using manipulated in vitro PGCs and BCs and (4) obtaining transgenic birds.

Keywords: birds, multiple ovulation

Metody manipulacji na gametach i zarodkach u ssaków mają już szerokie zastosowanie praktyczne, natomiast u ptaków nadal pozostają na etapie eksperymentalnym, co wynika m.in. z trudności w pozyskiwaniu wystarczającej ilości oocytów do badań i specyfiki rozwoju zarodków ptasich. W rozrodzie ptaków występują pewne różnice w porównaniu z rozrodem ssaków. Samica jest heterogametyczna i posiada układ chromosomów płciowych ZW, natomiast samiec jest homogametyczny – ZZ. Obecność chromosomów ZW prowadzi do rozwoju tylko lewego jajnika i jajowodu, a układ chromosomów ZZ do rozwoju parzystych jąder. W jajniku obecnych jest kilkadziesiąt pęcherzyków różnej wielkości. Żółte pęcherzyki (u kury o średnicy 8-36 mm) tworzą charakterystyczną hierarchię, w której największy pęcherzyk przedowulacyjny określany jest jako F1, drugi co do wielkości F2 itd. (7). Po owulacji największego pęcherzyka, uwolniony oocyt, obładowany dużą ilością żółtka i otoczony cytolemmą i błoną okołożółtkową wychwytywany jest przez lejek jajowodu. W lejku następuje zapłodnienie i tworzą się dwie dalsze błony: błona ciągła i błona pozażółtkowa, które wraz z błoną okołożółtkową tworzą tzw. błony żółtkowe. Zapłodnienie musi nastąpić przed wytworzeniem błony pozażółtkowej (do 15 min. po owulacji), gdyż plemniki nie są zdolne do jej penetracji (9). U ptaków występuje polispermia fizjologiczna, tzn. wiele plemników przechodzi przez błonę okołożółtkową do blastodysku oocytu (tarczki zarodkowej), gdzie ich chromatyna ulega dekondensacji i tworzą się przedjądrza męskie, jednak tylko jedno łączy się z przedjądrzem żeńskim, tworząc zygotę. Pozostałe przedjądrza degenerują podczas wczesnych etapów rozwoju zarodka (27, 31, 36). Rola

dotychczasowych przedjądrzy jest nieznana. Połączenie przedjądrza żeńskiego i męskiego (syngamia) zachodzi w magnum, odcinku białkotwórczym (około 3,5 h po zapłodnieniu), a pierwszy podział w cieśni lub po wejściu jaja do gruczołu skorupowego (31). Dalszy rozwój zarodka ptaka zachodzący w gruczole skorupowym, obejmuje dziesięć stadiów (I do X) opisanych dla kury przez Eyal-Giladi i Kochav (6). Stadia od I do VI to okres bruzdkowania, w wyniku którego powstaje tarczka zarodkowa, zawierająca około 2 tysięcy komórek ułożonych w 5 warstw oddzielonych od żółtka jamą podzarodkową (6, 17). Z kolei stadia VII do X to okres tworzenia pola jasnego na skutek wypadania komórek ze strony brzusznej centralnej części zarodka. W stadium X centrum tarczki zarodkowej stanowi jednokomórkową warstwę, tzw. pole jasne, natomiast obrzeże stanowi wielokomórkową warstwę, tzw. pole ciemne. W zniesionym jajku zarodek kury liczy 40-60 tys. komórek (stadium X) (6, 17). Opracowanie metod hodowli oocytów ptaków, zapłodnienia i hodowli zarodków poza organizmem w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych ułatwi badanie mechanizmów zapłodnienia i rozwoju oraz manipulacje genomem prowadzące do uzyskiwania ptaków transgenicznych.

Celem opracowania jest przedstawienie wybranych osiągnięć badawczych i technicznych dotyczących manipulacji na gametach, embrionach i genomie ptaków.

Superowulacja

W celu uzyskania jednorazowo większej liczby oocytów od ptaka stosuje się kilkudniową (5-7 dni) iniekcję gonadotropiny surowicy żrebnych kłaczy (PMSG), a następnie pojedyncze podanie hormonu indukujące-

go owulację. PMSG blokuje spontaniczną owulację i stymuluje wzrost pęcherzyków, czego wynikiem jest obecność w jajniku kilku pęcherzyków o jednakowej wielkości (brak hierarchii). Natomiast iniekcja hormonu uwalniającego gonadotropiny (LHRH), hormonu luteinizującego (LH) czy ekstraktu z przysadek wywołuje owulację. Zastosowanie techniki superowulacji pozwala uzyskać 2-5 oocytów od kury (12, 15, 26). Natomiast u przepiórek otrzymujących PMSG odpowiedź na podanie LH jest bardzo zróżnicowana. Uzyskano średnio jeden oocyt od ptaka (10).

Owulacje *in vitro*

Metoda opracowana przez Olszańską i wsp. (28) pozwala na hodowlę pęcherzyków jajnikowych ptaków i ich owulację w warunkach doświadczalnych. Wydajność metody (liczba owulacji *in vitro*) zależy od czasu izolacji pęcherzyków przed spodziewaną spontaniczną owulacją. Im krótszy odstęp czasu pomiędzy pobraniem pęcherzyka jajnikowego a przewidywaną naturalną owulacją, tym większy procent owulacji *in vitro* (do 70%). Metoda ta pozwala na badanie mechanizmu owulacji, roli hormonów w tym procesie i wykorzystanie oocytów do zapłodnienia *in vitro*.

Zapłodnienie *in vitro*

Po raz pierwszy klasyczne zapłodnienie *in vitro* oocytów kury pobranych natychmiast po owulacji przeprowadzono ponad 30 lat temu (8). Na blastodysk nakładano zawieszinę plemników i całość inkubowano przez 15 min., a po przemyciu dalsze 24 h. Zapłodnienie i rozwój embrionów badano histologicznie (barwienie hematoksyliną). Znacznie później Nakanishi i wsp. (25) przedstawili dokumentację fotograficzną formowania przedjądru męskich i żeńskich po zapłodnieniu *in vitro*. Żywe kurczęta uzyskano po implantacji do jajowodu kur zastępczych *in vitro* zapłodnionych oocytów (38). Ostatnio Olszańska i wsp. (29) uzyskali u przepiórki japońskiej zapłodnienie *in vitro* oocytów owulowanych pozaustrojowo.

Przeprowadzenie zapłodnienia *in vitro* u ptaków nie jest łatwe, wynika to m.in. z trudności w ustaleniu czasu naturalnej owulacji oraz pozyskania oocytów tylko z błoną okołożółtkową. Ponieważ klasyczna metoda zapłodnienia *in vitro* jest utrudniona, postanowiono zastosować metodę bezpośredniej iniekcji plemnika do cytoplazmy (ICSI), jednak pierwsze próby zakończyły się niepowodzeniem. Dokonano tego po raz pierwszy dopiero w 2003 r. (11). Autorzy wykazali, że bezpośrednia iniekcja pojedynczego plemnika do oocytu przepiórki może aktywować oocyt i prowadzić do zapłodnienia. Ponadto wydłużone spermatydy i plemniki pobrane z jądra są kompetentne do zapłodnienia, tak jak plemniki pochodzące z nasienia. Zastosowanie techniki ICSI może być bardzo użyteczną metodą do badania mechanizmu zapłodnienia, roli gamet w tym procesie, a także do produkcji ptaków transgenicznych przez użycie plemników jako wektorów do wprowadzania obcego DNA do oocytu.

Hodowle embrionów

Z końcem lat 80. opracowano metodę hodowli embrionów kurzych od stadium jednej komórki do wylęgu w warunkach *in vitro* (20, 32). Metoda ma III etapy. Pierwszy etap obejmuje okres od zapłodnienia (stadium jednej komórki) do wytworzenia blastodermi, czyli okres rozwoju zachodzący naturalnie w jajowodzie. Zapłodniony oocyt pobrany z magnum jest umieszczany w naczyniu zawierającym medium składające się z białka rzadkiego i roztworu soli mineralnych. Inkubacja prowadzona jest przez jedną dobę. W drugim etapie embriony przenoszone są do skorup zastępczych wypełnionych medium i hodowane przez kolejne 3 doby embriogenezy. Następny etap obejmuje okres wzrostu embrionów od czwartej doby do wylęgu i prowadzony jest w większych skorupach zastępczych w celu wytworzenia komory powietrznej nad embrionem. Ta procedura jest również opracowana do hodowli embrionów przepiórek w skorupach jaj kurzych (30).

Inną, zasługującą na uwagę metodą jest metoda hodowli zarodków opracowana przez Chapmana i wsp. (2). Metoda jest przeznaczona do hodowli embrionów od stadium gastrulacji do neurulacji (do 59-64 h) i nazywana jest EC (Early Chick). Hodowla embrionów prowadzona jest na szalkach Petriego wypełnionych medium składającym się z białka jaja kurzego, agaru i antybiotyku. Zaletą tej metody jest możliwość przeprowadzania zabiegów mikrochirurgicznych w obrębie zarodków, mikroiniekcji, implantacji i elektroporacji oraz obserwowania zarodków bezpośrednio w hodowli.

Otrzymywanie ptaków transgenicznych

Cele i metody uzyskiwania ptaków zmienionych genetycznie opisano w kilkunastu pracach przeglądowych (1, 3-5, 13, 14, 16, 19, 23, 33-35, 37). Procedury transferu genów są adaptowane z technik używanych u ssaków lub rozwijane specjalnie dla ptaków. Stosowane metody uzyskiwania ptaków transgenicznych mają na celu wprowadzenie nowego genu do komórek płciowych lub ich prekursorów. Opracowano kilka sposobów wprowadzania egzogenego DNA do genomu ptaków.

Mikroiniekcja DNA do zapłodnionego oocytu. Zapłodnione oocyty pobierane są z magnum i DNA zostaje wprowadzony bezpośrednio do tarczki zarodkowej zapłodnionego oocytu, w pobliże przedjądru żeńskiego. Ponieważ u ptaków cytoplazma jest nieprzezroczysta, nie ma możliwości bezpośredniej iniekcji do żeńskiego czy męskiego przedjądru. Efektywność tej metody jest bardzo niska, ponieważ wprowadzony do cytoplazmy DNA często nie zostaje zintegrowany z DNA chromosomów i ulega degeneracji podczas wczesnych etapów rozwoju zarodka. Zastosowanie plemników jako wektorów do wprowadzania obcego DNA w połączeniu z techniką ICSI byłoby dobrym rozwiązaniem i mogłoby mieć zastosowanie praktyczne. Jednak technika ta, wraz z możliwością hodowli oocytów będących tuż po owulacji wymaga udoskonalenia.

Elektroporacja i lipofekcja. Rozwój technik lipofekcji i elektroporacji (18, 21) umożliwia transfekcję komórek *in vitro* i *in vivo*. Metodami tymi wprowadzono DNA do plemników oraz embrionów będących w stadium rozwoju X (E-G&K). Plemników poddanych lipofekcji, elektroporacji lub inkubacji z egzogennym DNA użyto do sztucznej inseminacji kur i uzyskano pozytywne na obecność transgeny tylko jednodniowe embriony. Uzyskane wyklute pisklęta nie posiadały egzogenego DNA (24). Stosując elektroporację *in vivo* embrionów w stadium X (22) uzyskano wysoką ekspresję egzogenego DNA w tkankach embrionów, jednak podczas rozwoju zarodka DNA ulegało degradacji.

Użycie komórek zarodkowych do produkcji chimer. Obecnie najbardziej obiecującą metodą prowadzącą do uzyskania ptaków transgeniczných jest użycie komórek blastodermalnych (BCs) lub pierwotnych komórek płciowych (PGCs). Wykorzystuje się BCs pochodzące od embrionów będących w stadium X (E-G&K), a które posiadają pewną liczbę prekursorów PGCs. Z kolei PGCs izoluje się z jamy zarodkowej embrionów w stadium X-XII (E-G&K), z krwi (2.-3. dzień inkubacji) lub z różnicujących się gonad zarodków (5.-6. dzień inkubacji). Zarówno BCs, jak i PGCs można hodować *in vitro*, zamrażać i wprowadzać egzogeny DNA, np. na drodze elektroporacji czy lipofekcji. W wyniku iniekcji BCs do embrionów biorców będących w stadium rozwoju X uzyskuje się chimery fenotypowe i mały procent chimer płciowych. Natomiast wykorzystując PGCs wprowadza się je do embrionów będących w takim samym stadium rozwoju jak zarodki, od których pochodzą i uzyskuje się chimery płciowe. Chimery wykorzystuje się dalej do wyprowadzenia linii ptaków transgeniczných lub do biokonserwacji genotypów.

Podsumowanie

Obecnie możliwe jest: (1) przeprowadzenie dojrzewania, owulacji i zapłodnienia *in vitro* (klasycznie i ICSI) oocytów ptasich, (2) hodowla *in vitro* embrionów od jednokomórkowej zygoty do wylęgu pisklęcia, (3) uzyskanie chimer wykorzystując świeże, przechowywane i manipulowane *in vitro* PGCs i BCs oraz (4) otrzymanie ptaków transgeniczných. Opracowanie efektywnych metod manipulacji komórkami blastodermalnymi i pierwotnymi komórkami płciowymi rokuje największe nadzieje w uzyskiwaniu ptaków transgeniczných i biokonserwacji genotypów.

Piśmiennictwo

1. Bednarczyk M.: Manipulacje komórkami embrionalnymi ptaków. *Biotechnologia* 2003, 60, 36-47.
2. Chapman S. C., Collignon J., Schoenwolf G. C., Lumsden A.: Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier. *Dev. Dyn.* 2001, 220, 284-289.
3. Etches R. J.: Manipulating the avian genome. *Proc. Int. Cong. Bird Reprod., Tours 1999*, 169-173.
4. Etches R. J., Verrinder Gibbins A. M.: Manipulation of the Avian Genome. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida 1993.
5. Etches R. J., Carsience R. S., Fraser R. M., Clark M. E., Toner A., Verrinder Gibbins A. M.: Avian chimeras and their use in manipulation of the avian genome. *Poult. Sci.* 1993, 72, 882-889.

6. Eyal-Giladi H., Kochav S.: From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and new look at the first stages of the development of the chick. I General Morphology. *Dev. Biol.* 1976, 49, 321-337.
7. Gilbert A. B.: Female genital organs, [w:] King A. S., McLelland J. (red.): Form and Function in Birds. Academic Press, London 1979, 1, 237-360.
8. Howarth B. Jr.: An examination for sperm capacitation in the fowl. *Biol. Reprod.* 1971, 3, 338-341.
9. Howarth B.: Maturation of spermatozoa and mechanism of fertilization, [w:] Cunningham F. J., Lake P. E., Hewitt D. (red.): Reproductive biology of Poultry. British Poultry Science Ltd, Oxford 1984, 161-174.
10. Hrabia A., Takagi S., Shimada K.: Variable response to hormonal induction of multiple ovulation in quail. *J. Poult. Sci.* 2003, 40, 234-238.
11. Hrabia A., Takagi S., Ono T., Shimada K.: Fertilization and development of quail oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.* 2003, 69, 1651-1657.
12. Imai K.: Effects of avian and mammalian pituitary preparations on induction of ovulation in the domestic fowl. *J. Reprod. Fert.* 1973, 33, 338-341.
13. Ishii Y., Reese D., Mikawa T.: Somatic transgenesis using retroviral vectors in the chicken embryo. *Dev. Dyn.* 2004, 229, 630-642.
14. Ivarie R.: Avian transgenesis: progress towards the promises. *Trends Biotech.* 2003, 21, 14-19.
15. Johnson A. L., Leone E. W.: Ovine luteinizing hormone-induced steroid and luteinizing hormone secretion, and ovulation in intact and pregnant mare serum gonadotropin-prmed hens. *Poult. Sci.* 1985, 64, 2171-2179.
16. Kamihira M., Nishijima K., Iijima S.: Transgenic birds for the production of recombinant proteins. *Adv. Biochem./Biotechnol.* 2004, 91, 171-189.
17. Kochav S., Ginsburg M., Eyal-Giladi H.: From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. II Microscopic anatomy and cell population dynamics. *Dev. Biol.* 1980, 79, 296-308.
18. Muramatsu T., Nakamura A., Park H. M.: In vitro electroporation: a powerful and convenient means of nonviral gene transfer to tissues of living animals (Review). *Int. J. Mol. Med.* 1998, 1, 55-62.
19. Mozdziaż P., Petite J. N.: Status of transgenic chicken models for developmental biology. *Dev. Dyn.* 2004, 229, 414-421.
20. Naito M., Nirasawa K., Oishi T.: Development in culture of the chick embryo from fertilized ovum to hatching. *J. Exp. Zool.* 1990, 254, 322-326.
21. Naito M., Sano A., Tagami T., Harumi T., Matsubara Y.: Efficient transfection of chicken blastoderms *in vivo* by lipofection and electroporation using green fluorescent protein gene as a marker. *Anim. Sci. J.* 2000, 71, 377-385.
22. Naito M., Sano A., Tagami T., Harumi T., Matsubara Y., Kuwana T.: Efficient gene transfer into early chicken embryos by electroporation of stage X blastoderms *in vivo*, applying electric pulses vertically to the blastoderm layer. *J. Poult. Sci.* 2002, 39, 292-301.
23. Naito M.: Genetic manipulation in chickens. *World's Poult. Sci. J.* 2003, 59, 361-371.
24. Nakanishi A., Iritani A.: Gene transfer in the chicken by sperm-mediated methods. *Mol. Reprod. Dev.* 1993, 36, 258-261.
25. Nakanishi A., Utsumi K., Iritani A.: Early nuclear events of *in vitro* fertilization in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Mol. Reprod. Dev.* 1990, 26, 217-221.
26. Nakanishi A., Miyake M., Utsumi K., Iritani A.: Fertilizing competency of multiple ovulated eggs in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Mol. Reprod. Dev.* 1991, 28, 131-135.
27. Okamura F., Nishiyama H.: Penetration of spermatozoa into the ovum and transformation of the sperm nucleus into the male pronucleus in the domestic fowl, *Gallus gallus*. *Cell. Tissue Res.* 1978, 190, 89-98.
28. Olszanska B., Malewska A., Stepińska U.: Maturation and ovulation of Japanese quail oocytes under *in vitro* conditions. *Br. Poult. Sci.* 1996, 37, 929-935.
29. Olszanska B., Stepińska U., Perry M. M.: Development of embryos from *in vitro* ovulated and fertilized oocytes of the quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J. Exp. Zool.* 2002, 292, 580-586.
30. Ono T., Murakami T., Mochii M., Agata K., Kino K., Otsuka K., Ohta M., Mizutani M., Yoshida M., Eguchi G.: A complete culture system for avian transgenesis, supporting quail embryos from the single-cell stage to hatching. *Dev. Biol.* 1994, 161, 126-130.
31. Perry M. M.: Nuclear events from fertilization to the early cleavage in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J. Anat.* 1987, 150, 99-109.
32. Perry M. M.: A complete culture system for the chick embryo. *Nature* 1988, 331, 70-72.
33. Petite J. N.: The avian germline and strategies for the production of transgenic chickens. *J. Poult. Sci.* 2002, 39, 205-228.
34. Sang H.: Transgenic chickens – methods and potential applications. *Trends Biotech.* 1994, 12, 415-420.
35. Sang H.: Prospects for transgenesis in the chick. *Mech. Dev.* 2004, 121, 1179-1186.
36. Waddington D., Gribbin C., Sterling R. J., Sang H. M., Perry M. M.: Chronology of events in the first cell cycle of the polyspermic egg of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Int. J. Dev. Biol.* 1998, 42, 625-628.
37. Tajima A.: Production of germ-line chimeras and their application in the domestic chicken. *Avian Poult. Biol. Rev.* 2002, 13, 15-30.
38. Tanaka K., Wada T., Koga O., Nishio Y., Hertelendy F.: Chick production by *in vitro* fertilization of fowl ovum. *J. Reprod. Fert.* 1994, 100, 447-449.