

Modyfikacje genetyczne komórek zarodkowych ptaków^{*)}

MAGDALENA WAWRZYŃSKA, MAREK BEDNARCZYK

Katedra Biotechnologii Zwierząt Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt, UTP, ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

Wawrzyńska M., Bednarczyk M.

Genetic modification of avian embryonic cells

Summary

The demand for human pharmaceuticals is increasing rapidly from year to year. Most of them are currently produced in expensive bacterial bioreactors. A potential way to produce large amounts of easily available, cheap recombinant proteins is through depositing them in chicken eggs. However, manipulations on oocytes are difficult to perform in chickens because of the specific nature of the avian reproductive system. Therefore, safe non-viral methods of producing transgenic poultry have been developed. One of the safest procedures is microinjection where naked DNA is injected directly into blastoderm. An alternative method uses transfected blastodermal cells, cultured *in vitro*, which can be injected into recipient embryos. The most common ways of introducing genes into blastodermal cells are electroporation and lipofection. Recently, experiments with new techniques like microelectroporation, nucleofection and neutral lipids have also been performed as well as tests using fluorescent and magnetic activated cell sorting to achieve higher efficiency.

Keywords: chicken, recombinant proteins

Nowe techniki modyfikacji genetycznej komórek zwierzęcych przyczyniły się do powstania w ciągu kilku lat odrębnej gałęzi przemysłu, wykorzystującej narządy i tkanki zwierząt transgenicznych do produkcji ludzkich białek terapeutycznych (17). Jest ona uzasadniona z uwagi na pogłębiającą się różnicę pomiędzy popytem na biofarmaceutyki a podażą ludzkich tkanek do ich izolacji, jak również nie tylko potencjalnym zagrożeniem przenoszenia tą drogą groźnych chorób (AIDS, Creutzfelda-Jakoba, i in.). Natomiast produkcja rekombinowanych białek hodowanych *in vitro*, w bioreaktorach przemysłowych, zmodyfikowanych komórkach zwierzęcych lub bakteryjnych jest nadal drogą, zwłaszcza w porównaniu z ich produkcją w tkankach zwierzęcych.

Szacuje się (9), że koszt produkcji jednego grama białka w hodowlach komórkowych *in vitro* wynosi od około 50 do 150 USD. Natomiast np. w gruczole mlekowym waha się od 6 do 20 USD. Jeszcze bardziej atrakcyjne jest wykorzystanie jajowodu kury, bowiem koszt produkcji białek farmaceutycznych w tym systemie ocenia się na 10-25 centów/gram (8).

Tak niska cena odzwierciedla wyjątkowe predyspozycje ptaków do produkcji w jajowodzie egzogennych białek, które deponowane w jaju mogą się stać cennym źródłem biofarmaceutyków. Białka jaja kurzego

są produktami ekspresji jedynie 7 genów, a jeden z nich – gen owoalbuminy – odpowiedzialny jest za ekspresję aż ponad 50% ich objętości. Bardzo istotna jest możliwość sterylnej produkcji biofarmaceutyków w części białkotwórczej jajowodu, przez ptaki utrzymywane w środowisku wolnym od drobnoustrojów chorobotwórczych (pathogen-free). Wyprodukowane w części białkotwórczej jajowodu (magnum) białko jest otoczone błonami, w tym skorupową i codziennie, w sterylnej formie „wydalane” z organizmu nioski. Genetyczne możliwości produkcji około 330-350 jaj w ciągu roku, przemysłowe metody produkcji, w tym inseminacji oraz opanowane metody izolacji egzogennych białek z białka jaja kurzego są dodatkowym atutem.

Mikroiniekcja DNA lub modyfikowanych komórek do zarodków ptasich

Produkcja transgenicznych ptaków produkujących egzogenne białka nastęcza wiele trudności. Ze względów bezpieczeństwa najczęściej stosuje się metody niewirusowe wprowadzania obcych genów do komórek zwierzęcych. Popularna w odniesieniu do ssaków iniekcja egzogennego DNA do oocyty jest u ptaków utrudniona z uwagi na specyficzny cykl rozwojowy: polispermiczne zapłodnienie w lejku jajowodu, oocyt bogaty w materiał zapasowy, utrudniający manipulację, a przede wszystkim wizualizację przedjądrza, za-

^{*)} Praca finansowana przez MNiIn grant nr 2 P06D 029 26.

awansowany zarodek w momencie zniesienia jaja, liczący około 50 000-60 000 komórek.

Pomimo trudności, próbowano w odniesieniu do ptaków mikroiniekcji, polegającej na wstrzyknięciu „nagiego” DNA do tarczki zarodkowej. Badania z wykorzystaniem konstruktów genowych pRSVcat wykazały (23), że następstwem procedury jest szybkie wyciszenie ekspresji obcego genu. W badaniach tych po siedmiu dniach hodowli transgen wykryto u 30% transfekowanych embrionów. Lepsze wyniki otrzymano po wstrzyknięciu do tarczki zarodkowej DNA kodującego gen niespecyficznego dla ptaków bakteryjnej β -galaktozydazy. Obecność nieswoistego białka wykryto w pierwotnych komórkach płciowych (PGCs) wyizolowanych z krwi, co dowiodło możliwości wytworzenia tą drogą osobników przekazujących wprowadzone cechy przyszłym pokoleniom (12). Za największy sukces tej metody można uznać wynik doświadczenia, w którym wykorzystano ruchome elementy DNA – transpozony umożliwiające lepszą integrację egzogenego DNA w chromosomach gospodarza (15), w rezultacie którego po 12 dniach od iniekcji DNA do tarczki zarodkowej połowa osobników wykazywała ekspresję wprowadzonego genu. Sześć osobników osiągnęło dojrzałość płciową, a u jednego z samców obcy gen został wykryty w nasieniu i cecha została przekazana pokoleniu G1.

Alternatywną metodą w stosunku do mikroiniekcji może być strategia pozwalająca uzyskać ptaki transgeniczne za pośrednictwem chimer płciowych (cyt. 1). Do produkcji chimer ptaków wykorzystuje się totipotentne komórki blastodermalne (BCs) lub pierwotne komórki płciowe (PGCs), charakteryzujące się właściwościami komórek macierzystych. Udoskonalona procedura produkcji ptasich chimer (2, 3, 7) wykorzystująca iniekcję BCs do zarodka biorcy wskazuje na BCs jako doskonałe narzędzie umożliwiające otrzymanie transgenicznych ptaków. Zaletami BCs są nie tylko szeroka dostępność i łatwy sposób izolacji, ale także możliwość utrzymywania komórek w hodowli *in vitro* przez wiele dni, co ułatwia ich transformację. Dodatkowo obecność w populacji BCs około 20-30 prekursorów gamet – PGCs umożliwia uzyskanie chimer płciowych (4), które mogą przekazywać nową cechę na następne generacje.

Plemniki i precypitacja

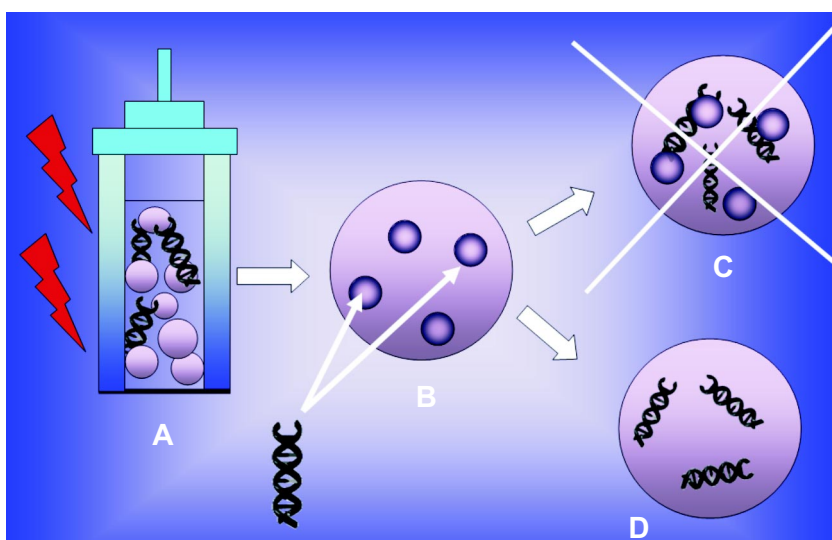
Komórkami idealnie przystosowanymi do przenoszenia informacji genetycznej z pokolenia na pokolenie są plemniki, stanowiące doskonałe narzędzie do wprowadzania do oocytów egzogenego DNA. Atutami przemawiającymi za ich wykorzystaniem są nie tylko łatwiejszy dostęp do plemników w porównaniu z oocytami i niższy koszt ich pozyskania, ale także znacz-

nie większa liczebność w porównaniu do populacji żeńskich komórek rozrodczych. Metodę, która udowodniła, że taka transfekcja jest możliwa w przypadku ptaków, zaproponował Sugihara i wsp. (25). W wyniku wstrzyknięcia do jąder koguta plazmidu kodującego gen acetylotransferazy chloramfenikolu udało się uzyskać ekspresję genu w miejscu iniekcji trwającą do 28. dnia po zabiegu (25).

Jedną z najstarszych niewirusowych metod transfekcji komórek ptaków jest precypitacja. Obecnie ma jednak znikome zastosowanie, z uwagi na znaczną toksyczność. Wśród pozostałych uniwersalnych zastosowań (BCs, PGCs, plemniki) mają: elektroporacja, nukleofekcja i lipofekcja.

Metody wprowadzania DNA do zarodka z wykorzystaniem prądu elektrycznego

Elektroporacja (ryc. 1) polega na wykorzystaniu zjawiska transportu makromolekuł do wnętrza komórki, dzięki pojawianiu się przejściowych porów w błonie komórkowej, powstałych na skutek działania prądu elektrycznego. Jednakże w wyniku nieumiejętnego zastosowania prądu może dojść do przekroczenia wartości krytycznej tolerancji komórki, skutkiem czego są nieodwracalne zmiany w błonie komórkowej, co prowadzi do śmierci na drodze biernego procesu nekrozy lub/i czynnego procesu apoptozy. W związku ze specyficznymi właściwościami BCs i PGCs nie można zastosować podczas transfekcji parametrów procesu skutecznych dla innych linii komórkowych, np. komercyjnie dostępnych procedur stosowanych dla bakterii czy komórek ssaków. Dlatego w dalszym ciągu trwają badania eksperymentalne nad opracowaniem procedury elektroporacji zapewniającej, z jednej strony, wysoką przeżywalność komórek, z drugiej zaś –



Ryc. 1. Elektroporacja komórek blastodermalnych: A – elektroporacja; B – migracja DNA do komórki przez otwarte pod wpływem prądu pory w błonie komórkowej; C – komórka, w której parametry prądu zostały dobrane nieodpowiednio, komórka ulega nekrozie lub/i apoptozie; D – komórka, która ujawni wprowadzony gen, parametry prądu zostały dobrane

wysoki odsetek transfekowanych komórek, ujawniających ekspresję transgenu.

Jedną z procedur wykorzystujących elektroporację polega na zastosowaniu prądu o napięciu 250 V i pojemności 950 μF w obecności plazmidu kodującego gen lacZ. W doświadczeniu (12) transfekcji poddano PGCs wyizolowane z gonad 6-dniowych embrionów. Po 24-godzinnej hodowli komórki wstrzyknięto do biorców, będących w 17. stadium rozwoju. Gen lacZ wykryto we wszystkich zarodkach w 6. dobie inkubacji, u 67% w dobie 10. i u 41% osobników po wykluciu. Natomiast analiza PCR wskazała na możliwości wykorzystania metody do transfekcji PGCs.

Nowatorską metodą, która może być również wykorzystana do miejscowego wprowadzania leków lub immunizacji, jest mikroelektroporacja. W technice tej zawieszona DNA wstrzykiwana jest *in ovo*, a elektrody przykładane są w okolicach iniekcji DNA. Obiecujące rezultaty otrzymano przy zastosowaniu zewnętrznych elektrod igłowych przykładanych do zarodka będącego w X stadium rozwoju (10). W badaniach tych po wprowadzeniu genu reporterowego – GFP, zjawisko fluorescencji obserwowano w tkankach zarodka w ciągu 48 godzin inkubacji. W doświadczeniu wykonanym przez Momose i wsp. (18) około 90% embrionów przeżyło pierwszą dobę po elektroporacji. Ekspresja była zauważalna już w 2,5 godziny po zastosowaniu prądu i utrzymywała się do 3 doby. Udowodniono też, że elektroporacja stosowana *in vivo* może powodować szybką ekspresję obcych białek, deponowanych w jaju kurzym (26). W magnum jajowodu uzyskano ekspresję ludzkiej fosfatazy alkalicznej, która w białku jaja była identyfikowana w maksymalnej ilości w 2 dni po transfekcji. Efekt okazał się jednak krótkotrwały, ponieważ po 4 dniach ekspresja

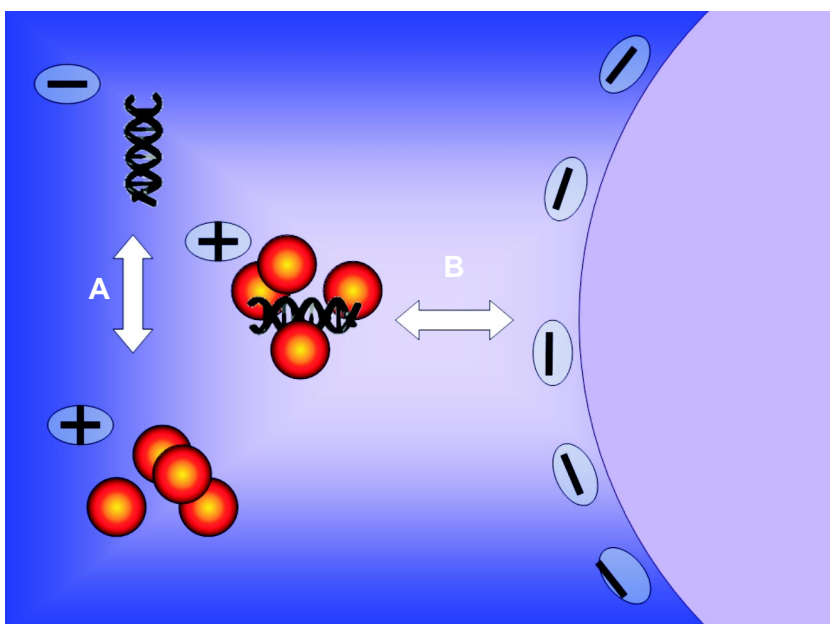
prawie zanikła (26). Prawdopodobną przyczyną wyciszenia ekspresji genów jest obserwowany po elektroporacji stopniowy, cytoplazmatyczny rozkład egzogenego DNA. Obronny mechanizm trawienia obcego DNA przez komórkowe endonukleazy może być więc przeszkodą uniemożliwiającą dotarcie DNA do jądra komórki i późniejszą ekspresję białka. Interesującą propozycją rozwiązania tego problemu jest najnowsza technologia – nukleofekcja, umożliwiająca wprowadzenie DNA bezpośrednio do jądra komórkowego (11). Metoda została opatentowana przez firmę Amaxa, która nie udostępnia informacji na temat parametrów procesu. W badaniach własnych (28) wykazano, że dobierając odpowiednie parametry prądu elektrycznego można uzyskać porównywalną do technologii Amaxa wydajność transfekcji.

Lipofekcja

Równocześnie prowadzone są badania nad mniej wydajną w przypadku BCs i PGCs lipofekcją, wykorzystującą naturalne właściwości błon (ryc. 2). Jej zaletą jest możliwość ochrony przed strawieniem przez cytoplazmatyczne DNAzy wprowadzanego do komórki DNA, dzięki opłaszczającym właściwościom lipidów. Metoda jest tania, łatwa i bezpieczna w użyciu. Cechuje ją niska immunogenność i możliwość wprowadzenia do komórek także dużych fragmentów DNA. Wydajność lipofekcji jest tkankowo specyficzna, a o efektywności transportu DNA do wnętrza komórki decydują właściwości fizykochemiczne kompleksu lipid-DNA (5).

Jedno z pierwszych doświadczeń z wykorzystaniem lipofekcji do transfekcji BCs zostało przeprowadzone w 1991 r. (6). Wyizolowane BCs inkubowano w obecności konstruktu opłaszczającego LipofektynąTM. Następnie komórki zostały wstrzyknięte do zarodków biorców (X stadium rozwoju). Po 65 godzinach inkubacji ujawniła się aktywność β -galaktozydazy. W przeprowadzonym równoległym doświadczeniu, w którym wstrzyknięto plazmid opłaszczony lipidem bezpośrednio do embrionu *in vivo* zaobserwowano jedynie kilka komórek wykazujących ekspresję genu lacZ (6). Skuteczność metody transfekcji komórek BCs *in vitro* za pomocą lipofektyny została także potwierdzona w badaniach własnych (5).

Prowadzone były również próby wprowadzania genów za pomocą lipofekcji do PGCs wyizolowanych z krwi i ich iniekcji do zarodków biorców. W 3. dobie inkubacji 95% embrionów wykazywała ekspresję egzogenego białka w gonadach, podczas gdy wśród wyklutych piskląt jedynie w 11,1%. Cecha nie podlegała dziedziczeniu (21). Prowadzone były także badania nad lipofekcją PGCs wyizolowanych z gonad. W doświadczeniu z zastosowaniem



Ryc. 2. Lipofekcja: A – przyciąganie pomiędzy dodatnio naładowanym lipidem i DNA o ładunku ujemnym; B – przyciąganie pomiędzy lipidem o ładunku dodatnim i błoną komórkową o ładunku ujemnym

Lipofektaminy uzyskano jednak niską ekspresję genu lacZ, na poziomie 17% (12).

Innym wariantem techniki wykorzystującym lipofekcję jest bezpośrednia iniekcja lipofektanta z DNA do zarodka bez uprzedniej inkubacji z BCs. W doświadczeniu z jej wykorzystaniem po 48 godz. inkubacji odnotowano 52,7% przeżywalność zarodków, spośród których 41,4% ujawniło obecność egzogenego genu lacZ (20). Jak duże znaczenie ma rodzaj zastosowanego lipofektanta dowiedziano, stosując ten sam plazmid, ale inny lipofektant-DDAB. W rezultacie uzyskano wyższą ekspresję genu – na poziomie 80% w embrionach 3- i 4-dniowych przepiórek. Przeżywalność embrionów była również wysoka. Wykluczyło się 35% ptaków (22).

Nowatorski sposób transfekcji komórek zaproponował Maruyama i wsp. (16), w którym działanie prądu połączono z wcześniejszą inkubacją komórek z plazmidem w obecności lipofektanta. Po trzech dniach inkubacji 75% embrionów wykazywała ekspresję β -galaktozydazy.

Próbowano również wykorzystać metodę balistyczną do transfekcji zarodków. Jednak mimo wysokiej skuteczności (wydajność ekspresji 100%) jej efektem była wysoka zamieralność embrionów wynosząca 75% (24).

Sortowanie komórek

Niedawno pojawiła się nowa koncepcja, zmierzająca do zwiększenia puli transfekowanych komórek wprowadzanych do zarodków biorców. Jej podstawą jest możliwość magnetycznego i/lub fluorescencyjnego sortowania komórek (14, 19, 27). Dzięki wykorzystaniu elektroporacji z plazmidami kodującym gen LacZ i przeciwciała mysie K^k oraz zastosowaniu sortera magnetycznego MACS uzyskano populację BCs wykazującą około 1,4 razy wyższą ekspresję genu LacZ w porównaniu z grupą kontrolną (27). Przeprowadzono także udane próby izolacji PGCs przy pomocy sortera fluorescencyjnego FACS (19). Rezultaty te wskazują nowy kierunek prowadzenia doświadczeń w przyszłości.

Przedstawione badania wskazują na możliwość wykorzystania zarodkowych komórek ptaków, jako doskonałego obiektu umożliwiającego tworzenie transgenicznych ptaków. Na wydajność ich transformacji składa się wiele czynników: metoda transfekcji, miejsce transfekcji, rodzaj użytego plazmidu i jego toksyczność, jak również zastosowanie sortera. W związku z dynamicznym rozwojem przedstawionych metod istnieje wysokie prawdopodobieństwo, że w niedalekiej przyszłości możliwe będzie pozyskiwanie szerokiej gamy ludzkich białek terapeutycznych w tkankach bioreaktorów ptasich.

Piśmiennictwo

1. Bednarczyk M.: Manipulacje komórkami embrionalnymi ptaków. *Biotechnologia* 2003, 60, 37-47.

2. Bednarczyk M., Łakota P., Grajewski B.: Ocena przeżywalności zarodków kaczych i gęsich po iniekcji do jamy podzarodkowej komórek blastodermalnych dawców. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 521-524.
3. Bednarczyk M., Łakota P., Siwek M.: Improvement of hatchability of chicken egg injected by blastoderm cells. *Poult. Sci.* 2000, 78, 1283-1288.
4. Bednarczyk M., Łakota P., Słomski R., Pawłowski A., Lipniski D., Siemieniako D., Lisowski M., Czekalski P., Grajewski B., Dłużniewska P.: Reconstitution of a chicken breed by inter se mating of germline chimeric birds. *Poult. Sci.* 2002, 81, 1347-1353.
5. Bednarczyk M., Plucienniczak G., Plucienniczak A., Łakota P., Sochanik A., Dłużniewski P., Grajewski B.: Expression of exogenous genes in blastodermal cells of chicken in vitro. *Folia Biol.* 2003, 51, 189-194.
6. Brazalot C. L., Pettite J. N., Etches R. J., Verrinder Gibbins A. M.: Efficient transfection of chicken cells by lipofection, and introduction of transfected blastodermal cells into the embryo. *Mol. Reprod. and Dev.* 1991, 30, 304-312.
7. Czekalski P., Bednarczyk M.: Wpływ chimeryzmu na wybrane cechy reprodukcyjne kogutów. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 85-88.
8. Das R. C.: Production of therapeutic proteins from transgenic animals. *Bio-Business* 2001, 2, 60-64.
9. Dyck M. K., Lacroix D., Pothier F., Sirard M. A.: Making recombinant proteins in animals-different systems, different applications. *Trends Biotechnol.* 2003, 21, 394-399.
10. Furuta H., Fujihara N.: Introduction of exogenous genes into chicken embryos by electroporation using a needle type electrode. *J. Poult. Sci.* 2000, 37, 334-340.
11. Hamm A., Krott N., Breibach I., Blindt M. D., Bosserhoff A.: Efficient transfection method for primary cells. *Tissue Eng.* 2002, 8, 235-245.
12. Hong Y. H., Moon Y. K., Jeong D. K., Han J. Y.: Improved transfection efficiency of chicken gonadal primordial germ cells for the production of transgenic poultry. *Transgenic Res.* 1998, 7, 247-252.
13. Inada S., Hattori M. A., Fujihara N., Morohashi K.: In vivo gene transfer into the blastoderm of early developmental stage of chicken. *Reprod. Nutr. Dev.* 1997, 37, 13-20.
14. Levoir M. van de, Diamond J. H., Leighton P. A., Mather-Love C., Heyer B. S., Bradshaw R., Kerchner A., Hooi L. T., Gessaro T., Swanbeg S. E., Delany M. E., Etches R. J.: Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* 2006, 441, 766-769.
15. Love J., Gribbin C., Mather C., Sang H.: Transgenic birds by DNA microinjection. *Biotechnology (N Y)* 1994, 12, 60-63.
16. Maruyama K., Kagami H., Matsubara Y., Harumi T., Tagami T., Naito M.: Transfection of blastodermal cell with reporter genes and expression in early chick embryos. *Jap. Poult. Sci.* 2000, 37, 142-153.
17. Max A.: Practical use of animal reproductive biotechnology. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 697-776.
18. Momose T., Tonegawa A., Takeuchi J., Ogawa H., Umesono K., Yasuda K.: Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Develop. Growth Differ.* 1999, 41, 335-344.
19. Mozdziaż P. E., Angerman Stewart J., Rushton B., Pardue S. L., Pettite J. N.: Isolation of chicken primordial germ cells using fluorescence-activated cell sorting. *Poult. Sci.* 2005, 84, 594-600.
20. Muramatsu T., Mizutani Y., Ohmori Y., Okumura J.: Comparison of three nonviral transfection methods for gene expression in early chicken embryos in ovo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 230, 376-380.
21. Naito M., Sano A., Harumi T., Matsubara Y., Kuwana T.: Migration of primordial germ cells isolated from embryonic blood into the gonads after transfer to stage X blastoderms and detection of germline chimaerism by PCR. *Br. Poult. Sci.* 2004, 45, 762-768.
22. Oguchi S., Kamihira M., Tachibana J. Y., Iijima S.: Exogenous gene transfection into quail embryo using cationic lipid vesicles. *J. Ferm. Bioeng.* 1998, 86, 118-120.
23. Oshop G. L., Elankumaran S., Vakharia V. N., Hecket R.: In ovo delivery of DNA to the avian embryo. *Vaccine* 2003, 21, 1275-1281.
24. Ribeiro L. A., Mariani P. D. S. C., Azevedo J. L., Rech E. L., Schmidt G. S., Coutinho L. L.: A biolistic process for in vitro gene transfer into chicken embryos. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2001, 34, 1115-1124.
25. Sugihara K., Park H.-M., Muramatsu T.: In vivo gene electroporation confers strong transient expression of foreign genes in the chicken testis. *Poult. Sci.* 2000, 79, 1116-1119.
26. Takami H., Watanabe H., Ohmori Y., Park H.-M., Muramatsu T.: Human alkaline phosphatase expression and secretion into chicken eggs after in vivo gene electroporation in the oviduct of laying hens. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 2002, 292, 88-93.
27. Tsunekwa N., Naito M., Sakai Y., Nishida T., Noce T.: Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development* 2000, 127, 2741-2750.
28. Wawrzyńska M., Bednarczyk M., Łakota P., Lubiszewska M.: Influence of electroporation on chicken blastoderm cells' viability in vitro. *Vet. Med. Praha* 2006 (w druku).