

Porównanie uszkodzeń DNA plemników królików transgenicznych i nietransgenicznych

Piotr Gogol, Michał Bochenek

*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,
Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa*

Transgeneza zwierząt polega na ich modyfikacji genetycznej za pomocą konstrukcji genowych, które po wprowadzeniu do komórek i integracji z genomowym DNA gospodarza ulegają ekspresji *in vivo*, nadając organizmowi nową cechę. Technologia ta jest przedmiotem zainteresowania biotechnologów ze względu na możliwość wykorzystania jej do takich celów, jak poprawa cech użytkowych zwierząt gospodarskich, produkcja białek terapeutycznych, uzyskanie zwierząt odpornych na choroby czy dawców narządów w ksenotransplantacji.

Poprawa cech użytkowych obejmuje zmiany zmierzające do podniesienia efektywności produkcji zwierzęcej poprzez spowodowanie ekspresji określonych białek, mających wpływ na zwiększenie masy ciała zwierząt, np. nadekspresja hormonu wzrostu wywołana w określonych tkankach (głównie w tkance mięśniowej) oraz modyfikacje szlaków metabolicznych, za które odpowiedzialne są pojedyncze geny. Znacznie większym zainteresowaniem, ze względu na potencjalnie bardziej spektakularne i wymierne finansowe korzyści, cieszą się obecnie prace ukierunkowane na wykorzystanie zwierząt jako źródła wielu istotnych w medycynie, przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym białek (Houdebine, 2000). Granica pomiędzy tymi dwoma kierunkami wykorzystania zwierząt transgenicznych coraz bardziej się zaciera. Związane to jest z tym, że często modyfikacje genetyczne są tak pomyślane, aby suma ich efektów miała jak najszersze, możliwe do przewidzenia i korzystne efekty. Przykładem takiego postępowania są uzyskane w naszym Dziale transgeniczne króliki z wbudowanym ge-

nem fukozylotransferazy (Fuc), połączonym z promotorem białka kwaśnej serwatki (WAP) (Jura i in., 2003). Zastosowanie tego konstruktu genowego miało na celu spowodowanie bakteriostatycznego działania mleka poprzez wzbogacenie jego składu o białko enzymu fukozylotransferazy oraz spowodowanie obniżenia ilości laktozy, która jest głównym czynnikiem alergennym mleka.

Dynamiczny rozwój badań nad wprowadzaniem genetycznych zmian organizmów na drodze transgenezy wymaga odpowiedzi na pytanie o jakość uzyskanego materiału genetycznego i wpływ na płodność. Zaburzenia rozrodu obserwowane były u transgenicznych myszy, świń i owiec (Pursel in., 1990; Bartke i in., 1992; Meliska i Bartke, 1997; Maleszewski i in., 1998). Trzeba jednak zaznaczyć, że obserwacje te dotyczą przede wszystkim zwierząt z wbudowanym genem o działaniu ogólnoustrojowym, jak np. gen hormonu wzrostu. Obniżona płodność lub bezpłodność samców transgenicznych związana była z zaburzeniami w zachowaniu płciowym lub wadami budowy i upośledzeniem funkcji plemników. Jedną z nieprawidłowości stwierdzonych w plemnikach transgenicznych myszy była niejednorodność i niestabilność struktury DNA (chromatyny) (Rhim i in., 1995; Maleszewski i in., 1998). Takie wady chromatyny stwierdzano również w przypadku ekspozycji zwierząt na niektóre związki mutagenne (Evenson i Jost, 1993). Dowiedziono również, że palenie tytoniu, które jak wiadomo może mieć działanie mutagenne i karcinogenne, powoduje uszkodzenia DNA plemników. Chromatyna plemników u palaczy charakteryzuje się pod-

wyższą wrażliwością na denaturację i występowaniem zwiększonej liczby uszkodzeń łańcucha DNA (Potts i in., 1999). Przypuszcza się, że uszkodzenia struktury chromatyny w plemnikach i związane z tym wzrost wrażliwości DNA na denaturację oraz zaburzenia płodności mogą powstawać wskutek mutacji (Gorczyca i in., 1993). Nie można zatem wykluczyć, że zmiana genomu uzyskana poprzez wprowadzenie obcego fragmentu DNA (konstrukt genowego), co ma miejsce w przypadku osobników transgenicznyc, spowoduje zmiany właściwości DNA. W związku z tym, w kontekście zachowania bezpieczeństwa biotechnologicznego, w Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki PIB prowadzono badania nad wpływem transgenezy na jakość nasienia transgenicznyc królików, ocenianą na podstawie stopnia fragmentacji DNA plemników.

Celem badań było porównanie fragmentacji DNA w plemnikach królików nietransgenicznyc oraz transgenicznyc, w genomie których stwierdzono obecność konstrukt genowego WAP-Fuc. Ocenę struktury (fragmentacji) chromatyny wykonywano metodą Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). Opiera się ona na stwierdzeniu, że nieprawidłowa struktura chromatyny jest związana ze wzrostem wrażliwości DNA na denaturację. W metodzie tej wykorzystuje się metachromatyczne właściwości oranżu akrydyny. Barwnik ten związany z podwójną nicią DNA fluoryzuje w paśmie zielonym, natomiast w połączeniu z pojedynczą nicią DNA w paśmie czerwonym. Po łagodnej denaturacji chromatyny za pomocą obniżonego pH u plemników z nieprawidłową jej strukturą następuje wzmocnienie fluorescencji w paśmie czerwonym. Ten wzrost świecenia jest mierzony w cytometrze przepływowym.

W badaniach wykorzystano nasienie od dojrzałych płciowo 20 transgenicznyc samców, w genomie których stwierdzono obecność konstrukt genowego WAP-Fuc. Grupę kontrolną stanowiło nasienie od 10 nietransgenicznyc samców w podobnym wieku (13–18 miesięcy). Nasienie pobierano w odstępach tygodniowych. Od każdego samca poddano analizie od 2 do 5 ejakulatów. Próbkę analizowano w cytometrze przepływowym Coulter Elite. Barwnik wzbudzano laserowym światłem o długości fali 488 nm i mocy 35 mW. Stopień uszkodzeń struktury

chromatyny oceniano na podstawie obliczanego dla każdego plemnika parametru alfa t (α_t), gdzie $\alpha_t = \text{czerwona} / (\text{zielona} + \text{czerwona})$ fluorescencja. Dla każdej próbki nasienia obliczano odsetek plemników wykazujących fragmentację DNA ($\text{COMP}\alpha_t$) oraz odchylenie standardowe tego parametru ($\text{SD}\alpha_t$), określające stopień zaawansowania fragmentacji chromatyny. Średnia wartość parametru $\text{COMP}\alpha_t$ w grupie samców transgenicznyc wynosiła 3,72. W grupie samców nietransgenicznyc średnia wartość parametru $\text{COMP}\alpha_t$ była nieco niższa i wynosiła 2,91 (różnica statystycznie nieistotna). Średnia wartość parametru $\text{SD}\alpha_t$ dla samców transgenicznyc i nietransgenicznyc wynosiła odpowiednio 10,63 i 10,41 (różnica statystycznie nieistotna).

Przeprowadzone badania chromatyny plemników królików transgenicznyc i nietransgenicznyc wykazały, że w obydwu grupach samców udział plemników z nieprawidłową strukturą chromatyny był na stosunkowo niskim poziomie (około 3%). W skrajnym przypadku odsetek plemników z chromatyną podatną na denaturację osiągnął 5,5%. Wyższy odsetek plemników z uszkodzoną chromatyną w nasieniu transgenicznyc królików stwierdzili Courtens i in. (1994). Posługując się metodą mikroskopową autorzy ci wykazali spontaniczną dekondensację chromatyny u około 6% plemników. Fakt występowania dekondensacji chromatyny u tak wysokiego odsetka plemników nie znalazł potwierdzenia w naszych badaniach, mimo że przed analizą cytometryczną plemniki były poddane działaniu obniżonego pH. Można przypuszczać, że na uzyskane przez Courtensa i in. (1994) wyniki mogła mieć wpływ rasa królików użytych do doświadczenia lub/i sam proces utrwalania próbek przed oceną mikroskopową. Dla porównania, w badaniach przeprowadzonych na nasieniu buhajów hodowlanych wykazano, że odsetek plemników z uszkodzoną strukturą chromatyny wynosił od 5 do 40% (Ballachey i in., 1987), a nawet od 3 do 91,4% (Sailer i in., 1996). Co ciekawe stwierdzono, że nawet w ejakulatach, które pozytywnie przeszły stosowaną w zakładzie unasienniania ocenę, udział plemników z uszkodzoną chromatyną może wynosić ponad 23% (Bochenek i in., 2001). Oznacza to, że mimo stwierdzonej korelacji pomiędzy wadami chromatyny a aż szesnastoma paramet-

trami morfometrycznymi plemników (Sailer i in., 1996) część plemników z uszkodzoną chromatyną może posiadać prawidłową morfologię. Evenson i in. (1984) stwierdzili, że w nasieniu człowieka plemniki z chromatyną podatną na denaturację mogą stanowić nawet 100%. Wiąże się to prawdopodobnie z faktem, że chromatyna plemników człowieka jest bardziej wrażliwa na denaturację niż u innych gatunków (Love i Kenney, 1999). Stosunkowo niski udział plemników z uszkodzoną chromatyną w nasieniu badanych przez nas królików może wynikać z gatunkowo uwarunkowanej wysokiej odporności chromatyny na denaturację oraz niskiej wrażliwości na czynniki zaburzające proces spermatogenezy. W badaniach prowadzonych na transgenicznym myszom niekompletnie skondensowaną chromatynę stwierdzono u 80% plemników w nasieniu

(Rhim i in., 1995). Badania te były jednak prowadzone na zwierzętach, u których ekspresja genu spowodowała częściowe zastąpienie protaminy, charakterystycznej dla chromatyny mysiej, protaminą ptasią – galliną, niezdolną do tworzenia mostków dwusiarczkowych, koniecznych do prawidłowej kondensacji chromatyny. Powyższe obserwacje, jak również stwierdzone w naszych badaniach brak istotnych różnic pomiędzy stabilnością chromatyny plemników królików transgenicznych i nietransgenicznych wskazują, że sama obecność wprowadzonego konstruktów genowego nie prowadzi do zaburzeń struktury chromatyny.

Ewentualne uszkodzenia chromatyny u zwierząt transgenicznych i zaburzenia płodności należy zatem łączyć z aktywnością wprowadzonego genu.

Tabela 1. Wyniki oceny DNA plemników samców transgenicznych i nietransgenicznych
Table 1. Evaluation results of sperm DNA from transgenic and non-transgenic males

| | Samce – Males | |
|---|------------------------------------|---|
| | transgeniczne <i>transgenic</i> | nietransgeniczne <i>non-transgenic</i> |
| Liczba samców <i>No. of males</i> | 20 | 10 |
| Liczba ocenionych ejakulatów <i>No. of ejaculates tested</i> | 93 | 57 |
| COMP α_t | 3,7 \pm 1,5 | 2,9 \pm 1,6 |
| SD α_t | 10,9 \pm 2,0 | 10,4 \pm 1,5 |

COMP α_t – odsetek plemników z uszkodzonym DNA – *percentage of sperm with damaged DNA*,
SD α_t – stopień uszkodzeń DNA – *degree of DNA damage*.

Literatura

- Ballachey B.E., Hohenboken W.D., Evenson, D.P. (1987). Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. *Biol. Reprod.*, 36: 915–925.
- Bartke A., Naar E.M., Johnson L., May M.R., Cecim M., Yun J.S., Wagner T.E. (1992). Effects of expression of human or bovine growth hormone genes on sperm production and male reproductive performance in four lines of transgenic mice. *J. Reprod. Fert.*, 95 (1): 109–118.
- Bochenek M., Smorąg Z., Pilch J. (2001). Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. *Theriogenology*, 56: 557–567.
- Courtens J.L., Bolet G., Thea-Clement M. (1994). Effect of acrosome defects and sperm chromatin decondensation on fertility and litter size in the rabbit. Preliminary electron-microscopic study. *Reprod. Nutr. Dev.*, 34: 427–437.
- Evenson D.P., Jost L.K. (1993). Hydroxyurea exposure alters mouse testicular kinetics and sperm chromatin structure. *Cell Prolif.*, 26: 147–159.
- Evenson D.P., Klein F.A., Whitmore W.F., Melamed M.R. (1984). Flow cytometric evaluation of sperm from patients with testicular carcinoma. *J. Urol.*, 132: 1220–1225.

Gorczyca W., Traganos F., Jesionowska H., Darzynkiewicz Z. (1993). Presence of DNA strand break and increased sensitivity of DNA *in situ* to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp. Cell. Res.*, 207: 202–205.

Houdebine L.M. (2000). Transgenic animals bioreactors. *Transgenic Res.*, 9: 305–320.

Jura J., Smoraż Z., Gajda B., Kareta W., Kopchick J.J., Kelder B., Prieto P.A. (2003). Ekspresja genu WAP-Fuc u transgenicznym zwierząt gospodarskich – efektywność transgenezy przy zastosowaniu metody mikroiniekcji. *Biotechnologia*, 1 (60): 216–222.

Love C.C., Kenney R.M. (1999). Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease in protamine disulfide bonding in the stallion. *Biol. Reprod.*, 60: 615–620.

Maleszewski M., Kuretake C., Evenson D., Yanagimachi H., Bjordahl J., Yanagimachi R. (1998). Behavior of transgenic mouse spermatozoa with galline protamine. *Biol. Reprod.*, 58: 8–14.

Meliska C.J., Bartke A. (1997). Copulatory behavior and fertility in transgenic male mice expressing human placental growth hormone gene. *J. Androl.*, 18 (3): 305–311.

Potts R.J., Newbury C.J., Smith G., Notarianni L.J., Jefferies T.M. (1999). Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutation Res.*, 423: 103–111.

Pursel V.G., Bolt D.J., Miller K.F., Pinkert C.A., Hammer R.E., Palmiter R.D., Brinster R.L. (1990). Expression and performance in transgenic pigs. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 40: 235–242.

Rhim J.A., Connor W., Dixon G.H., Harendza J., Evenson D.P., Palmiter D., Brinster R.L. (1995). Expression of an avian protamine in transgenic mice disrupts chromatin structure in spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 52: 20–32.

Sailer B.L., Jost L.K., Evenson D.P. (1996). Bull sperm morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry*, 24: 167–173.

COMPARISON OF SPERM DNA DAMAGES OF TRANSGENIC AND NON-TRANSGENIC RABBITS

Summary

The introduction of specific genes into the genome of farm animals and its stable incorporation into the germ line has been a major advance in biotechnology. One of the most interesting applications is to use transgenic animals for the production of various proteins of medical significance. Another application concerns efforts to improve the productivity traits of breeding animals. It cannot be ruled out that genome change obtained by the introduction of a gene construct, as in the case of transgenic animals, leads to changes in DNA structure. This paper compares sperm DNA fragmentation of rabbits transgenic for WAP-Fuc gene and non-transgenic rabbits. The presence of WAP-Fuc gene construct in the genome of transgenic rabbits did not cause any spermatogenesis disturbances leading to the production of spermatozoa with damaged DNA.



Króliki: z lewej – hotot 2, z prawej – belgijski olbrzym biały 2 (fot. D. Kowalska)
Rabbits: Dwarf Hotot rabbit (on the left), Belgian giant white (on the right)