

# Perspektywy klonowania somatycznego dla uzyskiwania zwierząt transgenicznych<sup>\*)</sup>

MARCIN SAMIEC, MARIA SKRZYSZOWSKA

Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice/Kraków

Samiec M., Skrzyszowska M.

## Advantages and perspectives of using somatic cloning for production of transgenic animals

### Summary

The aim of the paper was to present an overall survey of achievements in the field of transgenesis and somatic cloning technologies and, on this basis, to show that *in vitro* transfection of cultured differentiated cells combined with nuclear transfer (NT) is currently the most effective procedure producing transgenic animals. Improvements in the technology of producing transgenic farm animals are highly desirable because the economic advantages thus gained may benefit both biotechnology and basic research. The main barrier in transgenic animal production lies in identifying more efficient systems of transgenic delivery and better mechanisms to optimize the regulation of transgenic expression levels. Although pronuclear microinjection has been used for more than two decades to produce genetically modified mice, rabbits, pigs, sheep, goats and cattle, variable transgenic expression patterns and uncertain transmission through the germ line preclude widespread application of this technology. On the other hand, the successful production of offspring originating from embryos reconstructed with transfected cell nuclei has had important implications for various biomedical, agricultural and research purposes such as cell therapy, xenotransplantation, as well as generating and/or multiplying transgenic animal disease models and transgenic bioreactors of high genetic merit, providing human recombinant proteins (the so-called biopharmaceuticals).

**Keywords:** somatic cloning, transgenesis, pronuclear microinjection, transfection

Klonowanie i transgeneza, a w szczególności połączenie obu tych technik, są obecnie kierunkami biotechnologii rozrodu zwierząt o największym potencjale możliwości aplikacyjnych. Podstawy biologiczne, jakie zostały stworzone w zakresie genetyki molekularnej, a także embriologii eksperymentalnej w ciągu ostatnich kilkunastu lat, umożliwiły bowiem opracowanie technologii transplantacji jąder komórek somatycznych, których praktyczne wykorzystanie będzie w znacznym stopniu uzależnione od ich efektywności (1, 15, 18, 19).

Do niedawna podstawową techniką uzyskiwania zmodyfikowanych genetycznie zwierząt była iniekcja obcego genu (transgenu) do jednego z przedjądrzy zygot (3, 11). Jednakże zarówno u zwierząt gospodarskich (owce, kozy, bydło, świnie, króliki), jak i laboratoryjnych (myszy) strategia ta ma szereg wad limitujących jej stosowanie na szeroką skalę. Niska wydajność tej techniki wyraża się niewielkim odsetkiem zwierząt wykazujących prawidłową (nie indukującą mozaicyzmu genetycznego linii komórek somatycznych i płciowych) integrację wprowadzonego konstruk-

tu genowego (średnio 5% w stosunku do całkowitej liczby uzyskanego potomstwa oraz w granicach od 0,5% do około 3% w stosunku do liczby poddanych mikroiniekcji zygot, transplantowanych do samic biorczyń), a tym bardziej potwierdzoną molekularnie i fenotypowo ekspresję (transkrypcję) zintegrowanego transgenu (z reguły 1-2% w stosunku do całkowitej liczby urodzonych osobników) przejawiającą się syntezą i sekrecją przez komórki pęcherzykowe gruczołu mlekowego pożądaných białek terapeutycznych w koncentracji opłacalnej z ekonomicznego punktu widzenia (9, 10). Ponadto, miejsce integracji obcego konstrukt DNA do genomu zarodka jest czysto przypadkowe, co z kolei rzutuje na niski poziom jego ekspresji.

W przeciwieństwie do tradycyjnej metody mikroiniekcji egzogenego DNA do przedjądrzy zygot, produkcja zwierząt transgenicznych metodą klonowania somatycznego, a także somatyczne klonowanie uzyskanych już zwierząt transgenicznych ma wiele zalet. Transfekcja hodowanych *in vitro* komórek somatycznych, wykorzystywanych jako dawców jąder komórkowych w procedurze klonowania, jest bowiem zabiegiem stosunkowo prostym, szybkim i, co najważniejsze, dotyczy ogromnej populacji komórek. Dodatkowym walorem jest możliwość łatwego określenia

<sup>\*)</sup>Praca wykonana w ramach projektu badawczego zamawianego PBZ-MIN-005/P04/2002/6.

płci genetycznej (chromosomalnej) komórek (analiza kariotypu komórek), które będą poddane transfekcji, co ma istotne znaczenie, gdy produkt ekspresji transgenu pozyskuje się z mleka, a źródłem dawców jąder somatycznych w procedurze klonowania będą np. fibroblasty wyizolowane z ciała płodów z jeszcze nie wykształconymi anatomicznie somatycznymi związkami zewnętrznymi narządów płciowych tzw. wyrostkami płciowymi (fetal genders), determinującymi płeć fenotypową osobnika. Ponadto, stosowane obecnie techniki transfekcji komórek, takie jak: lipofekcja, elektroporacja, transdukcja DNA za pośrednictwem retrovirusów i in. pozwalają na insercję, wraz z określonymi genami sprzężonymi z promotorami kierunkowymi, także genów reporterowych, np. genu kinazy fosfoglicerolowej neomycyny (PGKneo) warunkującego oporność na genetycyne (G418) lub genu białka intensywnej zieleni fluorescencyjnej (eGFP – extended green fluorescent protein) czy genu deaminazy blastocydyny S (Bsd), pełniących rolę markerów pozytywnej selekcji transgenicznych komórek somatycznych w hodowli *in vitro* (4, 6, 7, 13-15, 17, 20). Ten ostatni zabieg umożliwia przyżyciową weryfikację efektywności procesu transfekcji komórek (eliminację nietransformowanych genetycznie komórek) jeszcze przed procedurą klonowania somatycznego.

W badaniach prowadzonych od 1989 r. przez koncern biofarmaceutyczny PPL Therapeutics wykazano, że całkowita efektywność produkcji transgenicznych owiec wzrasta ponad dwukrotnie w wyniku zastosowania techniki transplantacji jąder zmodyfikowanych genetycznie komórek somatycznych w porównaniu ze standardową techniką transgenezy metodą mikroiniekcji egzogennych konstruktów DNA do przedjądrzy zygot. Znakomitą tego egzemplifikacją były eksperymenty Schnieke i wsp. (20), w których ostatecznie udowodniono, że w celu uzyskania jednej maciorki owcy domowej (*Ovis aries* L.) z potwierdzoną molekularnie ekspresją genu kodującego ludzki IX czynnik krzepliwości krwi niezbędne było wyprodukowanie 20,8 zwierząt sklonowanych z jąder transfekowanych fibroblastów płodowych i aż 51,4 jagniąt urodzonych w wyniku zastosowania konwencjonalnej strategii iniekcji transgenów. Sprzężenie genów rekombinowanych białek ludzkich z promotorami genów kodujących białka serwatkowe mleka (np.  $\beta$ -laktoglobulinę lub  $\alpha$ -laktoalbuminę) jest wyjątkowo atrakcyjną perspektywą klonowania somatycznego w aspekcie ukierunkowania aktywności genów odpowiedzialnych za ekspresję ludzkich białek terapeutycznych na komórki wydzielnicze gruczołu mlekowego. Wymiona małych (koza, owca) i dużych (bydło) przeżuwaczy, a także gruczoły sutkowe innych gatunków zwierząt gospodarskich (przede wszystkim świni) mogą być bowiem unikalnymi fabrykami różnych transgenicznych biofarmaceutyków syntetyzowanych tam w ogromnej ilości i wydzielanych wraz z pozostałymi składnikami mleka na zewnątrz, co umożliwia ich

masowe (wielokrotne) przyżyciowe pozyskiwanie (ekstrakcję). Cibelli i wsp. (4) stwierdzili również, że całkowita wydajność procesu transgenezy u bydła mierzona odsetkiem urodzonych cieląt w stosunku do liczby transformowanych genetycznie zarodków transplantowanych do zsynchronizowanych samic biorczyń wzrasta wielokrotnie w wyniku wykorzystania techniki klonowania somatycznego w porównaniu z tradycyjnym systemem mikroiniekcji egzogennego DNA do przedjądrzy zygot. Badania wym. autorów udowodniły bowiem, że na wyprodukowanie trzech transgenicznych buhajków klonalnych wystarczyło przeszczepienie jedynie 28 zrekonstruowanych blastocyst. Z kolei uzyskanie tylko jednego transgenicznego osobnika standardową metodą mikroiniekcji wymagało transferu aż 500 zygot poddanych mikrochirurgicznym zabiegom transdukcji DNA. Eksperymenty Cibelli i wsp. (4) potwierdziły ponadto, że efektywność produkcji zmodyfikowanych genetycznie zwierząt metodą transplantacji jąder somatycznych może utrzymywać się na wysokim poziomie również u osobników płci męskiej. W tym przypadku sklonowane buhajki transgeniczne uzyskano po rekonstrukcji oocytów z jąder fibroblastów płodowych, transfekowanych *in vitro* markerowym (reporterowym) konstruktem DNA złożonym z genu warunkującego oporność na neomycynę oraz genu  $\beta$ -galaktozydazy, pod kontrolą wektora kierunkowego zawierającego wbudowany promotor cytomegalowirusa świńskiego (pCMV/ $\beta$ -GEO).

Atrakcyjność produkcji transformowanych genetycznie samców zwierząt gospodarskich wydaje się o wiele mniejsza w stosunku do multiplikacji transgenicznych samic, głównie ze względu na niższy potencjał możliwości produkcyjnych ksenotransgenicznych białek terapeutycznych. Miejscem syntezy ksenogenicznych biopreparatów może być jednak nie tylko gruczoł mlekowy zmodyfikowanych genetycznie zwierząt. Kerr i wsp. (12) oraz Zhu i wsp. (24) wykazali bowiem, że innymi, alternatywnymi bioreaktorami mogą być także: pęcherz moczowy oraz nerki (w szczególności nabłonek kanalików nerkowych na odcinku ramienia wstępującego pętli Henlego lub przewodników krętych dalszych), zarówno transgenicznych osobników męskich, jak i żeńskich. Uzyskali oni myszy ze zmodyfikowanymi genetycznie komórkami nabłonka wielowarstwowego przejściowego (*urothelium*), wykazującymi ekspresję genu hormonu wzrostu człowieka (hGH) pod wpływem jego skoniugowania z promotorem kierunkowym genu uroplakiny II lub mysiego białka Tamm-Horsfalla (uromoduliny). Jeden mililitr objętości moczu tych myszy zawierał do 500 ng ludzkiej somatotropiny. Obiecującymi bioreaktorami transgenicznymi wydają się także pęcherzyki nasienne (gruczoły pęcherzykowe) samców zwierząt laboratoryjnych i gospodarskich. Dyck i wsp. (8) wykazali bowiem, że wykorzystanie transgeny zawierającego cDNA ludzkiego hormonu wzrostu sprzężony z promotorem mysiego genu P12, specyficznego dla komór-



rek gruczołów płciowych dodatkowych może ukierunkować syntezę somatotropiny na pęcherzyki nasienne, a sekrecję na osocze (plazmę) nasienia.

Pozyskiwanie ludzkich białek terapeutycznych z moczu i płynów sekrecyjnych gruczołów płciowych dodatkowych transgenicznych zwierząt mogłoby znacznie zredukować koszty produkcji ksenogenicznych biopreparatów nie tylko dlatego, że białka te można by izolować z fizjologicznych wydalin i wydzielin transformowanych genetycznie osobników obu płci, a nie jedynie od samic, lecz także z powodu możliwości ich ekstrakcji już w okresie neonatalnym rozwoju ontogenetycznego zwierzęcia, a nie dopiero od momentu uzyskania dojrzałości płciowej i somatycznej oraz przejścia pierwszej laktacji. Kolejną zaletą tego kierunku produkcji byłaby możliwość technicznego uproszczenia samego procesu uzyskiwania produktów ekspresji transgenów, a także ich izolacji i ekstrakcji (puryfikacji), ze względu na brak zjawiska chelatowania egzogennych białek w moczu, które jest fizjologicznym procesem kompleksowania różnych mikro- i makromolekuł przez białka kazeinowe i serwatkowe mleka (10).

Transgeniczne zwierzęta z potwierdzonym wysokim poziomem ekspresji transgeny mogą być następnie multiplikowane techniką klonowania somatycznego. Ma to szczególne uzasadnienie w przypadku, gdy pozyskiwane z tych zwierząt biofarmaceutyki znajdują powszechne zastosowanie w terapii u ludzi cierpiących na szereg nieuleczalnych chorób genetycznych. W momencie uzyskania przez transgeniczne biopreparaty odpowiednich certyfikatów dopuszczających je do aplikacji u ludzi, somatyczne klonowanie zmodyfikowanych genetycznie osobników, które je syntetyzują, pozwoli, przynajmniej teoretycznie, na utrzymanie homogenności takich leków ekstrahowanych z naturalnych wydzielin i wydalin kolejnych generacji sklonowanych zwierząt. Technologię taką wykorzystwała z powodzeniem amerykańska firma biotechnologiczna Genzyme Transgenic Corporation, po wyprodukowaniu transgenicznych kóz z potwierdzoną w mleku ekspresją genu ludzkiej antytrombiny III, standardową metodą mikroiniekcji konstruktów cDNA wyposażonych w promotor kierunkowy koziej  $\beta$ -kazeiny (1, 16).

Koza (*Capra hircus* L.) jako gatunek o dużej bioróżnorodności ras wykazujących stosunkowo wysoką wydajność mleczną może być idealnym obiektem dla transgenicznej produkcji rekombinowanych białek terapeutycznych. Chociaż efektywność klonowania somatycznego kóz mierzona odsetkiem urodzonych koźląt jest wciąż stosunkowo niska i z reguły nie przekracza średnio 10% w stosunku do liczby zarodków transplantowanych do dróg rodnych macioerek biorecypientek oraz 5% w stosunku do liczby zrekonstruowanych oocytów, to problematyka związana z tą techniką wspomaganego rozrodu zwierząt wzbudza ogromne i ciągle rosnące zainteresowanie jako metodą alternatywną do

standardowej techniki mikroiniekcji transgenów (1, 16). Wydajność tej ostatniej bowiem wyraża się bardzo niskim stopniem prawidłowej integracji obcych genów w genomie urodzonych macioerek – założycielek linii transgenicznych (średnio 1,7% w stosunku do liczby zygot przeszczepianych do matek zastępczych) (9, 10). Natomiast technologia transplantacji jąder transfekowanych *in vitro* komórek somatycznych zwiększa istotnie prawdopodobieństwo uzyskiwania niemozaikowego potomstwa transgenicznego, posiadającego wbudowany egzogeny konstrukt genowy również w linii pierwotnych komórek płciowych. Takie niechimeryczne pod względem transformacji genetycznej komórki gametogeniczne i somatyczne osobniki zachowują pełną zdolność do przekazywania fenotypowo i molekularnie potwierdzonej ekspresji transgeny na komórki gruczołu mlecznego kolejnej generacji urodzonych koźląt. Doskonałym tego przykładem mogą być wyniki badań Baguisiego i wsp. (1). Detekcja wysokiego poziomu ekspresji genu kodującego rekombinowaną ludzką antytrombinę III w komórkach wymion trzech macioerek klonalnych uzyskanych z zarodków zrekonstruowanych z jąder fibroblastów transgenicznych płodów wyrażała się również w postaci niezwykle wysokiej fenotypowej wartości tej zmodyfikowanej genetycznie cechy w pobranych próbkach mleka. W okresie 33 dni zainicjowanej już w wieku 2 miesięcy laktacji wydajność mleczna tych macioerek osiągnęła wartość około 160 mL, a koncentracja ludzkiej antytrombiny III w pobranym mleku wyniosła aż 5,8 g/L (20,5 U/mL aktywności enzymatycznej oczyszczonego biopreparatu) w dniu 5. oraz 3,7 g/L (14,6 U/mL aktywności) w 9. dniu laktacji. Przy tak dużym poziomie stężenia rekombinowanych białek terapeutycznych w mleku, wielkostadnie fermy transgenicznych kóz mogą z łatwością dostarczać nawet do 300 kg wyekstrahowanego produktu biofarmaceutycznego w skali całego roku (5). Sprzężenie technologii klonowania somatycznego z hormonalną indukcją wczesnej laktacji u niedojrzałych płciowo macioerek transgenicznych umożliwi znaczne skrócenie czasu uzyskiwania produktu ekspresji transgeny, nawet do 8-9 miesięcy od momentu transfekcji linii komórkowych do momentu jego sekrecji w mleku. Objętość pozyskiwanych w ten sposób próbek mleka jest nie tylko wystarczająca do prawidłowego oszacowania wielkości produkcji rekombinowanych białek, ale nawet przy stosunkowo niskim poziomie ekspresji transgeny, wyrażanym w mg/mL mleka pozwala na wielokrotne przeprowadzanie klinicznych testów aktywności wytwarzanych biopreparatów (1).

Innym gatunkiem zwierząt gospodarskich, niezwykle atrakcyjnym w aspekcie praktycznego zastosowania sprzężonej technologii transgenezy i klonowania somatycznego w medycynie i immunologii transplantacyjnej, a także farmacji jest świnia domowa (*Sus scrofa domestica* L.) (6, 13, 18, 19). Ostatnie doniesienia

o wykorzystaniu techniki transplantacji jąder transfekowanych *in vitro* komórek somatycznych do uzyskania transgenicznych świń (z potwierdzoną molekularnie oraz fenotypowo ekspresją genu białka intensywnej zieleni fluorescencyjnej) (14), jak również o wyprodukowaniu sklonowanych prosiąt z hodowanych *in vitro* fibroblastów wyizolowanych ze skóry zmodyfikowanego genetycznie knura z ksenogenicznymi determinantami antygenowymi zablokowanymi pod wpływem ekspresji genu  $\alpha$ -1,2-fukozylotransferazy (2) mogą świadczyć o zbliżającej się fazie intensywnych testów nad przeszczepianiem transformowanych genetycznie organów świńskich do organizmów naczelnymi i potencjalnymi ludźmi – biorców. Niestety, próby przeszczepów unaczynionych narządów świńskich kończą się zawsze ich nadoстрыm, humoralnym odrzuceniem waskularnym (HAR – hyperacute rejection) (2, 13, 18). Jak się wydaje, jedynie organy świń transgenicznych, które posiadałyby ekspresję genów „uczłowieczających” ich komórki, stanowiłyby pożądany materiał do przeszczepów ksenogenicznych. Główną przeszkodą dla powszechnego stosowania organów świń w transplantologii medycznej jest immunologiczna niezgodność, przede wszystkim w zakresie gatunkowo specyficznych antygenów głównego układu zgodności tkankowej (MHC – major histocompatibility complex): ludzi (HLA – human leukocyte antigens) oraz świń (SLA – swine leukocyte antigens). Jednakże deficyt organów do allotransplantacji u ludzi stał się bodźcem do poszukiwania nowych, alternatywnych źródeł przeszczepów. Od dawna postuluje się bowiem, że zmodyfikowane genetycznie świnię mogą stanowić (przy uwzględnieniu wysokiej plności i płodności tego gatunku) wprost nieograniczone źródło dawców ksenotransplantów. Ksenotransplantacja narządów świńskich jest również atrakcyjną opcją z powodu ich kompatybilnej z organami ludzkimi wielkości oraz fizjologii i anatomii (2, 6, 13, 18). Transgeneza (z zastosowaniem ukierunkowanej mutagenazy – gene targeting) sprzężona z klonowaniem somatycznym może stanowić w najbliższej przyszłości podstawę do powstania i powielania populacji świń z transformowanym genetycznie („zhumanizowanym”) układem immunologicznym o zablokowanej ekspresji wielu epitopów oraz populacji świń stanowiącej źródło dawców ksenotransplantów o wyraźnie wydłużonej przeżywalności (zwiększonej oporności na HAR) w organizmie biorców. Taka perspektywa otwiera również nowe możliwości dla produkcji świńskich bioreaktorów syntetyzujących w komórkach krwi lub dostarczających w osoczu krwi ludzkie białka i hormony, w tym różne biofarmaceutyki (18, 21).

U innych gatunków zwierząt gospodarskich transplantacja jąder komórek somatycznych może być również efektywnym sposobem uzyskiwania i multiplikacji transgenicznych osobników z ukierunkowaną insercją (sterowanym nokautem) lub delecją docelowych genów. Doskonałą tego egzemplifikacją było wypro-

dukowanie przez McCreath i wsp. (15) klonalnych jagnięt z jąder fibroblastów płodowych z potwierdzoną insercją transgenu AATC2 złożonego z ludzkiego genu  $\alpha$ -1-antytrypsyny (AAT) i promotora kierunkowego genu owczej  $\beta$ -laktoglobuliny (zapewniającego ekspresję w gruczole mlekowym) w *locus* allelu owczego genu  $\alpha$ 1(I) prokolagenu (COL1A1). Innym przykładem wykorzystania sterowanej mutagenazy drogą rekombinacji homologicznej genów docelowych *loci* było uzyskanie przez Denninga i wsp. (7) sklonowanych płodów owczych z jąder fibroblastów płodowych z ukierunkowaną delecją pojedynczych alleli genów kodujących:  $\alpha$ -1,3-galaktozylotransferazę ( $\alpha$ -1,3-GT) oraz białko prionowe (PrP<sup>C</sup>).

Dla hodowli i medycyny bardzo atrakcyjna jest obecnie perspektywa uzyskania drogą ukierunkowanej mutagenazy oraz klonowania somatycznego zwierząt ze znokautowanym genem patologicznego białka prionowego (PrP<sup>Sc</sup>) odpowiedzialnego za powstawanie pasażowalnych encefalopatii gąbczastych (TSEs – transmissible spongiform encephalopathies), przede wszystkim trzęsawki (scrapie) u owiec i BSE u bydła. Badania w tym kierunku zainicjowano u myszy oraz udowodniono, że inaktywacja tego genu nie powoduje u nich żadnego szkodliwego efektu rozwojowego, a homozygotyczne myszy z potwierdzonym nokautem allelu genu PrP<sup>Sc</sup> są odporne na trzęsawkę po wprowadzeniu do ich organizmu białkowych cząsteczek infekcyjnych (prionów). Natomiast wywołanie gąbczastego zwyrodnienia mózgu drogą indukowanej infekcji prionowej w populacji myszy – kontrolnych modeli badawczych etiopatologii scrapie prowadziło do śmierci poszczególnych osobników już po około 5-6 miesiącach od wystąpienia pierwszych objawów chorobowych (22). Wyprodukowanie transformowanych genetycznie klonów somatycznych małych i dużych przeżuwaczy, odpornych na trzęsawkę i BSE w wyniku sterowanego nokautu *locus* genu PrP<sup>Sc</sup> jest o tyle istotne dla medycyny weterynaryjnej i biotechnologii rozrodu zwierząt, że encefalopatie te nie są przenoszone przez zarodki, nawet jeżeli zostały one przeszczepione do dróg rodnych biorczyń, u których stwierdzono później występowanie tych chorób. Zarodki owcze lub bydłce ze zainaktywowanym genem patologicznego białka prionowego, pozyskane od stymulowanych hormonalnie klonalnych samic dawczyń – założycielek linii transgenicznych zwierząt, wolnych od PrP<sup>Sc</sup>, mogą być zatem z powodzeniem transplutowane do biorczyń zainfekowanych prionami, a będących jeszcze w okresie wylegania choroby, bez obawy o niebezpieczeństwo transmisji białkowych cząsteczek infekcyjnych do organizmów kolejnych osobników populacji hodowlanej wpisanej do ksiąg zwierząt zarodowych (23).

Z kolei u świń jednym z najbardziej spektakularnych przykładów ukierunkowanej techniką „knock-out” inaktywacji genów było sklonowanie ogółem 9 prosiąt z użyciem fibroblastów płodowych z unie-



czynnym allelem genu  $\alpha$ -1,3-GT, odpowiedzialnego za nadostre odrzucanie przeszczepów ksenogenicznych (6, 13).

Perspektywa klonowania zmodyfikowanych genetycznie zwierząt gospodarskich i laboratoryjnych w celu pozyskania biopreparatów rekombinowanych białek ludzkich czy organów przydatnych w transplantologii medycznej lub stworzenia podstaw komórkowej terapii wielu ciężkich chorób genetycznych na zwierzęcych modelach badawczych jest perspektywą, której racjonalne wykorzystanie przysłuży się niewątpliwie człowiekowi (2, 6, 7, 15, 16, 18-20).

### Piśmiennictwo

1. Baguisi A., Behboodi E., Melican D. T., Pollock J. S., Destrempe M. M., Cammuso C., Williams J. L., Nims S. D., Porter C. A., Midura P., Palacios M. J., Ayres S. L., Denniston R. S., Hayes M. L., Ziomek C. A., Meade H. M., Godke R. A., Gavin W. G., Overstrom E. W., Echelard Y.: Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotech.* 1999, 17, 456-461.
2. Bondioli K., Ramsdoon J., Williams B., Costa C., Fodor W.: Cloned pigs generated from cultured skin fibroblasts derived from a H-transferase transgenic boar. *Mol. Reprod. Dev.* 2001, 60, 189-195.
3. Bowen R. A., Reed M. L., Schnieke A., Seidel G. E. J., Stacey A., Thomas W. K., Kajikawa O.: Transgenic cattle resulting from biopied embryos: expression of c-ski in a transgenic calf. *Biol. Reprod.* 1994, 50, 664-668.
4. Cibelli J. B., Stice S. L., Golueke P. J., Kane J. J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de Leon F. A., Robl J. M.: Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 1998, 280, 1256-1258.
5. Clark A. J.: The mammary gland as a bioreactor: expression, processing, and production of recombinant proteins. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 1998, 3, 337-350.
6. Dai Y., Vaught T. D., Boone J., Chen S.-H., Phelps C. J., Ball S., Monahan J. F., Jobst P. M., McCreath K. J., Lamborn A. E., Cowell-Lucero J. L., Wells K. D., Colman A., Polejaeva I. A., Ayares D. L.: Targeted disruption of the  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat. Biotechnol.* 2002, 20, 251-255.
7. Denning C., Burl S., Ainslie A., Bracken J., Dinnyes A., Fletcher J., King T., Ritchie M., Ritchie W. A., Rollo M., de Sousa P., Travers A., Wilmot I., Clark J.: Deletion of the  $\alpha$ (1,3)galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. *Nat. Biotechnol.* 2001, 19, 559-562.
8. Dyck M. K., Gagne D., Ouellet M., Senechall J. F., Belanger E.: Seminal vesicle production and secretion of growth hormone into seminal fluid. *Nat. Biotech.* 1999, 17, 1087-1090.
9. Ebert K. M., Schindler J. E. S.: Transgenic farm animals: Progress report. *Theriogenology* 1993, 39, 121-135.
10. Echelard Y.: Recombinant protein production in transgenic animals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1996, 7, 536-540.
11. Hammer R. E., Pursel V. G., Rexroad C. E. Jr., Wall R. J., Bolt D. J., Ebert K. M., Palmer R. D., Brinster R. L.: Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 1985, 315, 680-683.
12. Kerr D. E., Liang F., Bondioli K. R., Zhao H., Kreibich G., Wall R. J., Sun T. T.: The bladder as a bioreactor: urothelium production and secretion of growth hormone in urine. *Nat. Biotech.* 1998, 16, 75-79.
13. Lai L., Kolber-Simonds D., Park K.-W., Cheong H.-T., Greenstein J. L., Im G.-S., Samuel M., Bonk A., Rieke A., Day B. N., Murphy C. N., Carter D. B., Hawley R. J., Prather R. S.: Production of  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase knock-out pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 2002, 295, 1089-1092.
14. Lai L., Park K. W., Cheong H. T., Kuhholzer B., Samuel M., Bonk A., Im G.-S., Rieke A., Day B. N., Murphy C. N., Carter D. B., Prather R. S.: Transgenic pig expressing the enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicine-treated fibroblasts as donor cells. *Mol. Reprod. Dev.* 2002, 62, 300-306.
15. McCreath K. J., Howcroft J., Campbell K. H. S., Colman A., Schnieke A. E., Kind A. J.: Production of gene targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 2000, 405, 1066-1067.
16. Reggio B. C., James A. N., Green H. L., Gavin W. G., Behboodi E., Echelard Y., Godke R. A.: Cloned transgenic offspring resulting from somatic cell nuclear transfer in the goat: oocytes derived from both follicle-stimulating hormone-stimulated and nonstimulated abattoir-derived ovaries. *Biol. Reprod.* 2001, 65, 1528-1533.
17. Roh S., Shim H., Hwang W. S., Yoon J. T.: In vitro development of green fluorescent protein (GFP) transgenic bovine embryos after nuclear transfer using different cell cycles and passages of fetal fibroblasts. *Reprod. Fertil. Dev.* 2000, 12, 1-6.
18. Samiec M.: Development of pig cloning studies: past, present and future. *J. Anim. Feed Sci.* 2003, w druku.
19. Samiec M., Skrzyszowska M., Smorąg Z.: Effect of activation treatments on the in vitro developmental potential of porcine nuclear transfer embryos. *Czech J. Anim. Sci.* 2003, 48, 499-507.
20. Schnieke A., Kind A. J., Ritchie W. A., Mycock K., Scot A. R., Ritchie M., Wilmut J., Colman A., Campbell K. H. S.: Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 1997, 278, 2130-2133.
21. Sharma A., Martin M. J., Okabe J. F., Truglio R. A., Dhanjal N. K., Logan J. S., Kumar R.: An isologous porcine promoter permits high level expression of human hemoglobin in transgenic swine. *Biotechnology* 1994, 12, 55-59.
22. Weissmann C., Fisher M., Raeber A., Bueler H., Sailer A., Shmerling D., Rulicke T., Bradner S., Aguzzi A.: The use of transgenic mice in the investigation of transmissible spongiform encephalopathies. *Rev. Sci. Tech.* 1998, 17, 278-290.
23. Wrathall A. E.: Risk of transmission of spongiform encephalopathies by reproductive technologies in domesticated ruminants. *Livestock Prod. Sci.* 2000, 62, 287-316.
24. Zhu X., Cheng J., Huang L., Gao J., Zhang Z.-T., Pak J., Wu X.-R.: Renal tubule-specific expression and urinary secretion of human growth hormone: a kidney-based transgenic bioreactor. *Transgenic Res.* 2003, 12, 155-162.

Adres autora: mgr Marcin Samiec, os. Zielone 20/3A, 31-970 Kraków;  
e-mail: klon502@wp.pl



# medycyna weterynaryjna

## Prenumerata w 2005 r.

	kwartalna	półroczna	roczna
instytucje	90,00 zł	180,00 zł	360,00 zł
indywidualni	45,00 zł	90,00 zł	180,00 zł
studenci	24,00 zł	48,00 zł	96,00 zł

**Opłaty prenumeracyjne prosimy przekazywać na konto:**

„Medycyna Weterynaryjna” – Redakcja, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin  
Redaktor naczelny: tel./fax (81) 533-29-12      Prenumerata: tel./fax (81) 445-69-00  
PKO BP S.A. II O/LUBLIN 31 1020 3150 0000 3902 0003 3134