



## Znaczenie świni dla klonowania somatycznego i transgenezy

Marcin Samiec, Maria Skrzyszowska

Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki,  
Balice k. Krakowa

### The role of pig in somatic cell cloning and transgenesis

#### Summary

A stimulus for development of the studies on pig somatic cell cloning, especially in recent years, was above all the possibility of its practical application for production of transgenic piglets using *in vitro* transfected nuclear donor cells and multiplication of genetically-engineered sows and boars generated so far, on the grounds of important implications for biomedicine, pharmacy and agriculture. However, effective pig somatic cell nuclear transfer, avoiding the sexual reproduction pathway, creates a possibility of providing numerous monogenic and monosexual offspring derived not only from genetically-transformed individuals, but also from adult (postpubertal) animals of high genetic merit. Generation of cloned transgenic pigs for biomedical purposes to obtain recombinant xenogeneic proteins or organs suitable in xenotransplantation, or to create cell (gene) therapy foundations for a number of serious monogenic diseases that induce heritable (congenital) developmental anomalies, is perceived as a service to humanity.

#### Key words:

pig, somatic cell cloning, transgenesis, *in vitro* transfection, recombinant human protein/biopharmaceutical, xenotransplantation.

#### Adres do korespondencji

Marcin Samiec,  
Dział Biotechnologii  
Rozrodu Zwierząt,  
Instytut Zootechniki,  
32-083 Balice k. Krakowa;  
e-mail: klon502@wp.pl

### 1. Wstęp

Boźcem do rozwoju badań nad klonowaniem somatycznym świń, szczególnie w ostatnich latach, była przede wszystkim możliwość praktycznego zastosowania tej techniki wspomaganego rozrodu zwierząt do produkcji transgenicznych prosiąt przy wykorzystaniu transfekowanych *in vitro* komórek-dawców jąder

oraz do multiplikacji uzyskanych już transformowanych genetycznie loch i knurów, ze względu na ważne implikacje dla biomedycyny, a także farmacji (1-4). Jednakże, efektywne klonowanie somatyczne świń, omijając drogę rozrodu płciowego, stwarza również możliwość dostarczania dosyć licznego monogenetycznego i jedno-płciowego potomstwa wywodzącego się nie tylko z transgenicznych osobników, lecz także z wyselekcjonowanych pod względem wybitnych cech wartości hodowlanej i użytkowej dorosłych zwierząt (5-7).

## **2. Rola klonowania somatycznego i transgenezy w genetycznej inżynierii embrionalnej ssaków**

Sprzężenie technik transfekcji hodowanych *in vitro* komórek somatycznych oraz transplantacji jąder tych komórek do enukleowanych oocytów-biorców jest obecnie najbardziej efektywną metodą uzyskiwania ssaków transgenicznych. Poprawa wydajności produkcji transgenicznych zwierząt gospodarskich przy jednoczesnym obniżeniu kosztów ich uzyskiwania jest szczególnie atrakcyjną perspektywą agroekonomicznych uwarunkowań badań biotechnologicznych zarówno o charakterze podstawowym jak i o wymiarze aplikacyjnym (8-13). Jednakże, główną barierą limitującą stosowanie technik transgenezy na szeroką skalę pozostaje wciąż problem opracowania bardziej efektywnych systemów wprowadzania (a także integracji) egzogennych konstrukcji genowych do genomu jądrowego różnych układów biologicznych (zygot, komórek somatycznych, plemników, oocytów i in.). Prowadzone są również liczne próby nad optymalizacją molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za precyzyjną regulację poziomu ekspresji transgenów w genomowym DNA (14-20). Mimo że standardowa procedura mikroiniekcji transgenów do przedjądrzy zygot jest wykorzystywana od ponad dwudziestu lat do produkcji genetycznie zmodyfikowanych myszy, królików, świń, owiec, kóz oraz bydła, to u urodzonych zwierząt obserwuje się często różnice osobnicze we wzorcach ekspresji transgenów (somatyczny mozaicyzm genetyczny), a także nieprawidłowości w procesie transmisji aktywnej transkrypcyjnie konstrukcji genowej do genomu linii komórek płciowych, co znacznie obniża potencjał możliwości aplikacyjnych tej technologii, tkwiący w perspektywie komercyjnej produkcji rekombinowanych białek ludzkich przez bioreaktory zwierzęce (21-26). Dlatego też, uzyskiwanie zwierząt klonalnych przy zastosowaniu procedury transplantacji jąder transfekowanych *in vitro* komórek somatycznych o różnym fenotypie tkankowym otwiera zupełnie nowy rozdział w historii badań nad strategiami transgenizacji zwierząt, szczególnie w zakresie sterowanej mutagenyzy techniką rekombinacji homologicznej. Właściwa selekcja pozytywna transgenicznych komórek jest bowiem niezwykle wydajnym sposobem weryfikacji efektywności procesu transfekcji, gwarantującym stosunkowo wysoki odsetek transformowanego genetycznie potomstwa klonalnego, co po-

twierdzą wyniki badań przeprowadzonych u różnych gatunków ssaków (kozy, owce, bydło i świnię; [17,27-32]).

Uzyskiwanie wysokiej efektywności w zakresie produkcji transgenicznego potomstwa klonalnego, pochodzącego z zarodków rekonstruowanych z jąder transfekowanych komórek somatycznych ma ważne implikacje dla różnych dziedzin nauk biomedycznych, rolniczych, a także dla badań podstawowych, nie mających charakteru aplikacyjnego. Połączenie technik klonowania somatycznego oraz transgenezy oferuje zupełnie nowe możliwości dla celów: komórkowej terapii genowej, ksenotransplantacji organów, jak również tworzenia i/lub multiplikacji populacji transformowanych genetycznie zwierzęcych modeli badawczych (medycznych) chorób monogenowych człowieka, wywołujących wrodzone wady rozwojowe, oraz bioreaktorów zwierzęcych o wysokiej wartości hodowlanej i użytkowej, dostarczających rekombinowanych białek ludzkich (tzw. biofarmaceutyków; [3,4,27,30,33-37]).

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 (2,9,13,15,38).

### **3. Prognoza możliwości praktycznego zastosowania klonowania somatycznego i transgenezy świń w ksenotransplantologii i przemyśle biofarmaceutycznym**

Świnia domowa (*Sus scrofa domesticus* L.) jest gatunkiem zwierząt gospodarskich, niezwykle atrakcyjnym w aspekcie praktycznego zastosowania sprzężonej technologii transgenezy i klonowania somatycznego w medycynie i immunologii transplantacyjnej, a także farmacji (3,4,27,39-43). Ostatnie doniesienia o: 1) wykorzystaniu techniki transplantacji jąder transfekowanych *in vitro* komórek somatycznych do uzyskania transgenicznych świń z potwierdzoną molekularnie oraz fenotypowo ekspresją reporterowego genu białka intensywnej zieleni fluorescencyjnej (ang. *enhanced green fluorescent protein*/eGFP; [6,44-46]), jak również o: 2) wyprodukowaniu sklonowanych prosiąt z hodowanych *in vitro* fibroblastów wyizolowanych z tkanki skórnej zmodyfikowanego genetycznie knura lub z ciała płodów z ksenogenicznymi determinantami antygenowymi zablokowanymi pod wpływem ekspresji genu ludzkiej H-transferazy ( $\alpha$ -1,2-fukozylotransferazy/ $\alpha$ -1,2-FT; [47,48]) mogą świadczyć o zbliżającej się fazie intensywnych testów nad przeszczepianiem transformowanych genetycznie organów świńskich do organizmów naczelnych i potencjalnych ludzi-biorców. Niestety, próby przeszczepów unaczynionych narządów świńskich kończą się zawsze ich nadoстрыm, humoralnym odrzuceniem waskularnym (HAR, ang. *hyperacute rejection*; [17,27,49]). Jedynie organy świń transgenicznych, które posiadałyby eks-

presję genów „uczłowieczających” ich komórki, stanowiłyby, jak się wydaje, pożądanym materiałem do przeszczepów ksenogenicznych. Główną przeszkodą dla powszechnego stosowania organów świń w transplantologii medycznej jest immunologiczna niezgodność, przede wszystkim w zakresie gatunkowospecyficznego antygenów głównego układu zgodności tkankowej (MHC, ang. *major histocompatibility complex*): ludzi (HLA, ang. *human leukocyte antigens*) oraz świń (SLA, ang. *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 świny mogą stanowić (przy uwzględnieniu wysokiej plenności i płodności tego gatunku) wprost nieograniczone źródło dawców ksenotransplantatów. Ksenotransplantacja narządów świńskich jest również atrakcyjną opcją z powodu ich kompatybilnej z organami ludzkimi wielkości oraz fizjologii i anatomii (49,50). Wykorzystanie systemu ukierunkowanego wprowadzania obcego DNA, wybranymi metodami transfekcji, hodowanych *in vitro* różnych typów świńskich komórek somatycznych, a następnie użycie populacji transformowanych genetycznie komórek-dawców w technice transplantacji jąder somatycznych może prowadzić do otrzymania dość licznych klonów świń wytwarzających np. 1) antygeny ludzkiego MHC (HLA); 2) endogenne immunosupresory człowieka; czy 3) główne białka regulujące kaskadę enzymatyczną dopełniacza człowieka, z grupy obecnych w błonach komórkowych inhibitorów cytotoxyczności układu dopełniacza o ściśle określonych tzw. kompleksach różnicowania (CD, ang. *cluster of differentiation*; [2,49,51-53]), m.in. takie jak: a) ludzki błonowy kofaktor białkowy dla czynnika regulatorowego 1, czyli inaktywatora katalizującego hydrolizę składników komplementu C3b/C4b, zapobiegający formowaniu się na powierzchni błony konwertaz C3 – CD46/MCP (ang. *membrane cofactor protein*); b) ludzki czynnik przyspieszający rozkład konwertaz C3 i C5 zarówno klasycznej, jak i alternatywnej drogi aktywacji komplementu – CD55/DAF (ang. *decay-accelerating factor*); lub c) białko wiążące surowicze składniki dopełniacza C8 i C9 (ang. *C8/C9 binding protein*), zwane również czynnikiem restrykcji homologicznej lub błonowym inhibitorem reaktywnej lizy komórkowej (protektyną), które zapobiega formowaniu się kompleksu atakującego błonę cytoplazmatyczną (C5b-9/MAC, ang. *membrane attack complex*), poprzez hamowanie polimeryzacji czynnika C9, a tym samym blokowanie katalizowanej za pośrednictwem kompleksu C5b-8 reakcji wbudowywania/zakotwiczenia C9 w plazmolemmę – CD59/HRF20/MIRL (ang. *homologous restriction factor 20/membrane inhibitor of reactive lysis*). Tą drogą można również uzyskać transgeniczne osobniki klonalne z indukowalną modyfikacją/rekombinacją ksenogenicznych epitopów, w następstwie ich enzymatycznego „zamaskowania” przez inhibicję kompetycyjną (hamowanie konkurencyjne)  $\alpha$ -1,3-galaktozylotransferazy ( $\alpha$ -1,3-GT) pod wpływem  $\alpha$ -1,2-fukozylotransferazy (27,51,52). W wyniku praktycznego wykorzystania opisanej kompleksowej technologii genetycznej inżynierii embrionalnej można także wyprodukować stada zarodowe świń klonalnych, mających zinaktywowane techniką *knock-out* (rekombinacji homologicznej) geny kodujące enzymy katalizujące przy-

łączenie różnych fragmentów determinant antygenowych – ksenogenicznych reszt cukrowcowych (np. allel genu  $\alpha$ -1,3-GT; *locus* GGTA1) do glikoprotein oraz glikolipidów błon komórkowych, odpowiedzialnych za nadostre odrzucanie ksenogenicznych przeszczepów, w wyniku reakcji z ludzkimi preformowanymi przeciwciałami ksenoreaktywnymi (głównie przeciwciałami anty-Gal, skierowanymi przeciwko epitopom galaktozylo- $\alpha$ -1,3-galaktozy/ $\alpha$ -Gal na powierzchni komórek endotelialnych unaczynionych ksenotransplantów; [28,49,51,53,54]). Transgeneza (z zastosowaniem ukierunkowanej mutagenezy, ang. *gene targeting*) sprzężona z klonowaniem somatycznym może stanowić w najbliższej przyszłości podstawę do powstania i powielania populacji świń z tak 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.

U świń jednym z najbardziej spektakularnych przykładów ukierunkowanej techniką *knock-out* inaktywacji genów było sklonowanie ogółem 29 prosiąt z użyciem fibroblastów płodowych z unieczynnionym allelem *locus* GGTA1 (2,48,55,56). Kolejnym sukcesem w zakresie sterowanej mutagenezy DNA genomowego komórek somatycznych świni była indukcja insercyjnej inaktywacji allelu genu  $\alpha$ -1,3-GT w transfekowanych techniką elektroporacji liniach klonalnych fibroblastów, wyprowadzonych z eksplantów tkankowych transformowanych genetycznie płodów płci męskiej, które uzyskano w wyniku krycia dojrzałych płciowo loszek heterozygotycznym knurem transgenicznym, wykazującym ekspresję genu ludzkiej  $\alpha$ -1,2-FT (48). W następstwie transplantacji jąder tych komórek do enukleowanych oocytów-biorców, wyprodukowano łącznie 4 żywe prosięta klonalne, posiadające nie tylko znokautowany gen  $\alpha$ -1,3-GT, lecz będące także nosicielami ogólnoustrojowej aktywności transkrypcyjnej losowo wprowadzonego genu H-transferazy człowieka. Postuluje się, że uzyskana tą drogą tzw. piętrowa modyfikacja genetyczna knurków klonalnych może być bardziej efektywną techniką genetycznej inżynierii embrionalnej w aspekcie jej przydatności w ksenotransplantologii narządów niż wyprodukowanie potomstwa klonalnego z tzw. połowicznym fenotypem *null* w zakresie ekspresji genu  $\alpha$ -1,3-galaktozylotransferazy. Przypuszcza się, że obniżenie międzygatunkowej bariery immunologicznej, wynikające ze znacznego osłabienia lub całkowitego ominięcia (supresji) reakcji nadostrego lub opóźnionego odrzucania ksenotransplantów, można osiągnąć dopiero przez sklonowanie prosiąt z tzw. złożonym profilem transgenicznym rekombinowanych immunoprotein powierzchniowych. Jednym z tego typu przykładów są właśnie wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez Ramsoondara i wsp. (48). Wyprodukowanie świń klonalnych z semideficiencją genu  $\alpha$ -1,3-GT, a zatem heterozygotycznych osobników transgenicznych ze znokautowanym pojedynczym allelem *locus* GGTA1, nie wystarczy bowiem do zwiększenia oporności na HAR w ksenogenicznych organach. Represja transkrypcyjna allelu genu  $\alpha$ -1,3-GT prawdopodobnie powinna być dodatkowo wspomagana przez proces kierowanej za pośrednictwem enzymu  $\alpha$ -1,2-FT człowieka inhibicji kompetycyjnej re-

akcji biokatalizowanej przez drugą pulę cząsteczek  $\alpha$ -1,3-galaktozylotransferazy, obecnych w komórkach narządów transgenicznych prosiąt klonalnych w wyniku czynnej ekspresji nie zinktywowanego techniką rekombinacji homologicznej drugiego allelu genu  $\alpha$ -1,3-GT. Hamowanie współzawodnicze  $\alpha$ -1,3-galaktozylotransferazy świni przez rekombinowaną  $\alpha$ -1,2-fukozylotransferazę ludzką prowadzi z kolei do maskowania epitopów  $\alpha$ -Gal w następstwie konkurencyjnego przyłączenia reszt fukozy (inhibitora izosterycznego) do cząsteczek substratu akceptorowego – N-acetylolaktozoaminy (Gal- $\beta$ -1,4-GlcNAc-R) na powierzchni komórek śródbłonna naczyniowego świń – potencjalnych dawców ksenotransplantów (29,48,49,51,53).

Doskonałą egzemplifikacją sprzężenia tzw. piętrowej transgenezy i klonowania somatycznego może być również uzyskanie transformowanych genetycznie prosiąt klonalnych, urodzonych po transplantacji zarodków zrekonstruowanych z jąder hodowanych *in vitro* komórek fibroblastycznych, pochodzących z biopatów tkanki skórnej świń, które wykazywały tzw. złożony profil transgeniczny w postaci indukowanej ekspresji genów kodujących zarówno: 1) ludzki czynnik przyspieszający rozkład konwertaz C3 (CD55/DAF) oraz 2) N-acetyloglukozoaminotransferazę III (GnT-III) człowieka (57). Rekombinowany ludzki enzym GnT-III odpowiedzialny jest za premodelowanie/rearanżację biosyntezy powierzchniowych łańcuchów oligosacharydowych, stanowiących część terminalną ksenogenicznych determinant antygenowych  $\alpha$ -Gal. Z kolei, ten ostatni proces biokatalizacyjny, w połączeniu z hamowaniem aktywności (cytotoksyczności) kaskady enzymatycznej układu dopełniacza, może prowadzić do zablokowania reakcji rekombinowanych glikolipidów i glikoprotein powierzchniowych z ludzkimi preformowanymi immunoglobulinami ksenoreaktywnymi z grupy anty-Gal, a tym samym opóźnienia reakcji nadostrego lub ostrego odrzucania przeszczepów ksenogenicznych. Zjawisko to tłumaczy się preferencyjnym wiązaniem reszt N-acetyloglukozoaminy (pełniących funkcję inhibitora izosterycznego) z łańcuchami cukrowcowymi epitopów Gal- $\beta$ -1,4-GlcNAc-R, w następstwie procesu hamowania współzawodniczego cząsteczek  $\alpha$ -1,3-galaktozylotransferazy świni przez enzym GnT-III człowieka (50,51,57,58).

Perspektywa produkcji homozygotycznych świń klonalnych ze znokautowanym genotypem  $\alpha$ -1,3-galaktozylotransferazy oraz dodatkowo z tzw. „transgenicznym tłem”  $\alpha$ -1,2-fukozylotransferazy człowieka otwiera ogromne możliwości aplikacyjne klonowania somatycznego i piętrowej transgenezy w medycynie i immunologii transplantacyjnej. Jedną z dróg prowadzących do osiągnięcia tego celu było sklonowanie ogółem 4 zmodyfikowanych genetycznie prosiąt (loszek) z podwójnym nokautem (mutagenezą ukierunkowaną) genu  $\alpha$ -1,3-GT (59). Jeden allel *locus* GGTA1 został unieczynniony techniką insercyjnej inaktywacji (sterowanego uszkodzenia eksonowej sekwencji nukleotydowej genu) w hodowanych *in vitro* komórkach somatycznych świń. Z kolei, supresję transkrypcyjną drugiego allelu uzyskano na drodze selektywnej indukcji mutacji genowej/punktowej – transwersji T/G (zamiany zasady pirymidynowej – tyminy na zasadę purynową – guaninę) w obrębie drugiego nukleotydu eksonu dziewiątego genu kodującego enzym  $\alpha$ -1,3-GT. W przeciwieństwie do klono-



wania somatycznego świń transgenicznych z semideficiencją genu  $\alpha$ -1,3-galaktozylo-transferazy, które prowadzi jedynie do połowicznej eliminacji ksenogenicznych determinant antygenowych  $\alpha$ -Gal z błon cytoplazmatycznych komórek endotelialnych naczyń krwionośnych, produkcja prosiąt klonalnych z ukierunkowaną inaktywacją dwóch alleli *locus* GGTA1 ma na celu uzyskanie pełnego fenotypu *null* w zakresie ekspresji genu  $\alpha$ -1,3-GT, a zatem całkowitego usunięcia epitopów galaktozylo- $\alpha$ -1,3-galaktozy z organizmu świń – potencjalnych dawców ksenotransplantów (48,59). Ten kierunek badań biotechnologicznych w medycynie transplantacyjnej jest, jak się wydaje, jedyną drogą znoszącą międzygatunkowe bariery immunologiczne, limitujące zastosowanie sprzężonych technik klonowania somatycznego i transgenezy świń na szeroką skalę w ksenotransplantologii narządów. Taka perspektywa otwiera również nowe możliwości dla produkcji świńskich bioreaktorów syntetyzujących w komórkach krwi lub dostarczających w osoczu krwi oraz w naturalnych (fizjologicznych) wydzielinach i wydalinach ciała (np. mleko, plazma/osocze nasienia, mocz) ludzkie białka i hormony, w tym różne biofarmaceutyki (np. ludzką insulinę, VIII i IX czynnik krzepnięcia krwi, ludzką antytrombinę III,  $\alpha$ -1-antytrypsynę i inne; [4,17,60]). Bezpośrednie korzyści wykorzystania transgenicznych loch i knurów, a także samic i samców innych gatunków zwierząt gospodarskich do uzyskiwania rekombinowanych białek terapeutycznych człowieka wynikają z: 1) wysokiej wydajności produkcyjnej; 2) niskich kosztów wytwarzania w porównaniu z technologiami hodowli *in vitro* transgenicznych komórek gruczołowych (komórkowych bioreaktorów); 3) cytofizjologicznej zdolności transformowanych genetycznie białek obcogatunkowych, które syntetyzowane są w gruczołach mlekowych (wymionach) lub nerkach, do podlegania szeregom kompleksowych posttranslacyjnych modyfikacji biochemicznych, np. glikozylacji, fosforylacji, czy  $\gamma$ -karboksylacji, pozwalających z jednej strony na utrzymanie stosunkowo wysokiego poziomu aktywności centrów katalitycznych wielu rekombinowanych białek enzymatycznych, a z drugiej – znacznie ułatwiających wielokrotne pozyskiwanie (ekstrakcję) bioterapeutyku z takich płynów ustrojowych jak mleko, siara czy mocz poprzez osłabienie jego powinowactwa do kompleksowych (np. glikozylowanych) związków chelatujących mleka lub moczu; 4) stopniowego zwiększania zaufania ludzi cierpiących na szereg nieuleczalnych chorób genetycznych poprzez eliminowanie białkowych produktów leczniczych wymagających izolacji z krwi człowieka, która może być źródłem wielu niebezpiecznych patogenów takich jak wirus HIV czy wirus zakaźnego zapalenia wątroby typu C (38,58,61-63).

#### **4. Świnia domowa jako transgeniczny bioreaktor rekombinowanej hemoglobiny ludzkiej**

Możliwość wykorzystania erytrocytów świń wykazujących ekspresję genu ludzkiej hemoglobiny jako substytutu krwi ludzkiej jest również bardzo atrakcyjnym aspektem klonowania somatycznego świń, głównie w związku z ciągle zmniejsza-

jącą się liczbą dawców krwi, a także co jest bardzo znaczące, w związku ze wzrastającym w ostatnich latach niebezpieczeństwem transmisji groźnych infekcji wirusowych indukowanych przez retrowirusy HIV i zakaźnego zapalenia wątroby typu C. W 1992 r. uzyskano po raz pierwszy transgeniczne świnie, syntetyzujące w czerwonych ciałkach krwi ok. 9% rekombinowanej hemoglobiny ludzkiej (rhHb, ang. *recombinant human hemoglobin*) o zdolności utlenowania bardzo zbliżonej do oksyhemoglobiny ( $\text{Hb}(\text{O}_2)_4$ ) z krwi człowieka (64). Zastosowano pięć różnych konstrukcji genowych, jednak w przypadku wszystkich wariantów doświadczalnych zarejestrowano występowanie dużych różnic w ekspresji genów kodujących cząsteczki globin człowieka wśród urodzonych prosiąt. Jednakże, gen  $\alpha$ -globiny charakteryzował się wysokim poziomem transkrypcji w przeciwieństwie do minimalnego stopnia ekspresji genu  $\beta$ -globiny. Realne możliwości efektywnej biosyntezy dużych ilości heterotetramerycznych cząsteczek ksenogenicznej hemoglobiny A (występującej we krwi ludzi dorosłych), złożonych z dwóch łańcuchów  $\alpha$ - i dwóch łańcuchów  $\beta$ -globiny ( $\text{H}\alpha\text{H}\beta$ , ang. *human  $\alpha$ - / human  $\beta$ -globin chains*) oraz z chelatowego kompleksu hemu (żelazoprotoporfiryny) posiadającego prawidłowy wykres krzywej równowagi tlenowej  $\text{Hb}(\text{O}_2)_4$ , były zatem bardzo ograniczone w krwiobiegach transgenicznych bioreaktorów świńskich. Dlatego też z ekonomicznego punktu widzenia zmonitorowany maksymalny poziom koncentracji ludzkiej Hb (około 9%) w ogólnej puli hemoglobiny transformowanych genetycznie świń okazał się zupełnie nieopłacalny dla przemysłu biofarmaceutycznego. Oszacowano natomiast, że gdyby udział transgenicznej Hb w łożysku naczyniowym świń osiągnął co najmniej 50% w stosunku do całkowitego stężenia tej chromoproteiny (hemoproteiny) w erytrocytach, zaistniałyby dopiero wystarczające warunki rentowności jej produkcji (ekstrakcji/puryfikacji) na szeroką skalę techniczną. Nowy rozdział w historii badań nad uzyskiwaniem rekombinowanej hemoglobiny ludzkiej w zwierzęcych bioreaktorach transgenicznych otworzyły dopiero wyniki eksperymentów przeprowadzonych na świniach przez Sharmę i wsp. (65). Przy wykorzystaniu konstruktów genetycznych nowej generacji, który wprowadzono do genomu przedjądrzowego zygot świńskich uzyskano znaczący postęp w zakresie efektywności ekspresji (transkrypcji) genu ludzkiej Hb w organizmach świń. Potwierdziło to wysoki potencjał możliwości aplikacyjnych tkwiący w perspektywie komercyjnej produkcji tego terapeutycznego białka hemowego przez koncerny biotechnologiczne. Struktura wymienionej konstrukcji genowej obejmowała sekwencję regulatorową ludzkiego intronowego regionu kontrolnego *locus* allelu  $\beta$ -globiny ( $\beta$ -LCR, ang.  *$\beta$ -locus control region*), zawierającą cztery charakterystyczne miejsca superwrażliwe na DNA-azę I, sprzężoną z ludzkimi genami  $\alpha$ - i  $\epsilon$ -globiny oraz ze zhybrydizowanymi eksonowymi sekwencjami chimerowego (świńsko-ludzkiego) genu konstytucji  $\beta$ -globiny. Gen  $\epsilon$ -globiny włączony był do konstruktów w celu poprawy regulacji transkrypcji genu  $\beta$ -globiny w bardzo wczesnych etapach rozwoju ontogenetycznego. W doświadczeniach przeprowadzonych przez Swansona i wsp. (64) wykazano bowiem, że nieprawidłowa ekspresja genu kodującego łańcuch  $\beta$ -globiny ludzkiej Hb w przedimplantacyjnej fazie embriogenezy



daje efekt letalny lub semiletalny w rozwoju płodowym. Wydajność produkcji transgenicznych prosiąt posiadających prawidłowo zintegrowany w genomie jądrowym konstrukt egzogennej DNA wyniosła aż około 5,5% w stosunku do całkowitej liczby uzyskanego potomstwa. Ponadto w erytroblastach (normoblastach) urodzonych prosiąt zaobserwowano maksymalną dodatnią korelację między integracją transgenu a jego ekspresją w dojrzałych, bezjądrzastych krwinkach czerwonych. U siedmiu spośród ośmiu transformowanych genetycznie świń rekombinowana hemoglobina ludzka (H $\alpha$ H $\beta$ ) stanowiła od 5 do 24% całkowitego poziomu koncentracji Hb obecnej w erytrocytach. Z kolei u jednego osobnika transgenicznego ludzka hemoglobina osiągnęła niezwykle wysokie stężenie (32 g/L osocza krwi), co stanowiło około 24% ogólnej liczby cząsteczek Hb w krwiobiegu, a hybrydowy tzn. ludzko-świński wariant Hb (H $\alpha$ P $\beta$ , ang. *human  $\alpha$ - /porcine  $\beta$ -globin chains*) wahał się na poziomie około 30 g/L osocza krwi, przy udziale rzędu 30% w stosunku do całkowitego poziomu tego białka w czerwonych ciałkach krwi. Koncentracja rekombinowanej hemoglobiny tzw. profilu transgenicznego w organizmie świńskiego bioreaktora wyniosła zatem aż 54% ogólnej puli tej hemoproteiny w łożysku naczyniowym. Ponadto u scharakteryzowanej lochy – założycielki transgenicznych rodów zwierząt – zaobserwowano transmisję konstruktów genetycznych do linii komórek płciowych i zdolność do przekazywania fenotypowo potwierdzonej (niemozaikowej) ekspresji transgenów do genomu pokolenia potomnego. U pięciu sztuk prosiąt z liczącego 12 osobników miotu uzyskanego od tej lochy transgeniczny profil ekspresji ludzkiej hemoglobiny utrzymywał się na takim samym poziomie jak u matki (65). Z obserwacji procesów fizjologicznych organizmu świń najistotniejsze było to, że populacja transgenicznych loch i knurów posiadających ponad 50% ksenogenicznej (obcogatunkowej) Hb była całkowicie zdrowa.

## **5. Ocena ryzyka pasażalnych infekcji wirusowych w układzie heterologicznym: transgeniczna świnia-człowiek**

Potencjalnym zagrożeniem dla pokonania międzygatunkowej bariery immunologicznej w transplantacji organów, a także przeszkodą w stosowaniu białek terapeutycznych wyizolowanych z organizmów świń transgenicznych może być niebezpieczeństwo przeniesienia i reaktywacji endogennych retrowirusów świń (PERVs, ang. *porcine endogenous retroviruses*) i/lub cząstek (wirionów) cytomegalowirusa świńskiego (PCMV) do ludzkiego ustroju (66,67). Intensywność reinfekcji/reaktywacji latentnych form obcogatunkowego wirusa w dużym stopniu zależy od rodzaju zastosowanego leczenia immunosupresyjnego biorcy ksenogenicznego przeszczepu/-ów. Ryzyko transmisji tych endowirusów można wyeliminować również na drodze ukierunkowanej transgenezy, ograniczającej szansę na ich uaktywnienie się w organizmie biorcy (tj. zróżnicowanie/progresję wirerii latentnej w stadium aktywnego zakażenia wirusowego). W czasie genetycznej modyfikacji całego organizmu bądź po-

szczególnych tkanek lub komórek dawcy przeszczepu można równocześnie transformować genetycznie retrowirusy. To z kolei może się przyczynić do ich preadaptacji do nowych warunków i pozostania nadal w formie latentnej po przeszczepieniu organu, lub do ich inaktywacji/atenuacji, a nawet całkowitego usunięcia na drodze nokautowania docelowych genów wirusów, np. genu odwrotnej transkryptazy, mającej równocześnie aktywność integrazy DNA, czyli enzymu katalizującego integrację materiału genetycznego wirusów z genomem jądrowym komórek gospodarza, będącego w tym przypadku biorcą ksenotransplantu (66,68).

## **6. Udział Instytutu Zootechniki w Balicach w rozwoju badań nad klonowaniem somatycznym i transgenezą świń**

W Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki w Balicach prowadzone są obecnie intensywne badania nad klonowaniem somatycznym świń z wykorzystaniem hodowanych *in vitro* linii komórek fibroblastycznych, które wyprowadzono z biopłatów tkanki skórnej ucha transgenicznego knura TG-1154, wykazującego ogólnoustrojową ekspresję genu ludzkiej  $\alpha$ -1,2-fukozylotransferazy (H-transferazy). Kolejny kierunek badań z zakresu transgenezy i klonowania somatycznego w Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki w Balicach dotyczy z kolei określenia kompetencji rozwojowych *in vitro* świńskich zarodków transgenicznych pochodzenia klonalnego w zależności od zastosowania różnych procedur sztucznej aktywacji rekonstruowanych hybryd jądrowo-cytoplazmatycznych. Pośrednim markerem selekcyjnym postaktywacyjnego potencjału przeżywalności oraz aktywności podziałowej transformowanych genetycznie zarodków klonalnych jest detekcja zielonej bioluminescencji ich blastomerów, będąca wynikiem całkowitego lub mozaikowego wzorca ekspresji transgeny reporterowego białka intensywnej zieleni fluorescencyjnej (eGFP), trwale zintegrowanego z ulegającym epigenetycznemu przeprogramowaniu genomem jądrowym komórki somatycznej. Zachowanie przez sklonowane zarodki świńskie zdolności do emisji zielonej fluorescencji o wysokim natężeniu po zainicjowaniu aktywności transkrypcyjnej własnego genomu w późnym stadium 4-komórkowym może być również wyznacznikiem prawidłowego przemodelowania konformacji przestrzennej somatycznej chromatyny jądrowej z wbudowanym egzogennym konstruktem zawierającym cDNA białka eGFP. Nasilenie epigenetycznych modyfikacji somatycznego materiału genetycznego w postaci wzrostu stopnia demetylacji reszt cytozyny DNA oraz zaawansowanych procesów acetylacji reszt lizyny głównie histonów H4 mogłoby świadczyć o właściwym przebiegu rearanżacji chromatyny również w miejscu integracji transgeny eGFP. Konsekwencją tego może być z kolei brak zaburzeń w przeprogramowaniu samego konstruktów genetycznego będącego nośnikiem alleli kodujących tę fluorogeniczną białko, w następstwie inhibicji represji nukleosomowej przez wielokompleksowe białka z rodziny *brahma* (m.in. białka BRG1 oraz BRM, homologiczne z czynnikami białko-

wymi drożdży *Saccharomyces cerevisiae* z grupy SWI2/SNF2, ang. *switch of mating type/sucrose non-fermenting*). Te zależne od ATP wielopodjednostkowe kompleksy białkowe są odpowiedzialne za przebudowę chromatyny somatycznej (zmiany w topologii DNA) najpierw w mikrośrodowisku cytoplazmatycznym oocyty-biorcy jądra, a następnie w cytozolu blastomerów zarodków znajdujących się w kolejnych stadiach rozwojowych przedimplantacyjnej fazy embriogenezy.

Wykorzystywane w procedurze klonowania somatycznego, hodowane *in vitro* linie komórek somatycznych (fibroblastycznych), poddawane są uprzednio transformacji genetycznej (w stanie subkonfluencji) przy wykorzystaniu konstrukcji genowej pWAPhGH-GFPBsd, zawierającej: 1) gen hormonu wzrostu człowieka (hGH) pod kontrolą promotora genu kwaśnej serwatki mleka szczura (rWAP), 2) reporterowy gen białka intensywnej zieleni fluorescencyjnej krążkopława (meduzy) *Aequorea victoria* (eGFP, marker selekcyjny; [69]) oraz 3) gen deaminazy blastocydy S (marker selekcyjny). W doświadczeniach nad uzyskiwaniem transgenicznych linii klonalnych komórek fibroblastycznych stosowane są następujące metody transfekcji o różnych parametrach fizykochemicznych: 1) lipofekcja oraz 2) nukleofekcja/nukleoporacja (kombinacja lipofekcji z elektroporacją, umożliwiającą za pośrednictwem nośników liposomowych, transdukcję konstrukcji genowej bezpośrednio do jądra komórki somatycznej). Transfekowane linie komórkowe poddawane są selekcji pozytywnej w pożywce z dodatkiem blastocydy S, w celu weryfikacji efektywności transgenezy. Wyselekcjonowane linie komórek somatycznych z kilku różnych pasażów analizowane są w mikroskopie epifluorescencyjnym pod kątem detekcji ekspresji transgenicznego białka eGFP. Następnie, prowadzone są eksperymenty nad uzyskiwaniem zarodków świni techniką klonowania somatycznego, z wykorzystaniem dwóch typów transgenicznych (konfluentnych) komórek: fibroblastów płodowych lub fibroblastów tkanki skórnej dorosłych osobników (loszek lub loch), jako źródła dawców jąder komórkowych. Transgeniczne zarodki klonalne hodowane są *in vitro* do stadium moruli/blastocysty, a uzyskane morule i blastocysty poddawane są przyżyciowej diagnostyce fluorescencyjnej w kierunku detekcji poziomu ekspresji reporterowego genu *eGFP*. Reasumując, z przeprowadzonych badań wynika, że efektywność transfekcji hodowanych *in vitro* komórek fibroblastycznych świni oceniana przyżyciowo (fluorescencyjnie) na bazie indeksu ekspresji ksenogenicznego genu reporterowego *eGFP* wynosi blisko 100%. Technika nukleofekcji, w porównaniu do standardowych metod transfekcji *in vitro* komórek somatycznych (lipofekcja, elektroporacja), pozwala na znaczne skrócenie czasu weryfikacji efektywności transgenezy poprzez przyżyciową kontrolę ekspresji reporterowego genu *eGFP* z 24-48 godzin do nawet 4-6 godzin po zakończeniu zabiegu transfekcji. Zarodki klonalne świni rekonstruowane z jąder transgenicznych fibroblastów płodowych wykazują wyższą aktywność podziałową (83,7% vs. 65,8%) oraz kompetencje rozwojowe *in vitro* do stadium blastocysty (22,5% vs. 17,7%) niż zarodki rekonstruowane z jąder transgenicznych fibroblastów tkanki skórnej dorosłych osobników. W uzyskanych morulach i blastocystach klonalnych świni stwierdza się blisko 100% indeks ekspresji reporte-

rowego transgenu eGFP na podstawie przyżyciowej diagnostyki poziomu emisji zielonej chemiluminescencji.

## 7. Podsumowanie

Na obecnym etapie badań, techniczne możliwości klonowania somatycznego świń i innych gatunków ssaków są ogromne, lecz wyprzedziły one znacznie zrozumienie biologicznych uwarunkowań, a w szczególności aspektów molekularnych tej metody. Mimo to podstawy biologiczne, jakie zostały stworzone w zakresie genetycznej inżynierii embrionalnej, zwłaszcza w ciągu ostatnich kilkunastu lat, umożliwiły opracowanie kompleksowej technologii wspomaganego rozrodu zwierząt z wykorzystaniem procedury transplantacji jąder komórek somatycznych, która może spełniać w wielu przypadkach warunki dla jej zastosowania do realizacji ograniczonych celów praktycznych, a wśród nich warunków stosunkowo wysokiej efektywności (3,9,40,56,70,71). W przyszłości pozwoli on niewątpliwie na wykorzystanie techniki klonowania somatycznego do multiplikacji identycznych genetycznie osobników, szczególnie tych o wybitnych, wysokoodziedziczonych cechach wartości hodowlanej (genetycznej) i użytkowej, co przyczynić się może do skrócenia odstępów międzypokoleniowego i przyspieszenia tempa osiągania postępu hodowlanego. Największe jednak oczekiwania związane są z praktyczną aplikacją techniki transplantacji jąder komórek somatycznych, transformowanych genetycznie na poziomie hodowli *in vitro*, jako alternatywnej metody uzyskiwania transgenicznych zwierząt gospodarskich w stosunku do mikroiniekcji egzogennych konstruktorów genetycznych do przedjądrzy zygot. Klonowanie somatyczne może być także efektywnym sposobem multiplikacji już wyprodukowanych osobników transgenicznych (16,30,33,70,71).

Praca wykonana w ramach projektu badawczego zamawianego nr PBZ-MIN-005/P04/2002/6.

## Literatura

1. Betthausen J., Forsberg E., Augenstein M., Childs L., Eilertsen K., Enos J., Forsythe T., Golueke P., Jurgella G., Koppang R., Lesmeister T., Mallon K., Mell G., Misica P., Pace M., Pfister-Genskow M., Strelchenko N., Voelker G., Watt S., Thompson S., Bishop M., (2000), *Nat. Biotech.*, 18, 1055-1059.
2. 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., (2002), *Nat. Biotech.*, 20(3), 251-255.
3. Samiec M., (2004), *J. Anim. Feed Sci.*, 13(2), 211-238.
4. Nagashima H., Fujimura T., Takahagi Y., Kurome M., Wako N., Ochiai T., Esaki R., Kano K., Saito S., Okabe M., Murakami H., (2003), *Theriogenology*, 59(1), 95-106.
5. Boquest A. C., Grupen C. G., Harrison S. J., McIlpatrick S. M., Ashman R. J., d'Apice A. J. F., Nottle M. B., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 1283-1287.
6. Hyun S., Lee G., Kim D., Kim H., Lee S., Nam D., Jeong Y., Kim S., Yeom S., Kang S., Han J., Lee B., Hwang W., (2003), *Biol. Reprod.*, 69, 1060-1068.

7. Samiec M., Skrzyszowska M., Smorąg Z., (2003), *Czech J. Anim. Sci.*, 48(12), 499-507.
8. Cibelli J. B., Stice S. L., Goluece P. J., Kane J. J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de Leon F. A., Robl J. M., (1998), *Science*, 280, 1256-1258.
9. McCreath K. J., Howcroft J., Campbell K. H. S., Colman A., Schnieke A. E., Kind A. J., (2000), *Nature*, 405, 1066-1067.
10. Keefer C. L., Baldassarre H., Keyston R., Wang B., Bhatia B., Bilodeau A. S., Zhou J. F., Leduc M., Downey B. R., Lazaris A., Karatzas C. N., (2001), *Biol. Reprod.*, 64, 849-856.
11. Ono Y., Shimosawa N., Ito M., Kono T., (2001), *Biol. Reprod.*, 64, 44-50.
12. Zakhartchenko V., Mueller S., Alberio R., Scherthner W., Stojkovic M., Wenigerkind H., Wanke R., Lassnig C., Mueller M., Wolf E., Brem G., (2001), *Mol. Reprod. Dev.*, 60, 362-369.
13. Schnieke A., Kind A. J., Ritchie W. A., Mycock K., Scot A. R., Ritchie M., Wilmut J., Colman A., Campbell K. H. S., (1997), *Science*, 278, 2130-2133.
14. Uhm S. J., Kim N. H., Kim T., Chung H. M., Chung K. H., Lee H. T., Chung K. S., (2000), *Mol. Reprod. Dev.*, 57, 331-337.
15. 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., Wilmut I., Clark J., (2001a), *Nat. Biotech.*, 19, 559-562.
16. Bordignon V., Keyston R., Lazaris A., Bilodeau A. S., Pontes J. H. F., Arnold D., Fecteau G., Keefer C., Smith L. C., (2003), *Biol. Reprod.*, 68, 2013-2023.
17. Machaty Z., Bondioli K. R., Ramsoondar J. J., Fodor W. L., (2002), *Cloning Stem Cells*, 4(1), 21-27.
18. Hofmann A., Zakhartchenko V., Weppert M., Sebald H., Wenigerkind H., Brem G., Wolf E., Pfeifer A., (2004), *Biol. Reprod.*, 71, 405-409.
19. Cabot R. A., Kühholzer B., Chan A. W. S., Lai L., Park K. W., Chong K. Y., Schatten G., Murphy C. N., Abeydeera L. R., Day B. N., Prather R. S., (2001), *Anim. Biotechnol.*, 12, 205-214.
20. Houdebine L. M., (2002), *J. Biotechnol.*, 98, 145-160.
21. Bowen R. A., Reed M. L., Schnieke A., Seidel G. E. J., Stacey A., Thomas W. K., Kajikawa O., (1994), *Biol. Reprod.*, 50, 664-668.
22. Baldassarre H., Wang B., Gauthier M., Neveu N., Mellor S., Pika J., Loisselle M., Duguay F., Zhou J., Keyston R., Lazaris A., Karatzas C., Keefer C., (1999), *Theriogenology*, 51, 415.
23. Palmiter R. D., Brinster R. L., Hammer R. E., Trumbauer M. E., Rosenfeld M. G., Birnberg N. C., Evans R. M., (1982), *Nature*, 300, 611-615.
24. Hammer R. E., Pursell V. G., Rexroad C. E. Jr., Wall R. J., Bolt D. J., Ebert K. M., Palmiter R. D., Brinster R. L., (1985), *Nature*, 315, 680-683.
25. Eyestone W. H., (1994), *Reprod. Fertil. Dev.*, 6, 647-652.
26. Wilkie T. M., Brinster R. L., Palmiter R. D., (1986), *Dev. Biol.*, 118, 9-18.
27. Lai L., Prather R. S., (2002), *Ann. Med.*, 34, 501-506.
28. Thomson A. J., Marques M. M., McWhir J., (2003), *Reproduction*, 61 (Suppl.), 495-508.
29. Denning C., Priddle H., (2003), *Reproduction*, 126, 1-11.
30. Samiec M., Skrzyszowska M., (2005), *Med. Wet.*, 61(1), 24-28.
31. Clark A. J., Burl S., Denning C., Dickinson P., (2000), *Transgenic Res.*, 9, 263-275.
32. Denning C., Dickinson P., Burl S., Wylie D., Fletcher J., Clark A. J., (2001b), *Cloning Stem Cells*, 3, 221-231.
33. Behboodi E., Memili E., Melican D. T., Destrempe M. M., Overton S. A., Williams J. L., Flanagan P. A., Butler R. E., Liem H., Chen L. H., Meade H. M., Gavin W. G., Echelard Y., (2004), *Transgenic Res.*, 13, 215-224.
34. Weissmann C., Fisher M., Raeber A., Bueler H., Sailer A., Shmerling D., Rulicke T., Bradner S., Aguzzi A., (1998), *Rev. Sci. Tech.*, 17(1), 278-290.
35. Scott M. R., Will R., Ironside J., Nguyen H. O., Tremblay P., DeArmond S. J., Prusiner S. B., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 15137-15142.
36. Prusiner S. B., Groth D., Serban A., Koehler R., Foster D., Torchia M., Burton D., Yang S. L., DeArmond S. J., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 10608-10612.
37. Bueler H., Raeber A., Sailer A., Fischer M., Aguzzi A., Weissmann C., (1994), *Mol. Med.*, 1, 19-30.
38. Reggio B. C., James A. N., Green H. L., Gavin W. G., Behboodi E., Echelard Y., Godke R. A., (2001), *Biol. Reprod.*, 65, 1528-1533.

39. Polejaeva J. A., Chen S.-H., Vaught T. D., Page R. L., Mullins J., Ball S., Dai Y., Boone J., Walker S., Ayares D. L., Colman A., Campbell K. H. S., (2000), *Nature*, 407, 86-90.
40. Walker S. C., Shin T., Zaunbrecher G. M., Romano J. E., Johnson G. A., Bazer F. W., Piedrahita J. A., (2002), *Cloning Stem Cells*, 4(2), 105-112.
41. Yin X. J., Tani T., Yonemura I., Kawakami M., Miyamoto K., Hasegawa R., Kato Y., Tsunoda Y., (2002), *Biol. Reprod.*, 67, 442-446.
42. Yin X. J., Cho S. K., Park M. R., Im Y. J., Park J. J., Jong-Sik-Bhak, Kwon D. N., Jun S. H., Kim N. H., Kim J. H., (2003), *Zygote*, 11(2), 167-174.
43. Kawakami M., Tani T., Yabuuchi A., Kobayashi T., Murakami H., Fujimura T., Kato Y., Tsunoda Y., (2003), *Cloning Stem Cells*, 5(4), 379-387.
44. Park K.-W., Cheong H.-T., Lai L., Im G.-S., Kuhholzer B., Bonk A., Samuel M., Rieke A., Day B. N., Murphy C. N., Carter D. B., Prather R. S., (2001), *Anim. Biotechnol.*, 12 (2), 173-181.
45. 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., (2002a), *Mol. Reprod. Dev.*, 62(3), 300-306.
46. Park K.-W., Lai L., Cheong H.-T., Cabot R., Sun Q.-Y., Wu G., Rucker E. B., Durtschi D., Bonk A., Samuel M., Rieke A., Day B. N., Murphy C. N., Carter D. B., Prather R. S., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 1001-1005.
47. Bondioli K., Ramsoondar J., Williams B., Costa C., Fodor W., (2001), *Mol. Reprod. Dev.*, 60, 189-195.
48. Ramsoondar J. J., Machaty Z., Costa C., Williams B. L., Fodor W. L., Bondioli K. R., (2003), *Biol. Reprod.*, 69, 437-445.
49. Joziassse D. H., Oriol R., (1999), *Biochim. Biophys. Acta*, 1455, 403-318.
50. Logan J. S., (2000), *Curr. Opin. Immunol.*, 12, 536-568.
51. Sharma A., Naziruddin B., Cui C., Martin M. J., Xu H., Wan H., Lei Y., Harrison C., Yin J., Okabe J., Mathews C., Stark A., Adams C. S., Houtz J., Wiseman B. S., Byrne G. W., Logan J. S., (2003), *Transplantation*, 75, 430-436.
52. Auchincloss H. Jr., Sachs D. H., (1998), *Annu. Rev. Immunol.*, 16, 433-470.
53. Galili U., (2001), *Biochimie*, 83, 557-563.
54. Harrison S. J., Guidolin A., Faast R., Crocker L. A., Giannakis C., D'Apice A. J., Nottle M. B., Lyons I., (2002), *Transgenic Res.*, 11, 143-150.
55. 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., (2002b), *Science*, 295, 1089-1092.
56. Harrison S., Boquest A., Grupen C., Faast R., Guidolin A., Giannakis C., Crocker L., McIlpatrick S., Ashman R., Wengle J., Lyons I., Tolstoshev P., Cowan P., Robins A., O'Connell P., D'Apice A. J. F., Nottle M., (2004), *Cloning Stem Cells*, 6(4), 327-331.
57. Fujimura T., Kurome M., Murakami H., Takahagi Y., Matsunami K., Shimanuki S., Suzuki K., Miyagawa S., Shirakura R., Shigehisa T., Nagashima H., (2004), *Cloning Stem Cells*, 6(3), 294-301.
58. Lai L., Prather R. S., (2003), *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 1(1), 82 (licensee BioMed Central Ltd.).
59. Phelps C. J., Koike C., Vaught T. D., Boone J., Wells K. D., Chen S. H., Ball S., Specht S. M., Polejaeva I. A., Monahan J. A., Jobst P. M., Sharma S. B., Lamborn A. E., Garst A. S., Moore M., Demetris A. J., Rudert W. A., Bottino R., Bertera S., Trucco M., Starzl T. E., Dai Y., Ayares D. L., (2003), *Science*, 299(5605), 411-414.
60. Lee J.-W., Wu S.-C., Tian X. C., Barber M., Hoagland T., Riesen J., Lee K.-H., Tu C.-F., Cheng W. T. K., Yang X., (2003), *Biol. Reprod.*, 69, 995-1001.
61. Echelard Y., (1996), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7, 536-540.
62. Wright G., Carver A., Cottom D., Reeves D., Scott A., Simons P., Wilmut I., Garner I., Colman A., (1991), *Biotechnology*, 9, 830-834.
63. Wang B., Zhou J., (2003), *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 1(1), 103 (licensee BioMed Central Ltd.).
64. Swanson M. E., Martin M. J., O'Donnell K. O., Hoover K., Lago W., Huntress V., Parsons C. T., Pinkert C. A., Pilder S., Logan J. S., (1992), *Biotechnology*, 10, 557-559.
65. Sharma A., Martin M. J., Okabe J. F., Truglio R. A., Dhanjal N. K., Logan J. S., Kumar R., (1994), *Biotechnology*, 12(1), 55-59.



66. van der Laan L. J. W., Lockey C., Griffith B. C., Frasier F. S., Wilson C. A., Onions D. E., Hering B. J., Long Z., Otto E., Torbutt B. E., Salomon D. R., (2000), *Nature*, 406, 501-504.
67. Ye Y., Niekrasz M., Kosanke S., Welsh R., Jordan H. E., Fox J. C., Edwards W. C., Maxwell C., Cooper D. K., (1994), *Transplantation*, 57, 694-703.
68. Patience C., Takeuchi Y., Weiss R. A., (1997), *Nat. Med.*, 3, 282-286.
69. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., Prasher D. C., (1994), *Science*, 263, 802-805.
70. Baguisi A., Behboodi E., Melican D. T., Pollock J. S., Destrempes 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., (1999), *Nat. Biotech.*, 17, 456-461.
71. Forsberg E. J., (2005), *Reprod. Fertil. Dev.*, 17(1,2), Proceedings of 31<sup>st</sup> Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (IETS), (January 8-12), Copenhagen (Denmark), 59-68.