



Jajowód transgeniczných ptaków – źródłem białek terapeutycznych?

Marek Bednarczyk, Paweł Łakota, Magdalena Wawrzyńska
Katedra Biotechnologii Zwierząt, Akademia Techniczno-Rolnicza,
Bydgoszcz

The oviduct of transgenic birds – a source of therapeutic proteins?

Summary

The use of transgenic mammals for the production of therapeutic proteins was developed over two decades ago, and a number of proteins have been produced in the milk of animals. Therapeutic proteins produced in eggs of transgenic hens have significant advantages over transgenic mammalian systems, including: regular high eggs production, large number of progeny, short generation times, sterile contents of the eggs produced by specific pathogen free chickens and, well characterization of the regulatory sequences of white protein genes similar to human glycosylation of chicken IgGs, etc. In this overview, recent progress in the development of chicken bioreactors was presented.

Key words:

chicken bioreactor, chimera, therapeutic proteins.

1. Wprowadzenie

Pierwsze transgeniczne zwierzę (mysz), które zostało genetycznie zmienione w celu wywołania specyficznych cech fenotypowych zostało uzyskane w 1980 r. (1). Od tego czasu ich liczba wzrosła lawinowo, np. w Nowej Zelandii, w 2003 r. istniało 3000 transgeniczných owiec, nosicielek ludzkiej alfa-1-antytrypsyny (2). Oczywiście jest pytanie, w jakim celu tworzymy transgeniczne zwierzęta? Można wymienić przynajmniej kilka powodów (3): cel poznawczy, rozszyfrowanie kodu genetycznego, badanie genetycznej kontroli systemów fizjologicznych, opracowanie genetycznego modelu chorób, poprawa cech produkcyjnych, wytwa-

Adres do korespondencji

Marek Bednarczyk,
Katedra Biotechnologii
Zwierząt,
Akademia
Techniczno-Rolnicza,
ul. Mazowiecka 28,
85-084 Bydgoszcz.

rzanie nowych produktów. Odpowiedź na to pytanie jest kwestią otwartą i dyskusyjną, np. co do produkcji metodami transgenezy organów do ksenotransplantacji. Będzie też zapewne ulegała zmianie, w miarę rozwoju nowych technik i strategii badawczych, uwarunkowań ekonomicznych i zapotrzebowania na nowe produkty.

W 1987 r. po raz pierwszy zademonstrowano możliwość produkcji biofarmaceutyków w gruczole mlecznym zwierząt transgenicznych (4). Nowa technologia tworzenia transgenicznych zwierzęcych bioreaktorów przyczyniła się do powstania, w ciągu kilku lat nowej gałęzi przemysłu, wykorzystującej narządy i tkanki zwierząt transgenicznych do produkcji ludzkich białek terapeutycznych. Obecnie łączna wartość światowego rynku biofarmaceutyków szacowana jest na 4-5 mld USD. Mimo że w ciągu kolejnych lat przemysł farmaceutyczny będzie rozwijał się w tempie 7-8% rocznie, przewiduje się, że produkcja białek terapeutycznych osiągnie w tym samym okresie wzrost ponad 15% rocznie (5). Większość ludzkich białek terapeutycznych izolowanych jest z tkanek ludzkich (np. czynniki krzepliwości krwi) lub produkowanych jako rekombinowane białka w wyniku hodowli zmodyfikowanych komórek bakteryjnych w bioreaktorach przemysłowych. Ograniczeniem pierwszej z wymienionych metod jest pogłębiająca się różnica pomiędzy popytem na biofarmaceutyki a podażą tkanek do ich izolacji, stwarza ona również potencjalne zagrożenie przenoszenia groźnych chorób (AIDS, Creutzfelda-Jakoba, i in.). Natomiast produkcja rekombinowanych białek w hodowanych *in vitro* komórkach zwierzęcych lub bakteryjnych jest nadal droga (tab.), zwłaszcza w porównaniu z ich produkcją w tkankach bioreaktorów zwierzęcych.

Tabela

Szacunkowy koszt wytworzenia /USD/ 1 g białka terapeutycznego, w zależności od skali i systemu produkcji (na podstawie 6)

Skala produkcji	System	Koszt
50 kg/rok	hodowla komórkowa	147
	zwierzę transgeniczne	20
300 kg/rok	hodowla komórkowa	48
	zwierzę transgeniczne	6

Od czasu kiedy to po raz pierwszy uzyskano transgeniczną mysz (4) produkującą tkankowy aktywator plazminogenu (tAP), można wymienić wiele innych białek produkowanych w gruczole mlekowym ssaków (7), z których kilka znajduje się we wstępnej fazie badań klinicznych. Badania kliniczne przynajmniej jednego z produktów, o nazwie handlowej ATryn®, opracowanego przez amerykańską firmę GTC Biotherapeutics zostały zakończone. Jest to ludzka antytrombina III, produkowana w mleku transgenicznych kóz. Większość rekombinowanych białek wydzielanych w mleku transgenicznych zwierząt posiada potencjalne właściwości farmaceutyczne, zachowując aktywność biologiczną.

2. Ssaki

Gruzoł mlekowy jest ogólnie uważany za narząd z wyboru do ekspresji rekombinowanych białek przez transgeniczne ssaki – bioreaktory. System ten ma dwie podstawowe zalety, z jednej strony mleko może być łatwo produkowane w znacznej ilości, z drugiej poznano dokładnie geny kodujące kazeinowe (alfa *S1- CSN1S1*, alfa *S2- CSN1S2*, beta – *CSN2* i kappa – *CSN3*) i serwatkowe (beta-laktoglobulina – *LGB* i alfa-laktoalbumina – *LALBA*) białka mleka bydła. W rezultacie możliwa jest swoista ekspresja białek terapeutycznych w gruczole mlekowym.

Istnieje wiele informacji o ekspresji heterologicznych białek (7), w ilości nawet kilku gramów na litr mleka transgenów. Wykorzystanie gruczołu mlekowego obok niewątpliwych zalet posiada również wady. Produkcja białek w gruczole mlekowym jest ograniczona relatywnie długim czasem od narodzenia zwierzęcia do pierwszej laktacji, cyklicznością laktacji oraz wysokimi nakładami i czasem niezbędnym do produkcji transgenicznych zwierząt charakteryzujących się znaczną produkcją mleka. Produkcja transgenicznych królików i/lub świń wykazujących ekspresję obcych białek w gruczole mlekowym może być próbą rozwiązania tego problemu. Stosując odpowiednie promotory wzbogacono skład mleka transgenicznych królików (cyt. za 8), o wiele rekombinowanych białek: α 1-antytrypsynę, interleukinę-2, tkankowy aktywator plazminogenu (TPA), insulinopodobny czynnik wzrostowy-I, hormon wzrostu, α -glukozydazę, białko C, jak również gonadotropinę kosmówkową klaczy. Należy jednak zaznaczyć, że w wielu przypadkach poziom ekspresji funkcjonalnych białek był niezadowalający, wahał się bowiem w szerokich granicach od zaledwie 0,3 ng do nawet 8 mg/ml.

Często dochodzi do ektopowej, niekontrolowanej ekspresji transgenów, który oddziałuje niekorzystnie na zwierzę, powodując zaburzenia płodności i gigantyzm (hGH), zaburzenia erytropoezy i wzrostu, a nawet śmierć transgenicznych zwierząt (cdNA kodujący erytropoetynę). Jest to nie tylko prawdopodobne w przypadku znacznej koncentracji egzogennych białek w mleku i możliwości ich resorpcji (9-11), ale także w odniesieniu do niewielkiej ich koncentracji i w innych systemach ekspresyjnych (12). Wykazano ponadto, że nie zawsze obce gatunkowo białka syntetyzowane w gruczole mlekowym transgenicznych ssaków podlegają prawidłowym modyfikacjom potranslacyjnym (13).

3. Ptaki

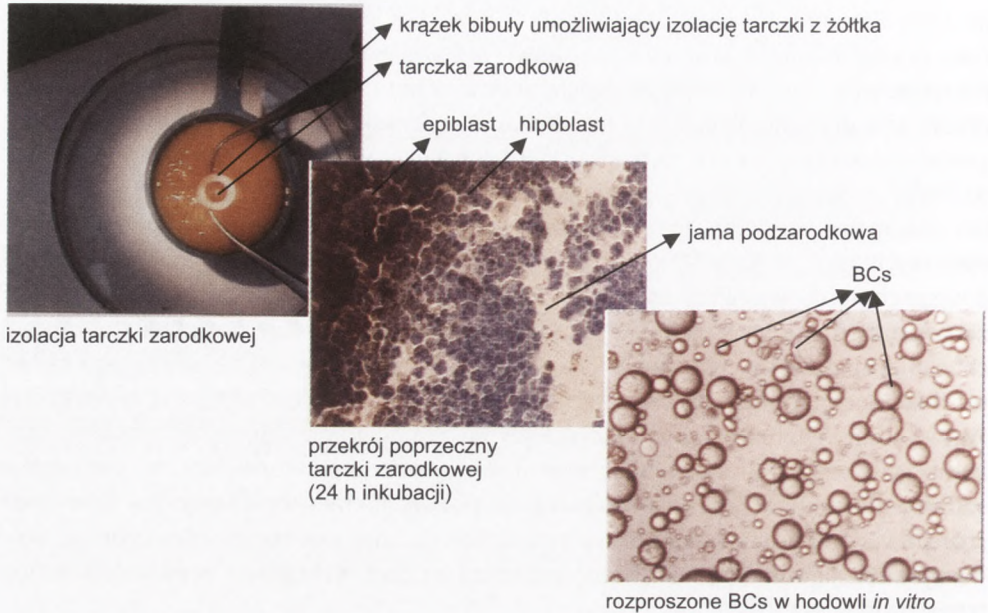
Informacje dotyczące ptaków o zmodyfikowanym genotypie są stosunkowo nieliczne (cyt. za 14). Tymczasem istnieje przynajmniej kilka powodów, dla których ptaki są nie tylko niezwykle atrakcyjnym modelem w badaniach nad transgenezą, ale przede wszystkim mogą być doskonałym bioreaktorem. Wykorzystanie jajowodu kury jako bioreaktora zapewnia wiele korzyści, w porównaniu z innymi systema-

mi (15). Genetycznie wyselekcjonowane kury rasy White Leghorn znoszą w ciągu roku ponad 330 jaj, z których każde zawiera 6,5 g białka. Białka są produktami ekspresji jedynie 7 genów, a jeden z nich gen owoalbuminy odpowiedzialny jest za ekspresję aż 2 gramów białka. Wyprodukowane w części białkotwórczej jajowodu (magnum) białko jest niemal natychmiast otoczone błonami, w tym skorupową i codziennie, w sterylnej formie „wydalane” z organizmu nioski. Kury przez wiele pokoleń mogą być utrzymywane w środowisku wolnym od drobnoustrojów chorobotwórczych (ang. *pathogen-free animals*), dzięki czemu zarodki kur wykorzystywane są powszechnie do wydajnej produkcji, np. immunoglobulin. Warto także zaznaczyć, że w porównaniu ze ssakami u ptaków odnotowano wysokie podobieństwo przeciwciał grupy IgG do przeciwciał ludzkich (14). Szacuje się np., że jedna kura może produkować taką ilość przeciwciał, jaką uzyskuje się od 10 królików w ciągu roku. Ponadto kury charakteryzuje znacznie szybsza rotacja pokoleń w porównaniu z ssakami gospodarskimi. Dzięki przemysłowym metodom produkcji, a zwłaszcza sztucznej inseminacji genotyp założyciela populacji transgenicznych kur może zostać powielony w nieograniczonej praktycznie liczbie potomków. Reasumując, wykorzystanie jajowodu ptaków do produkcji dużych ilości, zmodyfikowanych posttranslacyjnie, tanich białek jest poważną alternatywą w stosunku do innych systemów.

Jednakże produkcja transgenicznych ptaków jest utrudniona, z uwagi na ich specyficzny cykl rozwojowy. Mikroiniekcja, najczęściej stosowana technika wprowadzania obcego DNA do komórek ssaków, nie znajduje praktycznego zastosowania w odniesieniu do ptaków, ponieważ zapłodnienie ma miejsce w lejku jajowodu i jest polispermiczne (16). Identyfikacja męskiego przedjądrza, zanurzonego w żółtku jest zatem utrudniona, tym bardziej wśród kilkudziesięciu plemników, podobnie jak umieszczenie oocytu w operowanym jajowodzie (17). Ponadto zarodek kury, przed zniesieniem jaja, zawiera około 50 000 komórek.

Mimo że wykorzystanie retrowirusów umożliwia skuteczne wprowadzenie i stabilną, także w kolejnych generacjach ekspresję egzogenego DNA do komórek kury (14,18-21), jednak ich praktyczne zastosowanie do produkcji transgenicznych ptaków jest wątpliwe. Z metodycznego punktu widzenia niedogodnością jest konieczność ograniczenia wprowadzonego konstruktów do zaledwie kilku, maksymalnie 10 kpz (22). Poza metodycznymi istnieją wobec tej metody znacznie poważniejsze zastrzeżenia. Manipulacje patogenami nie znajdują akceptacji społecznej, pomimo konstrukcji retrowirusów replikacyjnie defektywnych. Obawy te są uzasadnione zważywszy przypadki ich rekombinacji z wirusami endogennymi oraz możliwość wywołania odpowiedzi immunologicznej (23).

Wydajność tego systemu okazała się niska, np. spośród 546 infekowanych zarodków (14), do wylęgu przeżyło jedynie 126 szt. (23%). Dalej jedynie u około 10% wylęzonych piskląt stwierdzono, metodą PCR, w komórkach krwi, obecność transgenu. Przy czym modyfikacja dotyczyła jedynie 1% komórek krwi tych ptaków. Obecnie białko (β -lactamase) produkowane było w ilości 11,9-173,4 ng/ml surowicy krwi



Rys. 1. Izolacja komórek blastodermalnych (BCs) kury.

i znacznie większej ilości, od 56,3 do 250 ng w ml białka jaja. W dalszym opisie omawianego doświadczenia udowadnia się, że w przypadku ptaków wyprowadzenie linii transgeniczných osobników produkujących znaczne ilości egzogenne go białka jest stosunkowo proste, pomimo niskiej odziedziczalności transgen u. Od trzech k o g u t ó w, nosicieli transgen u uzyskano łącznie 1052 szt. potomstwa, z których jedynie 3 pisklęta, po tym samym ojcu, okazały się transgenicznymi. Umiejętne krzyżowanie umożliwiło jednak uzyskanie w G_2 znacznej stawki transgeniczných kur, produkujących w ml surowicy krwi od 5,0 do 6,7 μg obcego białka.

Dalsze możliwości stwarza opracowana w ostatnich latach strategia, pozwalająca na uzyskanie ptaków transgeniczných, za pośrednictwem chimer płciowych (cyt. za 24). Podstawowymi etapami tej strategii są: a) izolacja komórek embrjonalnych dawcy, b) transfekcja komórek *in vitro*, c) hodowla i selekcja komórek zmodyfikowanych, d) ich iniekcja do zarodków biorców, e) wyląg i identyfikacja chimer fenotypowych, f) odchów chimer i identyfikacja chimer płciowych, g) ich krzyżowanie w celu uzyskania ptaków transgeniczných. Opisaną strategię przedstawiono schematycznie we wcześniejszej pracy (24).

Do produkcji chimer ptaków wykorzystuje się dwie odmienne procedury, z wykorzystaniem:

– komórek blastodermalnych (BCs – rys. 1), iniekowanych do jamy podzarodkowej zarodków biorców,

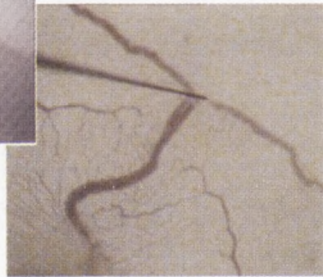
– pierwotnych komórek płciowych (PGCs – rys. 2 i 3), wstrzykiwanych bezpośrednio do naczyń krwionośnych zarodków biorców.

Zwłaszcza BCs izolowane w X stadium rozwoju embrionalnego, wśród których znajdują się zresztą prekursorzy PGCs stanowią dogodne narzędzie do produkcji ptaków transgeniczných (25), ponieważ mogą być utrzymywane w hodowli przez wiele dni oraz podlegać transfekcji *in vitro* (26), a po iniekcji do zarodka biorcy ulegają wbudowaniu i zróżnicowaniu w różnych tkankach (27). Te właściwości umożliwiają wprowadzenie modyfikacji genetycznych do komórek szlaku płciowego.

W naszych badaniach (28) posługujemy się w celu produkcji chimer zmodyfikowaną metodą iniekcji komórek blastodermalnych, poprzez komorę powietrzną jaja, do zarodka będącego w X stadium rozwoju embrionalnego. W ich wyniku uzyskaliśmy nie tylko wysokie wskaźniki wylęgu manipulowanych zarodków (41%) i wysoki procent chimer fenotypowych wśród wylęzonych piskląt od 87 do 100% (27,29,30), ale również zadowalającą przeżywalność odchowywanych do osiągnięcia dojrzałości płciowej chimer (87%) oraz znaczny odsetek chimer płciowych – 30% (31). Skonstruowane zostały wektory plazmidowe (32) wyposażone w specyficzne sekwencje regulacyjne, umożliwiające ocenę ekspresji wybranych genów w komórkach blastodermalnych kury *in vitro*. Jako element regulujący ekspresję obcych genów w jajowodzie wybrano promotor owoalbuminy, podstawowego białka jaja kurzego. Badając warunki transfekcji uzyskaliśmy ekspresję genów reporterowych: lu-



2,5-dniowy zarodek kury

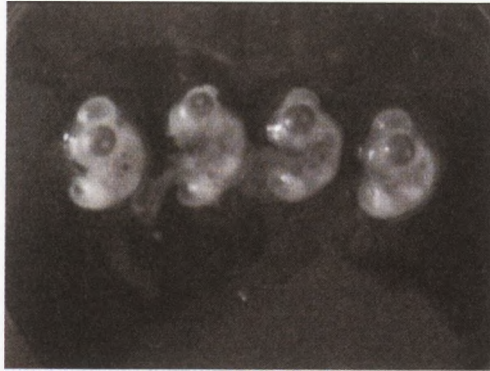


pobór krwi z żyły żółtkowej

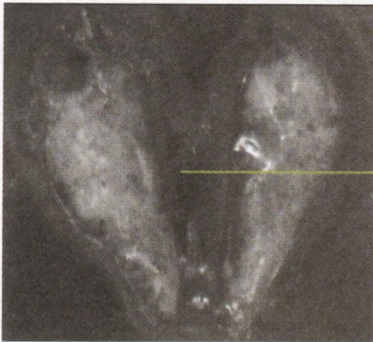


pierwotne komórki płciowe

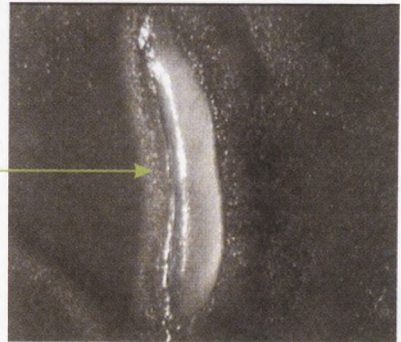
Rys. 2. Izolacja pierwotnych komórek płciowych (PGCs) z krwi 2,5-dniowego zarodka kury.



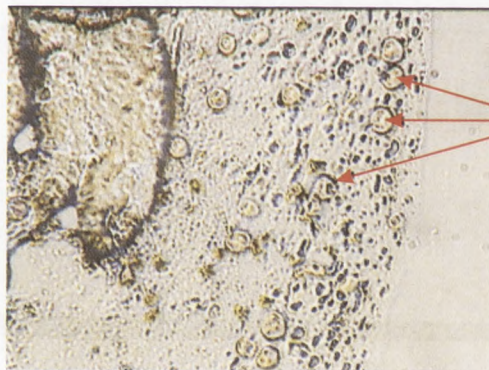
dawcy PGCs, sześciodniowe zarodki kurze, przygotowane do sekcyjnego pobrania gonad



śródnercza (pow. 15 ×)

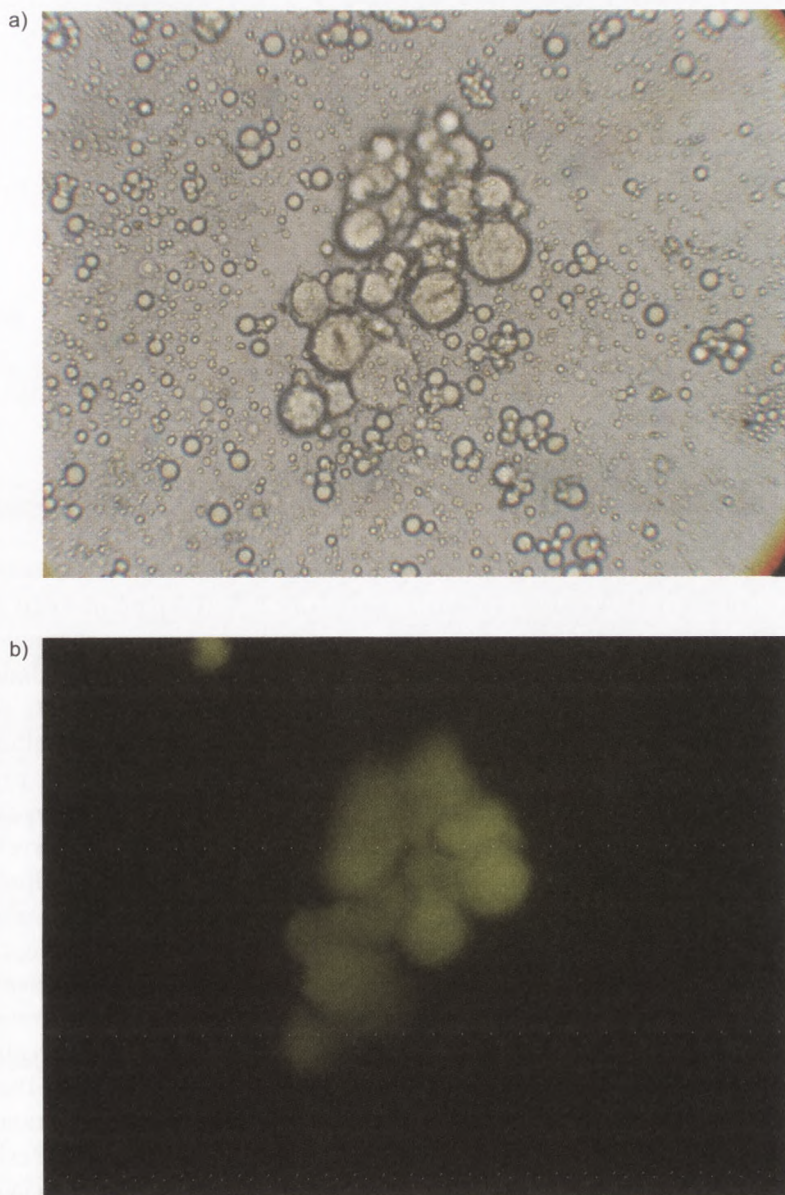


wypreparowana gonada (pow. 30 ×)
(zaznaczone miejsce lokalizacji w śródnerczu)

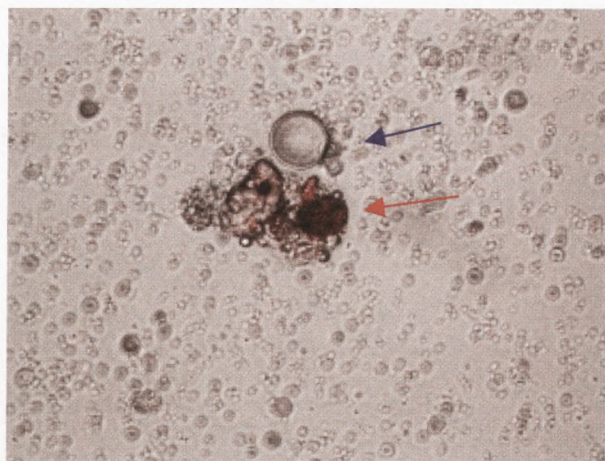


przekrój poprzeczny gonady (pow. 150 ×)

Rys. 3. Izolacja pierwotnych komórek płciowych (PGCs) z gonad 6-dniowego zarodka kury.



Rys. 4. Ekspresja genu reporterowego pAcGFP1-C1 po 72 godzinie inkubacji: a) obraz w mikroskopie świetlnym (pow. 400 ×); b) obraz w mikroskopie fluorescencyjnym (pow. 400 ×) w świetle UV (absorpcja 558 nm, emisja 583 nm).



—▶ komórka nie wykazująca ekspresji genu reporterowego,
—▶ ekspresja genu reporterowego w jądrze BCs

Rys. 5. Ekspresja pDsRed2-Nuc w jądrze komórki blastodermalnej kury.

cyferazy, zielonego białka fluorescencyjnego – GFP (rys. 4) i jego nowego wariantu – pDsRed2-Nuc (rys. 5), umożliwiającego śledzenie ekspresji egzogenego DNA w jądrze komórkowym BCs hodowanych *in vitro* (33). Ponadto udowodniliśmy, że zachowując analogiczne warunki lipofekcji możliwa jest transfekcja oraz ekspresja w BCs kury ludzkiego genu interferonu $\alpha 2$ pod kontrolą promotora owoalbuminy.

Efektywna transfekcja BCs *in vitro* jest jednym z pośrednich etapów prowadzących do produkcji ptaków transgenicznych. Kolejnym jest uzyskanie żywych piskląt, po iniekcji zmodyfikowanych BCs do zarodków biorców i ekspresji obcych genów w ich tkankach. W cytowanych badaniach (33) uzyskaliśmy, w wyniku odpowiedniego postępowania, zwiększenie wylęgowości piskląt biorców transfekowanych BCs, od ok. 5 do 25%. Znaczna śmiertelność, około 90% (116/129) manipulowanych zarodków dotyczy także innych metod, np. wykorzystujących wektory wirusowe (20). Przyczyną jest, jak się przypuszcza toksyczny efekt wprowadzonego transgenu.

Ostatnio opublikowane wyniki badań, prowadzonych przez konsorcjum utworzone z kilku amerykańskich uniwersytetów i komercyjnej firmy Origen Therapeutics (34) są wielkim osiągnięciem potwierdzającym możliwości wykorzystania komórek embrjonalnych do produkcji ptaków bioreaktorów. Specyficzna ekspresja monoklonalnych ludzkich przeciwciał – mAb, w jajowodzie kury i ich produkcja w białku jaja kurzego jest wynikiem połączenia wielu unikatowych rozwiązań, w tym długotrwałej metody hodowli kurzych pierwotnych komórek zarodkowych (cES), konstrukcji odpowiedniego konstruktów genowego, zawierającego pełną sekwencję promotora owoalbuminy oraz techniki transfekcji komórek, z wykorzystaniem metody elektroporacji. W efekcie uzyskano bardzo wydajne bioreaktory, kury znoszące jaja

zawierające od 1 do 3 mg ludzkiego białka w jaj. Ponieważ właściwości biologiczne i strukturalne tak produkowanych białek nie odbiegały od „naturalnych” oraz jak szacuje Origen Therapeutics ich produkcja jest tańsza o dalsze 40-60%, w porównaniu do innych systemów bioreaktorów zwierzęcych możemy się spodziewać, że w przewidywanej przyszłości ludzkie białka terapeutyczne staną się tanim, ogólnie dostępnym farmaceutykami.

Praca wykonana w ramach projektu 5 P06D 029 26, finansowanego przez Ministerstwo Edukacji i Nauki.

Literatura

- Gordon J. W., Scangos G. A., Plotkin D. J., Barbosa J. A., Ruddle F. H., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77, 7380-7384.
- Harper G. S., Browniee A., Hall T. E., Seymour R., Lyons R., Ledwith P., (2003), *Food Standards*, Australia, New Zealand.
- Wheeler M. B., (2003), *J. Anim. Sci.*, 81, suppl 3, 32-37.
- Gordon K., Lee E., Vitale J. A., Smith A. E., Westphal H., Hennighausen L., (1987), *Bio/Technology*, 5, 1183-1187.
- Andersson R., Mynahan R., (2001), *In Vivo*, 5, 1-5.
- Dyck M. K., Lacroix D., Pothier F., Sirard M. A., (2003), *Trends in Biotechnology*, 21, 394-399.
- Keefer C. L., (2004), *Anim. Reprod. Sci.*, 82-83, 5-12.
- Fan J., Watanabe T., (2003), *Pharmacol Ther.*, 99(3), 261-282.
- Ebert K. M., DiTullio P., Barry C. A., Schindler J. E., Ayres S. L., Smith T. E., Pellerin L. J., Meade H. M., Denman J., Roberts B., (1994), *Biotechnology (NY)*, 12, 699-702.
- Massoud M., Attal J., Thepot D., Pointu H., Stinnakre M. D., Theron M. C., Lopez C., Houdebine L. M., (1996), *Reprod. Nutr. Dev.*, 36, 555-563.
- Palmer C. A., Lubon H., McManaman J. L., (2003), *Transgenic Res.*, 12(3), 283-292.
- Zbikowska H. M., Soukhareva N., Behnam R., Chang R., Drews R., Lubon H., Hammond D., Soukharev S., (2002), *Transgenic Res.*, 11, 425-435.
- Lee T. K., Drohan W. N., Lubon H., (1995), *J. Biochem. (Tokyo)*, 118, 81-87.
- Harvey A. J., Speksnijder G., Baugh L. R., Morris J. A., Ivarie R., (2002), *Nat. Biotechnol.*, 20, 396-399.
- Lillico S. G., McGrew M. J., Sherman A., Sang H. M., (2005), *Drug Discov. Today*, 10(3), 191-196.
- Perry M. M., (1987), *J. Anatomy*, 150, 99-109.
- Pancer Z., Snapir N., Robinson B., Friedman A., Eyal-Giladi H., (1989), *Br. Poult. Sci.*, 30, 953-957.
- Salter D. W., Smith E. J., Hughes S. H., Wright S. E., Fadly A. M., Writter R. L., Crittenden L. B., (1986), *Poultry Sci.*, 65, 1445-1458.
- Bosselman R. A., Hsu R. Y., Boggs T., Hu S., Bruszewski J., Ou S., Souza L., Kozar L., Martin F., Nicolson M., Rishell W., Schultz J. A., Semon K. M., Stewart R. G., (1989), *J. Virol.*, 63, 2680-2689.
- Kwon M. S., Koo B. C., Choi B. R., Lee H. T., Kim Y. H., Ryu W. S., Shim H., Kim J. H., Kim N. H., Kim T., (2004), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320, 442-448.
- Mozdziak P. E., Borwornpinyo S., McCoy D. W., Petite J. P., (2003), *Dev. Dyn.*, 226, 439-445.
- Ishii Y., Mikawa T., (2005), *Birth. Defects Research (Part C)*, 75, 19-27.
- Crittenden L. B., Salter D. W., (1992), *Poult. Sci.*, 71, 799-806.
- Bednarczyk M., (2003), *Biotechnologia*, 1(60), 37-47.
- Etches R. J., Clark M. E., Zajchowski L., Speksnijder G., Gibbins A. M. V., Kino K., Pain B., Samarut J., (1997), *Poultry Sci.*, 76, 1075-1083.
- Brazolot C. L., Petite J. N., Etches R. J., Gibbins A. M. V., (1991), *Mol. Reprod. Develop.*, 30, 304-312.

27. Bednarczyk M., Łakota P., Lisowski M., (2006), *Theriogenology*, (w druku).
28. Bednarczyk M., Łakota P., Siwek M., (2000a), *Poultry Sci.*, 79, 1823-1828.
29. Bednarczyk M., Łakota P., Siwek M., (2000b), *Brit. Poultry Sci.*, 41, suppl, 38-39.
30. Czekalski P., Bednarczyk M., (2006), *Med. Wet.*, 62(1), 85-88.
31. Bednarczyk M., Łakota P., Słomski R., Pławski A., Lipniski D., Siemieniako D., Lisowski M., Czekalski P., Grajewski B., Dłużniewska P., (2002), *Poultry Sci.*, 81, 1347-1353.
32. Płucienniczak A., Wójcik E., (2000), *Złeczenie 50/79/99*, IBA, PAN.
33. Bednarczyk M., Płucienniczak G., Płucienniczak A., Łakota P., Sochanik A., Dłużniewska P., Grajewski B., (2003), *Folia Biol.*, 51(3-4), 189-194.
34. Zhu L., van de Lavoie M.-C., Albanese J., Beenhouwer D. O., Cardarelli P. M., Cuison S., Deng D. F., Deshpande S., Diamond J. H., Green L., Halk E. L., Heyer B. S., Kay R. M., Kerchner A., Leighton P. A., Mather C. M., Morrison S. L., Nikolov Z. L., Passmore D. B., Pradas-Monne A., Preston B. T., Rangan V. S., Shi M., Srinivasan M., White S. G., Winters-Digiacinto P., Wong S., Zhou W., Etches R. J., (2005), *Nat. Biotechnol.*, 23, 1159-1169.