



Plemniki jako wektory DNA w uzyskiwaniu zwierząt transgenicznych

Joanna Jurkiewicz

Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki, Kraków

Sperm cells as DNA vectors for production of transgenic animals

Summary

The transgenic animals are obtained mainly by microinjection of exogenous DNA into male pronuclei of the zygote. The efficiency of this method is not satisfactory, especially in domestic animals. Using the sperm cells as vectors for transferring exogenous DNA sequences into the oocyte during the process of fertilization seems to be an easy and simple method for production of transgenic animals. It was discovered that sperm cells of all species show the spontaneous ability to take up exogenous DNA. Exogenous DNA binding is not accidental, it always occurs in the postacrosomal segment of the sperm head. The interaction is ionic, reversible, sequence – independent, and not restricted to DNA, but can be reproduced using other negatively charged macromolecules. The introduction of DNA into sperm cells is possible using different methods, however, any of these methods could be considered as a routine one. The mechanisms of taking up and association of DNA by sperm are being constantly revealed and better understood.

Key words:

sperm cells, exogenous DNA, transgenic animals.

Adres do korespondencji

Joanna Jurkiewicz,
Dział Biotechnologii
Rozrodu Zwierząt,
Instytut Zootechniki,
32-083 Balice k. Krakowa.

biotechnologia

1 (72) 29–43 2006

1. Wprowadzenie

Zwierzęta transgeniczne uzyskuje się obecnie poprzez przeniesienie do dróg rodnych hormonalnie przygotowanych biocytów, zarodków uzyskanych przy użyciu następujących technik:

– bezpośredniej mikroiniekcji genu lub fragmentu DNA do męskiego przedjądra zygoty;

- modyfikację genetyczną pierwotnych komórek zarodkowych – ESC (ang. *embryonic stem cells*) i wprowadzenie ich do zarodka w stadium blastocysty;
- infekcję wczesnego zarodka zrekombinowanym wektorem pochodzenia wirusowego;
- klonowanie somatyczne z zastosowaniem transfekowanych linii komórkowych.

Spośród tych metod najszerzej stosowana jest mikroiniekcja egzogenego DNA do męskiego przedjądrza zygoty (zob. Jura i wsp. w tym samym numerze). Efektywność metody, jak wiadomo, nie jest zadowalająca, ponadto wymaga użycia kosztownej aparatury (mikromanipulatory, mikroskop odwrócony), oraz dużych umiejętności operatorów. Z tego względu rozwijane są badania zmierzające do opracowania alternatywnej dla mikroiniekcji metody. Jedną z takich metod jest transfer genów za pośrednictwem plemników jako nośników (wektorów) egzogenego DNA. Metoda ta może być korzystna szczególnie dla tych gatunków zwierząt, u których efektywność mikroiniekcji DNA jest szczególnie niska, a koszty uzyskania zygot wysokie, jak np. u bydła. Najkorzystniejszym aspektem wykorzystania plemników jako wektorów egzogenego DNA jest możliwość uzyskiwania transgenezy na szeroką skalę produkcyjną. Odmienne niż mikroiniekcja, którą należy przeprowadzać na każdej pojedynczej zygotie, użycie plemników jako wektorów może prowadzić do uzyskania dużej liczby zmodyfikowanych zarodków.

2. Metody wprowadzania DNA do plemników

Użycie plemników jako wektorów do przenoszenia sekwencji egzogenego DNA do oocytu podczas procesu zapłodnienia jest, jak się wydaje, prostą i łatwą metodą uzyskiwania zwierząt transgenicznych. W metodzie tej wykorzystuje się zdolność wiązania egzogenego DNA przez plemniki. Egzogenne DNA może być wprowadzane do komórek plemników przy wykorzystaniu kilku metod. Najbardziej rozpowszechniona metoda polega na bezpośredniej inkubacji pozbawionych osocza plemników, z egzogennym DNA. Inkubacja przeprowadzana jest przy odpowiednio dobranych parametrach temperatury i czasu jej trwania. Uzyskane w rezultacie plemniki, przenoszące obcą informację genetyczną wykorzystywane są do zapłodnienia *in vitro*, inseminacji standardowej lub laparoskopowej. We wstępnych badaniach wykazano jednak niską skuteczność tej metody (8). Aby zwiększyć efektywność pobrania i włączenia egzogenego DNA przez plemniki proponowano różne metody transfekcji plemników, przy użyciu elektroporacji, lipofekcji, enzymu restrykcyjnego, czy przeciwciała monoklonalnego (mAb C). Ostatnio zaproponowano nowe rozwiązanie, w którym inkubowane z DNA plemniki wprowadzano drogą mikroiniekcji do cytoplazmy oocytu (ICSI).

Inną alternatywną metodą w której wykorzystuje się plemniki jako wektory DNA polega na mikroiniekcji obcego DNA bezpośrednio do kanalików nasiennych lub sieci jądra. Plemniki te wykorzystywane są następnie do naturalnego krycia lub inseminacji (3,4).

2.1. Inkubacja plemników z DNA

Pierwsze dowody na możliwość wiązania egzogenego DNA przez plemniki ssaków przedstawił Bracket i wsp. w 1971 r. (5). W tym pionierskim doświadczeniu wykazano, że plemniki królika, pozbawione osocza, mogą wiązać egzogeny DNA pochodzący od wirusa SV40 i przekazywać go w trakcie zapłodnienia do oocytów, powodując ich transformację. Obecność wirusowego DNA w zarodkach została stwierdzona dzięki cytotoksycznemu działaniu powodowanemu przez zarodki w stadium 1- i 2-komórkowym na współhodowane komórki CV1. Wówczas informacja ta została jednak zignorowana. Dopiero w roku 1989 znaleziono potwierdzenie w dwóch innych doświadczeniach, gdzie stwierdzono wiązanie egzogenego DNA w komórkach plemników jeżowca (6) i myszy (7). Arezzo i wsp. (6) wykazali, że zarówno homologiczne jak i heterologiczne DNA przyłączało się do plemników, a w zarodkach stwierdzono ekspresję transgenu. Lavitrano i wsp. (7) donieśli, że plemniki najądrzowe myszy były spontanicznie zdolne do wiązania DNA plazmidu pSV2CAT. Następnie cząsteczki DNA zostały przekazane do oocytów podczas zapłodnienia, tworząc genetycznie zmodyfikowane zarodki. Ekspresję genu reporterowego CAT stwierdzono w tkankach zwierząt pozytywnych, a transgen był przekazywany od założycieli do potomstwa pokolenia F1 w proporcjach zgodnych z rozkładem mendlowskim. Później jednak pojawiło się wiele kontrowersji, gdyż licznym badaczom nie udało się powtórzyć tych doświadczeń z pozytywnym skutkiem. Negatywne rezultaty zostały zbiorczo opublikowane przez Brinstera i wsp. (8), którym nie udało się uzyskać osobników transgenicznych za pośrednictwem plemników jako nośników egzogenego DNA. Sceptycyzm w odniesieniu do tej metody nie zraził innych eksperymentatorów i nadal podejmowano próby, skupiając się przede wszystkim na ocenie zdolności plemników do przyłączania egzogenego DNA. Stwierdzono, że plemniki praktycznie wszystkich gatunków wykazują zdolność wiązania egzogenego DNA. Wiązanie to nie jest przypadkowe, zachodzi zawsze w postakrosomalnym odcinku główki plemnika. Interakcja jest jonowa, odwracalna, niezależna od sekwencji, i nie ogranicza się do DNA, ale może być odtworzona przy użyciu innych, ujemnie naładowanych makrocząsteczek (9).

Wnioski te wysunięto na podstawie licznych doświadczeń, w których przebadano wiele gatunków zwierząt, od owadów do ssaków.

Atkinson i wsp. (10) opisali wiązanie egzogenego DNA z plemnikami u muchy *Lucilia cuprina* i pszczoły miodnej *Apis mellifera*. W tym przypadku liniowy plazmid DNA zawierający fragment genu muszki *Drosophila melanogaster* *vermillion* poddano inkubacji z plemnikami. Okazało się, że cząsteczki DNA są wiązane na całej długości plemników u obydwu owadów. Proces wiązania egzogenego DNA z plemnikami stwierdzono również u żaby szponiastej *Xenopus laevis*. W tym przypadku wiązanie cząsteczek DNA następowało po prostej inkubacji w temperaturze pokojowej, już w ciągu pierwszych 20 min (11). Podobną właściwość wykazywały plemniki ryb: wiązanie egzogenego DNA z plemnikami opisano u karpia (12), łososia odmiany chinook (13) i danio przegowanego (14).

Castro i wsp. (12) przeprowadzili eksperymenty na kilku gatunkach zwierząt gospodarskich stwierdzając, że zdolność przyłączania egzogenego DNA wykazują plemniki koguta, kozła, tryka, knura i buhaja. Po prostych inkubacjach plemników wymienionych gatunków zwierząt z egzogenym DNA zauważono znaczne różnice w stopniu przyłączenia jego cząsteczek. Stwierdzono, że egzogeny DNA przyłącza się do 7-25% plemników koguta, 1,5-3% buhaja, 6-10% tryka i kozła, a zaledwie do 0,3% knura. W przeciwieństwie do tych wyników Camaioni i wsp. (15) uzyskali znacznie lepsze rezultaty. Po godzinnej inkubacji z pSV2CAT DNA obserwowano przyłączenie DNA do 78% plemników knura, 47% buhaja, a także do 26% plemników męzczyzny. Natomiast pośrednie wartości uzyskali Horan i wsp. (16), gdy po inkubacji plemników z plazmidem p(RSV bGh) DNA stwierdzili przyłączenie się 30% plemników knura. Zdolność dojrzałych plemników do wiązania egzogenego DNA została również potwierdzona przez Francolini i wsp. (17), którzy dodatkowo zauważyli, że pewna część egzogenego DNA związanego z plemnikami jest później internalizowana do jądra i wbudowywana do chromatyny. Efektywność tego procesu zależała od czasu trwania inkubacji. Wyników doświadczeń nie można jednak bezpośrednio porównywać, ze względu na szereg różnic w zastosowanych protokołach dotyczących postępowania z plemnikami, a także ze względu na różnice międzyrasowe. Lokalizacja rejonów wiązania DNA w plemnikach wszystkich badanych gatunków zwierząt była wyraźna w postakrosomowym odcinku główki plemnika. W przypadku plemników męskich lokalizacja jest podobna jak u innych gatunków, przy czym znakowany obszar zazwyczaj wychodzi poza mały odcinek postakrosomu, zakrywając łączący fragment (15). Natomiast w plemnikach buhaja zauważono dodatkowe wiązanie cząsteczek DNA w 2 miejscach: w skrajnie tylnej części końcówki główki oraz w obszarze zewnętrznej czapeczki akrosomalnej. Te 3 miejsca lokalizacji mogą istnieć w obrębie jednego plemnika (10).

W kolejnych badaniach zmierzano do określenia zjawiska interakcji egzogenego DNA z komórkami plemników jako podstawowej reakcji tego procesu. Okazało się, że zaskakująco dużo czynników moduluje interakcje plemników z egzogenym DNA. Lavitrano i wsp. (9) zidentyfikowali białka o wielkości 30-35 kDA występujące na powierzchni plemnika, które w specyficzny sposób wiążą się z DNA. Białka te mogą brać aktywny udział w przyłączeniu DNA, jeśli tylko interakcja ta nie jest wstrzymywana przez czynnik hamujący (IF-1) występujący w osoczu. Czynnik ten został rozpoznany zarówno w osoczu ssaków jak i na powierzchni plemników u bardziej prymitywnych gatunków, nie posiadających osocza (np. u jeźowca) (18). Wiąże się on selektywnie z postakrosomowym odcinkiem główki plemników, tzn. z tym samym odcinkiem komórki, w którym zachodzi wiązanie egzogenego DNA. Tak zatem IF-1 prawdopodobnie odgrywa istotną rolę działając jako naturalna bariera i chroniąc plemniki najądrzowe przed niepożądanym wtargnięciem obcych cząsteczek, które mogłyby naruszyć integralność plemnika i genetyczną tożsamość potomstwa. W obszernej pracy Lavitrano i wsp. (19) rozpoznali dwie inne cząsteczki, które być może uczestniczą w internalizacji cząsteczek DNA: CD4 i główny układ

zgodności tkankowej (MHC) klasy II. Okazało się, że zarówno cząsteczki CD4 jak i układu zgodności tkankowej klasy II (MHC II) odgrywają znaczące, ale odmienne role w procesie interakcji plemników z egzogennym DNA. Wsunęto hipotezę, że podczas spermatogenezy konieczna jest ekspresja MHC klasy II w celu wytworzenia dojrzałych komórek plemników, całkowicie kompetentnych i zdolnych do absorbowania DNA. Natomiast cząsteczki CD4 są potrzebne do jego internalizacji w jądrze. Zoragi i Spadafora (20) sugerują, że związany egzogeny DNA przyłącza się w plemnikach do rusztowania jądrowego, po czym zostaje przegrupowany i podlega rekombinacji z genomowym DNA plemnika. Miejsca integracji nie są ze sobą powiązane, ale są otoczone przez identyczne sekwencje co sugeruje, że integracja następuje w preferowanych miejscach. Równolegle do jednego końca miejsca integracji znajduje się sekwencja konsensusowa topoizomerazy II, co wskazuje na możliwą rolę tego enzymu w procesie rekombinacji niehomologicznej. Natomiast interakcja plemników najądrzowych z egzogennym DNA uruchamia endogenną nukleazę, która rozszczepia DNA zarówno egzogenne jak i genomowe prowadząc ostatecznie do procesu śmierci komórkowej przypominającej proces apoptozy (21-23).

Uzyskane wyniki pozwoliły na dokładniejsze i bardziej precyzyjne opracowanie metody. W kolejnych badaniach, uwzględniających uzyskane informacje otrzymano genetycznie zmodyfikowane zarodki i osobniki transgeniczne z potwierdzoną ekspresją wprowadzanego egzogenego DNA (24-34).

W zakrojonym na dużą skalę doświadczeniu Maione i wsp. (24) powtórzyli eksperyment przeprowadzony przez Lavitrano w 1989 r. (7), uzyskując transgeniczne myszy. Plemniki myszy inkubowano z plazmidowym DNA pSV2CAT podczas kapacytacji, dodając je potem do dojrzałych komórek jajowych. W tym eksperymencie częstotliwość inkorporacji DNA do plemnika była względnie jednolita – 90%, ale proporcja uzyskanych transgenicznych płodów była zmienna. Na 75 przeprowadzonych prób tylko w 13 udało uzyskać się transgeniczne osobniki. W zależności od eksperymentu potomstwo okazywało się transgeniczne od 0 do 100%. Okoliczności prowadzące do tych zróżnicowanych wyników pozostają nie wyjaśnione. U bydła w wyniku zapłodnienia *in vitro* nasieniem transfekowanym plazmidem pSV2CAT uzyskano 10% genetycznie zmodyfikowanych zarodków. Natomiast po inseminacji takim nasieniem uzyskano 1 transgeniczne cielę wykazujące słabe specyficzne dla transgeny sygnały o niespodziewanej długości (25). Sperandio i wsp. (27) inkubowali plemniki buhaja i knura z 3 różnymi plazmidowymi DNA (pSV2CAT, pRSV, pAGLU). Stwierdzili przyłączenie i przekazanie transgeny podczas zapłodnienia uzyskując genetycznie zmodyfikowane zarodki w przypadku obydwu badanych gatunków zwierząt. Efektywność w tym przypadku zależna była od użytego plazmidu. Najlepsze rezultaty uzyskano przy wykorzystaniu plazmidu pSV2CAT: 22% transgenicznych bydlęcych blastocyst, i 5,7% świńskich. Po inseminacji 10 loch transfekowanymi plemnikami uzyskano 5 transgenicznych prosiąt. W innym doświadczeniu przy wykorzystaniu tego samego plazmidu i jego inkubacji z plemnikami knura również udało się otrzymać transgeniczne osobniki. Transgen zlokalizowano w genomie 12 prosiąt, ale nie

wykazano produkcji białka co sugeruje transmisję mozaicyzmu (28). Również plemniki królicze mają zdolność przyłączania i przekazywania egzogenego DNA podczas procesu zapłodnienia (26). Skuteczność metody u tego gatunku wzrastała poprzez dodatkowe działanie DMSO i szoku termicznego, któremu poddano plemniki oraz użycie mieszaniny liniowego i kolistego plazmidu DNA pRK31lacZ. Te modyfikacje pozwoliły uzyskać aż 97% zarodków zawierających bakteryjną beta-galaktozydazę, a liczba transgenicznych królików wahała się od 47 do 88,9%.

Na efektywność metody oprócz różnych sekwencji DNA mają również wpływ jego ilości użyte do inkubacji z plemnikami. Sciamanna i wsp. (29) przeprowadzając badanie na najądrzowych plemnikach myszy i ejakulowanych plemnikach knura zastosowali do inkubacji 2 różne plazmidy w różnych stężeniach stwierdzając, że najwyższe wyniki, tj. 53% transgenicznych myszy, uzyskano przy bardzo niskim stężeniu pVLCNhGH plazmidu DNA (1 ng), a 66% transgenicznych świń przy jego wyższym stężeniu (5-10 ng).

Niedawno Lavitrano i wsp. (30,31) donieśli o wytworzeniu transgenicznych świń z genem hDAF (ang. *human decay accelerating factor*), który pomaga pokonać nadostre odrzucenie organu świńskiego przez organizm ludzki. Ten zespół badaczy opracował warunki inkubacji plemników knura z egzogenym DNA, co pozwoliło uzyskać aż 57% transgenicznych świń. Transgen hDAF był integrowany w genomie świni, ulegał transkrypcji i translacji wytwarzając funkcjonalne białko u 64% transgenicznych świń. W tym przypadku gen przekazywany był następnemu pokoleniu. Z najnowszego doniesienia tego zespołu wynika, że dla zwiększenia efektywności metody transfekcji plemników zastosowano 3 geny kodujące białko fluoryzujące na zielono (EGFP), niebiesko (EBFP) i czerwono (DsRed2). Stwierdzono ekspresję wszystkich 3 białek w przypadku 88% zarodków (morula/blastocysta) ocenianych w 6 dniu po inseminacji. Po wykonaniu analizy genomowego DNA metodą PCR wykazano, że wszystkie urodzone prosięta były transgeniczne, a 40% wykazywało ekspresję 3 genów. Równoczesne uzyskanie ekspresji 3 fluoryzujących białek u potrójnie transgenicznych świń dowodzi, że możliwe jest wyprodukowanie wielotransgenicznych osobników za pomocą plemników jako nośników egzogenego DNA (32). W innym doświadczeniu po laparoskopowej inseminacji plemnikami inkubowanymi z egzogenym DNA udało się uzyskać 86% blastocyst świńskich z ekspresją EGFP (33), a po iniekcji plemników inkubowanych z EGFP do cytoplazmy oocytów 22% blastocyst wykazujących ekspresję tego genu (34).

2.2. Elektroporacja plemników z DNA

Elektroporacja jest metodą, w której komórki, w obecności egzogenego DNA poddawane są działaniu pola elektrycznego. W błonie komórkowej powstają czasowo małe pory, przez które egzogeny DNA może przenikać do wnętrza komórki. Elektroporacja jest prostą, wygodną i łatwą metodą do transferu cząsteczek egzogenego DNA.

Tsai i wsp. (35) poddali elektroporacji plemniki uchowca japońskiego (*Haliotis divorsicolor suportexta*) w obecności egzogenego DNA (opAFP-2000CAT). Po przeprowadzonej analizie reakcji PCR wykazano, że transgen był obecny u 65% osobników pierwszego pokolenia, a po analizie Southern Blot stwierdzono również jego integrację z genomowym DNA larw. Wykazano także, że elektroporacja nie wpływa na zdolność plemników do zapłodnienia, czego dowodem była prawie 100% efektywność. Muller i wsp. (36) poddawał elektroporacji plemniki karpia, suma afrykańskiego i tilapii, stwierdzając ekspresję transgeny u 3-4% uzyskanego narybku. Patil i Khoo (37) przeprowadzając elektroporację u danio pręgowanego zauważyli, że plemniki poddane elektroporacji przyłączały więcej cząsteczek egzogenego DNA, niż plemniki których nie poddawano działaniu pola elektrycznego. Ponadto zauważono, że technika ta negatywnie wpłynęła na ruchliwość plemników, nie wywierając jednak negatywnego wpływu na skuteczność zapłodnienia. Na podstawie uzyskanych wyników przypuszcza się, że elektroporacja plemników rybich korzystnie wpływa na ich zdolność przyłączania egzogenego DNA do postakrosomalnego odcinka główki plemnika.

Horan i wsp. (38) ocenili wpływ elektroporacji na plemniki knura. Po prostej inkubacji plemników tego gatunku z plazmidowym DNA zawierającym bydlęcy gen hormonu wzrostu, aż 70% plemników wiązało plazmidowe DNA do postakrosomalnego odcinka główki plemnika. Elektroporacja zwiększyła je zaledwie o 5-10%. Elektroporacji poddawano także plemniki buhaja w obecności plazmidu zawierającego gen reporterowy CAT. Sekwencje genu były obecne w przypadku 22% blastocyst uzyskanych po zapłodnieniu *in vitro* plemnikami po elektroporacji. Stwierdzono, że u tego gatunku elektroporacja plemników zwiększa ich skuteczność przyłączania egzogenego DNA, ale negatywnie wpływa na ich zdolność do zapłodnienia i być może z tego powodu nie uzyskano transgenicznego potomstwa (39). Co ciekawe Rieth i wsp. (40) niedawno uzyskali transgeniczne zarodki otrzymane po zapłodnieniu *in vitro* plemnikami po elektroporacji z konstruktem DNA zawierającym gen reporterowy (ang. *Alu-like repeat*), o którym wiadomo, że sprzyja otrzymywaniu zwierząt transgenicznych poprzez rekombinację homologiczną. W wyniku przeprowadzonej reakcji PCR stwierdzono, że 46,5% zarodków wykazywało zjawisko rekombinacji homologicznej w porównaniu do zaledwie 3,5% w kontroli. Na podstawie tych rezultatów potwierdzono, że elektroporacja plemników buhaja, w połączeniu z rekombinacją homologiczną, zwiększa skuteczność integracji wprowadzanych cząsteczek DNA.

2.3. Lipofekcja plemników z DNA

Kolejną metodą umożliwiającą wniknięcie egzogenego DNA do wnętrza komórki jest lipofekcja. Metoda ta polega na jonowym oddziaływaniu wprowadzonego DNA i liposomów. Powierzchnia liposomów jest obdarzona ładunkiem dodatnim

i elektrostatycznie oddziałuje z resztami fosforanowymi DNA oraz błoną komórkową. DNA i liposomy tworzą dodatkowo naładowane kompleksy będące sferycznymi, ciągłymi, dwuwarstwowymi, lipidowymi strukturami, opłaszczającymi skondensowane DNA. Kompleksy DNA-lipidy są zdolne wnikać do komórek na drodze endocytozy (41).

Bachiller i wsp. (42) jako pierwsi wykorzystali liposomy kationowe do wprowadzenia egzogenego DNA do plemników myszy. Zaobserwowano, że w obecności liposomów ponad 80% plemników wykazywało sygnał wewnątrz główki specyficzny dla egzogenego DNA. Przy odpowiednich stężeniach DNA i liposomów uzyskano 60% skuteczności zapłodnienia *in vitro* transfekowanymi plemnikami. Sugeruje to, że traktowanie plemników liposomami nie zmniejsza ich zdolności do zapłodnienia. Jednak nie udało się otrzymać transgenicznego potomstwa, tylko w przypadku 1 osobnika po analizie Southern Blot obserwowano słaby sygnał o niespodziewanej długości. Intensywność sygnału jak i długość fragmentów sugerowały mniej niż jedną kopię skróconego konstruktów w każdej komórce. Prawie równocześnie w 2 pracach doniesiono o wprowadzeniu egzogenego DNA w drodze lipofekcji do plemników koguta. Po zapłodnieniu kur tak przygotowanymi plemnikami otrzymano zarodki (blastodermę z jaj po zniesieniu oraz po 11-13 dniach inkubacji) i kurczęta wykazujące obecność cząsteczek egzogenego DNA (43,44). Jednakże w obu przypadkach egzogeny DNA nie ulegał integracji z genomem, lecz znajdował się w formie episomalnej.

Z kolei, na kongresie zastosowań genetyki w Guelph przedstawiono 2 doniesienia o otrzymaniu transgenicznych królików (45) i kurcząt (46) z zastosowaniem plemników transfekowanych za pomocą liposomów. Autorzy twierdzili też, że wprowadzone sekwencje egzogenego DNA były przekazywane następnym pokoleniom. Jednak te prace nie są dobrze udokumentowane, a u kur nie stwierdzono ekspresji wprowadzonego genu (46). Transgeniczne osobniki udało się uzyskać Rottmanowi i wsp. w 1996 r. poprzez wprowadzenie do plemników królika, buhaja i koguta, w drodze lipofekcji, kilku plazmidów DNA zawierających dodatkowo mysiego elementu amplifikującego (nts). Tylko, wtedy gdy element ten był częścią plazmidowego DNA, uzyskano 4 transgeniczne cielęta, 2 transgeniczne płody królicze i 4 transgeniczne króliki. Analizy PCR i Southern Blot wyraźnie wykazywały ekspresję genu reporterowego. W przypadku zarodków kurzych po przeprowadzonej analizie PCR wykazano także obecność plazmidowego DNA bez dodatkowego czynnika, głównie w zarodkach we wczesnych stadiach rozwojowych, a z obecnością mysiego czynnika amplifikującego zdecydowanie w zarodkach w późniejszych stadiach rozwojowych (47).

Inny zespół badaczy (48) przy udziale liposomów uzyskał transgeniczne króliki wykazujące ekspresję genu świńskiego hormonu wzrostu (PGH) i białka zielonofluoryzującego (GFP). Po zapłodnieniu *in vitro* oocytów króliczych plemnikami traktowanymi kompleksem liposomów i plazmidowego DNA uzyskano 32% zarodków, które wykazywały ekspresję GFP. W pokoleniu F0 uzyskano 39% (29/74) transgenicznych królików. Gen świńskiego hormonu wzrostu integrował się z genomem więk-

szości osobników wykazujących ekspresję GFP. Transmisję transgenu zaobserwowano w pokoleniu F1, gdzie 1 osobnik spośród 6 wykazywał ekspresję GFP. Na podstawie tych wyników przypuszcza się, że lipofekcja może być skuteczną metodą, jednakże na jej efektywność mają wpływ m.in. takie czynniki jak: proporcje w jakich stosowane są liposomy i plazmidowe DNA oraz obecność w pożywce białek surowicy bydlęcej. Wykazano, że wysoka koncentracja liposomów ma niekorzystny wpływ na ruchliwość plemników, a obecność w pożywce białka surowicy bydlęcej, ze względu na swój ujemny ładunek, może blokować interakcję kompleksu liposomy-DNA z plemnikami. Najwyższy odsetek dzielących się zarodków, blastocyst i osobników transgenicznych uzyskano stosując liposomy w objętościach 2- i 3-krotnie większych w stosunku do plazmidowego DNA, używając przy tym pożywki nie zawierającej albuminy surowicy bydlęcej (49).

2.4. Wprowadzenie DNA do plemników za pośrednictwem enzymu restrykcyjnego

Wywołanie integracji egzogenego DNA z plemnikami jest możliwe poprzez zastosowanie enzymu restrykcyjnego (REMI, ang. *restriction enzyme mediated integration*). Metoda ta wykorzystuje liniowe DNA, które jest otrzymywane z plazmidu DNA poprzez jego cięcie enzymem restrykcyjnym w celu otrzymania jednoniciowego DNA z lepкими końcami. Liniowe, lepkie końce DNA, wraz z enzymem restrykcyjnym, są wprowadzane do komórki docelowej poprzez takie metody transfekcji jak lipofekcja lub elektroporacja. Odpowiedni enzym restrykcyjny jest wykorzystany do cięcia genomowego DNA w miejscach, w których możliwe jest spowodowanie integracji egzogenego DNA poprzez jego komplementarne lepkie końce.

Po raz pierwszy tę metodę zastosowano u drożdży, udowadniając, że może zwiększać stopień integracji prawie 20-krotnie (50). Od tego czasu wykazano, że metoda skutecznie zwiększa integrację transgenów u grzybów (51), pierwotniaków (52) i żab (53).

W 1996 r. Kroll i Amaya (54) wykorzystując enzym restrykcyjny wprowadzili liniowy plazmid DNA do jąder plemników żaby szponiastej w celu dekondensacji genomowego DNA. Jądra te po włączeniu egzogenego DNA były transferowane do dojrzałych komórek jajowych metodą mikroiniekcji. W tym doświadczeniu 36% osobników było transgenicznych w porównaniu do 19% w kontroli.

Jesuthsan i wsp. (55) uzyskał transgeniczne osobniki poprzez iniekcję jąder plemników do komórek jajowych danio pręgowanego. Plemniki poddano wcześniej określonym procedurom, w których zmieniano czas trwania ich inkubacji z egzogenym DNA oraz jego stężenia. Przy skrajnych parametrach zaobserwowano transmisję mozaikową.

Technikę tę zastosowano z powodzeniem u bydła, ale w tym przypadku w celu zwiększenia integracji liniowego plazmidu pGFP z genomowym DNA plemników połączono ją z lipofekcją. Integracja *NotI*-pGFP z bydlęcym genomowym DNA plem-

ników była wyraźna. Plemniki te wykorzystano potem do zapłodnienia *in vitro*, uzyskując 30% morul z ekspresją GFP. Natomiast po inseminacji uzyskano 2 osobniki, które po analizie PCR i RT-PCR dawały pozytywny sygnał, jednakże po analizie Southern Blot pozytywny sygnał stwierdzono tylko u jednego osobnika. Dodatkowo stosując tę samą metodę, ale inne konstrukcje genetyczne, uzyskano 2 transgeniczne cielęta. Reasumując, wszystkie uzyskane cielęta (4) wykazywały pozytywny sygnał. Gdy tę samą metodę zastosowano u kur, uzyskano w pokoleniu F1 90% (17/19) osobników z ekspresją GFP, a 83% (25/30) w pokoleniu F2 (56).

2.5. Wprowadzenie DNA do plemników za pośrednictwem przeciwciała monoklonalnego (mAb C)

Chang i wsp. (57) zaproponowali niezwykle interesującą metodę otrzymywania zwierząt transgenicznych, która polega na inkubacji plemników z egzogennym DNA w obecności przeciwciała monoklonalnego (mAb C). Przeciwciało to jest podstawowym białkiem, które wiąże się z DNA poprzez jonowe interakcje, pozwalając egzogennemu DNA na powiązanie z powierzchnią plemnika. Stwierdzono, że obecność przeciwciała jako łącznika w wiązaniu DNA i komórek plemników nie przeszkadza w zapłodnieniu. Wadą metody był niski odsetek zapłodnień *in vitro*, lepsze rezultaty uzyskiwano poprzez inseminację. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że mAb C wiązało się z plemnikami większości badanych gatunków zwierząt. Po zapłodnieniu transfekowanymi plemnikami za pośrednictwem mAb C, egzogenne DNA wbudowywało się do genomu świni i myszy z wysoką efektywnością. Ekspresję transgeny wykazywało 61% (35/57) transgenicznych świń pokolenia F0, a w pokoleniu F1 u 37,5% świń i 33% myszy. Wyraźna była też transmisja transgeny w pokoleniu F2. Na podstawie uzyskanych wyników przypuszcza się, że użycie przeciwciała w celu przyłączenia egzogennego DNA do plemników jest skutecznym sposobem na integrację transgeny, jego ekspresję i transmisję do kolejnych pokoleń.

2.6. Iniekcja plemników do cytoplazmy oocytu po inkubacji plemników z DNA

Innym wariantem metody wykorzystującej plemniki jako nośniki egzogennego DNA jest jej połączenie z metodą iniekcji plemników do cytoplazmy oocytu (ICSI, ang. *intracytoplasmic sperm injection*). W tym przypadku plemniki po inkubacji z egzogennym DNA, są wprowadzane do cytoplazmy oocytów na drodze iniekcji (ICSI). Niedawno opracowano kilka nowych procedur, mających ułatwić plemnikom przyłączanie egzogennego DNA. Procedury te polegały na wystawieniu plemników mysich na działanie Tritonu X-100, powtórzonych cykli zamrażania – rozmrażania lub liofilizacji, przed inkubacją z egzogennym DNA i iniekcją plemników do cytopla-

zmy oocyty (58). Od 64 do 94% uzyskanych blastocyst wykazywało obecność genu reporterowego *LacZ* lub *GFP*, natomiast tylko 26% blastocyst było pozytywnych względem *GFP*, gdy wykorzystano plemniki nie poddane takim procedurom. W wyniku krzyżowania transgenicznych samców myszy z nietransgenicznymi samicami uzyskano potwierdzoną ekspresję i integrację wprowadzanego genu średnio u 40% potomstwa. W wyniku zastosowania tej metody uzyskano także potwierdzoną ekspresję wprowadzanej informacji genetycznej w zarodkach małpy rhesus (59,60) i świni (61,34). Sukcesy odniesione w wyniku zastosowania tej metody są dowodem, że plemniki mogą być wykorzystywane do przyłączania i przekazywania egzogenego DNA w połączeniu z zapłodnieniem techniką ICSI.

3. Mikroiniekcja DNA i męskich komórek rozrodczych z obcym DNA do kanalików nasiennych lub jądra

3.1. Mikroiniekcja DNA

Niedawno opracowano technikę polegającą na mikroiniekcji egzogenego DNA bezpośrednio do kanalików nasiennych lub wnętrza jądra (59-66). Egzogenne DNA wprowadzone bezpośrednio do jądra jest sprawnie transportowane do przewodów najądrza i wówczas włączane przez komórki nabłonkowe najądrzy i plemniki najądrzowe (62). Metoda ta łączy możliwość tworzenia „transgenicznych plemników” oraz możliwość zbadania funkcji genów uczestniczących w spermatogenezie po transfekcji *in vivo* męskich płciowych komórek macierzystych. W doświadczeniu przeprowadzonym przez Huguet i wsp. (63) stwierdzono, że 60-80% plemników wykazywało obecność plazmidowego DNA po iniekcji do mysich powrózków, a 8% uzyskanego potomstwa wykazywało ekspresję genu reporterowego. Kim i wsp. (64) dokonali iniekcji kompleksu liposomów z genem *lacZ* do kanalików nasiennych myszy, które wcześniej poddano działaniu busulfanu, w celu zmniejszenia spermatogenezy. Stwierdzono, że ekspresja transgeny wystąpiła w 8 do 14,8% kanalików, a reakcja PCR wykazała obecność transgeny u 7-13% plemników najądrza. U świń, egzogenne DNA zostało również wprowadzone do męskich komórek rozrodczych, a od 15 do 25% kanalików nasiennych zawierających komórki rozrodcze, wykazywało ekspresję genu *lacZ*. Celebi i wsp. (65) przeprowadzili tego samego rodzaju doświadczenia, wykazując, że transgen był przekazywany potomstwu, ale pozostawał episomalny. W miarę wzrostu zwierząt plazmid zniknął w trakcie kolejnych podziałów komórkowych. Do podobnych wniosków doszli także inni badacze, którzy przy wykorzystaniu tych samych metod uzyskali transgeniczne potomstwo, jednak badając transmisję genu w kolejnych pokoleniach stwierdzono, że jego ekspresja była bardzo słaba, albo nie występowała w ogóle. Zwielokrotnienie liczby iniekcji jąder w krótkich odstępach czasu nie poprawiły efektywności metody (66,67). Inny zespół

(68) wykonał iniekcje egzogenego DNA do kanalików nasiennych myszy w połączeniu z elektroporacją, w celu transfekcji spermatogenicznych komórek macierzystych umiejscowionych w kanalikach nasiennych. Uzyskano długotrwałą ekspresję transgenu w transfekowanych komórkach. Wyniki te wskazują, że spermatogeniczne komórki macierzyste albo spermatogonia mogą włączać egzogeny DNA i transgen może być przekazywany do protoplastycznych komórek, uzyskanych po transfekcji proliferujących komórek płciowych.

Z wymienionych prac wynika, że najlepsze rezultaty uzyskiwano, gdy egzogenne DNA w kompleksach z liposomami wprowadzano do kanalików nasiennych bądź jąder. Jednakże, wysoki poziom mozaicyzmu, jak również zmniejszający się odsetek zwierząt niosących egzogeny DNA wraz z ich rozwojem, może w dużej mierze zależeć od rodzaju zastosowanych liposomów (69).

Wstępne rezultaty tej metody są zachęcające, ale zanim będzie mogła być wykorzystana do transgenezy zwierząt gospodarskich musi być udoskonalona. Metodę tę można też wykorzystać w badaniach nad regulacją spermatogenezy na poziomie molekularnym.

3.2. Mikroiniekcja genetycznie zmodyfikowanych męskich komórek rozrodczych

Brinster i wsp. (70) opracowali technikę, która polega na pobraniu komórek z jądra zawierających transgen od płodnych samców i mikroiniekcji tych komórek do kanalików nasiennych niepłodnych samców. W metodzie tej wykorzystuje się proces spermatogenezy i interakcje, które istnieją pomiędzy komórkami kanalików nasiennych. Pierwotne komórki somatyczne, które wspomagają i odżywiają komórki płciowe, tworzą ścianę kanalików i określają nisze dla komórek macierzystych. Proces spermatogenezy jest złożony, ściśle regulowany i ogromnie produktywny. U szczurów różnicowanie i proces mejozy, który rozpoczyna się od podziału pojedynczej komórki macierzystej, teoretycznie może wyprodukować ponad 4 tys. plemników, chociaż w wyniku apoptozy wydajność procesu spada o 20-50%. Tylko spermatogonialne komórki macierzyste mogą wyprodukować kolonie wszystkich komórek uczestniczących w spermatogenezie w jądrze biorcy. W wyniku krzyżowania biorcy z nietransgeniczną samicą powstaje potomstwo, które niesie geny dawcy. Metoda ta pozwala ominąć trudności i niepewności związane z bezpośrednią transfekcją plemników (71,72). Brinster i wsp. dokonali iniekcji świeżo izolowanych komórek rozrodczych od myszy dawczyń do kanalików nasiennych myszy biorców, pozabawionych komórek płciowych. Stwierdzili, że normalna spermatogeneza została przywrócona u 18-36% biorców, a z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że możliwy jest transfer świeżo pobranych lub wyhodowanych komórek rozrodczych do kanalików nasiennych myszy biorcy. Udało im się także wytworzyć spermatogenezę w kanalikach nasiennych biorców po transplantacji komórek płciowych, które

uprzednio zamrożono w temp. -196°C (73). Ten sam zespół próbował opracować metodę długotrwałej hodowli komórek macierzystych (74), w celu ostatecznej ich transfekcji *in vitro* przed reimplantacją do kanalików nasiennych jąder biorców. Z powodzeniem wykorzystano retrowirusy do transfekcji męskich komórek macierzystych *in vitro* przed ich mikroiniekcją do kanalików nasiennych (75). Ekspresja transgenu reporterowego *lacZ* trwała u myszy biorców ponad 6 miesięcy, co wskazuje, że transgen został włączony do transfekowanych komórek macierzystych. Potwierdzenie tej hipotezy nastąpiło rok później, gdy wykazano integrację i transmisję transgenu u 4,5% potomstwa, bez jakichkolwiek strat pokoleniowych (76). Zespół Brinstera wykazał także możliwość produkcji plemników szczurzych i chomiczych po transplantacji komórek zarodkowych do myszy o obniżonej odporności (77,78). Wreszcie Huang i wsp. (79) dokonali transfekcji komórek zarodkowych samców myszy *in vivo* z genem kodującym żółte białko fluorescencyjne (YFP, ang. *yellow fluorescent protein*), otrzymując fluoryzujące plemniki, które ostatecznie wykorzystano do metody ICSI. Transgen został następnie przekazany i włączony do genomu potomstwa.

4. Podsumowanie

Interakcja egzogennej DNA z plemnikami jest procesem, w którym uczestniczy szereg czynników. Zdolność plemników wielu gatunków zwierząt do wiązania egzogennej DNA jest udokumentowana i potwierdzona. Wciąż spotyka się jednak sceptycyzm i kontrowersje wokół tej metody, związane z jej funkcjonowaniem i trudnościami z uzyskiwaniem powtarzalnych wyników. Zainteresowanie metodą jest coraz większe i, jak się wydaje, będzie ona zyskiwać na znaczeniu. Problemem do rozwiązania pozostaje bardziej dogłębne poznanie mechanizmu przyłączania i przekazywania obcej informacji genetycznej z użyciem plemników jako wektorów egzogennej DNA. Pozwoliłoby to na bardziej precyzyjne określenie uwarunkowań stosowania tych metod i wykorzystania ich w biotechnologii zwierząt jako użytecznego narzędzia w produkcji transgenicznych osobników.

Literatura

1. Graham F. L., van der Eb A. J., (1973), *Virology*, 52, 456-467.
2. Gordon J. W., Scangos G. A., Plotkin D. J., Barbarosa J. A., Ruddle F. H., (1980), *PNAS*, 77, 7380-7384.
3. Celebi C., Guillaudeau T., Auvray P., Vallet-Erdtman V., Jegou B., (2002), *Biol. Reprod.*, 27, 1-18.
4. Wall R. J., (2002), *Theriogenology*, 57, 189-201.
5. Brackett B. G., Barańska W., Sawicki W., Koprowski H., (1971), *PNAS*, 68, 353-357.
6. Arezzo F., (1989), *Cell Biol. Int. Rep.*, 13, 391-94.
7. Lavitrano M., Camaioni A., Fazio V. M., Dolci S., Farace M. G., Spadafora C., (1989), *Cell*, 67, 717-723.
8. Brinster R. L., Sandgren E. P., Behringer R. R., Palmiter R. D., (1989), *Cell*, 59, 239-241.
9. Lavitrano M., French D., Zani M., Frati L., Spadafora C., (1992), *Mol. Reprod. Dev.*, 31, 161-169.
10. Atkinson P. W., Hines E. R., Beaton S., Matthaie K. I., Reed K. C., Bradley M. P., (1991), *Mol. Reprod. Dev.*, 29, 1-5.

11. Habrova V., Takac M., Navratil J., Macha J., Ceskova N., Jonak J., (1996), *Mol. Reprod. Dev.*, 44, 332-342.
12. Castro F. O., Hernandez O., Uliver C., Solano R., Milanec C., Aguilar A., Perez A., de Armas R., Herrera L., de la Fuente J., (1990), *Theriogenology*, 34, 1099-1110.
13. Symonds J. E., Walker S. P., Sin F. Y. T., Sin I., (1994), *Mol. Marine Biol. Biotech.*, 3, 104-111.
14. Khoo H. W., Ang L. H., Lim H. B., Wong K. Y., (1992), *Aquaculture*, 109, 1-19.
15. Camaioni A., Russo M. A., Odorisio T., Gandolfi F., Fazio V. M., Siracusa G., (1992), *J. Reprod. Fert.*, 96, 203-212.
16. Horan R., Powell R., McQuaid S., Gannon F., Houghton J. A., (1991), *Arch. Androl.*, 26, 83-92.
17. Francolini M., Lavitrano M., Lamia C. L., French D., Frati L., Cotelli F., Spadafora C., (1993), *Mol. Reprod. Dev.*, 34, 133-139.
18. Zani M., Lavitrano M., French D., Lulli V., Maione B., Sperandio S., Spadafora C., (1995), *Exp. Cell Res.*, 217, 57-64.
19. Lavitrano M., Maione B., Forte E., Francolini M., Sperandio S., Testi R., Spadafora C., (1997), *Exp. Cell Res.*, 233, 56-62.
20. Zoraqi G., Spadafora C., (1997), *DNA and Cell Biol.*, 16, 291-300.
21. Maione B., Pittoggi L., Achene R., Lorenzini R., Spadafora C., (1997), *DNA Cell Biol.*, 16, 1087-1097.
22. Spadafora C., (1998), *BioEssays*, 20, 955-964.
23. Gandolfi F., (2000), *Theriogenology*, 53, 127-137.
24. Maione B., Lavitrano M., Spadafora C., Kiessling A. A., (1998), *Mol. Rep. Dev.*, 50, 406-409.
25. Schellander K., Peli J., Schmoll F., Brem G., (1995), *Anim. Biotech.*, 6, 41-50.
26. Kuznetsov A. V., Kuznetsova I. V., Schit I. YU., (2000), *Mol. Rep. Dev.*, 56, 292-297.
27. Sperandio S., Lulli V., Bacci M. L., Forni M., Maione B., Spadafora C., Lavitrano M., (1996), *Anim. Biotech.*, 7, 59-77.
28. Lauria A., Gandolfi F., (1993), *Mol. Rep. Dev.*, 36, 255-257.
29. Sciamanna I., Piccoli S., Barberi L., Zaccagnini G., Magnano A. R., Giordano R., Campedelli P., Hodgson C., Lorenzini R., Spadafora C., (2000), *Mol. Rep. Dev.*, 56, 301-305.
30. Lavitrano M., Bacci M. L., Forni M., Lazzareschi D., Di Stefano C., Fioretti D., Giancotti G., Pucci L., Renzi L., Wang H., Stoppacciaro A., Stassi G., Sargiacomo M., Sinibaldi P., Turchi V., Giovannoni R., Casa G. D., Seren E., Rossi G., (2002), *PNAS*, 99, 14230-14235.
31. Lavitrano M., Forni M., Bacci M. L., Di Stefano C., Varzi V., Wang H., Seren E., (2003), *Mol. Reprod. Dev.*, 64, 284-291.
32. Webster N. L., Forni M., Bacci M. L., Giovannoni R., Razzini R., Fantinati P., Zannoni A., Fusetti L., Dalpra L., Bianco M. R., Papa M., Seren E., Sandrin M. S., McKenzie I. F. C., Lavitrano M., (2005), *Mol. Reprod. Dev.*, 72, 68-76.
33. Frantinati P., Zannoni A., Bernardini C., Webster N., Lavitrano M., Forni M., Seren E., Bacci M. L., (2005), *Theriogenology*, 63, 806-817.
34. Garcia-Vazquez F., Garcia-Rosello E., Gutierrez-Adan A., Gadea J., (2005), *Seventh International Conference on Pig Reproduction*, Rolduc, The Netherlands, Session VI, 155.
35. Tsai H., Lai C. H., Yang H., (1997), *Transgenic Res.*, 6, 85-95.
36. Muller F., Ivics Z., Erdelyi F., Papp T., Varadi T., Horwath L., Maclean N., (1992), *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1, 276-281.
37. Patil J. G., Khoo H. W., (1996), *J. Exp. Zool.*, 274, 121-129.
38. Horan R., Powell R., Bird J. M., Gannon F., Houghton J. A. (1992), *Arch. Andro.*, 1, 28, 105-114.
39. Gagne M. B., Pothier F., Sirard M., (1991), *Mol. Rep. Dev.*, 29, 6-15.
40. Rieth A., Pothier F., Sirard M., (2000), *Mol. Rep. Dev.*, 57, 338-345.
41. Felgner P. L., Gadek T. R., Holm M., Roman R., Chan H. W., Wenz M., Northrop J. P., Ringold G. M., Danielsen M., (1987), *PNAS*, 84, 7413-7417.
42. Bachiller D., Schellander K., Peli J., Ruther U., (1991), *Mol. Rep. Dev.*, 30, 194-200.
43. Rottman O. J., Antes R., Hofer P., Maierhofer G., (1992), *J. Anim. Breed. Genet.*, 109, 64-90.
44. Nakanishi A., Iritani A., (1993), *Mol. Rep. Dev.*, 36, 258-261.
45. Rottman O., Antes R., Hofer P., Sommer B., Grummt F., (1994), *Proceedings of 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock production*, Guelph, Canada (August 7-12), 21, 347-349.

46. Squires E. J., Drake D., (1994), *Proceedings of 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock production*, Guelph, Canada (August 7-12), 21, 350-353.
47. Rottman O., Antes R., Hofer P., Maierhofer G., Sommer B., Wanner G., Gorlach A., Grummt F., Pirchner F., (1996), *J. Anim. Breed. Genet.*, 113, 401-411.
48. Wang H. J., Lin A. X., Zhang Z. C., Chen Y. F., (2001), *Anim. Biotech.*, 12, 101-110.
49. Wang H. J., Lin A. X., Zhang Z. C., Chen Y. F., (2003), *Anim. Biotech.*, 2, 155-165.
50. Schiestl R. H., Petes T. D., (1991), *PNAS*, 88, 7585-7589.
51. Maier F. J., Schafer W., (1999), *Biol. Chem.*, 380, 855-864.
52. Black M., Seeber F., Soldati D., Kim K., Boothroyd J. C., (1995), *Mol. Biochem. Parasitol.*, 74, 55-63.
53. Manivasakam P., Schiestl R. H., (1998), *Mol. Cell Biol.*, 18, 1736-1745.
54. Kroll K. L., Amaya E., (1996), *Development*, 122, 3173-3183.
55. Jesuthasan S., Subburaju S., (2002), *Dev. Biol.*, 242, 88-95.
56. Shemesh M., Gurevich M., Harel-Markowitz E., Benvenisti L., Shore L. S., Sram Y., (2000), *Mol. Rep. Dev.*, 56, 306-308.
57. Chang K., Qian J., Jiang M., Liu Y., Wu M., Chen CH., Lai CH., Lo H., Hsiao Ch., Brown L., Bolen Jr. J., Huang H., Ho P., Wu F., Lin Y., Xu J., Wang K., (2002), *BMC Biotechnology*, 2, 1-9.
58. Perry A. C., Wakayama T., Kishikawa H., Kasai T., Okazaki M., Toyoda Y., Yanagimachi R., (1999), *Science*, 284, 1180-1183.
59. Chan A. W., Luetjens C. M., Dominko T., Ramalho-Santos J., Simerly C. R., Hevitson L., Schatten G., (2000), *Mol. Reprod. Dev.*, 56, 325-328.
60. Chan A. W., Luetjens C. M., Dominko T., Ramalho-Santos J., Simerly C. R., Hevitson L., Schatten G., (2000), *Mol. Reprod. Dev.*, 6, 26-33.
61. Lai L., Sun Q., Wu G., Murphy C. N., Kuhholzer B., Park K. W., Bonk A. J., Day B. N., Prather R. S., (2001), *Zygote*, 9, 339-346.
62. Sato M., Ishikawa A., Kimura M., (2002), *Mol. Reprod. Dev.*, 61, 49-56.
63. Huguet E., Esponda E., (2000), *Mol. Reprod. Dev.*, 56, 243-247.
64. Kim J. H., Jung-Ha H. S., Chung K. S., (1997), *Mol. Reprod. Dev.*, 46, 515-526.
65. Celebi C., Auvray P., Benvegna T., Plusquellec D., Jegou B., Guillaudeux T., (2002), *Mol. Reprod. Dev.*, 62, 477-482.
66. Sato M., Gotoh K., Kimura M., (1999), *Transgenics*, 2, 357-369.
67. Sato M., Yabuki K., Watanabe T., Kiura M., (1999), *Transgenics*, 3, 11.
68. Yamazaki Y., Fujimoto H., Ando H., Ohyama T., Hirota Y., Noce T., (1998), *Biol. Reprod.*, 59, 1439-1444.
69. Yonezawa T., Furuhata Y., Hirabaiashi K., Suzuki M., Takahashi M., Nishihara M., (2001), *Mol. Reprod. Dev.*, 60, 196-201.
70. Brinster R. L., (2002), *Science*, 296, 2174-2176.
71. Brinster R. L., Zimmerman J. W., (1994), *PNAS*, 91, 11298-11302.
72. Brinster R. L., Avarbock M. R., (1994), *PNAS*, 91, 11303-11307.
73. Avarbock M. R., Brinster C. J., Brinster R. L., (1996), *Nat. Med.*, 2, 693-696.
74. Nagano M., Avarbock M. R., Leonida E. B., Brinster C. J., Brinster R. L., (1998), *Tissue Cell*, 30, 389-397.
75. Nagano M., Shinohara T., Avarbock M. R., Brinster R. L., (2000), *FEBS Lett.*, 475, 7-10.
76. Nagano M., Brinster C. J., Orwig K. E., Ryu B. Y., Avarbock M. R., Brinster R. L., (2001), *PNAS*, 98, 13090-13095.
77. Clouthier D. E., Avarbock M. R., Maika S. D., Hammer R. E., Brinster R. L., (1996), *Nature*, 381, 418-421.
78. Ogawa T., Dobrinski I., Avarbock M. R., Brinster R. L., (1999), *Biol. Reprod.*, 60, 515-521.
79. Huang Z., Tamura M., Sakurai T., Chuma S., Saito T., Nakatsuji N., (2000), *FEBS Lett.*, 487, 248-251.