Kojarzy się to nam ze zdarzeniem, jakie miało miejsce przy okazji wizyty znanego genetyka z zagranicy w naszym Instytucie. Na obiad podano kotlety schabowe, gość zachwycał się ich smakiem, nie spotykanym już w Niemczech. Ze smutkiem jednak przyznał, że to jego osobista działalność hodowlana spowodowała radykalną poprawę mięsności u świń rodzimych, w konsekwencji chudej wieprzowiny jest pod dostatkiem, ale pozbawiono ją przy tej okazji walorów smakowych.

Promujmy zatem walory dobrej polskiej żywności otrzymanej tradycyjnie i dajmy szansę jej producentom.

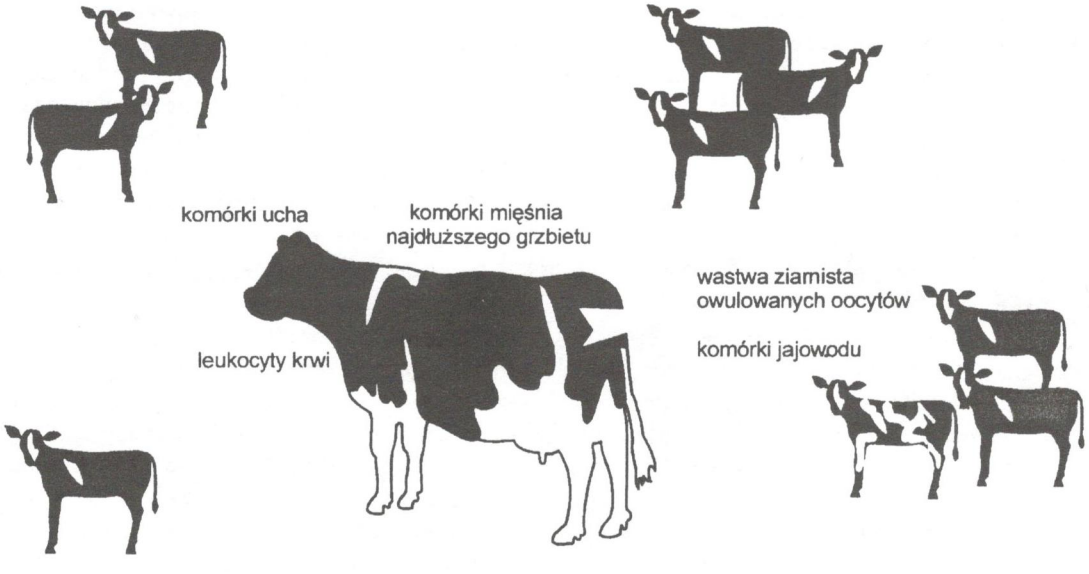
Somatyczne klonowanie ssaków

Jacek A. Modliński, Jolanta Karasiewicz

IGiHZ PAN w Jastrzębcu

Dwudziestego siódmego lutego 1997 roku, kiedy brytyjskie czasopismo naukowe „Nature" opublikowało artykuł Iana Wilmuta i wsp. [12] o narodzinach jagnięcia uzyskanego w wyniku transplantacji do enukleowanego oocytu jądra pochodzącego z komórki gruczołu mlekowego 6-letniej owcy, przełamany został obowiązujący dogmat, że klonowanie ssaków przy użyciu jąder pochodzących z komórek zróżnicowanych jest, z biologicznego punktu widzenia, całkowicie niemożliwe. Do tej pory, klonowanie ssaków ograniczało się wyłącznie do klonowania ich zarodków. Stosowane w tym celu metody, takie jak bisekcja blastocyst i transplantacje do enukleowanych oocytów jąder różnego typu komórek zarodkowych, pozwalały na uzyskanie grup identycznych genetycznie zarodków, które następnie – po ich przeszczepieniu do biorczyń – dawały, w wielu przypadkach, klony urodzonych zwierząt. Najwięcej tego typu badań przeprowadzono, ze zrozumiałych względów, na zarodkach bydlęcych. Liczebność uzyskiwanych klonów była różna: od dwóch (przy stosowaniu metody bisekcji), aż do 5-11 cieląt (przy stosowaniu metody transferu jąder komórkowych). Pomimo jednak znacznej efektywności klonowania zarodków różnych gatunków ssaków, w tym wielu gatunków zwierząt gospodarskich, znaczenie tej metody dla praktyki hodowlanej i przyspieszenia postępu genetycznego było dość problematyczne. Klonowany zarodek jest *terra incognita* zarówno pod względem płci, jak i wartości genetycznej, co ma zasadnicze znaczenie w odniesieniu do zwierząt gospodarskich. Istnieją wprawdzie techniki pozwalające na przyżyciowe określenie płci zarodków, jednak, po pierwsze, często nie dają one jednoznacznych wyników, a po drugie, stosowanie ich związane jest zawsze z koniecznością pobrania z zarodka pewnej liczby komórek. Powoduje to z jednej strony jego traumatyzację, a ponadto zmniejsza liczbę komórek, które mogą być użyte do klonowania. Określenie z kolei wartości genetycznej zarodka, a tym samym wynikającej z niej wartości użytkowej uzyskanych klonów zwierząt wymagałoby zastosowania stosunkowo złożonej procedury. W pierwszym etapie należałoby część komórek – dawców jąder – użyć do klonowania, a pozostałą część zarodka zamrozić. W drugim etapie, po urodzeniu się zwierząt i osiągnięciu przez nie odpowiedniego wieku, przeprowadzona by była ich ocena użytkowa. Jeżeli wypadłaby ona pomyślnie, to w trzecim etapie należałoby rozmrozić pozostałą część zarodka i użyć jądra komórek do uzyskania większej liczby klonów. Jak łatwo się domyślić, procedura taka, choć możliwa, jest jednak bardzo nieopłacalna z praktycznego punktu widzenia.

Tak więc, jeśli chodzi o możliwość zwiększenia liczebności wartościowych genotypów, klonowanie zarodków ssaków nie spełniło swego zadania. Jedynym sposobem realizacji tego



Rys. 1. Klony bydła uzyskane z komórek ciała dorosłego osobnika

celu mogło być tylko klonowanie dorosłych osobników o określonych, szeroko pojętych cechach użytkowych.

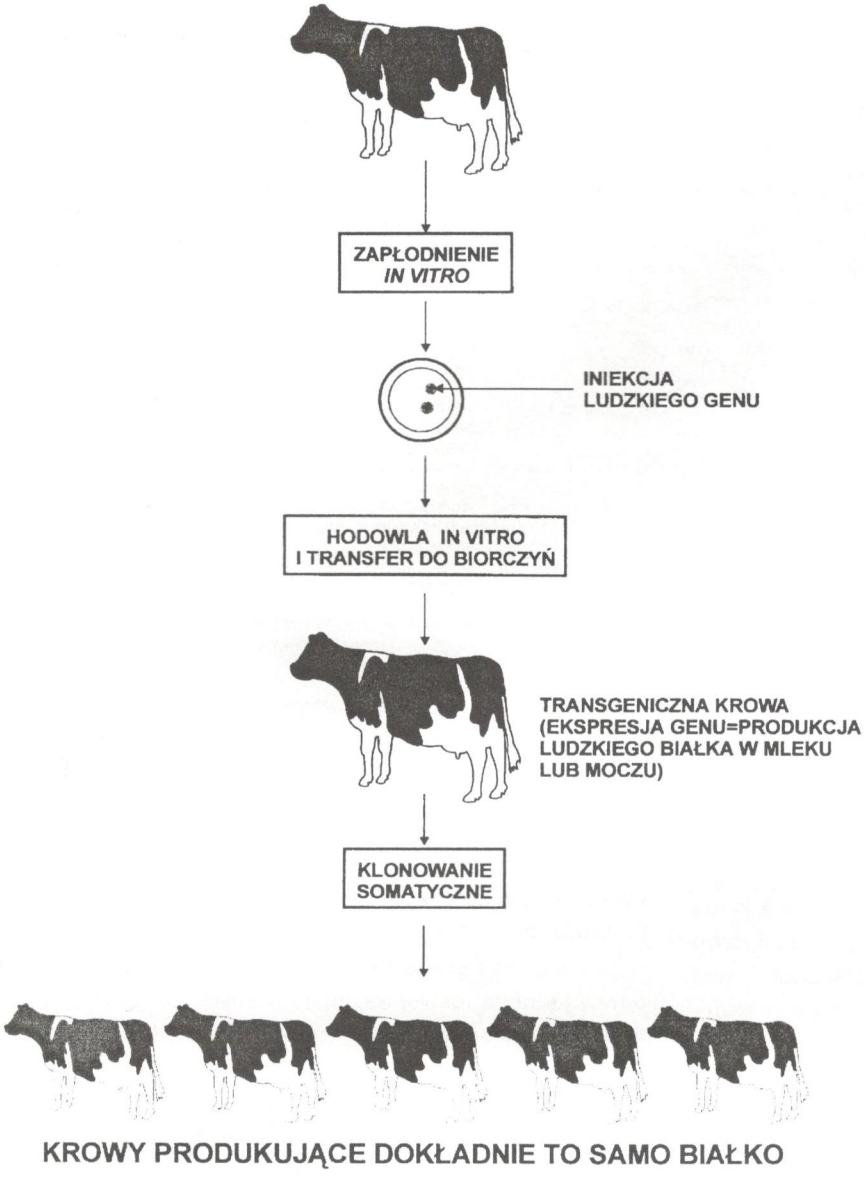
Jak już wspomniano, do chwili narodzin owcy Dolly obowiązującym w biologii paradygmatem było założenie, że w rozwoju zarodkowym i płodowym ssaków – w miarę postępującego różnicowania komórek – w ich genomie zachodzą nieodwracalne zmiany, które powodują, że ich jądra nie mogą już powrócić do stanu niezróżnicownego jądra zygoty. Ponieważ powrót genomu do stanu „pierwotnego", określany mianem przeprogramowania lub przemodelowania, jest *conditio sine qua non* umożliwiającym pokierowanie od początku do końca ontogenezą sklonownego zarodka lub dorosłego osobnika, paradygmat nieodwracalnych zmian w genomie wykluczał całkowicie możliwość klonowania osobników dorosłych. Co więc spowodowało, że przełamanie tego paradygmatu stało się możliwe? Żmudne badania nad poznaniem mechanizmów warunkujących przeprogramowanie wprowadzonych do cytoplazmy oocytu obcych jąder komórkowych doprowadziły do stworzenia nowych modeli doświadczalnych, które skierowały klonowanie ssaków na zupełnie nowe tory. Stworzenie tych modeli wiązało się przede wszystkim z pełniejszym, niż do tej pory, zrozumieniem roli, jaką w rozwoju rekonstruowanego oocytu odgrywa odpowiedni dobór faz cyklu komórkowego komórki biorcy i komórki dawcy jądra. W cytoplazmie owulowanego oocytu (komórki biorcy) stwierdza się wysoki poziom tzw. czynnika dojrzewania oocytów (MPF; ang. maturation promoting factor), który – między innymi – jest odpowiedzialny za wyróżnicowanie się chromatyny (chromosomów) z jądra interfazowego i utrzymywanie jej w stanie skondensowanym. Aktywacja oocytu, zarówno naturalna, spowodowana wniknięciem plemnika, jak i sztuczna, wywołana działaniem różnych bodźców fizyczno-chemicznych, powoduje gwałtowny spadek poziomu MPF, co umożliwia dekondensację chromatyny i utworzenie jądra interfazowego. Analiza zachowań jąder komórkowych, będących w różnych fazach cyklu komórkowego, wprowadzonych do oocytów z różnym poziomem MPF doprowadziła do stworzenia modelu tzw. uniwersalnych biorców, którymi są preaktywowane oocyty. Są to oocyty, które poddane są aktywacji kilka godzin przed wprowadzeniem do nich obcego jądra komórkowego. W oocytach takich poziom MPF jest już bardzo niski, co powoduje, że chromatyna wprowadzonych jąder nie ulega kondensacji, a replikacja DNA przebiega zgodnie z fazą cyklu komórkowego, w jakim znajduje się jądro w momencie jego wprowadzenia do cytoplazmy oocytu [1]. Prawidłowy przebieg replikacji DNA w rekonstruowanych oocytach warunkuje zachowanie prawidłowej ploidii (liczby chromosomów) w rozwijających się zarodkach. Zastosowanie modelu „uniwersalnych biorców" zwiększyło istotnie efektywność klonowania, mierzoną odsetkiem prawidłowo rozwijających się zarodków uzyskanych w wyniku transplantacji do enukleowanych oocytów jąder komórek zarodkowych, jak również liczbą urodzonych zwierząt.

Tabela
Wykorzystanie jąder komórek dorosłych osobników w somatycznym klonowaniu ssaków

Gatunek	Typ komórek dawców jąder	Pochodzenie, płeć, szczep (rasa)	Wyniki
Mysz	komórki pęcherzykowe	*Cumulus oophorus* – warstwa ziarnista owulowanych oocytów – B6D2, B6D3	myszy – samice [9]
	komórki nerwowe	mózg (płeć dawców nie podana)	7-dniowe płody – ? [9]
	komórki Sertoliego	jądra	8,5-dniowe płody – płeć męska [9]
	komórki ogona	koniec ogona, samce B6C3	myszy – samce [10]
Owca	nieznany	gruczoł mleczny ciężarnej 6-letniej owcy – finn dorset	jagnięta – samice [12]
Bydło	komórki pęcherzykowe	warstwa ziarnista owulowanych oocytów, krowy – japońska czarna	cielęta – samice [4]
	komórki nabłonkowe	jajowód, krowy – japońska czarna	cielęta – samice [4]
	komórki pęcherzykowe	warstwa ziarnista pęcherzyka jajnikowego, krowy – rasa nie podana	cielęta – samice [11]
	komórki z ucha, fenotyp nieznany	ucho, buhaje – japońska czarna	cielęta – samce [Nagai, inf. ustna]
	komórki z mięśni, fibroblasty (?) fibrocyty (?)	mięsień najdłuższy grzbietu, buhaje – japońska czarna	cielęta – samce [8]
	leukocyty	buhaje, krew obwodowa	cielę – samiec [3]
Świnia	nieznany	lochy	prosięta – samice [Wilmut i wsp., 2000; nie publikowane]

Badania nad wpływem fazy cyklu komórkowego komórki dawcy jądra na rozwój rekonstruowanych oocytów doprowadziły do powstania koncepcji, że fazą najbardziej sprzyjającą przemodelowaniu wprowadzonych jąder komórkowych jest faza G1 (presyntetyczna), a jeszcze lepiej faza GO, określana mianem fazy spoczynkowej komórki. Faza G1 jest pierwszą fazą cyklu każdej dzielącej się komórki. Trwa ona jednak stosunkowo krótko, co utrudnia wykorzystanie komórek w tej fazie cyklu, jako potencjalnych dawców jąder. W fazie GO znajdują się z kolei tylko nieliczne rodzaje nie dzielących się komórek, takie jak komórki nerwowe, komórki Sertoliego oraz część komórek pęcherzykowych otaczających owulowane oocyty ssaków. W fazę GO można jednak wprowadzić wiele rodzajów komórek, które mogą rosnąć w warunkach *in vitro*. W tym celu stosuje się „głodzenie" komórek, hodując je w pożywce o drastycznie obniżonej zawartości cielęcej surowicy płodowej, która jest głównym czynnikiem odżywczym hodowanych *in vitro* komórek. Hodowane w tych warunkach komórki przestają się dzielić i wchodzą w stan „uśpienia", który jest właśnie spoczynkową fazą GO.

Wprowadzanie komórek w fazę GO zastosowali po raz pierwszy Campbell i wsp. z Roslin Institute w Szkocji [2] w odniesieniu do nabłonkopodobnych linii owczych komórek pochodzenia zarodkowego, uzyskując po transferze ich jąder urodzone jagnięta. Istotne w tym doświadczeniu było to, że jądra pochodziły z komórek stosunkowo wysokich pasaży i cechowały je już zmiany charakterystyczne dla komórek różnicujących się. Autorzy wysunęli przypuszczenie, że genom komórki „uśpionej" w fazie GO jest najbardziej otwarty



Rys. 2. Klonowanie a medycyna i farmacja

i podatny na wpływ czynników cytoplazmatycznych oocytu, warunkujących przemodelowanie wprowadzonego jądra. Założenie to okazało się ze wszech miar słuszne, czego dowodem było uzyskanie, w rok poźniej przez ten sam zespół, jagniąt urodzonych po transferze do enukleowanych oocytów jąder „głodzonych" owczych fibroblastów płodowych oraz słynnej Dolly, po transferze jądra komórki pochodzącej z „głodzonych" hodowli komórek gruczołu mlekowego dorosłej owcy [12].

Wykazanie, że klonowanie dorosłych ssaków jest możliwe, stało się nieprawdopodobnym impulsem dla rozwoju badań nad wykorzystaniem zróżnicowanych komórek płodowych i komórek dorosłych osobników w klonowaniu ssaków. Ten typ klonowania, wykorzystujący jako dawców jąder komórki zróżnicowane, określony został mianem klonowania somatycznego. W rok po ogłoszeniu narodzin Dolly, zespół Yanagimachiego z Uniwersytetu w Honolulu doniósł o uzyskaniu kilkudziesięciu myszy po transplantacji do oocytów jąder pochodzących z komórek pęcherzykowych [9]. W ciągu następnych dwóch lat pojawiło się wiele prac donoszących o pomyślnym sklonowaniu dorosłych osobników myszy, bydła i świni przy wykorzystaniu jąder pochodzących z komórek różnych rodzajów tkanek (tab.). Intensywne badania nad klonowaniem somatycznym, prowadzone w wielu laboratoriach na świecie, doprowadziły jednak do opracowania innego modelu doświadczalnego niż wspomniany już model zaproponowany przez zespół Wilmuta i Campbella. Okazało się, że w klonowaniu somatycznym znacznie lepsze efekty przynosi wprowadzanie jąder komórkowych do nieaktywowanych oocytów, a więc charakteryzujących się wysokim poziomem MPF. W oocytach takich dochodzi do zaniku otoczki jądrowej wprowadzonych jąder, a następnie do kondensacji ich chromatyny. Aktywację oocytów przeprowadza się w kilka godzin po transferze jądra (określa się to mianem postaktywacji), w wyniku czego „naga" chromatyna (czyli DNA i białka jądrowe) wystawiona jest przez kilka godzin na działanie czynników cytoplazmatycznych operujących w nieaktywowanym oocycie. Istotne jest również to, że ten schemat doświadczenia nie wymaga uprzedniego „głodzenia" komórek, co znacznie skraca i upraszcza całą procedurę. Należy także zwrócić uwagę, że w przeciwieństwie do powszechnie stosowanej w klonowaniu zarodkowym ssaków metody preaktywacji oocytów (uniwersalni biorcy), w klonowaniu somatycznym znacznie lepsze efekty przynosi zastosowanie wspomnianej metody postaktywacji oocytów. Postaktywacja oocytów w odniesieniu do jąder komórek zarodkowych przynosi zdecydowanie negatywne efekty. Nie wiemy jednak, do tej pory, co jest powodem tak odmiennej reakcji jąder komórek zarodkowych i komórek somatycznych na czynniki środowiska cytoplazmatycznego oocytu.

Ze zrozumiałych względów praktycznych najwięcej badań nad klonowaniem somatycznym przeprowadzanych jest u bydła. Obecne możliwości klonowania osobników dorosłych u tego gatunku przedstawione są w tabeli, a także poglądowo na rysunku 1. Należy jednak zwrócić uwagę, że w wielu przypadkach (podobnie zresztą jak w przypadku Dolly, czy myszy uzyskanych po transferze jąder komórek końca ogona) fenotyp bydlęcych komórek somatycznych użytych jako dawców jąder, jest trudny do zdefiniowania. Komórkami o określonym fenotypie były jedynie komórki pęcherzykowe, komórki nabłonka jajowodu oraz leukocyty. W pozostałych natomiast przypadkach przypuszczać można, że dawcami jąder były fibroblasty – kiedy źródłem komórek były fragmenty tkanki pobranej z ucha lub skóry, czy też fibroblasty, fibrocyty lub

satelitowe komórki mięśniowe – kiedy fragmenty tkanki pochodziły z mięśni.

U bydła i u myszy uzyskano już somatyczne klony obojga płci. Liczebność tych klonów jest różna. U myszy sięga ona nawet kilkudziesięciu osobników, natomiast u bydła jest znacznie mniejsza i nie przekracza na ogół kilku cieląt. Najliczniejsze, jak do tej pory, somatyczne klony bydlęce uzyskali w 1998 r. Kato i wsp. w Japonii [4] oraz w 1999 r. Wells i wsp. w Nowej Zelandii [11]. Kato uzyskała 8 cieląt po przeniesieniu do 5 biorczyń 10 blastocyst powstałych w wyniku wprowadzenia do enukleowanych oocytów jąder komórek pęcherzykowych (6 blastocyst) i jąder komórek nabłonka jajowodu (4 blastocysty). Urodzone cielęta stanowiły klon, ponieważ wszystkie komórki – dawcy jąder (chociaż o różnym fenotypie) pochodziły od jednego zwierzęcia (samicy). Klon uzyskany przez Wellsa i wsp. liczył 10 cieląt i powstał w wyniku transplantacji jąder komórek pęcherzykowych warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego. Klon ten jest, jak dotąd, najliczniejszym klonem somatycznym uzyskanym u bydła. Wyjątkowo interesującym osiągnięciem, obrazującym możliwości klonownia somatycznego, było otrzymnie przez Galliego i wsp. [3] buhaja po wprowadzeniu do enukleowanego oocytu jądra leukocytu krwi obwodowej.

Jak już wcześniej wspomniano, tylko klonowanie somatyczne może umożliwić – przynajmniej teoretycznie – rzeczywiste zwiększenie liczebności wartościowych genotypów. Rodzi się więc pytanie: czy i w jaki sposób spektakularne osiągnięcia w dziedzinie somatycznego klonowania ssaków mogą być wykorzystane w praktyce hodowlanej zwierząt gospodarskich. W chwili obecnej, naszym zdaniem, odpowiedź jest prosta: zastosowanie somatycznego klonowania w hodowli zwierząt gospodarskich przez długi czas pozostanie w sferze fantazji, głównie ze względów ekonomicznych, a także biologicznych. Składa się na to kilka przyczyn. Przede wszystkim jest to procedura niezmiernie droga; uzyskanie owcy Dolly kosztowało ponad 750 tysięcy dolarów. Wprawdzie koszty te uległy obecnie pewnemu obniżeniu, tym niemniej są one nadal bardzo wysokie, zwłaszcza w odniesieniu do bydła. Wynikają one z konieczności stosowania bardzo skomplikowanej i kosztownej aparatury, konieczności przeprowadzania zabiegów przez wysoko kwalifikowanych specjalistów oraz, co najważniejsze, z bardzo niskiej wydajności klonowania somatycznego. Obecnie nie przekracza ona 2%, co wiąże się z koniecznością użycia i utrzymania stosunkowo dużej liczby zwierząt. Poza tym klonowanie somatyczne jest nadal – z biologicznego punktu widzenia – wielką niewiadomą. Około połowa cieląt urodzonych w Japonii padła w czasie porodu lub wkrótce po urodzeniu. Jedną z przyczyn była niewątpliwie ich nadmierna (czasami nawet dwukrotnie większa niż normalna) masa urodzeniowa. Anomalia ta, określana jako large calf syndrome, powoduje ciężkie porody. Nie może to być jednak jedyna przyczyna zwiększonej śmiertelności cieląt, gdyż padały również cielęta o normalnej lub nawet nieco niższej masie ciała. Rozwój sklonowanych zwierząt związany jest często z nadmiernym rozwojem łożyska, a u urodzonych zwierząt występują, w wielu przypadkach, zaburzenia w funkcjonowaniu układu oddechowego i układu krążenia. Zagadnienia te omówione są szerzej w innych pracach opublikowanych ostatnio przez autorów tego artykułu [6, 7].

Z somatycznym klonowaniem ssaków wiążą się wątpliwości dotyczące rzeczywistego wieku sklonowanego zwierzęcia w momencie narodzin. Wiadomo bowiem, że wraz z liczbą przebytych przez komórki cykli komórkowych dochodzi do skracania się telomerów (końcowych fragmentów chromosomów stabilizujących ich strukturę w czasie replikacji DNA), co uważane jest za jeden z przejawów starzenia się zarówno komórki, jak i całego organizmu. Jeżeli zjawisko to byłoby nieodwracalne, to pochodzące od dorosłych osobników komórki dawcy jąder byłyby już wyjściowo komórkami starymi, co mogłoby wywierać niekorzystny wpływ na rozwój sklonowanego osobnika i być może ograniczać również długość jego życia. Czy tak jest w istocie, trudno w tej chwili odpowiedzieć. Analiza długości telomerów owcy Dolly wykazała, że są one znacznie krótsze niż u zwierząt kontrolnych, będących w tym samym wieku. Kiedy Dolly miała około jednego roku długość jej telomerów zbliżona była do długości telomerów jej „matki", która miała 6 lat, gdy pobrano od niej komórki gruczołu mlekowego użyte poźniej jako dawcy jąder. W momencie analizy jej telomerów Dolly miała 3 lata, a więc jej „telomerowy" wiek odpowiadałby wiekowi 9-letniej owcy. Nie wiadomo oczywiście, jak długo będzie żyła. Ponieważ jednak do chwili obecnej urodziła czworo jagniąt, to sądzić można, że jej zdolności rozrodcze nie zostały upośledzone. Z kolei, w kwietniu 2000 roku ukazała się w amerykańskim czasopiśmie naukowym „Science" praca Lanzy i wsp. [5], która problem długości telomerów u sklonowanych zwierząt stawia w zupełnie nowym świetle. Okazało się, że u bydła, po wprowadzeniu do enukleowanych oocytów jąder fibroblastów, w których chromosomach – w wyniku długotrwałej hodowli *in vitro* – doszło do niemal całkowitego zaniku telomerów, dochodzi w czasie rozwoju sklonowanych zarodków do odtworzenia normalnej (a nawet czasami ponadnormalnej) długości telomerów. Nie wiadomo, czy w grę wchodzą tu tylko różnice międzygatunkowe, czy też wpływają na to jakieś inne czynniki i mechanizmy.

Czym więc jest uzasadnione tak duże zaintresowanie somatycznym klonowaniem ssaków, a także olbrzymie nakłady, jakie przeznacza się na ten cel? Powody są przynajmniej dwa: jeden natury czysto poznawczej, drugi czysto praktycznej. Badania nad somatycznym klonowaniem dostarczyć mogą nieocenionych informacji dotyczących mechanizmów różnicowania komórkowego ssaków. Omówienie tego zagadnienia przekracza jednak ramy tego artykułu. Jeśli chodzi natomiast o aspekt praktyczny, to somatyczne klonowanie ssaków, zwłaszcza owiec, bydła czy świń, ma ogromne znaczenie dla farmacji i medycyny, szczególnie gdy dotyczyć będzie klonowania zwierząt transgenicznych produkujących w mleku lub w moczu cenne ludzkie białka terapeutyczne, takie jak: czynniki krzepliwości krwi podawane chorym na hemofilię, alfa-antytrypsynę stosowaną w leczeniu mukowiscydozy i rozedmy płuc, antytrombinę III, przeciwzakrzepowe białko stosowane w operacjach kardiologicznych, alfa-laktoalbuminę umożliwiającą uzyskanie humanizowanego mleka krowiego oraz wiele innych, wśród nich interferon, albuminę krwi, tkankowy aktywator plazminogenu czy laktoferynę. Obecnie podstawową metodą uzyskiwania transgenicznych zwierząt jest metoda iniekcji obcego (w tym również ludzkiego) genu do jednego z przedjądrzy zygoty. Jest to zabieg kosztowny i ma-

ło wydajny, jeśli chodzi o liczbę zwierząt, u których stwierdzono włączenie się (czyli integrację) wprowadzonego genu do genomu zarodka, a tym bardziej jego ekspresję (czyli efekt działania) przejawiającą się wytwarzaniem pożądanych białek przez komórki gruczołu mlekowego lub komórki nabłonka pęcherza moczowego. Miejsce integracji obcego genu do genomu zarodka jest czysto przypadkowe, co rzutuje z kolei na poziom jego ekspresji. Powoduje to, że uzyskanie nawet dwóch zwierząt transgenicznych wykazujących taki sam poziom ekspresji transgenu nie zawsze kończy się powodzeniem, a często jest wręcz niemożliwe.

Znacznie dogodniejszą metodą, w przeciwieństwie do metody iniekcji genu do przedjądrzy, jest metoda transformacji genetycznej hodowanych *in vitro* komórek somatycznych, przede wszystkim fibroblastów płodowych. Jest to metoda szybka, stosunkowo prosta i – co jest niezmiernie istotne – dotyczy ona ogromnej liczby komórek. Jądra takich genetycznie zmodyfikowanych komórek mogą być następnie wykorzystane w procesie klonowania somatycznego do produkcji transgenicznych zwierząt. Dotychczasowe badania wykazały, że w produkcji transgenicznych owiec wykorzystanie jąder zmodyfikowanych genetycznie fibroblastów płodowych jest znacznie bardziej korzystne, pod względem ekonomicznym, niż metoda iniekcji genu do przedjądrzy. Metoda klonowania somatycznego z wykorzystaniem fibroblastów płodowych, do których wprowadzone zostały ludzkie geny IX czynnika krzepliwości krwi oraz alfa-antytrypsyny (AAT), jest już z powodzeniem stosowana u owiec. We wspomnianym już Instytucie Roslin w Szkocji jest już tyle transgenicznych owiec wytwarzających w mleku AAT, że pokrywają one pełne roczne zapotrzebowanie na to białko w całej Wielkiej Brytanii.

Jak już wspomniano, uzyskanie wielu zwierząt wykazujących taki sam, wysoki poziom ekspresji transgenu w mleku jest bardzo trudne. Poza tym produkt każdego *de novo* uzyskanego zwierzęcia transgenicznego musiałby przejść długotrwałe i kosztowne badania laboratoryjne i kliniczne, zanim mógłby zostać dopuszczony do obrotu. Jedynym sposobem uniknięcia tych problemów jest somatyczne klonowanie dorosłych zwierząt transgenicznych produkujących opłacalne, z ekonomicznego punktu widzenia, ilości określonego białka terapeutycznego, które przeszło już wszystkie wymagane testy kliniczne. Wynika to z faktu, że metoda klonowania somatycznego takich zwierząt – jako jedyna – zapewnić może jednorodność uzyskiwanego i podawanego chorym leku. Schemat powiązania transgenezy i klonowania somatycznego przedstawiono na rysunku 2.

Rozważane jest także klonowanie somatyczne genetycznie modyfikowanych ssaków, przede wszystkim świń, które mogłyby być wykorzystane jako dawcy narządów do przeszczepów dla ludzi, jak również do wytwarzania ludzkiej hemoglobiny do przetaczań krwi. Świnie takie miałyby zmienione komponenty układu odpornościowego, tak aby nie nastąpiła reakcja odrzucenia przeszczepu. Przed kilkoma miesiącami zespół Iana Wilmuta dokonał somatycznego klonowania dorosłych świń; nie wiadomo jednak czy były to zwierzęta genetycznie zmodyfikowane.

Korzyści z somatycznego klonowania ssaków mogą być więc różnorakie oraz bardzo wymierne i nie ulega wątpliwości, że ta dziedzina biotechnologii znajdzie wkrótce szerokie zastosowanie praktyczne.

Literatura: 1. Campbell K.H.S., Ritchie W.A., Wilmut I.: Biol. Reprod. 49, 993-942, 1993; **2. Campbell K.H.S., McWhir J., Ritchie W.A., Wilmut I.**: Nature 380, 64-66, 1996; **3. Galli C., Duchi R., Moor R.M., Lazarii G.**: Cloning 1, 170-191, 1999; **4. Kato Y., Tani T., Sotomaru Y., Kurokawa K. i wsp.**: Science 282, 2095-2098, 1998; **5. Lanza R.P., Cibell J.B., Blackwell C. i wsp.**: Science 288, 665-669, 2000; **6. Modliński J.A., Karasiewicz J.**: Klonowanie człowieka. Fantazje – zagrożenia – nadzieje. Tow. Naukowe KUL, 1999; **7. Modliński J.A., Karasiewicz J.**: Postępy Biologii Komórki 26, (suppl. 12), 9-16, 1999; **8. Shiga K., Fujita T., Hirose K., Sasae Y., Nagai T.**: Theriogenology 52, 527-535, 1999; **9. Wakayama T., Perry A.C.F., Zucotti M., Johnson K.R., Yanagimachi R.**: Nature 394, 369-374, 1998; **10. Wakayama T., Yanagimachi R.**: Nature Genetics 22, 127-128, 1999; **11. Wells D.N., Misica P.A., Tervit H.R.**: Biol. Reprod. 60, 996-1005, 1999; **12. Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Campbell K.H.S.**: Nature 385, 810-813, 1997.

Selektywna produkcja zwierząt transgenicznych za pomocą genu białka zieloności jako markera

Stanisław J. Rosochacki[1,2], Rafał Olszewski[1], Jarosław Połoszynowicz[2]

[1]IGiHZ PAN w Jastrzębcu, [2]Politechnika Białostocka

Niska wydajność produkcji zwierząt transgenicznych metodą mikroiniekcji jest bardzo ważnym problemem w procesie otrzymywania zwierząt gospodarskich. Wiele prac badawczych dotyczy opracowania mniej kosztownych metod uzyskiwania zwierząt transgenicznych. Badania te odnoszą się głównie do preselekcji zarodków wykazujących integrację w stadium przed ich transferem do biorczyń. Pozwoli to na znaczne obniżenie liczby wymaganych biorczyń, a co za tym idzie, także kosztów związanych z transgenezą. Badania wykazują, że koszty produkcji zwierząt transgenicznych, szczególnie cieląt, mogą być znacznie obniżone poprzez stwierdzenie transgenezy (integracji genu) we wczesnych stadiach rozwoju zarodków (np. we wczesnych blastocystach), co umożliwia użycie znacznie mniejszej liczby biorczyń, które urodzą transgeniczne zwierzęta. Przez pierwsze lata badań nad transgenezą stwierdzenie procesu integracji genu prowadzono dopiero w tkankach bądź krwi nowourodzonych osobników. Do tego celu służyły takie metody jak: dot-blot, reakcja polimeryzacji łańcuchowej (PCR) lub metoda Souther-blot. Główną metodą wykrywania transgenezy pozostaje wykrycie transgenu za pomocą metody Southern-blot, po uprzedniej ekstrakcji DNA