



## Wykorzystanie nowych kierunków badań w klonowaniu somatycznym świń

Maria Skrzyszowska, Marcin Samiec

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

### The use of new strategies in the studies on somatic cell cloning in pigs

#### Summary

Somatic cell nuclear transfer (SCNT) technique in pigs remains relatively low (2% to 5% of produced piglets), that is why further efforts have to be made to optimize both a multi-step cloning procedure and to improve a structural-functional quality of recipient oocytes and nuclear donor cells. Pre- and postimplantation developmental potential of porcine SCNT-derived embryos depends to a high degree on not only coordination of mitotic cycle stage with phenotype of nuclear donor cell, but also proper combination of the methods of maternal chromosome elimination (enucleation), oocyte reconstruction techniques, the systems of artificial activation of generated nuclear-cytoplasmic hybrids (clonal cybrids) and *in vitro* culture of reconstructed embryos. Generally, it can result in increasing the competences of both somatic nuclear and mitochondrial genome for epigenetic remodeling/reprogramming in developing cloned embryos.

#### Key words:

pig, somatic cell cloning, nuclear-cytoplasmic maturity, recipient oocyte, enucleation, reconstruction, activation, *in vitro* culture.

#### Adres do korespondencji

Maria Skrzyszowska,  
Dział Biotechnologii  
Rozrodu Zwierząt,  
Instytut Zootechniki,  
32-083 Balice k. Krakowa;  
e-mail:  
mskrzysz@izoo.krakow.pl

### 1. Wstęp

Na obecnym etapie badań, techniczne możliwości klonowania somatycznego świń i innych gatunków ssaków wyprzedzają znacznie zrozumienie biologicznych uwarunkowań, a w szczególności molekularnych aspektów tej technologii.

Rozwój badań nad klonowaniem somatycznym świń, inspirowany jest możliwościami praktycznego wykorzystania tej techniki do produkcji transgenicznych loch i knurów, a także do multiplikacji istniejących już transgenicznych osobników. Doniesienia o wykorzystaniu techniki transplantacji jąder transfekowanych *in vitro* komórek somatycznych do uzyskania transgenicznych świń, z potwierdzoną molekularnie oraz fenotypowo ekspresją genu białka intensywnej zieleni fluorescencyjnej (1,2), ale przede wszystkim wyprodukowanie sklonowanych prosiąt z hodowanych *in vitro* fibroblastów skóry zmodyfikowanych genetycznie płodów lub dojrzałych osobników z ksenogenicznymi epitopami zablokowanymi pod wpływem ekspresji genu H-transferazy (3,4), świadczą o możliwościach wykorzystania transformowanych genetycznie organów sklonowanych świń w ksenotransplantologii. Ze względu na porównywalną wielkość i wydolność fizjologiczną narządów świni i człowieka, obiecująco rysuje się możliwość przeszczepiania ksenotransplantów, pochodzących od zmodyfikowanych genetycznie świń, jako alternatywnego źródła organów w stosunku do przeszczepów allogenicznych, których dostępność, z powodu ograniczonej liczby dawców, jest wciąż niewystarczająca do potrzeb występujących w tym zakresie (3).

Niska wydajność technologii klonowania somatycznego świń (2-5%) wymusza potrzebę podejmowania działań zmierzających nie tylko do poprawy skuteczności techniki transplantacji jąder komórkowych u tego gatunku, lecz także do rozpoznania możliwych konsekwencji jej zastosowania. Zbliżenie się do tego celu możliwe będzie zarówno poprzez optymalizację poszczególnych etapów samej procedury klonowania, jak i poprawę kondycji strukturalno-funkcjonalnej oocytów-biorców oraz komórek somatycznych, dawców jąder (5,6), co z kolei może mieć wpływ na wzrost ich kompetencji do epigenetycznego przeprogramowania/przemodelowania genomu jądrowego i mitochondrialnego w przedimplantacyjnych zarodkach klonalnych.

## **2. Dojrzałość jądro-cytoplazmatyczna oocytów-biorców jąder somatycznych**

Wyniki badań przeprowadzonych nad klonowaniem somatycznym świń potwierdzają, że stosunkowo wysoki potencjał rozwojowy zarodków klonalnych jest możliwy do osiągnięcia między innymi w wyniku wykorzystania w procedurze transplantacji jąder komórkowych oocytów-biorców, wykazujących pełną synchronizację między dojrzałością jądrową, epigenomową a cytoplazmatyczną (5,6). Ten optymalny wzorzec dojrzałości jądro-cytoplazmatycznej jest obserwowany w oocytach powulacyjnych, które osiągnęły swoją kompetencję mejotyczną w pęcherzykach jajnikowych loch lub loszek-dawczyń. Jednakże ze względów ekonomicznych, wynikających z wysokich kosztów zarówno stymulacji hormonalnej zwierząt w celu indukcji superowulacji, jak i utrzymania zwierząt, częściej wykorzystywanym źródłem



komórek-biorców są oocyty pozyskiwane do dojrzewania *in vitro* z jajników loch i loszek rzeźnych. Jest to szczególnie atrakcyjne źródło oocytów w kontekście szerokiej dostępności tego materiału biologicznego na potrzeby embriologii eksperymentalnej. Stosowane dotychczas powszechnie metody pozaustrojowej hodowli niedojrzałych oocytów świni, oparte na zdefiniowanych chemicznie pożywkach, uzupełnionych liofilizowanymi dodatkami hormonalnymi (gonatotropiną kosmówkową żrebnych klaczy/eCG oraz ludzką gonatotropiną kosmówkową/hCG lub ludzką gonatotropiną menopauzalną/hMG), aminokwasami egzogennymi (cysteiną, cystyną lub L-glutaminą), świńskim płynem pęcherzykowym, oraz rekombinowanymi ludzkimi czynnikami wzrostowymi (np. epidermalnym czynnikiem wzrostowym/EGF, czynnikiem przeciwbiałaczkowym/LIF lub transformującym czynnikiem wzrostowym  $\alpha$ TGF- $\alpha$ ) nie pozwalają jednak na uzyskiwanie satysfakcjonującego odsetka komórek-biorców, wykazujących pełną (skoordynowaną) dojrzałość jądro-cytoplazmatyczną, która z kolei warunkuje ich prawidłową kondycję strukturalno-funkcjonalną. Zdecydowaną poprawę efektywności dojrzewania mejotycznego *in vitro* osiągnięto dopiero po zastosowaniu sekwencyjnych (dwustopniowych) systemów hodowli oocytów. Pierwszy etap hodowli *in vitro* obejmuje inkubację oocytów w pożywce uzupełnionej egzogennymi hormonami oraz odpowiednimi czynnikami odwracalnie blokującymi cykl mejotyczny: 1) inhibitorami procesu rozpadu otoczki jądrowej pęcherzyka zarodkowego (GVBD, ang. *germinal vesicle break-down*) np. cyklicznym dibutyryloadenozynomonofosforanem (dwumaślanem cAMP/db-cAMP) lub 2) specyficznymi inhibitorami kompetycyjnymi kinaz cyklicznych (m.in. serynowo-treoninowej kinazy białkowej p34<sup>cdc2</sup>) np. roskowityną lub butyrylolaktonem I. Procedura ta pozwala na zwiększenie stopnia synchronizacji cyklu mejotycznego oocytów w stadium diktiotenu profazy podziału redukcyjnego, czyli w stadium pęcherzyka zarodkowego (GV, ang. *germinal vesicle*). Z kolei, w drugim etapie inkubacji oocytów z pożywki hodowlanej eliminowane są dodatki hormonalne oraz blokery cyklu mejotycznego. Umożliwia to z jednej strony lepszą koordynację w nabywaniu kompetencji mejotycznej przez oocyty, czyli zdolności oocytów do wznowienia i ukończenia mejozy, a z drugiej – zmniejszenie stopnia asynchronii między dojrzałością jądrową, epigenomową i cytoplazmatyczną oocytów w stadium metafazy II podziału mejotycznego (ekwacyjnego/wyrównawczego).

### 3. Koordynacja stadium cyklu mitotycznego z fenotypem komórki-dawcy jądra

Z przeprowadzonych dotychczas eksperymentów nad klonowaniem świń wynika, że źródłem komórek somatycznych, najbardziej podatnych na epigenetyczne przeprogramowanie genomu jądrowego i mitochondrialnego w zrekonstruowanych zarodkach, są fibroblasty płodowe, a także fibroblasty tkanki skórnej dorosłych osobników, których cykl mitotyczny został zsynchronizowany *in vitro* w sta-



dium G1/G0 w wyniku głodzenia (deprywacji troficzej) lub hodowli do stanu pełnej konfluencji (inhibicji kontaktowej migracji i proliferacyjnego wzrostu komórek; [1,2,5-7]). Jednakże, ostatnio w badaniach nad klonowaniem somatycznym świń pojawiła się tendencja do wykorzystywania innych źródeł komórek-dawców jąder, takich jak np. komórki tkanki mięśniowej gładkiej serca (kardiomiocyty; [8]) czy komórki nerek (9). Ponadto proponuje się alternatywny system synchronizacji faz cyklu podziałowego hodowanych *in vitro* komórek somatycznych w stadium G2/M, w wyniku kilkugodzinnej inkubacji komórek w pożywce z dodatkiem odpowiedniego inhibitora mikrotubuli wrzeczona kariokinetycznego (kolchicyny, kolcemidu lub nokodazolu; [10,11]).

#### 4. Optymalizacja procedury klonowania somatycznego

Pre- i postimplantacyjny potencjał rozwojowy zarodków świni rekonstruowanych z jąder komórek somatycznych zależy w dużym stopniu nie tylko od koordynacji stadium cyklu mitotycznego z fenotypem komórki-dawcy jądra, lecz także od odpowiedniego zestawienia metod eliminacji chromosomów matecznych (enukleacji), technik rekonstrukcji oocytów (transplantacji jąder komórkowych), systemów sztucznej aktywacji uzyskanych hybryd jądrowo-cytoplazmatycznych (cybryd klonalnych) oraz hodowli *in vitro* zarodków klonalnych (8,12,13).

Poszukiwane są nowe rozwiązania, które mogą przyczynić się do technicznych usprawnień, powodujących obniżenie czasochłonności zabiegu klonowania, a tym samym do zachowania odpowiednich reżimów czasowych między poszczególnymi etapami procedury klonowania somatycznego. Ten kierunek optymalizacji badań może zatem prowadzić do obniżenia stopnia inwazyjności stosowanych powszechnie procedur enukleacji, rekonstrukcji oraz sztucznej aktywacji oocytów. Jest to niezwykle istotne, biorąc pod uwagę cytofizjologiczne i biofizyczne ograniczenia możliwości adaptacyjnych cybrydowych zygot klonalnych, powstałych w wyniku hybrydyzacji (wymieszania) mikrośrodków cytoplazmatycznych komórek pochodzących z dwóch różnych linii rozwojowych: gametogenicznej (germinalnej) oraz somatycznej.

##### 4.1. Eliminacja chromosomów matecznych (enukleacja oocytów)

W badaniach nad klonowaniem świń coraz częściej proponuje się wykorzystanie enukleacji mikrochirurgicznej wspomaganą chemicznie (z wykorzystaniem kombinacji demekolcyny lub nokodazolu oraz sacharozy) lub dwustopniowej enukleacji chemicznej (z wykorzystaniem kombinacji jonomycyny i demekolcyny) jako alternatywnych metod eliminacji chromosomów matecznych (8,9,14,15), szczególnie z powodu niewielkiego stopnia inwazyjności w ultrastrukturę cytoplazmy oocytu. Daje to możliwość uniknięcia niebezpieczeństwa wynikającego z usunięcia nadmiernej



ilości specyficznych czynników ooplazmatycznych regulujących przebieg cyklu mejotycznego oraz przejście z mejotycznej do mitotycznej kontroli cyklu komórkowego w rekonstruowanych zarodkach. Niedobór tych czynników w cytoplazmie blastomerów może bowiem wywołać poważne konsekwencje w postaci braku strukturalnego przemodelowania chromatyny i epigenetycznego przeprogramowania genomu jądrowej komórki somatycznej, a tym samym ograniczenia zdolności rozwojowych przedimplantacyjnych zarodków klonalnych.

#### 4.2. Rekonstrukcja enukleowanych oocytów

Połączenie środowisk cytoplazmatycznych dwóch komórek znajdujących się w różnych stadiach cyklu podziałowego powoduje zakłócenie mechanizmów kontrolujących przebieg cyklu i możliwość pojawienia się nieprawidłowości w dalszym rozwoju cybrydowej zygoty klonalnej. Jednakże, właściwy dobór stanów cytofizjologicznych karioplastów i cytoplastów w momencie rekonstrukcji zarodków poprzez hybrydyzację somatycznych komórek-dawców jąder w fazie G0/G1 (o uśpionej aktywności proliferacyjnej i spowolnionym metabolizmie aparatu jądrowego, przez regulowane zewnątrzkomórkowo epigenetyczne modyfikacje DNA, prowadzące do niemal całkowitej supresji transkrypcyjnej materiału genetycznego) oraz oocytów-biorców jąder, których cykl mejotyczny został również zablokowany na skutek osiągnięcia dojrzałości cytoplazmatycznej i jądrowej, przyczynia się z pewnością do obniżenia niestabilności genomu, zredukowania stopnia asynchronii w interakcjach jądrowo-cytoplazmatycznych i prawidłowej rearanżacji egzogennej chromatyny jądrowej.

Rekonstrukcja oocytów poprzez zastąpienie ich własnego materiału genetycznego DNA jądrowej komórki somatycznej jest, obok enukleacji, najbardziej istotnym etapem techniki klonowania somatycznego świń. Mikrochirurgiczny transfer karioplastów lub całych komórek somatycznych jest alternatywną metodą rekonstrukcji klonalnych hybryd jądrowo-cytoplazmatycznych w stosunku do powszechnie stosowanej fuzji komórek indukowanej w polu elektrycznym. Technika rekonstrukcji oocytów może w dużym stopniu wpływać na molekularne mechanizmy rearanżacji chromatyny jądrowej, obejmujące zarówno strukturalne przemodelowanie jak i epigenetyczne przeprogramowanie somatycznego materiału genetycznego. Ponadto, system doooplazmatycznej iniekcji karioplastów lub całych komórek somatycznych w fazach G0/G1 lub G2/M cyklu podziałowego może przyczynić się do wzrostu wydajności techniki klonowania somatycznego świń, a także innych gatunków ssaków (7,15-17). Zupełnie innym podejściem do tego zagadnienia jest mikroiniekcja samych tylko chromosomów metafazowych komórki-dawcy, zamiast całej komórki somatycznej lub całego jądra komórki somatycznej (z nienaruszoną integralnością otoczki jądrowej) do cytoplazmy enukleowanego oocytu. Strategia ta, zastosowana po raz pierwszy w klonowaniu somatycznym świń przez Lai i wsp. (10), powinna za-



pobiec transferowi przeważającej większości specyficznych czynników komórki-dawcy (cytozolowych i nukleoplazmatycznych), co może mieć wpływ na prawidłowe przemodelowanie i przeprogramowanie jądra w nowym środowisku komórki-biorcy. W przeciwieństwie bowiem do mikroiniekcji kompletnych jąder interfazowych, w wyniku transferu samych płytek metafazowych, powstałe w aktywowanych oocytach, w procesie przemodelowania, rzekome przedjądra kumulowałyby w macierzy (matriks) jądrowej wyłącznie endogenne białka ooplazmatyczne w formie związanej z chromatyną. Przeprogramowanie genomu dawcy w wyniku pełnej synchronizacji faz cyklu komórkowego karioplastów i cytoplastów mogłoby przebiegać wówczas bez żadnych zaburzeń. Technika bezpośredniej mikroiniekcji chromosomów metafazowych ostatecznie pozwala na całkowite wyeliminowanie negatywnych skutków oddziaływania na wprowadzony materiał genetyczny nadmiaru czynników cytoplazmatycznych pochodzenia egzogenne, zakłócających wymianę i współdziałanie między czynnikami jądrowymi, a wewnętrznymi związkami ooplazmatycznymi, głównie z grupy białek enzymatycznych należących do rodziny kinaz cyklino-zależnych (CDKs, *cyclin-dependent protein kinases*) i fosfataz. Kolejną zaletą metody mikroiniekcji jest zatem zapobieganie naruszeniu specyficznej dynamicznej równowagi całej kaskady procesów katalizowanych przez różne enzymy regulujące przebieg cyklu komórkowego, a także umożliwienie prawidłowego funkcjonowania rozmaitych białek regulatorowych (z grupy stymulatorów i/lub inhibitorów) w rekonstruowanych zygotach. Transplantacja jąder interfazowych lub płytek metafazowych ma jeszcze jedną zasadniczą przewagę nad techniką elektrofuzji komórek. Pozwala bowiem uniknąć szkodliwego wpływu nadmiaru czynników, często o antagonistycznym działaniu, i niedoboru substancji reagujących synergistycznie, w następstwie połączenia i wymieszania (hybrydyzacji) dwóch różnych środowisk cytoplazmatycznych komórki-dawcy i ooplastu i powstania cybrydowej zygoty klonalnej.

#### 4.3. Odstęp czasowy między rekonstrukcją a aktywacją oocytów

Podczas gdy w klonowaniu somatycznym bydła i małych przeżuwaczy (owca, koza) preferowany jest zazwyczaj 3-6-godzinny (18-24) lub nawet dłuższy 6-10-godzinny (25,26) okres preinkubacji zygot klonalnych w pożywce pozbawionej jonów  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$ , lub w pożywce o niskiej sile jonowej, w celu właściwego przygotowania chromatyny jądrowej do postaktywacyjnych przemian jakościowych i ilościowych w jej konformacji przestrzennej, u świń zaleca się wręcz skrócenie tego czasu do 3-4 godzin (7,16,27-29), a nawet 1-2 godzin (7,8,10,30,31). Takie przedziały czasowe między momentem fuzji/mikroiniekcji a momentem aktywacji uważa się u tego gatunku za wystarczające dla właściwych interakcji jądrowo-cytoplazmatycznych w rekonstruowanych oocytach. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez Koo i wsp. (32) jednoznacznie wskazują na wyższe kompetencje rozwojowe do stadium blastocysty oraz wyższą jakość morfologiczną zarodków elektroaktywowanych



2 godziny po fuzji, w porównaniu z zarodkami poddawanyymi 4- i 6-godzinnej inkubacji przed procedurą aktywacji. Ponadto, blastocysty uzyskane z oocytów aktywowanych 2 godziny po zabiegu transplantacji jąder fibroblastów płodowych posiadały prawie dwukrotnie wyższą (ok. 30) średnią liczbę komórek, niż blastocysty pochodzące z hodowli *in vitro* zarodków aktywowanych 6 godzin po ich rekonstrukcji (ok. 16). Wydaje się, że skrócenie czasu ekspozycji wprowadzonych jąder komórkowych na czynniki cytoplazmatyczne oocytu, a tym samym przyspieszenie momentu postaktywacji rekonstruowanych oocytów świńskich związane jest z wcześniejszym (w stadium 4-blastomerowym) niż np. u owiec, kóz i bydła (w stadium 8-16 blastomerów) uruchomieniem aktywności transkrypcyjnej własnego genomu zarodkowego. Uważa się bowiem, że opóźnienie momentu postaktywacji zarodków świńskich wpływa negatywnie na cykl przemian towarzyszących epigenetycznemu prze-modelowaniu i przeprogramowaniu genomu jądrowego i mitochondrialnego komórki somatycznej podczas pierwszych trzech podziałów bruzdkowania. Opóźnienie, bądź spowolnienie kilkustopniowego procesu dynamicznych zmian konfiguracji przestrzennej i metabolizmu transferowanej chromatyny somatycznej powoduje, że ukończenie wymaganych modyfikacji epigenetycznych (demetylacji reszt cytozyny DNA oraz hiperacetytacji histonów) genomu jądrowego, jak również odpowiednich interakcji między genomem jądrowym a mitochondrialnym, przed momentem aktywacji transkrypcyjnej genomu zarodkowego staje się niemożliwe. W wyniku braku pełnej realizacji tych podstawowych dla wczesnej embriogenezy przemian somatycznego DNA genomowego, zarodki świni wchodzą w trwałe i nieodwracalny blok rozwojowy (*cleavage-block*), w warunkach hodowli *in vitro*.

W klonowaniu somatycznym świń, obecnie najczęściej stosuje się jeden z dwóch następujących układów doświadczalnych: 1) jądra komórek w fazie G1 lub G0 cyklu mitotycznego wprowadza się do enukleowanych, nieaktywowanych oocytów w stadium metafazy II (MII) i równocześnie aktywuje się uzyskane cybrydy klonalne (2,11,33) lub też 2) jądra komórek w stadium G1, G1/G0 albo G2/M wprowadza się do ooplastów MII, które aktywowane są dopiero w 30 minut do kilku godzin (maksymalnie do 3-4 godzin) po zabiegu transplantacji jąder (protokół postaktywacji [2-4,10,16,27,28,38]).

Długość okresu preinkubacji w doświadczalnym modelu postaktywowanych oocytów świńskich jest także, jak się wydaje, zależna od rodzaju zastosowanego czynnika indukującego wznowienie zablokowanego w stadium Metafazy II cyklu mejotycznego. Przed aktywacją elektryczną, cybrydy rekonstruowane z jąder komórek somatycznych są zazwyczaj inkubowane w pożywce o niskiej sile jonowej przez 1-2 godziny (8,10,30,31). Dwustopniowa aktywacja chemiczna z wykorzystaniem kombinacji związków sulfhydrylowych/disulfidowych timerosalu/ditiotreitolu wymaga jeszcze krótszego czasu trwania preinkubacji rekonstruowanych oocytów w medium wolnym od kationów  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$ , a mianowicie od 30 minut do 1 godziny, maksymalnie do 2 godzin (34-36). W przypadku stosowania procedur opartych na połączeniu standardowej aktywacji chemicznej, z użyciem jonomycyny, z odwra-



całą inhibicją cyklino-zależnych kinaz białkowych za pomocą analogu puromycyny – 6-dimetyloaminopuryny (6-DMAP), okres ekspozycji transferowanego jądra somatycznego na działanie czynników cytozolowych oocyty jest najczęściej nieznacznie wydłużony do 3-4 godzin (2,27,28). Tak opracowane protokoły eksperymentalne odstępów czasowych między etapem rekonstrukcji zygot świńskich a ich aktywacją ułatwiają pełne przemodelowanie chromatyny jądrowej i przeprogramowanie DNA genomowego komórek somatycznych, jednak nie są to systemy uniwersalne i mogą podlegać pewnym modyfikacjom.

#### 4.4. Sztuczna aktywacja rekonstruowanych oocytów

Kolejnym czynnikiem decydującym w dużym stopniu o kompetencjach rozwojowych zarodków klonalnych świń jest sztuczna aktywacja rekonstruowanych oocytów. Molekularny mechanizm stosowanych dotychczas metod aktywacji wciąż odbiega od fizjologicznego wzorca przyrostu wewnątrzkomórkowej koncentracji kationów wapnia  $[Ca^{2+}]_i$ , inicjowanego penetracją oocyty przez plemnik w procesie zapłodnienia. Z kolei, brak skutecznych systemów aktywacji oocytów w klonowaniu somatycznym świń może znacznie ograniczać potencjał rozwojowy rekonstruowanych zarodków, dlatego też stał się bodźcem do poszukiwania nowych, alternatywnych układów doświadczalnych, których istotą jest wykorzystanie całkowicie odmiennych źródeł czynników aktywujących lub modyfikacja parametrów fizykochemicznych procedur stosowanych u innych gatunków zwierząt gospodarskich i laboratoryjnych. Przyrost stężenia wolnych jonów wapnia w ooplazmie jest podstawowym elementem mechanizmu transdukcji sygnału stymulującego dojrzały oocyt świń do uruchomienia własnego programu rozwojowego i wyjścia z bloku metafazowego II podziału mejotycznego. Mobilizacja wewnątrzkomórkowych rezerwuarów wapniowych (w retikulum endoplazmatycznym gładkim) oocytów świń generuje serię powtarzalnych wyrzutów  $Ca^{2+}$ , które przyjmują charakter szybkich, krótkotrwałych oscylacji o niskiej częstotliwości. Pulsacyjny sposób uwalniania jonów wapnia z depozytów wewnątrzkomórkowych jest konieczny, dlatego że podwyższony poziom  $Ca^{2+}$ , utrzymujący się w cytoplazmie przez dłuższy czas, jest dla oocyty toksyczny. Ogromna nadwrażliwość zrekonstruowanych oocytów świń na gwałtowne zmiany metaboliczne w gospodarce wapniowej jest przyczyną niskiej tolerancji zygot klonalnych na wszelkie odchylenia od opisanego fizjologicznego schematu oscylacji kationów  $Ca^{2+}$ . Dlatego też w klonowaniu somatycznym świń zaleca się stosowanie tylko takich procedur sztucznej aktywacji, które spełniałyby warunki wymagane do prawidłowego uruchomienia programu rozwojowego rekonstruowanych zarodków. Celem takich systemów stymulacji rekonstruowanych oocytów do dalszego rozwoju jest uniknięcie wszelkich zakłóceń dynamicznej homeostazy w cytozolowej koncentracji jonów  $Ca^{2+}$ , wynikających zarówno z aplikacji zbyt słabych sygnałów aktywujących jak i sygnałów o zbyt wysokim stopniu inwazyjności para-



metrów fizykochemicznych, wielokrotnie przekraczającym możliwości adaptacyjne zygot klonalnych. W wyniku licznych prób sztucznego generowania oscylacyjnych wyrzutów wapnia doprowadzających do przejściowego wzrostu wewnątrzkomórkowej koncentracji wolnych jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w rekonstruowanych oocytach świni, przetestowano wiele różnorodnych bodźców fizykochemicznych, które były zdolne w mniejszym lub większym stopniu do aktywacji programu rozwojowego cybrydowych zygot klonalnych. W technologii klonowania somatycznego świń najczęściej stosowanymi bodźcami aktywującymi są czynniki fizyczne, takie jak impulsy prądu stałego (16,31,37), albo czynniki chemiczne, takie jak jonomycyna (2,8,12,28,38,39) lub timerosal w kombinacji z ditiotreitolom (34-36). Prowadzone obecnie intensywne badania nad udoskonaleniem metod sztucznej aktywacji zygot klonalnych świni polegają głównie na optymalizacji parametrów technicznych pola elektrycznego (natężenie, czas trwania impulsów, liczba impulsów i odstęp czasowy między nimi) lub też, coraz częściej, na łączeniu bodźca aktywującego (najczęściej jonomycyny, jonoforu wapnia A23187 lub impulsów prądu stałego) ze związkami odwracalnie blokującymi aktywność cyklino-zależnych kinaz białkowych (niespecyficznymi lub specyficznymi inhibitorami kompetycyjnymi CDKs), takimi jak 6-dimetyloaminopuryna (6-DMAP [2,8,12,27,28,39]), butyrylolakton I (8), czy związkami hamującymi translację, np. cykloheksymidem (8,38,40,41). Pomimo różnic w molekularnym mechanizmie przyrostu wewnątrzkomórkowej koncentracji jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w zygotach klonalnych świni, niemal każdy ze sztucznych aktywatorów indukuje tylko pojedynczą falę oscylacji kationów wapnia, zamiast powtarzalnych serii pulsacyjnych wyrzutów  $\text{Ca}^{2+}$  generowanych podczas zapłodnienia. Dlatego też zaskakujący może wydawać się fakt, że krótkotrwały (przejściowy) wylew jonów wapnia z endogennych rezerwuarów cybryd klonalnych inicjowany przez stymulację różnych ścieżek (czynników) tego samego szlaku transdukcji sygnałów wewnątrzkomórkowych (systemu wtórnego przekazywania wewnątrzkomórkowego) w przypadku stosowania przeważającej większości bodźców aktywujących okazuje się wystarczający do uruchomienia pełnego programu rozwojowego rekonstruowanych zarodków, kończącego się uzyskaniem potomstwa. Ponadto w przypadku ekspozycji cytoplazmatycznych hybryd klonalnych na działanie egzogennych czynników stymulujących, które wywołują pojedynczy (przejściowy) wyrzut wewnątrzocytarnych jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , zaobserwowano pewną tendencję wzrostową w skuteczności aktywacji wśród starzejących się oocytów w stosunku do świeżo dojrzałych oocytów. W związku z tym obecnie prowadzone są próby nad wydłużaniem okresu, w którym zachodzą oscylacje wewnątrzkomórkowego stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  w zygotach klonalnych. Takie protokoły aktywacyjne mogłyby znaleźć powszechne zastosowanie w klonowaniu somatycznym świń z wykorzystaniem szybko dojrzewających *in vitro* oocytów-biorków jąder. Ostatnio, badania nad aktywacją cybryd klonalnych świń koncentrują się raczej na sprzężeniu procedur indukujących wielokrotną mobilizację wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych z systemami długotrwałej (kilkugodzinnej) supresji aktywności kinaz białkowych z rodziny CDK (kinazy  $\text{p34}^{\text{cdc}2}$ , stanowiącej podjednostkę



katalityczną czynnika dojrzewania mejotycznego oraz kinazy białkowej aktywowanej mitogenami – MPF/MAPK, ang. *maturation/meiosis promoting factor/mitogen-activated protein kinase*). Podstawowym warunkiem praktycznej aplikacji wielu metod sztucznej aktywacji rekonstruowanych oocytów świni musi być otrzymanie zadowalającej efektywności, co wymaga prowadzenia dalszych, szczegółowych badań nad poznaniem molekularnych mechanizmów przekazywania sygnałów jonowych dostarczanych cybrydowym zygotom klonalnym wraz ze wzrostem stężenia wapnia w ich cytozolu. W tym celu konieczne jest prowadzenie intensywnych badań nad opracowaniem takich systemów sztucznej aktywacji zygot klonalnych, których mechanizm oddziaływania naśladowałby niemal całkowicie lub przynajmniej w przeważającej części fizjologiczny wzorzec przyrostu wewnątrzkomórkowej koncentracji kationów wapnia  $[Ca^{2+}]_i$ , obserwowany podczas zapłodnienia monospermicznego oocytów świni (8,14,28).

## **5. Ocena jakości strukturalno-funkcjonalnej komórek-dawców jąder oraz zarodków klonalnych na bazie metod detekcji symptomów wczesnej apoptozy**

Wydajność technologii klonowania somatycznego uwarunkowana jest wieloma czynnikami. Jednym z niezwykle istotnych czynników jest strukturalno-funkcjonalna jakość komórek-dawców jąder. Stosowane powszechnie metody sztucznej synchronizacji cyklu mitotycznego hodowanych *in vitro* komórek somatycznych w stadium G1/G0, takie jak deprywacja troficzna/głodzenie komórek, czy inhibicja kontaktowa migracji i proliferacyjnego wzrostu komórek w warunkach pełnej konfluencji, mogą być czynnikami indukującymi wewnątrzkomórkowe zmiany apoptotyczne, a tym samym limitującymi kompetencje ich jąder do pokierowania rozwojem rekonstruowanych zarodków. Kryteria morfologiczne stosowane dotąd powszechnie do oceny jakościowej komórek somatycznych, mogą być jednak niewystarczające na potrzeby klonowania. Zmiany biochemiczne będące jednym z najwcześniejszych przejawów transdukcji sygnałów śmierci fizjologicznej (apoptozy) mogą bowiem nie znajdować odzwierciedlenia w wyglądzie morfologicznym komórki. W związku z tym w Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki w Balicach podjęto badania w kierunku detekcji symptomów molekularnych, towarzyszących wczesnym fazom apoptozy w komórkach somatycznych, a wykorzystywanych jako źródło dawców jąder w procedurze klonowania. Selekcja komórek somatycznych jest prowadzona na bazie przyżyciowej (fluorescencyjnej) oceny, w kierunku rozpoznania zmian wczesnoapoptotycznych. W diagnostyce ultrastrukturalnych cech apoptozy stosowane są metody, nie wymagające utrwalania/lizy komórek, z użyciem dwóch markerów testowych. Jednym z nich jest wysoce labilny fluorochrom DNA YO-PRO-1, wykazujący zdolność do łatwej dyfuzji zarówno przez mikrokanały powstające w plazmolemie jak i tzw. megakanały w półprzepuszczalnych błonach kompartmentów



wewnątrzkomórkowych. Drugim z kolei markerem jest sprzężona z reporterowym białkiem intensywniej zieleni fluorescencyjnej (eGFP) aneksyna V, wykazująca wysokie powinowactwo do reszt fosfatydyloseryny (PS) w błonie cytoplazmatycznej komórek. Komórki somatyczne poddawane są także fluorescencyjnej diagnostyce cytometrycznej w kierunku określenia rozkładu faz cyklu mitotycznego (przy wykorzystaniu roztworu do permeabilizacji błon cytoplazmatycznych komórek, jodku propidyny i RNAzy) oraz w celu analizy cyklu mitotycznego łącznie z wykrywaniem subpopulacji komórek późnoapoptotycznych z hipodiploidalną liczbą cząsteczek DNA, tworzącej tzw. załamek sub-G1/pre-G1 na histogramie DNA (ekstrakcja niskocząsteczkowego DNA jądrowego z komórek apoptotycznych przy wykorzystaniu buforu fosforanowo-cytrynianowego o wysokiej molarności oraz inkubacja komórek z jodkiem propidyny i RNAzą). Taki kierunek badań umożliwi wykluczenie błędów związanych z nieprawidłową selekcją komórek somatycznych wykorzystywanych jako źródło dawców jąder w procedurze klonowania.

Wczesnoapoptotyczne zmiany biochemiczne komórek somatycznych mają charakter odwracalny i mogą zostać cofnięte po wprowadzeniu karioplastu do nowego mikrośrodowiska cytoplazmatycznego oocyty-biorcy, charakteryzującego się wysoką koncentracją białkowych inhibitorów apoptozy. Jednakże, zastosowanie nieodpowiednich procedur sztucznej aktywacji rekonstruowanych oocytów, których mechanizm oddziaływania znacznie odbiegałby od fizjologicznego wzorca przyrostu wewnątrzkomórkowej koncentracji jonów  $\text{Ca}^{2+}$  może spowodować kontynuację apoptotycznych przemian biochemicznych i morfologicznych w cytoplazmatycznych hybridach klonalnych, a także niewłaściwy przebieg epigenetycznych modyfikacji genomu podczas przemodelowania oraz przeprogramowania egzogennych jąder somatycznych. Wykazanie ścisłych zależności pomiędzy parametrami fizykochemicznymi pulsacyjnych wyrzutów kationów wapnia z depozytów wewnątrzkomórkowych a aktywacją określonych czynników transkrypcyjnych (np. czynników wiążących się z oktamerem nukleotydów rdzenia nukleosomowego [Oct-3/Oct-4]; ang. *octamer DNA motif binding proteins*), stanowiłoby niepodważalny dowód, że oscylacje wapniowe mogą, w zależności od rodzaju impulsu stymulującego program rozwojowy cybrydy klonalnej, indukować specyficzną odpowiedź genomu zarodkowego na poziomie ekspresji genów. Od rodzaju uaktywnianych czynników transkrypcyjnych zależy bowiem, jaka pula genów ulegnie demetylacji i ekspresji na określonym etapie przedimplantacyjnej fazy embriogenezy.

## **6. Doskonalenie warunków fizykochemicznych hodowli *in vitro* zarodków klonalnych**

Niezwykle istotne są również badania prowadzone nad optymalizacją warunków hodowli *in vitro* zarodków świni, w tym także, zarodków uzyskanych w wyniku klonowania somatycznego czy zapłodnienia pozaustrojowego. Być może modyfikacja



składu jakościowego i ilościowego stosowanych dotychczas pożywek hodowlanych takich jak: 1) NCSU-23 (ang. North Carolina State University-23; [7,17,42,43]), 2) NCSU-37 (8,9,42,44), 3) zmodyfikowana pożywka Whitten'a/mWM (ang. *modified Whitten medium*; [16,45]), 4) CR2 (Charles Rosenkrans 2 *medium*; [27]), 5) KSOM (ang. *potassium simplex optimized medium*; [46]), 6) zmodyfikowana pożywka CZB (ang. *modified Chalot, Ziomek, Bavister medium*; [47]), 7) BECM-3 (ang. *Beltsville embryo culture medium-3*; [16,43,48]), lub opracowanie zupełnie nowych pożywek hodowlanych takich jak: PZM-3 i PZM-4 (ang. *Porcine Zygote Medium-3/4*; [15,49]) przyczyni się do wzrostu zarówno potencjału rozwojowego, jak i jakości morfologicznej hodowlanych *in vitro* zarodków zrekonstruowanych z jąder komórek somatycznych. Niewykluczone również, że systemy sekwencyjnej hodowli *in vitro* w chemicznie zdefiniowanych pożywkach lub współhodowli z tworzącymi warstwę odżywczą komórkami somatycznymi (np. komórkami pęcherzykowymi, komórkami nabłonka jajowodowego, komórkami wątroby szczura bawolego [BRL, ang. *Buffalo Rat Liver cells*], komórkami nerki makaka zielonego [VERO, ang. *Verro cells*] lub ich mieszanymi populacjami) okażą się dopiero optymalnym rozwiązaniem, istotnie zwiększającym *pre* i *postimplantacyjne* potencje rozwojowe rekonstruowanych zarodków (27,39,43, 44,50).

## 7. Podsumowanie

Efektom realizacji wyszczególnionych zagadnień badawczych powinno być opracowanie kompleksowej metody (technologii) klonowania somatycznego świń, która pozwoli na wykorzystanie jej do realizacji ograniczonych celów praktycznych. Jednym z nich będzie możliwość zastosowania techniki klonowania somatycznego do multiplikacji identycznych genetycznie zwierząt, szczególnie tych o wybitnych cechach wartości hodowlanej i użytkowej, co przyczynić się może do przyspieszenia tempa osiągania postępu hodowlanego. Największe jednak oczekiwania związane z techniką klonowania świń wiąże się z możliwością uzyskiwania zwierząt transgenicznych z jąder komórek somatycznych modyfikowanych genetycznie na poziomie hodowli *in vitro*. Klonowanie somatyczne może być także efektywnym sposobem multiplikacji osobników transgenicznych, wyprodukowanych standardową metodą mikroiniekcji konstruktów genowych do przedjądrzy zygot. Uzyskiwanie transformowanych genetycznie loch i knurów techniką klonowania somatycznego jest, jak się wydaje, szczególnie atrakcyjną opcją, ze względu na ważne implikacje dla medycyny i immunologii transplantacyjnej, a także farmacji i hodowli zwierząt (2-4,7,38, 50-52).

Praca wykonana w ramach projektu badawczego zamawianego nr PBZ-KBN-048/P05/2001/08.



## Literatura

1. Park K.-W., Lai L., Cheong H.-T., Cabot R., Sun Q.-Y., Wu G., Rucker E. B., Durtschi D., Bonk A., Samuel M., Rieke A., Day B. N., Murphy C. N., Carter D. B., Prather R. S., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 1001-1005.
2. Hyun S., Lee G., Kim D., Kim H., Lee S., Nam D., Jeong Y., Kim S., Yeom S., Kang S., Han J., Lee B., Hwang W., (2003a), *Biol. Reprod.*, 69, 1060-1068.
3. Ramsoondar J. J., Machaty Z., Costa C., Williams B. L., Fodor W. L., Bondioli K. R., (2003), *Biol. Reprod.*, 69, 437-445.
4. Bondioli K., Ramsoondar J., Williams B., Costa C., Fodor W., (2001), *Mol. Reprod. Dev.*, 60, 189-195.
5. Lee G. S., Hyun S. H., Kim H. S., Kim D. Y., Lee S. H., Nam D. H., Jeong Y. W., Kim S., Kang S. K., Lee B. C., Hwang W. S., (2003a), *Theriogenology*, 59, 1949-1957.
6. Hyun S. H., Lee G. S., Kim D. Y., Kim H. S., Lee S. H., Kim S., Lee E. S., Lim J. M., Kang S. K., Lee B. C., Hwang W. S., (2003b), *Theriogenology*, 59, 1641-1649.
7. Lee J.-W., Wu S.-C., Tian X. C., Barber M., Hoagland T., Riesen J., Lee K.-H., Tu C.-F., Cheng W. T. K., Yang X., (2003b), *Biol. Reprod.*, 69, 995-1001.
8. Yin X. J., Tani T., Yonemura I., Kawakami M., Miyamoto K., Hasegawa R., Kato Y., Tsunoda Y., (2002), *Biol. Reprod.*, 67, 442-446.
9. Kawakami M., Tani T., Yabuuchi A., Kobayashi T., Murakami H., Fujimura T., Kato Y., Tsunoda Y., (2003), *Cloning Stem Cells*, 5(4), 379-387.
10. Lai L. Tao., Machaty Z., Kühholzer B., Sun Q.-Y., Park K.-W., Day B. N., Prather R. S., (2001), *Biol. Reprod.*, 65, 1558-1564.
11. Lai L., Park K. W., Cheong H. T., Kühholzer B., Samuel M., Bonk A., Im G. S., Rieke A., Day B. N., Murphy C. N., Carter D. B., Prather R. S., (2002a), *Mol. Reprod. Dev.*, 62(3), 300-306.
12. Roh S., Hwang W.-S., (2002), *Reprod. Fertil. Dev.*, 14, 93-99.
13. Nagashima H., Fujimura T., Takahagi Y., Kurome M., Wako N., Ochiai T., Esaki R., Kano K., Saito S., Okabe M., Murakami H., (2003), *Theriogenology*, 59(1), 95-106.
14. Yin X. J., Cho S. K., Park M. R., Im Y. J., Park J. J., Jong-Sik-Bhak, Kwon D. N., Jun S. H., Kim N. H., Kim J. H., (2003), *Zygote*, 11(2), 167-174.
15. Kawano K., Kato Y., Tsunoda Y., (2004), *Cloning Stem Cells*, 6(2), 67-72.
16. Onishi A., Iwamoto M., Akita T., Mikawa S., Takeda K., Awata T., Hanada H., Perry A. C. F., (2000), *Science*, 289, 1188-1190.
17. Kurome M., Fujimura T., Murakami H., Takahagi Y., Wako N., Ochiai T., Miyazaki K., Nagashima H., (2003), *Cloning Stem Cells*, 5(4), 367-378.
18. Cibelli J. B., Stice S. L., Goluece P. J., Kane J. J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de Leon F. A., Robl J. M., (1998), *Science*, 280, 1256-1258.
19. Wells D. N., Misica P. M., Tervit H. R., (1999), *Biol. Reprod.*, 60, 996-1005.
20. McCreath K. J., Howcroft J., Campbell K. H. S., Colman A., Schnieke A. E., Kind A. J., (2000), *Nature*, 405, 1066-1067.
21. Loi P., Clinton M., Barboni B., Fulka Jr. I., Cappai P., Feil R., Moor R. M., Ptak G., (2002), *Biol. Reprod.*, 67, 126-132.
22. Keefer C. L., Baldassarre H., Keyston R., Wang B., Bhatia B., Bilodeau A. S., Zhou J. F., Leduc M., Downey B. R., Lazaris A., Karatzas C. N., (2001), *Biol. Reprod.*, 64, 849-856.
23. Keefer C. L., Keyston R., Lazaris A., Bhatia B., Begin I., Bilodeau A. S., Zhou F. J., Kafidi N., Wang B., Baldassarre H., Karatzas C. N., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 199-203.
24. Reggio B. C., James A. N., Green H. L., Gavin W. G., Behboodi E., Echelard Y., Godke R. A., (2001), *Biol. Reprod.*, 65, 1528-1533.
25. Dominko T., Mitalipova M., Haley B., Beyhan Z., Memili E., McKusick B., First N. L., (1999), *Biol. Reprod.*, 60, 1496-1502.
26. Shiga K., Fujita T., Hirose K., Sasae Y., Nagai T., (1999), *Theriogenology*, 52, 527-535.
27. Betthausen J., Forsberg E., Augenstein M., Childs L., Eilertsen K., Enos J., Forsythe T., Golueke P., Jurgella G., Koppang R., Lesmeister T., Mallon K., Mell G., Misica P., Pace M., Pfister-Genskow M.,



- Strelchenko N., Voelker G., Watt S., Thompson S., Bishop M., (2000), *Nat. Biotechnol.*, 18, 1055-1059.
28. Boquest A. C., Grupen C. G., Harrison S. J., McIlpatrick S. M., Ashman R. J., d'Apice A. J. F., Nottle M. B., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 1283-1287.
29. Miyoshi K., Rzucidlo S. J., Pratt S. L., Stice S. L., (2002), *Biol. Reprod.*, 67, 540-545.
30. Park K.-W., Kühholzer B., Lai L., Machaty Z., Sun Q.-Y., Day B. N., Prather R. S., (2001), *Anim. Reprod. Sci.*, 68, 111-120.
31. de Sousa P., Dobrinsky J. R., Zhu J., Archibald A. L., Ainslie A., Bosma W., Bowering J., Bracken J., Ferrier P. M., Fletcher J., Gasparrini B., Harkness L., Johnston P., Ritchie M., Ritchie W. A., Travers A., Albertini D., Dinnyes A., King T. J., Wilmut I., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 642-650.
32. Koo D.-B., Kang Y.-K., Choi Y.-H., Park J.S., Han S.-K., Park I. Y., Kim S.-U., Lee K.-K., Son D.-S., Chang W.-K., Han Y.-M., (2000), *Biol. Reprod.*, 63, 986-992.
33. Dai Y., Vaught T. D., Boone J., Chen S.-H., Phelps C. J., Ball S., Monahan J. F., Jobst P. M., McCreath K. J., Lamborn A. E., Cowell-Lucero J. L., Wells K. D., Colman A., Polejaeva I. A., Ayares D. L., (2002), *Nat. Biotechnol.*, 20, 251-255.
34. Tao T., Machaty Z., Boquest A. C., Day B. N., Prather R. S., (1999a), *Anim. Reprod. Sci.*, 56, 133-141.
35. Tao T., Boquest A. C., Machaty Z., Petersen A. L., Day B. N., Prather R. S., (1999b), *Cloning*, 1(1), 55-62.
36. Kühholzer B., Tao T., Machaty Z., Hawley R. J., Greenstein J. L., Day B. N., Prather R. S., (2000), *Mol. Reprod. Dev.*, 56, 145-148.
37. Polejaeva J. A., Chen S.-H., Vaught T. D., Page R. L., Mullins J., Ball S., Dai Y., Boone J., Walker S., Ayares D. L., Colman A., Campbell K. H. S., (2000), *Nature*, 407, 86-90.
38. Samiec M., Skrzyszowska M., Smorąg Z., (2003), *Czech J. Anim. Sci.*, 48(12), 499-507.
39. Lee G. S., Kim H. S., Hyun S. H., Kim D. Y., Lee S. H., Lim J. M., Lee E. S., Kang S. K., Lee B. C., Hwang W. S., (2003c), *Mol. Reprod. Dev.*, 66(1), 17-23.
40. Cheong H. T., Ikeda K., Martinez Diaz M. A., Katagiri S., Takahashi Y., (2000), *Reprod. Fertil. Dev.*, 12, 15-20.
41. Martinez Diaz M. A., Ikeda K., Takahashi Y., (2002), *Reprod. Fertil. Dev.*, 14, 191-197.
42. Petters R. M., Wells K. D., (1993), *J. Reprod. Fertil.*, 48 (Suppl.), 61-73.
43. Im G.-S., Lai L., Liu Z., Hao Y., Wax D., Bonk A., Prather R. S., (2004), *Theriogenology*, 61, 1125-1135.
44. Kikuchi K., Onishi A., Kashiwazaki N., Iwamoto M., Noguchi J., Kaneko H., Akita T., Nagai T., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 1033-1041.
45. Beckmann L. S., Day B. N., (1993), *Theriogenology*, 39, 611-622.
46. Machaty Z., Day B. N., Prather R. S., (1998), *Biol. Reprod.*, 59, 451-455.
47. Pollard J. W., Plante C., Leibo S. P., (1995), *J. Reprod. Fertil.*, 103, 331-337.
48. Dobrinsky J. F., Johnson L. A., Rath D., (1996), *Biol. Reprod.*, 55, 1069-1074.
49. Yoshioka K., Suzuki C., Tanaka A., Anas I. M.-K., Iwamura S., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 112-119.
50. Skrzyszowska M., Samiec M., Smorąg Z., (2005), *Ann. Anim. Sci.*, (w druku).
51. Lai L., Kolber-Simonds D., Park K.-W., Cheong H.-T., Greenstein J. L., Im G.-S., Samuel M., Bonk A., Rieke A., Day B. N., Murphy C. N., Carter D. B., Hawley R. J., Prather R. S., (2002b), *Science*, 295, 1089-1092.
52. Walker S. C., Shin T., Zaunbrecher G. M., Romano J. E., Johnson G. A., Bazer F. W., Piedrahita J. A., (2002), *Cloning Stem Cells*, 4(2), 105-112.