

POTENCJAŁ APLIKACYJNY KLONOWANIA SOMATYCZNEGO KÓŻ W ROLNICTWIE, TRANSGENICE ZWIERZĄT, BIOTECHNOLOGII ROLNO-SPOŻYWCZEJ, BIOMEDYCYNIE I PRZEMYSŁE BIOFARMACEUTYCZNYM

Maria Skrzyszowska¹, Marcin Samiec¹

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,
Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji, 32-083 Balice k. Krakowa
E-mail: maria.skrzyszowska@izoo.krakow.pl; marcin.samiec@izoo.krakow.pl
Maria Skrzyszowska ORCID: 0000-0002-0068-6407
Marcin Samiec ORCID: 0000-0002-4060-1893

Koza domowa jako gatunek o stosunkowo dużej bioróżnorodności ras mlecznych i mięsnych może być wysoko wartościowym obiektem dla badań z zakresu transgeniki zwierząt, bazującej na uzyskiwaniu i powielaniu transformowanych genetycznie osobników przy wykorzystaniu jednej z najdynamiczniej rozwijających się technologii wspomaganego rozrodu, jaką stanowi klonowanie metodą transplantacji jąder komórek somatycznych (SCNT; ang. somatic cell nuclear transfer). Celem nadrzędnym tej pracy jest zaprezentowanie aktualnych osiągnięć ukierunkowanych na opracowanie innowacyjnych i wysoko efektywnych rozwiązań stosowanych do produkcji transgenicznych maciorek i kozłów klonalnych. Ponadto, w niniejszej pracy zostały przedstawione perspektywy wykorzystania genetycznie zmodyfikowanych kóz klonalnych nie tylko na potrzeby nowoczesnej hodowli zwierząt gospodarskich, biotechnologii żywienia i przemysłu rolno-spożywczego, lecz także na potrzeby farmakologii i biomedycyny.

Słowa kluczowe: koza klonalna, klonowanie somatyczne, hodowla zwierząt gospodarskich, transgenika, biotechnologia żywienia, przemysł rolno-spożywczy, farmakologia, biomedycyna

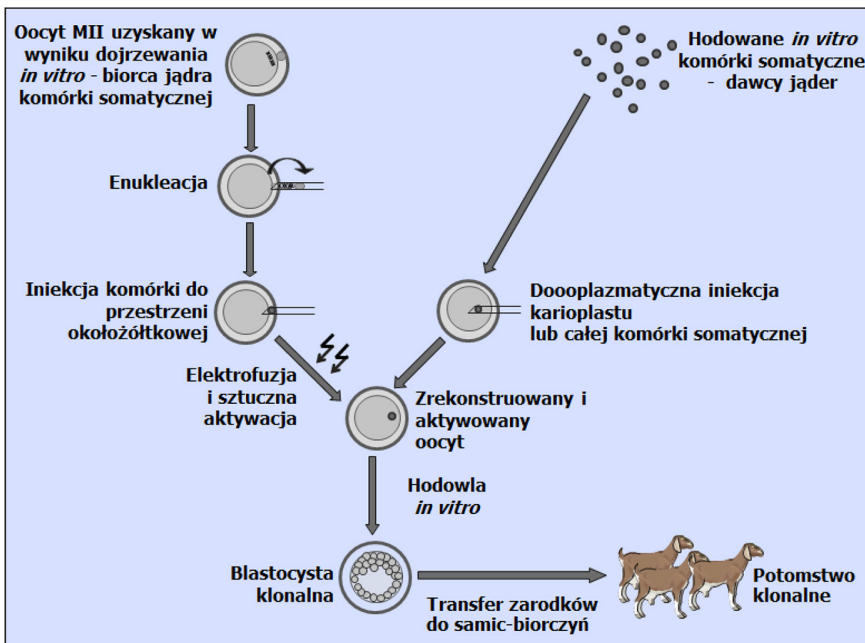
Jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się strategii biotechnologii reprodukcyjnej ssaków, w tym zwierząt gospodarskich, jest klonowanie techniką transplantacji jąder komórek somatycznych (SCNT; ang. *somatic cell nuclear transfer*) (ryc. 1).

Atrakcyjność technik klonowania wynika z możliwości ich zastosowania do generowania i multiplikowania transgenicznych zwierząt, cennych ze względu na produkt ekspresji zmodyfikowanych genów, a także, choć w mniejszym stopniu, z możliwości powielania osobników o wybitnych, wysokoodziedzicznych cechach wartości hodowlanej (genetycznej) i użytkowej, co może skutkować skróceniem odstępu między-

¹Maria Skrzyszowska i Marcin Samiec przyczynili się w jednakowym stopniu do powstania tego artykułu naukowego (równy wkład autorski).

pokoleniowego i przyśpieszeniem tempa osiągania postępu hodowlanego. Jednakże, realizacja wskazanych kierunków badań postępuje nadal w ograniczonej skali, z powodu wysokich kosztów procedury klonowania wynikających z niskiej skuteczności metody. Upowszechnienie metod klonowania będzie możliwe po osiągnięciu wysokiej i stabilnej efektywności, gwarantującej powtarzalność wyników (Samiec i Skrzyszowska, 2011a, b; Hall i in., 2013; Skrzyszowska i Samiec, 2020a).

Głównym powodem niskiego przed- i poimplantacyjnego potencjału rozwojowego oraz słabej jakości zarodków klonalnych, a także stosunkowo wysokiej częstości występowania wrodzonych wad rozwojowych (zmian anatomo-, histo- i fizjopatologicznych) u płodów i potomstwa klonalnego jest nieprawidłowa adaptacja transferowanych jąder komórek somatycznych do warunków biochemicznych mikrośrodowiska cytoplazmatycznego oocyta, czyli ich niekompletne lub wadliwe przeprogramowanie w cytoplazmie enukleowanych oocytów. Wynika stąd potrzeba prowadzenia badań zmierzających do precyzyjnego zdefiniowania/rozpoznania warunków ułatwiających proces epigenetycznego przeprogramowania genomu komórek-dawców jąder w przed- i poimplantacyjnej fazie rozwoju klonalnych zarodków oraz płodów ssaków, w tym kozy domowej (Martins i in., 2016; Samiec i Skrzyszowska, 2018a; Yang i in., 2018; Deng i in., 2020a, b). Obiecujących wyników dostarczyły badania z użyciem nieselektywnych związków stymulujących epigenetycznie uwarunkowaną aktywność transkrypcyjną DNA genomowego, zarówno w somatycznych komórkach-dawcach jąder, jak i w klonalnych zarodkach ssaków, w tym kozy (Iager i in., 2008; Mao i in., 2018; Samiec i Skrzyszowska, 2018b; Samiec i in., 2019; Skrzyszowska i Samiec, 2020b).



Ryc. 1. Schemat klonowania kóz techniką transplatacji jąder komórek somatycznych do enukleowanych (wyjądrzonych) oocytów-biorców (SCNT; ang. *somatic cell nuclear transfer*)

Fig. 1. Schematic representation of cloning goats by somatic cell nuclear transfer (SCNT) into enucleated recipient oocytes

Gatunkowo-specyficzne zalety kozy zwiększające możliwości jej praktycznego wykorzystania w rolnictwie, transgenice, biotechnologii, biomedycynie i biofarmacji

Koza domowa (*Capra aegagrus hircus*) jako gatunek o relatywnie dużej bioróżnorodności ras wykazujących stosunkowo wysoką wydajność mleczną i/lub mięsną może być dobrym obiektem dla transgenicznej produkcji osobników stanowiących bioreaktory rekombinowanych ludzkich białek terapeutycznych (tzw. biofarmaceutyków lub nutraceutyków) bądź osobników o genetycznie zmodyfikowanych parametrach mięsności i śródmięśniowej zawartości tkanki tłuszczowej. Zwiększenie efektywności produkcji oczyszczonych, obcogatunkowych (tj. ksenogenicznych) biopreparatów farmakologicznych lub nutraceutycznych, pochodzących z gruczołów mlekowych, czyli wymion transgenicznych kóz ułatwiłoby zatem ich stopniowe uzdatnianie w przemyśle biofarmaceutycznym (Baguisi i in., 1999; Wan i in., 2012). Inną wymierną korzyścią uzyskiwania zmodyfikowanych genetycznie kóz klonalnych, cennych ze względu na ksenogeniczny produkt transgenicznej ekspresji egzogenego DNA (ukierunkowanej na gruczoły mlekowe lub skutkującej podwyższoną mięsnością), jest stosunkowo krótki odstęp międzypokoleniowy dający możliwość przyspieszania tempa osiągania postępu genetycznego w zakresie hodowli tzw. maciorek i kozłów-założycieli rodzicielskich linii transgenicznych (ang. *founder does and bucks*) (Wan i in., 2012; Zhou i in., 2013). Kolejną zaletą tego gatunku małych przeżuwaczy jest niska podatność ras kóz należących do mlecznego lub mięsnego typu użytkowego na infekcje patologicznymi prionami (PrP^{Sc}) wywołującymi chorobę *scrapie* (trzęsawkę) u owiec (Baldassarre i in., 2002, 2003a; An i in., 2019). Transgeniczne kozy mogą być optymalnymi bioreaktorami rekombinowanych białek terapeutycznych człowieka również z innego, agroekonomicznego powodu. W porównaniu z chowem krów transgenicznych, zwierzęta te można łatwiej hodować, szybciej kierować ich naturalnym i biotechnologicznie wspomaganym rozrodem, a ich utrzymanie jest znacznie tańsze niż użytkowanie dużych przeżuwaczy. Posiadają one dość duże w stosunku do rozmiarów ich ciała wymiona o przewadze tkanki gruczołowej nad włóknistą tkanką mięszową (parenchymalną), co już genetycznie predestynuje ten gatunek małych przeżuwaczy do wysokiego potencjału produkcyjnego siary i mleka. Konsekwencją tych anatomiczno-fizjologicznych zalet kóz może być wysoka wydajność stada transgenicznych maciorek w zakresie syntezy i sekrecji rekombinowanych białek terapeutycznych człowieka (tzw. biofarmaceutyków lub nutraceutyków) przez komórki pęcherzyków mlekotwórczych, wytwarzających wydzielinę o zmodyfikowanym genetycznie składzie jakościowym i ilościowym (Wan i in., 2012; Gash i in., 2019).

Pierwsze transgeniczne koźlęta klonalne uzyskano po transplantacji zarodków zrekonstruowanych z jąder komórek somatycznych, transfekowanych *in vitro* stosunkowo prostymi konstrukcjami genowymi niezawierającymi genomowych sekwencji regionów kodujących transgeny strukturalne, lecz złożonymi jedynie z segmentów eksonowych genów kodujących markerowe białka selekcyjne, np. fosfotransferazę glicerolową/kinazę fosfoglicerolową neomycyny (PGKneo), warunkującą oporność na genetycyne (G418) i/lub reporterowe białko intensywnej zieleni fluorescencyjnej meduzy słońbiopława *Aequorea victoria* (eGFP; ang. *enhanced green fluorescent*

protein). W doświadczeniach Zou i in. (2002) przeprowadzonych nad klonowaniem somatycznym kóz wykorzystano hodowane *in vitro* fibroblasty płodowe, transfekowane przy użyciu konstrukcji genetycznej zawierającej jedynie gen oporności na pochodną neomycyny (*neo^r*). Efektem tych badań było wyprodukowanie 5 zmodyfikowanych genetycznie kozłąt. Z kolei Keefer i in. (2001) oraz Baldassarre i in. (2002, 2003a) zastosowali do zabiegu transfekcji (lipofekcji) *in vitro* fibroblastów płodowych bardziej złożoną plazmidową konstrukcję genową (*CEeGFP*) zawierającą: 1) rozbudowaną sekwencję genomową tzw. ludzkiego wariantu genu białka eGFP pod kontrolą promotora ludzkiego czynnika elongacji łańcucha polinukleotydowego-1 α (ang. *human elongation factor-1 α*) oraz regulatorowej sekwencji regionu wzmacniającego inicjację transkrypcji mRNA cytomegalowirusa (ang. *cytomegalovirus enhancer*), a także 2) markerowy gen selekcyjny neomycyny sprzężony z ekspresyjnym wektorem kierunkowym wyizolowanym z genomu wirusa SV-40 (ang. *simian virus-40*). Po transplantacji zarodków zrekonstruowanych z jąder tak transformowanych genetycznie komórek somatycznych uzyskano jedną maciorkę klonalną z potwierdzoną molekularnie i fenotypowo ekspresją reporterowego transgenu *eGFP*.

Transgeniczne zwierzęta ze zdiagnozowanym przyżyciowo wysokim profilem aktywności transkrypcyjnej obcogatunkowego genu mogą być następnie multiplikowane techniką klonowania somatycznego. Ma to szczególne uzasadnienie w przypadku gdy pozyskiwane od tych zwierząt biofarmaceutyki mogą znaleźć powszechne zastosowanie w terapii u ludzi cierpiących na szereg nieuleczalnych chorób jednogenowych. W momencie uzyskania przez transgeniczne biopreparaty odpowiednich certyfikatów dopuszczających je do aplikacji u ludzi, somatyczne klonowanie zmodyfikowanych genetycznie osobników pozwoli, przynajmniej teoretycznie, na utrzymanie homogenności takich leków ekstrahowanych z fizjologicznych wydzielin i wydaliny (mleko, mocz) kolejnych generacji sklonowanych zwierząt. Technologia taką wykorzystywała z powodzeniem amerykańska firma biotechnologiczna *Genzyme Transgenic Corporation (GTC) Biotherapeutics*, po wyprodukowaniu transgenicznych kóz z potwierdzoną w mleku monoalleliczną ekspresją genu rekombinowanej ludzkiej antytrombiny III (*rhAT*), standardową metodą mikroiniekcji konstruktów cDNA wyposażonych w promotor genu koziej b-kazeiny. W przeprowadzonych eksperymentach, z płodów uzyskanych w wyniku krycia nietransgenicznych maciorek zmodyfikowanym genetycznie kozłem-założycielem transgenicznego rodu zwierząt (ang. *founder buck*), z ukierunkowaną na gruczoł mlekowy aktywnością transkrypcyjną genu *rhAT*, wyprowadzono linie transformowanych genetycznie komórek fibroblastycznych. Linie klonalne tych komórek posłużyły jako źródło dawców jąder w procedurze klonowania somatycznego, której efektem było wyprodukowanie łącznie 8 transgenicznych maciorek (Baguisi i in., 1999; Reggio i in., 2001). Kolejnym przykładem wykorzystania techniki klonowania somatycznego do powielania populacji osobników transgenicznych są wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez Cheng i in. (2002). W tym przypadku do rekonstrukcji enukleowanych oocytów użyto hodowane *in vitro* linie komórkowe, wyprowadzone z biopłatów tkankowych transgenicznej kozy wykazującej ogólnoustrojową ekspresję genu rekombinowanej erytropoetyny człowieka (*rhEPO*). Po chirurgicznym transferze zarodków klonalnych do dróg rodnych hormonalnie zsynchronizowanych maciorek-biorczyń, urodziły się 2 zmodyfikowane gene-

tycznie kozłeta, z potwierdzonym molekularnie oraz fenotypowo wysokim profilem aktywności transkrypcyjnej transgenu kodującego ksenogeniczne (obcogatunkowe) białko rhEPO.

Transgeniczne kozy klonalne jako bioreaktory terapeutycznych białek człowieka

Technologia transplantacji jąder transfekowanych *in vitro* komórek somatycznych zwiększa prawdopodobieństwo uzyskiwania niemozaikowego potomstwa transgenicznego, posiadającego wbudowany egzogenny konstrukt genowy również w linii pierwotnych komórek płciowych. Takie niechimerowe pod względem transformacji genetycznej komórek gametogenicznych i somatycznych osobniki zachowują pełną zdolność do przekazywania fenotypowo i molekularnie zdiagnozowanej ekspresji transgenu na komórki gruczołu mlekowego kolejnej generacji urodzonych kozłat (Baldassarre i in., 2003b; Gash i in., 2019; Zhang i in., 2019a). Doskonałym tego przykładem mogą być wyniki badań przeprowadzonych przez Baguisi i in. (1999). Detekcja wysokiego poziomu ekspresji genu kodującego rekombinowaną ludzką antytrombinę III (rhAT) w komórkach wymion trzech macierek klonalnych uzyskanych z zarodków zrekonstruowanych z jąder fibroblastów transgenicznych płodów wyrażała się również w postaci niezwykle wysokiej fenotypowej wartości tej zmodyfikowanej genetycznie cechy w pobranych próbkach mleka. W okresie 33 dni zainicjowanej już w wieku 2 miesięcy laktacji wydajność mleczna tych macierek osiągnęła wartość około 160 mL, a koncentracja rhAT w pobranym mleku wyniosła aż 5,8 g/L (20,5 U/mL aktywności enzymatycznej oczyszczonego biopreparatu) w dniu 5. oraz 3,7 g/L (14,6 U/mL aktywności) w 9. dniu laktacji. Przy tak dużym poziomie stężenia rekombinowanych białek terapeutycznych w mleku, wielkostadnie fermy transgenicznych kóz mogą dostarczyć nawet do 300 kg wyekstrahowanego (puryfikowanego) produktu biofarmaceutycznego w skali całego roku. Sprzężenie technologii klonowania somatycznego z hormonalną indukcją wczesnej laktacji u niedojrzałych płciowo macierek transgenicznych umożliwi znaczne skrócenie czasu uzyskiwania produktu ekspresji transgenu, nawet do 8–9 miesięcy od momentu transfekcji linii komórkowych do momentu jego sekrecji w mleku (Baguisi i in., 1999; Baldassarre i in., 2004). Objętość pozyskiwanych w ten sposób próbek mleka jest nie tylko wystarczająca do prawidłowego oszacowania wielkości produkcji rekombinowanych białek, ale nawet przy stosunkowo niskim poziomie ekspresji transgenu, wyrażanym w mg/mL mleka pozwala na wielokrotne przeprowadzanie klinicznych testów aktywności farmakokinetycznej, hormonalnej lub enzymatycznej wytwarzanych biopreparatów.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt zapoczątkowania w latach 2006–2009 przez amerykańską korporację biotechnologiczną *GTC Biotherapeutics* szeroko zakrojonej międzynarodowej komercjalizacji biomedycznej pierwszego biopreparatu farmakologicznego o nazwie ATryn®, którego podstawowym biochemicznym składnikiem aktywnym jest rekombinowana ludzka antytrombina III (rhAT) pochodząca z mleka transgenicznych osobników klonalnych dużego gatunku zwierząt gospodarskich, jakim jest koza domowa (Echelard i in., 2006; Niemann i Kues, 2007; An i in., 2019). Fakt ten należy uznać za ogromny kamień milowy ukierunkowany na praktyczne wdrożenie na skalę przemysłową pierwszego produktu biofarmaceutycznego współ-

czesnej biotechnologii reprodukcyjnej ssaków opartej na sprzężonych technologiach genetycznej/genomowej inżynierii zarodkowej takich jak: transgeneza i klonowanie somatyczne zwierząt gospodarskich. Warto w tym miejscu podkreślić, że ATryn® – jako pierwszy w świecie lek syntetyzowany i dostarczany przez przekształcone w bioreaktory wymiona zmodyfikowanych genetycznie kóz klonalnych, charakteryzujących się wysokoefektywną, organo-specyficzną ekspresją mono- lub bialleliczną transgeny *rhAT* – został pierwotnie dopuszczony w 2006 roku przez Europejską Agencję Leków (EMA; ang. *European Medicines Agency*) do obrotu handlowego i użytkowania w sektorze biofarmaceutyczno-medycznym państw Unii Europejskiej, a w następnej kolejności uzyskał w 2009 roku certyfikację Amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (FDA/USFDA; ang. *United States Food and Drug Administration*) zezwalającą na obrót i uzdatnianie na rynkach biofarmaceutycznych i biomedycznych w USA oraz w Kanadzie (Samiec i Skrzyszowska, 2011a; Shepelev i in., 2018). Na obecnym etapie ATryn® znajduje szerokie zastosowanie w biomedycznych programach/platformach terapeutycznych dedykowanych dla hospitalizowanych pacjentów internistycznych cierpiących na genetycznie uwarunkowany wariant niedoboru glikoproteiny przeciwzakrzepowej, jaką stanowi antytrombina III. Pacjenci dotknięci wrodzonym deficytem tego białka antykoagulacyjnego wykazują mniej lub bardziej zaawansowane objawy żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej, która jest uznawana za jedno z najczęstszych i najgroźniejszych schorzeń układu sercowo-naczyniowego u człowieka. Dlatego też ATryno-, czyli *rhAT*-zależna profilaktyka przeciwzakrzepowa wydaje się być godnym uwagi elementem leczenia ciężkich zaburzeń okołoperacyjnych i okołoporodowych oraz groźnych powikłań zakrzepowo-zatorowych, w tym klinicznie niemych i objawowych przypadków zakrzepowego zapalenia (zakrzepicy) żył głębokich, a także symptomów przewlekłej, opóźnionej, podostrej lub ostrej zatorowości płucnej (tj. różnych postaci zatoru tętnicy płucnej), które ujawniają się w tej grupie dziedzicznie obciążonych pacjentów tzw. podwyższonego ryzyka (Echelard i in., 2005; Patnaik i Moll, 2008).

Kolejnym przykładem praktycznego wykorzystania gruczołów mlekowych transformowanych genetycznie kóz klonalnych jako bioreaktorów syntetyzujących ludzkie białka terapeutyczne lub mleko o tzw. zhumanizowanym składzie biochemicznym są badania Zhu i in. (2016), zmierzające do obniżenia reakcji alergicznej na białko β -laktoglobuliny (BLG). Jest to jedno z najważniejszych białek serwatkowych o potencjalnym charakterze alergennym, które występuje w mleku wszystkich ssaków parzystokopytnych (*Artiodactyla*), w tym także kozy domowej. Jedynie w mleku człowieka białko to nie wykazuje takich właściwości. Obecność tego białka w mleku kóz w znacznym stopniu ogranicza spożycie tego produktu, mimo jego wysokiej wartości odżywczej i właściwości prozdrowotnych. Autorzy tych prac badawczych, jako pierwsi, stosując konwencjonalną metodę rekombinacji homologicznej (HR; ang. *homologous recombination*) uzyskali funkcjonalną inaktywację pojedynczej kopii genu *BLG* albo poprzez znokautowanie (usunięcie/wyłączenie) jego specyficznych sekwencji kodujących (ang. *BLG gene knock-out*), albo poprzez wstawienie (insercję) specyficznych sekwencji unieczynnających aktywność transkrypcyjną genu *BLG* na drodze włączenia (inkorporacji) eksonów genu α -laktoalbuminy człowieka (*hLA*; ang. *hLA gene knock-in*) do genomu jądrowego hodowanych *in vitro* płodowych komórek

fibroblastycznych. W następnej kolejności komórki te wykorzystano jako źródło dawców jąder do rekonstrukcji enukleowanych oocytów kozy w procedurze klonowania somatycznego. Efektem końcowym tych badań było urodzenie trzech kozłąt, spośród których u dwóch potwierdzono monoalleliczny nokaut celowanego genu *BLG* (Zhu i in., 2016).

Z kolei Yuan i in. (2017) wygenerowali – przy zastosowaniu strategii klonowania somatycznego – transgeniczne kozy, których wymiona były bioreaktorami syntetyzującymi zhumanizowane mleko zawierające farmakologiczną lub nutraceutyczną immunoglobulinę, określaną mianem rekombinowanej laktoferyny człowieka (*hLF*). Źródło komórek-dawców jąder w procedurze rekonstrukcji enukleowanych oocytów techniką klonowania somatycznego stanowiły transformowane genetycznie fibroblasty płodowe, których genom został zmodyfikowany/zedytowany poprzez wprowadzenie sekwencji cDNA *hLF* do *locus* genu β -laktoglobuliny, czyli poprzez zastąpienie genu *BLG* genem *hLF*. Do modyfikacji/edytowania genomu jądrowego fibroblastycznych komórek płodowych użyto systemu nukleaz efektorowych strukturalnie i funkcjonalnie przypominających/podobnych do aktywatorów transkrypcyjnych (TALENs; ang. *transcription activator-like effector nucleases*). Skuteczność ukierunkowanej mutagenyzy genu *BLG* kształtowała się na poziomie 10%. Wyniki przeprowadzonych badań wyraźnie wykazały, że poprzez sprzężenie strategii edytowania genomu w oparciu o nukleazy TALENs z techniką klonowania somatycznego możliwe było bialleliczne unieczynnienie genu *BLG* poprzez wstawienie (*knock-in*) eksonów genu *hLF* do genomu kóz klonalnych, których gruczoł mlekowy, poprzez zaprogramowaną transformację genetyczną, został ukierunkowany na produkcję rekombinowanej laktoferyny człowieka. Zakodowana na drodze transgenezy, jakościowa i ilościowa modyfikacja składu biochemicznego mleka koziego, czyli innymi słowy produkcja zhumanizowanego mleka przez wymiona kóz jako transgenicznych bioreaktorów, może skutkować obniżeniem stopnia jego alergenicności, przy jednoczesnym wzbogaceniu mleka o wartościowe białko multipotencjalne, jakim jest laktoferyna. To białko z grupy immunoglobulin, poza fizjologiczną regulacją dynamicznej homeostazy metabolizmu kationów żelaza, wykazuje szereg innych cennych właściwości immunoterapeutycznych, m.in. takich jak: przeciwdrobnoustrojowe (antybakteryjne, mykostatyczne i antywirusowe), immunomodulujące, przeciwzapalne oraz przeciwnowotworowe (Wan i in., 2012; Yuan i in., 2017; Zhang i in., 2019a).

Warto również odnotować fakt, że Zhang i in. (2015) udowodnili skuteczną integrację genu rekombinowanej laktoferyny człowieka z obcogatunkowym genomem-gospodarzem wskutek przeprowadzonej transformacji genetycznej hodowanych *in vitro* płodowych komórek fibroblastycznych kozy. Transformowane genetycznie fibroblasty płodowe kozy wykorzystano następnie do uzyskania – na drodze klonowania somatycznego – transgenicznych kozłąt (maciorek) z potwierdzoną molekularnie obecnością genu *hLF* w biopatach tkanki skórnej ucha. Spośród sześciu uzyskanych transgenicznych kozłąt klonalnych, trzy maciorki padły w okresie perinatalnym z powodu niedorozwoju płuc i ostrej niewydolności oddechowej. W eksplantach tkankowych pozyskanych *post mortem* z płuc padłych maciorek transgenicznych zidentyfikowano hipermetylację wysp/dinukleotydów CpG (5'-cytydino-3'-monofosforylo-5'-guanozyny-3') w obrębie regionu o zróżnicowanej metylacji, tj. regionu kontrolnego

piętnowania (DMR/ICR; ang. *differentially methylated region/imprinting control region*) genu receptora insulinopodobnego czynnika wzrostowego typu 2 (*IGF2R*; ang. *insulin-like growth factor 2 receptor*). Dlatego też allel matczyny genu *IGF2R* okazał się być nadaktywny transkrypcyjnie wskutek nadmiernej metylacji reszt cytozyny w intronowej sekwencji DMR/ICR, natomiast allel pochodzenia ojcowskiego pozostał wyciszony transkrypcyjnie wskutek prawidłowo przebiegającej rodzicielskiej metylacji piętnującej. W rezultacie, w wyizolowanych pośmiertnie eksplantach tkanki płucnej koźląt klonalnych wykazano nadekspresję mRNA transkrybowanego przez ulegający nieprawidłowemu piętnowaniu genomowemu (imprintingowi gametycznemu) allel matczyny genu *IGF2R*.

Reasumując, piętnowane geny (ang. *imprinted genes*) są ważnym epigenomowym regulatorem anatomiczno-histologicznego wzrostu i rozwoju oraz fizjologicznego dojrzewania płuc. Z kolei wadliwe lub niekompletne przeprogramowanie epigenetycznie uwarunkowanej aktywności transkrypcyjnej DNA, które leży u podstaw błędnej (wzmózonej) metylacji piętnującej allel genu *IGF2R* pochodzenia matczynego, determinującej monoalleliczną nadekspresję tego genu z genomu matczynego w płucach płodów klonalnych, wydaje się być jednym z głównych letalnych czynników związanych z etiopatogenezą hipoplazji płuc i ciężkiej niewydolności oddechowej u nowonarodzonych transgenicznych koźląt klonalnych (Zhang i in., 2015).

Transgeniczne kozy klonalne jako źródło wartościowego mięsa dla człowieka

Miostatyna, kodowana przez gen *MSTN*, jest hormonalnym (polipeptydowym) czynnikiem inhibitorowym wzrostu, różnicowania, dojrzewania i rozwoju mięśni szkieletowych ssaków. Z przeprowadzonych badań wynika, że funkcjonalne unieczynnienie genu miostatyny poprzez zastosowanie technik ukierunkowanej mutagenezy (ang. *gene targeting*) lub edytowania genomu (ang. *genome editing*) skutkuje zwiększeniem masy mięśni szkieletowych i równocześnie obniżeniem zawartości śródmięśniowej tkanki tłuszczowej, a także zahamowaniem otyłości indukowanej genetycznie lub ektopowo (dietetycznie). Prowadzi to do korzystnych efektów w postaci zwiększonej wydajności mięsnej, opasowej i rzeźnej zmodyfikowanych genetycznie osobników męskich i żeńskich na skutek komórkowej hiperplazji (rozwrostu) oraz hipertrofii (przerostu) tkanki mięśniowej poprzecznie prążkowanej. Badania nad czynnościową inaktywacją, tj. nokautem, genu *MSTN* (*MSTN-KO*; ang. *myostatin gene knockout*) u kóz (Zhou i in., 2013; Petersen i Niemann, 2015; Wang i in., 2015) oraz owiec (Liu i in., 2014; Zhang i in., 2014) przeprowadzano w kilku różnych ośrodkach naukowych. Jednakże z powodu niskiej efektywności, zarówno konwencjonalnej metody ukierunkowanej mutagenezy przy zastosowaniu rekombinacji homologicznej sekwencji kodujących i/lub regulatorowych DNA, jak i innowacyjnej strategii edytowania genomu z użyciem nukleaz z domeną palca cynkowego (ZFNs; ang. *zinc-finger nucleases*), tylko nieliczne badania zostały sfinalizowane skutecznym znokautowaniem genu *MSTN* (Zhang i in., 2014).

W ostatnich latach zaproponowano inne godne uwagi rozwiązania w zakresie technik edycji genów przy wykorzystaniu nukleaz TALENs lub przy użyciu zgrupowanych, regularnie rozmieszczonych, krótkich, powtarzających się sekwencji palindromowych oraz wiążących się z sekwencjami CRISPR endonukleazami typu 9

(CRISPR/Cas9; ang. *clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated endonuclease 9*). Osiągnięty postęp w postaci opracowanych technik celowanego, tj. ukierunkowanego, nokautu specyficznych *loci* genowych jest obiecujący i coraz szerzej techniki te wykorzystywane są do precyzyjnej edycji genomu, pozwalając w miarę łatwo modyfikować genom ssaków, w tym również kozy domowej (Miller i in., 2011; Frock i in., 2015; Hu i in., 2016; Hao i in., 2018; Fan i in., 2019; Kalds i in., 2019). Ni i in. (2014) po raz pierwszy wykazali, że edycja genomu za pośrednictwem CRISPR/Cas9 może indukować precyzyjne mutacje mono- lub bialleliczne w genie miostatyny (*MSTN*) fibroblastów płodowych kozy. Populację komórek z bialleliczną inaktywacją/nokautem genu *MSTN* (*MSTN*-KO; ang. *myostatin gene knockout*) wykorzystano w procedurze klonowania somatycznego. Efektem tych badań było uzyskanie trzech urodzonych żywych koźląt, z których wszystkie były nosicielami biallelicznej mutacji w postaci podwójnej inaktywacji *loci* tego genu. Bardzo interesujące badania z zakresu edycji genomu kozy z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas9 przeprowadzili także Wang i in. (2015). W następstwie tych badań uzyskano osobniki-założyciele transformowanych genetycznie rodów kóz ze zmutowanym genem miostatyny. Zwierzęta te mogą być cennym modelem badawczym do pogłębienia wiedzy na temat znaczenia miostatyny, np. w kontekście jakości i walorów smakowych mięsa pochodzącego od zwierząt z niekontrolowanym przyrostem masy mięśniowej. Jednakże w ramach tych samych prac badawczych wykryto u tych osobników dodatkowo tzw. poza-celowe mutacje (ang. *off-target modifications*). W związku z tym, że kozy ze zmutowanym genem *MSTN* mogą być wartościowym obiektem w badaniach z zakresu fizjologii żywienia, technologii żywności, dietyki, nutrigenomiki, nutripigenomiki, nutritranskryptomiki, nutriproteomiki oraz metabolomiki i metabonomiki żywienia człowieka, zwrócono uwagę, że należy unikać lub istotnie zredukować ryzyko występowania tych poza-celowych mutacji, których oddziaływanie na zdrowie fizyczne, psychiczne i reprodukcyjne człowieka dotąd nie poznano (Wang i in., 2015; Zhang i in., 2019b). Z kolei z niektórych doniesień wynika, że w genomie zwierząt laboratoryjnych modyfikowanych genetycznie techniką TALENs nie wykazano mutacji poza-celowych lub częstość ich występowania była bardzo ograniczona (Tesson i in., 2011; Sung i in., 2013; Frock i in., 2015; Hu i in., 2016). Potwierdziły to również badania Carlsona i in. (2016) wykonane na bydło; osobniki uzyskane po transferze klonalnych zarodków zrekonstruowanych z jąder komórek somatycznych, transformowanych genetycznie techniką TALENs, były wolne od niepożądanych poza-celowych mutacji. Badania Yu i in. (2016) wykazały skuteczność systemu TALENs w hamowaniu ekspresji genu *MSTN* także w genomie kozy. Skuteczność obu systemów celowanych modyfikacji genomu kaszmirskich kóz alpas (zarówno za pośrednictwem TALENs, jak i CRISPR/Cas9) ocenili Zhang i in. (2019b). Efektywność generowania nokautu genu *MSTN* porównywano na wielu poziomach przed- i poimplantacyjnego rozwoju transgenicznych zarodków klonalnych. Wykazano bowiem, że efektywność elektrotransfekcji/elektroporacji komórek somatycznych oraz skuteczność cięcia eksonu 1 genu kodującego miostatynę była wyższa przy użyciu systemu CRISPR/Cas9 niż w przypadku edycji genomu z użyciem nukleaz TALENs. Niemniej jednak, efekt w postaci niecelowanych mutacji występował częściej w systemie CRISPR/Cas9 w porównaniu do systemu TALENs. Ponadto udo-

wodniono, że częstość efektywnego generowania ukierunkowanej mutagenyzy alleli genu *MSTN* była ponad 8-krotnie wyższa przy zastosowaniu strategii edytowania genomu za pośrednictwem CRISPR/Cas9 niż strategii opartej na wykorzystaniu nukleaz TALENs. Z kolei zarodki uzyskane techniką klonowania somatycznego, które zostały zrekonstruowane z jąder komórek zmodyfikowanych genetycznie przy udziale nukleaz TALENs, szybciej osiągały stadium 8-blastomerowe, a ich aktywność podziałowa była istotnie wyższa w odniesieniu do klonalnych zarodków rozwijających się z oocytów zrekonstruowanych z jąder komórek somatycznych, zmodyfikowanych systemem CRISPR/Cas9. Jednakże koźleta klonalne uzyskano po chirurgicznym transferze do maciorek-biorczyń zarodków modyfikowanych tylko i wyłącznie systemem CRISPR/Cas9. Finalnie sugeruje to, że wysoką efektywność/wydajność generowania ukierunkowanych modyfikacji genu miostatyny (*MSTN*-KO) osiągnięto właśnie przy użyciu systemu CRISPR/Cas9 (Zhang i in., 2019b). Z badań tych wynika, że jakkolwiek strategia edytowania genomu zależna od nukleaz TALENs cechuje się pewną przewagą nad systemem CRISPR/Cas9, to jednak ten ostatni zapewnia istotne korzyści wynikające z precyzyjnej edycji genów, co czyni ten system skutecznym i wysokowydajnym narzędziem nowoczesnej inżynierii genetycznej/genomowej w praktyce hodowlanej zwierząt gospodarskich, ukierunkowanej na badania z zakresu biotechnologii rolno-spożywczej i technologii żywności (nutritechnologii) człowieka opartej na diecie mięsnej (Hu i in., 2016; Hao i in., 2018; Fan i in., 2019; Kalds i in., 2019; Zhang i in., 2019b).

Wybrane aspekty biotechnologiczne, molekularne i epigenetyczne klonowania somatycznego kóz

Fenotyp oraz stadium cyklu mitotycznego komórek somatycznych są czynnikami, które mogą w dużym stopniu wpływać na efektywność klonowania kóz. Stosunkowo niewiele typów komórek-dawców jąder poddano testom, w kierunku ich przydatności pod kątem uzyskiwania zarodków, płodów i/lub potomstwa klonalnego u tego gatunku, m.in. komórki pochodzące z kilku rodzajów tkanek pobranych zarówno od płodów, jak i od zwierząt dorosłych obojga płci i w różnym wieku. Wśród stosowanych w procedurach klonowania kóz somatycznych komórek-dawców jąder należy wymienić: 1) hodowane *in vitro* (transgeniczne lub nietransgeniczne) fibroblasty układu skórno-powłokowego płodów (Reggio i in., 2001; Keefer i in., 2001, 2002; Zou i in., 2002; Baldassarre i in., 2004; Zhu i in., 2016; Yuan i in., 2017; Mao i in., 2018); 2) fibroblasty tkanki skórnej młodocianych i dorosłych osobników (Behboodi i in., 2004; Wan i in., 2012; Zhou i in., 2013; Kumar i Sarkhel, 2017; Skrzyszowska i Samiec, 2020b); 3) komórki ściennej warstwy ziarnistej wyizolowane z antralnych pęcherzyków jajnikowych (Keefer i in., 2002; Baldassarre i in., 2002) oraz 4) komórki wzgórka jajonośnego (Baldassarre i in., 2002; Keefer i in., 2002; Cheng i in., 2002). Na wyjątkową uwagę zasługuje fakt wykorzystania pituicytów, tj. komórek endokrynych przedniego płata (części gruczołowej) przysadki mózgowej dojrziałych płciowo osobników płci męskiej, jako źródła dawców jąder w procedurze klonowania somatycznego kóz (Ohkoshi i in., 2003). Ten szczególny typ komórek sekrecyjnych, syntetyzujących tzw. hormony tropowe, dotychczas nie był stosowany w technice transplantacji jąder somatycznych u innych gatunków zwierząt gospodarskich i la-

boratoryjnych. Postuluje się jednak, że sztuczna (egzogenna) kontrola aktywności metabolicznej oraz sekrecyjnej systemu endokrynnego wszystkich płatów przysadki mózgowej u zwierząt gospodarskich mogłaby być możliwa do uzyskania poprzez genetyczną modyfikację (transfekcję) pituicytów na poziomie hodowli *in vitro*. Z kolei wykorzystanie transformowanych genetycznie komórek gruczołowych przysadki mózgowej, wykazujących indukowalną ekspresję rekombinowanych ludzkich białek/poliptydów hormonalnych, do uzyskiwania ssaków techniką klonowania somatycznego, otwiera nowe możliwości aplikacyjne dla produkcji transgenicznych bioreaktorów zwierzęcych, dostarczających w ekstraktach (homogenatach) cytozolowych pituicytów lub w osoczu krwi obcogatunkowe hormony tropowe, niezbędne w terapii wielu chorób monogenowych człowieka, wywołujących wrodzone wady rozwojowe o podłożu endokrynologicznym. W rezultacie transplantacji klonalnych zarodków zrekonstruowanych z jąder komórkowych pituicytów do dróg rodnych hormonalnie zsynchronizowanych matek zastępczych urodził się koziołek klonalny. Wyniki tych eksperymentów potwierdzają, że w przedimplantacyjnych zarodkach klonalnych kozy możliwe jest pełne epigenetyczne przemodelowanie i przeprogramowanie genomu jądrowego nawet tak bardzo zróżnicowanych komórek somatycznych jak pituicyty. Szczególnie duża aktywność metaboliczna komórek części gruczołowej przysadki mózgowej jest związana z intensywną syntezą i sekrecją hormonów tropowych przez pituicyty, co skorelowane jest z bardzo szerokim i wysoce tkankowo-specyficznym profilem ekspresji genów. Z kolei zwiększenie natężenia aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego komórek endokrynnych przedniego płata przysadki zależy w dużym stopniu od obniżenia częstotliwości epigenetycznych modyfikacji, obejmujących zarówno demetylację reszt cytozyny w obrębie palindromowych sekwencji nukleotydowych DNA, jak i hiperacetylację oraz demetylację reszt lizyny histonów rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej. Wydaje się, że spadek supresji transkrypcyjnej regionów eksonowych wielu komórkowo-specyficzných genów DNA genomowego pituicytów, jak i zmniejszenie stopnia nukleosomowej represji chromatyny jądrowej powinny ułatwić proces epigenomowej rearanzacji wzorca metylacji wysp CpG oraz acetylacji i metylacji reszt lizyny białek histonowych (głównie H3 oraz H4) do epigenetycznego statusu DNA jądrowego totipotencyjnych komórek zarodkowych pochodzenia klonalnego. Jednakże niewłaściwy schemat epigenetycznego przeprogramowania somatogenicznego genomu jądrowego oraz nieprawidłowe usunięcie (tzw. wymazanie/wyzerowanie) – specyficznego dla pituicytów – rodzicielskiego piętnowania genomowego, tj. imprintingu gametycznego, warunkującego monoalleliczną ekspresję uniparentalną genów kodujących białka kluczowe dla przedimplantacyjnej fazy rozwoju klonalnych zarodków kozy, doprowadziły łącznie do wystąpienia zaawansowanych subletalnych defektów anatomiczno-histologicznych, które ujawniły się dopiero w okresie postnatalnym u koziołka klonalnego. Na skutek tych wad rozwojowych osobnik ten padł w szesnastym dniu po urodzeniu (Ohkoshi i in., 2003).

Deng i in. (2019) badali profil metylacji oraz poziom ekspresji genu *Xist* (ang. *X-inactive specific transcript*) w komórkach zarodków klonalnych, a także w komórkach fibroblastycznych z tkanki skórnej ucha, płuc i mózgu pozyskanych z tkanek padłych kóz klonalnych. Profil metylacji genu *Xist*, który jest transkrybowany do niekodującej cząsteczki mRNA, tj. transkryptu niewykazującego aktywności translacyj-

nej, był wyższy w 8-blastomerowych zarodkach klonalnych w porównaniu do profilu metylacji tego genu w zarodkach uzyskanych w wyniku zapłodnienia pozaustrojowego metodą docytoplazmatycznej iniekcji plemnika (ICSI; ang. *intracytoplasmic sperm injection*). Ponadto odnotowano zwiększony profil metylacji genu *Xist* w komórkach pochodzących z eksplantów tkankowych małżowin usznych, płuc i mózgu wyizolowanych *post mortem* od padłych 3-dniowych kozłat klonalnych płci żeńskiej w odniesieniu do osobników urodzonych w wyniku rozrodu naturalnego. Natomiast w przypadku biopłatów tkanki skórnej ucha pozyskanych od żywych maciorek klonalnych, a także w przypadku biopłatów tkanki płucnej i mózgowej pozyskanych od martwych koziołków klonalnych profil metylacji wysp CpG w obrębie regionów DMRs/ICRs genu *Xist* był niezmieniony. W związku z powyższym aktywność transkrypcyjna genu *Xist* ulegała znacznemu obniżeniu w płucach i mózgu padłych maciorek klonalnych, co skutkowało brakiem inaktywacji jednego z chromosomów X (albo pochodzenia ojcowskiego, albo matczynego) w komórkach tych dwóch narządów. Z kolei istotny wzrost ekspresji genu *Xist* stwierdzono w komórkach tkanki skórnej ucha żywych maciorek klonalnych, czego efektem była prawidłowa inaktywacja jednego z dwóch chromosomów X u tych osobników. Z badań tych wynika, że hipermetylacja oraz supresja transkrypcyjna genu *Xist*, a tym samym brak inaktywacji jednego z dwóch chromosomów X, czyli innymi słowy czynna inicjacja wzmożonej aktywności transkrypcyjnej (tj. bialleliczna nadekspresja) genów zlokalizowanych w obrębie *loci* ojcowskiego i matczynego chromosomu X u płodów żeńskich, które zostały zidentyfikowane i rozpoznane w tkankach 3-dniowych padłych maciorek, były rezultatem niekompletnego i błędnego przeprogramowania epigenetycznie uwarunkowanej aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego komórek somatycznych w klonalnych zarodkach kóz (Deng i in., 2019).

Niekompletne lub błędne epigenetyczne przeprogramowanie informacji epigenetycznej, zakodowanej w pozagenowych modyfikacjach kowalencyjnych genomu jądrowego komórek somatycznych, jest jednym z głównych czynników obniżających efektywność klonowania somatycznego mierzoną potencjałem rozwojowym *in vitro* oraz *in vivo* klonalnych zarodków ssaków, w tym kozy domowej (Wang i in., 2007; Samiec i Skrzyszowska, 2018b; Yang i in., 2018). Dość szeroko badaną modyfikacją genomu jądrowego komórek somatycznych w zarodkach klonalnych jest metylacja reszt cytozyny w obrębie wysp/dinukleotydów CpG (Samiec i Skrzyszowska, 2018a; Deng i in., 2020a, b). Han i in. (2018) wykazali, że enzymatyczna aktywność dioksygenaz 5-metylocytozyny (5-mC) DNA z rodziny demetylaz TET3 (ang. *ten-eleven translocation 3 proteins/TET 5-methylcytosine dioxygenases 3*) jest kluczowym mechanizmem molekularnym warunkującym proces aktywnej demetylacji DNA w przedimplantacyjnych zarodkach kozy uzyskanych techniką klonowania somatycznego. Znokautowanie genu *TET3* prowadzi do zahamowania czynnej (tj. niezależnej od replikacji DNA) demetylacji reszt 5-metylocytozyny (5-mC) w 2-blastomerowych zarodkach klonalnych kozy, a w rezultacie do obniżenia ekspresji genu pluripotencji *Nanog* w komórkach węzła zarodkowego blastocyst. Z kolei nadekspresja genu *TET3*, która została wywołana poprzez transgenizację hodowanych *in vitro* komórek somatycznych, skutkuje wzmożoną demetylacją reszt 5-mC DNA, redukcją ilościowego profilu reszt 5-mC, nasileniem częstości występowania reszt 5-hydroksymetylocy-

tozyny oraz zwiększeniem aktywności transkrypcyjnej kluczowych genów pluripotencji. Ponadto użycie transformowanych genetycznie komórek somatycznych wykazujących nadekspresję genu *TET3* – jako dawców jąder w procedurze rekonstrukcji enukleowanych oocytów kozy – przyczynia się do wzrostu natężenia aktywnej demetylacji reszt 5-mC DNA jądrowego komórek somatycznych, czego konsekwencją jest utrwalenie stanu hipometylacji somatogenicznego genomu w bruzdkujących zarodkach klonalnych, a także znaczące podwyższenie ich potencjału rozwojowego *in vitro* oraz *in vivo*. Wynika z tego, że nadekspresja genu *TET3* w komórkach-dawcach jąder istotnie zwiększa efektywność klonowania somatycznego kóz.

Potencjał rozwojowy zarodków klonalnych ssaków, w tym kozy domowej, które odziedziczyły skutek rekonstrukcji enukleowanych oocytów genom somatogeniczny, tj. genom jądrowy komórek somatycznych, jest w wysokim stopniu zależny od poziomu zaawansowania epigenetycznych modyfikacji DNA i histonów chromatyny jądrowej somatycznych komórek-dawców jąder, poddawanych długotrwałej hodowli *in vitro* (Yang i in., 2007; Yamanaka i in., 2009; Wan i in., 2016). Jednym ze sposobów odwrócenia zaawansowanych zmian we wzorcu kowalencyjnych modyfikacji epigenetycznych jąder komórek somatycznych, które obejmują gwałtowną metylację DNA oraz spadek ilościowego profilu acetylacji białek histonowych, wydaje się ich ekspozycja na działanie syntetycznych analogów endogennych związków odwracalnie hamujących aktywność metylotransferaz DNA (DNMTs; ang. *DNA methyltransferases*) i/lub deacetylaz histonów (HDACs; ang. *histone deacetylases*). Sugeruje się, że metodą pozwalającą na prawidłowe przeprogramowanie jąder komórek somatycznych może okazać się zastosowanie nieselektywnych związków stymulujących epigenetycznie uwarunkowaną aktywność transkrypcyjną DNA genomowego zarówno w hodowanych *in vitro* komórkach-dawcach jąder, jak i w zarodkach klonalnych. Egzogenna modulacja profilu pamięci epigenetycznej DNA genomowego może przyczynić się do cofnięcia „transkrypcyjnego zegara” jądra zróżnicowanej komórki somatycznej do statusu jądra totipotentnej lub pluripotentnej komórki zarodkowej, a zatem do przywrócenia wzorca ekspresji genów niezbędnych do uruchomienia programu rozwojowego zarodków klonalnych (Xiong i in., 2013a, b). Efektem tego jest zmniejszenie stopnia metylacji reszt cytozyny DNA oraz podwyższenie acetylacji białek histonowych chromatyny jądrowej (Zhang i in., 2007; Wang i in., 2011), co z kolei może prowadzić do przywrócenia i utrzymania prawidłowego wzorca ekspresji genów warunkujących totipotentję/pluripotencję (*Oct3/4*, *Nanog*, *c-Myc*, *Sox2*, *Klf4*, *Rex1*, *Cdx2*) oraz genów kodujących enzymy odpowiedzialne za endogenne modyfikacje epigenetyczne w przed- i poimplantacyjnej fazie rozwoju zarodkowego (DNMT1, DNMT3a/3b, HDAC1, HDAC2, HMT, HAT) (Dutta i in., 2011; Gómez i in., 2012; Hall i in., 2013). W następstwie prowadzonych w ostatnich latach badań opracowano innowacyjne i wysoko skuteczne rozwiązania ukierunkowane na modulację profilu pamięci epigenetycznej klonalnych zarodków ssaków, w tym kozy domowej, przy wykorzystaniu egzogennych związków z grupy niespecyficznych inhibitorów HDACs, takich jak trichostatyna A, kwas walproinowy czy skryptaid i/lub z grupy niespecyficznych inhibitorów DNMTs, takich jak 5-aza-2'-deoksycytidyna bądź z grupy selektywnych inhibitorów demetylaz reszt lizyny (K4) histonów H3 rdzenia nukleosomowego chromatyny jądrowej, takich jak trans-2-fenylcyklopropyloamina

(tranilcypromina; 2-PCPA). Wymienione powyżej rozwiązania znacząco ułatwiają epigenetycznie uwarunkowane przeprogramowanie aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego komórek somatycznych w rozwijających się zarodkach klonalnych. Finalnym rezultatem tych nowatorskich rozwiązań jest istotne zwiększenie przed- i/lub poimplantacyjnych kompetencji rozwojowych oraz poprawa jakości klonalnych zarodków ssaków, w tym kozy domowej (Zhao i in., 2010; Kim i in., 2011; Gómez i in., 2012; Mao i in., 2018; Samiec i in., 2019; Skrzyszowska i Samiec, 2020b).

Podsumowanie

Mimo że efektywność klonowania somatycznego kóz pozostaje na stosunkowo niskim poziomie, prowadzenie dalszych badań z tego zakresu jest konieczne ze względu na ważne implikacje tej nowoczesnej strategii wspomaganego rozrodu zwierząt dla hodowli kóz, transgeniki tego gatunku ssaków, biotechnologii rolno-spożywczej, a także dla biomedycyny i biofarmacji. Poprawa jakości generowanych zarodków klonalnych, w następstwie pełnego i prawidłowego przeprogramowania profilu pamięci epigenetycznej DNA genomowego komórek-dawców jąder, powinna skutkować wzrostem wydajności technik klonowania somatycznego wielu gatunków zwierząt gospodarskich, w tym kozy domowej. Jest to warunek niezbędny dla praktycznego wykorzystania klonowania kóz przede wszystkim do produkcji genetycznie transformowanych maciorek i kozłów na potrzeby technologii żywienia człowieka tj. nutritechnologii opartej na diecie mięsnej (transgeniczne kozy charakteryzujące się zwiększoną wydajnością mięsną wskutek komórkowej hiperplazji i hipertrofii tkanki mięśniowej szkieletowej), a także na potrzeby przemysłu biofarmaceutycznego i nutraceutycznego (transgeniczne kozy, których wymiona stanowią bioreaktory dostarczające rekombinowane ludzkie białka terapeutyczne lub mleko o zhumanizowanym składzie biochemicznym).

Piśmiennictwo

- An L., Yang L., Huang Y., Cheng Y., Du F. (2019). Generating goat mammary gland bioreactors for producing recombinant proteins by gene targeting. *Methods Mol. Biol.*, 1874: 391–401.
- Baguisi A., Behboodi E., Melican D.T., Pollock J.S., Destrempe M.M., Cammuso C., Williams J.L., Nims S.D., Porter C.A., Midura P., Palacios M.J., Ayres S.L., Denniston R.S., Hayes M.L., Ziomek C.A., Meade H.M., Godke R.A., Gavin W.G., Overström E.W., Echelard Y. (1999). Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.*, 17 (5): 456–461.
- Baldassarre H., Wang B., Kafidi N., Keefer C.L., Lazaris A., Karatzas C.N. (2002). Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production technologies. *Theriogenology*, 57 (1): 275–284.
- Baldassarre H., Keefer C., Wang B., Lazaris A., Karatzas C.N. (2003a). Nuclear transfer in goats using *in vitro* matured oocytes recovered by laparoscopic ovum pick-up. *Cloning Stem Cells*, 5 (4): 279–285.
- Baldassarre H., Wang B., Kafidi N., Gauthier M., Neveu N., Lapointe J., Sneek L., Leduc M., Duguay F., Zhou J.F., Lazaris A., Karatzas C.N. (2003b). Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of *in vitro* produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology*, 59 (3-4): 831–839.
- Baldassarre H., Wang B., Pierson J., Neveu N., Lapointe J., Cote F., Kafidi N., Keefer C.L., Lazaris A., Karatzas C.N. (2004). Prepubertal propagation of transgenic

- cloned goats by laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production. *Cloning Stem Cells*, 6 (1): 25–29.
- Behboodi E., Memili E., Melican D.T., Destrempe M.M., Overton S.A., Williams J.L., Flanagan P.A., Butler R.E., Liem H., Chen L.H., Meade H.M., Gavin W.G., Echelard Y. (2004). Viable transgenic goats derived from skin cells. *Transgenic Res.*, 13 (3): 215–224.
- Carlson D.F., Lancto C.A., Zang B., Kim E.S., Walton M., Oldeschulte D., Seabury C., Sonstegard T.S., Fahrenkrug S.C. (2016). Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. *Nat. Biotechnol.*, 34 (5): 479–481.
- Cheng Y., Wang Y.G., Luo J.P., Shen Y., Yang Y.F., Ju H.M., Zou X.G., Xu S.F., Lao W.D., Du M. (2002). Cloned goats produced from the somatic cells of an adult transgenic goat (article in Chinese). *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao (Chinese J. Biotechnol.)*, 18 (1): 79–83.
- Deng M., Ren C., Liu Z., Zhang G., Wang F., Wan Y. (2017). Epigenetic status of *H19-Igf2* imprinted genes and loss of 5-hydroxymethylcytosine in the brain of cloned goats. *Cell. Reprogram.*, 19 (3): 199–207.
- Deng M., Liu Z., Ren C., An S., Wan Y., Wang F. (2019). Highly methylated *Xist* in SCNT embryos was retained in deceased cloned female goats. *Reprod. Fertil. Dev.*, 31 (5): 855–866.
- Deng M., Liu Z., Chen B., Wan Y., Yang H., Zhang Y., Cai Y., Zhou J., Wang F. (2020a). Aberrant DNA and histone methylation during zygotic genome activation in goat cloned embryos. *Theriogenology*, 148: 27–36.
- Deng M., Zhang G., Cai Y., Liu Z., Zhang Y., Meng F., Wang F., Wan Y. (2020b). DNA methylation dynamics during zygotic genome activation in goat. *Theriogenology*, 156: 144–154.
- Dutta R., Malakar D., Khate K., Sahu S., Akshey Y., Mukesh M. (2011). A comparative study on efficiency of adult fibroblast, putative embryonic stem cell and lymphocyte as donor cells for production of handmade cloned embryos in goat and characterization of putative nES cells obtained from these embryos. *Theriogenology*, 76 (5): 851–863.
- Echelard Y., Meade H.M., Ziomek C.A. (2005). The first biopharmaceutical from transgenic animals: ATryn®. In: *Modern Biopharmaceuticals: Design, Development and Optimization*. Chapter 11. Book Editor: Dr. Jörg Knäblein, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Print ISBN: 9783527311842, Online ISBN: 9783527620982, <https://doi.org/10.1002/9783527620982.ch41>, pp. 995–1020.
- Echelard Y., Ziomek C.A., Meade H.M. (2006). Production of recombinant therapeutic proteins in the milk of transgenic animals. *BioPharm International*, 19 (8): 36–46.
- Fan Z., Yang M., Regouski M., Polejaeva I.A. (2019). Gene knockouts in goats using CRISPR/Cas9 system and somatic cell nuclear transfer. *Methods Mol. Biol.*, 1874: 373–390.
- Frock R.L., Hu J., Meyers R.M., Ho Y.J., Kii E., Alt F.W. (2015). Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. *Nat. Biotechnol.*, 33 (2): 179–186.
- Gash K.K., Yang M., Fan Z., Regouski M., Rutigliano H.M., Polejaeva I.A. (2019). Assessment of microchimerism following somatic cell nuclear transfer and natural pregnancies in goats. *J. Anim. Sci.*, 97 (9): 3786–3794.
- Gómez M.C., Biancardi M.N., Jenkins J.A., Dumas C., Galiguís J., Wang G., Earle Pope C. (2012). Scriptaid and 5-aza-2'deoxyctidine enhanced expression of pluripotent genes and *in vitro* developmental competence in interspecies black-footed cat cloned embryos. *Reprod. Domest. Anim.*, 47 (Suppl. 6): 130–135.
- Hall V., Hinrichs K., Lazzari G., Betts D.H., Hyttel P. (2013). Early embryonic development, assisted reproductive technologies, and pluripotent stem cell biology in domestic mammals. *Vet. J.* 197 (2): 128–142.
- Han C., Deng R., Mao T., Luo Y., Wei B., Meng P., Zhao L., Zhang Q., Quan F., Liu J., Zhang Y. (2018). Overexpression of *Tet3* in donor cells enhances goat somatic cell nuclear transfer efficiency. *FEBS J.*, 285 (14): 2708–2723.
- Hao F., Yan W., Li X., Wang H., Wang Y., Hu X., Liu X., Liang H., Liu D. (2018). Generation of cashmere goats carrying an *EDAR* gene mutant using CRISPR-Cas9-mediated genome editing. *Int. J. Biol. Sci.*, 14 (4): 427–436.
- Hu J.H., Davis K.M., Liu D.R. (2016). Chemical biology approaches to genome editing: understanding, controlling, and delivering programmable nucleases. *Cell Chem. Biol.*, 23 (1): 57–73.
- Iager A.E., Ragina N.P., Ross P.J., Beyhan Z., Cunniff K., Rodriguez R.M., Cibell-

- Li J.B. (2008). Trichostatin A improves histone acetylation in bovine somatic cell nuclear transfer early embryos. *Cloning Stem Cells*, 10 (3): 371–379.
- Kalds P, Zhou S., Cai B., Liu J., Wang Y., Petersen B., Sonstegard T., Wang X., Chen Y. (2019). Sheep and goat genome engineering: from random transgenesis to the CRISPR era. *Front. Genet.*, 10: 750.
- Keefer C.L., Baldassarre H., Keyston R., Wang B., Bhatia B., Bilodeau A.S., J.F., Leduc M., Downey B.R., Lazaris A., Karatzas C.N. (2001). Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and *in vitro*-matured oocytes. *Biol. Reprod.*, 64 (3): 849–856.
- 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). Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biol. Reprod.*, 66 (1): 199–203.
- Kim Y.J., Ahn K.S., Kim M., Shim H. (2011). Comparison of potency between histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid on enhancing *in vitro* development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 47 (4): 283–289.
- Kumar D., Sarkhel B.C. (2017). Differential expression pattern of key regulatory developmental genes in pre-implant zona free cloned vs *in vitro* fertilized goat embryos. *Gene Expr. Patterns.*, 25-26: 118–123.
- Liu C., Li W., Zhang X., Zhang N., He S., Huang J., Ge Y., Liu M. (2014). Knockdown of endogenous myostatin promotes sheep myoblast proliferation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 50 (2): 94–102.
- Mao T., Han C., Deng R., Wei B., Meng P., Luo Y., Zhang Y. (2018). Treating donor cells with 2-PCPA corrects aberrant histone H3K4 dimethylation and improves cloned goat embryo development. *Syst. Biol. Reprod. Med.*, 64 (3): 174–182.
- Martins L.T., Neto S.G., Tavares K.C., Calderón C.E., Aguiar L.H., Lazzarotto C.R., Ongaratto F.L., Rodrigues V.H., Carneiro Ide S., Rossetto R., Almeida A.P., Fernandes C.C., Rondina D., Dias A.C., Chies J.M., Polejaeva I.A., Rodrigues J.L., Forell F., Bertolini L.R., Bertolini M. (2016). Developmental outcome and related abnormalities in goats: comparison between somatic cell nuclear transfer- and *in vivo*-derived concepti during pregnancy through term. *Cell. Reprogram.*, 18 (4): 264–279.
- Miller J.C., Tan S., Qiao G., Barlow K.A., Wang J., Xia D.F., Meng X., Paschon D.E., Leung E., Hinkley S.J., Dulay G.P., Hua K.L., Ankoudinova I., Cost G.J., Urnov F.D., Zhang H.S., Holmes M.C., Zhang L, Gregory P.D., Rebar E.J. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat. Biotechnol.*, 29 (2): 143–148.
- Ni W., Qiao J., Hu S., Zhao X., Regouski M., Yang M., Polejaeva I.A., Chen C. (2014). Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. *PLoS One*, 9 (9): e106718.
- Niemann H., Kues W.A. (2007). Transgenic farm animals: an update. *Reprod. Fertil. Dev.*, 19 (6): 762–770.
- Ohkoshi K., Takahashi S., Koyama S., Akagi S., Adachi N., Furusawa T., Fujimoto J., Takeda K., Kubo M., Izaike Y., Tokunaga T. (2003). *In vitro* oocyte culture and somatic cell nuclear transfer used to produce a live-born cloned goat. *Cloning Stem Cells*, 5 (2): 109–115.
- Patnaik M.M., Moll S. (2008). Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia*, 14 (6): 1229–1239.
- Petersen B., Niemann H. (2015). Molecular scissors and their application in genetically modified farm animals. *Transgenic Res.*, 24 (3): 381–396.
- Reggio B.C., James A.N., Green H.L., Gavin W.G., Behboodi E., Echelard Y., Godke R.A. (2001). Cloned transgenic offspring resulting from somatic cell nuclear transfer in the goat: oocytes derived from both follicle-stimulating hormone-stimulated and nonstimulated abattoir-derived ovaries. *Biol. Reprod.*, 65 (5): 1528–1533.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2011a). Transgenic mammalian species, generated by somatic cell cloning, in biomedicine, biopharmaceutical industry and human nutrition/dietetics – recent achievements. *Pol. J. Vet. Sci.*, 14 (2): 317–328.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2011b). The possibilities of practical application of transgenic mammalian species generated by somatic cell cloning in pharmacology, veterinary medicine and xenotransplantation. *Pol. J. Vet. Sci.*, 14 (2): 329–340.

- Samiec M., Skrzyszowska M. (2018a). Can reprogramming of overall epigenetic memory and specific parental genomic imprinting memory within donor cell-inherited nuclear genome be a major hindrance for the somatic cell cloning of mammals? – a review. *Ann. Anim. Sci.*, 18 (3): 623–638.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2018b). Intrinsic and extrinsic molecular determinants or modulators for epigenetic remodeling and reprogramming of somatic cell-derived genome in mammalian nuclear-transferred oocytes and resultant embryos. *Pol. J. Vet. Sci.*, 21 (1): 217–227.
- Samiec M., Romanek J., Lipiński D., Opiela J. (2019). Expression of pluripotency-related genes is highly dependent on trichostatin A-assisted epigenomic modulation of porcine mesenchymal stem cells analysed for apoptosis and subsequently used for generating cloned embryos. *Anim. Sci. J.*, 90 (9): 1127–1141.
- Shepelev M.V., Kalinichenko S.V., Deykin A.V., Korobko I.V. (2018). Production of recombinant proteins in the milk of transgenic animals: current state and prospects. *Acta Naturae*, 10 (3): 40–47.
- Skrzyszowska M., Samiec M. (2020a). Generation of monogenetic cattle by different techniques of embryonic cell and somatic cell cloning – their application to biotechnological, agricultural, nutritional, biomedical and transgenic research. *Ann. Anim. Sci.*, in press, pp. 1–26, DOI: 10.2478/aoas-2020-0096.
- Skrzyszowska M., Samiec M. (2020b). Enhancement of *in vitro* developmental outcome of cloned goat embryos after epigenetic modulation of somatic cell-inherited nuclear genome with trichostatin A. *Ann. Anim. Sci.*, 20 (1): 97–108.
- Sung Y.H., Baek I.J., Kim D.H., Jeon J., Lee J., Lee K., Jeong D., Kim J.S., Lee H.W. (2013). Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. *Nat. Biotechnol.*, 31 (1): 23–24.
- Tesson L., Usal C., Ménoret S., Leung E., Niles B.J., Remy S., Santiago Y., Vincent A.I., Meng X., Zhang L., Gregory P.D., Anegón I., Cost G.J. (2011). Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat. Biotechnol.*, 29 (8): 695–696.
- Wan Y.J., Zhang Y.L., Zhou Z.R., Jia R.X., Li M., Song H., Wang Z.Y., Wang L.Z., Zhang G.M., You J.H., Wang F. (2012). Efficiency of donor cell preparation and recipient oocyte source for production of transgenic cloned dairy goats harboring human lactoferrin. *Theriogenology*, 78 (3): 583–592.
- Wan Y., Deng M., Zhang G., Ren C., Zhang H., Zhang Y., Wang L., Wang F. (2016). Abnormal expression of DNA methyltransferases and genomic imprinting in cloned goat fibroblasts. *Cell Biol. Int.*, 40 (1): 74–82.
- Wang F., Kou Z., Zhang Y., Gao S. (2007). Dynamic reprogramming of histone acetylation and methylation in the first cell cycle of cloned mouse embryos. *Biol. Reprod.* 77 (6): 1007–1016.
- Wang Y.S., Xiong X.R., An Z.X., Wang L.J., Liu J., Quan F.S., Hua S., Zhang Y. (2011). Production of cloned calves by combination treatment of both donor cells and early cloned embryos with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A. *Theriogenology*, 75 (5): 819–825.
- Wang X., Yu H., Lei A., Zhou J., Zeng W., Zhu H., Dong Z., Niu Y., Shi B., Cai B., Liu J., Huang S., Yan H., Zhao X., Zhou G., He X., Chen X., Yang Y., Jiang Y., Shi L., Tian X., Wang Y., Ma B., Huang X., Qu L., Chen Y. (2015). Generation of gene-modified goats targeting *MSTN* and *FGF5* via zygote injection of CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.*, 5: 13878.
- Xiong X., Lan D., Li J., Zhong J., Zi X., Ma L., Wang Y. (2013a). Zebularine and scriptaid significantly improve epigenetic reprogramming of yak fibroblasts and cloning efficiency. *Cell. Reprogram.*, 15 (4): 293–300.
- Xiong X.R., Li J., Fu M., Gao C., Wang Y., Zhong J.C. (2013b). Oocyte extract improves epigenetic reprogramming of yak fibroblast cells and cloned embryo development. *Theriogenology*, 79 (3): 462–469.
- Yamanaka K., Sugimura S., Wakai T., Kawahara M., Sato E. (2009). Acetylation level of histone H3 in early embryonic stages affects subsequent development of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos. *J. Reprod. Dev.*, 55 (6): 638–644.
- Yang F., Hao R., Kessler B., Brem G., Wolf E., Zakhartchenko V. (2007). Rabbit somatic cell cloning: effects of donor cell type, histone acetylation status and chimeric embryo complementation. *Reproduction*, 133 (1): 219–230.
- Yang M., Perisse I., Fan Z., Regouski M., Meyer-Ficca M., Polejaeva I.A. (2018). Increased pregnancy losses following serial somatic cell nuclear transfer in goats. *Reprod. Fertil. Dev.*, 30 (11): 1443–1453.

- Yu B., Lu R., Yuan Y., Zhang T., Song S., Qi Z., Shao B., Zhu M., Mi F., Cheng Y. (2016). Efficient TALEN-mediated myostatin gene editing in goats. *BMC Dev. Biol.*, 16 (1): 26.
- Yuan Y.G., Song S.Z., Zhu M.M., He Z.Y., Lu R., Zhang T., Mi F., Wang J.Y., Cheng Y. (2017). Human lactoferrin efficiently targeted into caprine beta-lactoglobulin locus with transcription activator-like effector nucleases. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, 30 (8): 1175–1182.
- Zhang Y., Li J., Villemoes K., Pedersen A.M., Purup S., Vajta G. (2007). An epigenetic modifier results in improved *in vitro* blastocyst production after somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*, 9 (3): 357–363.
- Zhang C., Wang L., Ren G., Li Z., Ren C., Zhang T., Xu K., Zhang Z. (2014). Targeted disruption of the sheep *MSTN* gene by engineered zinc-finger nucleases. *Mol. Biol. Rep.*, 41 (1): 209–215.
- Zhang Y.L., Zhang G.M., Wan Y.J., Jia R.X., Li P.Z., Han L., Wang F., Huang M.R. (2015). Identification of transgenic cloned dairy goats harboring human lactoferrin and methylation status of the imprinted gene *IGF2R* in their lungs. *Genet. Mol. Res.*, 14 (3): 11099–11108.
- Zhang T., Yuan Y., Lu R., Xu S., Zhou M., Yuan T., Lu Y., Yan K., Cheng Y. (2019a). The goat β -casein/CMV chimeric promoter drives the expression of hLF in transgenic goats produced by cell transgene microinjection. *Int. J. Mol. Med.*, 44 (6): 2057–2064.
- Zhang J., Liu J., Yang W., Cui M., Dai B., Dong Y., Yang J., Zhang X., Liu D., Liang H., Cang M. (2019b). Comparison of gene editing efficiencies of CRISPR/Cas9 and TALEN for generation of *MSTN* knock-out cashmere goats. *Theriogenology*, 132: 1–11.
- Zhao J., Hao Y., Ross J.W., Spate L.D., Walters E.M., Samuel M.S., Rieke A., Murphy C.N., Prather R.S. (2010). Histone deacetylase inhibitors improve *in vitro* and *in vivo* developmental competence of somatic cell nuclear transfer porcine embryos. *Cell. Reprogram.*, 12 (1): 75–83.
- Zhou Z.R., Zhong B.S., Jia R.X., Wan Y.J., Zhang Y.L., Fan Y.X., Wang L.Z., You J.H., Wang Z.Y., Wang F. (2013). Production of myostatin-targeted goat by nuclear transfer from cultured adult somatic cells. *Theriogenology*, 79 (2): 225–233.
- Zhu H., Hu L., Liu J., Chen H., Cui C., Song Y., Jin Y., Zhang Y. (2016). Generation of β -lactoglobulin-modified transgenic goats by homologous recombination. *FEBS J.*, 283 (24): 4600–4613.
- Zou X., Wang Y., Cheng Y., Yang Y., Ju H., Tang H., Shen Y., Mu Z., Xu S., Du M. (2002). Generation of cloned goats (*Capra hircus*) from transfected foetal fibroblast cells, the effect of donor cell cycle. *Mol. Reprod. Dev.*, 61 (2): 164–172.

Zatwierdzono do druku: 24 XI 2020

MARIA SKRZYSZOWSKA, MARCIN SAMIEC

Application potential of cloning goats by somatic cell nuclear transfer in agriculture, transgenics, agri-food biotechnology, biomedicine and biopharmaceutical industry

SUMMARY

Domestic goat as a species with a relatively great biodiversity of dairy and meat breeds, which are characterized by high genetic merit and yield of milk and meat production, can be a tremendously valuable tool for transgenic research. This latter is based on genetically engineered cloned specimens that have been generated and multiplied by applying one of the most dynamically developing assisted reproductive technologies, i.e., somatic cell nuclear transfer (SCNT). The primary goal of our paper is to demonstrate the progress and the state-of-the-art achievements focused on elaboration of innovative and highly efficient solutions used for creation of transgenic cloned does and bucks. Moreover, this paper aims to present

the perspectives of approaches for producing genetically transformed SCNT-derived goats not only for the purposes of modern livestock breeding, nutritional biotechnology, agri-food industry but also for the purposes of pharmacology and biomedicine.

Key words: cloned goat, somatic cell nuclear transfer, livestock breeding, transgenics, nutritional biotechnology, agri-food industry, pharmacology, biomedicine