

Transgeniczne króliki – uzyskiwanie oraz kierunki wykorzystania

Anna Skrobiszewska

*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,
Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa
e-mail.: askrobiszewska@izoo.krakow.pl*

Mianem zwierząt transgenicznych określamy zwierzęta, u których zmieniono gatunkowo specyficzny genom poprzez wprowadzenie egzogennej DNA o dowolnym pochodzeniu (tzw. transgeny). Modyfikacje genetyczne wprowadzane u zwierząt gospodarskich mogą dotyczyć uzyskania określonych cech hodowlanych, takich jak poprawa jakości mięsa świńskiego lub cech, które zostaną wykorzystane na potrzeby przemysłu farmaceutycznego czy biomedycyny.

Pierwsze doniesienia dotyczące uzyskania transgenicznych królików pojawiły się w połowie lat 80. ubiegłego wieku i stanowiły przełom w rozwoju badań nad wykorzystaniem tych zwierząt jako bioreaktorów oraz jako modeli ludzkich chorób. Do produkowania transgenicznych królików stosuje się współcześnie takie metody, jak: mikroiniekcja DNA i klonowanie somatyczne. Podejmowane są również próby wykorzystania transfekowanych plemników jako nośników egzogennej DNA w celu uzyskania transgenicznych królików.

Wykorzystanie królików w badaniach biomedycznych

Króliki są zwierzętami łatwymi do hodowli, płodnymi i plennymi. Cięża trwa u nich 28–31 dni, a czas osiągnięcia dojrzałości płciowej jest stosunkowo krótki – około 5 miesięcy. Ponadto, od królików można uzyskiwać potomstwo kilkakrotnie w ciągu roku. Wspomniane cechy powodują, że królik jest gatunkiem coraz częściej

wykorzystywanym do modyfikacji, mających na celu uzyskanie transgenicznych osobników, służących jako modele ludzkich chorób lub jako żywe fabryki (bioreaktory) białek o znaczeniu terapeutycznym.

Coraz częściej króliki odgrywają istotną rolę w poznaniu przyczyn i przebiegu oraz w procesie poszukiwania sposobów leczenia takich chorób, jak: miażdżyca, cukrzyca, nowotwory czy kardiomiopatia przerostowa (Bosze i in., 2003; Fan i Watanabe, 2003). Transgeniczne ssaki, w tym króliki, są najlepszymi bioreaktorami ze względu na zdolność przeprowadzania potranslacyjnych modyfikacji, prowadzących do uzyskania aktywnych biologicznie białek (Wells, 2010). W trakcie jednego roku samica królika może mieć 8 laktacji, trwających średnio po 4–5 tygodni. Od jednej samicy królika w czasie jednej laktacji można uzyskać około 1 litr mleka. Jest to ilość wystarczająca do uzyskania 1 kg białka o działaniu terapeutycznym w skali 1 roku (Lipiński i in., 2008). Do tej pory uzyskano króliki produkujące w mleku takie substancje, jak: ludzki hormon wzrostu – GH (z ang. growth hormone) (Lipiński i in., 2003), ludzki czynnik wzrostu nerwów β – hNGF β (z ang. human nerve growth factor β) (Coulibaly i in., 1999) oraz ludzką erytropoetynę (Rodriguez i in., 1995).

Metody uzyskiwania transgenicznych królików

Najczęściej stosowaną metodą produkcji transgenicznych królików jest mikroiniekcja

DNA do przedjądrza zapłodnionej komórki jajowej. Metoda ta jest skomplikowana, a jej wydajność nie przekracza 4% osobników transgenicznych uzyskanych w odniesieniu do zygot poddanych mikroiniekcji (Jura i in., 2010). W związku z tym stosuje się różnego rodzaju modyfikacje w celu zwiększenia efektywności tej metody mikroiniekcji. Ponadto, rozwijane są alternatywne metody transgenezy, takie jak: klonowanie somatyczne, a także podejmowane próby wykorzystania plemników jako nośników egzogenego DNA.

Mikroiniekcja DNA

Mikroiniekcja DNA jest najstarszą metodą transfekcji wykorzystywaną do produkowania transgenicznych zwierząt. Polega na wprowadzeniu konstrukcji genowej do przedjądrza zapłodnionej komórki jajowej. Wydajność tej metody zależy od wielu czynników, takich jak stężenie DNA, czystość roztworu DNA i forma wprowadzanego wektora: kolisty lub liniowej z tępych lub lepkich końcami. Istotną jest również wielkość wprowadzanego konstruktów genowego. Im dłuższy odcinek DNA jest wprowadzany, tym mniejsze jest prawdopodobieństwo integracji (Brinster i in., 1985; Smorąg i Słomski, 2005). Pierwsze próby uzyskania transgenicznych królików metodą mikroiniekcji DNA zostały przeprowadzone przez Brema i in. oraz Hammera i in. w 1985 r. W doświadczeniach tych do przedjądrza zapłodnionej komórki jajowej królika wprowadzono gen kodujący ludzki hormon wzrostu – GH (z ang. growth hormone) pod kontrolą promotora mysiej metalotioneiny (Brem i in., 1985; Hammer i in., 1985). Były to pionierskie prace, które wykazały możliwość wykorzystania królika jako żywego bioreaktora.

Z powodu niskiej wydajności klasycznej metody mikroiniekcji DNA, wynoszącej u królików 4% osobników transgenicznych możliwych do uzyskania w odniesieniu do liczby zygot poddanych mikroiniekcji (Jura i in., 2010), wprowadza się modyfikacje, mające na celu zwiększenie jej efektywności. Jedną z nich jest mikroiniekcja konstruktów genowych do obydwu przedjądrzy zapłodnionej komórki jajowej (Chrenek i in., 2005). Badania wykazały, że czę-

stość integracji konstruktów genowych przy zastosowaniu tej techniki jest większa. Ponadto, transgeniczne samice, otrzymane w wyniku mikroiniekcji do obydwu przedjądrzy produkują więcej określonego białka w mleku niż samice otrzymane w wyniku mikroiniekcji do jednego z przedjądrzy (Chrenek i in., 2005).

Jura i in. (2010) porównali skuteczność metod: klasycznej mikroiniekcji oraz lipomikroiniekcji. Lipomikroiniekcja jest modyfikacją standardowej mikroiniekcji DNA, w której do transportu DNA do przedjądrza wykorzystuje się liposomy. W transfekcji komórek somatycznych dodatkowo naładowane liposomy umożliwiają transport transgenów przez błonę komórkową i jego integrację z jądrowym DNA. Zygoty otoczone są osłonką przejrzystą, która uniemożliwia przenikanie kompleksu liposomy – DNA, dlatego konieczne jest wprowadzenie mieszaniny liposomów i DNA do przestrzeni okołozółtkowej. Pomimo że metoda lipomikroiniekcji jest prostsza w wykonaniu i w mniejszym stopniu uszkadza transfekowane zygoty, okazała się jednak mniej efektywna od klasycznej mikroiniekcji. Liczba blastocyst wykazujących ekspresję transgenów jest dwukrotnie niższa w porównaniu do liczby transgenicznych blastocyst uzyskanych przy pomocy klasycznej metody mikroiniekcji. Badania te prowadzone były na zarodkach uzyskanych *in vitro*, dlatego też trudno jest jednoznacznie określić, która z metod umożliwiłaby efektywniejszą produkcję transgenicznych osobników (Jura i in., 2010).

W pracach nad poprawieniem wydajności procesu transgenezy duże nadzieje wiąże się z wykorzystaniem wektorów lentiwirusowych. Ich zaletą jest możliwość wprowadzenia do komórki somatycznej kilku genów jednocześnie. W przypadku zygot osłonka przejrzysta stanowi barierę uniemożliwiającą wnikięcie lentiwirusów do cytoplazmy. Dlatego też, przy zastosowaniu tego typu wektorów do transfekcji zygot konieczne jest wprowadzanie ich do przestrzeni okołozółtkowej. Wektory lentiwirusowe są przygotowywane w taki sposób, aby wyeliminować zjadliwość wirusa, a wykorzystać jego naturalną predyspozycję do wprowadzania DNA lub RNA do jądra komórki (Park, 2007; Jura i in., 2008). Hiripi i in. (2010) dokonali udanej próby transfekcji zygot królika za pomocą lentiwirusów. Jako wektora użyto

zmodyfikowanego małpiego wirusa nabytego upośledzenia odporności SIV (z ang. simian immunodeficiency virus), niezdolnego do replikacji z podłączonym genem kodującym białko GFP (z ang. green fluorescence protein). W wyniku mikroiniekcji tego konstruktów do przestrzeni okołożółtkowej zygot przeniesieniu zarodków do samic biorczyń otrzymano 87 młodych królików. Po analizie molekularnej metodą PCR stwierdzono ekspresję genu GFP u 28 młodych. U transgenicznych samców zaobserwowano również transmisję transgenów do komórek linii płciowej (Hiripi i in., 2010).

Klonowanie somatyczne

Kiedy w 1996 r. naukowcom udało się sklonować owcę Dolly, nastąpił dynamiczny rozwój badań nad udoskonaleniem metody klonowania somatycznego – SCNT (z ang. somatic cell nuclear transfer). Technika ta polega na transplatacji jądra komórki somatycznej do pozbawionego własnego materiału genetycznego, czyli wyjądrzonego (enukleowanego) oocytu w stadium metafazy II podziału mejotycznego (oocyt Met II). Technika klonowania somatycznego udało się do tej pory uzyskać wiele gatunków ssaków. Efektywność tej metody jest jednak niska i nie przekracza 5% urodzonych zwierząt w stosunku do liczby rekonstruowanych oocytów. U królików maksymalnie 3% zarodków, uzyskanych w procesie klonowania somatycznego i przeniesionych do biorczyń, rozwija się w żywe potomstwo (Meng i in., 2009). Szczególnie istotnym czynnikiem wpływającym na efektywność klonowania jest odpowiedni dobór faz cyklu komórkowego komórki biorcy jądra i komórki dawcy jądra (Modliński i Karasiewicz, 2001). W klonowaniu somatycznym ssaków najczęściej stosuje się jako dawców jąder komórki w fazie spoczynku (faza G₀). Charakteryzują się one obniżonym poziomem transkrypcji, degradacją większości rodzajów mRNA, zmianami w polirybosomach oraz kondensacją chromatyny. Aby uzyskać komórki dawczynie jąder w tej fazie, poddaje się je procesowi „głodzenia”, czyli hoduje się je w pożywce z bardzo niską zawartością surowicy (Modliński i Karasiewicz, 2001; Li i in.,

2006). Sklonowane króliki uzyskano używając jąder pozyskanych z „głodzonych” dojrzałych fibroblastów (Li i in., 2006, 2009 b), jak i z „głodzonych” fibroblastów płodowych (Li i in., 2009 a). Chesne i in. (2002) sklonowali królika używając jąder pochodzących z komórek pęcherzykowych wzgórka jajonośnego. Komórki te naturalnie wchodzi w fazę G₀/G₁ i nie wymagają eksperymentalnego wprowadzania w stan spoczynku (Wakayama i in., 1998).

Wiek enukleowanych oocytów jest kolejnym czynnikiem wpływającym na prawidłowe przeprogramowanie jądra dawcy, a tym samym na wydajność klonowania somatycznego (Cervera i García-Ximénez, 2002). Du i in. (2009) użyli jako biorców jąder enukleowane oocyty pobrane 10, 12, 14 i 16 h po indukcji owulacji. Transfer zarodków klonalnych, które rozwinęły się z enukleowanych oocytów pobranych 12 h po indukcji owulacji, do których wprowadzono jądra komórek wzgórka jajonośnego, był najbardziej efektywny i skutkowało uzyskaniem 2 osobników (jednego martwego i jednego żywego) (Du i in., 2009).

Perspektywa wykorzystania transfekowanych *in vitro* komórek (komórek transgenicznych) jako dawców jąder oraz perspektywa klonowania genetycznie zmodyfikowanych zwierząt powoduje, że proponowane są nowe podejścia badawcze, mające na celu podniesienie efektywności SCNT, a tym samym wydajności procesu transgenezy. Jednym z nich jest metoda klonowania blastomerowego. W 2006 r. w Instytucie Zootechniki PIB w Balicach po raz pierwszy uzyskano tą metodą transgenicznego królika. W eksperymencie użyto jąder fibroblastów dorosłej transgenicznej samicy królika, produkującej w gruczole mlekowym ludzki hormon wzrostu. Jądro dojrzałego fibroblastu uzyskanego z tkanki usznej transgenicznej samicy wprowadzono do enukleowanego blastomeru 2-komórkowego zarodka. Jądro drugiego blastomeru pozostało nietknięte. 217 sklonowanych zarodków przeniesiono do 9 samic biorczyń, uzyskując 24 króliki. Analiza molekularna wykazała u 2 osobników (jeden martwy) obecność genu ludzkiego hormonu wzrostu. Sklonowany tą metodą transgeniczny królik NT20 nie wykazywał nieprawidłowości anatomicznych i fizjologicznych (Skrzysowska i in., 2006).

Transfekowane plemniki jako nośniki egzogenego DNA

Historia badań nad transfekcją plemników sięga 1971 r., kiedy to Bracket i in. wykazali, że plemniki królika pozbawione osocza wiążą obcy DNA, pochodzący od wirusa SV40 i przekazują go w czasie zapłodnienia do oocytów (Bracket i in., 1971; Wang i in., 2003). Jednak, efektywność pobierania i integracji obcego DNA przez plemniki utrzymuje się na niskim poziomie. Dlatego też, ciągle poszukuje się metod, które pozwoliłyby na podniesienie efektywności transfekcji plemników, a tym samym transgenezy. Jedną ze stosowanych metod transfekcji plemników jest lipofekcja. Wykorzystuje ona elektrostatyczne oddziaływanie między liposomami obdarzonymi dodatnim ładunkiem a DNA obdarzonym ładunkiem ujemnym, co umożliwia stworzenie kompleksu DNA – liposom, zdolnego do wnikięcia do wnętrza komórki na drodze endocytozy. Wang i in. (2003) wykazali, że użycie odpowiedniej proporcji liposomów i plazmidowego DNA znacznie zwiększa efektywność transfekcji plemników. Natomiast, obecność w pożywce białek surowicy bydlęcej skutecznie hamuje ten proces. Stosując plazmidowy DNA i lipofektaminę w proporcjach 1 : 2 i 1 : 3 uzyskano 66% plemników wykazujących integrację egzogenego DNA. Po przeprowadzeniu procesu zapłodnienia pozaustrojowego z wykorzystaniem tak uzyskanych plemników otrzymano największy odsetek dzielących się zarodków, blastocyst i osobników transgenicznych. W badaniach tych wykazano, że zastosowanie 6-krotnie większej objętości lipofektaminy w stosunku do plazmidowego DNA w sposób znaczący hamuje ruchliwość plemników (Wang i in., 2003).

Inną alternatywną techniką wykorzystującą plemniki jako nośniki egzogennej informacji genetycznej jest iniekcja DNA do kanalików nasiennych jąder samców. Wprowadzone w ten sposób DNA jest sprawnie pobierane przez komórki nabłonkowe najądrzy oraz plemniki najądrzowe (Sato i in., 2002; Jurkiewicz, 2006). W badaniach przeprowadzonych przez Shena

i n. (2006) mieszaninę liniowego i kolistego plazmidu wprowadzono do obydwu jąder samca królika. Następnie, samce te krzyżowano z nietransgenicznymi samicami. Uzyskano 89 transgenicznych królików, w tym samice wykazujące ekspresję transgeny w gruczole mlekowym.

Kolejną metodą, którą opracowano w ostatnich latach, jest zastosowanie techniki ICSI (z ang. intracytoplasmic sperm injection) do wprowadzania plemników transfekowanych egzogenym DNA. Jest ona z powodzeniem stosowana u myszy (Moreira i in., 2004, 2007). Li i in. (2010) badali efektywność tej metody na zarodkach króliczych. Analiza molekularna wykazała ekspresję genu markerowego GFP w zarodkach od stadium 2-komórkowego do stadium blastocysty. Ponadto, porównano wpływ różnych pożywek (TCM199, DM, DPBS, CZB, i CZB) oraz ich pH, a także wpływ stężenia i onformacji plazmidu na włączanie egzogenego DNA przez plemniki. Odsetek plemników, które zintegrowały obcy DNA, wynosił dla kolejnych pożywek: TCM199, DM, DPBS, CZB i HCZB – 90,0, 92,7, 91,0, 91,7 i 92,3%. Wartości pH pożywek, wahające się między 5,4 i 9,4 oraz stężenie plazmidu (między 5, 10 i 20 ng/μl) nie obniżyły efektywności integracji egzogenego DNA w plemnikach (Li i in., 2010).

Podsumowanie

Do produkowania transgenicznych królików stosuje się takie metody, jak: mikroiniekcja DNA i klonowanie somatyczne. Podejmowane są również próby wykorzystania plemników jako nośników egzogenego DNA.

Pomimo intensywnych badań prowadzonych nad udoskonalaniem metod transgenezy podstawowym problemem, wymagającym rozwiązania, wciąż pozostaje niska efektywność procesu. Dlatego też, konieczne jest kontynuowanie badań, ukierunkowanych na poprawienie wydajności procesu transgenezy w celu szerszego jej zastosowania w przemyśle farmaceutycznym i biomedycynie.

Literatura

Bosze Z., Hiripi L., Carnwath J.W., Niemann H. (2003). The transgenic rabbit as model for human

diseases and as a source of biologically active recombinant proteins. *Transgenic Res.*, 12 (5): 541–553.

- Brackett B.G., Baranska W., Sawicki W., Koprowski H. (1971). Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68: 353–357.
- Brem G., Brenig B., Goodman H.M., Selden R.C., Graf F., Kruff B., Springman K., Hondele J., Meyer J., Winnacker E.L., Kraublich H. (1985). Production of transgenic mice, rabbits, and pigs by microinjection into pronuclei. *Zuchthygiene*, 20: 251–252.
- Brinster R.L., Chen H.Y., Trumbauer M.E., Yaglet M.K., Palmiter R.D. (1985). Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4438–4442.
- Cervera R.P., García-Ximénez F. (2002). Oocyte age and nuclear donor cell type affect the technical efficiency of somatic cloning in rabbits. *Zygote*, 11 (2): 151–158.
- Chesne P., Adenot P.G., Viglietta C., Baratte M., Boulanger L., Renard J.P. (2002). Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat. Biotechnol.*, 20: 366–369.
- Chrenek P., Vasicek D., Makarevich A.V., Jurcik R., Suvegova K., Parkanyi V., Bauer M., Rafay J., Batorova A., Paleyanda R.K. (2005). Increased transgene integration efficiency upon microinjection of DNA into both pronuclei of rabbit embryos. *Transgenic Res.*, 14 (4): 417–428.
- Coulibaly S., Besenfelder U., Fleischmann M., Zinovieva N., Grossmann A., Wozny M., Bartke I., Tögel M., Müller M., Brem G. (1999). Human nerve growth factor beta (hNGF-beta): mammary gland specific expression and production in transgenic rabbits. *FEBS Lett.*, 444: 111–116.
- Du F., Xu J., Zhang J., Gao S., Carter M.G., He C., Sung L., Chaubal S., Fissore R.A., Tian X.C., Yang X., Chen Y.E. (2009). Beneficial effect of young oocytes for rabbit somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*, 11 (1): 131–140.
- Fan J., Watanabe T. (2003). Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models. *Pharmacol. Ther.*, 99: 261–282.
- Hammer R.E., Pursel V.G., Rexroad C.E. Jr., Wall R.J., Bolt D.J., Ebert K.M., Palmiter R.D., Brinster R.L. (1985). Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 315: 680–683.
- Hiripi L., Negre D., Cosset F.L., Kvell K., Czömpöly T., Baranyi M., Góczy E., Hoffmann O., Bender B., Bosze Z. (2010). Transgenic rabbit production with simian immunodeficiency virus-derived lentiviral vector. *Transgenic Res.*, 19 (5): 799–808.
- Jura J., Lipiński D., Słomski R., Smorąg Z. (2008). Kierunki i metody w transgenezie zwierząt gospodarskich. W: *Od genomu tura po ksenotransplantacje*. Ośrodek Wydawnictw Naukowych, Poznań, ss. 77–87.
- Jura J., Jura J., Ryńska B., Smorąg Z. (2010). Comparison of transfection methods for rabbit zygotes. *Ann. Anim. Sci.*, 10 (4): 425–430.
- Jurkiewicz J. (2006). Plemniki jako wektory DNA w uzyskiwaniu zwierząt transgenicznych. *Biotechnologia*, 1 (72): 29–43.
- Li Q., Hou J., Wang S., Chen Y., An X.R. (2010). Production of transgenic rabbit embryos through intracytoplasmic sperm injection. *Zygote*, 18 (4): 301–307.
- Li S., Chen X., Fang Z., Shi J., Sheng H.Z. (2006). Rabbits generated from fibroblasts through nuclear transfer. *Reproduction*, 131: 1085–1090.
- Li S., Chen X., Shi J., Guo Y., Yin C., Du L., Sheng H.Z. (2009 a). Cloning rabbits from fetal fibroblasts. *Livest. Sci.*, 122: 77–80.
- Li S., Guo Y., Shi J., Yin C., Xing F., Xu L., Zhang C., Liu T., Li Y., Li H., Du L., Chen X. (2009 b). Transgene expression of enhanced green fluorescent protein in cloned rabbits generated from *in vitro*-transfected adult fibroblasts. *Transgenic Res.*, 18: 227–235.
- Lipiński D., Jura J., Kalak R., Pławski A., Kala M., Szałata M., Jarmuż M., Korcz A., Słomska K., Jura J., Groniek P., Smorąg Z., Pieńkowski M., Słomski R. (2003). Transgenic rabbit producing human growth hormone in milk. *J. Appl. Genet.*, 44: 165–174.
- Lipiński D., Zeyland J., Szałata M. (2008). Produkcja biofarmaceutyków z wykorzystaniem transgenicznych zwierząt. W: *Od genomu tura po ksenotransplantacje*. Ośrodek Wydawnictw Naukowych, Poznań, ss. 103–108.
- Meng Q., Polgar Z., Liu J., Dinnyes A. (2009). Live birth of somatic cell-cloned rabbits following tri-chostatin A treatment and cotransfer of parthenogenetic embryos. *Cloning Stem Cells*, 11 (1): 203–208.

Modliński J.A., Karasiewicz J. (2001). Klonowanie somatyczne ssaków. *Medycyna Wieku Rozwojowego*, 5 (1): 9–25.

Moreira P.N., Giraldo P., Cozar P., Pozueta J., Jiménez A., Montoliu L., Gutiérrez-Adán A. (2004). Efficient generation of transgenic mice with intact yeast artificial chromosomes by intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.*, 71 (6): 1943–1947.

Moreira P.N., Pozueta J., Pérez-Crespo M., Valdivieso F., Gutiérrez-Adán A., Montoliu L. (2007). Improving the generation of genomic-type transgenic mice by ICSI. *Transgenic Res.*, 16 (2): 163–168.

Park F. (2007). Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? *Physiol. Genomics*, 31: 159–173.

Rodriguez A., Castro F.O., Aguilar A., Ramos B., Del Barco D.G., Leonart R., De la Fuente J. (1995). Expression of active human erythropoietin in the mammary gland of lactating transgenic mice and rabbits. *Biol. Res.*, 28 (2): 141–153.

Sato M., Ishikawa A., Kimura M. (2002). Direct injection of foreign DNA into mouse testis as a possible *in vivo* gene transfer system via epididymal spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, 61: 49–56.

Shen W., Li L., Pan Q., Min L., Dong H., Deng J. (2006). Efficient and simple production of transgenic mice and rabbits using the new DMSO-sperm mediated exogenous DNA transfer method. *Mol. Reprod. Dev.*, 73 (5): 589–594.

Skrzyszowska M., Smorąg Z., Słomski R., Kątska-Książkiewicz L., Kalak R., Michalak E., Wielgus K., Lehmann J., Lipiński D., Szalata M., Pławski A., Samiec M., Jura J., Gajda B., Ryńska B., Pieńkowski M. (2006). Generation of transgenic rabbits by the novel technique of chimeric somatic cell cloning. *Biol. Reprod.*, 74: 1114–1120.

Smorąg Z., Słomski R. (2005). Ksenotransplantacja – możliwości i ograniczenia. *Nauka*, 4: 133–148.

Wakayama T., Perry A.C.F., Zuccotti M., Johnson K.R., Yanagimachi R. (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394: 369–374.

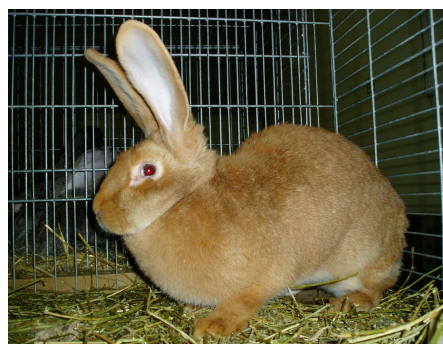
Wang H.J., Lin A.X., Chen Y.F. (2003). Association of rabbit sperm cells with exogenous DNA. *Anim. Biotechnol.*, 14: 155–165.

Wells D.J. (2010). Genetically modified animals and pharmacological research. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 199: 213–226.

TRANSGENIC RABBITS – PRODUCTION AND METHODS OF USE

Summary

Because of the similarity of many physiological characteristics to those of humans and ease of breeding, rabbits are increasingly used as model animals. Many experiments conducted on transgenic rabbits provided a new insight into etiology and course of various human diseases. Furthermore, these animals can be used as living bioreactors producing therapeutic proteins. Currently, transgenic rabbits are produced using methods such as pronuclear microinjection of DNA into a fertilized egg or somatic cell nuclear transfer. In addition, attempts have been made to use sperm cells as the carriers of exogenous DNA.



Króliki rasy: holicki niebieski i belgijski olbrzym żółty – *Blue Holicki and Sandy Flemish Giant rabbits* (fot. D. Kowalska)