

ANDRZEJ K. TARKOWSKI

Zakład Embriologii, Instytut Zoologii, Uniwersytet Warszawski

Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-927 Warszawa

E-mail: AKT@plearn.edu.pl

KLONOWANIE I KLONY ZWIERZĄT

Bezpośrednią przyczyną obserwowanego ostatnio zainteresowania zjawiskiem i technikami klonowania ssaków, było doniesienie o urodzeniu się owcy Dolly, która powstała w wyniku wszczepienia jądra komórki pochodzącej z tkanki gruczołu mlekowego dorosłej owcy do komórki jajowej pozbawionej własnego ja-

dra. Zanim omówię dokładniej to doświadczenie oraz jego znaczenie teoretyczne i praktyczne, należy sprecyzować, co rozumiemy przez „klon” i „klonowanie”, a następnie przedstawić tło historyczne i metodyczne tego eksperymentu, oraz zastanowić się, w jaki sposób klony powstają samorzutnie w świecie zwierząt.

TERMINOLOGIA

Klon oznacza grupę składającą się co najmniej z dwóch komórek lub osobników, które są identyczne pod względem genetycznym. Przez klonowanie rozumiemy wszelkiego rodzaju zabiegi eksperymentalne, mające na celu uzyskanie klonu. Klonem będą dwie komórki, lub wiele komórek powstałych w wyniku kolejnych podziałów mitotycznych jednej komórki macierzystej, naturalnie pod warunkiem, że w którymś momencie nie zaszła jakaś zmiana genetyczna, prowadząca do powstania dwóch, różniących się od siebie subpopulacji komórek. Klonem będzie grupa pierwotniaków (jednokomórkowych organizmów), powstała w wyniku kolejnych podziałów mitotycznych organizmu macierzystego, a więc bez udziału procesów płciowych. Klonem będą organizmy tkankowe powstałe w wyniku rozrodu bezpłciowego, dokonującego się na drodze podziału całego organizmu na dwa lub więcej organizmów potomnych, w wyniku pączkowania lub tworzenia różnego rodzaju form przetrwalnikowych. W końcu klonem będą bliźnięta jednojajowe oraz Dolly i dorosła samica, z której pochodził

genom Dolly. Te dwa ostatnie przykłady pokazują, że osobniki klonu mogą być w tym samym wieku, wtedy gdy powstają w wyniku jednego wydarzenia rozwojowego, które jednocześnie niejako „unicestwia” macierzystą komórkę, zarodek lub dorosły organizm, ale mogą również różnić się wiekiem wtedy, gdy nowy osobnik powstaje na drodze bezpłciowej z osobnika dorosłego, który nadal kontynuuje swój byt osobniczy. Na zakończenie tych rozważań terminologicznych jeszcze jedna uwaga. W artykułach prasowych i popularno — naukowych (ale również w literaturze fachowej), zarówno polskich jak i obcojęzycznych, można spotkać się ze stosowaniem terminu „klon” na określenie osobnika powstałego w wyniku klonowania. Nie jest to właściwe, ponieważ, jak to wyjaśniałem uprzednio, termin ten powinno się odnosić wyłącznie do grupy, choćby składała się ona tylko z dwóch osobników (komórek). Nie wykluczam jednak, że takie stosowanie tego terminu zostanie wymuszone przez potoczny język i w końcu zostanie powszechnie przyjęte.

O KLONACH POWSTAJĄCYCH SAMORZUTNIE PODCZAS ROZWOJU EMBRIONALNEGO

Nie będę omawiał różnych sposobów rozmnażania bezpłciowego organizmów dorosłych,

które zasygnalizowałem powyżej, a które prowadzą do powstania mniej lub bardziej licznych

klonów. Chciałbym natomiast omówić niektóre przykłady powstawania klonów podczas rozwoju embrionalnego, wtedy, gdy z jednego zarodka powstają dwa lub więcej zarodków, a w konsekwencji osobników. Zjawisko takie nazywamy poliembrionią. Choć występuje ono u szeregu grup zwierzęcych ograniczyć się do ssaków, najwięcej uwagi poświęcając człowiekowi.

SSAKI

Bliznięta jednojajowe (w przeciwieństwie do bliźniąt dwujajowych tylko one są genetycznym klonem) występują zapewne u wszystkich gatunków ssaków, ale u gatunków dzikożyjących, a szczególnie u tych, które zwykle rodzą kilkoro młodych, wykrycie ich jest najczęściej niemożliwe. Jedynie u zwierząt laboratoryjnych, gospodarskich lub dzikich, ale rozmnażających się pod kontrolą, na przykład w ogrodach zoologicznych, przypadki urodzenia się bliźniąt jednojajowych mogą zostać ewentualnie wykryte, ale nawet wówczas genetyczną identyczność rodzeństwa można potwierdzić jedynie w oparciu o szczegółowe badania serologiczne i biochemiczne.

Bliznięta u człowieka

Najbardziej miarodajne dane dotyczą bliźniąt ludzkich urodzonych w krajach rozwiniętych, w których większość porodów odbywa pod nadzorem położników, a ocena stopnia podobieństwa rodzeństwa jest znacznie łatwiejsza niż w przypadku zwierząt, i to zarówno „na oko”, jak i dzięki możliwości wykorzystania wielu markerów serologicznych i biochemicznych. Ze względu na znacznie większą obfitość i wiarygodność danych dotyczących tego zjawiska u człowieka niż jakiegokolwiek innego gatunku ssaków, jak również ze względu na zupełnie zrozumiałe nasze szczególne zainteresowanie własnym gatunkiem, zagadnienie bliźniąt jednojajowych — tego najmniejszego klonu genetycznego — omówię na przykładzie *Homo sapiens*.

Bliznięta jednojajowe nazywa się również monozygotycznymi, co oznacza, że wywodzą się one z jednej zapłodnionej komórki jajowej — zygoty. Te dwa określenia są więc synonimiczne. Stosuje się czasami również termin „bliźnięta monochorialne” (w przeciwieństwie do dichorialnych) na podstawie istnienia jednej kosmówki (i jednego łożyska) (kosmówka, łac. *chorion*) otaczającej oba bliźniacze zarodki. Chociaż wszystkie bliźnięta monochorialne są jednojajowe, to terminów tych nie można uważać za synonimy, ponieważ istnieją podstawy do sądzenia, że również część bliźniąt dichorial-

nych, a więc wyposażonych w oddzielny komplet błon płodowych (łącznie z własną kosmówką i łożyskiem) ma pochodzenie monozygotyczne. Bliźnięta te muszą rozwijać się niezależnie od siebie już przed implantacją. Do takiego wniosku można dojść na podstawie dokładnej znajomości konkretnych przypadków, to znaczy zarówno obserwacji dokonanych przez położnika podczas porodu, a dotyczących stanu błon płodowych, jak i odpowiednich badań genetycznych przeprowadzonych po urodzeniu. Inna droga polega na zastosowaniu tak zwanej reguły Weinberga, która nie umożliwia co prawda identyfikacji konkretnych par bliźniąt jednojajowych, ale pozwala na określenie częstości ich występowania w danej populacji, w określonym przedziale czasowym i to nawet bez jakichkolwiek informacji położniczych na temat budowy błon płodowych bliźniąt. Reguła Weinberga opiera się na niesłychanie prostym i oczywistym założeniu: ponieważ bliźnięta dwujajowe jednakowo często rozwijają się w osoby tej samej płci, jak i różnej płci, liczbę (częstość względną) bliźniąt dwujajowych w całej populacji bliźniąt można określić przez podwojenie liczby (częstości) bliźniąt o różnej płci. Jakakolwiek stwierdzona empirycznie „nadwyżka” par bliźniąt tej samej płci ponad oszacowaną w ten sposób w danej populacji częstość bliźniąt dwujajowych, określa liczebność bliźniąt jednojajowych. Porównanie tak obliczonych częstości występowania bliźniąt jednojajowych z danymi położniczymi doprowadziło wielu badaczy do wniosku, że ciążę monochorialne występują rzadziej niż to wynika z reguły Weinberga, co oznacza, że część bliźniąt jednojajowych rozwija się od pewnego momentu embriogenezy całkowicie niezależnie od siebie i rodzi się jako bliźnięta dichorialne. Bliższe omówienie tych zagadnień oraz dane dotyczące częstości występowania różnego rodzaju bliźniąt w różnych krajach i w różnych okresach czasu można znaleźć w opracowaniach monograficznych, na przykład GEDDA (1961) i BULMER (1970).

W przypadku bliźniąt monochorialnych jest rzeczą oczywistą, że wyodrębnienie się dwóch zarodków z pierwotnie jednego zarodka „macierzystego” musiało nastąpić po osiągnięciu przez ten zarodek stadium blastocysty* i w wyniku rozdzielenia się pierwotnie pojedynczego węzła zarodkowego na dwie grupy komórek embrionalnych w obrębie wspólnego trofoblastu (z którego następnie powstanie jedna, wspólna kosmówka), ale przed zapoczątkowaniem organogenezy, czyli pojawieniem się tak zwanej smugi pierwotnej i całego zespołu zawiązków narządów osiowych (struna grzbietowa, cewka nerwowa) oraz pozostałych błon płodowych (owod-

nia, omocznia i pęcherzyk żółtkowy). Do powstania bliźniąt może jednak dojść również nieco później, w obrębie jednej tarczki zarodkowej: proces ten może zakończyć się szczęśliwie powstaniem dwóch kompletnie oddzielonych od siebie zarodków (choć znajdujących się w jednej, wspólnej owodni), ale może również spowodować rozwinięcie się osobników wykazujących różny stopień zrośnięcia (tzw. bracia (siostry) syjamskie). Czasami możliwy i skuteczny jest zabieg rozdzielenia obu dzieci, czasami bliźnięta pozostają połączone ze sobą przez całe życie (np. słynni bracia syjamscy Chang i Eng żyjący w ubiegłym wieku), czasami — wreszcie — mamy do czynienia z występowaniem pewnych wspólnych części ciała lub narządów i podwojeniem innych, co nie pozwala na dłuższe życie po urodzeniu. Przypadki jednojajowych, ludzkich zarodków bliźniaczych we wczesnej fazie powstawania są znane w literaturze embriologicznej.

Brak jest natomiast obserwacji embriologicznych ilustrujących, w sposób nie budzący wątpliwości, powstawanie dichorialnych bliźniąt monozygotycznych. Pokazywane często w podręcznikach embriologicznych schematy powstawania bliźniąt jednojajowych na drodze spontanicznej separacji dwóch pierwszych blastomerów 2-komórkowego zarodka, wydają się być wyłącznie produktem fantazji autorów tych opracowań. Jest prawdą, że na przykład u myszy i innych ssaków laboratoryjnych i gospodarskich, możliwe jest eksperymentalne usunięcie osłonki jajowej (tzw. osłonki przejrzystej) otaczającej jajo, a później wczesny zarodek i rozdzielenie dwóch pierwszych blastomerów, oraz uzyskanie z nich dwóch blastocyst. Możliwe jest to jednak tylko w hodowli *in vitro*, ponieważ „nagie”, to znaczy pozbawione osłonki przejrzystej blastomery wszczepione do jajowodu samic biorczyń nie mogą się normalnie rozwijać (MODLIŃSKI 1970, BRONSON i MCLAREN 1970). Jest więcej niż prawdopodobne, że również u innych ssaków, a wśród nich i u człowieka, obecność osłonki przejrzystej w pierwszej fazie rozwoju *in vivo* jest konieczna. Pomijam tu już brak ze strony autorów tych schematów wyjaśnienia, w jaki sposób mogłoby dojść w jajowodzie do samorzutnego „wyzwolenia się” zarodka z bardzo masywnej osłonki przejrzystej, która normalnie zanika dopiero tuż przed implantowaniem się zarodka w macicy. Na podstawie obserwacji prowadzonych nad rozwojem zarodków różnych ssaków *in vitro*, niektórzy autorzy sugeru-

ją, że być może podział jednej blastocysty na dwie potomne blastocysty następuje w momencie „wykluwania się” jej z osłonki przejrzystej, w trakcie czego węzeł zarodkowy ulega rozdzieleniu. Jest to mechanizm możliwy, ale brak jest dowodów na to, że może on występować *in vivo*.

Trojaczki, czworaczki i pięcioraczki u człowieka

Podczas, gdy istnieją obserwacje dotyczące sposobu powstawania monochorialnych bliźniąt jednojajowych u człowieka, nie wiemy w jaki sposób powstają trojaczki i inne wieloraczki. Możemy się jedynie domyślać, że powstają one dzięki podobnym mechanizmom, które działają przy powstawaniu bliźniąt, być może w wyniku współwystąpienia różnych mechanizmów, to znaczy wykształcenia się najpierw z jednego zarodka dwóch blastocyst, a następnie wyodrębnienia się w obrębie jednej z nich (lub obu) dwóch lub większej liczby węzłów zarodkowych (lub dwóch zespołów narządów osiowych w obrębie jednego węzła zarodkowego). Prawdopodobieństwo wystąpienia każdej takiej „dewiacji” jest niewielkie, a ich współwystąpienie wydaje się już prawie nieprawdopodobne, ale biorąc pod uwagę, że rozradzająca się kilkumiliardowa populacja *Homo sapiens* jest gigantycznym, naturalnym „poligonem doświadczalnym” w zakresie rozrodu i rozwoju embrionalnego, najbardziej nieprawdopodobne wydarzenia mają prawo się wydarzyć.

U człowieka wielokrotnie obliczano częstość występowania wieloraczek jednojajowych (patrz cyt. uprzednio GEDDA 1961, BULMER 1970) i stwierdzono, że bliźnięta występują z częstością 3-4 na 1000 porodów, trojaczki z częstością 13-28 na milion porodów (dane wahają się nieco w zależności od kraju i okresu badań), a czworaczki z częstością 3 na dziesięć milionów porodów. Brak jest takich szacunków dla pięcioraczek, ale przynajmniej jeden przypadek wydaje się naukowo udowodniony — chodzi tu o pięć siostr Dionne urodzonych w latach trzydziestych w Kanadzie (MACARTHUR 1938). Siostry Dionne są jedynym wiarogodnym przykładem pięcioraczek u człowieka i nie znamy u naszego gatunku wieloraczek jednojajowych wyższego rzędu.

Poliembrionia u pancerników

Wśród ssaków mamy grupę zwierząt, w której u pewnych gatunków zjawisko poliembrionii występuje regularnie: z jednego zarodka, który powstał w wyniku zapłodnienia jednej komórki

*Blastocysta, zarodek w postaci pęcherzyka, w którym na jednym biegunie znajduje się grupa komórek zwana węzłem zarodkowym. Ściana pęcherzyka nazywa się trofoblastem. W tym stadium zarodek nawiązuje kontakt ze ścianą macicy, w której następnie zagnieżdża się (implantuje).

jajowej, rozwija się zawsze kilka, a nawet kilkanaście zarodków (wieloraczków) stanowiących klon genetyczny. Są to niektóre gatunki pancerników żyjących w Ameryce Płd., środkowej i w południowych rejonach Ameryki Północnej. U gatunku *Dasypus novemcinctus* z jednej blastocysty regularnie rozwijają się 4 zarodki, a u gatunku *Dasypus hybridus* od 7 do 12 zarodków (a następnie osobników). Tak więc, największy klon genetyczny u ssaków — jaki może powstać w sposób naturalny, bez żadnej ingerencji ze strony eksperymentatora, wynosi 12*.

Regularne występowanie poliembrionii wydaje się stanowić zaprzeczenie podstawowej zasady rozrodu płciowego, polegającej na genero-

waniu różnorodności genetycznej potomstwa, a przez to zwiększaniu jego szansy przeżycia. Trudno powiedzieć na czym polega biologiczna zaleta poliembrionii u pancerników: u ssaków „koszt produkcji” komórek jajowych jest niewielki w porównaniu z kosztem energetycznym ciąży i jeśli samica pancernika jest w stanie urodzić kilka, czy nawet kilkanaście młodych, to wydaje się, że mogłaby to czynić w sposób „konwencjonalny”, to znaczy przez owulowanie odpowiednio większej liczby jaj i ich niezależne zapłodnienie i rozwój. Jest to niewątpliwie bardzo interesujące zagadnienie z punktu widzenia strategii rozrodczej tych gatunków.

ZNACZENIE BADAŃ NAD BLIŹNIĘTAMI (WIELORACZKAMI) JEDNOJAJOWYMI I POWODY PODEJMOWANIA PRÓB UZYSKANIA KLONÓW ZWIERZĄT NA DRODZE EKSPERYMENTALNEJ

Bliźnięta jednojajowe są idealnym obiektem do badań nad udziałem czynników genetycznych i epigenetycznych (rozumianych jako wszelkiego rodzaju bodźce zewnętrzne (środowiskowe) działające po urodzeniu) w kształtowaniu cech fizycznych i psychicznych osobnika, czyli jego fenotypu. W przypadku człowieka informacje takie, oprócz znaczenia czysto poznawczego, mogą mieć ważne znaczenie dla prognozowania prawdopodobieństwa wystąpienia pewnych chorób u obu bliźniąt, lub określenia prawdopodobieństwa podobnych zachowań, na przykład w sytuacjach stresowych.

W przypadku zwierząt, dysponowanie grupą osobników (choćby tylko dwoma) identycznych pod względem genetycznym niesłychanie ułatwia i obniża koszty badania wpływu różnego rodzaju czynników (np. diety, warunków klimatycznych itd.) na ich wzrost i rozwój, ponieważ umożliwia uznanie stwierdzonych różnic fenotypowych wyłącznie za skutek działania badanych czynników. Dotyczy to wszelkich zwierząt, ale zapewne najbardziej użyteczne jest w przypadku dużych zwierząt gospodarskich, ze względu na wysokie koszty eksperymentowania na dużej liczbie zwierząt. Drugim powodem zainteresowania rozwojem technik klonowania jest potencjalna możliwość poprawienia jakości hodowanych zwierząt przez zwiększenie częstości występowania w populacji szczególnie cennych genotypów. Jest to ważne u tych gatunków ssaków, które w wyniku każdej ciąży mają zwykle tylko jedno młode, i które w okresie rozrodczym mogą mieć tylko kilkoro potomstwa. W przypadku samców, dzięki rozwinięciu

technik sztucznej inseminacji i zamrażania nasienia, propagacja cennego genotypu jest możliwa na wielką skalę. W przypadku samic można sztucznie zwiększyć liczebność potomstwa przez indukowanie egzogennymi hormonami płciowymi owulacji dużej liczby komórek jajowych, lub przez uzyskiwanie *in vitro* z pobranych jajników dużej liczby oocytów; w obu przypadkach konieczne jest jednak przeszczepienie uzyskanych zarodków do odpowiednich samic biorczyń, a w drugim przypadku trzeba ponadto przeprowadzić zapłodnienie *in vitro* uzyskanych oocytów. Pomimo tego, możliwości zwiększenia w populacji częstości udziału genomu genetycznie wartościowej samicy są — w porównaniu z samcami — nadal bardzo ograniczone. Z punktu widzenia zwiększenia liczebności wartościowych genotypów, optymalne postępowanie powinno polegać na klonowaniu dorosłych osobników, których cechy użytkowe możemy wcześniej w pełni ocenić. Jedynym sposobem zrealizowania takiego celu jest transplantacja do enukleowanych (wyjądrzonych) komórek jajowych innych jąder komórkowych pochodzących bezpośrednio lub pośrednio (tzn. po pasażowaniu *in vitro*) z tkanek dorosłego osobnika, a więc w sposób, w jaki powstała Dolly. Ale Dolly jest, jak do tej pory, jedynym znanym przykładem tego typu klonowania. Wszystkie dotychczasowe doświadczenia, w których stosowano technikę transplantacji jąder, polegały na klonowaniu zarodków, to znaczy powielaniu genomu przedimplantacyjnych zarodków. Takie doświadczenie, choć bardzo interesujące poznawczo, ma ograniczone znaczenie praktyczne. Co

*Poliembrionia występuje również u wielu grup bezkręgowców, ale szczególnie często obserwuje się ją w kilku rodzinach pasożytniczych błonkówek, u których osiąga niesłychaną „wydajność” - w skrajnych przypadkach z jednego zarodka może powstać aż około 2 tysięcy zarodków.

prawda, można w ten sposób zwiększyć liczebność potomstwa dwóch osobników, z których każde z osobna oceniamy jako wartościowe, a zakładając dodatkowo, że potomstwo wartościowych rodziców powinno (ale nie musi!!!) być również wartościowe, w pewnym stopniu realizujemy zamierzony cel genetycznego doskona-

lenia populacji interesujących nas zwierząt. Czyhają jednak na nas również poważne niebezpieczeństwa: powielamy genotyp nie znając przyszłego fenotypu i nie możemy wykluczyć możliwości, że ta konkretna kombinacja genetyczna wcale nie jest „dobra”, lub, że jest, co gorsza, nośnikiem niekorzystnej mutacji.

EMBRIOLOGIA EKSPERYMENTALNA: KLONY MOŻNA UZYSKAĆ RÓŻNYMI METODAMI

Pierwsze eksperymenty embriologiczne miały na celu wyjaśnienie, kiedy w rozwoju zarodkowym losy potomnych komórek zygoty, czyli blastomerów, zostają zdeterminowane. Inaczej mówiąc, do jakiego etapu rozwoju pojedyncze blastomery potrafią wytworzyć kompletny, tylko odpowiednio mniejszy zarodek (czyli, jak mówimy, wykazują zdolności regulacyjne), a od jakiego etapu mogą wytworzyć tylko określone części (tkanki) zarodka, to znaczy te, które wykształcają się z nich podczas normalnego, niezakłóconego rozwoju. Najprostszy sposób uzyskania odpowiedzi na to pytanie polega na rozdzieleniu zarodka na budujące go blastomery i obserwowanie ich rozwoju w izolacji od blastomerów siostrzanych. Pierwsze tego typu doświadczenie przeprowadził ponad 100 lat temu Hans DRIESCH (1892) na zarodkach jeźowców i stwierdził, że w stadium 2-komórkowym, każdy z blastomerów może wytworzyć normalnie zbudowaną larwę pluteus, naturalnie o odpowiednio mniejszych rozmiarach (do tego stadium zarodek jeszcze nie rośnie, a zatem wielkość larwy jest określona przez wielkość komórki wyjściowej (zygoty lub blastomeru).^{*} Było to pierwsze doświadczenie, w którym niejako „przy okazji” i nieświadomie uzyskano klony składające się z 2 zarodków. DRIESCH, podobnie jak inni późniejsi badacze, nie interesował się przebiegiem dalszego rozwoju takich miniaturowych larw, aby przekonać się, czy mogą one przejść przez metamorfozę i wykształcić normalne, płodne osobniki.

Badania polegające na izolowaniu blastomerów wczesnych zarodków, przeprowadzono u wielu grup zwierząt i stwierdzono, że wyniki mogą być różne: u niektórych zwierząt, na przykład u zachw, już dwa pierwsze blastomery nie są w stanie rozwinąć się w kompletne zarodki (rozwój takich zwierząt często nazywamy rozwojem mozaikowym, zdeterminowanym), u innych, na przykład u niektórych ssaków, nawet pojedynczy blastomer zarodka 8-komórkowego może czasami rozwinąć się w normalnego osob-

nika (w takich przypadkach mówimy o rozwoju regulacyjnym). Zachowanie przez blastomery totipotencji (czyli zdolności rozwojowych zygoty) jeszcze po trzecim podziale bruzdkowania, wynika ze szczególnych właściwości wczesnego rozwoju embrionalnego ssaków, u których determinacja losu blastomerów zachodzi wyjątkowo późno i dokonuje się epigenetycznie, dzięki zróżnicowanemu położeniu blastomerów w obrębie bruzdkującego zarodka (hipoteza “outside-inside” sformułowana głównie w oparciu o badania TARKOWSKIEGO i WRÓBLEWSKIEJ 1967), a nie w wyniku szczególnych właściwości cytoplazmy w różnych rejonach komórki jajowej, „rozsegregowywanej” w wyniku kolejnych podziałów bruzdkowania do różnych blastomerów. Z faktu, że czasami z pojedynczego blastomeru może rozwinąć się normalnie zbudowany zarodek (osobnik) naturalnie nie wynika jeszcze, że wszystkie blastomery w danym stadium rozwojowym charakteryzują się takimi właściwościami i udowodnienie tego wymaga często dodatkowych i bardziej skomplikowanych doświadczeń (patrz niżej).

Z punktu widzenia klonowania, metoda izolowania blastomerów jest użyteczna tylko wtedy, jeśli można dzięki niej uzyskać kilka osobników bliźniaczych (identycznych), a przynajmniej dwa. Od dawna było wiadomo, że u myszy z izolowanych blastomerów stadium 2-komórkowego można uzyskać pojedyncze, normalne osobniki (TARKOWSKI 1959a, b), ale dopiero w latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych uzyskano pary osobników bliźniaczych w wyniku rozdzielenia blastomerów (TSUNODA i MCLAREN 1983; praca ta zawiera również bibliografię wcześniejszych publikacji na ten temat). Nie można jednak liczyć na uzyskanie w ten sposób liczniejszych klonów, ponieważ zarodki powstałe z pojedynczych blastomerów stadium 4-komórkowego obumierają wkrótce po implantacji (ROSSANT 1976). U gatunków takich, jak królik lub owca, u których blastocysty tworzą się nieco później w rozwoju i w momencie implantacji

^{*}Ta pionierska praca Driescha (1892), przełożona na język angielski ukazała się w nieco skróconej postaci w książce “Foundations of Experimental Embryology”, — patrz WILLIER i OPPENHEIMER 1974.

składają się z większej liczby komórek niż blastocysty myszy, z pojedynczych blastomerów stadium 4-komórkowego, a nawet sporadycznie stadium 8-komórkowego, mogą rozwinąć się normalne osobniki (królik: MOORE i współaut. 1968; owca: WILLADSEN 1981). Gatunkiem, u którego otrzymano tą metodą najliczniejsze klonny, jest owca: WILLADSEN (1981) uzyskał czworaczki izolując zarodek 8-komórkowy na 4 pary blastomerów.

Liczebność klonów można jeszcze nieco zwiększyć dokonując bardzo już skomplikowanego doświadczenia, polegającego najpierw na izolowaniu blastomerów, a następnie na wspomożeniu ich rozwoju przez „dodanie” im blastomeru(ów) pochodzących z innego zarodka: jeśli blastomer „klonowany” będzie bardziej zaawansowany w rozwoju niż blastomer(y) „pomocnicze” („podporowe”), to istnieje szansa, że osobnik powstanie wyłącznie z blastomeru klonowanego, a blastomery pomocnicze wejdą w skład utworów pozazarodkowych. Takie doświadczenie przeprowadzili WILLADSEN i FEHILLY (1983) oraz FEHILLY i WILLADSEN (1986) u owcy uzyskując kilka klonów składających się z pięciu osobników. Naturalnie nie można wykluczyć, że w wyniku takiego zabiegu nie rozwinie się jednak osobnik chimerowy. Wydaje się jednak, że nawet stosując najbardziej finezyjne kruczki techniczne trudno byłoby uzyskać poprzez izolację blastomerów liczniejsze klony ssaków niż składające się z 8 osobników.

Konstruując w opisany powyżej sposób osobniki chimerowe, można również wykazać, że pojedyncze blastomery określonego stadium rozwojowego zachowały zdolność rozwoju i różnicowania we wszystkie tkanki zarodkowe i pozazarodkowe, to znaczy, że są nadal totipotentne, chociaż nie są już w stanie — na skutek zbyt małej wielkości — same rozwinąć się w osobniki. Posługując się tą metodą KELLY (1977) wykazała to w odniesieniu do pojedynczych blastomerów 4- i 8-komórkowego zarodka myszy, badając ich udział w ciele chimer i ich błonach płodowych.

Ponieważ czynnikiem ograniczającym pełny rozwój pojedynczych blastomerów, pochodzących ze stadiów 4- i 8-komórkowego, są zbyt małe rozmiary powstających z nich blastocyst, a szczególnie ich węzłów zarodkowych (albo nawet ich całkowity brak), próbowano zwiększyć możliwości rozwojowe takich blastomerów sztucznie zwiększając w nich ilość cytoplazmy. Na przykład, autor tego artykułu zwiększał wielkość izolowanych blastomerów 1/4 myszy (tzn. pochodzących ze stadium 4-komórkowego) dofuzjowując do każdego z nich 4 cytoplasty (tzn. bezjądrowe fragmenty) pochodzące z in-

nych blastomerów tego samego stadium. Użytkano w ten sposób kilka kwartetów siostrzanych blastocyst, ale niestety po transplantacji do samic biorczyń, chociaż wiele z nich implanowało się, wszystkie uległy resorpcji (A.K. TARKOWSKI, badania niepublikowane). Lepsze wyniki uzyskali KONO i TSUNODA (1989) dofuzjowując blastomery 1/4 i 1/8 myszy do enukleowanych blastomerów 1/2. Chociaż wiele tak skonstruowanych zarodków rozwinęło się w blastocysty, tylko w pierwszym wariantcie doświadczenia urodziły się młode i nie były one klonem (każde pochodziło z innego kwartetu). Tę próbę zwiększania liczebności klonów należy przynajmniej chwilowo uznać za nieudaną i raczej nie rokującą nadziei na przyszłość.

Inna metoda uzyskiwania zarodków bliźniaczych przez podział zarodka przedimplantacyjnego polega na mechanicznym rozdzieleniu moruli, lub części blastocysty, na dwie części (w przypadku blastocysty cięcie musi naturalnie przebiegać przez węzeł zarodkowy). Tę metodę zastosowano skutecznie i na większą skalę u bydła (OZIL i współaut. 1982; OZIL 1983). W niektórych krajach zabieg ten przeprowadza się bezpośrednio u hodowców, w warunkach polowych, co świadczy o tym, że musi on być ekonomicznie opłacalny. Próby uzyskania w ten sposób większej liczby osobników niż dwa nie powiodły się.

TOTIPOTENCJA BLASTOMERÓW I TOTIPOTENCJA JĄDER

Jeżeli wszystkie odizolowane od siebie, pojedyncze blastomery rozwiną się w normalne osobniki, to uzyskujemy na tej podstawie dwójaką informację. Po pierwsze, że w badanym stadium rozwoju komórki (blastomery) tworzące zarodek są totipotentne i po drugie, że jądra tkwiące w tych komórkach są również totipotentne. *Totipotencja blastomeru oznacza jednocześnie totipotencję jądra, ale totipotencja jądra nie musi oznaczać totipotencji blastomeru.* Dobrym przykładem ilustrującym i wyjaśniającym to dość zawile brzmiące stwierdzenie jest wynik klasycznego doświadczenia przeprowadzonego przez SPEMANN na początku obecnego stulecia (SPEMANN 1962). W wyniku rozdzielenia dwóch pierwszych blastomerów trąski SPEMANN uzyskiwał dwie normalnie zbudowane larwy, albo jedną normalną larwę i nienormalny zarodek obumierający przed rozpoczęciem gastrulacji. Wynik doświadczenia zależał od tego, czy w danym zarodku pierwsza bruzda podziałowa przebiegała zgodnie z płaszczyzną symetrii dwubocznej zygoty, czy też prostopadle do tej płaszczyzny. W zależności od przebiegu bruzdy, rejon, z którego miały powstać w przyszłości

struna grzbietowa i mezoderma przyosiowa, był rozdzielany do obu blastomerów, albo włączany w obręb tylko jednego blastomeru (i tylko ten blastomer mógł rozwinać się normalnie). Blastomer, który nie rozwija się normalnie, nie jest totipotentny, natomiast zawarte w nim jądro jest totipotentne, ale nie może swej potencji zrealizować na skutek braku w blastomerze pewnych składników cytoplazmy. Na ogół jądra zachowują dłużej totipotencję niż komórki, z których pochodzą. Na przykład u płazów nie można już uzyskać normalnego osobnika z pojedynczego blastomeru stadium 4-komórkowego, ale jądra nawet starszych zarodków wciąż zachowują totipotencję (czyli potencjał rozwoju jądra zygoty). Wykazał to po raz pierwszy również SPEMANN (1962) wykonując następujące, pomysłowe doświadczenie. W wyniku przewiązania zygoty trąszki pętlą z włosa, jądro zygotyczne znajdowało się w jednej połowie jaja, która podejmowała bruzdkowanie; bezjądrowa połówka jaja naturalnie nie bruzdkowała. Jeśli po czwartym lub piątym podziale rozluźniono pętlę i jedno z jąder potomnych przecisnęło się do połówki bezjądrowej, to podejmowała ona bruzdkowanie i rozwijała się w normalny zarodek. To doświadczenie można w pewnym sensie uznać za pierwszą próbę transplantowania jąder komórkowych, czemu poświęcona jest następna część tego artykułu.

OTRZYMYWANIE KLONÓW ZA POMOCĄ TECHNIKI TRANSPLANTACJI JĄDER KOMÓRKOWYCH

Płazy

Omówione powyżej wyniki doświadczeń embriologicznych wskazują, że uzyskanie liczniejszych klonów wymaga zastosowania zupełnie innego podejścia. Możliwości takie stwarza technika transplantacji jąder komórkowych do pozbawionych własnego jądra komórek jajowych. Technika ta, która została zastosowana po raz pierwszy przez BRIGGSA i KINGA (1952) u płazów, należy do najbardziej pomysłowych i użytecznych technik badawczych, stosowanych w biologii rozwoju. Polega ona na usunięciu jądra komórki jajowej (zabiegu tego dokonuje się używając szklanej igły, pipety lub niszcząc jądro promieniami UV), a następnie wprowadzeniu przy pomocy pipety jądra pobranego z innej komórki. BRIGGSOWI i KINGOWI, podobnie jak pierwszym embriologom doświadczałnym, nie przyświecała wcale idea powielania płazów w dużej liczbie kopii, ale chcieli oni uzyskać odpowiedź na fundamentalne pytanie stojące przed biologią rozwoju: czy rozwój embrionalny i różnicowanie komórkowe pociągają za sobą

nieodwracalne zmiany w genomie? Innymi słowy, czy różnice między genomem zróżnicowanych komórek rozmaitych typów, mają jedynie charakter funkcjonalny, czy też polegają one na trwałych zmianach strukturalnych. Oznaczałoby to, że w pierwszym przypadku (ale nie w drugim) genom terminalnie zróżnicowanej komórki byłby strukturalnie identyczny z genomem zygoty, z której dany organizm powstał, co stwarzałoby możliwość — przynajmniej teoretyczną — uzyskania ogromnej liczby genetycznych kopii osobnika dorosłego, przez umieszczenie pobranych z niego jąder komórkowych w wyjądrzonych jajach-biornach.

Badania BRIGGSA i KINGA zostały podjęte przez wielu badaczy, spośród których wymienić trzeba w pierwszym rzędzie ich współpracowniczkę MARIE A. DI BERARDINO (1997) oraz badacza angielskiego JOHN B. GURDONA (1977, 1986). Badacze amerykańscy przeprowadzali swoje doświadczenia na żabie *Rana pipiens*, a Gurdon na żabie południowoafrykańskiej *Xenopus laevis*. Chociaż inni badacze rozszerzyli te badania także na inne gatunki płazów bezogonowych i ogoniastych, to *Rana pipiens* i *Xenopus laevis* pozostają nadal gatunkami modelowymi. Wieleletnie badania dotyczące potencji rozwojowej jąder komórkowych pochodzących z różnych stadiów rozwoju osobniczego, które bardzo wszechstronnie zostały omówione w książce DI BERARDINO (1997) (patrz również GURDON 1977, 1986) można streścić następująco.

1) Najwyższy procent normalnie rozwijających się zarodków uzyskuje się po transplantacji do wyjądrzonych jaj-biornów jąder pochodzących z okresu bruzdkowania i stadium blastuli.

2) Im późniejsze stadium embriogenezy, tym mniej zarodków osiąga stadium kijanki i przechodzi metamorfozę.

3) Najbardziej zaawansowanym stadium rozwojowym, z którego pochodziły jądra komórkowe, które poprowadziły rozwój aż do powstania dorosłej, płodnej żaby była kijanka, a tkankami, z których pochodziły te komórki były: endodermalny nabłonek jelita (GURDON i UEBLINGER 1966) i ektodermalny naskórek (KOBEL i współaut. 1973).

4) Dawcami jąder były również komórki zróżnicowane (tzn. syntetyzujące charakterystyczne dla nich białko, np. hemoglobinę, keratynę, melaninę itd.), pobrane z dorosłych osobników: erytroblasty, erytrocyty, limfocyty, leukocyty oraz hodowane *in vitro* komórki naskórka. W innych badaniach użyto również komórek pobranych z wątroby, skóry, płuc, nerki i jelita, ale zdaniem DI BERARDINO (1997), autorzy nie udowodnili, że były to rzeczywiście komórki

zróżnicowane. We wszystkich tych doświadczeniach uzyskano rozwój jaj-biorców do różnych stadiów rozwojowych kijanki, ale na ogół z bardzo niską wydajnością (od 0.3% do 10%). Za najbardziej udane — w sensie uzyskanego stopnia zaawansowania rozwoju — należy uznać doświadczenia DI BERARDINO i współaut. (1986), w których w wyniku transplantacji jąder erytrocytów do jaj-biorców uzyskano samodzielnie odżywiające się kijanki (ang. feeding tadpole), które dożyły jednego miesiąca. Ponieważ w tych i pozostałych badaniach żadna z uzyskanych kijanek nie uległa metamorfozie w dorosłego osobnika, brak jest dowodu, że jądro pochodzące z terminalnie zróżnicowanej komórki dorosłego organizmu może zapewnić pełny rozwój komórki jajowej płaza. *Tym samym u płazów nie udało się dotychczas sklonować dorosłego zwierzęcia.*

5) Uzyskano liczne klony w wyniku transplantacji siostrzanych jąder pochodzących z zarodków; wydaje się, że najbardziej zaawansowanym stadium, z którego uzyskano bardzo liczny klon (30 osobników) był zarodek albinotycznego mutantu *Xenopus laevis* w stadium pączka ogonowego (GURDON, 1977).

6) Liczebność klonów można zwiększać przez stosowanie transplantacji seryjnych, na przykład jądra jednej blastuli transplantuje się do wielu jaj, z których po osiągnięciu przez nie stadium blastuli znowu pobiera się jądra komórek w celu uzyskania następnej generacji zarodków i ewentualnie osobników.

7) Niezależnie od stadium rozwojowego, z którego pochodzą komórki-dawcy jąder, śmiertelność uzyskanych zarodków jest zawsze wysoka i ujawnia się szczególnie na przełomie bruzdkowania i gastrulacji. Wiadomo, że śmiertelność ta jest w znacznym stopniu spowodowana aberracjami chromosomowymi, których skutki ujawniają się po uaktywnieniu się genomu zarodkowego, co u płazów następuje po raz pierwszy w stadium średnio zaawansowanej blastuli (u *Xenopus* po 12 podziale bruzdkowania, kiedy zarodek liczy ponad 4000 komórek) (NEWPORT i KIRSCHNER 1982a, b). Aberracje te mają bardzo prozaiczną przyczynę — wszczepiane jądra komórkowe są w najrozmaitszych fazach cyklu komórkowego, natomiast długość pierwszego cyklu embrionalnego i moment uaktywnienia się czynnika kontrolującego wejście w mitozę (MPF; ang.: M-phase promoting factor) jest pod kontrolą cytoplazmy jaja. Pierwsze cykle komórkowe u płazów są bardzo krótkie, natomiast w zarodkach późniejszych niż stadium blastuli ulegają wydłużeniu. Przeszczepione jądra pobrane z późnych zarodków często nie mogą ukończyć replikacji DNA przed wej-

ściem komórki jajowej w podział komórkowy. W rezultacie, tworzące się chromosomy ulegają rozerwaniu podczas mitozy lub są nieprawidłowo segregowane, co prowadzi do powstania jąder aneuploidalnych. Jest to niewątpliwie jeden z powodów zmniejszającej się wraz z wiekiem zarodka-dawcy przeżywalności zarodków-biorców, uzyskanych w wyniku transplantacji jąder. Nie może to być jednak powód jedyny. Wiadomo, że część uzyskanych zarodków ma całkowicie normalny kariotyp (przynajmniej na tyle, na ile można to ocenić na poziomie mikroskopu świetlnego) i przeprowadzono wystarczająco dużo doświadczeń, aby stworzyć takim zarodkom szansę pełnego rozwoju. Musi być zatem jeszcze jakaś inna przyczyna bardzo niskiej częstości normalnie rozwijających się zarodków, które uzyskuje się po transplantacji jąder pochodzących z bardziej zaawansowanych zarodków (lub osobników dorosłych). Fakt, że jądra zróżnicowanych komórek mogą zapewnić powstanie kijanek, a więc zaawansowanych postaci rozwojowych, w których występują już wszystkie podstawowe układy narządów i wiele bardzo różnych tkanek, świadczy o tym, że jądra te są co najmniej w wysokim stopniu pluripotentne, to znaczy nie zaszły w nich nieodwracalne zmiany przynajmniej w tych genach, które do tego stadium kontrolują procesy rozwojowe. Czyżby zmiany takie miały dotyczyć głównie genów, których aktywność rozpoczyna się dopiero w okresie metamorfozy? Nie widzę uzasadnienia dla takiego przypuszczenia, ale nie znalazłem nigdzie przekonywającego wyjaśnienia przyczyn obumierania na stadium larwalnym zarodków wyposażonych w genom pochodzący z komórek somatycznych dorosłego osobnika.

Ssaki

Minęło około 25 lat od czasu pierwszych doświadczeń BRIGGSA i KINGA zanim podobne doświadczenie przeprowadzono u ssaków i do tego ze znacznie mniej spektakularnym wynikiem. BROMHALL (1975) na Uniwersytecie w Oksfordzie i MODLIŃSKI (1978) w Zakładzie Embriologii Uniwersytetu Warszawskiego przeprowadzili transplantację jąder pobranych z zarodków przedimplantacyjnych (morul) do jaj królika i myszy stosując podobną technikę, jak u płazów. Z kilkuset jaj króliczych zoperowanych przez BROMHALLA rozwinęły się cztery 18-26-komórkowe morule, w których przypuszczalnie doszło do samorzutnej enukleacji komórki jajowej i przejścia przez wszczepione jądro funkcji jądra zygoty. MODLIŃSKI (1978) przedstawił kariologiczne dowody na to, że w kilku przypadkach wszczepione jądro blasto-

merowe pozostało w zygocie i przeszło — wspólnie z jądrem zygotycznym — replikację w kolejnych podziałach bruzdkowania, a operowane zarodki osiągnęły stadium blastocysty. Niestety w doświadczeniach tych nie usuwano własnego jądra jaja-biorcy i z tego powodu operowane zarodki były tetraploidalne, co nie pozwalało na ocenę rzeczywistych możliwości rozwojowych (potencji) przeszczepianego jądra. Podyktowane to było niesłychanie wysoką śmiertelnością operowanych jaj (wynikająca ze stosowanej techniki operacji), która niewątpliwie wzrosłaby niepomniernie, gdyby oprócz wprowadzania obcego jądra usiłowano również usunąć własne jądra (operacje przeprowadzano na jajach zapłodnionych, w których podczas całego pierwszego cyklu komórkowego występują dwa haploidalne jądra (przedjądrza)). W pracy opublikowanej trzy lata później, w której dawcami jąder były komórki pochodzące ze stadium blastocysty MODLIŃSKI (1981) wykazał ponadto, że tylko jądra komórek węzła zarodkowego, ale nie komórek trofoblastu (które są już komórkami różnicującymi się), umożliwiają rozwój takiego tetraploidalnego zarodka w blastocystę. Doświadczenia te uświadomiły jednocześnie, że konieczne są jakieś zupełnie nowe rozwiązania techniczne, gdyż klasyczna technika stosowana u płazów i polegająca na przebijaniu błony cytoplazmatycznej jaja stosunkowo grubą pipetą (musi ona pomieścić przeszczepiane jądro) jest dla jaj ssakowych zbyt brutalna. Trzeba pamiętać, że jaja ssaków są znacznie bardziej „delikatne” od jaj płazów, że są od nich znacznie mniejsze (10–20 razy jeśli chodzi o średnicę jaja) i, że przeprowadzenie operacji wymaga stosowania znacznie bardziej precyzyjnych technik mikrochirurgicznych. Pozostawała również do rozwiązania sprawa sposobu usunięcia z zygoty (bądź niezapłodnionego oocytu) ich własnego jądra, ponieważ tylko wtedy staje się możliwe ocenienie potencji przeszczepionego jądra. Takim metodycznym przełomem stało się opublikowanie przez MCGRATHA i SOLTERA (1983) techniki, która pozwala na usunięcie jądra z komórki jajowej (lub z blastomeru) bez przebijania błony cytoplazmatycznej. Zabieg ten polega na tym, że jądro wraz z niewielką ilością cytoplazmy zostaje wessane do mikropipety w postaci obłonionego palcowatego wyrostka, który przy wycofywaniu pipety ulega oderwaniu od jaja, a w miejscu przerwania błona cytoplazmatyczna zasklepia się. Aby wyciągnięte w ten sposób jądro otoczone małą ilością obłonionej cytoplazmy (twór taki nazywamy karioplastem) wprowadzić do innego jaja (lub blastomeru) trzeba zastosować metodę fuzji komórkowej. Używa się w tym celu jednego z trzech czynników

fuzjogennych: inaktywowanego wirusa Sendai, glikolu polietylenowego i impulsów prądu stałego. Zabieg ten można przeprowadzić zarówno na komórkach (oocytach, blastomerach) pozbawionych, jak i nie pozbawionych, osłonki przejrzystej. Jeśli komórki-dawcy jąder są małe (np. blastomery z późniejszych zarodków lub komórki somatyczne) dofuzjowuje się je po prostu w całości do wyjądrzonego jaja. Obszerny i bogato ilustrowany opis różnych technik stosowanych przy transplantacji jąder komórkowych u ssaków, pióra J.A. MODLIŃSKIEGO, można znaleźć w książce „Biotechnologia Zwierząt”, PWN, 1997.

MCGRATH i SOLTER (1983) zastosowali swoją technikę z powodzeniem do zarodków 1-komórkowych (zygot), które aż do momentu mitozy zawierają dwa haploidalne jądra, tak zwane przejądrze żeńskie i przejądrze męskie. Stwierdzili oni, że u myszy można wymienić jedno homologiczne przedjądrze (tzn. męskie z męskim albo żeńskie z żeńskim) lub oba przedjądrza między dwoma zarodkami i uzyskać ich normalny rozwój wyrażający się powstaniem osobników charakteryzujących się cechami genetycznymi dawcy-jąder (np. ubarwieniem). Wydawało się, że droga do klonowania ssaków stała się otworem. Niestety rok później ci sami autorzy (MCGRATH i SOLTER, 1984) opublikowali pracę, która była wielkim rozczarowaniem. Okazało się bowiem, że jeżeli w miejsce przedjądrzy wprowadzili jądro blastomeru stadium 2-komórkowego to zaledwie 19% zarodków rozwinęło się w blastocysty, a jądra blastomerów stadium 4- i 8-komórkowego umożliwiły tylko 1 lub 2 podziały bruzdkowania. Autorzy zakończyli swoją pracę następującym stwierdzeniem: “the results presented here, suggest that the cloning of mammals by simple nuclear transfer is biologically impossible”. Nie należy jednak nigdy wpadać z euforii w rozpacz — na szczęście konkluzja autorów okazała się zbyt pesymistyczna. MCGRATH i SOLTER tłumaczyli niepowodzenie swoich doświadczeń tym, że u ssaków — w przeciwieństwie do płazów — transkrypcja zaczyna się już podczas wczesnych etapów bruzdkowania (u myszy już na przełomie stadium 1- i 2-komórkowego) i w związku z tym przeprogramowanie jądra, wprowadzonego z powrotem do cytoplazmy oocyta rozpoczynającego rozwój, jest znacznie utrudnione lub wręcz niemożliwe. Pogląd ten był przez pewien czas powszechnie przyjmowany, ale okazał się nieuzasadniony. Negatywne wyniki uświadomiły jednak badaczom, że zastosowany schemat doświadczenia nie jest optymalny i, że niektóre jego elementy wymagają zmiany. Po pierwsze uznano, że niewłaściwe jest przeprowadzanie

enukleacji jaja-biorcy podczas interfazy zygotycznej. Usunięte z zygoty przedjądrza mogą — oprócz chromatyny (materiału genetycznego) — zawierać również różne białka, które w czasie oogenezy gromadzą się jądrze jajnikowego oocyty (pęcherzyku zarodkowego), potem podczas dojrzewania oocyty przechodzą do cytoplazmy, a po zapłodnieniu (lub ogólnie mówiąc po pobudzeniu oocyty do rozwoju) znajdują się (przynajmniej niektóre z nich) w rosnących przedjądrzach (płyzy — praca przeglądowa: DREYER 1989). Być może wszczepiane jądra zawierają zbyt mało tych białek (lub jeśli pochodzą z zaawansowanych zarodków lub osobników dorosłych nie zawierają ich już w ogóle), co utrudnia lub uniemożliwia prawidłowe funkcjonowanie wszczepionych jąder podczas pierwszych etapów rozwoju. To rozumowanie, choć chwilowo czysto spekulatywne nie jest pozbawione podstaw w świetle coraz liczniejszych danych o regulacyjnej roli wielu białek podczas rozwoju embrionalnego i ich przemieszczeniach między jądrem i cytoplazmą. Trzeba również pamiętać o tym, że wprowadzenie nowego jądra interfazowego do komórki jajowej, która znajduje się również w interfazie, nie sprzyja jego przeprogramowaniu ze względu na zachowującą się otoczkę jądrową, która może stanowić poważną barierę dla tych białek, które normalnie wnikają do jądra tylko podczas jego powstawania, w momencie przechodzenia z telofazy do interfazy. Warto przypomnieć, że w podobnych doświadczeniach u płazów, jądra wprowadzane są do oocytów znajdujących się w metafazie drugiego podziału mejotycznego (M II). W takich oocytach jądra ulegają odbłonieniu, a ich chromatyna zostaje odsłonięta na wszelkiego rodzaju czynniki cytoplazmatyczne, w tym wspomniane wyżej białka pochodzące z pęcherzyka zarodkowego. Takie jądra, po odtworzeniu otoczki jądrowej w pobudzonym do rozwoju oocyocie, przypominają jądra zygoty. Szereg badań, między innymi przeprowadzonych przez CZOŁOWSKĄ i współaut. (1984, 1992) oraz SZÖLLÖSIEGO i współaut. (1986, 1988) wykazało, jak ważne jest wprowadzanie jądra do oocyty w stadium M II dla prawidłowego przemodelowania jądra i upodobnienia się go pod względem strukturalnym i funkcjonalnym do przedjądrza typowego dla pierwszego cyklu komórkowego. Obecnie transplantacje jąder przeprowadza się prawie wyłącznie do oocytów w stadium M II, które wyjądrza się przez usunięcie całego wrzeciona z chromosomami.

Po drugie, uświadomiono sobie, że nie bez znaczenia jest faza cyklu jądrowego (cyklu komórkowego) w jakim znajduje się jądro w momencie transplantacji. Jest to szczególnie waż-

ne jeśli jajo-biorca znajduje się w fazie M, gdyż aktywny MPF powoduje natychmiastowy rozpad otoczki jądrowej i kondensację chromatyny. Dalsze losy takiego jądra zależą od możliwości zsynchronizowania cyklu jądrowego dawcy z cyklem cytoplazmatycznym biorcy. Jądro może być wprowadzone przed, w trakcie lub po pobudzeniu oocyty do rozwoju, a więc może znaleźć się w diametralnie różnych warunkach cytoplazmatycznych. Ideałem wydaje się wprowadzenie jądra znajdującego się w fazie G1 (lub nawet w fazie G0 jak w przypadku Dolly) do cytoplazmy oocyty poddanego jednocześnie aktywacji. W takich warunkach, w ciągu pierwszych kilkunastu minut dochodzi do przynajmniej częściowego odbłonienia jądra, ale ponieważ aktywność MPF szybko zanika, jądro szybko powraca do stanu interfazowego. W przypadku opóźnienia momentu aktywacji następuje niepożądane zjawisko przedwczesnej kondensacji chromosomów (wyróżnicowują się chromosomy wokół których rozpoczyna się budowa wrzeciona), które po pobudzeniu oocyty może prowadzić do nienormalnej kariokinezy i wadliwego rozdziału chromosomów (aneuploidii) w kończącym dojrzewanie oocyty lub podczas pierwszej mitozy.

Możliwe jest również wszczepienie jąder w fazie G2, ale wtedy korzystne jest właśnie opóźnienie pobudzenia oocyty aż do czasu utworzenia przez wprowadzone jądro wrzeciona, a następnie spowodowanie mitozy z wyrzuceniem jednego z potomnych jąder na zewnątrz jaja, w postaci rzekomego ciała kierunkowego. Tylko wtedy, gdy spełnione zostaną te warunki, rozwój rozpocznie się w oparciu o jedno diploidne jądro w fazie G1.

Najbardziej fatalne w skutkach jest wprowadzenie jądra w fazie S (w trakcie replikacji): chromatyna kondensuje wówczas nietypowo, co po przejściu do interfazy prowadzi także do aneuploidii.

Dobrze się stało, że zainteresowanie klonowaniem było tak silne, iż niezachęcające wyniki uzyskane przez MCGRATHA i SOLTERA (1984) nie zraziły innych badaczy, a szczególnie nie odwiodły ich od przeprowadzania podobnych prób na jajach i zarodkach innych gatunków, które okazały się znacznie dogodniejszymi obiektami niż mysz. Badania prowadzono głównie na owcy, bydle domowym i króliku i u wszystkich tych gatunków uzyskano w wyniku wszczepiania jąder pobranych z bruzdkujących zarodków lub z węzłów zarodkowych pełny rozwój i kłony składające się z kilku, a w przypadku bydła domowego nawet kilkunastu osobników (patrz prace przeglądowe: DI BERARDINO 1997, PRATHER i FIRST 1990, FIRST i PRATHER 1991, MOD-

LIŃSKI 1997, STICE i współaut. 1998). Największe klony u bydła domowego, o jakich znalazłem informacje w literaturze, składały się z 10 (STICE i KEEFER 1993) i 11 osobników (NIEMANN i MEINECKE 1993, cyt. za REKLEWSKA i REKLEWSKI 1997). Jeśli dawcą jąder jest zarodek przedimplantacyjny, to liczne klony można uzyskać tylko stosując seryjne klonowanie, to znaczy uzyskując w pierwszym etapie grupę (klon) przedimplantacyjnych zarodków, które służą jako dawcy jąder dla następnej generacji zarodków lub ostatecznego klonu złożonego z dorosłych osobników.

Okazało się w końcu, że po zastosowaniu optymalnych warunków, (enukleacja wrzeciona M II i użycie jąder w G1) możliwe jest również u myszy, uzyskanie normalnych osobników po transplantacji jąder blastomerów pochodzących ze stadium 2-, 4- i 8-komórkowego (CHEONG i współaut. 1993). Największy opisany dotychczas klon u myszy składał się z 6 osobników i uzyskany został w bardzo oryginalny sposób z jąder znajdujących się w trzeciej mitozie zarodkowej (tzn. między stadium 4 i 8 blastomerów) (KWON i KONO 1996). Karioplasty z wrzecionami mitotycznymi fuzjowano z enukleowanymi oocytami M II, które pobudzano do rozwoju w obecności cytochalazyny D. Ze względu na jej obecność w pożywce, kariokineza prowadziła do powstania w każdym oocyte dwóch diploidalnych przedjądrzy w fazie G1. Każde z tych przedjądrzy przeszczepiano następnie do zapłodnionych zarodków 1-komórkowych, z których uprzednio usunięto oba przedjądrza. Dwie cytowane powyżej prace, podobnie jak szereg innych prac dotyczących klonowania u innych gatunków, dowodzą, że podjęcie przez jądro embrionalne transkrypcji nie oznacza wcale utraty przez nie zdolności do przeprogramowania w cytoplazmie zygoty i powtórzenia od początku całego programu aktywności genetycznej. Świadczy to o zachowaniu przez te jądra genetycznej totipotencji.

Chociaż cierpliwością i pracą (niestety żmudną i długotrwałą) można uzyskać za pomocą transplantowania jąder pochodzących z zarodków, klony ssaków składające się nawet z kilkunastu osobników, najbardziej interesujące i fascynujące i to zarówno ze względów teoretycznych, jak i praktycznych (patrz str. 212–213), byłoby jednak wykazanie totipotencji jąder komórek pochodzących z dorosłych zwierząt i uzyskanie genetycznych kopii takich osobników. W tej dziedzinie największymi osiągnięciami może się pochwalić zespół I. Wilmuta z Roslin Institute w Edynburgu zajmujący się klonowaniem u owcy. Badacze ci (CAMPBELL i współaut. 1996) donieśli o urodzeniu się kilku

jagniąt w wyniku wprowadzenia do wyjądrzonych oocytów jąder komórek hodowanych *in vitro* i pochodzących z węzła zarodkowego 9-dniowych blastocyst. Komórki te były wielokrotnie pasażowane i chociaż początkowo miały wygląd pierwotnych komórek zarodkowych (ang. embryonic stem cells, ES cells), to następnie uległy różnicowaniu w komórki nabłonkowe, zawierające — poczynając od 6 pasażu — specyficzne białko, cytokeratynę. Ważną innowacją techniczną zastosowaną przez tych badaczy było hodowanie komórek przez 5 dni, poprzedzających użycie ich do transplantacji, w pożywce "głodowej" zawierającej zaledwie 0,5% surowicy, co powodowało zatrzymanie się komórek w fazie G0 cyklu komórkowego. Podobny wynik, a mianowicie: 3 jagnięta urodzone w wyniku transplantacji komórek pochodzących z węzłów zarodkowych 8-dniowych blastocyst i hodowanych *in vitro* (między 8 i 16 pasażem hodowli tkankowej) uzyskali WELLS i współaut. (1997). Rok później badacze z Roslin Institute donieśli powtórnie o urodzeniu się jagniąt, ale tym razem w wyniku transplantacji jąder fibroblastów pochodzących z komórek pobranych z 26-dniowych zarodków, oraz — co było najważniejszym osiągnięciem — w wyniku przeszczepienia jąder komórek pochodzących z gruczołu mlekowego 6-letniej owcy, które hodowano również przez długi czas *in vitro* (WILMUT i współaut. 1997). Również w tym doświadczeniu przeszczepiano jądra komórek zatrzymanych w fazie G0. Dolly, bo tak nazwano uzyskaną owcę, jest płodna i w kwietniu tego roku urodziła jagnię w wyniku całkowicie konwencjonalnych i tradycyjnych metod rozrodu. Tak więc wydawać by się mogło, że przełamano ostatnią barierę i uzyskano u ssaków kopię dorosłego organizmu. Wydajność tego doświadczenia była jednak niesłychanie niska: jedno urodzone jagnię z 277 oocytów, do których wprowadzono jądro komórki wywodzącej się z komórki somatycznej dorosłego osobnika. Bez znacznego zwiększenia efektywności dotychczasowej metody klonowania uzyskanie liczniejszych klonów nie będzie ani możliwe, ani opłacalne.

Rok po urodzeniu się Dolly nadal trwają zajadłe dyskusje i wiele osób wyraża wątpliwości odnośnie wiarygodności tego eksperymentu (patrz np. list Sgaramella i Zindera oraz odpowiedź Campbella i współaut. w Science: vol. 279, str. 635–636, 1998).

W moim przekonaniu, chociaż rzeczywiście nie potwierdzono do tej pory tego eksperymentu, nie przedstawiono również żadnych dowodów, które podważyłyby jego wiarygodność. Trudność bezdyskusyjnego udowodnienia, że Dolly i jej genetyczna matka są rzeczywiście

klonem, polega na tym, że matka Dolly dawno nie żyje (zapewne została skonsumowana jeszcze zanim urodziła się Dolly) i szeregu testów nie można już przeprowadzić, ponieważ pozostały po niej tylko komórki w hodowli tkankowej.

KLONOWANIE PRZY UŻYCIU PIERWOTNYCH KOMÓREK ZARODKOWYCH (ES CELLS)

Pierwotne komórki zarodkowe (często zwane także zarodkowymi komórkami pnia, co jest może terminologicznie poprawne, ale brzmi fatalnie) są komórkami totipotentnymi, to znaczy, że mogą one ulegać różnicowaniu we wszelkiego rodzaju tkanki somatyczne oraz komórki płciowe. Do niedawna totipotencję tych komórek można było wykazać jedynie przez wprowadzenie ich do normalnego, przedimplantacyjnego zarodka, który rozwijał się w osobnika chimerowego, to znaczy osobnika zbudowanego z dwóch populacji komórek — jednej wywodzącej się z zarodka i drugiej pochodzącej z komórek ES. Ostatnio dwóm grupom badaczy udało się uzyskać normalne i płodne osobniki, które zbudowane są wyłącznie z komórek wywodzących się z pierwotnych komórek zarodkowych (NAGY i współaut. 1993, WANG i współaut. 1997). W

moim przekonaniu jest to osiągnięcie podobnego kalibru, jak sklonowanie dorosłego organizmu metodą transplantacji jąder komórkowych, a do tego zabieg jest technicznie znacznie prostszy, a wyniki są powtarzalne. Sukces doświadczenia polegał na agregacji komórek ES z „ułomnym” partnerem — zarodkiem tetraploidalnym, który może utworzyć jedynie trofoblast, ale nie wchodzi (lub wchodzi w ilościach śladowych) w skład ciała powstającego osobnika (NAGY i współaut. 1990) lub na wprowadzeniu komórek ES do diploidalnych pęcherzy trofoblastycznych (tzn. blastocyst pozbawionych wężła zarodkowego) (MODLIŃSKI 1995). Może zatem w ten sposób będziemy tworzyć klony u ssaków, omijając jednocześnie dogmat Williama Harveya, iż *omne vivum ex ovo* !!!!

Komórki ES mogą również służyć do klonowania za pomocą transplantacji ich jąder do komórek jajowych. Doświadczenie takie wykonał MODLIŃSKI (1995) i uzyskał jeden zarodek 16-dniowy, wykazujący cechę genetyczną (pigmentacja) właściwą użytej linii komórek ES. Niestety śmiertelność zarodków wyposażonych w genom wywodzący się z komórek ES była bardzo wysoka i trudno w tej chwili ocenić perspektywę tego sposobu klonowania ssaków.

CZY OSOBNIKI WCHODZĄCE W SKŁAD KLONU SĄ RZECZYWIŚCIE GENETYCZNIE IDENTYCZNE I JAKIE GROŻĄ IM NIEBEZPIECZEŃSTWA?

Odpowiedź na pierwsze pytanie zależy od tego, w jaki sposób doszło do powstania klonu. Odpowiedź będzie twierdząca, jeśli klon powstał w wyniku naturalnej lub eksperymentalnej poliembriologii, ponieważ ten mechanizm gwarantuje identyczność nie tylko DNA jądrowego, ale również DNA mitochondrialnego, który dziedziczy się po matce i jest przekazywany w cytoplazmie oocyty. Natomiast w przypadku powstania klonu w wyniku transplantacji jąder komórkowych pełne podobieństwo uzyskanych w wyniku klonowania osobników wewnątrz klonu oraz podobieństwo z macierzystym zarodkiem lub osobnikiem dorosłym byłoby możliwe tylko w przypadku użycia oocytów-biorców pochodzących od tej samej samicy, od której pochodzi klonowany genotyp. Z wyjątkiem szczepów wsobnych jest to warunek trudny do spełnienia, a najczęściej z różnych względów niewykonalny.

W przypadku klonowania za pomocą transplantacji jąder, podobieństwo genomu jądrowego dawcy i biorców zostanie naturalnie zachowane tylko pod warunkiem, że w transplantom jądrze somatycznym (oraz w poprze-

dnich generacjach tej komórki) nie zaszły uprzednio żadne mutacje. Mutacje takie mogą nie mieć większego znaczenia dla funkcjonowania komórki-dawcy w całym wielokomórkowym organizmie (i nie występować w innych tkankach oraz w linii płciowej), ale mogą mieć niekorzystne lub wręcz fatalne skutki dla działalności jądra jako jądra zygotycznego, a więc jądra „zaczynającego jeszcze raz wszystko od początku”. Prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji lub jakichkolwiek uszkodzeń w strukturze DNA lub chromatyny rośnie wraz z wiekiem komórki-dawcy i zwykle również wraz z liczbą odbytych przez nią cykli komórkowych. Tak więc można oczekiwać, że im starszy organizm z którego pobierane są jądra komórkowe, tym mniejsza szansa normalnego rozwoju biorców jąder. W ten właśnie sposób DI BERARDINO (1997) tłumaczy uzyskanie lepszych wyników po transplantacji jąder erytrocytów pobranych z młodszych osobników niż starszych, oceniając wiek erytrocytów w krwi obwodowej w pierwszym przypadku na 30–60 dni, a w drugim na 100–200 dni. Innym przykładem mogą być hodowane *in vitro* komórki ES, w których w miarę

trwania hodowli wyrażonej liczbą pasaży (a więc rosnącej liczby cykli komórkowych i mitoz), narastają zmiany genetyczne pozbawiające je totipotencji (NAGY i współaut. 1990, 1993). Starzenie się zachodzi nie tylko na poziomie organizmowym (choć tu jest w pierwszym rzędzie widoczne), ale również na poziomie komórkowym, o czym może na przykład świadczyć wzrastająca wraz z wiekiem kobiety częstość anomalii chromosomowych w owulowanych oocytach. W tym przypadku liczy się sam wiek kalendarzowy komórki jajowej, a nie liczba przebytych cykli komórkowych, ponieważ oocyty nie dzielą się od okresu płodowego*.

Innym wyrazem starzenia się komórek jest stopniowe — wraz z liczbą przebytych przez

komórkę podziałów mitotycznych — skracanie się telomerów, zbudowanych ze szczególnego rodzaju sekwencji repetetywnego DNA i znajdujących się na końcach chromosomów. Ponieważ skrócenie telomerów może być zjawiskiem nieodwracalnym, jądro komórki somatycznej pochodzącej z osobnika dorosłego (czy nawet z zaawansowanego w rozwoju zarodka) wprowadzone do komórki jajowej, byłoby już „na starcie” jądrem starym, co nie jest zachęcającą perspektywą dla powstającego w ten sposób osobnika. Jesteśmy zatem jeszcze bardzo odlegli zarówno od opanowania techniki klonowania osobników dorosłych, jak i od poznania ewentualnych negatywnych skutków takich zabiegów.

Serdecznie dziękuję Dr Renacie Czołowskiej za liczne i cenne uwagi oraz za bardzo wnikliwe i krytyczne przeczytanie maszynopisu.

CLONING AND CLONES IN ANIMALS

Summary

The article reviews the following subjects: (1) polyembryony (twinning) in mammals and man as a spontaneous mechanism of cloning, (2) why clones are being produced and what is the purpose and significance of these studies, (3) methods of producing clones: isolation of blastomeres of early embryos, transplantation of cell nuclei into enucleated oocytes (nuclear transfer), making animals from embryonic

stem cells (ES cells), (4) the question of identity of the members of a clone and the possible risks of cloning adult animals.

The above issues are reviewed with the emphasis put on mammals, but the problem of nuclear transfer in amphibians has also received adequate attention.

LITERATURA

- BRIGGS R., KING T. J., 1952. *Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 38, 455–463.
- BROMHALL J. D., 1975. *Nuclear transplantation in the rabbit egg*. Nature 258, 719–722.
- BRONSON R., MCLAREN A., 1970. *Transfer to the mouse oviduct of eggs with and without the zona pellucida*. J. Reprod. Fert. 22, 129–137.
- BULMER M. G., 1970. *The biology of twinning in man*. Clarendon Press, Oxford, str 205.
- CAMPBELL K. H. S., MCWHIR J., RITCHIE W. A., WILMUT I., 1996. *Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line*. Nature 380, 64–66.
- CHEONG HT., TAKAHASHI Y., KANAGAWA H., 1993. *Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes*. Biol. Reprod. 48, 958–963.
- CZOŁOWSKA R., MODLIŃSKI, J. A., TARKOWSKI A. K., 1984. *Behaviour of thymocyte nuclei in non-activated and activated mouse oocytes*. J. Cell Sci. 69, 19–34.
- CZOŁOWSKA R., SZÖLLÖSI D., SZÖLLÖSI, M. S., 1992. *Changes in embryonic 8-cell nuclei transferred by means of cell fusion to mouse eggs*. Int. J. Dev. Biol. 36, 543–553.
- DIBERARDINO M. A. 1997. *Genomic potential of differentiated cells*. Columbia University Press, New York, str 386.
- DIBERARDINO M. A., HOFFNER ORR N., MCKINNELL, G. M., 1986. *Feeding tadpoles cloned from Rana erythrocyte nuclei*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8231–8234.
- DREYER C., 1989. *Fate and nuclear localization of germinal vesicle proteins during embryogenesis*. [W:] DIBERARDINO M. A., ETKIN L. D. (red.). *Developmental Biology, A Comprehensive Synthesis*, t. 6, *Genomic Adaptability in Somatic Cell Specialization*, Plenum Press, New York and London, str 31–57.
- DRIESCH H., 1992. (patrz WILLER, B. H., OPPENHEIMER J. M. 1974)
- FEHILLY C. B., WILLADSEN S. M., 1986. *Embryo manipulation in farm animals*. [W:] CLARKE J. R. (red.) *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, Clarendon Press, Oxford, str 379–413.
- FIRST N. L., PRATHER R. S., 1991. *Genomic potential in mammals*. Differentiation 48, 1–8.
- GEDDA L., 1961. *Twins in history and science*. Charles C Thomas Publisher, Springfield Illinois, str 240.
- GURDON J. B., 1977. *Egg cytoplasm and gene control in development*. Proc. R. Soc. Lond. B 198, 211–247.
- GURDON J. B., 1986. *Nuclear transplantation in eggs and oocytes*. J. Cell Sci. Suppl. 4, 287–318.
- GURDON J. B., UEHLINGER V., 1966. *“Fertile” intestine nuclei*. Nature 210, 1240–1241.

* Nie jest to może najlepszy przykład, ponieważ jądro oocytu naturalnie nie jest używane do transplantacji, ale nie znalazłem przykładu komórki somatycznej, której jądro ulega z wiekiem uszkodzeniom genetycznym i/lub funkcjonalnym nawet wtedy, gdy nie dzieli się mitotycznie.

- KELLY S. J., 1977. *Studies on the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres*. J. Exp. Zool. 200, 365-376.
- KOBEL H. R., BRYN R. B., FISCHBERG M., 1973. *Nuclear transplantation with melanophores, ciliated epidermal cells, and the established cell-line A-8 in Xenopus laevis*. J. Embryol. Exp. Morph. 29, 539-547.
- KONO T., TSUNODA Y., 1989. *Development of single blastomeres from four and eight-cell mouse embryos fused into the enucleated half of a two-cell embryo*. Gamete Res. 22, 427-434.
- KWON O. Y., KONO T., 1996. *Production of identical sextuplet mice by transferring metaphase nuclei from four-cell embryos*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 13010-13013.
- MACARTHUR J. W., 1938. *Genetics of quintuplets I. Diagnosis of the Dionne quintuplets as a monozygotic set*. J. Hered. 29, 323-329.
- MCGRATH J., SOLTER D., 1983. *Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion*. Science 220, 1300-1302.
- MCGRATH J., SOLTER D., 1984. *Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro*. Science 226, 1317-1319.
- MODLIŃSKI J. A., 1970. *The role of the zona pellucida in the development of mouse eggs in vivo*. J. Embryol. Exp. Morph. 23, 539-547.
- MODLIŃSKI J. A., 1978. *Transfer of embryonic nuclei to fertilised mouse eggs and development of tetraploid blastocysts*. Nature 273, 466-467.
- MODLIŃSKI J. A., 1981. *The fate of inner cell mass and trophectoderm nuclei transplanted to fertilized mouse eggs*. Nature 292, 342-343.
- MODLIŃSKI J. A., 1995. *Klonowanie zarodków ssaków - wykorzystanie pierwotnych komórek zarodkowych oraz wpływ niektórych czynników jądrowo-cytoplazmatycznych na rozwój rekonstruowanych zarodków* (Rozpr. hab.). Pr. i Mater. Zoot. Zesz. Spec. 4, str 98.
- MODLIŃSKI J. A., 1997. *Manipulacje na gametach i zarodkach ssaków*. [W:] ZWIERZCHOWSKI L., JASZCZAK K., MODLIŃSKI J. A. (red.). *Biotechnologia zwierząt*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str 353-430.
- MOORE N. W., ADAMS C. E., ROWSON L. E. A., 1968. *Developmental potential of single blastomeres of rabbit eggs*. J. Reprod. Fert. 17, 527-531.
- NAGY A., GOCZA E., DIAZ E. M., PRIDEAUX V. P., IVANYI E., MARKKULA M., ROSSANT J., 1990. *Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse*. Development 110, 815-821.
- NAGY A., ROSSANT J., NAGY R., ABRAMOW-NEWERLY, W., RODER, J. C., 1993. *Derivation of completely cell culture derived mice from early-passage embryonic stem cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 8424-8428.
- NEWPORT J., KIRSCHNER M., 1982a. *A major developmental transition in early Xenopus embryos: I. Characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage*. Cell 30, 675-686.
- NEWPORT J., KIRSCHNER M., 1982b. *A major developmental transition in early Xenopus embryos: II. Control of the onset of transcription*. Cell 30, 687-696.
- OZIL J. P., 1983. *Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow*. J. Reprod. Fert. 69, 463-468.
- OZIL J. P., HEYMAN Y., RENARD J. P., 1982. *Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow*. Vet. Rec. 110, 126-127.
- PRATHER R. S., FIRST N. L., 1990. *Nuclear transfer in mammalian embryos*. Int. Rev. Cytol. 120, 169-190.
- REKLEWSKA B., REKLEWSKI Z., 1997. *Zastosowanie biotechnik w doskonaleniu zwierząt gospodarskich*. [W:] ZWIERZCHOWSKI L., JASZCZAK K., MODLIŃSKI J. A. (red.) *Biotechnologia zwierząt*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str 521-546.
- ROSSANT J., 1976. *Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs*. J. Embryol. Exp. Morph. 36, 283-290.
- SPEMANN H., 1962. *Embryonic development and induction*. Hafner Publishing Company, New York, str 401.
- STICE S. L., KEEFER C. L., 1993. *Multiple generational bovine embryo cloning*. Biol. Reprod. 48, 715-719.
- STICE S. L., ROBL J. M., PONCE DE LEON F. A., GOLUEKE, P. G., CIBELLI J. B., KANE J. J., 1998. *Cloning: new breakthroughs leading to commercial opportunities*. Theriogenology 49, 129-138.
- SZÖLLÖSI D., CZOŁOWSKA R., SOŁTYŃSKA, M. S., TARKOWSKI, A. K., 1986. *Remodelling of thymocyte nuclei in activated mouse oocytes: an ultrastructural study*. Europ. J. Cell Biol. 42, 140-151.
- SZÖLLÖSI R., CZOŁOWSKA R., SZÖLLÖSI M. S., TARKOWSKI A. K., 1988. *Remodelling of mouse thymocyte nuclei depends on the time of their transfer into activated, homologous oocytes*. J. Cell Sci. 91, 603-613.
- TARKOWSKI A. K., 1959a. *Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs*. Nature 184, 1286-1287.
- TARKOWSKI A. K., 1959b. *Experimental studies on regulation in the development of isolated blastomeres of mouse eggs*. Acta Theriologica 3, 191-267.
- TARKOWSKI A. K., WRÓBLEWSKA J., 1967. *Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage*. J. Embryol. Exp. Morph. 18, 155-180.
- TSUNODA Y., MCLAREN A., 1983. *Effects of various procedures on the viability of mouse embryos containing half the normal number of blastomeres*. J. Reprod. Fert. 69, 315-322.
- WANG Z. Q., KIEFER F., URBÁNEK P., WAGNER E. F., 1997. *Generation of completely embryonic stem cell-derived mutant mice using tetraploid blastocyst injection*. Mech. Dev. 62, 137-145.
- WELLS D. N., MISICA P. M., DAY A. M. (TONY), TERVIT H. R., 1997. *Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: a comparison between in vivo- and in vitro-matured cytoplasts*. Biol. Reprod. 57, 385-393.
- WILLADSEN S. M., 1981. *The developmental capacity of blastomeres from four- and eight-cell sheep embryos*. J. Embryol. Exp. Morph. 65, 165-172.
- WILLADSEN S. M., FEHILLY C. B., 1983. *The developmental potential and regulatory capacity of blastomeres from two-, four- and eight-cell sheep embryos*. [W:] BEIER H. M., LINDNER H. R. (red.) *Fertilization of the human egg in vitro*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, str 353-357.
- WILLIER B. H., OPPENHEIMER J. M. (red.). 1974. *Foundations of experimental embryology*. Second edition. Hafner Press, A division of Macmillan Publishing Co., Inc., New York, str 277.
- WILMUT I., SCHNIEKE A. E., MCWHIR J., KIND A. J., CAMPBELL K. H. S., 1997. *Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells*. Nature 385, 810-813.