

PRODUCTIE VAN BIOFARMACEUTISCHE EIWITTEN DOOR GEKLOONDE, TRANSGENE HERKAUWERS

T. Rijsselaere, A. Van Soom

Vakgroep Voortplanting, Verloskunde en Bedrijfsdiergeneeskunde
Faculteit Diergeneeskunde, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke
Tom.rijsselaere@UGent.be

SAMENVATTING

De productie van biofarmaceutische eiwitten, die nodig zijn voor de behandeling van diverse ziekten bij de mens, is een dure en weinig efficiënte aangelegenheid. Oorspronkelijk werd hiervoor gebruik gemaakt van microbiële fermentatieprocessen en celcultuurbioreactoren. Sinds een tiental jaar poogt men om deze eiwitten op een efficiëntere manier te produceren in de melkklier van transgene herkauwers. Tot op heden worden deze transgene dieren voornamelijk gevormd door middel van micro-injectie. Hoewel deze techniek talrijke voordelen biedt, blijft de efficiëntie laag en zijn de kosten hoog. Recent is gebleken dat transgene dieren efficiënter geproduceerd kunnen worden door middel van de kloneringsmethode. Bovendien wordt het hierdoor mogelijk om het geslacht van het transgene dier op voorhand te bepalen. Een bijkomend belangrijk voordeel is de tijdwinst: enerzijds is er een verkorting van het interval tussen de genetische wijziging van de cel en de uitscheiding van de eiwitten in de melk en anderzijds wordt het mogelijk om een kudde van genetisch identieke, transgene dieren te verkrijgen in één generatie. Door voorafgaandelijk uitgebreide controles uit te voeren, is men bij de kloneringsmethode bovendien zeker dat alle geproduceerde dieren transgeen zijn. De belangrijkste nadelen van de kloneringsmethode zijn de hoge peri- en postnatale sterfte, het variabel geboortegewicht en het frequent voorkomen van ontwikkelingsstoornissen bij de gekloonde dieren.

INLEIDING

De vraag naar humane recombinante proteïnen voor de behandeling van verschillende ziekten is zeer groot (Brink *et al.*, 2000). Hemofiliepatiënten bijvoorbeeld hebben een gebrek aan bepaalde bloedstollingsfactoren, voornamelijk factor VIII en IX. Mensen die lijden aan hartaanvallen en beroerten kunnen vaak geholpen worden door een snelle behandeling met weefselplasminogeenactivator, een stof die bloedklonters oplost (Velandar *et al.*, 1997). De productie van deze biofarmaceutische eiwitten door middel van microbiële fermentatieprocessen (bacteriën) en celcultuurbioreactoren is tot op heden echter zeer duur. De hoge zuiveringskosten, de beperkte opbrengst en de afwijkende, driedimensionale structuur en posttranslationale wijzigingen van deze eiwitten maken dat deze methoden weinig economisch rendabel zijn (Datar *et al.*, 1993; Brink *et al.*, 2000).

Genetisch gemanipuleerde herkauwers vormen, door hun vermogen om recombinante, complexe eiwitten te produceren in de melk, een mogelijk alterna-

tief (Ebert en Schindler, 1993; Mercier en Vilotte, 1997; Brink *et al.*, 2000). In 1987 werd in het Edinburgh Research Centrum in Schotland een manier ontdekt om een vreemd gen in de melkklier van bijvoorbeeld een muis, een konijn of een rund tot expressie te brengen (Gordon *et al.*, 1987; Velandar *et al.*, 1997). Dit gen kan bijvoorbeeld coderen voor een humaan eiwit dat geproduceerd wordt in de melk van de herkauwer en daaruit verzameld kan worden. Verschillende eiwitten werden reeds op deze manier geproduceerd (onder andere plasminogeen, stollingsfactor IX, anti-trombine, α 1-antitrypsine) en worden nu reeds in klinische proeven getest voor toepassing bij de mens.

Sinds het midden van de jaren tachtig worden transgene herkauwers voornamelijk geproduceerd door micro-injectie van DNA in de pronuclei van bevruchte eicellen. De lage efficiëntie van de DNA-integratie en de variabele expressie van het ingebrachte gen zijn echter de belangrijkste beperkingen bij de productie van transgene herkauwers. Momenteel dienen er im-

mers minstens 140 embryo's te worden geïnjecteerd en ingeplant in receptorkoeien om één transgeen dier te verkrijgen (Wall, 1996).

Indien het mogelijk zou zijn om dergelijke transgene dieren te klonen, zouden veel van de hogergenoemde nadelen gereduceerd kunnen worden en zou de efficiëntie bijgevolg verhoogd kunnen worden (Houdebine, 1991; Cibelli *et al.*, 1998; Ziomek, 1998). Hoewel nog vele aspecten van het klonen onderzocht en verbeterd dienen te worden, zou het toepassen van de kloneringsmethode de productie van transgene dieren aanmerkelijk kunnen versnellen. Recent werd bekendgemaakt dat er klonen geboren zijn van transgene runderen (Cibelli *et al.*, 1998; Hill *et al.*, 1999; Brophy *et al.*, 2003), geiten (Baguisi *et al.*, 1999; Reggio *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 2002) en schapen (Schnieke *et al.*, 1997; McCreath *et al.*, 2000). Deze successen bieden de mogelijkheid om de voor- en nadelen van gekloonde, transgene herkauwers te vergelijken met deze van transgene dieren geproduceerd door middel van micro-injectie en laten toe de toekomstperspectieven van deze techniek nader te bekijken.

PRODUCTIE VAN BIOFARMACEUTISCHE EI-WITTEN

De productie van complexe, recombinante eiwitten voor humaan therapeutisch gebruik is één van de grootste wetenschappelijke en economische uitdagingen van de hedendaagse biotechnologie. Verschillende productiemogelijkheden werden reeds uitgetest: (1) bacteriële fermentatieprocessen (microbiële bioreactoren), (2) (zoogdier)celculturen (celcultuurbioreactoren), (3) extractie van eiwitten uit humaan bloed en (4) uitscheiding in de melk. Niet elk eiwit kan echter met elk van deze systemen geproduceerd worden (de Boer, 1990). De keuze tussen de verschillende methoden is grotendeels proefondervindelijk, waarbij ook rekening wordt gehouden met economische en eiwitchemische elementen en waarbij het productiesysteem een belangrijke invloed uitoefent op het eindproduct (Datar *et al.*, 1993).

De voornaamste problemen geassocieerd met het gebruik van microbiële bioreactoren (= bacteriële fermentatieprocessen) zijn de afwijkende posttranslationale wijzigingen en de opvouwing van de recombinante eiwitten. De vouwbladstructuur kan immers slechts door eukaryote cellen gevormd worden. Ook is er een complexe zuivering nodig, vooral wanneer deze eiwitten dienen voor intraveneus gebruik (Baguisi *et al.*, 1999). Het gebruik van celcultuurbioreactoren blijkt

geen goed alternatief te zijn omdat deze techniek te duur is voor massale productie, onder andere door de dure cultuurmedia (Denman *et al.*, 1991) en bovendien een lage opbrengst heeft. Datar *et al.* (1993) hebben bijvoorbeeld aangetoond dat voor de productie van weefselplasminogeenactivator door middel van microbiële bioreactoren en celcultuurbioreactoren de kosten oplopen tot meer dan 10 000 dollar per gram eiwit (Tabel 1). Hierdoor wordt het financieel onmogelijk om patiënten dagelijks met dergelijke eiwitten te behandelen.

De extractie van eiwitten uit humaan bloed is een nuttig alternatief om stabiele bloedeiwitten te verkrijgen. Hemofiliepatiënten met tekorten aan bloedstollingsfactoren zouden hiermee geholpen kunnen worden. Deze eiwitten zijn echter in zeer beperkte hoeveelheden aanwezig in het bloed en hun moeilijke extractie maakt dit ook tot een zeer dure aangelegenheid (Velandier *et al.*, 1997). Ook dient men op te letten voor viruscontaminatie, zoals bijvoorbeeld met het HIV en hepatitis C-virus (Griffin, 1997).

De uitscheiding van recombinante eiwitten in de melk lijkt in alle opzichten het meest voor de hand liggend alternatief voor de productie van biofarmaceutische eiwitten (Ebert en Schindler, 1993). Melk is immers een makkelijk te verzamelen biologische vloeistof die bovendien minder complex is dan bloed. Vooral bij de herkauwers vormt de hoge dagelijkse productie van stabiele eiwitten (tot 40 g/l melk) met uitstekende posttranslationale wijzigingen een belangrijk economisch voordeel (Houdebine, 1991). Collectie van biofarmaceutische eiwitten in de melk zou dus een belangrijke kostenbesparende techniek kunnen worden voor proteïnen die in hun actieve vorm niet door micro-organismen of celculturen gevormd kunnen worden. In een aantal studies (Datar, 1993; Bremel, 1996) heeft men gepoogd de verschillende productiesystemen met elkaar te vergelijken waarbij zowel de kosten als de opbrengsten in beschouwing genomen werden (Tabel 1).

In het midden van de jaren tachtig investeerden enkele firma's in transgene herkauwers die biologische proteïnen in de melk uitscheiden (Ziomek, 1998). Hiervoor bleek het nodig om het gen dat codeert voor het farmaceutische eiwit dat men in de melk wil uitscheiden, te koppelen aan een promotor die zorgt voor een specifieke uitscheiding van dit eiwit in de melkklier. Dit complex wordt dan gecombineerd met bijkomende regulatorische elementen om het expressieniveau en bijgevolg de concentratie van het betreffende eiwit in de melk te verhogen. Van de reeds geteste promo-

Tabel 1. Economische vergelijking van de verschillende systemen voor de productie van recombinant weefsel plasminogeen activator (uit Bremel, 1996).

	Cellcultuur	Bacteriële fermentatie	Melk
Productconcentratie (mg/l)	33,5	460	100
Jaarlijkse opbrengst (kg)	11,4	11,6	51
Kosten per gram (dollar)	> 10 000	> 20 000	10

Noot: De gegevens voor cellcultuur en bacteriële fermentatie zijn afkomstig uit Datar *et al.* (1993); voor melk werd een theoretische schatting gemaakt door Bremel (1996).

toren bleken vooral het β -lactoglobuline (schaap), het β -caseïne (geit; DiTullio, 1997), het α 1-caseïne (rund) en het zure weiproteïne (WAP; muis en konijn) tot hoge en specifieke expressieniveaus van vreemde eiwitten in de melk te leiden (Echelard, 1996; Brink *et al.*, 2000). Verschillende eiwitten (onder andere α -antitrypsine en anti-trombine) die gebruik maakten van dergelijke promotoren, worden reeds bij humane patiënten in klinische proeven getest en er wordt verwacht dat de komende 5 jaar verschillende proteïnen van transgene dieren de markt zullen bereiken.

Ondanks de bemoedigende resultaten zijn er toch nog talrijke nadelen aan deze techniek alvorens deze routinematig kan toegepast worden. Tot op heden wordt voor de productie van een transgeen dier voornamelijk gebruik gemaakt van micro-injectie. Hiervoor worden enkele picoliter van een vreemde DNA-oplossing (enkele honderden tot duizenden kopieën van het gen) met een micropipet rechtstreeks in de mannelijke pronucleus geïnjecteerd (Houdebine, 1991). Door het inbrengen van de vloeistof zwelt de pronucleus, breekt het DNA op bepaalde plaatsen en wordt (in bepaalde gevallen) het vreemde DNA ingebouwd. Hoewel deze techniek nog steeds de meest gebruikte is, zijn er ook belangrijke nadelen aan verbonden. (1) Het zichtbaar maken van de pronucleus vormt, vooral bij de herkauwers en het varken, een belangrijk probleem. Centrifugatie gedurende enkele minuten (15 000 g, voornamelijk bij het varken) of het gebruik van een contrastmicroscop (bij het schaap) kunnen dit verhelpen. (2) Ook de efficiëntie van micro-injectie laat te wensen over. Bij de muis geeft slechts 2,5 tot 6% van de geïnjecteerde embryo's aanleiding tot transgene dieren, bij het varken is dit 0,6% (van der Zijpp, 1990) en bij het

rund slechts 0,5 tot 1% (Cibelli *et al.*, 1998). Bijgevolg zijn voor deze techniek grote aantallen embryo's nodig (Nagashima *et al.*, 2003) waardoor de kosten voor de productie van een transgeen dier enorm hoog worden (Haskell en Bowen, 1995). Embryo's kunnen verzameld worden uit de geslachtstractus van gesuperovuleerde vrouwelijke dieren na inductie van ovulatie en kunstmatige inseminatie (Haskell en Bowen, 1995). De geringe controle over het ontwikkelingsstadium van de gerecupereerde embryo's vormt echter een belangrijk probleem. Aangezien er voor micro-injectie bovendien grote aantallen embryo's nodig zijn, is het meer rendabel om eicellen te puncteren uit ovaria (afkomstig uit het slachthuis), in vitro te rijpen en te bevruchten en deze gedurende enkele dagen in cultuur te brengen. Dit zou de kosten met ongeveer een derde kunnen verminderen (Wall, 1996). (3) Een ander nadeel is het variabele expressieniveau van het gen in de melk. Vermits het gen integreert op een niet te voorziene plaats in het genoom en het naburige genetische materiaal in belangrijke mate de transcriptie van het transgen beïnvloedt, krijgt men uiteenlopende concentraties aan recombinante eiwitten in de melk (Houdebine, 1991). (4) Men heeft ook vastgesteld dat sommige recombinante eiwitten die in hoge concentraties in de melk worden uitgescheiden, minder efficiënt posttranslationele wijzigingen ondergaan (Echelard, 1996). (5) Bijkomend is de productie van biofarmaceutische eiwitten door middel van transgene herkauwers een zeer langzaam proces (Brink *et al.*, 2000), aangezien men bijvoorbeeld bij de koe minstens 30 maanden zal moeten wachten alvorens men met zekerheid kan vaststellen of het transgen in een voldoende hoge concentratie tot expressie wordt gebracht (Tabel 2). Hormonale inductie van de lactatie kan deze lange tijdsperiode

Tabel 2. Interval (in maanden) tussen micro-injectie en melkcollectie bij de verschillende diersoorten (uit Ziomek, 1998).

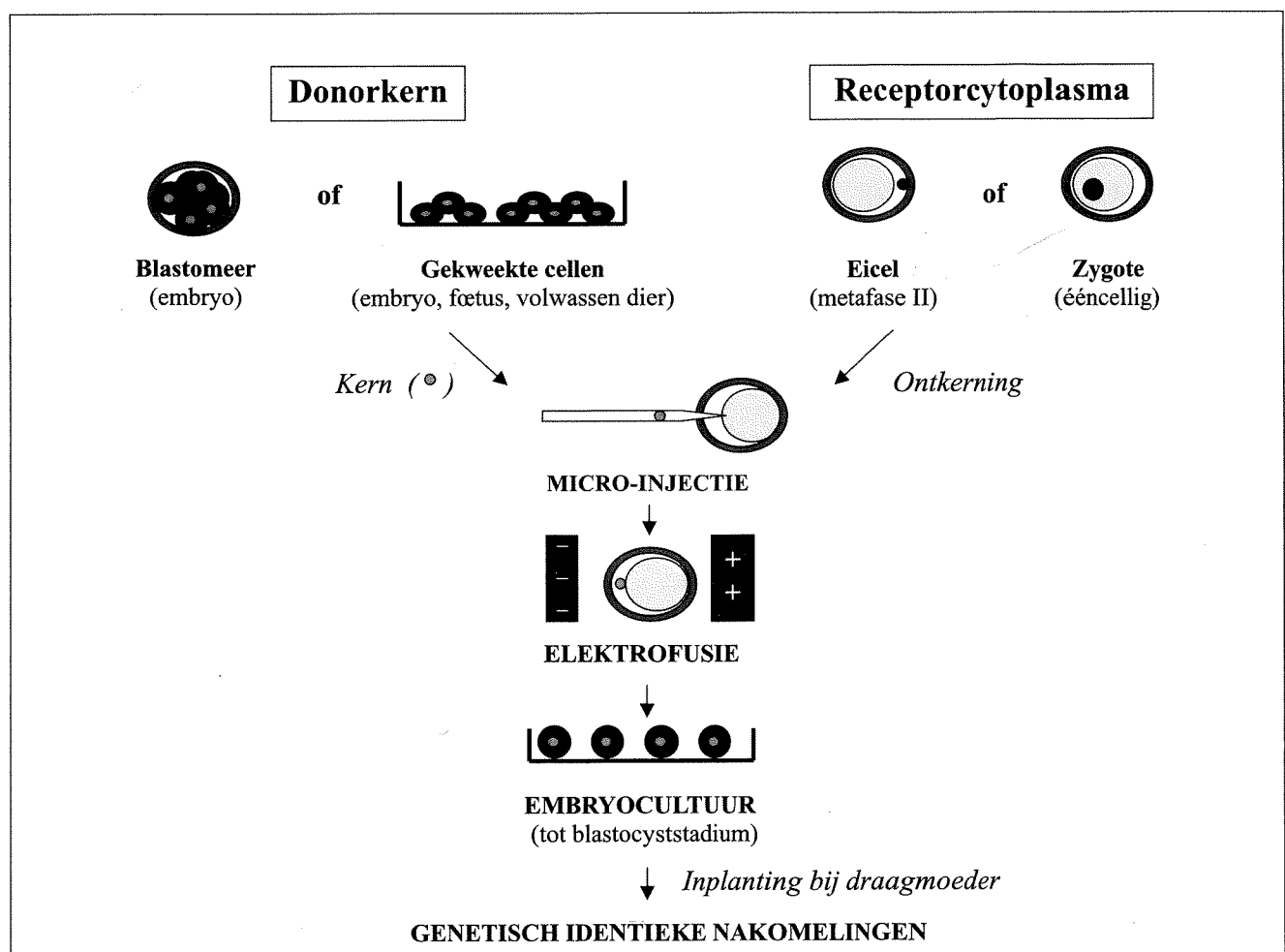
Diersoort	Maanden
Muis	3 tot 6
Konijn	7 tot 8
Schaap	16 tot 18
Geit	16 tot 18
Koe	30 tot 33

echter in zekere mate verkorten. Het interval tussen de micro-injectie van de embryo's en de melkcollectie bij de lacterende dieren is diersoortafhankelijk (Tabel 2) maar is vooral bij de herkauwers lang (Ziomek, 1998). (6) Tenslotte is het vaak moeilijk om de humane eiwitcomponent van zijn dierlijke equivalent te zuiveren (Pursel *et al.*, 1989).

Samenvattend kan men stellen dat de productie van biofarmaceutische eiwitten in de melk van transgene dieren grotendeels gelimiteerd wordt door de beperkte efficiëntie van micro-injectie. Desondanks heeft de productie van biofarmaceutische eiwitten in de melk het potentieel om in de toekomst de geprefereerde methode te worden om dergelijke eiwitten te produceren, mede dankzij de huidige bemoedigende resultaten en de mogelijkheid om de efficiëntie van transgenese te verhogen door nieuwere technieken, zoals retrovirusgedieerde transgenese (Haskell en Bowen, 1995), het gebruik van gerecombineerde spermatozoa als vector (Gandolfi, 2000) en het klonen van transgene herkauwers (Brink *et al.* 2000). In wat volgt zal vooral worden nagegaan in hoeverre de kloneringstechniek hierin verbetering kan brengen.

KLONEN VAN TRANSGENE HERKAUWERS

Bij kerntransfer (klonen) wordt een genetisch identieke kopie van een individu gemaakt door de kern van een totipotente cel (= donor) in een ont kern-



Figuur 1. Overzicht van kerntransfer (klonen).

de eicel of zygote (= receptor) te brengen (Figuur 1). Fusie tussen de donor en de receptor gebeurt meestal door middel van enkele elektrische pulsen in een elektrofusieapparaat (Campbell, 1994; Yong en Yuqiang, 1998). Embryo's waarin kernfusie is opgetreden, worden in een cultuurmedium gebracht voor verdere ontwikkeling tot morula's of blastocysten. Vervolgens wordt deze in een gesynchroniseerde draagmoeder geplaatst voor de verdere ontwikkeling (Brink *et al.*, 2000). De geproduceerde nakomelingen zullen genetisch identiek zijn aan de donorcel (Wilmot, 1998). Tot voor kort werden enkel blastomeren (embryonale cellen) gebruikt als donoren (Willadsen, 1986). Nadien werd echter ook gebruik gemaakt van kernen van celculturen en zelfs van geherprogrammeerde volwassen cellen (Wilmot *et al.*, 1997). Dit maakt het mogelijk om wijzigingen in het genetisch materiaal van de donorcel aan te brengen (bijvoorbeeld het toevoegen van specifieke genen) alvorens deze te versmelten met ontkernde eicellen (Campbell *et al.*, 1996).

Methodie

Klonen van transgene herkauwers kunnen op verschillende manieren verkregen worden, waarvan er hier twee besproken zullen worden. Bij een eerste methode worden fibroblastcellen uit een 35 tot 55 dagen oude foetus geïsoleerd. Deze cellen worden in een cultuurmedium gebracht en door verschillende seriepasingen worden enkele cellijnen opgebouwd. Men gebruikt voornamelijk foetale fibroblastcellen omdat deze cellen snel en makkelijk groeien in cultuur. Na identificatie van de mannelijke en de vrouwelijke cellijnen met de polymerase ketting reactie

(PCR) worden de fibroblastcellen volgens de klassieke methoden in vitro getransfecteerd met het gen dat men in het dier wenst tot expressie te brengen (transgen). Het is immers mogelijk om cellen in cultuur een DNA-fragment te laten opnemen door middel van liposoomgedieerde of Ca-fosfaatgedieerde transfectie (Wilmot, 1998). Aan dit transgen wordt een merker (bijvoorbeeld een resistentiegen tegenover neomycine) en eventueel een promotor (voor expressie in de melk; bijvoorbeeld β -lactoglobulinegen) gekoppeld. Door aan het cultuurmedium vervolgens neomycine toe te voegen, wordt het mogelijk om de neomycineresistente kolonies (met andere woorden de kolonies die het resistentiegen en bijgevolg ook het transgen hebben geïntegreerd) te selecteren. Deze geselecteerde kolonies worden vervolgens door middel van PCR nog eens gecontroleerd op stabiele integratie van het transgen. De fibroblastcellen die dit transgen stabiel hebben geïntegreerd zullen als uiteindelijke donorcel fungeren bij de kerntransfer (klonen). Vervolgens wordt telkens één donorcel met een ontkernde eicel (receptor) gefuseerd. De gereconstrueerde embryo's worden vervolgens in een cultuurmedium gekweekt. De embryo's die tot het blastocyststadium uitgroeien, worden in een gesynchroniseerde draagmoeder ingeplant waar ze verder tot ontwikkeling kunnen komen en genetisch identieke kopieën zullen worden van een transgeen dier. Op deze manier is men er reeds in geslaagd gekloonde kalveren te produceren die transgeen zijn voor het β -galactosidase (Cibelli *et al.*, 1998) en β - en κ -caseïne (Brophy *et al.*, 2003). Ook werden er schapen verkregen die humane bloedstollingsfactor IX in

Tabel 3. Productie van een transgeen schaap door middel van micro-injectie en kerntransfer (uit Schnieke *et al.*, 1997).

Parameter	Micro-injectie	Kerntransfer
Totaal aantal gebruikte schapen	2877	104
Totaal aantal geboren lammeren	1286	6
Levende, transgene lammeren (*)	56	5
Percentage lammeren transgeen	4,35%	100%
Schapen/transgeen lam	51,4	20,8

(*) Gedefinieerd als levend op de leeftijd van 1 week; 1 transgeen lam stierf 90 minuten na de partus.

Tabel 4. Productie van gekloonde transgene herkauwers.

Diersoort	Transgen	Embryo's (E ^(*))	Ingeplante Embryo's (IE)	Nakomelingen (NK ^(**))	NK/IE	Referentie
Rund	β -galactosidase	276	28	3	10,7% (3/28)	Cibelli <i>et al.</i> , 1998
Rund	β - en κ -caseïne	636	126	11	9% (11/126)	Brophy <i>et al.</i> , 2003
Schaap	Bloedstollingsfactor IX	425	62	5	8,1% (5/62)	Schnieke <i>et al.</i> , 1997
Geit	Humaan anti-trombine	277	112	3	2,6% (3/112)	Baguisi <i>et al.</i> , 1999
Geit	Humaan anti-trombine	225	184	5	2,7% (5/184)	Reggio <i>et al.</i> , 2001
Geit	Neomycineresistentiegen	162	38	5	13,2% (5/38)	Zou <i>et al.</i> , 2002

(*) Aantal gereconstrueerde embryo's (na kerntransfer)

(**) Levende, gekloonde, transgene nakomelingen

hun melk uitscheidden (Schnieke *et al.*, 1997). (Tabel 3 en 4).

Bij een tweede, meer recente methode gaat men ook uit van geïsoleerde foetale fibroblasten maar dit keer afkomstig van een foetus die reeds transgeen is. Dit in tegenstelling tot de vorige methode waarbij de geïsoleerde fibroblastcellen in vitro worden getransfecteerd. Deze foetus wordt verkregen door kunstmatige bevruchting van een niet-transgeen vrouwelijk dier met het sperma van een transgeen mannelijk dier. Van de 30 tot 40 dagen oude foetus worden fibroblastcellen geïsoleerd en verder in cultuur gekweekt. Na controle op stabiele integratie van het gen en eventuele geslachtscontrole door middel van PCR worden de geselecteerde cellen gebruikt als donorcel (of karyoplast) voor kerntransfer. De fusie met een ontkernde oöcyte (dus de eigenlijke kerntransfer), de in-vitro-cultuur tot het blastocyststadium en de verdere ontwikkeling in de draagmoeder zijn identiek aan de eerste methode. Met deze methode is men er in mei 1999 voor het eerst in geslaagd om drie gekloonde, transgene geiten te verkrijgen die een hoge concentratie (tot 10 ml/dag) humaan anti-trombine III in de melk uitscheidden (Baguisi *et al.*, 1999).

Resultaten en voordelen

Bij geiten blijkt het klonen minstens even efficiënt te zijn als micro-injectie (Tabel 4). Daar waar bij geiten met klassieke micro-injectie resultaten worden bereikt van 0,5 tot maximaal 3%, slaagden Baguisi *et al.* (1999) erin door middel van kerntransfer 2,6% van de overgeplante embryo's tot gezonde, levende, transgene nakomelingen te laten ontwikkelen. Bij Reggio

et al. (2001) bleek dit 2,2% te bedragen en bij Zou *et al.* (2002) zelfs 13,2%. Bij schapen blijken er met micro-injectie gemiddeld 51,4 dieren nodig te zijn voor de productie van één transgeen lam. Met de nieuwe methode van kerntransfer kon dit verminderd worden tot slechts 20,8, waardoor de efficiëntie met een factor 2,5 verhoogt (Tabel 3). Deze hogere efficiëntie kan voor een groot deel worden toegeschreven aan het feit dat er geen draagmoeders gebruikt hoeven te worden voor de ontwikkeling van niet-transgene lammeren, omdat de getransfecteerde cellen voor de kerntransfer extensief kunnen gecontroleerd worden op stabiele integratie van het transgen door middel van PCR. Zoals hoger vermeld, dienen er ongeveer 140 embryo's te worden geïnjecteerd en ingeplant in receptorkoeien voor de productie van één transgeen kalf (1/140 = 0,7%; Wall, 1996). Met kerntransfer is men erin geslaagd drie transgene kalveren voor β -galactosidase te produceren uit 28 ingeplante embryo's (3/28 = 10,7%; Cibelli *et al.*, 1998) en Brophy *et al.* (2003) verkreeg 11 transgene kalveren voor β - en κ -caseïne uit 126 ingeplante embryo's (8,7%). Door deze verhoging van de efficiëntie verminderen de kosten voor de productie van een transgeen rund.

Ook het interval tussen de transfectie van de cel en de uitscheiding van de recombinante eiwitten in de melk kan verkort worden. Bij de geit bleek deze verkorting 8 à 9 maanden te bedragen wanneer deze nieuwe techniek gecombineerd werd met hormonale inductie van de lactatie (Baguisi *et al.*, 1999). Hoeveel het interval verkort zonder gebruik van hormonale inductie werd in deze studie niet onderzocht. Bij micro-injectie bedroeg het interval 16 tot 18 maanden (Tabel 2).

Men heeft berekend dat de productie van 100 kg recombinant eiwit door transgene runderen ongeveer 41 maanden na kerntransfer bereikt kan worden, terwijl dit minstens 56 maanden zou duren na microinjectie (Brink *et al.*, 2000). De productie van een kudde van genetisch identieke, transgene dieren is door middel van kerntransfer immers mogelijk in één generatie. Vermits deze kudde genetisch identiek is, wordt het ook mogelijk om een deel van de kudde te gebruiken voor controle op expressie van het transgen in de melk, terwijl een ander deel al wordt gebruikt voor de voortplanting (Stice *et al.*, 1998). Bij micro-injectie heeft men voor de vorming van een kudde minimum 2 en waarschijnlijk meer generaties nodig aangezien het transgene dier eerst moet getest worden op expressie in de melk en dan pas kan gebruikt worden voor de voortplanting en bijgevolg voor de vorming van een kudde identieke dieren (Cibelli *et al.*, 1998). Per generatie betekent dit een tijdswinst van twee jaar. Bovendien is het mogelijk om veel sneller te controleren of de transgene dieren het eiwit ook werkelijk in hun melk uitscheiden (Brink *et al.*, 2000). Bijgevolg kunnen de onderzoeken naar de biologische en farmacologische eigenschappen van de geproduceerde eiwitten vlugger een aanvang nemen (Baguisi *et al.*, 1999). Dit alles resulteert in een snellere 'tijd tot de markt'.

Kerntransfer laat bovendien toe om het geslacht van het transgene dier op voorhand te determineren (Brink *et al.*, 2000). Hiervoor worden enkele fibroblastcellen uit de gekweekte cellijn geïsoleerd en met de PCR-techniek wordt vervolgens bepaald of de cellijn mannelijk of vrouwelijk is alvorens deze te transfacteren en als donorcel te gebruiken. Hierdoor vergroot de efficiëntie voor de productie van transgene dieren tweemaal in vergelijking met micro-injectie waarbij het geslacht van het dier niet te voorspellen is (Schnieke *et al.*, 1997). Deze vroegtijdige geslachtsbepaling zal vooral nuttig blijken wanneer men bijvoorbeeld humane biofarmaceutische eiwitten in de melk wil produceren en men bijgevolg enkel geïnteresseerd is in de vrouwelijke dieren. Bij micro-injectie bestaat de kans dat er een transgene stier wordt geboren waarbij de controle op uitscheiding in de melk niet kan nagegaan worden. Hiervoor zou de expressie van de eiwitten in de melk van zijn dochters moeten worden afgewacht, waardoor de tijd tussen micro-injectie en controle met minimaal één generatie wordt verlengd (Stice *et al.*, 1998). Ook is het door middel van PCR mogelijk om de getransfecteerde cel te controleren op stabiele integratie van het transgen. Bij de kloneringstechniek is er dus een voorafgaande

controle mogelijk alvorens deze cel wordt gebruikt als donorcel voor kerntransfer en alvorens het gereconstrueerde embryo in een draagmoeder gebracht wordt. Hierdoor is men zeker dat alle geboren nakomelingen (100%; Tabel 3) transgeen zijn (Schnieke *et al.*, 1997). Bij micro-injectie blijkt slechts een klein percentage (<5%) van de nakomelingen transgeen te zijn (Brink *et al.*, 2000). Controle op werkelijke invoeging van het transgen is bij deze techniek immers niet mogelijk.

Ook het probleem van mosaïcisme wordt bij kerntransfer vermeden (Schnieke *et al.*, 1997; Baguisi *et al.*, 1999; Brink *et al.*, 2000; Brophy *et al.*, 2003). Mosaïcisme is een belangrijke vertragende factor bij de opbouw van een kudde van identieke, transgene dieren. Normaal bezitten alle cellen van een individu hetzelfde genetische materiaal. Bij mozaïeke dieren is dit niet het geval: deze dieren bezitten cellen waarvan de genetische informatie niet identiek is (Houdebine, 1991). Vertraagde integratie van het vreemde DNA bij micro-injectie (Schnieke *et al.*, 1997) leidt ertoe dat het transgen niet in alle cellen van het embryo wordt opgenomen. Sommige cellen bezitten bijgevolg wel het transgen, andere cellen niet. Hierdoor zullen in het beste geval slechts een deel van de voortplantingscellen (dit wil zeggen de eicellen of de spermatozoïden) het transgen dragen. Bijgevolg zullen de nakomelingen van deze mozaïeke dieren ofwel transgeen zijn (en dit transgen op een mendeliaanse manier verder overerven) ofwel niet-transgeen zijn. Bij kerntransfer daarentegen zijn alle nakomelingen transgeen en dit in al hun cellen. De kern die als donorkern dient, wordt immers eerst gecontroleerd op stabiele integratie van het transgen alvorens deze met een ontkernde oöcyte wordt versmolten.

Nadelen en diersoortkeuze

Uit verschillende studies is gebleken dat dieren geproduceerd door middel van kerntransfer zowel voor, tijdens als na de geboorte meer problemen vertonen dan dieren die geboren zijn na natuurlijke dekking of kunstmatige inseminatie (Wilson *et al.*, 1995; Garry *et al.*, 1996; Walker *et al.*, 1996; Kruij en den Daas, 1997; Westhusin *et al.*, 2001). Vanzelfsprekend zal dit ook zo zijn wanneer kerntransfer gebruikt wordt als alternatieve methode voor de productie van transgene dieren. Zowel bij transgene kalveren als bij schapen die via deze nieuwe methode werden geboren, stelden de onderzoekers onder andere een verlengde drachtduur, een hoger geboortegewicht en een grotere variatie in geboortegewicht vast, wat vaker

dan normaal aanleiding gaf tot dystocia en keizersnede (Wilson *et al.*, 1995; Hill *et al.*, 1999; Westhusin *et al.*, 2001). Ook hartafwijkingen, hydroallantoïs en vergrote organen, wijzend op een ongebalanceerde embryonale ontwikkeling en een deficiënt energiemetabolisme, werden beschreven (Schnieke *et al.*, 1997; Cibelli *et al.*, 1998; Hill *et al.*, 1999) en resulteerden in een hogere foetale sterfte (Wilmut *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1999). Hypoxemie, hypoglycemie, hypothermie en metabole acidose kwamen volgens Garry *et al.* (1996) voor bij 34 van de 40 gekloonde kalveren. Ook werd een verhoogde incidentie van abortus en abnormale placentaontwikkeling beschreven (Hill *et al.*, 1999). Als mogelijke oorzaken werden onder andere het serum in het cultuurmedium, de transferprocedures (kunnen zorgen voor stoornissen in de vroege fetoplacentale energieregulatie) en de kloningstechniek zelf aangehaald (Hill *et al.*, 1999).

Deze bevindingen werden vooral bij het schaap en het rund beschreven. Geiten blijken niet dezelfde problemen te vertonen na kerntransfer (Baguisi *et al.*, 1999; Reggio *et al.*, 2001). Foetale of neonatale sterfte trad niet op in de studie van Reggio *et al.* (2001) en alle gekloonde, transgene geitjes waren gezond en hadden een normaal geboortegewicht (Baguisi *et al.*, 1999; Reggio *et al.*, 2001). Mogelijkerwijs zijn geitenembryo's minder gevoelig voor de manipulaties die tijdens kerntransfer plaatsvinden (Baguisi *et al.*, 1999; Reggio *et al.*, 2001) of is dit te verklaren door de beperkte tijdsperiode waarin geitenembryo's in cultuur worden gehouden (Reggio *et al.*, 2001). Het gebruik van gekloonde, transgene geiten voor de productie van biofarmaceutische eiwitten biedt trouwens nog enkele voordelen ten opzichte van runderen of schapen (Baguisi *et al.*, 1999): het kortere generatie-interval (5-8 maanden) in vergelijking met runderen, het twee- tot driemaal hogere melkvolume (600-800 liter per lactatie) in vergelijking met schapen, de 'dolle koeien-vrije status' en de lage incidentie van scrapie.

BESLUIT

Na de bekendmaking van Dolly, de eerste kloon van een volwassen schaap (Wilmut *et al.*, 1997), werd er druk gespeculeerd over de mogelijke toepassingen van het klonen van dieren. Het gebruik van deze techniek voor de productie van transgene dieren die biofarmaceutische eiwitten in de melk uitscheiden, is slechts één toepassingsgebied. Andere mogelijkheden zijn onder andere het klonen van transgene dieren

in het kader van xenotransplantatie, het klonen van dieren die resistent zijn tegen bepaalde ziekten, het klonen om uniforme tomen varkens of runderen te creëren met de gewenste productie-eigenschappen, enz.

Klonen blijkt niet alleen een efficiëntere maar ook een snellere methode om transgene dieren te produceren. De hogere efficiëntie gecombineerd met de voorafgaande geslachtsbepaling en de uitschakeling van mogelijk mozaïeke dieren, maken van kerntransfer een interessante methode om transgene dieren te produceren die biofarmaceutische eiwitten in de melk uitscheiden. Het feit dat bij deze techniek alle nakomelingen transgeen zijn en het interval tussen kerntransfer en melkcollectie kan verkort worden, zijn bijkomende belangrijke economische voordelen.

Ondanks de huidige, bemoedigende resultaten is het toch nodig ook even stil te staan bij de mogelijke nadelige gevolgen van het klonen. Dieren die met deze techniek geproduceerd werden, hebben zowel voor, tijdens als na de geboorte meer problemen. Ook vanuit ethisch oogpunt is het laatste woord hierover nog niet gevallen. Klonen is immers een onnatuurlijke voortplantingstechniek: de kloontechniek gebeurt volledig buiten het dier waarna het gekloonde embryo wordt ingeplant en zich verder ontwikkelt in het moederdier. In het kader hiervan kan men deze techniek als een volgende stap aanzien in de 'externalisering' van het voortplantingsproces en het meer 'ding worden' van het dier (Rutgers, 1997).

LITERATUURLIJST

- 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., Overstrom E.W., Echelard Y. (1999). Production of goats by somatic nuclear transfer. *Nature Biotechnology* 17, 456-461.
- Bremel R.D. (1996). Potential role of transgenesis in dairy production and related areas. *Theriogenology* 45, 51-56.
- Brink M.F., Bishop M.D., Pieper F.R. (2000). Developing efficient strategies for the generation of transgenic cattle which produce biopharmaceuticals in milk. *Theriogenology* 53, 139-148.
- Brophy B., Smolenski G., Wheeler T., Wells D., L'Huillier P. en Laible G. (2003). Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of β -casein and κ -casein. *Nature Biotechnology* 21, 157-162.
- Campbell K.H.S., Loi P., Cappai P., Wilmut I. (1994). Improved development to blastocyst of ovine nuclear transfer embryos reconstructed during the presumptive

- S-phase of enucleated activated oocytes. *Biology of reproduction* 50, 1385-1393.
- 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.
- 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. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 18, 79-83.
- Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J., Kane J.J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de Leon F.A., Robl J.M. (1998). Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280, 1256-1258.
- Datar R.V., Cartwright T., Rosen C.G. (1993). Process economics of animal cell and bacterial fermentations : A case study analysis of tissue plasminogen activator. *Bio/Technology* 11, 349-357.
- de Boer H.A. (1990). Transgenese : toepassingen, welzijn en ethiek. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 115, 570-574.
- Denman J., Hayes M., O'Day C., Edmunds T., Bartlett C., Hirani S., Ebert K.M., Gordon K., McPherson J.M. (1991). Transgenic expression of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk : purification and characterization of the recombinant enzyme. *Bio/Technology* 9, 839-843.
- DiTullio P. (1997). Production of complex human pharmaceuticals in the milk of transgenic goats using the goats beta casein promotor. In: Houdebine L.M.(editor). *Transgenic animals: generation and use*. Harwood academic publishers, Amsterdam, p.465-467.
- Ebert K.M., Selgrath J.P., DiTullio P., Denman J., Smith T.E., Memon M.A., Schindler J.E., Monastorsky G.M., Vitale J.A., Gordon K. (1991). Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Bio/Technology* 9, 835-838.
- Ebert K.M., Schindler J.E.S. (1993). Transgenic farm animals: progress report. *Theriogenology* 39, 121-135.
- Echelard Y. (1996). Recombinant protein production in transgenic animals. *Current Opinion in Biotechnology* 7, 536-540.
- Gandolfi F. (2000). Sperm-mediated transgenesis. *Theriogenology* 53, 127-137.
- Garry F.B., Adams R., McCann J.P., Odde K.G. (1996). Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology* 45, 141-152.
- Gordon K., Lee E., Vitale J.A., Smith A.E., Westphal H., Henninghausen L. (1987). Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Bio/Technology* 5, 1183.
- Griffin H. (1997). Cloning and genetic modification: applications in medicine. Roslin institute online. <http://www2.ri.bbsrc.ac.uk/library/research/cloning/medicine.htm>
- Haskell R.E., Bowen R.A. (1995). Efficient production of transgenic cattle by retroviral infection of early embryos. *Molecular reproduction and development* 40, 386-390.
- Hill J.R., Roussel A.J., Cibelli J.B., Edwards J.F., Hooper N.L., Miller M.W., Thompson J.A., Looney C.R., West-

- husin M.E., Robl J.M., Stice S.L. (1999). Clinical and pathological features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology* 51, 1451-1465.
- Houdebine L.M. (1991). La transgenèse chez les ruminants : Réalités et Perspectives. *Recueil de Médecine Vétérinaire Spécial Reproduction des Ruminants* 167, 323-333.
- Kruip Th.A.M., den Daas J.H.G. (1997). In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology* 47, 43-52.
- McCreath K.J., Howcroft J., Campbell K.H., Colman A., Scheike A.E., Kind A.J. (2000). Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultures somatic cells. *Nature* 405, 1066-1069.
- Mercier J.C., Vilotte J.L. (1997). The modification of milk protein composition through transgenesis: progress and problems. In: Houdebine L.M.(editor). *Transgenic animals: generation and use*. Harwood academic publishers, Amsterdam, p. 473-481.
- Nagashima H., Fujimura T., Takahagi Y., Kurome M., Wako N., Ochiai T., Esaki R., Kano K., Saito S., Okabe M., Murakami H. (2003). *Theriogenology* 59, 95-106.
- Pursel V.G., Pinkert C.A., Miller K.F., Bolt D.J., Campbell R.G., Palmiter R.D., Brinster R.L., Hammer R.E. (1989). Genetic engineering of livestock. *Science* 244, 1281-1288.
- 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 stimulated abattoir-derived ovaries. *Biology of Reproduction* 65, 1528-1533.
- Rutgers L.J.E. (1997). Kloneren van dieren gaat niet samen met respect voor hun eigenwaarde. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 122, 379-380.
- Schnieke A.E., Kind A.J., Ritchie W.A., Mycock K., Scott A.R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A., Campbell K.H. (1997). Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278, 2130-2133.
- Stice S.L., Robl J.M., Ponce de Leon F.A., Jerry J., Golueke P.G., Cibelli J.B., Kane J.J. (1998). Cloning : new breakthroughs leading to commercial opportunities. *Theriogenology* 49, 129-138.
- Van der Zijpp A.J. (1990). Genetische manipulatie bij landbouwhuisdieren : hoe en waartoe? *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 115, 584-587.
- Velander W.H., Lubon H., Drohan W.N. (1997). Transgenic livestock as drug factories. *Scientific American* 276, 54-58.
- Walker S.K., Hartwich K.M., Seamark R.F. (1996). The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. *Theriogenology* 45, 111-120.
- Wall R.J., Hawk H.W., Nel N. (1992). Making transgenic livestock: genetic engineering on a large scale. *Journal of Cellular Biochemistry* 49, 113.
- Wall R.J. (1996). Transgenic livestock: progress and prospects for the future. *Theriogenology* 45, 57-68.

- Westhusin M.E., Long C.R., Shin T., Hill J.R., Looney C.R., Pryor J.H., Piedrahita J.A. (2001). Cloning to reproduce desired genotypes. *Theriogenology* 55, 35-49.
- Willadsen S.M. (1986). Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320, 63-65.
- Wilmot I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.
- Wilmot I. (1998). Cloning for medicine. *Scientific American* 279, 30-35.
- Wilson J.M., Williams J.D., Bondioli K.R., Looney C.R., Westhusin M.E., McCalla D.F. (1995). Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. *Animal Reproduction Science* 38, 73-83.
- Yong Z. en Yuqiang L. (1998). Nuclear-cytoplasmic interaction and development of goat embryos reconstructed by nuclear transplantation: production of goats by serially cloning embryos. *Biology of reproduction* 58, 266-269.
- Ziomek C.A. (1998). Commercialization of proteins produced in the mammary gland. *Theriogenology* 49, 139-144.
- Zou X.G., Wang Y.G., Cheng Y., Yang Y.F., Ju H.M., Tang H., Shen Y., Mu Z., Xu S.F., Du M. (2002). Generation of cloned goats (*Capra hircus*) from transfected foetal fibroblast cells, the effect of donor cycle. *Molecular Reproduction and Development* 61, 164-172.

Uit het verleden

DE OPKOMST VAN DE TREKHOND

Omstreeks 1500 merkten buitenlanders met enige verbazing op dat in de Nederlanden honden, alleen of met twee, in de steden als trekdieren in kleine wagentjes werden ingespannen, met name voor het vervoer van bier. Men kon ze ook in een tredmolen laten lopen om een spit of een botervat te laten draaien.

Uit: van Uytven, R. (2003), *De papegaai van de paus. Mens en dier in de middeleeuwen*. Davidsfonds, Leuven-Waanders, Zwolle, p. 163.

HONDEN EN BRABANDERS

Trouw, moed en kracht waren de kwaliteiten die de middeleeuwen in de hond onderkenden, uitgerekend de hoedanigheden die edelen hoog in hun vaandel voerden, al was dat aan hun gedrag niet altijd te merken. In zijn berijmde kroniek van Brabant gaf Henne van Merchtene (1415) hoog af over zijn landgenoten, zij waren honden gelijk:

*Die vanuit zijn natuur
Trouw en edel, van zin puur
Is boven alle beesten die leven.
Want van de hond staat geschreven
Dat hij, uit angst noch uit nood
Noch uit vrees voor de dood,
Van zijn meester wil weggaan.
Al ziet men zijn meester hem slaan
Of hem verminken aan poot of kop.
Nochtans blijft hij hem trouw, let op,
Zonder in iets hem te weerstaan.*

Uit: van Uytven, R. (2003). *De papegaai van de paus. Mens en dier in de middeleeuwen*. Davidsfonds, Leuven-Waanders, Zwolle, p. 138.