Züchtungskunde, **81**, (6) S. 406–413, 2009, ISSN 0044-5401
© Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

Neue Wege in der Rinderzüchtung: Somatisches Klonen und transgene Rinder

H. Niemann[1]

Zusammenfassung

Das somatische Klonen ist bis heute bei mehr als einem Dutzend Spezies erfolgreich gewesen. Die Erfolgsraten, d.h. der Anteil geborener Nachkommen aus dem Klonprozess, sind niedriger im Vergleich zu konventionell produzierten Tieren. Die weltweit intensive Forschung hat jedoch zu deutlichen Verbesserungen geführt, so dass das Klonen heute bereits bei Rind und Schwein für spezifische Fragestellungen in Forschung und Anwendung eingesetzt werden kann. Das Klonen bietet ein überaus großes Anwendungspotential, insbesondere in der Grundlagenforschung, als therapeutisches Klonen in der Biomedizin sowie als reproduktives Klonen. Für die Tierzucht sind insbesondere die verbesserten Möglichkeiten zur Produktion transgener Tiere von Bedeutung. Die Effizienz des additiven Gentransfers kann erheblich erhöht werden gegenüber dem bisher üblichen Mikroinjektionsverfahren. Auch die selektive Ausschaltung eines Gens (Knockout) ist erstmals durch das Klonen beim Nutztier möglich. Ein weiteres wichtiges Anwendungsfeld ist die Erhaltung genetischer Vielfalt durch Einsatz somatischer Zellen von Tieren bedrohter Rassen. Die Anwendungsperspektiven des somatischen Klonens könnten durch die Verfügbarkeit pluripotenter Stammzellen deutlich erweitert werden. Die neuen genomischen Techniken und das somatische Klonen unter Einbeziehung pluripotenter Stammzellen können wesentlich dazu beitragen, eine effiziente, diversifizierte, zielgenaue und damit nachhaltige Tierproduktion zu entwickeln.

Schlüsselwörter: Tierzüchtung, somatisches Klonen, transgene Tiere, Stammzellen

Summary

New approaches in cattle breeding: Bovine somatic cloning and transgenesis

Somatic cloning has been successful in more than a dozen mammalian species. Success rates are still lower than with conventional reproduction or application of other biotechnologies such as embryo transfer or in vitro embryo production. However, recently significant progress has been made which allows to use porcine and bovine cloning in specific application fields in research and animal breeding. Somatic cloning bears great application potential, mainly in three areas: Basic research, therapeutic cloning in biomedicine and reproductive cloning.

With the aid of somatic cloning, transgenic animal production can be significantly improved. Additive gene transfer is much more efficient than the previously used microinjection technology. The use of somatic cloning allows for the first time to specifi-

[1] Institut für Nutztiergenetik, Mariensee 31535 Neustadt. E-Mail: heiner.niemann@fli.bund.de

cally delete genes (knockout) as has been shown for the bovine prion locus. The application potential of somatic cloning could be significantly expanded by the availability of pluripotent stem cells. A novel promising approach is the production of induced pluripotent stem cells (iPS) by reprogramming somatic cells via over-expression of only 4 pluripotency related genes. Another important area of application is maintenance of genetic diversity by cryopreservation of somatic cells from endangered species/breeds and their reconstruction by somatic cloning. The novel genomic technologies and somatic cloning based on the use of pluripotent stem cells will make a significant contribution towards development of an efficient, diversified and targeted and thus sustainable animal production.

Keywords: Animal breeding, somatic cloning, transgenic animals, stem cells

1 Das somatische Klonen als biotechnologisches Verfahren

Die Züchtung von Nutztieren hat eine lange und erfolgreiche Geschichte. Die auf wissenschaftlichen Erkenntnissen basierende Zuchtarbeit unter Einbeziehung biotechnologischer Verfahren – wie künstlicher Besamung und Embryotransfertechnologie – hat viele phänotypisch unterschiedliche Rassen (beim Rind >800 Rassen) hervorgebracht (Beja-Pereira et al., 2006; Larson et al., 2007). Das somatische Klonen ist eine neue vielversprechende Biotechnologie, die die bereits existierenden Biotechniken wirkungsvoll ergänzen kann. In Tab. 1 sind die reproduktionsbiologischen sowie die auf der Molekulargenetik beruhenden bio- und gentechnologischen Verfahren aufgelistet.

Tab. 1. Biotechnologie bei Nutztieren
Bio- and gene technology in farm animals

Reproduktionsbiologie	Molekulare Genetik
• Künstliche Besamung (KB)	• Genomanalyse
• Brunstsynchronisation	Sequenzierung
• Geburtssteuerung	Kartierung
• Embryo Transfer (ET)	Polymorphismen
• Kryokonservierung	• Molekulare Diagnostik
• Sexing	Genetische Defekte (MHS, BLAD, etc)
• In-vitro Produktion von Embryonen (IVM/F/C)	Genetische Abstammung
• Embryo-Splitting	Genetische Diversität
• Somatisches Klonen	• Funktionelle Genomik
• Mikroinjektion	Expressionsmuster
	Gen-Interaktionen
	• Transgene
	Additiv
	Knock-outs

2 Somatisches Klonen bei Nutztieren

Das Klonen ist bis heute bei mehr als einem Dutzend Säugerspezies erfolgreich gewesen (Schaf, Rind, Maus, Ziege, Schwein, Kaninchen, Katze, Pferd, Maultier, Ratte, Hirsch, Hund, Frettchen, Wolf) (Kues et al., 2008). Auch die Produktion geklonter Nachkommen von bedrohten Spezies und/oder Rassen ist gelungen. Ein prominentes Beispiel hierfür ist die Geburt geklonter sardischer Mufflons nach Übertragung geklonter Embryonen in ein Hausschaf (Loi et al., 2001). Ein weiteres Beispiel ist die erfolgreiche Klonierung der Enderby-Rinder, die sich durch besondere Kälteresistenz auszeichnen. Klonembryonen von Enderbyrindern wurden von Holstein Friesian-Empfängertieren ausgetragen (Wells et al., 1999). Kostengünstige Protokolle für die Langzeitkonservierung somatischer Zellen sind entwickelt worden und werden heute bereits zur Erhaltung genetischer Vielfalt eingesetzt (Groeneveld et al., 2008).

Jedoch ist die Erfolgsrate des Klonens häufig noch recht niedrig, insbesondere dadurch bedingt, dass die embryonale und fetale Mortalität erhöht ist (Kues und Niemann, 2004; Kues et al., 2008). Allerdings sind in den letzten Jahren teilweise sehr beachtliche Verbesserungen erzielt worden. Ein Beispiel dafür sind die Klonergebnisse beim Schwein, die wir in der eigenen Arbeitsgruppe erzielt haben. Durch bessere Selektion und Vorbereitung der Empfängertiere und insbesondere dadurch, dass wir Empfängertiere und Klonembryonen um 24 Stunden versetzt asynchron verwendet haben, konnten die Erfolgsraten deutlich gesteigert werden. Die Trächtigkeitsraten liegen jetzt bei etwa 80%, und die durchschnittliche Wurfgröße ist im Vergleich zu konventionellen Trächtigkeiten nur noch geringfügig reduziert (Petersen et al., 2008).

Nach dem Klonen ist vielfach darüber berichtet worden, dass die postnatale Entwicklung bei einem gewissen Anteil der Nachkommen beeinträchtigt sein kann. Dies kann sich in einem relativ breiten Spektrum von Symptomen zeigen, angefangen von einer verlängerten Trächtigkeitsdauer, übergroßen Nachkommen und aberranter Plazentaentwicklung sowie verschiedenen Krankheitsbildern bei den Klonnachkommen (Kues et al., 2008). Die irreguläre Plazentaausbildung wird aus heutiger Sicht als eine Hauptursache für die Entwicklungsstörungen angesehen. Eine kritische Durchsicht der verfügbaren Literatur ergibt jedoch, dass die allermeisten postnatalen Klone gesund sind und sich normal entwickeln (Lanza et al., 2001; Cibelli et al., 2002; Panarace et al., 2007). Wenn Schaf- oder Rinderklone etwa sechs Monate alt sind, unterscheiden sie sich nicht von altersgleichen Kontrollen in allen bisher geprüften Parametern wie biochemischen Blut- und Urinparametern, Immunstatus, Body Score, Wachstumsverlauf und Reproduktion. Umfangreiche Studien haben keine Unterschiede zwischen Fleisch- und Milchzusammensetzung beim Rind im Vergleich zu altersgleichen Kontrollen ergeben; alle Parameter lagen innerhalb des normalen Spektrums. Ähnliche Befunde wurden auch für geklonte Schweine berichtet (Yang et al., 2007; Miller, 2007). Deshalb besteht Einigkeit bei den Aufsichtsbehörden auf der ganzen Welt (USA, EFSA = European Food Safety Agency, Japan) dass Nahrungsmittel von geklonten Tieren sicher sind und dass es keine wissenschaftlich begründeten Hinweise gibt, das in Frage zu stellen. Dies ist inzwischen für Rind, Schwein und Ziege durch das Dokument der FDA (Food and Drug Administration) in den USA in 2008 (Rudenko et al., 2007) und durch die EFSA durch ihr Dokument zum Klonen aus dem Jahre 2008 – mit der erneuerten Version aus dem Jahre 2009 für Rind und Schwein – bekräftigt worden (European Food Safety Agency, 2009). Offene Fragen bestehen nach wie vor in Bezug auf Generationsintervall und Langlebigkeit, weil Antworten darauf auf Grund der Kürze der bisherigen Untersuchungsdauer bei geklonten landwirtschaftlichen Nutztieren noch nicht ermittelt werden konnten. Allerdings gibt es vorläufige Daten, die zeigen, dass keine negativen Einflüsse zu erwarten sind.

3 Anwendungsperspektiven des somatischen Klonens bei Nutztieren

Das überaus große Anwendungspotential des somatischen Kerntransfers hat dazu geführt, dass sich inzwischen auch Firmen mit dieser Technologie befassen und wirtschaftliche Nutzungen anbieten. Bekannt in diesem Zusammenhang sind die Fa. Viagen in Austin, Texas, USA, Cryozootech aus Frankreich, Cyagra in USA und Südamerika. Weitere Klonfirmen sind offenbar in China und Neuseeland tätig. Die Anwendungsbereiche des somatischen Klonens können im Wesentlichen in drei Bereichen gesehen werden:

– Grundlagenforschung,
– Therapeutisches Klonen und
– Reproduktives Klonen.

Im Zusammenhang dieses Beitrages sind insbesondere das reproduktive Klonen und die verbesserten Möglichkeiten zur Produktion transgener Tiere durch das Klonen von Bedeutung (Niemann und Kues, 2007; Robl et al., 2007). Durch den Einsatz des somatischen Klonens kann die Produktion transgener Rinder im Vergleich zur bisher üblichen Mikroinjektion erheblich verbessert werden, sowohl was die Effizienz als auch die Präzision betrifft. Dies ist im Wesentlichen dadurch begründet, dass beim Klonen keine Foundertiere wie bei der Mikroinjektion, dem klassischen Verfahren zur Produktion transgener Nutztiere, anfallen, die zunächst durch Verpaarung zur Geburt von F_1-Tieren geführt werden müssen, welche dann schließlich auf transgene Expression geprüft werden können. Beim Klonen können die nach dem Transfer der rekonstruierten Embryonen geborenen Klonnachkommen direkt darauf getestet werden, was die Produktion erheblich verkürzt und dadurch kostengünstiger gestaltet, beim Rind um etwa zwei Jahre.

Es gibt prominente Beispiele für die Produktion transgener Rinder mit vielversprechenden neuen Eigenschaften. Nach Transfektion zusätzlicher Kopien von ß- und k-Casein in bovine Fibroblasten und deren Verwendung im Klonen sind 11 Kälber geboren worden. Bei 9 von 11 Nachkommen wurden 8 – 20% mehr ß-Casein, doppelt soviel k-Casein wie im nicht-transgenen Tier sowie ein insgesamt verändertes k-Casein zu Gesamt-Casein-Verhältnis festgestellt (Brophy et al., 2003). Dies zeigt, dass eine signifikante Veränderung in der Milchkomposition durch Transfer zusätzlicher Kopien endogener Gene möglich ist. Durch Transfektion boviner Fibroblasten mit einem milchdrüsenspezifischen Konstrukt, in dem der ß-Lactoglobulinpromoter die Expression von Lysostaphin treibt, wurden nach deren Verwendung im Klonprozess transgene Kühe mit einer Sekretion von 0,9 bis 14 mg pro ml biologisch aktivem Lysostaphin in der Milch produziert (Wall et al., 2005). Diese Tiere zeigten eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber Staphylococcus aureus-Infektionen im Euter. Nachdem Staphylococcus aureus direkt in das Euter infundiert worden war, wurden nur drei der transgenen 21 Tiere krank – und das auch nur bei einer extrem hohen Infektionsdosis – während von den nicht transgenen Tieren nur 13 von 47 Tieren nicht erkrankten (Wall et al., 2005).

Mit Hilfe des Kerntransfers ist es erstmals beim Nutztier auch möglich, nicht nur additiven Gentransfer zu betreiben (wie oben beschrieben), sondern auch Gene spezifisch auszuschalten (Kues und Niemann, 2004). Ein gutes Beispiel dafür ist die Produktion geklonter Rinder mit Resistenz gegenüber BSE. Bei diesen Tieren wurde durch Gen-Targeting-Verfahren der Genort für das Prionprotein ausgeschaltet (sogen. Knockout) (Richt et al., 2007). Diese Tiere bilden heute die Grundlage für eine Herde transgener Tiere, die polyklonale Antikörper für die Humanmedizin im Blut produzieren (Robl et al., 2007). Erste Ergebnisse dazu sind vielversprechend. Es konnten nennenswerte Mengen biologisch aktiver polyklonaler Antikörper im Blut transgener Rinder nachgewiesen und diese daraus auch isoliert werden (Kuroiwa et al., 2009).

4 Pluripotente Stammzellen bei Nutztieren

Die Anwendungsperspektiven des somatischen Klonens zur Erstellung transgener Tiere würden durch die Verfügbarkeit pluripotenter Stammzellen deutlich verbessert werden (Kues und Niemann, 2004). Die zz. verfügbaren somatischen Zellen sind im wesentlichen primäre Zellkulturen, die eine begrenzte Lebensdauer in der *In-vitro*-Kultur haben, was langwierige Selektionsprozesse, die im Zusammenhang mit dem Knockout eines Gens stehen, sehr erschweren oder gar unmöglich machen kann. Die verfügbaren embryonalen Stammzellen bei der Maus bilden die Grundlage für die zahlreichen Knockout–Mausmodelle (Evans, 1981, 2005; Kues et al., 2008). Möglichkeiten zur Produktion pluripotenter Stammzellen bei Nutztieren bestehen in der Ableitung embryonaler Stammzellen aus Blastozysten (Evans, 1981), durch die Reprogrammierung somatischer Zellen über Kerntransfer (somatisches Klonen), über Reprogrammierung durch Fusion einer somatischen Zelle mit einer pluripotenten Zelle (Nowak-Imialek et al., 2009) sowie durch direkte Überexpression bestimmter Pluripotenzfaktoren (sog. induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) (Takahashi und Yamanaka, 2006; Park et al., 2008; Amabile und Meissner, 2009). Echte embryonale Stammzellen (d.h. solche mit Keimbahngängigkeit) konnten bisher bei Nutztieren nicht abgeleitet werden, obwohl seit vielen Jahren intensiv wissenschaftlich daran gearbeitet wird (Gjorret und Maddox-Hyttel, 2005; Trounson, 2005).

Vielversprechend ist die neue Technologie der iPS-Produktion. Erste Ergebnisse beim Schwein (Esteban et al., 2009; Wu et al., 2009; Ezashi et al., 2009) deuten darauf hin, dass solche pluripotenten Zellen auch bei anderen Nutztieren in naher Zukunft verfügbar werden sollten. Pluripotente Stammzellen, d.h. solche Zellen, die sich unbegrenzt in der Kultur vermehren können, ohne ihren Karyotyp zu verändern, haben für die Zukunft der Züchtung erhebliche Bedeutung. Pluripotente Stammzellen von wertvollen Zuchttieren könnte man für bestimmte gewünschte genetische Merkmale charakterisieren und dann ausgewählte Zellen im Kerntransfer einsetzen, um bestimmte Genotypen zu produzieren. Bei weiteren Fortschritten in der Forschung könnte es sogar möglich werden, solche Stammzellen in weibliche und männliche Gameten zu differenzieren und diese dann in der *In-vitro*-Fertilisation zur Produktion von Embryonen einzusetzen, die dann nach Transfer in Empfängertiere zu Nachkommen führen (Kues et al., 2008). Im Mausmodell ist eine solche Differenzierung von Stammzellen in weibliche und männliche Gameten bereits nachgewiesen.

5 Perspektiven für eine zukünftige Tierzucht und somatisches Klonen

Im Zusammenhang mit den immer besser werdenden Kenntnissen über das Nutztiergenom bietet das Klonen unter Verwendung von Stammzellen große Chancen für die Entwicklung einer diversifizierten und zielgenauen Tierproduktion. Denkbar ist eine Aufteilung in eine landwirtschaftliche Tierzucht mit einer zielgenauen Milchproduktion, entweder in Bezug auf die Menge und/oder für spezifische Inhaltsstoffe, eine Fleischproduktion mit einer diversifizierten Produktpalette, Nischenproduktion für spezifische diätetisch wertvolle Produkte oder die Produktion von Tieren für die Landschaftspflege. Daneben wird sich eine biomedizinische Tierzucht entwickeln, in der Tiere für die Produktion von Arzneimitteln (Pharming) erzeugt und transgene Schweine für die Organspende (Xenotransplantation) entwickelt werden (Kues und Niemann, 2004; Petersen et al., 2009). Auch die Entwicklung von transgenen Tieren als Krankheitsmodell für den Menschen bietet vielversprechende Perspektiven, wie jüngste Befunde zu transgenen Schweinen mit einem Modell für die zystische Fibrose zeigen (Rogers et al., 2008). Wei-

tere Diversifizierungen der Tierzucht könnten die ökologische Tierhaltung und die Sport- und Liebhaberzucht betreffen.

Die Erkenntnisfortschritte im genomischen Bereich, sowohl was die Aufklärung der Genome der landwirtschaftlichen Nutztiere als auch die molekulargenetischen Techniken angeht, sind im Wesentlichen der Entwicklung im Human- und Mausgenom gefolgt. Die Möglichkeiten zur Erkenntnis- und Produktionserweiterung durch gezielte Veränderungen im Genom von Nutztieren sind besonders bedeutsam; sie werden durch die Entwicklung neuer molekularer Hilfsmittel und Züchtungstechnologien vorangetrieben. Es bestehen jedoch nach wie vor große Lücken in unserem Verständnis der Funktionen des Genoms und der epigenetischen Mechanismen, die wesentlich für die Produktion gesunder Nachkommen sind. Eine besonders wichtige Rolle in diesem Zusammenhang wird die Entwicklung pluripotenter Stammzellen spielen. Die Verfügbarkeit solcher Zellen zusammen mit der Nutzung genomischer Daten wird neue molekulare Zuchtprogramme ermöglichen, die deutlich schneller und effektiver sind als alle aktuellen Zuchtprogramme. Der erstmalige Bericht, dass durch transgene Überexpression von nur vier Transkriptionsfaktoren (Oct4, Sox 2, KLf4 und cMyc) eine Umwandlung somatischer Zellen in pluripotente Stammzellen erfolgen kann (Takahashi und Yamanaka, 2006), wird entsprechende Forschungen bei Großtieren deutlich stimulieren und beschleunigen (Esteban et al., 2009; Wu et al., 2009; Ezashi et al., 2009). Genetisch veränderte Nutztiere werden zunächst eine wachsende Rolle im biomedizinischen Bereich spielen. Die Realisierung landwirtschaftlicher Anwendungspotentiale wird angesichts der Komplexität vieler der ökonomisch wichtigen Produktionsmerkmale noch länger dauern.

Eine möglichst effiziente Nutzung landwirtschaftlicher Nutztiere ist angesichts weltweiter Knappheit an landwirtschaftlich nutzbarem Land und der wachsenden Weltbevölkerung dringend geboten. Die neuen genomischen Techniken und das somatische Klonen eröffnen neue Wege für die Rinderzucht im Hinblick auf eine nachhaltige Verbesserung und Effizienzsteigerung – sowohl in der westlichen Welt, als auch in den Entwicklungsländern. Der Weg dorthin ist eine große Herausforderung für Wissenschaft und Tierzuchtpraktiker, der verantwortungsbewusst und konsistent in Angriff genommen werden sollte.

Literatur

Amabile, G. and A. Meissner, (2009): Induced pluripotent stem cells: Current progress and potential for regenerative medicine. Trends Mol. Med. **15**, 59–68.

Beja-Pereia, A., D. Caramelli, C. Lallueza-Fox, C. Vernesi, N. Ferrand, A. Casoli et al., (2006): The origin of European cattle: evidence from modern and ancient DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **103**, 8113-8118.

Brophy, B., G. Smolenski, T. Wheeler, D. Wells, P. L'Huillier and G. Laible, (2003): Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of β-casein and κ-casein. Nature Biotechnol. **21**, 157 – 162.

Cibelli, J.B., K.H. Campbell, G.E. Seidel, M.D. West and R.P. Lanza, (2002): The health profile of cloned animals. Nature Biotechnol. **20**, 13 – 14.

Esteban, M.A., J. Xu, J. Yang, M. Peng, D. Qin, W. Li, Z. Jiang, J. Chen, K. Deng, M. Zhong, J. Cai, L. Lai and D. Pei, (2009): Generation of Induced Pluripotent Stem Cell Lines from Tibetan Miniature Pig. J. Biol. Chem. **284**, Issue 26, 17634-17640.

European Food Safety Agency, (2009): Available from: URL: http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178676923092.htm.

Evans, M.J. and M.H. Kaufmann, (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature **292**, 154–156.

Evans, M., (2005): Embryonic stem cells: A perspective. *Novartis Found Symp.* **265**, 98–103, and discussion **265**, 103–106, **265**, 122–128.

Ezashi, T., B.P.V.L. Telugu, A.P. Alexenko, S. Sachdev, S. Sinha and R.M. Roberts, (2009): Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. Proc. Nat. Acad.Sci. USA **106**, 27, 10993-10998.

Gjørret, J.O. and P. Maddox-Hyttel, (2005): Attempts towards derivation and establishment of bovine embryonic stem cell-like cultures. *Repr., Fertil. Developm.* **17**, 113–124.

Groeneveld, E., N.H. Tinh, W. Kues and N.T. Vien, (2008): A protocol for the cryoconservation of breeds by low-cost emergency cell banks – a pilot study. Animal **2**, 1-8.

Kues, W.A. and H. Niemann, (2004): The contribution of farm animals to human health. Trends Biotechnol. **22**, 286-294.

Kues, W.A., D. Rath and H. Niemann, (2008): Reproductive biotechnology in farm animals goes genomics. CAB Reviews **3**, (36), 1-18.

Kuroiwa, Y., P. Kasinathan, T. Sathiyaseelan, J. Jiao, H. Matsushita, J. Sathiyaseelan, H. Wu, J. Mellquist, M. Hammitt, J. Koster, S. Kamoda, T. Tachibana, I. Ishida and J.M. Robl, (2009): Antigen-specific human polyclonal antibodies from hyperimmunized cattle. Nature Biotechnol. **27**, 173 – 181.

Lanza, R.P., J.B. Cibelli, D. Faber, R.W. Sweeney, B. Henderson, W. Nevala, M.D. West and P.J. Wettstein, (2001): Cloned Cattle Can Be Healthy and Normal. Sci. **294**, 1893-1894.

Larson, G., U. Albarella, K. Dobney, P. Rowley-Conwy, J. Schibler, A. Tresset et al., (2007): Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **104**, 15276 – 15281.

Loi, P., G. Ptak, B. Barboni, J. Fulka Jr., P. Cappai and M. Clinton, (2001): Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. Nature Biotechnol. **19**, 962 – 964.

Miller, H.I., (2007): Food from cloned animal is part of our brave old world. Trends Biotechnol. **25**, 201-203.

Niemann, H. and W.A. Kues, (2007): Transgenic farm animals: an update. *Reprod., Fertil. Developm.* **19**, 762–770.

Nowak-Imialek, M., W.A. Kues, C. Rudolph, B. Schlegelberger, U. Taylor, J.W. Carnwath and H. Niemann, (2009): Preferential loss of porcine chromosomes in reprogrammed inter-species cell hybrids, Cloning and Stem Cells (accepted for publication).

Panarace, M., J.I. Agüero, M. Garrote, G. Jauregui, A. Segovia, L. Cané, J. Gutiérrez, M. Marfil, F. Rigali, M. Pugliese, S. Young, J. Lagioia, C. Garnil, J.E. Forte Pontes, J.C. Ereno Junio, S. Mower and M. Medina, (2007): How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. Theriogenology **67**, 142-151.

Park, I.-H., R. Zhao, J.A. West, A. Yabuuchi, H. Huo, T.A. Ince, P.H. Lerou, M.W. Lensch and G.Q. Daley, (2008): Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. Nature 451, 141-146.

Petersen, B., A. Lucas-Hahn, M. Oropeza, N. Hornen, E. Lemme, P. Hassel, A.L. Queisser and H. Niemann, (2008): Development and validation of a highly efficient protocol of porcine somatic cloning using preovulatory embryo transfer in peripubertal gilts. Cloning Stem Cells **10**, 355-362.

Petersen, B., J.W. Carnwath und H. Niemann, (2009): The perspectives for porcine-to-human xenografts. Comp. Immunol., Microbiol. Infect. **32**, 91-105.

Richt, J.A., P. Kasinathan, A.N. Hamir, J. Castilla, T. Sathiyaseelan and F. Vargas, (2007): Production of cattle lacking prion protein. Nature Biotechnol. **25**, 132-138.

Robl, J.M., Z. Wang, P. Kasinathan and Y. Kuroiwa, (2007): Transgenic animal production and animal biotechnology. Theriogenology **67**:127-133.

Rogers, C.S., D.A. Stoltz, D.K. Meyerholz, L.S. Ostedgaard, T. Rokhlina, P.J. Taft, M.P. Rogan, A.A. Pezzulo, P.H. Karp, O.A. Itani, A.C. Kabel, C.L. Wohlford-Lenane, G.J. Davis, R.A. Hanfland, T.L. Smith, M. Samuel, D. Wax, C.N. Murphy, A. Rieke, K. Whitworth, A. Uc, T.D. Starner, K.A. Brogden, J. Shilyansky, P.B. McCray, Jr., J. Zabner, R.S. Prather and M.J. Welsh, (2008): Disruption of the *CFTR* Gene Produces a Model of Cystic Fibrosis in Newborn Pigs. Science **321**, 1837 – 1841.

Rudenko,L., J.C. Matheson and S.F. Sundlof, (2007): Animal cloning and the FDA—the risk assessment paradigm under public scrutiny. Nature Biotechnol. **25**, 39 – 43.

Takahashi, K. and S. Yamanaka, (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676.

Trounson, A., (2005): Derivation characteristics and perspectives for mammalian pluripotential stem cells. *Reprod., Fertil. Developm.* **17**, 135–141.

Wall, R.J., A.M. Powell, M.J. Paape, D.E. Kerr, D.D. Bannerman, V.G. Pursel, K.D. Wells, N. Talbot and H.W. Hawk, (2005): Genetically enhanced cows resist intramammary Staphylococcus aureus infection. Nature Biotechnol. **23**, 445 – 451.

Wells, D.N., P.M. Misica, H.R. Tervit and W.H. Vivanco, (1999): Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reprod., Fertil. Developm.* **10**, 369 – 378.

Wu, Z., J. Chen, J. Ren, L. Bao, J. Liao, C. Cui, L. Rao, H. Li, Y. Gu, H. Dai, H. Zhu, X. Teng, L. Cheng and L. Xiao, (2009): Generation of Pig-Induced Pluripotent Stem Cells with a Drug-Inducible System. J. Mol.Cell Biol. June 3, J. Molecular Cell Biol., doi:10.1093/jmcb/mjp003.

Yang, X., X.C. Tian, C. Kubota, R. Page, J. Xu, J. Cibelli and G. Seidel Jr. (2007): Risk assessment of meat and milk from cloned animals. Nature Biotechnol. **25**, 77 – 83.