

유전자 생체 이식 연구 Gene Targeting and Transgenic Research in the Biomedical Field

서울의대 생화학교실

서 정 선

서 론

유전자 생체 이식 기술은 특정 유전자를 수정란 속에 삽입시키거나 또는 유전자 조작을 거친 태아기간세포 (Embryonic stem cell)를 낭배기 태아에 넣어 주어 새로운 형질을 가진 생명체를 태어나게 하는 기술이다. 유전학적으로 '기능의 획득이나 소실'에 해당되는 이 기술은 유전자들의 생체 내에서의 기능을 알 수 있게 한다는 점에서 엄청난 중요성과 유용성이 있다. 이것은 마치 설계도만으로는 정확히 알 수 없었던 것을 집이 완성된 후에 쉽게 전체를 파악할 수 있는 것과 같은 것이다. 유전자 생체 이식 기술은 분자생물학에서 얻은 하나 하나의 부품들을 몸이라는 전체 속에서 조형해 볼 수 있는 유일한 기술로써 21세기 의학의 핵심영역을 차지할 것으로 예측되고 있다. 유전자 생체 이식 기술의 등장으로 앞으로 의·생물학의 흐름은 분자생물학에서 생체 생물학 (In vivo Biology) 또는 전개체 생물학 (Whole animal biology)의 방향으로 점진적으로 변화하고 있다.

분자생물학의 성공과 한계

분자생물학의 DNA 조작 기술과 포유동물 태생학 기술은 유전자 생체 이식 기술을 떠 받히고 있는 두 기둥이다. 특히 유전자를 마음대로 조작할 수 있는 분자생물학의 기술적 성공이 없었다면 생체내 유전자 이식은 불가능하였을 것이다. 그러나 분자생물학의 강력함 뒤에는 몸에서 세포로 그리고 유전자로 환원을 계속하여 얻은 대상의 단순화라는 엄청난 통찰력이 있음을 간과하여서는 안된다. 대부분의 경우 장점과 한계가 서로 붙어 있듯이 분자생물학의 경우에도 모든 문제를 유전자로 단순화시킨 것이 바로 한계이며 약점이 되고 있다. 분자생물학적 방법론은 단일 세포들 내에서 공통적인 사건의 접근과 해석에는 탁월한 점이 있으나 다세포생물의 발생 및 각 장기에서의 특수기능연구에서는 큰 도움이 못되고 있다.

분자생물학은 몸의 문제를 유전자의 문제로 단순화시키면서 생명이 단순한 물질기계에 불과하며 부품의 기능의 합이 생명이라는 환원주의적 기계론적 생명관을 탄생시켰었다. 이러한 경향은 결국 20세기 후반의 의·생물학의 특징을 유전자 만능 시대로 규정짓게 하고 있으며 1990년 인체 게놈 분석 계획이라는 야심찬 계획을 출범시켰었다.

결국 인간의 모든 유전자의 서열을 밝혀려는 인체 게놈 분석계획 (Human Genome Project)이 모든 문제의 마지막 해결책이 될 것인가? 의학이 과학의 방법론을 승배하는 한 분자생물학은 자신의 한계에도 불구하고 미래의학의 바탕학문으로서의 역할을 수행할 것이다. 이 계획의 성공여부는 차치하더라도 한가지 분명한 것은 21세기 의학이 이러한 기계론적

생명관의 연장선상에 있을 수밖에 없다는 사실이다.

새로운 의·생물학의 경향 - "몸으로의 회귀"

그렇다면 21세기의 의학은 세포수준의 미시적 생물학인 분자생물학의 연장선상에서 모든 질병의 원인을 유전자의 잘못에서만 찾으려는 특징만을 나타내게 될 것인가? 대답은 한마디로 '아니다'이다. 게놈 분석과 같이 환원주의적 경향이 더욱 활발하게 일어나기는 하겠지만 단순화의 역작용으로 본래 '몸으로의 회귀' 운동이 일어날 것이기 때문이다. '몸으로의 회귀'라는 것은 몸을 알기 위해 유전자까지 환원되었던 지난 160년의 생물학의 역사가 앞으로는 다시 몸의 차원에서 마지막으로 문제해결을 시도한다는 뜻이다.

그렇다면 무엇이 몸으로의 회귀 운동을 주도하게 될 것인가? 그것이 바로 유전자 생체 이식 기술 (Transgenic technique)이다. 미시적인 생물학인 분자생물학의 성과를 거시적 생물학인 의학으로 연결시켜 주는 고리가 바로 유전자 생체 이식 기술인 것이다 (여기에서 사용하는 유전자 생체 이식 기술이란 유전자 적중 기술도 포함하는 넓은 의미의 유전자 이식을 의미한다). 유전자 생체 이식 기술의 도입으로 인류는 기계론적인 생명관과 함께 전일적 (Holistic)이고 유기체적 (Organismic)인 생명관을 갖게 될 것이다.

유전자 생체 이식 기술의 세단계

기술적인 측면에서 유전자 이식 기술을 단계별로 나누어 보면 앞으로 발전 방향을 쉽게 예측할 수 있다. 유전자 이식에서 궁극적으로 필요한 기술은 생식세포에서 잘못된 유전자를 정확하게 제거하고 정상유전자를 그 자리에 바로 치환시키는 기술일 것이다. 사람에서는 생식세포에서의 유전자 조작이 엄격히 금지되어 있기 때문에 체세포에서만 유전자 조작을 엄격한 규정하에서 시행하고 있다. 그러나 아직도 정확하게 제자리에서 치환하는 기술이 불가능하기 때문에 염색체 아무 곳이나 또는 세포질 내에서의 일시적 발현만을 목표로 하는 방식으로 다소 성급하게 유전자 이식의 실용화를 서두르고 있다. 이런 의미에서 볼 때 현재 암환자 등 불치병을 대상으로 하는 유전자 치료법은 진정한 의미의 유전자 치료법으로 볼 수 없다.

유전자 생체 이식 기술을 세단계로 나누면 첫 단계는 염색체의 아무 곳이나 유전자가 삽입되게 이식하는 것이다. 기술적으로 가장 많이 사용되고 있는 방법으로 헤테롤로구스 재조합법 (Heterologous recombination)에 의한 것이다. DNA 미세주사 삽입법 (microinjection)으로 만들어지는 유전자 이식 생쥐가 여기에 속한다. 이 방법의 장점은 강력한 증상을 빠른 시간 내에 얻을 수 있다는 점이다.

두 번째로는 호몰로구스 재조합 방법 (Heterologous recombination)에 의한 것으로 원래 유전자를 찾아내어 소실시키거나 변형시키는 경우이다. 현재 유전자 적중 (Gene Targeting) 방법에 의한 녹아웃 (knock-out) 생쥐제조가 이 방법에 속한다. 이 방법은 본래의 유전자 자리를 찾아간다는 점에서 중요한 의미가 있다. 그러나 이 방법에서도 아직 정상유전자로의 치환은 시도되지 못하고 있다. 단지 유전자의 기능 소실을 통하여 매우 정확하게 기능을 알 수 있는 것이 장점이다.

세 번째 단계는 두 번째와 같이 제자리의 본래 유전자를 찾아갈 뿐 아니라 정상적인 유전자로 바꾸는 일까지 하는 것이다. 최근에 노스캐롤라이나 대학의 스미시즈 박사에 의해 원래 유전자의 개수를 변형시키는 실험이 생쥐에서 성공한 바 있으며 아직도 더 많은 실험이

필요한 듯이 보기는 하나 기술적으로는 문제가 없다.

유전자 생체 이식 기술과 인체 질환 모델

유전자 이식 기술 (Transgenic Technique)은 특정 유전자를 수정란 (주로 생쥐를 많이 사용함)의 핵 속에 삽입하여 새로운 형질을 나타내는 생명체를 얻는 기술이다. 유전학적으로 "기능의 획득 (Gain of Function)"에 해당하는 이 기술은 기능을 모르는 채로 클론된 유전자의 생체 내에서의 기능을 알 수 있게 한다는 점에서 엄청난 중요성과 유용성이 있다. 이것은 마치 설계도만으로는 알 수 없었던 것을 집이 완성된 후에 쉽게 전체를 파악할 수 있는 것과 같은 것이다. 분자생물학에서 얻은 하나 하나의 부품들을 몸이라는 전체 속에서 조명해 볼 수 있는 유일한 기술로써 생물학의 미래 기술이라고 할 수 있다.

미시적 생물학인 분자생물학은 거시적 생물학인 유전자 이식 동물 기술에 의해서만 생을 조명할 수 있다.

생명을 각종 부품들 (실제는 단백질에 해당됨)의 합으로 재현할 수 있다고 믿는 기계론적 생명관을 바탕으로 하는 분자생물학은 유전자 이식 기술의 성공으로 그 동안의 성과를 몸이라는 생체 내에서 검색 받을 수 있게 되었다. 지금까지 자연의 실수로 드물게 나타나는 유전자의 변이로 생기는 몸의 증상 (유전병)으로부터 조금씩 알 수 있었던 것을 이제는 자연의 실수를 사람이 디자이너 (Designer)가 되어 마음대로 만들어 낼 수 있게 된 것이다.

유전자 적중 기술 (Gene-Targeting)은 이식 기술과 함께 생체내의 유전자조작을 미세한 수준까지 확대시킨 고 난이도의 기술이다. 녹-아웃 기술 (Knock-out)이라고 하는 이 기술은 DNA간의 동형 재조합 (Homologous Recombination)방법을 이용한다. 특정 유전자와 동일한 구조를 가진 벡터의 앞과 뒷부분을 이용하여 비정상적인 부분을 삽입함으로써 결국은 특정 단백질의 생산을 못하게 하여 개체 내에서 기능을 알 수 있게 한다. 이 경우에는 "기능의 소실 (Loss of Function)"에 의해 역으로 본래의 기능을 추적하는 것이다. 적중 기술은 이식 기술에 비해 보다 자연스러운 (또는 생리적인) 기능변화를 알 수 있다는 장점을 갖고 있다. 이식 기술의 경우 수백~수천 개의 DNA조각이 염색체의 한 곳에 융화되기 때문에 확실하기는 하나 약간은 과장된 현상이 나올 가능성이 있다. 그러나 이식 기술은 적중 기술과는 달리 만들기가 쉽다는 장점 이외에도 적절한 프로모터의 이용으로 장기별 기능변화를 알 수 있기 때문에 또 다른 매력을 가지고 있다.

"기능의 획득이나 소실" 현상이 몸이라는 개체에서 현상으로 나타나기 때문에 우리는 쉽게 유전자라는 한 조각 DNA의 변이가 특정 질병의 증상과 정확히 관련이 있음을 명백히 알아낼 수가 있다. 따라서 유전자 이식 및 적중 기술을 이용한 인체 질환 모델 동물의 개발은 단순한 모델 동물의 개발이 아닌 원인을 주고 난 후의 결과로서의 질병 모델을 갖는 것으로서 질병의 병인과 증상을 손쉽게 연결시킬 수 있다는 것이 엄청나게 중요한 점이다.

더욱이 하나이상의 유전자들의 이상으로 발생하는 다유전적 소인 질환 (Multigenic Disorder)인 대부분의 난치성 성인병, 예를 들면 암, 당뇨병, 고혈압 등의 경우에는 각 유전자들의 이식 및 적중동물들을 서로 교배시켜 가면서 여러 유전자의 변이를 한 생쥐에서 동시에 일으킴으로써 정확한 병인 규명이 가능하게 될 것이다.

따라서 유전자 이식 및 적중생쥐를 이용한 인체 질환 모델은 학문적으로 파급효과가 크며, 일단 개발되면 치료제의 선별 (Screening)에서 세포배양 등의 방법으로는 따를 수 없는 장점이 있으므로 구미 제약회사에서는 큰 연구비를 투입하여 상품화하고 있다. 이와 관련된 최근의 연구개발 동향을 살펴보면 다음과 같다.

Table 1. 유전자 이식 생쥐를 이용한 암 모델 생쥐

| 이식된 유전자 | 발현부위 및 프로모터 | 관련된 인체질환 | 참고 문헌 |
|---------------|--------------|----------------------|---------------------------------|
| c-neu | 유선/Viral | 유선암 | Muller, 1988 Bouchard, 1989 |
| int-1 | 유선/ MMTV | 유선암, 타액선암 | Tsakamoto, 1988 |
| TGF- α | 유선/ MMTV | 유선암 | Matsui, 1990 |
| cyclin-D | 유선/ MMTV | 유선암 | Wang, 1994 |
| c-myc | B 임파구/ 면역글로빈 | 임파종 | Nussenzweig, 1988 |
| Bcl-2 | B 임파구/ 면역글로빈 | 악성 임파종 | McDonell, 1989, 1991 |
| myc | B 임파구/ 면역글로빈 | Burkitt's Lymphoma | Strasser, 1990 |
| bcr/abl | bcr 프로모터 | 백혈병 | Heisterkamp, 1990 |
| pim-1 | 임파구 | 임파종 | Breuer, 1989 |
| HBsAg | 간 | 간암 | Chisari, 1989 |
| SV40 Tag | 간 | 간암 | Kitagawa, 1991 |
| HBV X gene | 간 | 간암 | Kim, 1991 |
| SV40 Tag | 망막 | Retinoblastoma | Windle, 1990 |
| TGF- α | MT-1 프로모터 | 간장과 유선의 장기 분화이상 및 종양 | Jhsppan, 1990 Sandgren, 1990 |

가) 유전자 이식 질환 모델 동물 개발 및 응용연구 (Transgenic Mice as a Human Disease Model)

유전자 이식 기술로 가장 처음 개발된 모델 동물은 암 발생 유전자 이식 생쥐이다. 암질환이 제일 먼저 개발된 것은 암 유전자 연구가 비슷한 시기에 활발했던 점도 있으나 중요한 것은 암 유전자가 강력한 우성 (Dominant) 형질을 나타낸다는 점이다. 1984년 Brinster 등이 SV 40 T 항원유전자를 이식하여 만든 Ependymoma (Ventricle 내막세포암)을 필두로 P. Leder의 c-myc 발현 유선암, 그리고 D. Hanahan의 SV 40 T 항원발현 췌장 β 세포암이 나란히 서두를 장식하였다. 특정 세포에서 발현되는 조직 특이적 프로모터를 이용하거나 여러 조직에서 광범위하게 발현되는 조직 비특이적 프로모터를 이용하여 장기마다 암의 발생을 유도하였다 (Table 1 참조). 경우에 따라서는 B형 간염바이러스의 X-유전자에서와 같이 기능을 모르는 유전자를 사용하여 간암발생이 나타나는 것을 보고 X-유전자와 암 발생이 관계가 있다는 사실을 처음으로 보고한 경우도 있다. 작년에는 세포주기에 관련된 Cyclin D 유전자를 유선 (mammary gland)에서 발현시켜 유선암을 유발시킴으로써 세포주기의 이상이 암을 일으킨다는 사실을 밝혔다 (Wang 등, 1994). 또 다른 한편에서는 아포토우시스 (Apoptosis)를 억제하는 Bcl-2 유전자를 과발현시켜 B세포 임파종을 일으킴으로써 Bcl-2에 의한 아포토우시스 억제가 암발생과 관련이 있음을 보고하였다 (McDonell 등, 1989, 1991).

암억제 유전자 (tumor suppressor gene)의 경우는 변이형 암억제 유전자의 과발현을 일으켜 각종 암을 일으키는 등 암발생에 관여할 것으로 추측되는 유전자들이 직접 생체 내에서 암발생과 관련이 있음을 쉽게 증명하고 또 이들 암조직을 분석함으로써 암발생 원인 분석을

Table 2. 유전자 이식 생쥐를 이용한 면역계 질환 모델

| 이식된 유전자 | 발현부위 및 프로모터 | 관련된 인체 질환 | 참고 문헌 |
|---------------|-------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| c-fos | H-2K 프로모터 | T 임파구 분화 이상 | Puther, 1988 |
| TCR | T 임파구 | T 임파구 분화 이상 | Uematsu, 1988 Pircher, 1989 Krimpenfort, 1989 Ferrick, 1989 Berg, 1989 |
| 면역글로빈 | B 임파구 | B 임파구 분화 이상 | Neuberger, 1989 |
| MHC-II 특이 TCR | T 임파구 | CD4+CD8- T 임파구 증가 | Kaye, 1989 |
| CD8 | T 임파구/ CD2 | CD4-CD8+ T 임파구 증가 | Robey, 1991 |
| IL-4 | B 임파구 | IgE의 양 증가 (allergic inflammatory disease) | Tepper, 1990 |
| MHC-I 특이 TCR | T 임파구 | CD4-CD8+ T 임파구 증가 | Sha, 1998 |
| MBP 특이 TCR | T 임파구 | 자가면역 (뇌 척수염) | Lafaille, 1994 Goverman, 1993 |
| RBC 특이 TCR | B 임파구 | 자가면역 | Murakami, 1992 |
| HEL | 혈액 | 관용유발 (tolerance induction) 모델 | Adelstein, 1991 |
| MHC | 체장 | 관용유발 (tolerance induction) 모델 | Burkly, 1990 |

시도하고 있다.

암모델 다음으로 많이 응용되는 분야는 면역계통질환이다. T임파구 또는 B임파구에서 특이적으로 발현되는 프로모터를 이용하여 T임파구 또는 B임파구의 활성화 기전을 억제시킴으로써 분화이상을 초래케 하여 모델을 만들고 있다. 면역계통 질환 모델이 유전자 이식 기술로 많이 개발되는 중요한 이유는 면역현상이 단일 세포연구만으로는 연구될 수 없는 개체 차원의 현상이기 때문이다. 특히 관용현상 (Tolerance)을 이해하기 위해서는 자신의 항원을 자기 것 (selfness)으로 인식하는 특정시기 전 후로 특정 항원 유전자를 발현하는 유전자 이식동물을 만드는 것이 필수적이다 (Adelstein 등, 1991. Burkly 등 1990). 중요한 면역계통 질환 모델을 Table 2에 정리하였다.

기타 질환 모델로는 당뇨병, 동맥경화증 그리고 신경계통 질환 모델이 있다 (Table 3 참조). 지금도 유전자 은행에는 기능을 모르는 채로 클론된 수많은 유전자가 있으며 이 유전자들의 기능을 조금이라도 유추하기 위해서는 특정 프로모터를 이용한 유전자 이식 기술의 이용은 절대적이라고 볼 수 있다. 이식 기술을 이용한 질환 모델 개발은 한번 확립만 되면 매우 쉽게 동물들을 생산할 수 있으며 적중 기술에 의한 개발보다 위험성이 적다는 점에서 앞으로도 계속 이용될 것으로 생각된다.

나) 유전자 적중법 (Gene Targeting 또는 knock-out)에 의한 질환 모델 동물 개발 및 응용연구

유전자 적중 기술을 처음으로 생각해낸 사람은 유타대학의 M. Capecchi 박사와 노스캐롤

Table 3. 유전자 이식 생쥐를 이용한 인체 질환 모델

| 이식된 유전자 | 발현부위 | 관련된 인체 질환 | 참고 문헌 |
|---------------------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| MHC-II | 췌장 | 당뇨병 타입 I | Lo, 1988 |
| 인터페론-감마 | 췌장 | 당뇨병 타입 I | Sarvetrick, 1988 |
| MHC-I | 췌장 | 당뇨병 타입 I (췌장의 구조는 온전) | Allison, 1988 |
| Calmodulin | 췌장 | 당뇨병 타입 I | Epstein, 1989 |
| hemagglutinin gene of Influenza Virus | 췌장 | 당뇨병 타입 I | Roman, 1990 |
| 인터페론-알파 | 췌장 | 당뇨병 타입 I | Stewart, 1993 |
| 아포리포프로테인 | Transferrin 또는 Apo A 프로모터 | 동맥경화증 | Waiden, 1993 Lawn, 1992 Rubin, 1991 |
| CETP | 혈관내피세포 | 동맥경화증 | Marotti, 1993 |
| 프리온 (Prion) 단백질 | 신경세포 | 신경질환 (Scrapie) | Scott, 1993, 1994 DeArmond, 1994 Westaway, 1994 Hsiao, 1994 |
| 변이된 APP 유전자 | 신경세포 | 치매 (Alzheimer's Disease) | Games, 1995 |
| APP 유전자 C-말단 | 신경세포 | 치매 (Alzheimer's Disease) | Kawabata, 1991 |
| β -APP751 | 신경세포 | 치매 (Alzheimer's Disease) | Quan, 1991 |
| β -APP | 신경세포 | 치매 (Alzheimer's Disease) | Wirak, 1991 |

라이나 의대의 O. Smithies 박사 (N. Maeda 박사의 남편) 두 분이다. 세포의 염색체내 특정 부위에 외부 DNA를 삽입시키겠다는 시도는 처음에는 실현가능성이 의심되어 연구비가 거절되기도 하였다. 이 두 연구자의 노력으로 마침내 유전자 적중 기술은 귀중한 새로운 기술로 정착되었다. 특정 실험목적에 맞는 돌연변이를 찾기 위하여 돌연변이원이 무작위적으로 일으키는 변이를 기다리던 시대는 지나 갔다. 만일 IL-2의 중요성을 알아보고 싶다면 그 유전자를 선택적으로 조작하여 기능을 없애는 유전자 적중법을 시행하는 것이 기능을 아는데 제일 빠른 지름길이 된다. 몇 년전까지만 해도 이 기술은 개념적인 혁명으로서는 중요성이 인정되었으나 실험이 더디게 진행되어 실제로 성공한 실험의 수는 아주 소수에 불과하였다. 그러나 지금에 와서는 Embryonic stem cell (ES cell)이 개량되고 PCR 기술에 의한 genomic 유전자의 클론이 매우 편하여지고 기타 기술적인 장애물이 하나씩 제거되므로서 이제는 많은 유전자이식 실험실에서 성공적으로 수행되고 있다. 앞으로의 문제는 적중 실험이 되었는가 안되었는가에 있는 것이 아니고 무슨 유전자를 knockout 시켰을 때 증상이 과연 오겠는가를 잘 생각해서 실험에 임해야 한다. 대부분의 실험실들이 유전자 결핍 생쥐를 만들고도 증상이 없어서 헛된 노력만 들인 경우가 많다. 그 이유를 살펴보면 적중을

Table 4. 유전자 적중 기술을 이용한 인체질환 모델 생쥐

| 적중 유전자 | 기능 | 관련된 인체 질환 | 참고 문헌 |
|--------------|------------------|---------------------------|----------------------------------|
| IL-2 | 면역조절 | 면역기능의 저하 | Schorl, 1991 |
| RAG-1과 RAG-2 | 항체와 TCR 유전자의 재배열 | 면역결핍 | Shinkai, 1992 Mombaerts, 1992 |
| CFTR | 이온채널 | 낭포성 섬유증 (Cystic Fibrosis) | Snouwaert, 1992 |
| 안지오텐시노젠 | 혈압조절 | 고혈압 | Smithies, 1994 |
| p53 | 암 억제 | 각종 암 | Donehower, 1992 |
| Rb | 암 억제 | 발생과정 중 사망 | Lee, 1992 |
| 아포리포프로테인 | 지질대사에 관련 | 동맥경화증 | Zhang 등, 1994 |

시도한 유전자가 너무 중요하면 발생 초기에 다 죽게 된다. 또는 반대로 중요한 유전자이나 아무런 증상을 보이지 않는 경우는 진화과정에서 소위 "back-up" 시스템이 수없이 많아서 그런 경우가 있다.

가장 많이 이용되는 분야가 면역계통이다. 그 이유는 면역체제가 부서진다고 해도 생명유지에 즉각적인 문제가 발생하지는 않기 때문이다. 그 다음은 발달생물학분야의 공헌이다. 초기 발생에 있어서의 특정 유전자의 기능을 공부하는 데 이 유전자적중 생쥐는 절대적인 위치를 차지하고 있다. Capecchi 실험실의 Chisata 등은 *hox-1.5* 유전자 적중실험에서 심장과 혈관장애, 감상선 크기 저하, 무흉선 등 매우 광범위한 발달 장애를 가져오는 것을 확인하였다.

기타 중요한 이용분야는 유전병의 모델개발로써 *cystic fibrosis*, *나세포빈혈증*, *베타 탈라세미아*, *고셔질환* 등의 모델이 유전자 적중 법으로 개발되었다. Maeda 박사는 리포프로테인 두 종류의 적중으로 만든 다른 유전자 결핍생쥐를 교배하여 동맥경화증을 만들어 내었다. 지질대사의 관련된 유전자를 따로따로 파괴하여 만든 생쥐의 교배가 동맥경화증을 나타낸 것은 앞으로 인체 질환의 대부분이 다유전적 소인에 의한 것이라는 점에서 매우 중요한 발견이다. 자세한 것은 Table 4에 정리하였다.

참 고 문 헌

- Borrelli E, Heyman RA, Arias C, Sawchenko PE, Evans RM: Transgenic mice with inducible dwarfism. *Nature* 1989, 339 (6225), 538-541.
- Bradley A, Evans M, Kaufman MH and Robertson EJ: Formation of germ line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature (London)* 1984, 309, 255-256.
- Brinster RL, Chen HY, Trumbauer M, Senechal AW, Warren R and Palmiter RD: Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell* 1981, 27, 223-231.
- Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T, Pasquinelli C, Dunsford HA, Sell S, Pinkert CA, Brinster RL, Palmiter RD: Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus

- transgenic mice. *Cell* 1989, 59(6), 1145-1156.
- Cory S, Harris AW, Strasser A: Insights from transgenic mice regarding the role of bcl-2 in normal and neoplastic lymphoid cells. *Philos-Trans-R-Soc-Lond-B-Biol-Sci* 1994, 345(1313), 289-295.
- Costantini F and Lacy E: Introduction of a rabbit β -globin gene into the mouse germ line. *Nature (London)* 1981, 294, 92-94.
- Efrat S, Fusco-Demane D, Lemberg H, Emran OA and Wang X: Conditional transformation of a pancreatic beta-cell line derived from transgenic mice expressing a tetracycline-regulated oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92, 3576-3580.
- Gordon JW and Ruddle RH: Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 1980, 214, 1244-1246.
- Murakami M, Tsubata T, Lkamoto M, Shimizu A, Kumagai S, Imura H, Honjo T: Antigen-induced apoptotic death of Ly-1 B cells responsible for autoimmune disease in transgenic mice [see comments]. *Nature* 1992, 357(6373), 77-80.
- Smithies O, Gregg RG, boggs SS, Koralewski MA and Kucherlapati RS: Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature (London)* 1985, 317, 230-234.
- Smithies O, Kim HS: Targeted gene duplication and disruption for analyzing quantitative genetic traits in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91(9), 3612-3615.
- Wagner TE, Hoppe PC, Jollick JD, School DR, Hodinka RL and Gault JB: Microinjection of a rabbit β -globin gene into zygotes and its subsequent expression in adult mice and their offspring. *Proc Natl Acad Sci (U.S.A)* 1981, 78, 6376-6380.
-