



Transzgénikus állatok, mint bioreaktorok (irodalmi összefoglalás)

Bősze Zs., Tóth Sz.

Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ, Gödöllő, 2101 Szent-Györgyi A. u. 4.

ÖSSZEFOGLALÁS

Ma már különböző rendszerek állnak rendelkezésre gyógyászatilag hasznosítható rekombináns fehérjék előállítására. Jelenleg a transzgénikus haszonállatok vére és méginkább a teje tűnik a legvonzóbb lehetőségnek gyógyhatású fehérjék előállítására. Ezen szöveti sejtek feltehetően megfelelő mennyiségben képesek érett fehérjéket termelni. A fejlett DNS rekombinációs technológiák a mikroinjektálással és az embrió-átültetéssel összekapcsolódva lehetővé tették az idegen gének bevitelét az állatok csíravonalába. A tejjfehérje gének klónozása a 70-es, 80-as években, majd ezen gének promóter és szabályozó régióinak a meghatározása és jellemzése azt eredményezte, hogy a kutatók ma már több haszonállatfajban is képesek egyes gyógyhatású fehérjék hatékony, tejmirigy specifikus és a hormonális hatásokra is megfelelően reagáló termeltetésére. Egyes transzgenikus juhokban a gyógyhatású fehérjék az összes tejjfehérje tartalom 50%-ánál magasabb szintet meghaladva sem okoznak egészségügyi vagy szaporodási problémákat. A transzgenikus technika lehetővé teszi a tejalkotók egymáshoz viszonyított arányának megváltoztatását is. Laboratóriumunkban olyan kiméra gént hoztunk létre melynek segítségével vizsgálni tudtuk transzgénikus egerek tejében a kappa-kazein szint növekedésének fiziko-kémiai hatásait. A huszonegyedik század küszöbén, a gyógyhatású fehérjéket termelő gazdasági állatok realitássá váltak. Az első, a gyógyászat számára ily módon előállított termékek már a klinikai kivizsgálás különböző stádiumaiban vannak.
(Kulcsszavak: transzgénikus állat, bioreaktor, vér, tej)

ABSTRACT

Transgenic animals as bioreactors (review)

Zs. Bősze, Sz. Tóth

Agricultural Biotechnology Centre, Gödöllő, H-2101 Szent-Györgyi A. u. 4

Different systems are being studied and used to prepare recombinant proteins for pharmaceutical use. The blood, and even more so the milk, of transgenic livestock animals appear a very attractive source of pharmaceuticals. The cells from these animals are expected to produce well-matured proteins in potentially huge amounts. The development of recombinant DNA technology coupled with the techniques of microinjection and embryo transfer to introduce foreign genes into the germline of animals has provided the basic tools. Cloning of milk proteins in the late 70s and early 80s, followed by the identification and characterisation of promoter and regulatory sequences of milk protein genes, revealed sufficient genetic information to target genes exclusively to mammary tissue and to respond to hormonal signals. In sheep more than 50% of the protein in milk can be encoded by the

transgene without compromising the animal's health or reproductivity. However, the most natural use of this technology must include modifying the protein content of milk by manipulating the milk protein genes themselves. We have developed a chimeric gene to increase kappa-casein content in transgenic mice and rabbits and to examine its effect on the physicochemical properties of milk. As we approach the end of the 1990s the prospect of achieving the aim of producing pharmaceuticals in transgenic farm animals is becoming reality: the first human products are on their way through clinical trials.

(Keywords: transgenic animal, bioreactor, blood, milk)

BEVEZETÉS

A transzgenikus állatok egyedülálló lehetőséget nyújtanak valamely gén mutációjának, ill. idegen gén kifejeződésének in vivo vizsgálatára. Modellállatként a kutatók egereket használnak, mivel a transzgenikus haszonállatok előállítása idő, ill. költségigényes. Ennek ellenére transzgenikus juhot, kecskét, sertést és marhát is kifejlesztettek már adott célokra.

Ilyen cél például a transzgenikus állatok bioreaktorként történő felhasználása fehérje alapú gyógyszerek termeltetésére, mely módszer nálunk is elterjedt, elnevezése a "gene farming" (gén v. molekula gazdálkodás).

Gyógyászati célú fehérjék termeltetésére élő organizmusokkal először 1978-ban került sor, amikor proinzulint szintetizáló baktériumokat sikerült létrehozni (*Villa-Komaroff és mtsai.*, 1978). A hatékony transzgenikus emlősállat előállításához a mikroinjektációs technika nyitotta meg az utat 1980-ban (*Gordon és mtsai.*, 1980), ez a módszer azonban sok éven keresztül csak transzgenikus egerek előállítására szorítkozott. Gyógyhatású fehérjék termeltetésére az emlős sejtenyészetek is módot adnak. Így termeltettek humán interferont már 1982-ben (*Devos és mtsai.*, 1982). 1987-ben pedig megvalósították gyógyhatású fehérje expresszióját transzgenikus egér tejmirigyben (*Gordon és mtsai.*, 1987). A humán gyógyászatban használt fehérjék előállítása a fent említetteken kívül még számos más módszerrel is lehetséges, melyekről átfogó képet nyújt az 1. táblázat.

1. táblázat

Rekombináns fehérjék előállítása különböző rendszerekben (*Houdebine, 1994*)

	Protein mennyiség (7)	Kivonhatóság (8)	Posz-transzlációs módosítás (9)
Baktériumok (1)	++++	++	+
Élesztők (2)	++++	+++	++
Gombák(3)	++++	+++	+
Transzgenikus növények(4)	++++	++	++
Emlős sejt kultúrák (5)	+	++++	++++
Transzgenikus állatok (6)	++++	++++	++++

+ -kevés, gyenge (*low amount*) ++ -közepes (*medium*)
 +++ -jó, elegendő (*good*) +++++ -kiváló, sok (*very good, much*)

Table 1: Production of recombinant proteins in different biological systems

Bacterial(1), Yeast(2), Fungi(3), Transgenic plants(4), Mammalian cell culture(5), Transgenic animals(6), Protein content(7), Extractibility(8), Posttranslation modification(9)

Haszonállatok bioreaktorként történő felhasználására először transzgenikus juhot (*Clark és mtsai.*, 1989), majd olyan transzgent hordozó bikát állítottak elő, mely annak utódaiban lehetővé tette a tejösszetétel megváltoztatását (*Krimpenfort és mtsai.*, 1991). A tejfehérje gének sorozatos molekuláris klónozása, majd a génkifejeződés szabályozásában részvevő határoló régiók jellemzése meghatározóan hozzájárult ahhoz, hogy terápiás célt szolgáló fehérjék termelésére is képessé tudjuk tenni a haszonállatokat. Így korunkban, gyógyhatású fehérjék előállítására a transzgenikus állatok kínálják a legjobb lehetőségeket (2. táblázat).

2. táblázat

Gazdaságossági számítások rekombináns fehérjék előállítására különböző rendszerekben (*Bremel, 1996*)

	Emlős sejt kultúra (1)	E. coli (2)	Tej (3)
A termelt fehérje koncentrációja [mg/l] (4)	33,5	460	100
Beruházás költségigénye [M\$] (5)	61	389	3,3
Fenntartási költség [M\$/év] (6)	117	242,3	0,51
Termelt fehérje [kg/év] (7)	11,4	11,6	51
Termelési költség [\$/év] (8)	10.207	20.912	10

Table 2: Efficiency calculations of recombinant protein productions in different systems

Mammalian cell culture(1), *E. coli*(2), *Milk*(3), *Protein concentration*(4), *Implementation cost [M\$/year]*(5), *Operational cost [M\$/year]*(6), *Protein product [kg/year]*(7), *Productional cost [M\$/year]*(8)

GYÓGYHATÁSÚ FEHÉRJÉK TRANSZGÉNIKUS ÁLLATOK ÁLTAL TÖRTÉNŐ ELŐÁLLÍTÁSÁNAK LEHETŐSÉGEI

Fehérje termeltetés vérben és tojásban

Gyógyászati vagy egyéb célú fehérje termeltetésére a legkézenfekvőbb szövet a vér volna, hiszen a vérfehérjék legtöbbször szabályozó régióit jól ismerik és alkalmasak hatékony, ugyanakkor specifikus génkifejeztetésre. Külön előny, hogy a baktériumokkal szemben a szövetekben az egyes fehérjék teljes aktivitásának eléréséhez szükséges poszttranszlációs módosítások maradéktalanul megvalósíthatók. A vérvétel az állat egészségének károsítása nélkül megoldható. Így pl. humán α 1-antitripszin termeltetését is megvalósították transzgenikus nyulakban (*Massoud és mtsai.*, 1991). Hátránya ennek az eljárásnak, hogy a vérfehérjék tisztítása bonyolult és költséges. Mivel pedig az erek majd az összes szövet behálózódik, az idegen fehérje (vagy akár egy normál véralakító emelt szintű jelenléte) esetleg bizonyos szervekben anyagcsere- vagy szabályozási zavarokat idézhet elő. Következésképpen károsodhat a bioreaktorként használt állat egészsége.

Tojásban történő termeltetés hasonló előnyökkel járna, ráadásul a tisztítás is jóval egyszerűbb és költségkímélőbb lenne. Továbbá feltehető, hogy a transzgen fehérje magas szinten történő termelésének sem lennének az állatra nézve káros következményei. A gyógyászati fehérjék tojásban történő termeltetése azonban - számos

laboratórium évek óta tartó erőfeszítése ellenére - ma is csak kísérleti stádiumban van (Sang, 1994).

Fehérje termeltetése tejmirigyben

A tej fehérje összetétele

A tejfehérjék kb. 90%-a a tejmirigy alveoláris sejtjeiben termelődik. Alapvetően két fő csoportba sorolhatók: kazeinek és savófehérjék. A tej alkotóelemeinek mennyisége jelentősen eltér a különböző állatfajok esetében. Számos csecsemőkori allergiás megbetegedés vezethető vissza az emberi és a szarvasmarha tej összetételében lévő különbségekre (3. és 4. táblázat).

3. táblázat

Szarvasmarha és emberi tej kazein-, savó- és zsírtartalma (Davies és mtsai., 1983)

	kazein [g/l] (1)	savó [g/l] (2)	zsír [g/l] (3)
Szarvasmarha (4)	28	6	37
Ember (5)	4	6	38

Table 3: Casein, Whey and Fat content of the bovine and human milk

Casein(1), Whey(2), Fat(3), Bovine(4), Human(5)

4. táblázat

Szarvasmarha és emberi tej fő fehérje-összetevői (Brunner, 1981)

	kazeinek [g/l] (1)				fő savó fehérjék [g/l] (2)		
	alfaS1	alfaS2	béta	kappa	alfa-laktalbumin	béta-laktoglobulin	savó savas fehérje (3)
szarvasmarha (4)	10	3,4	10	3,9	1	3	nincs(6)
ember (5)	0,4		3	1	1,6	nincs	nincs

Table 4: Main protein ingredients of the bovine and human milk

Caseins(1), Main whey proteins(2), Whey acidic protein(3), Bovine(4), Human(5)

Génmérnökség a tejtermelésben

1982-ben írták le elsőként egy tejfehérje, nevezetesen a savó savas fehérje (WAP) 5' régiójának szabályozó szerepét a tejmirigy specifikus génkifejeződésben és vetették fel a lehetőségét különböző fehérjék transzgenikus állatok tejében történő termeltetésének (Hennighausen és mtsai., 1982). Ez a technológia -legalábbis elméletileg- megnyitotta a lehetőséget az emberi fogyasztásra szánt tehéntej összetételének megváltoztatására is. Több kitűnő, gondolatébresztő cikket írtak e témában, melyek felvetik a tejtermelés költségei csökkentésének, extra minőségű sajtok előállításának, vagy a fertőződések kivédésének lehetőségeit (Houdebine, 1994; Maga és mtsai., 1995a; Maga és mtsai., 1995b; Hennighausen és mtsai., 1990; Hennighausen és mtsai., 1992). Ezen

elképzelések közül csak néhány valósult meg és a kísérletek többsége a modellként használt transzgenikus egerekre korlátozódik.

Abban az esetben ha a cél valamelyik tejfehérje mennyiségének csökkentése, arra lehetőséget ad egy új eljárás: ribozim, vagy antiszensz gén bejuttatásával egyes gének átíródását specifikusan gátolni lehet, miáltal a tejben csökken az adott fehérje koncentrációja. Ilyen módszerrel a transzgenikus egérkísérletek biztató eredményei alapján a jövőben pl. (az α -laktoglobulin mennyiségének csökkentése révén) alacsony laktóz tartalmú tehéntej olcsó előállítására válhat lehetővé. Csak egereken valósult meg széles körben az ún. „knock out” (gén kiütés) és a "gene targeting" (célzott génbevitel) technika is, melyek egy gén célzott "kiütését" illetve a vad génnek valamilyen szempontból érdekes mutáns változatra történő kicserélését teszik lehetővé (Capecchi, 1989). Haszonállatokban eddig, ily módon nem volt lehetőség transzgenikus állatok előállítására (a megfelelő embrionális össejtvonalak hiányában), de mindez napjainkban elérhető közelségbe került.

TRANSZGÉNIKUS ÁLLAT ELŐÁLLÍTÁSA MIKROINJEKTÁLÁSSAL

A mikroinjektálás mára széleskörben alkalmazott rutineljárás lett (Hogan és mtsai., 1986). Megtermékenyített nőivarú egyedek petevezetőjéből az egysejtes embriók kimoshatók. Megtermékenyülés után a zigóta két sejtmagja még nem egyesült, jól látható a sarkitest és a két előmag. Vékonyra húzott üvegkapillárisal fáziskontraszt vagy interferencia mikroszkóp alatt juttatjuk az idegen DNS-t a hím előmagba. (Kb. 100 DNS molekula, 1-5 pikoliter injektáló oldat jut a sejtmagba.) (1., 2., 3. ábra)

1. ábra

Mikroinjektálás a pronukleáris zigótába

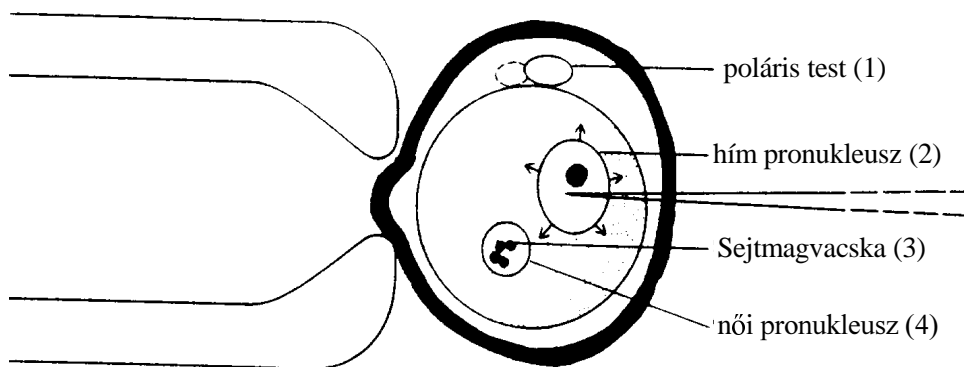


Figure 1: Microinjection into the pronuclear zygote

Polar body(1), Male pronucleus(2), Nucleolus(3), Female pronucleus(4)

2. ábra

Nyúlzigóta mikroinjektálása

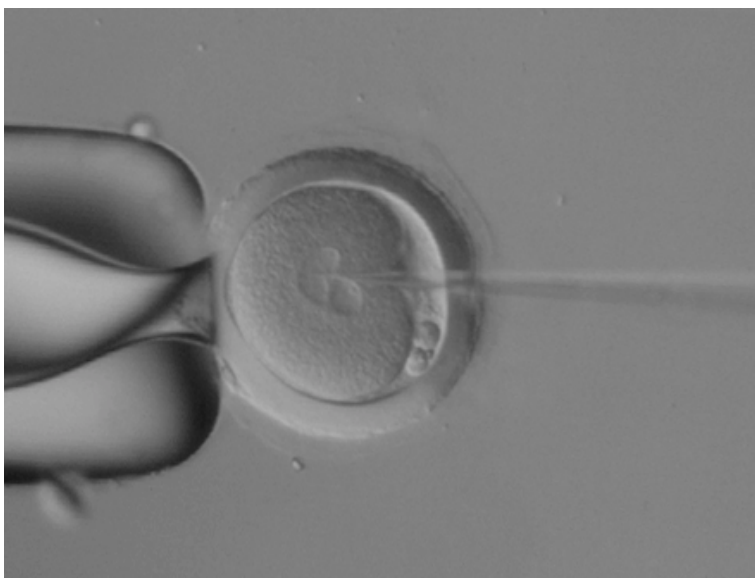


Figure 2: Microinjection of a rabbit zygote

3. ábra

Nyúlzigóta mikroinjektálása



Figure 3: Microinjection of a rabbit zygote

A zigótákat hormonálisan szinkronizált, álvemhes nőtény petevezetőjébe ültetjük. A megszülető utódok jelenlétét DNS hibridizációval (Southern-blot), megfelelő próbával mutatjuk ki (4. ábra).

4. ábra

A transzgénikus egér előállításának folyamata

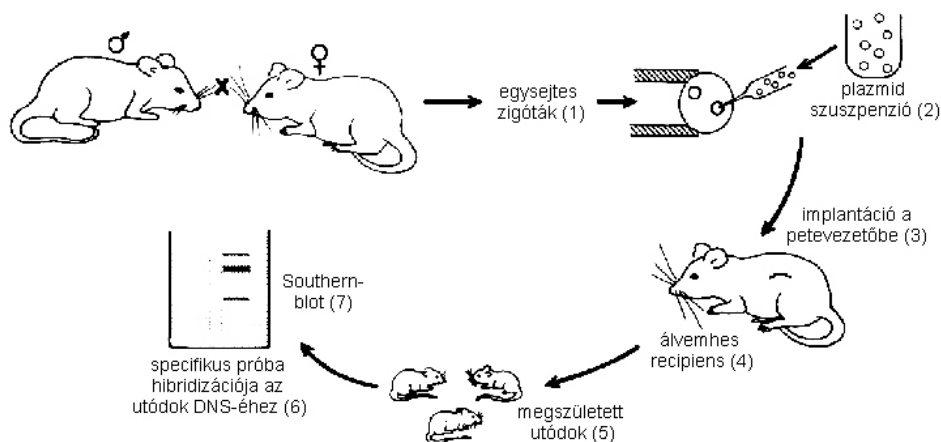


Figure 4: Production of transgenic mouse

One cell embryos, pronuclear stage(1), Plasmid suspension(2), Oviductal implantation(3), recipient(4), F0 generation(5), Specific probe hybridisation to offspring's DNA(6), Southern-blotting(7)

A transzgén beépülésének folyamata még nem teljesen ismert, de valószínű, hogy az injektált idegen DNS először ún. fej-farok konkatamereket képez, majd ezek után integrálódik egy, ritkábban két helyre a genomba. Úgy tűnik, hogy az integráció limitáló lépése a befogadó állat saját DNS-ének felnyílása. Az injektálással bejuttatott DNS beépülése a recipiens genomba deléciókat és duplikációkat is eredményezhet.

A GÉNKIFEJEZŐDÉS SZABÁLYOZÁSA

Mára a legtöbb tejfehérje 5' szabályozó régióját klónozták és leírták sajátjaikat. Az elsőként leírt WAP gén kifejeződése egér esetében a tejmirigy alveolusainak hámsejtjeihez kötődik és az RNS a vemhesség vége felé akkumulálódik. A laktáció csúcán a jelenlévő mRNS-eknek hozzávetőlegesen 10%-a WAP-ot kódol (Hennighausen és mtsai., 1982). Ez a magas szintű szövet specifikus génmegnyilvánulás alkalmassá teszi az alveoláris epithelben történő génkifejeződés tanulmányozására, és a különböző hibridgénekben szabályozó régióként való felhasználásra is (Ebert és mtsai., 1991; Velandar és mtsai., 1997). A WAP szabályozásának első szintjén bizonyos tejelválasztást szabályozó hormonok állnak. Expresszióját alapvetően három hormon egyidejű jelenléte váltja ki: inzulin, hidrokortizon és prolaktin. A tejfehérjék hormonális szabályozásához, a patkány béta-kazein és savó savas fehérje géneinek kifejeződéséhez

szükséges specifikus szabályozó régiókat definiáltak a tejmirigyben (Rosen és mtsai., 1996). Azonosították számos transzkripciós faktor összetett válaszelemét több kötődési hellyel. A tejmirigy-specifikus génmegnyilvánulást úgy tűnik, nem egyszerűen egy transzkripciós faktor közvetíti, hanem az számos faktor együttműködését igényli. A specifikus hormonok által szabályozott, jelerősítő pályák a transzkripciós faktorok közötti kapcsolatokat, az elemek közötti interakciót, a kromatin szerkezet változását és a tejfehérje gén kifejeződését vezérlik.

A legjobban ismert WAP és a béta-laktoglobulin (BLG) gének szabályozó régióiban több transzkripciós faktor kötőhelyet azonosítottak, úgymint a "milk protein binding faktor" vagy "signal transducers and activators of transcription 5" (MPBF vagy STAT5a) (Burdon és mtsai., 1994), a STAT5b (Liu és mtsai., 1995) és a nuclear factor I (NFI) (Li és mtsai., 1995), melyek a magas szintű expressziót biztosítják. Az Ets családba tartozó transzkripciós faktorokat kötő régiók (Welte és mtsai., 1994) és a negatív reguláló elemek régiója -mely a "nuclear binding factor" (NBF) fehérjével léphet kölcsönhatásba (Kolb és mtsai., 1995)- feltehetően a tejmirigy-epitélben történő génkifejeződésében játszik fontos szerepet.

A szabályozó elemek kontrolláló hatását igyekeznek kiküszöbölni az olyan kísérletekkel, mint például a c-myc gén felhasználása, melynek következtében a kialakult emlőtumor konstitutív tejfehérje gén átíródást eredményezett (Schoenenberger és mtsai., 1988). Ezek a kísérletek azonban még távol állnak a gazdasági felhasználástól, hiszen az ilyen jellegű beavatkozások számos hátrányos következménnyel járhatnak. Ezért elengedhetetlenül fontos a génkifejeződést szabályozó transzkripciós faktorok és a kapcsolódó szignál transzdukciós utak feltárása, ill. megismerése.

Érdemes még megjegyezni, hogy az egér (vagy patkány) WAP 5' régióját transzgen szabályozó régiójaként alkalmazva egerben és nyúlban bizonyított transzgen integráció esetén is csak az esetek 50%-ában kaptak génkifejeződést. Azokban a fajokban viszont, amelyek eredetileg nem hordozzák genomjukban a WAP gént (juh, sertés, szarvasmarha), többnyire minden a WAP szabályozó régiót tartalmazó hibrid génről történik fehérje termelés (Shamay és mtsai., 1991; Wall és mtsai., 1991; Wall és mtsai., 1996). Hasonló módon a juh β -laktoglobulin (BLG) gént (saját szabályozó régiójával) egerben kifejeztetve pozíciótól független génkifejeződést kaptak (Whitelaw és mtsai., 1992). Ezek alapján úgy tűnik, hogy -feltehetően a negatív regulátorok hiánya következtében- azon szabályozó régiók, melyek eredendően nincsenek meg a recipiens fajban, az esetek többségében pozíciótól független génkifejeződést biztosítanak minden beépült transzgen esetében.

ALKALMAZÁSOK GAZDASÁGI ÁLLATOKON

Transzgenikus tyúk

A transzgenikus madár előállításáról igen hosszú ideig csak retrovírusos géntranszferrel (Salter és mtsai., 1987; Bosselman és mtsai., 1989) történő kísérletek tudtak némi eredményről beszámolni. Mikroinjektálással transzgenikus madár előállítási technológiát Love és munkatársai, 1994. dolgozták ki. A madarak embrionális fejlődésének sajátágaiból adódóan a mikroinjektálás esetükben jelentősen eltér az emlősállatoknál megszokottaktól.

Az embrionális fejlődés első 24 órájában az embrió a petevezetőben tartózkodik. Mire az előző tojás lerakására kerül sor az embrió kb. 60000 sejtből álló blastodermává fejlődik. A mikroinjektáláshoz az embriókat az előző tojás lerakását követő 2.5 óra múlva izolálták a petevezetőből, ekkorra a termékenyítés már megtörtént, a germinális

lemezekben levő előmagok már jól láthatók, de még nem fuzionáltak. A mikroinjektálás a germinális lemezek citoplazmájába történt, az embriókat a mikroinjektálást követően ex vivo egy gazda-tojáshejben növesztik.

Love és mtsai. (1994) pRSV-lac Z konstrukciót injektált zigótába, 12 nap után az embriók fele tartalmazott plazmid DNS-t. Hét csirke elérte a szexuális érettséghez szükséges kort (az összes injektált 5,5% a) Egy közülük az utódai 3,4%-ába örököltette az idegen DNS-t.

Transzgénikus juh

A tenyészállatok közül a juh volt az első, melynek tejében idegen fehérjét termeltettek (*Clark és mtsai.*, 1989). A humán $\alpha 1$ -antitrypszin nagy mennyiségű termelése - melyhez egész nyáj transzgenikus birka áll rendelkezésre -, az egyik legsikeresebb az eddigi alkalmazások közül (*Wright és mtsai.*, 1991; *Carver és mtsai.*, 1993). Beszámoltak továbbá a humán VIII. véralvadás faktor igen alacsony szintű termelődéséről is transzgenikus birkák tejében (*Niemann és mtsai.*, 1999). A transzgenikus birka szélesebb körű alkalmazásához valószínűleg hozzájárul majd, hogy ennél az állatfajnál dolgozták ki a testi sejtek klónozásának technikáját (*Wilmut és mtsai.*, 1997). Az első olyan transzgenikus birka, amelyet nem mikroinjektálással, hanem a transzgennek embrionális fibroblaszt tenyészetbe történő bejuttatásával, majd ezt követő sejtmag átültetéssel állítottak elő, az emberi IX. véralvadás faktor termelését szolgálja (*Schnieke és mtsai.*, 1997).

Transzgénikus sertés

Az első tejmirigy-specifikus transzgén expresszáló sertést 1991-ben állították elő (*Wall és mtsai.*, 1991). A WAP gén promotert alkalmazva megállapították, hogy a transzgén termék koncentrációja jóval nagyobb, így kedvezőbb, mint a szövettényeszetekben, vagy mikrobiális sejt kultúra-rendszerekben történő előállítás (*Clark*, 1998; *Hennighausen és mtsai.*, 1991). Sertésekkel (pl. szomatotróp hormon kezelés hatására) akár 10 liter tejet is termeltethetünk naponta (*Harkins és mtsai.*, 1989) így elméletileg egy fehérjéből akár 1 kg termeltethető a 7-hetes laktáció alatt.

Gyógyhatású fehérjék mirigyspecifikus termelését transzgénikus sertésben is megoldották. Így például a VIII-as humán véralvadási faktor termelését (*Paleyanda és mtsai.*, 1997), amely a hemofília-A vérzékenység kezelésére alkalmas. Ebben az esetben a WAP szabályozó régiójához a véralvadási faktor cDNS-ét kapcsolták, amely kis mennyiségű, 2,7 $\mu\text{g/ml}$ gyógyhatású fehérje előállítását eredményezte.

Transzgénikus szarvasmarha

1991-ben hozták létre az első tőgyszpecifikus transzgén hordozó szarvasmarhát (*Krimpenfort és mtsai.*, 1991). Ezzel megnyílt az út tetszőleges gén kifejeztetéséhez tehénekben is. A dolog egyetlen szépséghibája, hogy rendkívül tökeigényes. Példa erre hogy az alfa-s1-humán laktoferrin cDNS-sel injektált, 129 beültetett embrióból 19 utódot, ebből csak 2 transzgénikus borjút tudtak előállítani. Más kutatócsoportok sem számoltak be sokkal nagyobb hatékonyságról pl. *Bowen és mtsai.* (1994) embrió-biopsziából nyert sejteket felhasználva, 2555 embriót injektáltak, melyekből 122-t beültetve egy transzgénikus embriót és egy transzgénikus borjút kaptak. *Eyerstone és mtsai.* (1994) kísérleteiben a mikroinjektált zigóták 15%-a fejlődött blasztocisztává és ezek kb. 18%-ából született élő borjú, a transzgén integráció frekvenciája tehát kb. 3%, vagyis kb. 1000 zigótából lett egyetlen transzgénikus borjú.

A TRANZGÉNIKUS ÁLLAT-ELŐÁLLÍTÁS ELŐNYEI ÉS HÁTRÁNYAI

Problémák és megoldások

- Ha nem megfelelő mértékű a kiválasztott fehérje termelődése, pontosabb szabályozó régiókat kell alkalmaznunk, cDNS helyett célszerű a genomi kópiát beépíteni, esetleg különleges szabályozó régiók beépítésével tovább fokozható a génmegnyilvánulás mértéke.
- Lehetséges, hogy nem megfelelő az RNS érési mechanizmus pl. IX. véralvadási faktor termelése egértejben (Yull és mtsai., 1995). Ilyenkor segíthet a kriptikus mRNS kivágási hely eltüntetése, más állatfaj alkalmazása, in vitro enzim hozzáadás (alfa-1- antitripszin birkában, humán antitrombin III. kecskében), vagy kettős transzgenikus technikával extra enzimaktivitás biztosítása (humán protein-c esetében, Drews és mtsai., 1995).

Kételyek a transzgenikus állatok felhasználásakor

- A termeltetett, ill. túltermeltetett transzgén fehérjék károsan befolyásolhatják az anyagcserét (pl. hGH egérben, Devinoy és mtsai., 1994; Chandrashekar és mtsai., 1992). Itt etikai szempontok alapján, össze kell vetni az állatnak okozott esetleges szenvedést a társadalom számára nyújtott előnyökkel, illetve lehetőség szerint olyan megoldást kell választani, amely leginkább megfelel az állatvédelmi elvárásoknak is.
- A bejuttatott idegen gén aktivizálhat bizonyos toxikus géneket. Ezek a hatások elsősorban a transzgén integráció helyétől függenek (mely mikroinjektálás esetén véletlenszerű), így továbbszaporítás előtt alapos vizsgálat alá kell vetni az állatokat, és ha ilyen hatás tapasztalható, azokat az egyedeket ki kell szelektálni.
- A nem megfelelően tisztított fehérjetermékek allergiás reakciókat válthatnak ki a kezelés során. Ez a veszély szinte valamennyi gyógyszer-előállítási folyamat során fennáll, ezért ebben az esetben is (ugyanúgy, mint más technológia esetén, fontos a végtermék nagyfokú tisztítása. (Általában a piacra lépő cégek minimum 99,98 %-os tisztaságot garantálnak).
- Retrovírus közvetített génbevitel esetén a bejuttatott vírus genom részek rekombinációjával vírusok jelenhetnek meg a természetben. Ennek a lehetősége miatt- ha valószínűsége még oly kicsi is- ma már egyre ritkábban próbálkoznak ezzel a technológiával.
- „Kiszabadulva” a transzgén elterjedhet a vad populációkban is. Ezért a transzgenikus állatállományokat fokozott felügyelet alatt kell tartani, amit nagy értékük miatt amúgy is megtesznek.
- A termeltetésre felhasznált állatfajokból fertőző ágensek (pl. prionok) kerülhetnek át a kezelt személyekbe, ezért a különböző cégek a lehetséges összes ilyen ágensre vizsgálják az állományokat. Engedélyezés előtt ezeknek a készítményeknek is szigorú klinikai teszteléseken kell átesni.

A transzgenikus állatok klónozásának előnyei

- A sejtmag-átviteli technikák révén egy generációval lerövidíthető a transzgenikus állatok előállítása.
- Mivel az utódok genetikai állománya lényegében egyezik a sejtmag-donoréval, az előállított, új generációban az összes állat transzgenikus lesz.
- A nukleusz donor sejtvonal lefagyasztható, korlátlan ideig felhasználható.
- Lehetőség nyílik haszonállatokban is a célzott génbevitelre.

A közeljövő

Csak az Egyesült Államokban évente kb. 3 milliárd dolláros piac az, amit a transzgénikus állatok tejében megtermelt gyógyhatású fehérjékkel telíteni lehetne. Így nem csoda, hogy 1-2 éven belül több termék megjelenése is várható. Pl. a Genzyme Transgenics Corporation humán antitrombin III. készítménye 3. szintű klinikai teszt stádiumában van (piacra kerülés 1999-ben esedékes, *Groet és mtsai.*, 1997). A PPL Therapeutics - humán alfa1-antitripszine 2. szintű klinikai teszt stádiumban van (*Breeze*, 1997).

SAJÁT KUTATÁSAINK

Kappa-kazein túltermeltetése transzgénikus állatokban

A κ -kazein az egyik fő tejfehérje. Amfoter sajátságából adódóan elsődleges szerepet játszik a kazein micellák fajlagos felületének és stabilitásának alakulásában, ezen keresztül jelentősen befolyásolhatja a tej emészthetőségét, ill. ipari feldolgozhatóságát.

A κ -kazein túltermeltetése céljából nyúl κ -kazein gén 12,5 kb. hosszú kódoló és 3' szakaszát kapcsoltuk össze a WAP 6,3 kb. hosszú 5' szabályozó régiójával. A WAP- κ hibrid gént mikroinjektálással juttattuk egér zigótákba.

Az injektált (kb. 250) embriót 12 anyába ültettük be, melyek 47 utódot ellettek. A született utódokat Southern-hibridizációval tesztelve 4 egérben mutattuk ki a transzgén beépülését. Két alacsonyabb és két magasabb kópiás beépülést kaptunk.

A transzláció mértékét northern-analízissel vizsgálva, az egyik kis kópiás beépülés esetében magas szintű génkifejeződést tapasztaltunk, a többinél vagy nem volt, vagy csak kis mennyiségű mRNS volt kimutatható. A western analízis során, a fehérje termelést vizsgálva is ezt a tendenciát kaptuk. A legmagasabb szintű génkifejeződést mutató egér vonal teje 3-4 mg/ml koncentrációban tartalmazta a nyúl κ -kazeint. A megemelkedett fehérje mennyiség sem ennél, sem a többi vonal esetében megfigyelhető káros elváltozásokat nem okozott. Transzmissziós elektronmikroszkópos felvételeken vizsgálva a kazein micellákat, szignifikáns különbség adódott a legtöbb nyúl κ -kazeint termelő transzgenikus egerektől származó és a kontroll tejminták micella méreteiben. (Kontroll átlag: 97 nm átmérő, transzgénikus átlag: 62 nm átmérő.) A WAP- κ hibrid génnel jelenleg transzgénikus nyúl létrehozásán dolgozunk, munkánk eredményeképpen már rendelkezünk vonalalapító egyeddel.

IRODALOM

- Bosselman, R.A., Hsu, R.Y., Boggs, T., Hu, S., Bruszewski, J., Ou, S., Kozar, L., Martin, F., Green, C., Jacobsen, F. (1989). Germline transmission of exogenous genes in the chicken. *Science*, 243. 533-5.
- Bowen, R.A., Reed, M.L., Schnieke, A., Seidel, G.E.Jr., Stacey, A., Thomas, W.K., Kajikawa, O. (1994). Transgenic cattle resulting from biopsied embryos: expression of c-ski in a transgenic calf. *Biol. Reprod.*, 50. 664-668.
- Breeze, M. (1997). AAT-recent clinical developments and an industry perspective on current regulatory tissues. IBC Conference Proceedings of Transgenic Therapeutics Febr.
- Bremel R.D. (1996). Potential role of transgenesis in dairy production and related areas. *Theriogenology*, 45. 51-56.
- Brunner, J.R. (1981). Cow milk proteins: Twenty-five years of progress. *J. Dairy Sci.*, 64. 1038-54.

- Burdon, T.G., Maitland, K.A., Clark, A.J., Wallace, R., Watson, C.J. (1994). Regulation of the sheep beta-lactoglobulin gene by lactogenic hormones is mediated by a transcription factor that binds an interferon-gamma activation site-related element. *Mol Endocrinol*, 8. 11. 1528-36.
- Capecchi, M.R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Review. Science*, 244. 1288-92.
- Carver, A.S., Dalrymple, M.A., Wright, G., Cottom, D.S., Reeves, D.B., Gibson, Y.H., Keenan, J.L., Barrass, J.D., Scott, A.R., Colman, A., (1993). Transgenic livestock as bioreactors: stable expression of human alpha-1-antitrypsin by a flock of sheep. *Biotechnology (NY)*, 11. 1263-70
- Chandrashekar, V., Bartke, A., Wagner, T.E. (1992). Neuroendocrine function in adult female transgenic mice expressing the human growth hormone gene. *Endocrinology*, 130. 4. 1802-8.
- Clark, A.J. (1998). Gene expression in the mammary glands of transgenic animals. *Biochem Soc. Symp.*, 63. 133-40.
- Clark, A.J., Bessos, H., Bishop, J.O., Brown, P., Harris, S., Lathe, R., McClenaghan, M., Prowse, C., Simsons, J.P., Whitelaw, C.B.A., Wilmut, I. (1989). Expression of human anti-hemophilic factor XI. in the milk of transgenic sheep. *Bio/Technology*, 7. 487-492.
- Davies, D.T., Holt, C., Christie, W.W. (1993). The composition of milk. *Biochemistry of Lactation*. Elsevier, Amsterdam, 1-11.
- Devinoy, E., Thepot, D., Stinnakre, M.G., Fontaine, M.L., Grabowski, H., Puissant, C., Pavirani, A., Houdebine, L.M. (1994). High level production of human growth hormone in the milk of transgenic mice: the upstream region of the rabbit whey acidic protein (WAP) gene targets transgene expression to the mammary gland. *Transgenic Res.*, 3. 79-89.
- Devos, R., Cheroute, H., Taya, Y., Degrave, W., Van Heuverswyn, H., Fiers, W. (1982). Molecular cloning of human immune interferon cDNA and its expression in eukaryotic cells. *Nucleic Acids Res.*, 10. 2487-501.
- Drews, R., Paleyanda, R.K., Lee, T.K., Chang, R.R., Rehemtulla, A., Kaufman, R.J., Drohan, W.N., Lubon, H. (1995). Proteolytic maturation of protein C upon engineering the mouse mammary gland to express furin. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 92. 10462-6.
- Ebert, K.M., Selgrath, J.P., DiTullio, P., Denman, J., Smith, T.E., Memon, M.A., Schindler, J.E., Monastersky, 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. *Biotechnology*, 9. 9. 835-8.
- Eyestone, W.H. (1994). Challenges and progress in the production of transgenic cattle. *Review. Reprod Fertil Dev.*, 6. 647-52.
- Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., Ruddle, F.H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77. 7380
- Gordon, K., Lee, E., Vitale, J.A., Smith, A.E., Westphal, H., Hennighausen, L. (1987). Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Biotechnology*. 24. 425-8.
- Groet, S., Meade, H. (1997). Antitrombin III-clinical development results and future plans. *IBC Conference Proceedings of Transgenic Therapeutics Febr.*

- Harkins, M., Boyd, R.D., Bauman, D. (1989). Effect of recombinant porcine somatotropin on lactational performance and metabolite patterns in sows and growth of nursing pigs. *J. Anim. Sci.*, 67. 1997-2008.
- Hennighausen, L. (1992). The prospects for domesticating milk protein genes. *J. Cell. Biochem.*, 49. 325-32.
- Hennighausen, L., Ruiz, L., Wall, R. (1990). Transgenic animals-production of foreign proteins in milk. *Curr. Opin Biotechnol.*, 1. 74-8.
- Hennighausen, L., Westphal, C., Sankaran, L., Pittius, C.W. (1991). Regulation of expression of genes for milk proteins. *Biotechnology*, 16. 65-74.
- Hennighausen, L.G., Sippel, A.E., Hobbs, A.A., Rosen, J.M., (1982). Comparative sequence analysis of the mRNAs coding for mouse and rat whey protein. *Nucleic Acids Res.*, 10. 3733-44.
- Hogan, B., Costantini, F., Lacy, E. (1986). *Manipulating the mouse embryo*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Houdebine, L.M. (1994). Production of pharmaceutical proteins from transgenic animals. *J. Biotechnol.*, 34. 269-287.
- Kolb, A.F., Albang, R., Brem, G., Erfle, V., Gunzburg, W.H., Salmons, B. (1995). Characterization of a protein that binds a negative regulatory element in the mammary-specific whey acidic protein promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 217. 1045-52.
- Krimpenfort, P., Rademakers, A., Eyestone, W., van der Schans, A., van den Broek, S., Kooiman, P., Kootwijk, E., Platenburg, G., Pieper, F., Strijker, R., (1991). Generation of transgenic dairy cattle using 'in vitro' embryo production. *Biotechnology (NY)*. 9. 844-7.
- Li, S., Rosen, J.M. (1995). Nuclear factor I and mammary gland factor (STAT5) play a critical role in regulating rat whey acidic protein gene expression in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.*, 4. 2063-70.
- Liu, X., Robinson, G.W., Gouilleux, F., Groner, B., Hennighausen, L. (1995). Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 92. 8831-5.
- Love, J., Gribbin, C., Mather, C., Sang, H. (1994). Transgenic birds by DNA microinjection. *Biotechnology (NY)*. 12. 1. 60-3.
- Maga, E.A., Anderson, G.B., Murray, J.D. (1995b). The effect of mammary gland expression of human lysozyme on the properties of milk from transgenic mice. *J. Dairy Sci.*, 78. 2645-52.
- Maga, E.A., Murray J.D. (1995a). Mammary gland expression of transgenes and the potential for altering the properties of milk *Bio/Technologie*, 13. 1452-1457.
- Massoud, M., Bischoff, R., Dalemans, W., Pointu, H., Attal, J., Schultz, H., Clesse, D., Stinnakre, M.G., Pavirani, A., Houdebine, L.M. (1991). Expression of active recombinant human alpha 1-antitrypsin in transgenic rabbits. *J. Biotechnol.*, 18. 193-203.
- Niemann, H., Halter, R., Carnwath, J.W., Herrmann, D., Lemme, E., Paul, D. (1999). Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep. *Transgenic Res.*, 3. 237-47.
- Paleyanda, R.K., Velander, W.H., Lee, T.K., Scandella, D.H., Gwazdauskas, F.C., Knight, J.W., Hoyer, L.W., Drohan, W.N., Lubon, H. (1997). Transgenic pigs produce functional human factor VIII in milk. *Nat. Biotechnol.*, 10. 971-5.

- Rosen, J.M., Li, S., Raught, B., Hadsell, D. (1996). The mammary gland as a bioreactor: factors regulating the efficient expression of milk protein-based transgenes. *Review. Am. J. Clin. Nutr.*, 63. 627S-32S.
- Salter, D.W., Smith, E.J., Hughes, S.H., Wright, S.E., Crittenden, L.B. (1987). Transgenic chickens: insertion of retroviral genes into the chicken germ line. *Virology.*, 157. 236-40.
- Sang, H. (1994). Transgenic chickens –methods and potential applications. *Trends in Biotechnology*, 12. 415-20.
- 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. 2130-3.
- Schoenenberger, C.A., Andres, A.C., Groner, B., van der Valk, M., LeMeur, M., Gerlinger, P. (1988). Targeted c-myc gene expression in mammary glands of transgenic mice induces mammary tumours with constitutive milk protein gene transcription. *EMBO J.*, 7. 169-75.
- Shamay, A., Solinas, S., Pursel, V.G., McKnight, R.A., Alexander, L., Beattie, C., Hennighausen, L., Wall, R.J. (1991). Production of the mouse whey acidic protein in transgenic pigs during lactation. *J. Anim. Sci.*, 69. 4552-62.
- Velander, W.H., Lubon, H., Drohan, W.N. (1997). Transgenic livestock as drug factories. *Sci. Am.*, 276. 70-4.
- Villa-Komaroff, L., Efstratiadis, A., Broome, S., Lomedico, P., Tizard, R., Naber, S.P., Chick, W.L., Gilbert, W. (1978). A bacterial clone synthesizing proinsulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75. 3727-31.
- Wall, R.J., Pursel, V.G., Shamay, A., McKnight, R.A., Pittius, C.W., Hennighausen, L. (1991). High-level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary glands of transgenic swine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88. 1696-700.
- Wall, R.J., Rexroad, C.E., Powell, A., Shamay, A., McKnight, R., Hennighausen, L. (1996). Synthesis and secretion of the mouse whey acidic protein in transgenic sheep. *Transgenic Res.*, 5. 67-72.
- Whitelaw, C.B., Harris, S., McClenaghan, M., Simons, J.P., Clark, A.J. (1992). Position-independent expression of the ovine beta-lactoglobulin gene in transgenic mice. *J. Biochem.*, 286. 31-9.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385. 810-3.
- Wright, G., Carver, A., Cottom, D., Reeves, D., Scott, A., Simons, P., Wilmut, I., Garner, I., Colman, A. (1991). High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology*, (NY) 9. 830-4.
- Yull, F., Harold, G., Wallace, R., Cowper, A., Percy, J., Cottingham, I., Clark, A.J. (1995). Fixing human factor IX (FIX): correction of a cryptic RNA splice enables the production of biologically active FIX in the mammary gland of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92. 10899-903.

Levelezési cím (*corresponding author*):

Bősze Zsuzsanna

Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ

2101 Gödöllő, Pf. 411.

Agricultural Biotechnology Centre

H-2101 Gödöllő, P.O.Box 411.

Tel.: 36-28-430-600

e-mail: bosze@abc.hu