



Nerka i pęcherz moczowy transgenicznych zwierząt jako bioreaktory?

Halina Małgorzata Żbikowska

Katedra Biochemii Ogólnej, Uniwersytet Łódzki, Łódź

The kidney and the bladder of transgenic animals as bioreactors?

Summary

Mammary gland-specific expression of human genes and secretion of human proteins into the milk of transgenic farm animals provides an important tool for manufacturing of many valuable pharmaceuticals. More recently, attention has focused on urine-based expression systems as a much more cost-effective technology. Successful application of this technology, however, requires the definition of several crucial regulatory elements that direct production of the protein into the urinary tract. To date, the 5' flanking region of either the uroplakin II (UPII) or uromodulin (THP) genes were used to drive the expression of heterologous proteins in the bladder or kidney epithelium of the transgenic mice, respectively. Herein, the progress and current limitations in this field are presented. Other currently known urine-specific protein genes are also described.

Key words:

bioreactor, bladder-specific gene transfer, kidney-specific gene transfer, Tamm-Horsfall protein, transgenic mouse urine, uromodulin, uroplakin.

Adres do korespondencji

Małgorzata Żbikowska,
Katedra Biochemii
Ogólnej,
Uniwersytet Łódzki,
ul. Banacha 12/16,
90-237 Łódź;
e-mail:
zbikow@biol.uni.lodz.pl

1. Wstęp

Gruczoł mleczny zwierząt gospodarskich, takich jak: owca, koza, krowa, królik oraz w mniejszym stopniu świnia, jest obecnie uznanym systemem ekspresyjnym, w którym na skalę przemysłową można pozyskiwać wiele cennych białek. Są to m.in. białka układu krzepnięcia krwi, hormony, przeciwciała. Wiele z tych białek ma złożoną strukturę wymagającą licznych potranslacyjnych modyfikacji. Szacuje się, że w laboratoriach znanych

firm biotechnologicznych na świecie opracowuje się technologie otrzymywania tą metodą około stu ważnych dla lecznictwa biofarmaceutyków. Kilka białek, w tym antytrombina III, α -glukozydaza i α_1 -antytrypsyna, jest na etapie III fazy badań klinicznych. Transgeneza gruczołu mlecznego w kontekście farmaceutycznego zastosowania produkowanych w nim białek jest przedmiotem licznych prac przeglądowych publikowanych w czasopismach zagranicznych (1-7) i polskich (8,9).

Chociaż gruczoł mleczny jest najlepiej zbadanym systemem ekspresyjnym, użyteczne białka mogą być wydzielane również do innych płynów fizjologicznych, takich jak krew (10,11), ślina (12), mocz (13-17) czy płyn nasienny (18), o ile zastosuje się odpowiedni tkankowospecyficzny promotor. Koncepcja produkcji białek w moczu jest stosunkowo nowa – pojawiła się w 1995 r., kiedy po raz pierwszy zidentyfikowano geny aktywne jedynie w pęcherzu moczowym (19). Geny te kodują białka – uroplakiny, wchodzące w skład urotelium – nabłonka wyścielającego pęcherz moczowy. Trzy lata później zespół Roberta Walla opublikował pierwsze doniesienie o udanej ekspresji ludzkiego hormonu wzrostu (hGH) pod kontrolą promotora mysiej uroplakiny II w moczu transgenicznych myszy (13). Mimo że uzyskana ekspresja hGH była niewielka, średnio 200 ng/ml, wydarzenie to wywołało duże zainteresowanie i jednocześnie sceptycyzm co do komercyjnej przydatności nowego systemu ekspresyjnego. W tym czasie zespół Henryka Lubonia pracował nad wyizolowaniem i sekwencjonowaniem kolejnego promotora – genu ludzkiej uromoduliny.

Produkcja biofarmaceutyków w moczu zwierząt transgenicznych ma szereg zalet w porównaniu z ich produkcją w mleku. Ogólnie, dzięki tej technologii można by znacznie szybciej uzyskać stado produkujące dane białko lecznicze, a tym samym znacznie obniżyć koszty związane z hodowlą zwierząt. Surowy produkt może być bowiem pozyskiwany zaraz po urodzeniu, niezależnie od płci oraz w ciągu całego życia zwierzęcia, bez konieczności oczekiwania na okresy laktacji. Niezaprzeczalną zaletą produkcji białek w moczu byłyby również mniej skomplikowane metody izolowania i oczyszczania produkowanego białka z surowego produktu. W przeciwieństwie do mleka, które zawiera prawie 40 mg białka/ml i od 3 do 6% tłuszczu, w moczu zwierząt hodowlanych nie ma lipidów, a ilość białka jest śladowa. Pod tym względem mocz stanowi idealne środowisko, do którego mogą być wydzielane produkowane białka. Magazynowanie i przetwarzanie dużych objętości tak rozcieńczonego roztworu może być jednak kłopotliwe. Do ograniczeń tej technologii należy zaliczyć niższy w porównaniu z produkcją w mleku, poziom ekspresji uzyskiwanych dotychczas farmaceutyków (od 100 do 10 000 razy). Kolejnym ograniczeniem mogą być trudności związane z pobieraniem moczu. Pozyskiwanie moczu od zwierząt hodowlanych w sposób ciągły wymaga zastosowania cewników. Metoda ta jest, co prawda od lat stosowana na skalę przemysłową do otrzymywania estrogenów z moczu ciężarnych kłaczy (20), ale z przyczyn etycznych wzbudza protesty opinii publicznej i obrońców zwierząt.

Niezależnie od perspektyw produkcji farmaceutyków w moczu zwierząt gospodarskich, przeprowadzone na białkach moczu manipulacje genetyczne znacznie przyspieszyły rozwój badań nad ekspresją ich genów. W pracy opisano poznane dotychczas geny specyficznych białek nerki i pęcherza moczowego. Ponadto przedstawiono osiągnięcia w zakresie ich wykorzystania do ekspresji ludzkich białek w moczu transgenicznych myszy z uwzględnieniem wyników badań własnych autorki.

2. Białka moczu i ich geny

Całkowita zawartość białka w prawidłowym moczu większości ssaków jest śladowa i wynosi około 100 µg/ml. W tej niewielkiej ilości znajduje się jednak wiele białek mających istotne znaczenie w fizjologii układu moczowego; funkcja wielu z nich nie jest znana. Uromodulina jest białkiem najobficiej występującym w fizjologicznym moczu ssaków, gdzie stanowi od 15 do 37% wszystkich białek (21,22). Inne, dobrze już poznane białka (oraz ich geny) obecne w moczu to m.in. erytropoetyna (23,24), renina (25), urokinazowy aktywator plazminogenu (26). Dzięki zastosowaniu w ostatnich latach kombinacji zaawansowanych technik – dwukierunkowej elektroforezy i spektrometrii masowej (analizy proteomu) – w moczu człowieka zidentyfikowano kilkadziesiąt białek należących m.in. do transporterów błonowych, receptorów, enzymów, serpin, białek chaperonowych i sygnałowych (27). Głównym miejscem syntezy białek obecnych w moczu jest nerka. Wyjątek stanowią gryzonie, u których w moczu dodatkowo występują tzw. główne białka moczowe (*major urinary proteins* – MUPs) (28,29). MUPs jest to rodzina niskocząsteczkowych białek syntetyzowanych w wątrobie, które są wydzielane do moczu dzięki filtracji zachodzącej w kłębuszkach nerkowych. Mają zdolność wiązania feromonów i pełnią rolę w doborze partnerów. Z powodu obecności MUPs stężenie białka w prawidłowym moczu myszy może wahać się od 0,5 do kilku mg/ml.

Obecny stan wiedzy na temat struktury i sekwencji genów ulegających ekspresji w nerce, a tym bardziej na temat charakterystyki ich promotorów, jest fragmentaryczny. Mechanizmy regulacji ekspresji genów w nerce są jeszcze mniej poznane. Głównym czynnikiem ograniczającym badanie mechanizmów transkrypcji genów układu moczowego były trudności w znalezieniu promotorów kierujących ekspresją specyficzną do poszczególnych segmentów nefronu albo do dolnych części układu moczowego. Ekspresja genów erytropoetyny, reniny czy aktywatorów plazminogenu, zachodzi również w innych tkankach poza układem moczowym. Z uwagi na możliwości biotechnologicznego wykorzystania największe znaczenie mają promotory wspomnianych już genów uromoduliny i uroplakin. Ponadto, w ciągu ostatnich kilku lat sklonowano i zsekwencjonowano kilkanaście genów innych białek, które są syntetyzowane wyłącznie (lub prawie wyłącznie) w nerce.

2.1. Uromodulina (białko Tamm-Horsfall – THP) – specyficzne białko nerki

Uromodulina wydzielona z moczu ciężarnych kobiet, jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej monomerycznej podjednostki około 85 kDa, identyczną z glikoproteiną Tamm-Horsfall (THP) (21,22). THP jest białkiem syntetyzowanym w komórkach nabłonkowych nerki i wydzielanym do moczu w ilości 50-200 mg/dobę. Wykazano, że THP w nerce występuje w dwóch formach, jako białko błonowe, należące do rodziny białek zakotwiczonych w błonie za pomocą reszty glikozylofosfatydylinozytolowej (GPI), oraz w formie rozpuszczalnej (30). Biologiczna rola THP nie została jeszcze jednoznacznie ustalona, chociaż istnieje zgodny pogląd co do istotnego znaczenia tego białka w fizjologii nerki. Uromodulinie przypisuje się m.in. udział w immunoregulacji nerki i w regulacji tworzenia kamieni nerkowych. THP została opisana w pracach przeglądowych (21,31).

Gen THP zidentyfikowano u prawie wszystkich kręgowców (32). U człowieka zlokalizowano go w chromosomie 16p12.3-16p13.11 (33). Uromodulina występuje tylko w określonej części nefronu. Wykazano za pomocą metod immunohistochemicznych i hydrydyzacji *in situ*, że ekspresja THP ogranicza się do szerszej części ramienia wstępującego pętli Henlego oraz do proksymalnej części kanalika krętego II rzędu (34,35). Do tej pory wyizolowano i zsekwencjonowano fragmenty regulatorowe promotorów genu THP kilku gatunków ssaków (tab. 1).

Tabela 1

Scharakteryzowane promotory genów uromoduliny i uroplakiny II

Gatunek	Autorzy/rok
uromodulina:	
szczur	Yu i wsp. (1994)
człowiek	Pennica i wsp. (1987), Żbikowska i wsp. (2002)
mysz	Zhu i wsp. (2002)
krowa	Yu i wsp. (1994), Kim i wsp. (2003)
uroplakina II:	
mysz	Lin i wsp. (1995)
człowiek	Zhang i wsp. (2002)
świnia	Kwon i wsp. (2002)

W wyniku porównania sekwencji genów THP człowieka, krowy, myszy i szczura wykazano, dużą zgodność między gatunkami w obrębie proksymalnego regionu końca 5' promotora (około 600 pz) (36). Procent zgodności sekwencji w tych regionach wynosił 90% dla genu mysiej i szczurzej, 75% dla ludzkiej i bydłowej oraz 66% dla mysiej i ludzkiej THP. Najprawdopodobniej w tej najbardziej konserwatywnej części są zlokalizowane najważniejsze elementy typu *cis* regulujące tkankowospecyficzną ekspresję. Wspólne dla promotorów THP wszystkich czterech gatunków oka-

zały się tylko kasety TATA oraz CAAT, typowe dla elementów promotorów większości swoiście tkankowych genów. Geny powszechnie ulegające ekspresji w różnych tkankach często nie mają tych sekwencji. Za pomocą komputerowej analizy fragmentów sekwencji promotorowych można określić hipotetyczne miejsca dla wiązania czynników transkrypcyjnych (typu *trans*). W promotorze genu ludzkiej (16) i bydłowej (37) THP wykazano miejsca dla wiązania C/EBP β , czynnika, który bierze udział w regulacji swoiście tkankowej ekspresji, np. w wątrobie oraz w adipocytach, a także miejsc dla czynnika jądrowego hepatocytów *fork head homolog* (HFH-3). Czynniki HFH-3 jest aktywatorem transkrypcji ulegającym specyficznej ekspresji w komórkach nabłonkowych nerki (38). Na podstawie przeprowadzonych przez nas badań nad sekwencją promotora ludzkiej uromoduliny interesujące było stwierdzenie prawdopodobnej obecności dwóch niezależnych miejsc inicjacji transkrypcji, w pobliżu pierwszego i drugiego eksonu (16). Miejsce wiążące dla czynnika jądrowego hepatocytów-1 (NHF-1) zlokalizowano w konserwatywnej części końca 5' promotora THP szczura (39) i co ciekawe, również w promotorze przenośnika jonów Na⁺, K⁺ i Cl⁻ myszy (izoforma NKCC2) (40). Kotransporter Na-K-Cl NKCC2 jest białkiem, którego transkrypty wykryto jedynie w nerce, w tym samym miejscu, gdzie jest syntetyzowana THP – w szerszej części wstępującego ramienia pętli Henlego. Nie wykazano, jak dotąd, obecności żadnych innych regulatorowych białek typowych dla nerki, które byłyby odpowiedzialne za swoiście tkankową transkrypcję w tym narządzie.

2.2. Uroplakiny – białka błonowe syntetyzowane przez komórki urotelium

Uroplakiny są rodziną integralnych białek błonowych wchodzących w skład blaszki urotelium. Blaszka ta, zbudowana jest z segmentów błony o asymetrycznej budowie (*asymetric unit membrane* – AUM) i pokrywa znaczną część (70-90%) zewnętrznej powierzchni urotelium ssaków (41). Pozostała część powierzchni urotelium (10-30%) ma budowę typowej dwuwarstwowej błony lipidowej, która jest charakterystycznie zagięta i pełni funkcję łączników (*hinge area*). Dzięki takiej budowie strefy powierzchniowej, nabłonek urotelialny ściany pęcherza moczowego funkcjonuje jako szczelna bariera dla składników moczu i wody. W przeprowadzonej analizie za pomocą metody mikroskopii elektronowej wykazano, że obszary blaszki AUM zbudowane są z wielu podjednostek, z których każda ma strukturę heksamery. Białka wchodzące w skład tej podjednostki zostały wyizolowane i sklonowane (42-44). Są to dwa białka o czterech helisach transbłonowych, uroplakiny Ia (UPIa) i Ib (UPIb) o masach cząsteczkowych odpowiednio, 27 i 28 kDa oraz nie spokrewnione z tą rodziną, posiadające jedną domenę transbłonową, uroplakiny II (UPII) i III (UPIII) o masie 15 i 47 kDa. Uroplakiny są produktami czterech różnych genów; wykazano, że ich ekspresja w bydłowych i mysich tkankach zachodzi specyficznie w urotelium (42-44). W tkankach człowieka ekspresja uroplakiny UPIa oraz UPII zachodzi tylko w powierzchniowej warstwie urotelium, natomiast ekspresję UPIII

i UPIb stwierdzono także poza urotelium; UPIII wykazano w nabłonku prostaty, a UPIb w komórkach nabłonka układu oddechowego i trzustki (45). Fragmenty promotorów genu UPII niektórych gatunków ssaków zostały sklonowane i zsekwencjonowane (tab. 1).

2.3. Inne tkankospecyficzne białka nerki

Molekularne mechanizmy tkankospecyficznej ekspresji genów nerki są mało poznane. W ostatnich latach sklonowano cDNA dla licznych białek, które ulegają ekspresji preferencyjnie w niektórych segmentach nefronu (30,46-50). Wśród nich są geny kodujące białka, które biorą udział w transporcie różnych substancji przez błony, jak np. kotransportery sodowo-glukozowy (SGLT2), sodowo-fosforanowy (NPT2), sodowo-chlorkowy (NCCT) i sodowo-potasowo-chlorkowy (NKCC2), akwaporyna-2 (AQP2) oraz białka kanałów chlorkowych (C1C-K1, C1C-K2, C1C-5). Spośród innych białek należy tu wymienić również transpeptydazę χ -glutamylową (GGT typu 2), 1- α hydroksylazę witaminy D3, receptor wazopresyny V₂ oraz specyficzne dla nerki kadheryny (Ksp-kadheryny) (51-53).

Tabela 2

Przykłady genów ulegających swoistej ekspresji w segmentach nefronu, których sekwencje promotorowe zostały sklonowane i zsekwencjonowane

Promotor genu	Skrót	Gatunek	Miejsce ekspresji	Autorzy	Rok
akwaporyny-2	AQP2	szczur	kanalik zbiorczy	Fushimi i wsp.	(1993)
akwaporyny-CD	AQP-CD	człowiek	kanalik zbiorczy	Uchida i wsp.	(1994)
receptora wazopresyny (typ 2)	V2	szczur	kanalik zbiorczy	Mandon i wsp.	(1995)
kotransportera sodowo-potasowo-chlorkowego	NKCC2	mysz	grubsza część wstępującego ramienia pętli Henlego	Igarashi i wsp.	(1996)
transpeptydazy χ -glutamylowej kanału chlorkowego	GGT (II) C1C-K1	mysz szczur	kanalik kręty bliższy cienka część wstępującego ramienia pętli Henlego	Sepulveda i wsp. Uchida i wsp.	(1997) (1998)
specyficznych dla nerki kadheryn	Ksp-kadheryny	mysz	nabłonek kanalików nerkowych	Whyte i wsp.	(1999)
kotransportera sodowo-chlorkowego	TSC	szczur	kanalik kręty dalszy	Taniyama i wsp.	(2001)

Sklonowano również i częściowo scharakteryzowano sekwencje promotorowe końca 5' wielu z wymienionych białek (tab. 2). Trwające badania z użyciem transfekowanych komórek oraz transgenicznych myszy mają na celu potwierdzenie, że promotory te wykazują komórkospecyficzną ekspresję *in vitro* oraz kierują *in vivo*

ekspresję białka do specyficznych segmentów nefronu. W przyszłości, niektóre z promotorów przedstawionych w tabeli 2 mogą być wykorzystane do ekspresji obcych gatunkowo białek w moczu.

3. Ekspresja farmaceutyków w moczu – konstrukcje genowe, poziom ekspresji i aktywność biologiczna

Dokonano, jak dotąd, zaledwie kilku prób ekspresji rekombinowanych białek ludzkich w moczu transgenicznych myszy (tab. 3). Są to białka o charakterze hormonów i czynników wzrostowych, jak hormon wzrostu (GH) (13,15), erytropoetyna (Epo) (16) i czynnik stymulujący kolonie granulocytów-makrofagów (GM-CSF) (14) oraz alfa-1-antytrypsyna (α_1 -AT) (17). Alfa-1-antytrypsyna jest inhibitorem proteaz, należącym do rodziny serpin, której fizjologicznym substratem jest elastyna neutrofilii. Genetyczny brak α_1 -AT jest przyczyną wrodzonej rozedmy płuc. Preparaty α_1 -AT mają zastosowanie w terapii zastępczej oraz w leczeniu m.in. mukowiscydozy. W zastosowanych konstrukcjach genowych wektorami były regulatorowe sekwencje genów mysiej uroplakiny II lub ludzkiej i mysiej uromoduliny. We wszystkich modelach doświadczalnych uzyskano swoistą ekspresję wprowadzonych obcych genów w moczu.

Tabela 3

Produkcja ludzkich białek w moczu myszy transgenicznych

Produkowane białko	Promotor	Konstrukcja – skrót	Stężenie transgenicznego białka w moczu	Autorzy/rok
hormon wzrostu	mysia UP II	hGH/mUPII	100-500 ng/ml	Kerr i wsp. (1998)
czynnik stymulujący kolonie granulocytów-makrofagów	mysia UP II	hGM-CSF/mUPII	do 180 ng/ml	Ryoo i wsp. (2001)
erytropoetyna	ludzka THP	hEpo/hTHP	do 6 ng/ml	Żbikowska i wsp. (2002)
Alfa-1-antytrypsyna	ludzka THP	h α_1 -AT/hTHP	do 65 μ g/ml	Żbikowska i wsp. (2002)
hormon wzrostu	mysia THP	hGH/mTHP	500 ng/ml	Zhu i wsp. (2003)

Wspomniano już, że jako pierwsze uzyskano transgeniczne myszy, do których genomu wprowadzono metodą mikroiniekcji konstrukcję genową, zawierającą fragment końca 5' genu mysiej uroplakiny II, o długości 3,6 kbp oraz gen ludzkiego GH (13). Myszy te wytwarzały w komórkach nabłonka pęcherza moczowego, a następnie wydzielaly do moczu od 100 do 500 ng/ml ludzkiego białka. Wykazano, że transgen mUPII/hGH ulegał integracji w jednym miejscu genomu, w postaci kilku do kilkuset kopii, w zależności od linii transgenicznych myszy, i był dziedziczony przez

około 50% potomstwa. Stężenie hGH w moczu transgenicznych myszy utrzymywało się na stałym poziomie przez ponad 8 miesięcy. Z dziewięciu uzyskanych myszy pokolenia założycielskiego (F0), aż pięć okazało się nieplodnych. Był to najprawdopodobniej skutek niekorzystnego działania wprowadzonego hormonu, świadczący jednak o tym, że produkowane ludzkie białko było aktywne. W przypadku pierwszego skonstruowanego transgenu tak, jak można było się spodziewać, obserwowano również ektopową ekspresję genu hGH w innych tkankach niż urotelium. Około 100 razy niższą ekspresję niż w tkance docelowej odnotowano w nerce, mózgu i jądrach transgenicznych myszy.

Taki sam fragment promotora mysiej UPII został następnie wykorzystany przez Ryo i wsp. w celu ekspresji w moczu ludzkiego GM-CSF (14). Także i tym razem wydajność produkcji obcego gatunkowo białka nie przekroczyła rzędu ng/ml (od kilku do 180 ng/ml). W tym modelu, we wszystkich dziewięciu uzyskanych liniach transgenicznych myszy, transkrypty wprowadzonego genu wykrywane były tylko w komórkach urotelium. Odnotowano natomiast „przeciekanie” hGM-CSF do układu krążenia, gdzie osiągał stężenie około 6 ng/ml surowicy u zwierząt produkujących maksymalną ilość czynnika wzrostu w moczu. Z najnowszych doniesień wynika, że ludzki hormon wzrostu uzyskano także w moczu myszy wyposażonych w konstrukt, który zawierał jako wektor fragment genu mysiej uromoduliny, o długości 3,0 kpz (15). Uzyskane trzy linie transgenicznych myszy produkowały 300-500 ng/ml hGH. W dwóch liniach transgenicznych zwierząt wykazano ektopową ekspresję hGH w komórkach nabłonka żołądka.

Najlepszym uzyskanym dotychczas przykładem ekspresji obcego białka w moczu transgenicznych myszy okazała się ludzka α_1 -AT (17). Naszym modelem doświadczalnym były myszy, do których wprowadzono konstrukcję zawierającą genomowy region kodujący α_1 -AT człowieka połączony z promotorem ludzkiej THP. Zastosowany fragment genu uromoduliny (THP) o długości 5,6 kpz, zawierający sekwencje promotora (3,7 kpz) zapewnił swoistą tkankowo ekspresję ludzkiego białka w komórkach nabłonka nerki. W moczu transgenicznych myszy udało się uzyskać rekombinowaną α_1 -AT człowieka w stężeniu od 0,5 do 65 μ g/ml. Transgeniczna α_1 -AT, była glikozylowana oraz charakteryzowała się taką samą aktywnością biologiczną jak handlowa α_1 -AT, otrzymywana z osocza człowieka. Ponadto N-końcowa sekwencja uzyskanego w moczu białka była identyczna z teoretyczną sekwencją publikowaną dla dojrzałej (z odciętym peptydem sygnałowym), osoczowej α_1 -AT człowieka. Nasze wyniki dostarczyły zatem pierwszego bezpośredniego dowodu, że komórki nerki, podobnie jak gruczołu mlecznego, są zdolne do przeprowadzania prawidłowego procesowania oraz potranslacyjnej glikozylacji białek kodowanych przez obce gatunkowo geny. W wykorzystaniu zwierząt transgenicznych jako żywych bioreaktorów nie mniej istotne od wydajności produkcji, jest aby produkowane aktywne białko nie miało negatywnego wpływu na zdrowie zwierzęcia. Jakkolwiek nie przeprowadziliśmy badań histologicznych, wykluczających nieprawidłowości w funkcjonowaniu nerki czy innych narządów, wszystkie myszy mające transgen hTHP/h

α_1 -AT prawidłowo się rozwijały i rozmnażały. Myszy w warunkach fizjologicznych mają białko w moczu (rzędu mg/ml) ze względu na obecność MUPs. Trudno jednak przewidzieć jak znosiłyby obecność obcego białka zwierzęta hodowlane, u których białko w moczu jest objawem patologicznym.

Chociaż mała liczba danych nie pozwala na formułowanie ostatecznych wniosków, w układzie modelowym (transgeniczne myszy), ekspresja obcych gatunkowo białek w moczu pod wieloma względami, jak się wydaje, jest porównywalna z produkcją w mleku. Dotyczy to różnicowania w stężeniu wydzielanych białek pomiędzy poszczególnymi liniami transgenicznych myszy, co jest zrozumiałe ze względu na przypadkowość miejsca integracji jak i ilości zintegrowanych kopii obcego genu z genomem gospodarza. Wydajność ekspresji rzędu $\mu\text{g/ml}$, to średni wynik uzyskiwany dla białek produkowanych w mleku transgenicznych zwierząt. Wyższą wydajność transgenezy można osiągnąć przez zastosowanie „optymalnego” konstruktów, zawierającego wszystkie niezbędne elementy regulatorowe *cis*. Poznanie takich elementów genów specyficznych białek moczu, teoretycznie pozwoli na konstruowanie coraz lepszych pod tym względem transgenów. Znacznym ograniczeniem w uzyskaniu większej wydajności produkcji białek w moczu mogą okazać się słabsze, w porównaniu z gruczołem mlecznym, możliwości wydzielnicze komórek układu wydalniczego. Problem ten dotyczy w szczególności komórek urotelium, które w zasadzie nie są przystosowane do funkcji sekrecyjnej. Na przykład w urotelium transgenicznych myszy stwierdzono stosunkowo wysoki poziom ekspresji mRNA dla hGH produkowanego pod kontrolą promotora uroplakiny II, w porównaniu do ilości GH wydzielanego do moczu (13). W obrazie immunohistologicznym komórek urotelium obserwowano również liczne agregaty GH. W niedawnym doniesieniu wykazano, co prawda, że komórki bydłowego urotelium syntetyzują i wydzielają tPA, uPA oraz serynowy inhibitor proteaz, PP5 (54), jednak nie potwierdzono doświadczalnie w jaki sposób białka te są wydzielane przez pokrytą blaszką AUM powierzchnię urotelium. Przypuszcza się, że sekrecja ogranicza się do fragmentów łączących (*hinge area*) pomiędzy segmentami AUM.

Należy zaznaczyć, że obserwowane w badaniach nad ekspresją białek w moczu zjawiska niepożądane, jak ektopowa ekspresja obcych genów, „przeciek” białek do krwiobiegu, czy niekorzystny wpływ ekspresji aktywnego białka na funkcjonowanie organizmu myszy, dotyczą w takim samym stopniu również transgenezy gruczołu mlecznego (6,7).

4. Podsumowanie

Postęp w badaniu transgenezy nerki i pęcherza moczowego ma duże znaczenie poznawcze. Konsekwentne uzupełnianie tej wiedzy oraz zrozumienie mechanizmu regulacji transkrypcji genów białek moczu będzie miało istotne znaczenie w poznaniu patofizjologii układu moczowego. Dotyczy to głównie poszukiwania markerów

nowotworów oraz możliwości zastosowania terapii genowej w ich leczeniu. Czy transgeneza układu moczowego ma szansę na praktyczne zastosowanie do produkcji farmaceutyków? Odpowiedzi na to pytanie można będzie udzielić dopiero po uzyskaniu zwierząt hodowlanych, wyposażonych w sprawdzone już na myszach konstrukcje genowe. Gdyby udało się osiągnąć wydajność produkcji białka rzędu przynajmniej kilkudziesięciu $\mu\text{g/ml}$ w zwierzętach gospodarskich, taka ilość byłaby już wystarczająca aby zapewnić ich farmaceutyczne zastosowanie. Niższy w porównaniu z gruczołem mlecznym poziom ekspresji byłby bowiem zrekompensowany możliwością pozyskiwania surowego produktu od obu płci i w ciągu całego życia zwierzęcia oraz potencjalnie prostszymi metodami oczyszczania gotowego produktu. Jest jeszcze jeden aspekt przemawiający za rozwojem badań nad tym nowym bioreaktorem. Jednym z mankamentów ekspresji białek w gruczole mlecznym są dość często spotykane niepełne lub niewłaściwe modyfikacje potranslacyjne niektórych białek. Możliwości komórek gruczołu mlecznego i nerki do przeprowadzania takich modyfikacji mogą znacznie się różnić. Stwierdzono na przykład, że znaczna część ludzkiego białka C, produkowanego w mleku świń transgenicznych, była nieaktywna (55). Przyczyną tego, prawdopodobnie był brak w gruczole mlecznym enzymów proteolitycznych (typu furyny), aktywujących prekursor białka C. Enzymy takie są obecne w pętli Henlego nefronu i biorą udział w procesowaniu prekursora epidermalnego czynnika wzrostu (EGF) (56). Nowy system ekspresyjny dawałby większe możliwości ekspresji białek, które trudno przeprowadza się w gruczole mlecznym.

Literatura

1. Henninghausen L., (1990), *Prot. Exp. Purif.*, 1, 3-8.
2. Houdebine L.-M., (1994), *J. Biotechnol.*, 34, 269-287.
3. Houdebine L.-M., (2000), *Transgenic Res.*, 9, 305-3320.
4. Janne J., Hyttinen J. M., Peura T., Tolvanen M., Alhonen L., Sinervita R., Halmekyto M., (1994), *Int. J. Biochem.*, 26, 859-870.
5. Janne J., Alhonen L., Hyttinen J. M., Peura T., Tolvanen M., Korhonen V. P., (1998), *Biotechnol. Annu. Rev.*, 4, 55-74.
6. Luboń H., Paleyanda R. K., Velandar W. H., Drohan W. N., (1996), *Trans. Med. Rev.*, X, 131-143.
7. Luboń H., (1998), *Biotech. Ann. Rev.*, 4, 1-54.
8. Rosochalski S. J., Zwierzchowski L., (1999), *Biotechnologia*, 2, 7-24.
9. Zwierzchowski L., (1998), *Biotechnologia*, 2, 33-56.
10. Sharma A., Martin M. J., Okabe J. F., Truglio R. A., Dhanjal N. K., Logan J. S., Kumar R., (1994), *Biotechnology*, 12, 55-59.
11. Swanson M. E., Martin M. J., O'Donnell J. K., Hoover K., Lago W., Huntress V., Parsons C. T., Pinkert C. A., Pilder S., Logan J. S., (1992), *Biotechnology*, 10, 557-559.
12. Midkkelsen T. R., Brandt J., Larsen H. J., Larsen B. B., Poulsen K., Ingerslev J., Din N., Hjorth J. P., (1992), *Nucl. Acids Res.*, 20, 2249-2255.
13. Kerr D. E., Liang F., Bondioli K. R., Zhao H., Kreibich G., Wall R. J., Sun T.-T., (1998), *Nature Biotech.*, 16, 75-79.
14. Ryoo Z. Y., Kim M. O., Kim K. E., Bahk Y. Y., Lee J. W., Park S. H., Kim J. H., Byun S. J., Hwang H. Y., Youn J., Kim T. Y., (2001), *Transgenic Res.*, 10, 193-200.

15. Zhu X., Cheng J., Huang L., Gao J., Zhang Z.-T., Pak J., Wu X.-R., (2003), *Transgenic Res.*, 12, 155-162.
16. Żbikowska H. M., Soukhareva N., Behnam R., Chang R., Drews R., Luboń H., Hammond D., Soukharev S., (2002), *Transgenic Res.*, 11, 425-435.
17. Żbikowska H. M., Soukhareva N., Behnam R., Luboń H., Hammond D., Soukharev S., (2002), *Biochem. J.*, 365, 7-11.
18. Dyck M. K., Gagne D., Ouellet M., Senechal J. F., Belanger E., Lacroix D., Sirard M. A., Pothier F., (1999), *Nat. Biotechnol.*, 17, 1087-1090.
19. Lin J. H., Zhao H., Sun T. T., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 679-683.
20. Williams L. S., (1994), *Can. Med. Assoc. J.*, 151, 1009-1012.
21. Kumar S., Muchmore A., (1990), *Kidney Int.*, 37, 1395-1401.
22. Pennica D., Kohr W. J., Kuang W.-J., Glaister D., Aggarwal B. B., Chen E. Y., Goeddel V., (1987), *Science*, 236, 83-88.
23. Ebert B. L., Bunn F., (1999), *Blood*, 94, 1864-1877.
24. Loya F., Yang Y., Lin H., Goldwasser E., Albitar M., (1994), *Blood*, 84, 1831-1836.
25. Paul M., Burt D. W., Krieger J. E., Nakamura N., Dzau V. J., (1992), *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 262, E644-E650.
26. Irigoyen J. P., Munoz-Canoves P., Montero L., Koziczak M., Nagamine Y., (1999), *Cell. Mol. Life Sci.*, 56, 104-132.
27. Thongboonkerd V., McLeish K. R., Arthur J. M., Klein J. B., (2002), *Kidney Int.*, 62, 1461-1469.
28. Beynon R. J., Hurst J. L., (2003), *Biochem. Soc. Trans.*, 31, 142-146.
29. Berger F. G., Szoka P., (1981), *Biochem. Genet.*, 19, 1261-1273.
30. Fukuoka S., Kobayashi K., (2001), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 289, 1044-1048.
31. Kokot F., Duława J., (2000), *Nephron*, 85, 97-102.
32. Badgett A., Kumar S., (1998), *Urol. Int.*, 61, 72-75.
33. Pook M. A., Jeremiah S., Scheinman S. J., Thakker R. V., (1993), *Ann. Hum. Genet.*, 57, 285-290.
34. Bachmann S., Metzger R., Bunnemann B., (1990), *Histochemistry*, 94, 517-523.
35. Prasad K., Bates J., Badgett A., Dell, Sukhatme V., Yu H., Kumar S., (1995), *Biochim. Biophys. Acta*, 1260, 328-332.
36. Zhu X., Cheng J., Gao J., Lepor H., Zhang Z.-T., Pak J., Wu X.-R., (2002), *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 282, F608-F617.
37. Kim H.-T., Song I.-Y., Piedrahita J., (2003), *Transgenic Res.*, 12, 191-201.
38. Overdier D. G., Ye H., Peterson R. S., Clevidence D. E., Costa R. H., (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 13725-13730.
39. Yu H., Papa F., Sukhatme V. P., (1994), *Gene Exp.*, 4, 63-75.
40. Igarashi P., Whyte D. A., Li K., Nagami G. T., (1996), *J. Biol. Chem.*, 271, 9666-9674.
41. Lewis S. A., (2000), *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 278, F867-F874.
42. Lin J. H., Wu X. R., Kreibich G., Sun T. T., (1994), *J. Biol. Chem.*, 269, 1775-1784.
43. Wu X. R., Sun T. T., (1993), *J. Cell Sci.*, 106, 31-43.
44. Yu J., Lin J. H., Sun T. T., (1994), *J. Cell Biol.*, 125, 171-182.
45. Olsburgh J., Harnden P., Weeks R., Smith B., Joyce A., Hall G., Poulosom R., Selby P., Southgate J., (2003), *J. Pathol.*, 199, 41-49.
46. Fushimi K. S., Uchida Y., Hara Y., Hirata Y., Marumo F., Sasaki S., (1993), *Nature*, 361, 549-552.
47. Kanai Y., Lee W. S., You S., Brown D., Hediger M. A., (1994), *J. Clin. Invest.*, 93, 397-404.
48. Taniyama Y., Sato K., Sugawara A., Uruno A., Ikeda Y., Kudo M., Ito S., Takeuchi K., (2001), *J. Biol. Chem.*, 276, 26260-26268.
49. Uchida S., Sasaki S., Fushimi K., Marumo F., (1994), *J. Biol. Chem.*, 269, 23451-23455.
50. Uchida S., Rai T., Yatsushige H., Matsumura Y., Kawasaki M., Sasaki S., Marumo F., (1998), *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 274, F602-F610.
51. Mandon B., Bellanger A. C., Elalouf J. M., (1995), *Pflugers Arch.*, 430, 12-18.
52. Sepulveda A. R., Huang S. L., Lebovitz R. M., Lieberman M. W., (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 11959-11967.

53. Whyte D. A., Li C., Thomson R. B., Nix S. L., Zanjani R., Karp S. L., Aronson P. S., Igarashi P., (1999), *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 277, F587-F598.
54. Deng F.-M., Ding M., Lavker R. M., Sun T.-T., (2001), *PNAS*, 98, 154-159.
55. Drohan W. N., (1997), *Thromb. Haemost.*, 78, 543-547.
56. Salido E. C., Lakshmanan J., Fisher D. A., Shapiro L. J., Barajas L., (1991), *Histochemistry*, 96-72.