



Ekspresyjne konstrukcje genowe prawidłowych i zmutowanych genów

Daniel Lipiński^{1,2}, Marlena Szalata^{1,2}, Robert Kalak^{1,2}, Andrzej Pławski¹, Katarzyna Nuc², Marta Kala¹, Wojciech Juzwa², Karolina Słomska², Piotr Groniek², Jacek Jura³, Jolanta Jura⁴, Zdzisław Smorąg³, Marek Pieńkowski⁵, Ryszard Słomski^{1,2}

¹Zakład Genetyki Człowieka, Polska Akademia Nauk, Poznań

²Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań

³Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt, Instytutu Zootechniki, Balice k. Krakowa

⁴Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

⁵Piengen Biomedical Corporation, Knoxville, USA

Expressive gene structures of proper and modified genes

Summary

The genetic construct WAP6xHisHGH containing the gene encoding human growth hormone (hGH) and WAP promoter expressed in mammary gland of animals was prepared. The 5' end of the gene was modified by the addition of sequence encoding six histidine residues and the sequence recognized by thrombin. In this way, the growth hormone can be easily purified by affinity chromatography and cleaved with thrombin to an active form. In the next step, the genetic construct was introduced by microinjection into male pronuclei of fertilized oocytes. Transgene was detected in male rabbit of F0 generation (number 61). Twelve offspring of founder rabbit of generation F1 indicated transgene sequences. The presence of growth hormone was revealed in the samples of milk accumulated during the lactation of females of F1 generation. The genetic constructs containing chain 1 and chain 2 of Feld1, and the major allergen produced by cat (*Felis domesticus*) were prepared. Both genes were inactivated by introduction into the sequences a positive selectable marker aminoglycoside phosphotransferase (resistant to neomycin). Outside the region of homology to Feld1 chain 1 and chain 2 genes, the negative selectable marker – thymidine kinase gene was introduced. The genetic constructs pNTKfD1 and pNTKfD2 can be used in further experiments involving the inactivation of Feld1 genes in cat cells. Both genes were modified by site-directed mutagenesis using megastarter with Stop codon for premature termination of translation. The

Adres do korespondencji

Daniel Lipiński,
Zakład Genetyki Człowieka
Polska Akademia Nauk,
ul. Strzeszyńska 32,
60-479 Poznań.

presence of mutation was confirmed by sequencing. The genetic constructs with human hGH gene and cat Feld1 gene were introduced into the bovine and cat fetal fibroblasts respectively in co-transfection with plasmid pGT-N29 containing positive selectable marker by lipofection, precipitation and electroinjection methods. After the selection, surviving cells were subjected to further molecular analysis. The stable incorporation of the genetic constructs WAP6xHisHGH and WAPHGH into the genome were observed.

Key words:

gene structure, gene function, gene modification, human growth factor.

1. Wstęp

Współczesna biotechnologia opiera się na rekombinacji DNA *in vitro* – klonowaniu i ekspresji genów kodujących określone białka, optymalizacji poziomu ekspresji określonego genu, inżynierii białek, wprowadzaniu celowych zmian w sekwencji nukleotydów powodujących zmiany aminokwasów w białku, a co za tym idzie modyfikacji właściwości białka, ulepszaniu funkcji białek, transgenezie roślin i zwierząt oraz diagnostyce i terapii genowej. Inżynieria genetyczna powoli i systematycznie wkracza w coraz to nowe dziedziny życia człowieka. Przemysł farmaceutyczny wykorzystuje techniki rekombinacji DNA do tworzenia szeregu leków. Perspektywy zastosowań są niezmiernie szerokie.

2. Wprowadzanie genów przez rekombinację homologiczną

Wyjaśnianie funkcji specyficznych białek opiera się na analizie zmutowanych organizmów i linii komórkowych. Początkowo uzyskiwanie mutantów odbywało się poprzez selekcję zmian fenotypowych. Rozwój technologiczny doprowadził do opracowania metody wprowadzania genów poprzez rekombinację homologiczną w komórkach ssaków, umożliwiającą uzyskiwanie mutantów dowolnego genu (1). Ponieważ większość komórek ssaków jest diploidalna, zawiera dwa allele każdego genu znajdującego się na chromosomie autosomalnym, w większości przypadków, aby uzyskać dostrzegalną zmianę fenotypu, obydwa allele muszą zostać inaktywowane.

Pierwszym etapem rekombinacji homologicznej jest przygotowanie konstrukcji genowej, którą najczęściej wprowadza się do macierzystych komórek embrionalnych (ES – *embryonic stem cells*), uzyskiwanych z komórek wczesnego okresu zarodkowego (1). Komórki macierzyste można modyfikować genetycznie, np. wszczepiając im obcy gen lub wprowadzając zmutowany gen w miejsce prawidłowego. Po selekcji, rekombinowane komórki ES wprowadza się do blastocysty, z której rozwija się chimera. Jeżeli wprowadzona modyfikacja genetyczna obejmuje linie komórek płciowych, chimery mogą dać początek linii transgenicznych zwierząt. Obecnie poza komórkami ES zastosowanie mają również komórki EG (*embryonic germ cells*) wy-

odrębniane z komórek linii płciowej oraz komórki EC (*embryonic carcinoma cells*) uzyskiwane z niezróżnicowanych komórek linii nowotworowej.

Przez wiele lat zastosowanie rekombinacji homologicznej było ograniczone do myszy. W ciągu ostatnich kilku lat udało się wyprowadzić linie komórek ES i EG u owiec, świń i bydła (2). U świń i bydła po iniekcji zmodyfikowanych genetycznie komórek macierzystych do blastocysty uzyskano organizmy chimeryczne (3,4). Jednakże, nie udało się dotychczas wprowadzić tą metodą transgenów do komórek linii płciowej.

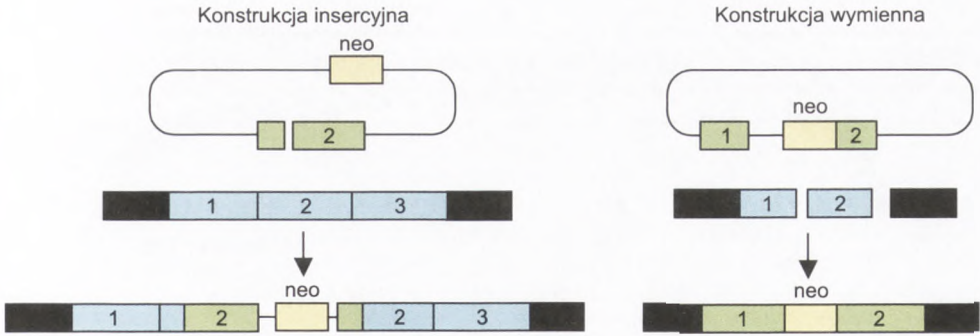
Rekombinacja homologiczna występuje z częstością 0,5-10%. Wydajność rekombinacji homologicznej można poprawić zwiększając obszar homologii w konstrukcji genowej (5). Zależność między wielkością obszaru homologii a wydajnością procesu ma charakter wykładniczy pomiędzy 2-10 tysięcy zasad. Zwiększanie zakresu homologii ponad 14 tysięcy zasad ma niewielki wpływ na wydajność. Wydajność procesu można również poprawić stosując w konstrukcji genowej genomowy DNA, izogeniczny w stosunku do komórek, które stosuje się do transfekcji (6). Częstość wystąpienia rekombinacji homologicznej, jak się wydaje, jest niezależna od wielkości obszaru niehomologicznego, wprowadzanego w miejsce homologiczne, co najmniej do dwunastu tysięcy nukleotydów (7).

3. Budowa konstrukcji genowych

Do rekombinacji homologicznej stosuje się konstrukcje genowe wymienne (*replacement*) oraz rzadziej konstrukcje insercyjne (*insertion*) (rys. 1). Przy wykorzystaniu konstrukcji insercyjnych nie uzyskuje się trwałego procesu rekombinacji (5). W tego typu konstrukcjach sekwencja homologiczna do określonego genu jest hydrolizowana enzymem restrykcyjnym w regionie homologii. Podczas rekombinacji homologicznej konstrukcja insercyjna zostaje wprowadzona w miejscu homologii do genu, przerywając strukturę tego genu poprzez dodanie sekwencji. Podwojenie sekwencji homologicznej sprawia, że nowo wprowadzona sekwencja genu oraz marker selekcyjny mogą zostać usunięte podczas etapów rekombinacji wewnętrznej chromosomowej.

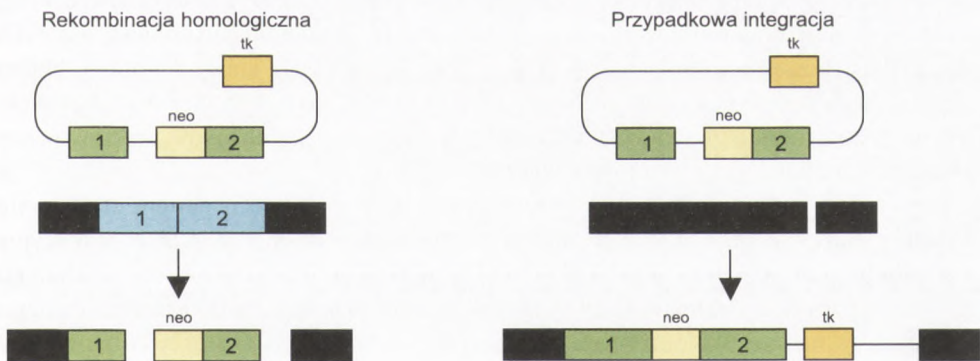
Konstrukcje wymienne umożliwiają inaktywację specyficznych genów. Konstrukcja zawiera sekwencję genu, który ma być inaktywowany. W eksonie 1 lub 2 wprowadzana jest mutacja. Najczęściej jest to sekwencja genu kodującego marker selekcyjny. Stosuje się również konstrukcje z wprowadzonymi mutacjami punktowymi. Podczas rekombinacji homologicznej następuje wymiana genu zmutowanego z prawidłową sekwencją genomowego DNA. Ponieważ nie występuje tutaj duplikacja sekwencji, gen prawidłowy nie może zostać odtworzony.

Prawie wszystkie konstrukcje genowe stosowane w rekombinacji homologicznej podlegają selekcji pozytywnej na obecność genu warunkującego oporność na antybiotyk (np. neomycyna). Ten sam gen stosuje się jednocześnie do inaktywacji bada-

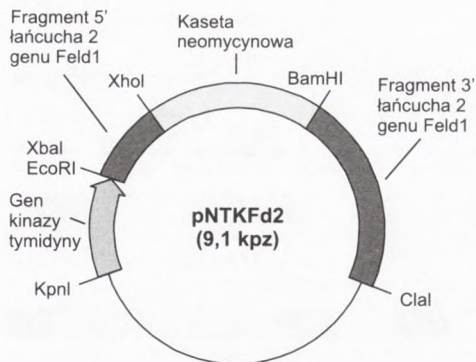


Rys. 1. Dwa typy konstrukcji wykorzystywanych do rekombinacji homologicznej. Konstrukcje insercyjne dodają swoje sekwencje (kolor zielony) do genu endogennego (kolor niebieski), powodując podwojenie i uszkodzenie normalnej struktury genu. Konstrukcje wymienne podstawiają swoje sekwencje w miejsce sekwencji genu endogennego.

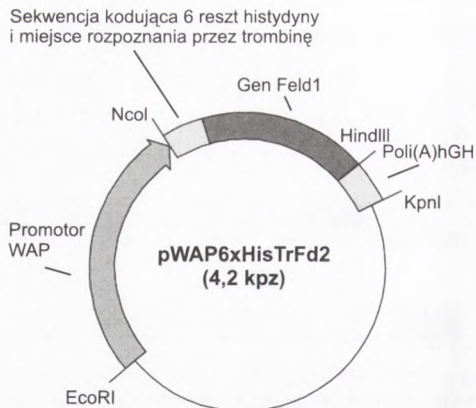
nego genu. Selekcja komórek antybiotykiem G418 (pochodna neomycyny) eliminuje zdecydowaną większość komórek, które nie mają konstrukcji stabilnie zintegrowanej z genomem. Jednakże w większości przypadków konstrukcja integruje z genomem nie przez rekombinację homologiczną, lecz poprzez przypadkową integrację. Najczęściej stosowana metoda eliminacji komórek z przypadkowo zintegrowaną konstrukcją znana jest jako selekcja pozytywno-negatywna. Strategia ta jest stosowana tylko dla konstrukcji wymiennych (8). W tego typu konstrukcjach (rys. 2) poza regionem homologii genu umieszcza się negatywny marker selekcyjny, gen kinazy tymidyny wirusa *Herpes simplex*. W obecności tego genu komórki są wrażliwe na acyklowir i jego analogi (np. gancyklowir). Enzym kinaza tymidyny wprowadza gancyklowir do syntetyzowanego łańcucha DNA, powodując jego terminację i śmierć komórki. Podczas rekombinacji homologicznej zostają utracone sekwencje leżące



Rys. 2. Podczas rekombinacji homologicznej sekwencje konstrukcji leżące poza regionem homologii do genu endogennego zostają usunięte. Podczas przypadkowej integracji wszystkie sekwencje konstrukcji zostają zachowane. W obecności genu TK komórki są wrażliwe na gancyklowir i jego analogi.



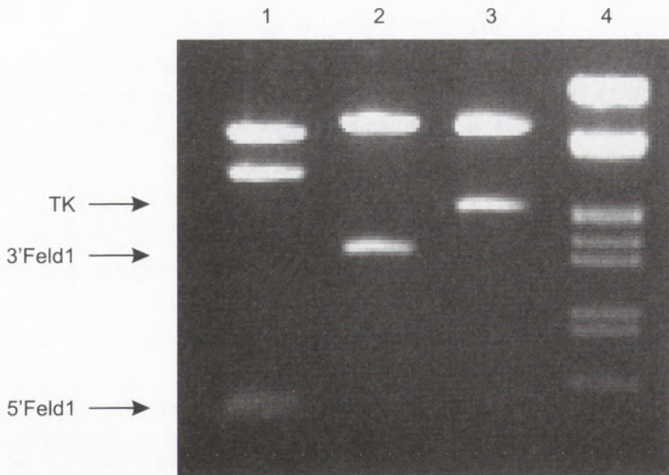
Rys. 3. Inaktywująca konstrukcja genu pNTKfD2 zawierająca łańcuch 2 genu kodującego główny alergen kota – białko Feld1. Gen Feld1 jest poprzedzony genem kinazy tymidyny. Fragment 5' i fragment 3' genu Feld1 rozdzielono genem warunkującym oporność na neomycynę umożliwiającą wyłączenie genu.



Rys. 4. Ekspresyjna konstrukcja genu pWAP6xHisTrFd2 zawierająca łańcuch 2 genu kodującego główny alergen kota – białko Feld1. Gen Feld1 znajduje się pod promotorem kwaśnego białka serwatki WAP. W konstrukcję wprowadzono sekwencję kodującą 6 reszt histydyny oraz sekwencję rozpoznawaną przez trombinę umożliwiającą oczyszczenie rekombinowanego alergenu poprzez zastosowanie chromatografii powinowactwa i trawienie trombiną.

poza regionem homologii do genu. W przeciwieństwie do tego, podczas przypadkowej integracji wszystkie sekwencje w konstrukcji zostają zachowane. Rekombinanty homologiczne są odporne na G418 i odporne na gancyklovir, podczas gdy klony z przypadkowo zintegrowaną konstrukcją są odporne na G418, a wrażliwe na gancyklovir. Oprócz kinazy tymidyny i gancykloviru zastosowanie znalazły także inne, również letalne dla komórek markery selekcyjne. Przykłady własnych ekspresyjnych konstrukcji genowych zawierających gen kodujący główny alergen kota – białko Feld1 przedstawiono na rysunkach 3 i 4, a na rysunku 5 przedstawiono analizę elektroforetyczną klonu pNTKfD1 zawierającego łańcuch 1 genu Feld1 inaktywowany genem fosfotransferazy aminoglikozydowej.

W celu eliminacji komórek z przypadkowo zintegrowanym genem stosuje się również konstrukcje, w których umieszcza się region kodujący marker selekcyjny pozbawiony promotora. Sekwencja kodująca marker przerywa ekson badanego genu i jest zgodna z ramką odczytu. W ten sposób ekspresja markera selekcyjnego jest uzależniona od promotora endogennego i zachodzi tylko w przypadku rekombinacji homologicznej. W tym przypadku rekombinanty homologiczne są odporne na antybiotyk G418, a komórki z przypadkowo zintegrowaną konstrukcją wrażliwe na ten antybiotyk. Strategia ma zastosowanie zarówno do konstrukcji insercyjnych, jak



Rys. 5. Analiza elektroforetyczna klonu pNTKfD1 zawierającego łańcuch 1 genu Feld1 inaktywowany genem fosfotransferazy aminoglikozydowej. W celu inaktywacji genu kodującego łańcuch 1 białka Feld1 do wektora pNTK wprowadzono fragment obejmujący region 5' genu o wielkości 448 pz oraz region 3' genu o wielkości 1290 pz. Gen kinazy tymidyny został wprowadzony do sekwencji poza regionem homologii. Tor 1, hydroliza enzymami restrykcyjnymi EcoRI i XhoI potwierdza obecność regionu 5' łańcucha 1 genu Feld1 o wielkości 448 pz w odpowiedniej orientacji; tor 2, hydroliza enzymami restrykcyjnymi BamHI i ClaI potwierdza obecność regionu 3' łańcucha 1 genu Feld1 o wielkości 1290 pz; tor 3, hydroliza enzymami restrykcyjnymi XbaI i KpnI potwierdza obecność genu kinazy tymidyny (2020 pz); tor 4, marker wielkości λ DNA HindIII/EcoRI.

i konstrukcji wymiennych, ale tylko w przypadku linii komórkowych, w których wprowadzony gen ulega ekspresji (9).

Możliwe jest również zastosowanie markera selekcyjnego pozbawionego sygnału poli(A), co czyni jego transkrypt bardzo nietrwały. Konstrukcję genową przygotowuje się w taki sposób, aby po integracji konstrukcji, w przypadku rekombinacji homologicznej pojawił się sygnał poli(A). W ten sposób transkrypt genu selekcyjnego staje się bardziej trwały, co umożliwia selekcję pozytywną (10).

4. Inaktywacja genów

Rekombinację homologiczną najczęściej stosuje się w celu całkowitej inaktywacji genów. Zwykle ekson kodujący ważną domenę białka (lub koniec 5' tego regionu) zostaje przerwany pozytywnym markerem selekcyjnym, co uniemożliwia powstawanie prawidłowego mRNA. Gen może zostać inaktywowany również poprzez usunięcie fragmentu lub całego genu. W tym przypadku konstrukcja genowa musi zawierać sekwencje homologiczne do genomowego DNA, leżące bezpośrednio z obu stron regionu, który ma być usunięty. W ten sposób można usunąć do piętna-

stu tysięcy par zasad i całkowicie wyeliminować wiele genów (11). Zastosowanie systemu rekombinazy Cre-loxP umożliwia inaktywację genu ograniczoną przestrzennie, dla określonego typu komórek lub tkanek, jak i czasowo, poprzez kontrolę aktywności lub ekspresji rekombinazy.

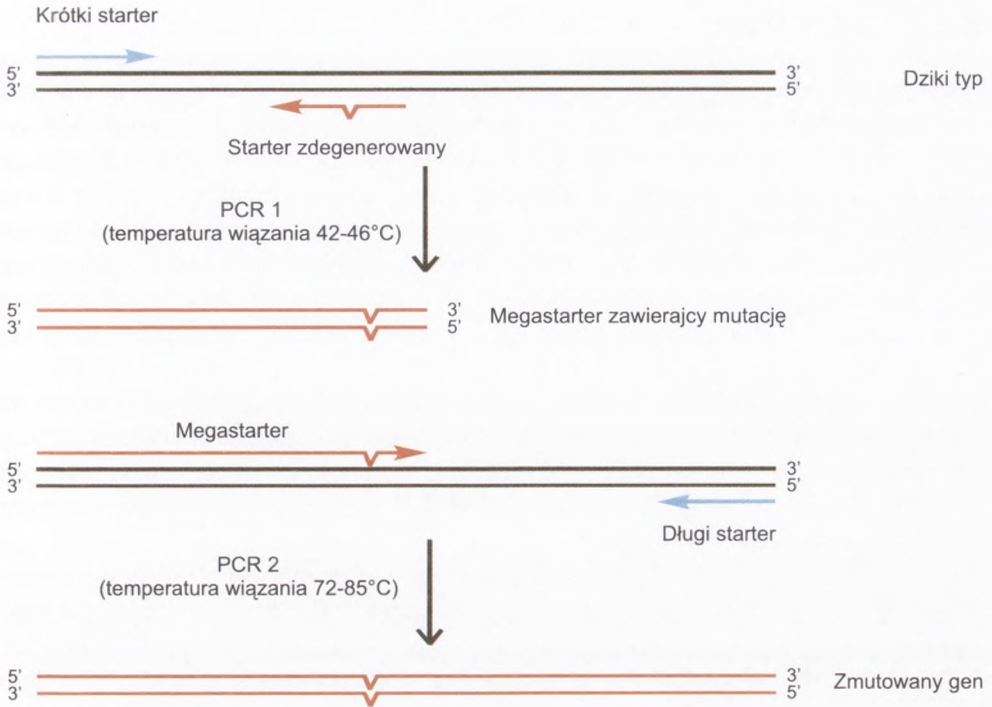
Często do konstrukcji wymiennych wprowadza się zgodnie z ramką odczytu na końcu 5' genu docelowego, drugi marker selekcyjny, gen lacZ kodujący β -galaktozydazę. Wprowadzenie sekwencji kodującej β -galaktozydazę umożliwia nie tylko inaktywację funkcji genu, ale również ekspresję białka fuzyjnego z aktywnością β -galaktozydazy. W ten sposób konstrukcja może być również wykorzystana do monitorowania aktywności promotora endogennego genu w różnych tkankach podczas rozwoju (7).

Wprowadzenie do konstrukcji sekwencji IRES (*Internal Ribosomal Entry Site*) umożliwia ponowną inicjację procesu translacji na utworzonym policistronowym mRNA. Dzięki temu nie ma już potrzeby umieszczania genów selekcyjnych zgodnie z ramką odczytu, co znacznie upraszcza budowę konstrukcji (12).

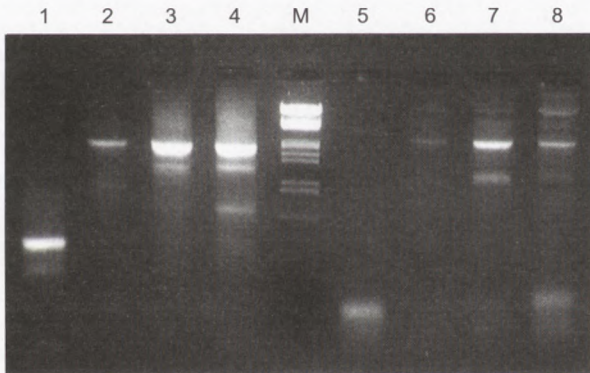
Inaktywację genu można uzyskać wprowadzając mutację punktową, która prowadzi do przedwczesnej terminacji translacji (mutacja typu STOP). Taką mutację można wprowadzać za pomocą techniki ukierunkowanej mutagenезy z zastosowaniem megastartera w reakcji PCR (rys. 6). Strategia wykorzystuje startery flankujące o diametralnie różnej temperaturze wiązania (T_m). Krótki starter flankujący ma zwykle 15-16 zasad i temperaturę wiązania 42-46°C. Długi starter flankujący ma 25-30 zasad i temperaturę wiązania pomiędzy 72 i 85°C. W pierwszej reakcji PCR uzyskiwany jest megastarter przy udziale startera wprowadzającego mutację i startera flankującego o niskiej T_m , w warunkach niskiej temperatury wiązania. Druga reakcja PCR może zostać wykonana w tej samej próbówce, co pierwsza reakcja PCR, w obecności startera flankującego o wysokiej temperaturze wiązania i megastartera, w warunkach wysokiej temperatury wiązania, która zapobiega wiązaniu startera o niskim T_m z pierwszej reakcji PCR (rys. 7).

Konstrukcję z tak zmienionym genem można wprowadzić do komórek w ko-transfekcji z wektorem zawierającym pozytywny marker selekcyjny (13). Teoretycznie w przypadku rekombinacji homologicznej wektor zawierający marker selekcyjny powinien integrować w innym miejscu. Pozwala to wyeliminować marker selekcyjny podczas hodowli zwierząt. Niestety obie konstrukcje często integrują w tym samym miejscu, co znacznie ogranicza zastosowanie tej metody.

Inna metoda eliminacji markera selekcyjnego wymaga podwójnej rekombinacji homologicznej (14). W pierwszym etapie konstrukcja insercyjna zawierająca inaktywowany gen oraz pozytywny i negatywny marker selekcyjny integruje poprzez rekombinację homologiczną z genomowym DNA. Duplikacja sekwencji może być przyczyną wystąpienia wewnątrzchromosomowej rekombinacji homologicznej, która eliminuje albo nowo wprowadzoną sekwencję albo sekwencję genu endogennego wraz z markerami selekcyjnymi.



Rys. 6. Schemat ukierunkowanej mutagenazy z zastosowaniem megastartera w reakcji PCR.



Rys. 7. Modyfikacja genów kodujących główny alergen kota Feld1 (łańcuch 1 i łańcuch 2) poprzez wprowadzenie kodonu Stop metodą ukierunkowanej mutagenazy z zastosowaniem megastartera w reakcji PCR. Tor 1, produkt DNA pierwszej reakcji PCR ukierunkowanej mutagenazy łańcucha 1 genu Feld1 (378 pz); tor 2-4, produkty DNA drugiej reakcji PCR ukierunkowanej mutagenazy łańcucha 1 genu Feld1 (1687 pz); tor M, standard wielkości λ DNA HindIII/EcoRI; tor 5, produkt DNA pierwszej reakcji PCR ukierunkowanej mutagenazy łańcucha 2 genu Feld1 (112 pz); tor 6-8, produkty DNA drugiej reakcji PCR ukierunkowanej mutagenazy łańcucha 2 genu Feld1 (2141 pz). W eksonie 3 łańcucha 1 zmieniono kodon TGC (cysteina) na kodon TGA (Stop) w pozycji 424-426. W eksonie 1 łańcucha 2 zmieniono kodon GGC (glicyna) na kodon TGA (Stop) w pozycji 262-264.

5. System Cre-loxP

System Cre-loxP pochodzi z bakteriofaga P1. Rekombinaza Cre działa na miejsca loxP w DNA. Miejsce loxP składa się z dwóch palindromowych, trzynastunukleotydowych sekwencji, rozdzielonych sekwencją ośmionukleotydową. Jeżeli dwa miejsca loxP o tej samej orientacji znajdują się blisko siebie, rekombinaza może utworzyć pętlę z sekwencji leżącej pomiędzy dwoma takimi miejscami i usunąć ją pozostawiając jedno miejsce loxP w genomowym DNA, a drugie na kolistym fragmencie DNA zawierającym sekwencję wyciętą, szybko ulegającą degradacji. Jeżeli miejsca loxP znajdują się w przeciwnej orientacji, rekombinaza Cre powoduje inwersję sekwencji leżącej pomiędzy nimi. W obu przypadkach reakcja jest odwracalna. Właściwie zaprojektowana konstrukcja zawierająca miejsca loxP może zostać zastosowana do wprowadzania subtelných mutacji lub do czasowo, albo przestrzennie kontrolowanej inaktywacji (15). Poza rekombinazą Cre również inne rekombinazy, takie jak rekombinaza FLP rozpoznająca na DNA miejsca FRT, mogą zostać w podobny sposób wykorzystane (16).

Obecność pozytywnego markera selekcyjnego w genomowym DNA może powodować liczne nieoczekiwane skutki. Na przykład, obecność genu *neo*, często z jego własnym promotorem, może zmieniać ekspresję sąsiadujących genów (17). Rekombinaza Cre może z powodzeniem zostać zastosowana do usuwania markerów selekcyjnych. Konstrukcja genu musi zawierać markery selekcyjne leżące pomiędzy dwoma miejscami loxP, które mają tę samą orientację (18). Ekspresja rekombinazy Cre może nastąpić albo poprzez transfekcję do komórek wektora ekspresyjnego produkującego enzym Cre (19) albo przez lipofekcję enzymu do komórek (20). Po wycięciu markera selekcyjnego w genomowym DNA pozostaje jedno miejsce loxP, ale konstrukcja może być zaprojektowana w taki sposób, aby pozostawało w miejscu mniej istotnym, takim jak intron. Mimo że nawet krótka sekwencja loxP może wpływać na ekspresję sąsiadujących genów, zmiany takie nie zostały dotychczas zaobserwowane. Aktywność rekombinazy Cre działającej krótkotrwale, podana w literaturze, różni się znacznie, od ok. 2-15% (21). Natomiast aktywność rekombinazy *in vivo* zależna jest od sekwencji zintegrowanych z genomem, a zatem jest dużo wyższa ze względu na długotrwały charakter ekspresji.

W przypadku genów, które są niezbędne dla rozwoju wczesna inaktywacja uniemożliwiłaby uzyskanie osobnika dorosłego. Opóźnienie ekspresji białka Cre do czasu, aż zwierzę stanie się dorosłe umożliwiłoby jego normalny rozwój, a inaktywacja genu mogłaby nastąpić u dorosłego osobnika (22). Takie opóźnienie jest możliwe dzięki zastosowaniu promotorów komórkowospecyficzných lub promotorów indukowanych.

Opóźnienie ekspresji białka Cre wymaga najpierw uzyskania dwóch linii zwierząt transgeniczných. U pierwszej linii zwierząt ekspresja Cre jest indukowana lub ograniczona do niektórych typów komórek. Druga linia zwierząt transgeniczných jest tworzona poprzez rekombinację homologiczną, w której wykorzystuje się kon-

strukcje genowe zawierające początkowo trzy miejsca loxP, ograniczające fragment genu, który jest istotny dla funkcji genu oraz marker selekcyjny. Po weryfikacji procesu rekombinacji homologicznej, rekombinaza Cre ulega krótkotrwałej ekspresji, tworząc pętle pomiędzy parami miejsc loxP i usuwając je. Kolonie są następnie analizowane na wystąpienie określonego typu rekombinacji (utrata markera selekcyjnego a zachowanie wszystkich regionów genu). Jeżeli częstość wystąpienia rekombinacji homologicznej jest zbyt niska, korzystne może być zastosowanie konstrukcji, która zawiera negatywny marker selekcyjny pomiędzy miejscami loxP razem z markerem pozytywnym, co znacznie ułatwia selekcję komórek. W ten sposób komórki są selekcjonowane na każdym etapie.

Interesujący nas gen będzie ulegał normalnej ekspresji, ponieważ jego jedyną modyfikacją jest obecność miejsc loxP w niekodujących obszarach genu (np. intronach). Krzyżowanie obu linii zwierząt transgenicznych doprowadzi do powstania linii, u których rekombinaza Cre będzie wycinać DNA, inaktywując gen, tylko w komórkach, w których ulega ekspresji i w określonym stadium rozwojowym. W ten sposób tkankowospecyficzna inaktywacja została przeprowadzona dla wielu genów (23).

Wykorzystując wektory wirusowe do ekspresji białka Cre, możliwe jest uzyskanie inaktywacji genu przestrzennie ograniczonej zasięgiem infekcji wirusowej. Strategia ta znalazła zastosowanie dla licznych tkanek, takich jak mózg, wątroba, okrężnica i serce (24-26).

6. Wprowadzanie konstrukcji genowych do komórek

Szybki rozwój technik inżynierii genetycznej w ostatnich latach umożliwia praktycznie wszelkie manipulacje z materiałem genetycznym *in vitro*. Wiele zagadnień jest związanych z wydajnym i swoistym wprowadzaniem DNA do komórki. Wprowadzany do komórek DNA jest hydrofilowym, wielkocząsteczkowym biopolimerem o ujemnym ładunku, którego transport przez błonę komórkową jest utrudniony, ponieważ błona komórkowa również jest obdarzona ładunkiem. Inną poważną przeszkodą, jaką napotyka wprowadzanie DNA do komórek, jest liniowy rozmiar tych makrocząsteczek.

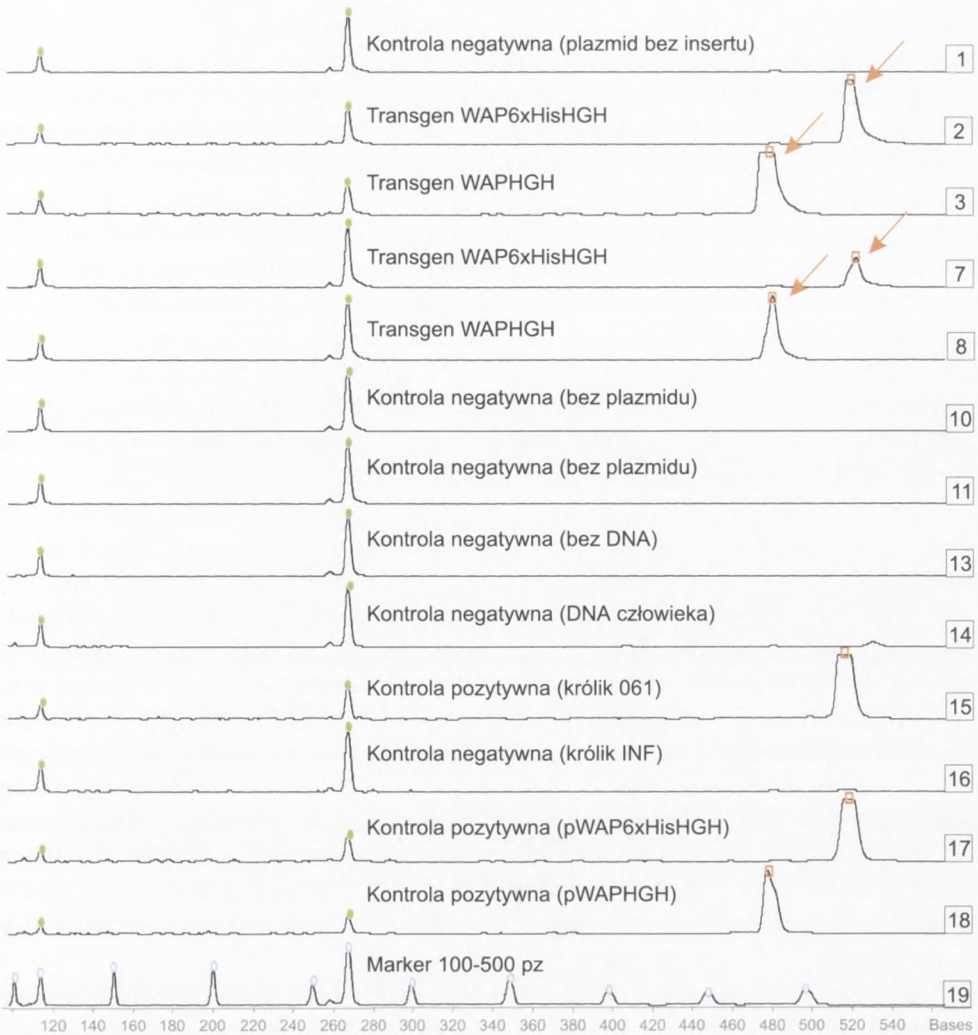
Trudności z wprowadzaniem DNA do komórek przyczyniły się do opracowania wielu nowych technik transfekcji, z których kilka znalazło szersze zastosowanie. DNA można wprowadzać do komórki metodami fizykochemicznymi, do których zalicza się elektroporację, precypitację, mikroiniekcję i biolistykę. Z metod biologicznych powszechnie wykorzystuje się wektory wirusowe i niewirusowe. Wektory wirusowe oparte są głównie na rekombinowanych retrowirusach i adenowirusach. Z wektorów niewirusowych najczęściej stosuje się liposomy.

Istotą biolistyki jest opłaszczenie cząstek metalu ciężkiego (najczęściej złota lub wolframu) o rozmiarze około 1 μm cząsteczkami DNA, które są następnie przyspie-

szane w polu elektrycznym o wysokim napięciu lub w aparacie ciśnieniowym i wstrzeliwane do komórek. Biolistyka jest dostatecznie uniwersalna i wydajna, aby mogła być z powodzeniem zastosowana dla wielu typów komórek i środowisk komórkowych, tkanek i organów *in vitro* i *in vivo* (27). Metoda wymaga niewielkiej ilości DNA i w porównaniu z innymi technikami transfekcji małej liczby komórek. Prawie 100% kotransfekcja jest obserwowana, gdy cząsteczkę metalu opłaszczy się jednocześnie dwiema lub większą liczbą różnych cząsteczek DNA. Stabilna transfekcja występuje ze względnie wysoką częstością (około 1% czasowo transfekowanych komórek), a integracji z genomem komórki gospodarza ulega zwykle powyżej 20 kopii transgeny. Może to prowadzić do pomyłek, gdy analizowane mają być elementy regulatorowe transgeny, ponadto może to wywołać niestabilność genomu komórki. Biolistyka znalazła zastosowanie szczególnie tam gdzie nie mogły być zastosowane inne techniki transfekcji. Najczęstsze zastosowanie znalazła w inżynierii genetycznej roślin.

Elektroporacja jest prostą, szybką i wydajną techniką transfekcji. Krótki impuls elektryczny o wysokim napięciu, trwający nie dłużej niż kilka milisekund tworzy w błonach komórkowych pory, przez które egzogeny DNA przechodzi do cytoplazmy i jądra komórkowego (28). Wadą metody jest ponad 50% śmiertelność komórek. Parametry, które mają wpływ zarówno na wydajność transfekcji, jak i na śmiertelność komórek to parametry definiujące długość impulsu elektrycznego (pojemność kondensatora, napięcie, odległość między elektrodami, oporność, temperatura zawiesiny komórkowej), liczba cząsteczek DNA i ogólny stan fizjologiczny komórek. Prawie każdy typ komórek może zostać transfekowany poprzez elektroporację, ale ustalenie właściwych parametrów procesu może okazać się bardzo trudne. Istnieją jednak procedury, które mają szersze zastosowanie (29). Zaletą elektroporacji jest to, że stabilna integracja transfekowanego DNA dotyczy często pojedynczej kopii. Odmianą elektroporacji jest elektroiniekcja, w której stosowane są dwa impulsy elektryczne – pierwszy do utworzenia porów w błonie komórkowej i drugi do wprowadzenia DNA.

Po raz pierwszy metoda precypitacji została zastosowana w 1973 r. do wprowadzania DNA adenowirusa do komórek ssaków (30). Precypitat DNA-kation może być pobierany przez komórkę na drodze endocytozy. Jest to metoda, którą z powodzeniem można stosować do komórek adherentnych *in vitro*, a jej największą zaletą jest niski koszt. Skuteczność metody zależy przede wszystkim od pH pożywki i buforów, co tłumaczy niską wydajność procesu, gdy nie dość precyzyjnie kontroluje się ten parametr. Stabilne rekombinanty, często zawierające wiele kopii transfekowanego DNA występują z częstością około 10^{-5} . Zastosowanie specjalnych buforów ułatwiających formowanie się kompleksów DNA-kation na komórkach, zwiększa 10-100-krotnie częstość zajścia stabilnej transfekcji (rys. 8). Metody precypitacji nie można zastosować *in vivo* i w zawiesinach komórkowych *in vitro*.



Rys. 8. Analiza DNA komórek płodowych fibroblastów bydłych na występowanie transgenu po transfekcji komórek konstrukcją genową WAP6xHisHGH lub WAPHGH metodą precypitacji. Stosując PCR amplifikowano fragment DNA o wielkości 518 pz obejmujący fragment promotora WAP i fragment genu hGH zawarty w konstrukcji genowej WAP6xHisHGH oraz fragment DNA o wielkości 480 pz zawarty w konstrukcji genowej WAPHGH. Do analizy zastosowano parę starterów WHGH2F i WHGH2R. Frakcjonowanie fragmentów DNA wykonano w 6% żelu poliakryloamidowym na zestawie ALFExpress. Strzałką zaznaczono transgen wykryty w DNA komórek fibroblastów płodowych. Wielkość transgenu jest zgodna z wielkością sekwencji transgenu w kontroli pozytywnej (odpowiednio konstrukcja genowa WAP6xHisHGH i WAPHGH).

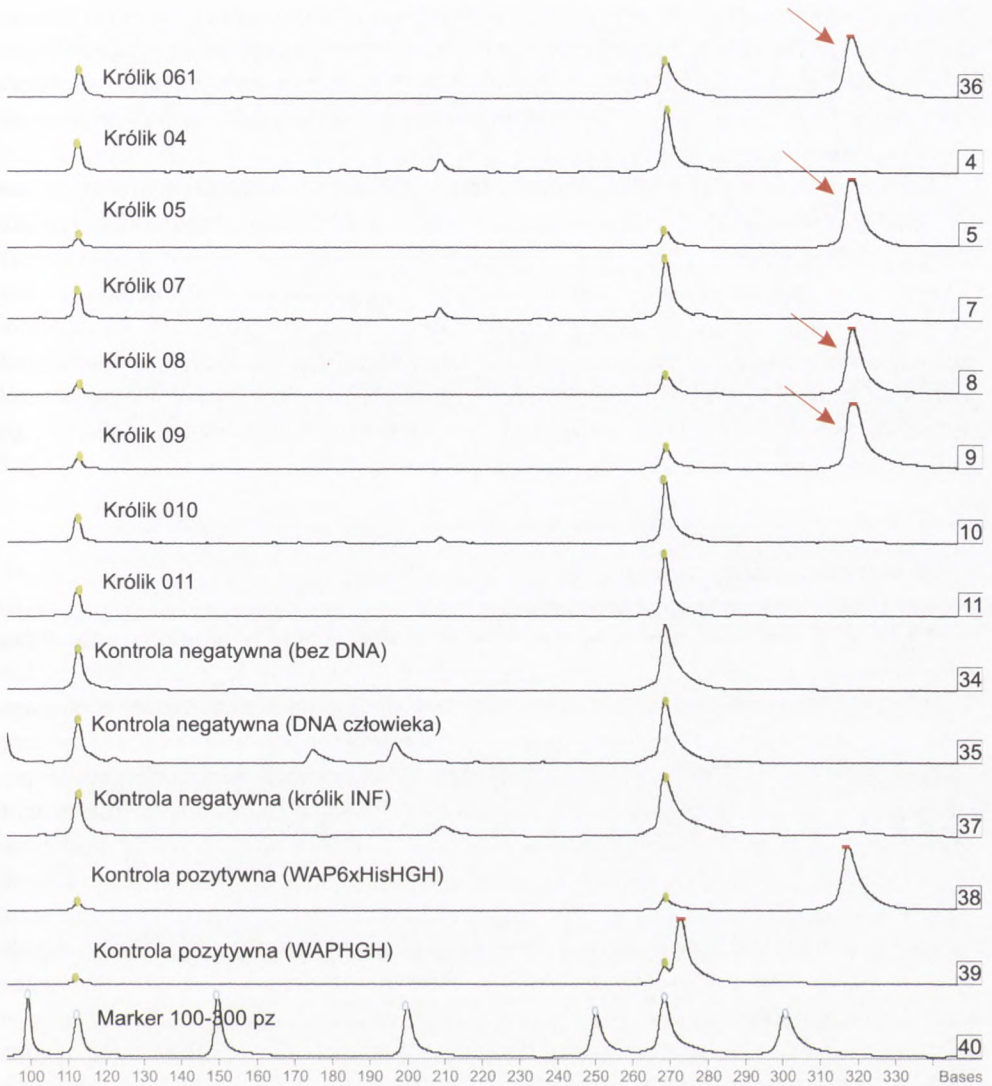
Mikroiniekcja konstrukcji DNA do przedjądrzy zapłodnionych komórek jajowych jest metodą wykorzystywaną do uzyskiwania transgeniczných zwierząt domowych. Jednakże, charakteryzuje się niską wydajnością (1-4% transgenicznego potomstwa),

przypadkową integracją i zróżnicowanym poziomem ekspresji transgenu (31). Najczęściej integracja poprzedzona jest łączeniem się poszczególnych kopii transgenu w większe tandemowo powtórzone zespoły. Dopiero takie zespoły integrują z genomowym DNA w pojedynczym miejscu. Uzyskiwanie transgenicznych zwierząt na drodze mikroiniekcji jest bardzo czasochłonne i kosztowne. Koszt uzyskania transgenicznej myszy to 120 USD, transgenicznej świni 25 000 USD, transgenicznej owcy 50 000 USD, a w przypadku transgenicznego bydła przekracza 500 000 USD (32). W konsekwencji, zastosowanie mikroiniekcji zostało ograniczone do wytwarzania rekombinowanych białek w gruczołach mlekowych zwierząt transgenicznych i do ksenotransplantacji. Obniżenie kosztów produkcji transgenicznego bydła o 50-60% jest możliwe poprzez selekcję embrionów *in vitro* na obecność transgenu. Technologia mikroiniekcji została obszernie omówiona w literaturze (31-33). Pomimo ograniczeń mikroiniekcja została z powodzeniem wykorzystana do uzyskiwania zwierząt transgenicznych w biomedycynie i rolnictwie (rys. 9).

Spośród metod biologicznych należy wyróżnić wprowadzanie konstrukcji genowych z wykorzystaniem wektorów retrowirusowych. Odwrotna transkryptaza wprowadzana do komórki przez wirusa syntetyzuje dwuniciową nić DNA na matrycy genomowego RNA wirusa. DNA integruje z genomem gospodarza w sposób przypadkowy. Warunkiem integracji DNA wirusa jest podział komórki. Wyjątek stanowią lentiwirusy integrujące także z genomem komórek nie dzielących się. Na obu końcach retrowirusowego DNA znajdują się regiony LTR (*long terminal repeats* – długie powtórzenia końcowe) bogate w sygnały odpowiedzialne za integrację i transkrypcję. Włączanie retrowirusowego DNA do genomu gospodarza zachodzi przy udziale białka integracyjnego (IN), również wprowadzanego do komórki przez wirusa. W celach terapeutycznych regiony leżące pomiędzy sekwencjami LTR, kodujące białka rdzenia wirusa, odwrotną transkryptazę i integrzę oraz glikoproteiny otoczki można zastąpić genem terapeutycznym. Tak zmodyfikowany wektor wirusowy ulega integracji, ale nie jest zdolny do autoreplikacji.

Do wprowadzania konstrukcji genowych stosuje się również wektory adenowirusowe. Wirus nie integruje z genomem komórki gospodarza i nie wymaga do infekcji podziałów komórkowych. Wirusowy DNA funkcjonuje w postaci nietrwałego episomu, dlatego efekt działania wektora jest stosunkowo krótkotrwały. Głównym ograniczeniem stosowania wektorów adenowirusowych jest ich immunogenność, dlatego z genomu adenowirusa usuwa się geny kodujące najbardziej immunogenne białka. Aby zapobiec autoreplikacji usuwa się region E1 (34). Wektory adenowirusowe zdolne są pomieścić geny o wielkości 7,5 kbp. Podejmowane są również próby konstruowania adenowirusowych minichromosomów, w których usuwa się wszystkie sekwencje kodujące wirusa, co zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia odpowiedzi immunologicznej i znacznie zwiększa pojemność wektora.

Prostą i stosunkowo niedrogą metodą wprowadzania transgenu jest lipofekcja. Transfer DNA do komórki eukariotycznej jest ograniczony m.in. z powodu elektrostatycznego odpychania występującego pomiędzy cząsteczką DNA i błoną komór-



Rys. 9. Analiza DNA królików pokolenia F1 na występowanie transgenu. Badania przeprowadzono na króliku 61 (F0) oraz jego potomstwie (F1). Królika F0 uzyskano w wyniku mikroiniekcji konstrukcji genowej WAP6xHisGH do przedjądrza męskiego zygoty. Metodą PCR amplifikowano fragment DNA o wielkości 315 pz obejmujący fragment promotora WAP i fragment genu hGH zawarty w konstrukcji genowej WAP6xHisGH. Do analizy zastosowano parę starterów WHGH1F i WHGH1R. Frakcjonowanie fragmentów DNA wykonano w 6% żelu poliakrylamidowym na zestawie ALFExpress. Strzałkami zaznaczono transgen. Wielkość transgenu wykrytego u królików pokolenia F1 jest identyczna z wielkością transgenu występującego u królika pokolenia F0 i zgodna z wielkością sekwencji transgenu w kontroli pozytywnej (konstrukcja genu WAP6xHisGH).

kową. Agregacja nośników, będących mieszaniną lipidów obdarzonych ładunkiem dodatnim i lipidów elektrostatycznie obojętnych, na DNA prowadzi do jego kondensacji i opłaszczania (35). Powstają dodatnio naładowane kompleksy będące sferycznymi, ciągłymi, dwuwarstwowymi, lipidowymi strukturami opłaszczającymi skondensowany DNA. Takie kompleksy DNA-lipidy są zdolne do wnikania do komórek na drodze endocytozy.

Przyłączanie kompleksu do komórek i jego pobieranie na drodze endocytozy zależy od ilości, rodzaju i rozmieszczenia dodatnich ładunków nośnika. Każdy typ komórek wymaga innego składu lipidowego nośnika. Wydajność transferu DNA zależy również od odpowiedniego stosunku ilości DNA i lipidów, który obok składu chemicznego nośnika decyduje o wielkości i ładunku całego kompleksu. Wielkość kompleksów ma wpływ na wydajność ich pobierania na drodze endocytozy. Wydajność jest odwrotnie proporcjonalna do wielkości kompleksu. Poszczególne typy komórek mogą różnić się zdolnością do pobierania kompleksów o różnej wielkości, co częściowo tłumaczy różnice w wydajności transfekcji.

7. Zwierzęta transgeniczne

Technologia transgenezy znalazła szerokie zastosowanie w biomedycynie. Kilka rekombinowanych białek jest produkowanych na dużą skalę w gruczołach mlekowych transgenicznych owiec oraz kóz i oczyszczone białka mleka zostały biologicznie scharakteryzowane (36). Zastosowanie „żywych bioreaktorów” na szerszą skalę jest ograniczone z kilku powodów. Poziomu ekspresji interesujących genów połączonych z regionem regulatorowym genów kodujących białka mleka nie można przewidzieć. Rekombinowane białka wydzielane do mleka nie zawsze są modyfikowane we właściwy sposób. Istnieje niebezpieczeństwo, że człowiek wraz z białkiem ekstrahowanym z mleka może być narażony na kontakt z groźnymi patogenami. Jednakże, kilka białek człowieka jak antytrombina III, α_1 -antytrypsyna, tkankowy aktywator plazminogenu, α -glukozydaza i laktoferyna przechodzi już zaawansowane testy kliniczne (36).

Inną obiecującą dziedziną, w której zwierzęta transgeniczne mogą mieć ogromne zastosowanie jest ksenotransplantacja. Trwają prace nad tworzeniem genetycznie zmodyfikowanych narządów zwierzęcych nadających się na przeszczepy. Przeszczepiony narząd pochodzący od świni mógłby uratować życie tysiącom ludzi, których ze względu na brak dawcy nie można poddać zabiegowi transplantacji serca, nerki czy wątroby. Jednakże, taki narząd jest dla człowieka przeszczepem wysoce niezgodnym tkankowo, który prawie natychmiast zaczyna być odrzucany w wyniku nadostrej reakcji immunologicznej. U człowieka występują ksenoreaktywne przeciwciała skierowane przeciwko antygenowi Gal świni obecnemu na glikolipidach i glikoproteinach. Przyłączanie reszty cukrowej α -1,3Gal (antygeny Gal) odbywa się przy udziale enzymu α -1,3-galaktozylotransferazy. Zarówno enzym jak i reszta cu-

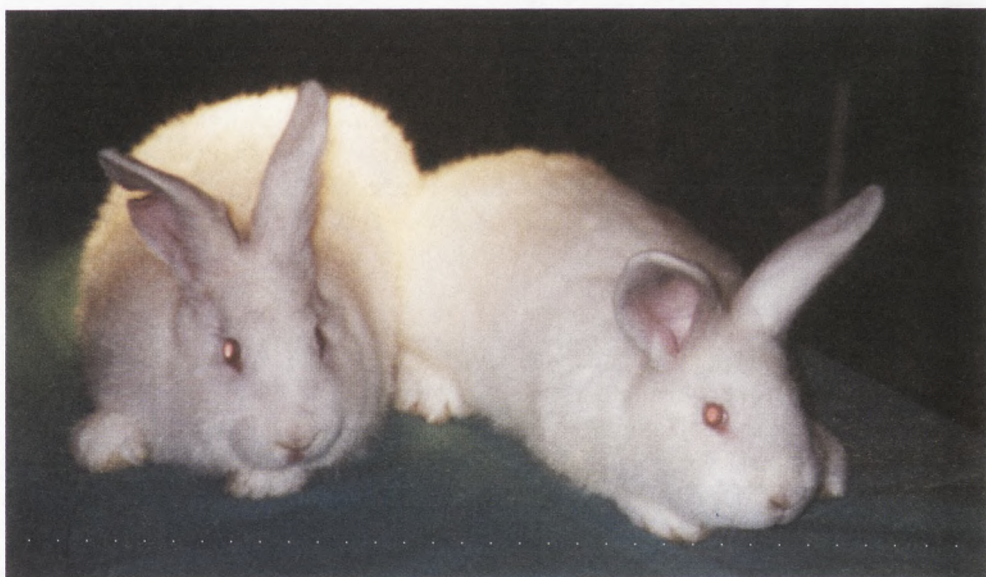
krowa nie występują u człowieka. Uważa się, że przeszczep narządu genetycznie zmienionej świni pozbawionej enzymu α -1,3-galaktozylotransferazy, a zatem pozbawionego antygeny Gal, byłby tolerowany przy jednoczesnym podawaniu leków działających na inne mniej nasilone reakcje immunologiczne. Drugim czynnikiem decydującym o szybkim odrzuceniu przeszczepu jest włączenie u biorcy tzw. enzymatycznej kaskady dopełniacza. System dopełniacza powoduje lizę komórek przez tworzenie otworów w ich błonie komórkowej. W tej precyzyjnie regulowanej kaskadzie reakcji uczestniczy ponad 15 białek. Powstanie kompleksu antygen-przeciwciała powoduje aktywację pierwszego składnika kaskady. Ciąg reakcji prowadzi do utworzenia kompleksu atakującego błonę, który wnika do wnętrza błony komórkowej zawierającej antygen. Kompleks katalizuje wejście do błony cząsteczek, które tworzą w błonie duże pory. W rezultacie następuje liza i zniszczenie rozpoznanej komórki. Możliwe jest wprowadzenie do genomu świń genów człowieka regulujących kaskadę enzymatyczną dopełniacza (37). Geny te wytwarzają czynniki blokujące aktywację dopełniacza i zapobiegające formowaniu się kompleksu atakującego błonę komórkową.

Innym interesującym zastosowaniem jest możliwość wprowadzania odporności na choroby (38). Obecne badania nad wprowadzaniem odporności na choroby poprzez transfer genu ukierunkowane są na trzy strategie: a) somatyczny transfer genu (np. szczepionki DNA), b) inaktywacja genu w komórkach linii płciowej, c) adytywne transfer genu do komórek linii płciowej. Strategie te mają na celu czasową lub trwałą ekspresję czynników mających wpływ na niespecyficzne lub specyficzne mechanizmy obronne lub zniszczenie genów, które wywołują chorobę.

Pierwszy transgeniczny królik powstał w 1985 r. (39). Zwierzę to ma wiele zalet, z których najważniejsze to krótka ciąża, krótki odstęp międzypokoleniowy i liczne mioty. Łatwiej niż u myszy można wykonać wiele zabiegów, dlatego uzyskanie transgenicznych królików zabiera stosunkowo niewiele czasu w porównaniu z genetyczną modyfikacją innych gatunków zwierząt gospodarskich. Króliki mogą produkować rekombinowane białka w ilości zapewniającej ich farmaceutyczne zastosowanie. We krwi transgenicznych królików udało się uzyskać α_1 -antytrypsynę człowieka w stężeniu 1 mg/ml (40). Obecne przeciwciała monoklonalne wyprodukowano zarówno we krwi (41) jak i w mleku (42) transgenicznych królików. Wykorzystanie mleka do uzyskiwania rekombinowanych białek było rozważane wkrótce po urodzeniu się pierwszego transgenicznego ssaka. Po raz pierwszy udało się to zastosować u transgenicznych myszy, które z powodzeniem wydzielają w mleku β -laktoglobulinę owcy (43). Zaletą tej metody, poza możliwością uzyskania dużej ilości rekombinowanego białka, jest przypisywana komórkom gruczołu mlekowego zdolność do prawidłowej modyfikacji potranslacyjnej białek. Niestety nie można przewidzieć wydajności konstrukcji genowej *in vivo* na etapie transfekcji (44). W 1 ml mleka można uzyskać kilka miligramów rekombinowanego białka. Do oszacowania wydajności konstrukcji genowych, które mają być zastosowane u większych zwierząt najczęściej wykorzystuje się myszy. Króliki w okresie laktacji dostarczają potomstwu ponad 200 ml mleka

dziennie. Stężenie białka w mleku królika jest trzy razy większe niż w mleku krowy. Dlatego zwierzęta te mogą być źródłem względnie dużej ilości rekombinowanych białek. Uważa się, że w przypadku białek farmaceutycznych, na które zapotrzebowanie nie przekracza 1 kg rocznie wykorzystanie królików transgenicznych staje się opłacalne na skalę przemysłową. W praktyce zbiera się do 100 ml mleka w ciągu 24 godzin tak, aby pozostała ilość wystarczyła do wykarmienia potomstwa. Okres laktacji u królika trwa 4-5 tygodni. W ciągu roku króliki mogą kilkakrotnie przechodzić okres laktacji. Stężenie rekombinowanego białka w mleku transgenicznych królików w ilości powyżej 1 mg/ml udało się uzyskać w przypadku IGF-1 człowieka (45). Elementy regulatorowe pochodziły od genu kodującego α_{S1} -kazeinę bydła. Również w mleku otrzymano w ilości od kilku ng/ml do kilku mg/ml interleukinę 2 (46), tkankowy aktywator plazminogenu (47), chymozynę (48) i erytropoetynę (49). Królik jest również interesujący ze względu na podobieństwo z metabolizmem tłuszczów człowieka. Z tego powodu powstały zwierzęta, u których ekspresji ulegają gen lipazy wątrobowej (50), apolipoproteina A1 (51), apolipoproteina B100 (52), lecytyno-cholesterolowa acylotransferaza (53), apolipoproteina E (54) i 15-lipoksygenaza (55). W badaniach własnych uzyskano transgenicznego królika wytwarzającego w mleku hormon wzrostu człowieka (rys. 10).

W porównaniu z innymi dużymi zwierzętami gospodarskimi świnia ma kilka zalet – ciąża trwa 114 dni, odstęp międzypokoleniowy wynosi tylko 12 miesięcy, a liczba prosiąt w miocie zazwyczaj 10-12. Laktująca maciora produkuje całkiem duże ilości mleka, około 300 litrów rocznie. Prowadzone doświadczenia są ukierun-



Rys. 10. Transgeniczne króliki 05 (samiec) i 08 (samica) pokolenia F1, potomstwo królika 61.

kowane na poprawę produktywności, wzmocnienie odporności na choroby, produkcję farmaceutyków i tworzenie modeli chorób człowieka. Transgeniczne świnię mogą odegrać ważną rolę w dostarczaniu produktów mających zastosowanie w medycynie. Hemoglobina człowieka (56) i białko C człowieka (57) już są produkowane przez świnię. Białko C podawane jest w przypadku jego niedoboru w organizmie. Funkcja białka polega na kontrolowaniu krzepnięcia krwi. Transgeniczne świnię produkowały białko C człowieka w mleku w ilości ponad 1 g/l (58). Konstrukcja genowa zawierała 1,6 kpz cDNA genu białka C wprowadzonego do 1 eksonu genu WAP myszy. Gen WAP składał się z 2,6 kpz sekwencji promotora, 3,0 kpz sekwencji kodującej oraz 1,6 kpz sekwencji końca 3'. W przeprowadzonych badaniach potwierdzono, że komórki gruczołu mlekowego potrafią w sposób wydajny wykonać proces γ -karboksylacji. Ze względu na dużą liczbę różnorodnych hemoglobinopatii występuje duże zapotrzebowanie na hemoglobinę. Hemoglobinę człowieka udało się uzyskać u transgenicznych świń. W najlepszym przypadku u transgenicznej lochy uzyskano w erytrocytach 24% hemoglobiny człowieka (32 g/l) i 30% hybrydowej hemoglobiny H α P β (40 g/l). Od tej samej lochy uzyskano 12 prosiąt w tym 5 transgenicznych. Poziom ekspresji hemoglobiny człowieka był identyczny jak u lochy. Do transgenezy zastosowano konstrukcję zawierającą genomowy region kodujący β -globinę człowieka (1,5 kpz segmentu obejmującego trzy eksony i dwa introny oraz 2,0 kpz końca 3') połączony z promotorem β -globiny świni (2,5 kpz) oraz region β -LCR człowieka (6,5 kpz) z genami α - i ϵ -globiny (56). Obecnie prowadzone są intensywne badania nad wprowadzaniem genów, które umożliwiłyby w przyszłości międzygatunkowe przeszczepy organów. Wykazano już, że możliwe jest ograniczenie szybkości odrzucania przeszczepu poprzez wprowadzenie do genomu dawcy genów kodujących inhibitory kaskady enzymatycznej dopełniacza (37). Spośród zwierząt gospodarskich świnię domowa jest gatunkiem najczęściej wykorzystywanym w biomedycznych analizach porównawczych chorób człowieka. Ze względu na podobieństwa anatomiczne i fizjologiczne świnię jest lepszym modelem niż zwierzęta laboratoryjne. Ze względu na wielkość i anatomiczne podobieństwo oka świni i człowieka uzyskano transgeniczną świnię ze zmutowanym genem rodopsyny (58). Celem badań w tym przypadku było badanie barwnikowego zwyrodnienia siatkówki, groźnej choroby dziedzicznej człowieka. W przyszłości możliwe są również badania porównawcze układu pokarmowego i krwionośnego.

Produkcja transgenicznych kóz skupiła się na produkcji farmaceutyków w gruczołach mlekowych. U kóz dominującym białkiem w mleku jest β -kazeina występująca w ilości 10-20 g/l. Promotor β -kazeiny kozy wykorzystano do przygotowania konstrukcji umożliwiających ekspresję tkankowego aktywatora plazminogenu człowieka (1-3 g/l) (59), antytrombiny III człowieka (3-4 g/l) (dane nie publikowane) oraz przeciwciał monoklonalnych człowieka (5 g/l).

Transgeniczne owce, do których wprowadzona została konstrukcja genowa, zawierająca gen insulinopodobnego czynnika wzrostu pod kontrolą promotora keratyny myszy, ulegającego ekspresji w skórze, mają o 6,2% więcej wełny niż zwierzęta

z grupy kontrolnej. W niedalekiej przyszłości transgeniczne owce zostaną wprowadzone na rynek (60). Nie zaobserwowano negatywnego wpływu transgenu na zdrowie i reprodukcję zwierząt. U chorych na hemofilię może wystąpić brak jednego z kilku czynników krzepnięcia krwi, najczęściej czynnika VIII lub IX. Ekspresję czynnika IX krzepliwości krwi człowieka udało się uzyskać w owczym mleku. Niestety ilość białka nie przekraczała 25 ng/ml. Transgen składał się z 4 kpz sekwencji promotora β -laktoglobuliny owcy (BLG), 1,5 kpz cDNA czynnika IX człowieka (hFIX) oraz 4,9 kpz sekwencji kodującej gen BLG i sekwencji końca 3' (61). Podobna konstrukcja posłużyła do uzyskania aż 30 mg/ml α_1 -antytrypsyny człowieka (62). Infuzje tego białka ułatwiają oddychanie osobom cierpiącym na rozedmę płuc. Konstrukcja genu zawierała 6,5 kpz sekwencji minigenu α_1 -antytrypsyny człowieka (pierwszy intron został usunięty). Poziom ekspresji cDNA i sekwencji genomowych jest zróżnicowany, ale częściej wyższy poziom ekspresji osiąga się w przypadku sekwencji genomowych, tak jak w przypadku wymienionych dwóch konstrukcji.

Ze względu na duże koszty mniej badań jest wykonywanych na transgenicznym bydle. Konstrukcję zawierającą genomową sekwencję kodującą erytropoetynę człowieka pod kontrolą sekwencji regulatorowej α_{S1} -kazeiny bydła wprowadzono poprzez mikroiniekcję do zapłodnionych *in vitro* oocytów. Zanim embriony zostały wprowadzone do macicy biorczyń, po 6-7 dniach hodowli były analizowane na obecność transgenu i płeć. Obecność transgenu u narodzonego cielaka została potwierdzona poprzez analizę PCR komórek krwi, mleka i błon płodowych oraz *Southern blotting* (63). Do przedjądrzy 36,530 dojrzałych i zapłodnionych *in vitro* zygot wprowadzono konstrukcję zawierającą α -laktoglobulinę człowieka, która miała ulegać ekspresji w gruczołach mlekowych. Rozwinęły się 1,472 embriony, które wprowadzono do macicy matek zastępczych (148 transferów bliźniaczych). Spośród nich 28% zaszło w ciążę (374/1,324), 17% się ocieliło (226/1,324), a 8% okazało się transgenicznymi. Częstość przekazywania cechy wahała się między 3-54%, wskazując na różny stopień mozaikowości. Embriony wyhodowane *in vitro* poprzez zapłodnienie *in vitro* nasieniem tych byków, były analizowane na obecność transgenu przed ich transferem do macicy biorczyń. Dotychczas wszystkie 6 cieląt narodzonych z tak monitorowanych embrionów były transgeniczne (64). W 1991 r. uzyskano transgenicznego buhaja mającego w genomie konstrukcję składającą się z sekwencji regulatorowej α_{S1} -kazeiny bydła i cDNA laktoferyny człowieka (65). Jednakże, nie zamieszczono w literaturze informacji o ilości uzyskanego białka u potomstwa.

8. Funkcje biologiczne białek zastosowanych we własnych konstrukcjach genowych

Szacuje się, że 2,5% populacji człowieka jest uczulona na alergeny zwierząt domowych. Wśród właścicieli zwierząt procent ten jest wyższy i stanowi od 5 do 38%. Spośród wszystkich alergenów pochodzenia zwierzęcego najczęstsze przypadki uczu-

lenia wywołują alergeny kota i psa. Głównym alergenem kota domowego (*Felis domesticus*) jest białko Feld1 o masie cząsteczkowej 38 kDa. Alergen zbudowany jest z dwóch podjednostek o masie 19 kDa. Każda podjednostka składa się z dwóch, połączonych wiązaniem dwusiarczkowym łańcuchów polipeptydowych. Łańcuch 1 białka Feld1 wykazuje homologię sekwencji aminokwasowej z uteroglobiną królika, podczas gdy łańcuch 2 białka Feld1 jest glikoproteina z oligosacharydem połączonym wiązaniem N-glikozydowym z asparaginą 33. Oba łańcuchy położone są względem siebie antyrównolegle. Każdy z łańcuchów kodowany jest przez inny gen. Gen kodujący łańcuch 1 zbudowany jest z 1640 pz i składa się z czterech eksonów, z których dwa pierwsze kodują dwie różne sekwencje sygnałowe. Sekwencja sygnałowa A występuje częściej zarówno w gruczołach ślinowych jak i łojowych. Gen kodujący łańcuch 2 zbudowany jest z 2084 pz i składa się z trzech eksonów. Znane są dwie formy łańcucha 2. Forma długa zbudowana jest z 92 aminokwasów i dominuje w gruczołach ślinowych, podczas gdy forma krótka zbudowana jest z 90 aminokwasów i dominuje w gruczołach łojowych (66).

Geny kodujące białko Feld1 ulegają ekspresji w gruczołach łojowych i ślinowych. Wydzieliny tych gruczołów rozprowadzane są wraz ze śliną po powierzchni włosów podczas pielęgnacji futra. Z powierzchni futra drobne cząsteczki zawierające alergen przedostają się do powietrza. Dzięki swojemu niewielkiemu rozmiarowi, 10-krotnie mniejsze od alergenu roztoczy kurzu domowego cząsteczki alergenu kota mogą przez długi czas utrzymywać się w powietrzu. Największe zagrożenie ze strony alergenu Feld1 ze względu na jego wysokie stężenie występuje w domach, w których żyją koty, ale jego obecność stwierdza się również w domach i pomieszczeniach publicznych, w których kot nigdy nie był obecny. Ze względu na wysoką lepkość cząsteczki alergenu Feld1 mogą być łatwo przenoszone, np. na ubraniu. Wykazano, że przyczyną występowania objawów uczuleniowych u dzieci przebywających w szkole może być alergen przeniesiony na ubraniu przez dzieci, które mają koty w swoich domach.

Koty różnych ras mogą być źródłem różnej ilości alergenu. Większość alergenów jest rozpuszczalna w wodzie, dlatego bardziej odpowiednie dla dzieci z atopią, jak się wydaje, są rasy kotów, które nie stronią od zabawy w wodzie. Nie występują jednak hipoalergiczne rasy kotów. Jednakże inaktywacja genów kodujących główny alergen kota domowego, jakim jest białko Feld1, znacznie zmniejszyłaby częstość występowania objawów uczuleniowych.

Hormon wzrostu jest niezbędny dla prawidłowego wzrostu u kręgowców. Bierze udział w metabolizmie u ssaków stymulując syntezę białek i degradację tłuszczów. Hormon wzrostu człowieka składa się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o długości 191 aminokwasów, z dwoma wiązaniami dwusiarczkowymi i strukturą czwartorzędową, która obejmuje cztery helisy zwinęte w sposób antyrównoległy. Gen kodujący hormon zbudowany jest z 1632 nukleotydów i składa się z pięciu eksonów i czterech intronów.

W 1982 r. na drodze mikroiniekcji wprowadzono do zygoty myszy konstrukcję składającą się z promotora metalotioneiny myszy (mMT) i hormonu wzrostu szczura

(rGH) (67). Wprawdzie uzyskane w tym doświadczeniu samice były nieplodne, ale samce przekazywały obcy gen potomstwu, które odznaczało się zwiększonym tempem wzrostu wynikającym z konstytutywnej nadekspresji hormonu wzrostu szczura. Stężenie hormonu wzrostu w transgenicznym myszom było 500 razy większe niż w normalnych, a ich masa dwukrotnie przewyższała masę zwierząt kontrolnych. Każda komórka zawierała około 30 kopii genu hormonu wzrostu szczura.

Doświadczenie to dało początek badaniom, które miały na celu podwyższenie tempa wzrostu zwierząt gospodarczych. Dobre wyniki uzyskano w przypadku transgenicznym świń zawierających gen hormonu wzrostu bydła (68). Świnie transgeniczne nie były większe niż kontrolne, ale czas potrzebny do uzyskania przez nie masy ciała był o 15% krótszy, a wykorzystanie paszy o 18% lepsze. Tusze świń transgenicznych zawierały o 85% mniej tłuszczu niż tusze świń kontrolnych. Nie zmienił się stopień umięśnienia. Jednakże, ze względu na zaburzenia zdrowotne transgeniczne świni nie nadawały się do chowu i hodowli. Również w przypadku pozostałych gatunków zwierząt gospodarskich modyfikacje genetyczne polegające na wprowadzaniu obcych czynników wzrostu powodowały nieplodność zwierząt transgenicznych.

Najkorzystniejsze wyniki udało się uzyskać australijskiej grupie naukowców, która wprowadziła do genomu świń dodatkowe kopie hormonu wzrostu (pGH) połączonego z promotorem genu metalotioneiny (hMt). Uzyskane w ten sposób transgeniczne zwierzęta charakteryzują się znacznie przyspieszonym wzrostem, co wynika z tzw. nadekspresji genu pGH, przejawiającej się wytwarzaniem znacznej ilości hormonu. Poziom ekspresji transgeny może być regulowany ilością cynku dostarczaną wraz z pokarmem. Dodatkowo transgeniczne świni cechuje lepsza przyswajalność pożywienia i lepsza proporcja tkanki tłuszczowej do tkanki mięśniowej. Obecnie trwa proces wprowadzania zwierząt na rynek (69). Nie zaobserwowano negatywnego wpływu transgeny na zdrowie i reprodukcje zwierząt.

Jedyny preparat hormonu wzrostu człowieka stosowany w leczeniu karłowatości uznany przez Światową Organizację Zdrowia uzyskiwany jest z komórkowych kultur *in vitro*. Wykazuje doskonałe właściwości biologiczne, ale jest stosunkowo drogi (70). Hormon wzrostu można także łatwo uzyskiwać ekstrahując go z przysadek mózgowych człowieka. Koszty pozyskania hormonu tym sposobem są niewielkie, ale ograniczeniem jest dostępność materiału. Alternatywą jest możliwość wykorzystania zwierząt transgenicznych jako bioreaktorów, produkujących hormon wzrostu człowieka w mleku.

Konstrukcję zawierającą elementy regulatorowe (6,3 kbp) genu WAP królika połączoną z genem hormonu wzrostu człowieka zastosowano do uzyskania transgenicznych myszy (71). Powstało 13 linii transgenicznych myszy, z których u sześciu udało się uzyskać mleko. U pięciu hormon wzrostu występował w mleku w dużej ilości od 4-22 mg/ml. Hormon wzrostu okazał się biologicznie aktywny. U dwóch linii szczegółowo zbadanych mRNA hGH występowało tylko w gruczołach mlekowych podczas laktacji. U pozostałych siedmiu linii transgenicznych hormon wzrostu był obecny we krwi, co było prawdopodobnym powodem sterylności i braku mleka.

Równie wydajną ekspresję hormonu wzrostu w mleku transgenicznych myszy udało się uzyskać pod kontrolą promotora genu β -kazeiny szczura (72). Zastosowano dwa rodzaje konstrukcji różniących się jedynie sekwencją końca 3'. Transgeniczne myszy produkowały hormon wzrostu dużo wydajniej (19-5500 $\mu\text{g/ml}$) w przypadku konstrukcji zawierającej sekwencje końca 3' pochodzącą od genu hGH niż w przypadku konstrukcji zawierającej sekwencje końca 3' genu β -kazeiny szczura. Koniec 3', jak się okazało, spełniał ważną rolę dla wydajnej ekspresji. Elementy regulatorowe genu β -kazeiny szczura mogą sprawnie pokierować ekspresją genów w gruczołach mlekowych zwierząt.

Transgeniczne króliki wyposażone w konstrukcję składającą się z promotora genu kwaśnego białka serwatki myszy WAP i genu hormonu wzrostu człowieka uzyskali naukowcy kubańscy (73). Przeprowadzono mikroiniekcję 552 jednokomórkowych embrionów, z których 72% przeżyło. Embriony przeniesiono do macicy 31 biorczyń i urodziło się 51 młodych. Obecność transgeny analizowano u 47 królików, z których 11 okazało się transgenicznymi. Spośród nich 6 zmarło, a 5 (3 samice, 2 samce) było analizowanych bardziej szczegółowo. Osiągnięto wydajność 23,4% w odniesieniu do liczby narodzonych królików i 2% w stosunku do liczby embrionów poddanych mikroiniekcji. W następnym pokoleniu obecność transgeny wykazano u dziewięciu z dwudziestu narodzonych królików. W najkorzystniejszym przypadku hormon wzrostu występował w mleku w ilości 50 mg/ml.

9. Perspektywy zastosowania własnych konstrukcji genowych

Bardzo ważna jest możliwość zastąpienia w badaniach diagnostycznych alergenów izolowanych ze źródeł naturalnych preparatami zawierającymi odpowiednio dobrane pod względem składu i zawartości rekombinowane alergeny tzw. „koktajl”, o ściśle zdefiniowanej aktywności (74). Zdolność produkowania nieograniczonych ilości rekombinowanych alergenów pobudziła do rozważań nad możliwością stosowania profilaktycznych szczepionek w terapii alergii. Pomysł opiera się na założeniu, że postnatalna immunizacja zagrożonych alergią osób zapobiegnie rozwojowi odpowiedzi z udziałem IgE. Takie podejście do tego zagadnienia wynika z obserwacji, że noworodki są „immunologicznie naiwne” to znaczy w wyniku ekspozycji na alergen nie reagują wytwarzając IgE, a ich odpowiedź z udziałem limfocytów T jest znacznie ograniczona (75). Immunizacja z użyciem wysokich dawek alergenu (lub alergenu w połączeniu z adiuwantem T_H1) generowałaby prawdopodobnie odpowiedź typu T_H1 (IgG1, bez IgE). Jeśli alergen zostałby podany wraz z innymi szczepionkami w przeciągu 1 do 2 lat po urodzeniu mogłoby to doprowadzić do częściowego lub całkowitego zahamowania rozwoju odpowiedzi z udziałem IgE. Przewiduje się użycie rekombinowanych alergenów w diagnostyce *in vitro*, gdzie szczególne zainteresowanie wzbudza możliwość ich zastosowania w technologii mikropłytek. Jedną ze strategii jest wytwarzanie tzw. hipoalergenów, czyli odpowiednio zmodyfi-

kowanych alergenów, wykazujących obniżoną zdolność wiązania przeciwciał IgE, ale zachowujących epitopy dla limfocytów T. Naturalny kontakt z głównym alergenem kota domowego – Feld1 następuje w wyniku inhalacji nanogramowych lub mikrogramowych ilości tego czynnika, co wywołuje u pacjenta odpowiedź typu T_H2 (udział immunoglobulin IgG1, IgG4, oraz IgE). Podanie bardzo wysokich dawek Feld1 prowadzi u alergików do obniżenia wrażliwości na działanie IgE, u osobników zaś nie wykazujących reakcji alergicznych stwierdzono produkcję IgG1 oraz IgG4, ale brak przeciwciał IgE (76).

W leczeniu karłowatości powszechnie stosuje się hormon wzrostu produkowany w komórkach bakterii. Mimo że jest to produkt w pełni funkcjonalny, różni się od naturalnego. Komórki prokariotyczne nie potrafią wykonać niektórych modyfikacji, szczególnie glikozylacji. Proces ten ma miejsce głównie w aparacie Golgiego komórek eukariotycznych. Wydaje się, że jedynie hodowle komórek zwierzęcych oraz komórki krwi i komórki gruczołu mlekowego transgenicznych zwierząt potrafią wykonać wszystkie skomplikowane modyfikacje potranslacyjne wystarczająco dokładnie, aby powstała funkcjonalna forma białka, która normalnie występuje w organizmie człowieka. Mimo wielu zalet zastosowanie hodowli komórkowych ograniczone jest względnie wysokimi kosztami oraz trudnościami związanymi z utrzymaniem w hodowli dużej liczby komórek. Z tej przyczyny uzyskiwanie rekombinowanych białek tym sposobem nie jest szeroko rozpowszechnione. Hodowle komórek zwierzęcych wykorzystano do uzyskania względnie niewielkich ilości białek. Pozbawione takich ograniczeń zwierzęta transgeniczne, jak się wydaje, są idealnymi bioreaktorami. Obecnie, najlepszym źródłem rekombinowanych białek jest, jak się wydaje, mleko. W przypadku konstrukcji genowych mających ulegać ekspresji w gruczołach mlekowych zwierząt transgenicznych stosuje się sekwencje regulatorowe genów kodujących białka mleka. Ekspresja takich genów występuje tylko w gruczołach mlekowych zwierząt w okresie laktacji i jest ograniczona do komórek gruczołu mlekowego. Obecność obcych białek w mleku nie powinna wówczas wpływać na organizm zwierzęcia. Niekiedy jednak obserwuje się nieprawidłową (ektopową) ekspresję w tkankach innych niż nabłonek gruczołu mlekowego. Aby uniknąć efektów ubocznych konstrukcję genową WAP6xHisHGH zaprojektowano w taki sposób, aby kodowała nieaktywną formę białka. Koniec 5' genu hormonu wzrostu człowieka został modyfikowany przez dodanie sekwencji kodującej 6 reszt histydyny oraz sekwencji rozpoznawanej przez trombinę. W ten sposób hormon może być oczyszczany z mleka na podstawie chromatografii powinowactwa, wykorzystując powinowactwo histydyny do jonów niklu. Dopiero po oczyszczeniu białko hydrolizowane jest za pomocą trombiny do formy aktywnej. U niektórych zwierząt poziom ekspresji transgenu w gruczole mlekowym jest na tyle wysoki, że pozyskiwanie białek z mleka staje się opłacalne na skalę przemysłową.

Literatura

1. Robertson E. J., (1991), *Biol. Reprod.*, 44, 238-245.
2. Anderson G. B., (1999), *Embryonic stem cells in agricultural species*, in: *Transgenic animals in agriculture*, CABI Publ., New York, USA, 57-66.
3. Cibelli J. B., Stice S. L., Golueke P. J., Kane J. J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de Leon F. A., Robl J. M., (1998), *Nat. Biotechnol.*, 16, 642-646.
4. Piedrahita J. A., Moore K., Oetama B., Lee C. K., Scales N., Ramsoundar J., Bazer F. W., Ott T., (1998), *Biol. Reprod.*, 58, 1321-1329.
5. Thomas K. R., Capecchi M. R., (1987), *Cell*, 51, 503-512.
6. van Deursen J., Wieringa B., (1992), *Nucleic Acids Res.*, 20, 3815-3820.
7. Mansour S. L., Thomas K. R., Deng C. X., Capecchi M. R., (1990), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 87, 7688-7692.
8. Mansour S. L., Thomas K. R., Capecchi M. R., (1988), *Nature*, 336, 348-352.
9. Schwartzberg P. L., Goff S. P., Robertson E. J., (1989), *Science*, 246, 799-803.
10. Donehower L. A., Harvey M., Slagle B. L., McArthur M. J., Montgomery C. A., Butel J. S., Bradley A., (1992), *Nature*, 356, 215-221.
11. Mombaerts P., Clarke A. R., Hooper M. L., Tonegawa S., (1991), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 88, 3084-3087.
12. Mountford P., Zevnik B., Duwel A., Nichols J., Li M., Dani C., Robertson M., Chambers I., Smith A., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 4303-4307.
13. Reid L. H., Shesely E. G., Kim H. S., Smithies O., (1991), *Mol. Cell Biol.*, 11, 2769-2777.
14. Valancius V., Smithies O., (1991), *Mol. Cell Biol.*, 11, 1402-1408.
15. Sauer B., (1993), *Methods Enzymol.*, 225, 890-900.
16. Vooijs M., van der Valk M., te Riele H., Berns A., (1998), *Oncogene*, 17, 1-12.
17. Olson E. N., Arnold H. H., Rigby P. W., Wold B. J., (1996), *Cell*, 85, 1-4.
18. Zou Y. R., Muller W., Gu H., Rajewsky K., (1994), *Curr. Biol.*, 4, 1099-1103.
19. Gu H., Zou Y. R., Rajewsky K., (1993), *Cell*, 73, 1155-1164.
20. Baubonis W., Sauer B., (1993), *Nucleic Acids Res.*, 21, 2025-2029.
21. Abuin A., Bradley A., (1996), *Mol. Cell Biol.*, 16, 1851-1856.
22. Rajewsky K., Gu H., Kuhn R., Betz U. A., Muller W., Roes J., Schwenk F., (1996), *J. Clin. Invest.*, 98, 600-603.
23. Gu H., Marth J. D., Orban P. C., Mossmann H., Rajewsky K., (1994), *Science*, 265, 103-106.
24. Wang Y., Krushel L. A., Edelman G. M., (1996), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 93, 3932-3936.
25. Rohlmann A., Gotthardt M., Willnow T. E., Hammer R. E., Herz J., (1996), *Nat. Biotechnol.*, 14, 1562-1565.
26. Shibata H., Toyama K., Shioya H., Ito M., Hirota M., Hasegawa S., Matsumoto H., Takano H., Akiyama T., Toyoshima K., Kanamaru R., Kanegae Y., Saito I., Nakamura Y., Shiba K., Noda T., (1997), *Science*, 278, 120-123.
27. Arnold D., Feng L., Heintz N., (1994), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91, 9970-9974.
28. Potter H., (1988), *Anal. Biochem.*, 174, 361-373.
29. Baum C., (1994), *BioTechniques*, 17, 1059-1062.
30. Graham F. L., van der Eb A. J., (1973), *Virology*, 52, 456-467.
31. Wall R. J., (1996), *Theriogenology*, 45, 57-68.
32. Wall R. J., Hawk H. W., Nel N., (1992), *J. Cell. Biochem.*, 49, 113-120.
33. Murray J. D., (1999), *Theriogenology*, 51, 149-159.
34. Engelhardt J. F., Yang Y., Stratford-Perricaudet L. D., Allen E. D., Kozarsky K., Perricaudet M., Yankaskas J. R., Wilson J. M., (1993), *Nat. Genet.*, 4, 27-34.
35. Gao X., Huang L., (1995), *Gene Therapy*, 2, 710-722.
36. Meade H. M., Echelard Y., Ziomek C. A., Young M. W., Harvey M., Cole E. S., Groet S., Smith T. E., Curling J. M., (1999), *Expression of recombinant proteins in the milk of transgenic animals. Gene expression systems*, Academic Press, San Diego, USA, 399-427.

37. McCurry K. R., Kooyman D. L., Alvarado C. G., Cotterell A. H., Martin M. J., Logan J. S., Platt J. L., (1995), *Nat. Med.*, 1, 423-427.
38. Muller M., Brem G., (1998), *Rev. Sci. Tech.*, 17(1), 365-378.
39. Hammer R. E., Pursel V. G., Rexroad C. E., Wall R. J., Bolt D. J., Ebert K. M., Palmiter R. D., Brinster R. L., (1985), *Nature*, 315, 680-683.
40. Massoud M., Bischoff R., Dalemans W., Pointu H., Attal J., Schultz H., Clesse D., Stinnakre M. G., Pavirani A., Houdebine L. M., (1991), *J. Biotechnol.*, 18, 193-203.
41. Weidle U. H., Lenz H., Brem G., (1991), *Gene*, 98, 185-191.
42. Castro F. O., Limonta J., Gavilondo J., de la Fuente J., (1996), *Theriogenology*, 45, 340.
43. Simons J. P., McClenaghan M., Clark A. J., (1987), *Nature*, 328, 530-532.
44. Petitclerc D., Attal J., Theron M. C., Bearzotti M., Bolifraud P., Kann G., Stinnakre M. G., Pointu H., Puissant C., Houdebine L. M., (1995), *J. Biotechnol.*, 40, 169-178.
45. Brem G., Hartl P., Besenfelder U., Wolf E., Zinovieva N., Pfaller R., (1994), *Gene*, 149, 351-355.
46. Buhler T.A., Bruyere T., Went D.F., Stranzinger G., Burki K., (1990), *Biotechnology*, 8, 140-143.
47. Riego E., Limonta J., Aguilar A., Perez A., de Armas R., Solano R., Ramos B., Castro F. O., de la Fuente J., (1993), *Theriogenology*, 39, 11731-11785.
48. Brem G., Besenfelder U., Zinovieva N., Seregi J., Solti L., Hartl P., (1995), *Theriogenology*, 43, 175.
49. Castro F. O., Aguirre A., Fuentes P., Ramos B., Rodriguez A., de la Fuente J., (1995), *Theriogenology*, 43, 184.
50. Fan J., Wang J., Bensadoun A., Lauer S. J., Dang Q., Mahley R. W., Taylor J. M., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 8724-8728.
51. Duverger N., Emmanuel F., Viglietta C., Attenot F., Viry I., Houdebine L. M., Deneffe P., (1995), *Atherosclerosis*, 115.
52. Fan J., McCormick S. P., Krauss R. M., Taylor S., Quan R., Taylor J. M., Young S. G., (1995), *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 15, 1889-1899.
53. Brousseau M. E., Zech L. A., Berard A., Valsman B. L., Meyn S. M., Powell D., Santamarina-Fojo S., Brewer Jr. H. B., Hoeg J. M., (1995), *Circulation*, 92, 8.
54. Fan J., Ji Z. S., Huang Y., de Silva H., Sanan D., Mahley R. W., Innerarity T. L., Taylor J. M., (1998), *J. Clin. Invest.*, 101, 2151-2164.
55. Shen J., Kuhn H., Petho-Schramm A., Chan L., (1995), *FASEB J.*, 9, 1623-1631.
56. Sharma A., Martin M. J., Okabe J. F., Truglio R. A., Dhanjal N. K., Logan J. S., Kumar R., (1994), *Biotechnology*, 12, 55-59.
57. Velander W. H., Johnson J. L., Page R. L., Russell C. G., Subramanian A., Wilkins T. D., Gwazdauskas F. C., Pittius C., Drohan W. N., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 12003-12007.
58. Petters R. M., (1994), *Reprod. Fertil. Dev.*, 6, 643-645.
59. Ebert K. M., DiTullio P., Barry C. A., Schindler J. E., Ayres S. L., Smith T. E., Pellerin L. J., Meade H. M., Denman J., Roberts B., (1994), *Biotechnology*, 12, 699-702.
60. Damak S., Jay N. P., Barrell G. K., Bullock D. W., (1996b), *Biotechnology*, 14, 181-184.
61. Clark A. J., Bessou H., Bishop J. O., Brown P., Harris S., Lathe R., McClenaghan M., Prowse C., Simons J. P., Whitelaw C. B. A., Wilmut I., (1989), *Biotechnology*, 7, 487-492.
62. Wright G., Carver A., Cottom D., Reeves D., Scott A., Simons P., Wilmut I., Garner I., Colman A., (1991), *Biotechnology*, 9, 830-834.
63. Hyttinen J. M., Peura T., Tolvanen M., Aalto J., Alhonen L., Sinervirta R., Halmekyto M., Myohanen S., Janne J., (1994), *Biotechnology*, 12, 606-608.
64. Eyestone W. H., (1999), *Theriogenology*, 51, 509-517.
65. Krimpenfort P., Rademakers A., Eyestone W., van der Schans A., van den Broek S., Kooiman P., Kotwijck E., Platenburg G., Pieper F., Strijker R., de Boer H., (1991), *Biotechnology*, 9, 844-847.
66. Griffith I. J., Craig S., Pollock J., Yu X. B., Morgenstern J. P., Rogers B. L., (1992), *Gene*, 113, 263-268.
67. Palmiter R. D., Brinster R. L., Hammer R. E., Trumbauer M. E., Rosenfeld M. G., Brinberg N. C., Evans R. M., (1982), *Nature*, 300, 611-615.
68. Pursel V. G., Rexroad C. E., (1993), *Molecular Reproduction and Development*, 36, 251-254.
69. Nottle M. B., Nagashima H., Verma P. J., Du Z. T., Grupen C. G., MacIlfatrick S., Ashman R. J., Harding M. P., Giannakis C., Wigley P. L., Lyons I. G., Harrison D. T., Luxford B. G., Campbell R. G.,

- Crawford R. J., Robins A. J., (1999), *Production and analysis of transgenic pigs containing a metallothionein porcine growth hormone gene construct. Transgenic animals in agriculture*, CABI Publ., New York, USA, 145-156.
70. Phillips J. A., (1995), *Inherited defects in growth hormone synthesis and action. Metabolic and molecular bases of inherited disease*, Eds. Scriver CH. R., Beaudet A. L., Sly W.S., Valle D., Ed. McGraw-Hill, Inc., 97, 3023-3044.
71. Devinoy E., Thepot D., Stinnakre M. G., Fontaine M. L., Grabowski H., Puissant C., Pavirani A., Houdebine L. M., (1994), *Transgenic Res.*, 3, 79-89.
72. Lee C. S., Kim K., Yu D. Y., Lee K. K., (1996), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 56, 211-222.
73. Limonta J. M., Castro F. O., Martinez R., Puentes P., Ramos B., Aguilar A., Lleonart R. L., de la Fuente J., (1995), *J. Biotech.*, 40, 49-58.
74. Thomas W. R., Smith W., (1999), *Clin. Exp. Allergy*, 29, 1583-1587.
75. Platts-Mills T. A. E., Woodfolk J. A., (2000), *J. Allergy Clin. Immunol.*, 106, 441-443.
76. Vaughan W., McGee H., Squillace S. P., Sporik R. B., Platts-Mills T. A. E., (2000), *J. Allergy Clin. Immunol.*, 105, S363.