

# Biotechnologiczne wykorzystanie gruczołu mlecznego — perspektywy manipulacji genetycznych białkami mleka

*Lech Zwierzchowski*  
Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt  
Polska Akademia Nauk  
Jastrzębiec

## 1. Dlaczego gruczoł mleczny?

**M**leko jest podstawowym produktem białkowym spożywanym przez ludzi. Szacuje się, że ponad 30% białka spożywczego pochodzi z mleka. Jako niemowlęta odżywiamy się głównie mlekiem matki, które dla niemowlęcia jest niewątpliwie pokarmem idealnym, niestety nie dla wszystkich dostępnym. Jako dorośli spożywamy głównie mleko i przetwory z mleka krów, a w mniejszym stopniu także owiec i kóz. Mleko przeżuwaczy, chociaż ogólnie dostępne, nie jest idealnym pokarmem dla człowieka. Kazeiny, główne białka mleka, zawierają zbyt mało aminokwasów siarkowych — cysteiny i metioniny,  $\beta$ -laktoglobulina, białko serwatki mleka przeżuwaczy, jest źródłem uczuleń, a zaburzenia w przyswajaniu laktozy są częstą przyczyną występowania poważnych zakłóceń w funkcjonowaniu przewodu pokarmowego. Także tłuszcz mleka, ze względu na dużą zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych, jest niezbyt zdrowym pokarmem dla ludzi.

Większość mleka spożywa się w postaci przetworów — serów, kefirów, jogurtów lub lodów. Skład mleka, wyjściowego surowca dla tych produktów, często decyduje o ich jakości. Małe stężenie białka, wielkość i struktura miceli kazeinowych mogą wpływać na jakość niektórych gatunków serów; laktoza, słabo rozpuszczalna w niskich temperaturach, może obniżać jakość niektórych produktów mleczarskich, np. lodów.

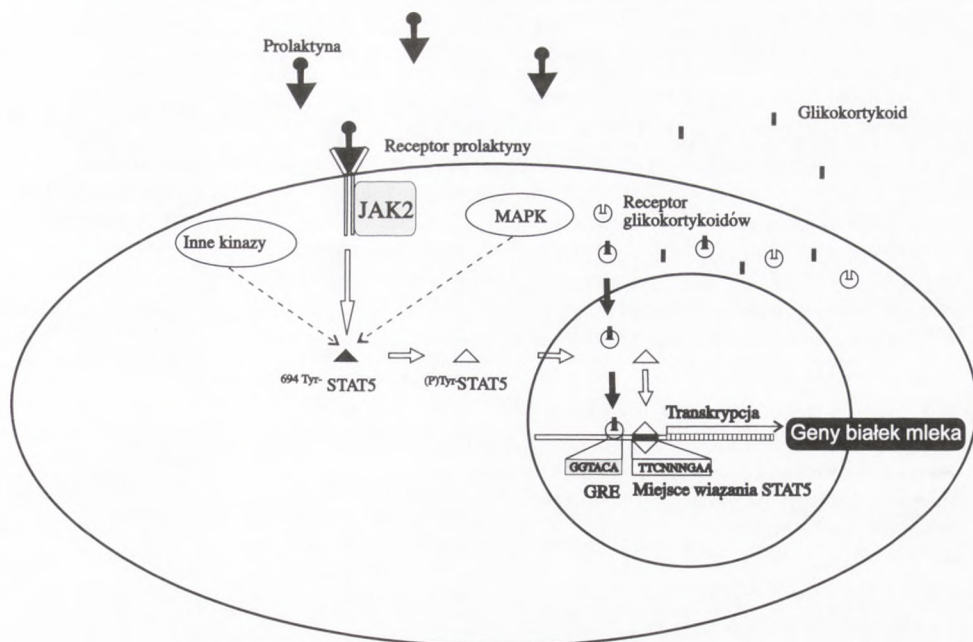
Ze względu na możliwość przeprowadzenia manipulacji genetycznych bez naruszania integralności organizmu zwierzęcia, gruczoł mleczny jest atrakcyjnym celem dla inżynierii genetycznej. Jest on czymś w rodzaju naturalnej fabryki białek, które są syntetyzowane w ogromnych ilościach i wydzielane na zewnątrz, co umożliwia ich odzyskanie bez konieczności zabijania zwie-

rzęcia. Mleko jest najłatwiejszą do pozyskania wydzieliną zwierząt; mleko przeżuwaczy jest rutynowo uzyskiwane za pomocą mechanicznego doju. Także mleko świń, a nawet królików można doić mechanicznie. Nie bez znaczenia jest to, że mleko powstaje „zamknięte” w gruczole mlecznym i w dużym stopniu jest odizolowane od krwioobiegu zwierzęcia. W związku z tym zmiany jego składu (np. obecność aktywnych biologicznie białek wydzielanych z mlekiem) nie powinny wpływać na organizm zwierzęcia. Biorąc to pod uwagę wcześniej zorientowano się, że gruczoł mleczny mógłby być idealnym „bioreaktorem” do produkcji obcych gatunkowo (np. ludzkich) białek. Realizacja tego pomysłu, jak się wydaje, jest już dość bliska. Leki wytworzone tym sposobem są obecnie poddawane testom klinicznym.

## 2. Geny białek mleka

Do tego aby przeprowadzać manipulacje na genach białek mleka trzeba znać ich strukturę i sekwencję, a także mechanizmy regulacji ich ekspresji. Na szczęście taka wiedza jest już dostępna. Sklonowano i zsekwencjonowano geny kazein i białek serwatki kilku gatunków ssaków, w tym wszystkich podstawowych gatunków zwierząt gospodarskich. W grudniu 1997 r. w bazie danych GenBank znajdowało się 409 rekordów zawierających sekwencje cDNA lub genów białek mleka. Znana jest także sekwencja części regulacyjnych tych genów, obejmująca od kilkuset do kilku tysięcy par zasad (pz) końca 5', przed miejscem inicjacji transkrypcji (28 rekordów w GenBank).

Prowadzone są intensywne badania nad mechanizmami regulacji ekspresji genów białek mleka. Na podstawie przeprowadzonej analizy komputerowej określono potencjalne sekwencje regulacyjne typu *cis* oraz przypuszczalne miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych w promotorach genów białek mleka (55). Funkcję niektórych z tych sekwencji potwierdzono doświadczalnie (28,56,100,101 i cytowania zawarte w tych artykułach). Na podstawie uzyskanych wyników z przeprowadzonych badań eksperymentalnych ustalono podstawowy mechanizm regulacji ekspresji genów białek mleka przez prolaktynę i glikokortykoidy (rys. 1). W przekazywaniu sygnału hormonalnego prolaktyny uczestniczy receptor ulokowany w błonie komórkowej, który, po związaniu z ligandem, za pośrednictwem kinazy białkowej Jak2, fosforyluje czynnik transkrypcyjny STAT5. Wykazano, że do aktywacji czynnika STAT5 konieczna jest przede wszystkim fosforylacja tyrozyny w pozycji 694, chociaż fosforylacji podlegają także reszty serynowe i treoninowe. Zaktywowany, ufosforylowany czynnik jest następnie translokowany do jądra komórkowego, gdzie łączy się, przypuszczalnie jako dimer STAT5A/STAT5B, z odpowiednią sekwencją w promotorach genów białek mleka i inicjuje ich transkrypcję (33,49). Glikokortykoidy, które także zwiększają tempo transkrypcji genów białek mleka, działają najprawdopodobniej pośrednio, zmieniając konformację chromatyny w obrębie promotorów, umożliwiając wiązanie takich czynników transkrypcyjnych jak NF1 i STAT5 (75).



Rys. 1. Postulowany mechanizm regulacji ekspresji genów białek mleka przez prolaktynę i glikokortykoidy (opis w tekście).

### 3. Cele biotechnologicznego wykorzystania gruczołu mlecznego

Intensywna praca hodowlana, selekcja i doskonalenie zwierząt, chociaż bardzo efektywne jeśli chodzi o zwiększenie wydajności mlecznej zwierząt, w znacznie mniejszym stopniu pozwalają wpływać na skład mleka. Te ograniczenia, a także postęp jaki dokonał się ostatnio w zakresie biologii molekularnej i embriologii, sprawiły, że obecnie myśli się poważnie o wykorzystaniu inżynierii genetycznej do wprowadzenia istotnych zmian w składzie mleka przeżuwaczy, poprawy jego właściwości odżywczych, a także o wykorzystaniu transgenicznych zwierząt jako producentów obcych gatunkowo, głównie ludzkich, białek o działaniu leczniczym. Spodziewa się, że inżynieria genetyczna pozwoli na osiągnięcie w ciągu jednego pokolenia zmian, których uzyskanie tradycyjnymi metodami zajęłoby kilkaset lat, jeżeli w ogóle byłoby możliwe do osiągnięcia.

Cele biotechnologicznego wykorzystania gruczołu mlecznego zebrano w tabeli 1. Niewątpliwie zamiarem, w znacznym stopniu już realizowanym, jest produkcja ludzkich białek leczniczych za pomocą „żywych bioreaktorów” — transgenicznych zwierząt gospodarskich. Inny kierunek badań, możliwy do realizacji w znacznie dalszej perspektywie, to zastosowanie inżynierii genetycznej do modyfikacji składu mleka tak, aby uzyskać bardziej wartościowy produkt spożywczy, lepiej nadający się do przerobu w przemyśle mleczarskim.

TABELA 1  
CELE BIOTECHNOLOGICZNEGO WYKORZYSTANIA GRUCZOLU MLECZNEGO

Cel	Manipulacja genetyczna	Spodziewany efekt
<p>zwiększenie stabilności mleka w podwyższonych temperaturach</p> <p>poprawa jakości produktów spożywczych wytwarzanych z mleka</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• zwiększenie jędrności strątu kazeinowego i ilości zawartych w nim białek i tłuszczów; poprawa jakości serów</li> <li>• przyspieszenie dojrzewania serów</li> <li>• zwiększenie trwałości zawiesiny koloidowej kazein mleka; lepsza emulgacja</li> <li>• eliminacja kryształków lodu i strąków laktozy; poprawa jakości lodów; zmiana właściwości osmotycznych mleka</li> </ul> <p>poprawa właściwości odżywczych mleka</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• zwiększenie zawartości wapnia i fosforanów</li> <li>• zwiększenie zawartości aminokwasów siarkowych w białkach mleka</li> </ul> <p>humanizacja mleka przeżuwaczy</p> <p>umożliwienie spożywania mleka krowiego przez ludzi z zespołem nietolerancji na laktozę lub uczulonych na <math>\beta</math>-laktoglobulinę</p>	<p>wprowadzenie dodatkowych genów białek mleka</p> <p>ukierunkowana mutageneza genów kazein</p> <p>inaktywacja lub zahamowanie ekspresji genu <math>\alpha</math>-laktoalbuminy</p> <p>wprowadzenie bakteryjnego genu <math>\beta</math>-galaktozydazy z promotorem genu białka mleka</p> <p>inaktywacja genu <math>\beta</math>-laktoglobuliny</p>	<p>nadprodukcja określonych typów kazein lub białek serwatki</p> <p>zmiana struktury I-rzędowej kazein</p> <p>obniżenie zawartości laktozy w mleku</p> <p>produkcja mleka bez <math>\beta</math>-laktoglobuliny</p>
<p>zmniejszenie zapadalności krów na zapalenie wymienia (<i>mastitis</i>); ochrona potomstwa przed zakażeniami przewodu pokarmowego; zwiększenie absorpcji żelaza</p>	<p>wprowadzenie genów lizozymu, lizostatyny, laktoferyny lub immunoglobuliny połączonych z promotorami genów białek mleka</p>	<p>obecność białek o działaniu obronnym lub przeciwbakteryjnym w gruczole mlecznym i w mleku</p>
<p>produkcja zdrowszego, mniej tłustego mleka; obniżenie kosztów produkcji mleka</p>	<p>inaktywacja lub modyfikacja genów związanych z biosyntezą kwasów tłuszczowych</p>	<p>zmniejszenie zawartości tłuszczu w mleku; zwiększenie proporcji kwasów tłuszczowych nienasyconych</p>
<p>wytwarzanie ludzkich białek leczniczych w mleku transgenicznym zwierząt gospodarskich — „żywych bioreaktorów”</p>	<p>wprowadzenie ludzkich genów struktury połączonych z promotorami genów białek mleka</p>	<p>synteza obcych gatunkowo białek w gruczole mlecznym zwierząt transgenicznym</p>

Modyfikacji składu mleka można dokonać poprzez wprowadzenie nowych genów, zahamowanie ekspresji jednego lub kilku genów, „ulepszenie” istniejących genów białek mleka lub modyfikację innych genów kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę takich składników mleka jak tłuszcze lub cukry. Wzbogacenie mleka w nowe białka mogłoby poprawić jego wartość odżywczą, np. zwiększyć stężenie białek bogatych w cysteinę i metioninę.

Manipulacje genetyczne mogą także doprowadzić do poprawy właściwości technologicznych mleka. Wprowadzając do genomu zwierzęcia dodatkowe geny kazein można zwiększyć odporność mleka na podwyższoną temperaturę, skrócić czas koagulacji mleka pod działaniem podpuszczki i zwiększyć jędrność strątu kazeinowego, z którego można by produkować sery o lepszej jakości. Mleko transgenicznych myszy wyposażonych w dodatkowe geny kazeiny  $\kappa$  pochodzące od bydła charakteryzowało się mniejszymi micelami kazeinowymi, wzbogaconymi w kazeinę  $\kappa$ , i po traktowaniu podpuszczką wytwarzało mocniejszy skrzep kazeinowy (29). Rekombinowana kozia kazeina  $\kappa$  wytwarzana w gruczole mlecznym transgenicznych myszy włączała się do miceli kazeinowych mysiego mleka i zmieniała warunki precypitacji kazein przez jony  $\text{Ca}^{2+}$  (66). Gdyby podobne manipulacje genetyczne przeprowadzić na krowach, można by w ten sposób zwiększyć wydajność produkcji serów i poprawić ich jakość.

Planuje się także uzyskanie w gruczole mlecznym ekspresji zmutowanych białek mleka o korzystniejszych z punktu widzenia człowieka właściwościach, np. przez wprowadzenie do genów kazein sekwencji kodujących dodatkowe miejsca fosforylacji (bloki fosfoserynowe) lub dodatkowe miejsca cięcia przez enzymy proteolityczne. Takie kazeiny mogłyby być lepszym surowcem do produkcji serów — szybciej dojrzewających i zawierających więcej łatwo przyswajalnego fosforanu wapnia.

Spożywanie nadmiaru tłuszczów zwierzęcych, w tym także tłuszczu mleka, może być przyczyną arteriosklerozy, dlatego obecnie konsumuje się coraz więcej mleka chudego. Tłuszcz z pełnego mleka spożywczego usuwa się częściowo przez wirowanie. W przyszłości będzie można najprawdopodobniej obniżyć zawartość tłuszczu w mleku przez unieczynnienie któregoś z genów kodujących enzymy szlaku biosyntezy lipidów. Syntezę *de novo* tłuszczów będzie można zahamować blokując ekspresję genu karboksylazy acetylo-koenzymu A (8). Tego typu manipulacje genetyczne pozwoliły już na 70% obniżenie syntezy kwasów tłuszczowych w hodowanych *in vitro* adipocytach. Obniżenie produkcji tłuszczu przez laktujące krowy mogłoby dodatkowo przynieść korzyści ekonomiczne. Synteza tłuszczów jest bardzo kosztowna energetycznie. Szacuje się, że obniżenie stężenia tłuszczu w mleku krowim z 3,8 do 2% zmniejszyłoby o 22% wydatki na paszę potrzebną do wytwarzania mleka (91). Być może w przyszłości będzie można także zmienić skład tłuszczów mleka w kierunku wzrostu proporcji tłuszczów nienasyconych, zdrowszych dla konsumenta, np. przez wprowadzenie aktywnego w gruczole mlecznym genu  $\Delta 9$  desaturazy.

Skierowanie do gruczołu mlecznego syntezy białek o działaniu bakterio-bójczym lub innych białek o działaniu obronnym mogłoby chronić gruczoł

mleczny zwierzęcia przed zakażeniami bakteryjnymi (*mastitis*) lub chronić potomstwo przed zakażeniami przewodu pokarmowego. Ludzki lizozym wydzielany z mlekiem transgenicznych myszy zachowywał swoje właściwości bakteriobójcze, a ponadto mleko z ludzkim lizozymem zawierało mniejsze micelle kazeinowe, szybciej wytwarzało strątki kazeinowy pod wpływem podpuszczki, który był twardszy niż strątki powstały z normalnego mleka (54).

Jedną z modyfikacji składu mleka, mającą potencjalne zastosowanie praktyczne, jest redukcja stężenia laktozy. Zawartość tego dwucukru w mleku można obniżyć, np. przez unieczynnienie (*knock-out*) genu  $\alpha$ -laktoalbuminy lub zahamowanie jego ekspresji. Alfa-laktoalbumina, poza tym, że jest białkiem odżywczym mleka, pełni także w gruczole mlecznym funkcję enzymatyczną będąc komponentą kompleksu syntazy laktozowej, enzymu katalizującego syntezę laktozy z glukozy i UDP-galaktozy. Zmniejszenie syntezy laktozy próbowano także spowodować w inny sposób. U transgenicznych królików ekspresja w gruczole mlecznym bakteryjnego genu *lacZ* połączonego z promotorem genu kazeiny  $\beta$  wiązała się z niewielkim obniżeniem stężenia laktozy w mleku, przypuszczalnie na skutek hydrolizy dwucukru do glukozy i galaktozy przez  $\beta$ -galaktozydazę, produkt genu *lacZ* (37). Na drodze inaktywacji genu lub zahamowania jego ekspresji można by także obniżyć w mleku krowim zawartość innego białka serwatki —  $\beta$ -laktoglobuliny, głównego alergen mleka.

W najbardziej ambitnych projektach zakłada się przeprowadzenie humanizacji mleka krowiego. Wiadomo, że skład ludzkiego mleka znacznie różni się od mleka krowy i innych przeżuwaczy. Zawiera ono znacznie mniej białek (10 g/l) niż mleko krowie (33 g/l), dużo białek serwatki (70%), głównie laktoferyny i lizozymu, lecz znacznie mniej kazeiny; jedynymi kazeinami występującymi w większym stężeniu w mleku kobiety są kazeiny  $\beta$  i  $\kappa$ . Planuje się zatem zastąpienie, przynajmniej częściowe, białek mleka krowy białkami ludzkimi. Pierwszym krokiem w tym kierunku jest wzbogacenie krowiego mleka w ludzką laktoferynę, białko o działaniu bakteriobójczym (46).

W najbliższych latach okaże się czy te wspaniałe perspektywy są możliwe do realizacji. Wzbogacanie mleka o dodatkowe białka jest już obecnie możliwe nie tylko u zwierząt laboratoryjnych, lecz także i u gospodarskich. Przykładem może być synteza ludzkiej laktoferyny w gruczole mlecznym transgenicznych krów (50) lub mysiego kwaśnego białka serwatki (WAP) w gruczole mlecznym owcy (94) i świni (77,93). Unieczynnienie istniejących genów jest znacznie trudniejsze niż dodanie nowego aktywnego genu. Jedną z takich manipulacji, inaktywację genu w drodze homologicznej rekombinacji (*knock-out*), można jak na razie przeprowadzić tylko u myszy, a to ze względu na dostępność mysich pierwotnych komórek zarodkowych — ESC (*embryonic stem cells*). Inna możliwość polega na wprowadzeniu do genomu zwierzęcia DNA kodującego mRNA o sekwencji antysensowej do określonego transkryptu, który mógłby efektywnie zredukować jego translację, lub antysensowego RNA połączonego z rybozymbem — RNA-enzymem katalizującym rozszczepienie docelowego mRNA. Redukcję syntezy  $\alpha$ -laktoalbuminy udało się przeprowadzić u podwójnie transgenicznych myszy, u których ekspresja odpowiedniego

rybozemu połączonego z antysensownym RNA powodowała znaczny spadek ekspresji genu bydłczej  $\alpha$ -laktoalbuminy w gruczole mlecznym, nie wpływając na ekspresję endogennego białka myszy (52).

Większości planowanych manipulacji genetycznych mających na celu modyfikację składu mleka (tab. 1) jeszcze nie przeprowadzono, lub przeprowadzono je tylko na myszach, najlepiej poznanym i najłatwiej dostępnym zwierzęciu doświadczalnym.

#### 4. Metody transgenezy

Najpowszechniej stosowaną techniką wprowadzania nowej informacji genetycznej do genomu zwierząt jest mikroiniekcja DNA do męskiego przedjądrza zygoty. Technikę tę wykorzystywano powszechnie do modyfikacji funkcji gruczołu mlecznego u zwierząt transgenicznych. Inne metody stosowano rzadko, a ich skuteczność nie została jeszcze sprawdzona. Próbowano, np. „wstrzeliwać” przez skórę do gruczołu mlecznego myszy i owcy obce DNA — reporterowy gen CAT połączony z promotorem cytomegalowirusa (HCMV) lub promotorem genu WAP. Do tego celu wykorzystano specjalną strzykawkę (*jet injector*) używaną powszechnie do szczepień (24). Zarówno u myszy, jak i u owcy obserwowano niewielką, przejściową ekspresję wprowadzonych genów. Archer i wsp. (1) zastosowali bezpośrednią infuzję rekombinowanego, defektywnego replikacyjnie retrowirusa jako wektora do uzyskania ekspresji ludzkiego hormonu wzrostu (hGH) w gruczole mlecznym kozy. Ekspresję tego samego genu, połączonego z promotorem i enhancerem cytomegalowirusa, uzyskano w gruczole mlecznym owcy, wstrzeliwując DNA za pomocą „działka genowego” (43). Metody bezpośredniego wprowadzania DNA, chociaż wygodniejsze i tańsze niż mikroiniekcja do przedjądrza zygoty, pozwalają tylko na uzyskanie przejściowej, lokalnej ekspresji obcego genu. Dlatego nadają się one raczej do testowania nowych konstrukcji genowych.

Bardziej subtelne manipulacje genetyczne, takie jak ukierunkowana mutagenesa, inaktywacja genów poprzez *knock-out* lub zastąpienie genów, także były stosowane w celu modyfikacji funkcji gruczołu mlecznego. Jednak tego typu manipulacje można, jak na razie, przeprowadzać tylko na myszach, bowiem tylko dla tego gatunku opracowano metody hodowli totipotentnych pierwotnych komórek zarodkowych ESC — niezbędnych do przeprowadzenia homologicznej rekombinacji.

Próby wprowadzania obcego DNA za pośrednictwem plemników, chociaż bardzo obiecujące, nie zostały dotychczas wystarczająco dopracowane i potwierdzone. Rottmann i wsp. (76) próbowali wprowadzić do zarodków królików, kur i bydła różne konstrukcje genowe, m.in. konstrukcję zbudowaną z promotora genu kazeiny  $\alpha$ S1 bydła i ludzkiej laktoferyny. Obecność ludzkiego genu wykazano stosując technikę PCR w 7-dniowych zarodkach bydła, lecz nie znaleziono go w komórkach krwi cieląt urodzonych z transfekowanych zarodków.

## 5. Mysz jako model doświadczalny

Obok hodowanych *in vitro* komórek, właśnie transgeniczne myszy były często wykorzystywane jako model do badania regulacji ekspresji genów w gruczole mlecznym; pozwala to na zbadanie ekspresji genu u żywego zwierzęcia. Doświadczenia prowadzone nad transgenezą gruczołu mlecznego trwają już 10 lat. Wykazano, że można uzyskać specyficzną ekspresję w gruczole mlecznym obcych gatunkowo genów białek mleka lub konstrukcji genowych wyposażonych w promotory tych genów.

Po raz pierwszy myszy transgeniczne wytwarzające obce gatunkowo białko w gruczole mlecznym uzyskali Simons i wsp. (78). Myszy te wytwarzały owczą  $\beta$ -laktoglobulinę, białko, które nie występuje normalnie w mleku gryzoni (tab. 2). Następnie, w wielu laboratoriach, uzyskano transgeniczne myszy, wyposażone w geny białek mleka innych gatunków ssaków: produkujące w mleku kazeinę  $\beta$  szczura lub kozy,  $\alpha$ -laktoalbuminę świnki morskiej, bydła i kozy lub kazeinę  $\kappa$  bydła (tab. 2). Ekspresja obcych białek w gruczole mlecznym myszy osiągała bardzo różny poziom, od kilku ng/ml dla szczurzej kazeiny  $\beta$  aż do 45 mg/ml w przypadku owczej  $\beta$ -laktoglobuliny.

TABELA 2

MYSZY TRANSGENICZNE WYPOSAŻONE W CAŁE, OBCE GATUNKOWO GENY BIAŁEK MLEKA  
LUB W KONSTRUKCJE GENOWE ZAWIERAJĄCE PROMOTORY GENÓW BIAŁEK MLEKA (WYBRANE DOŚWIADCZENIA)

Wprowadzony gen		Stężenie w mleku białka — produktu genu	Literatura
promotor	gen struktury		
owczej $\beta$ -laktoglobuliny		45 mg/ml	(78)
szczurzej kazeiny $\beta$		bardzo niskie	(51)
koziej kazeiny $\beta$		1-24 mg/ml	(67)
koziej $\alpha$ -laktoalbuminy		3,7 mg/ml	(80)
bydłęcej $\alpha$ -laktoalbuminy		450 $\mu$ g/ml-1,5 mg/ml	(88, 5)
bydłęcej kazeiny $\kappa$		0,94-3,85 mg/ml	(29)
WAP myszy	ludzkiego hormonu wzrostu	0,41-22 mg/ml	(73, 17)
	ludzkiego aktywatora plazminogenu	50 $\mu$ g/ml	(26, 69)
bydłęcej kazeiny $\alpha$ S1	ludzkiej urokinazy	2 mg/ml	(62)
	ludzkiej laktoferyny	36 $\mu$ g/ml	(70)
owczej $\beta$ -laktoglobuliny	ludzkiej $\alpha$ -antytrypsyny	9 mg/ml	(2)
	ludzkiej albuminy surowicy	10 mg/ml	(36)
	ludzkiego fibrynogenu	2 mg/ml	(71)
WAP królika	ludzkiego hormonu wzrostu	10 mg/ml	(83)
MMTV	bydłęcej kazeiny $\alpha$ S1	0,36 mg/ml	(99)



Mysz była też pierwszym transgenicznym zwierzęciem wytwarzającym w gruczole mlecznym ludzkie białko wykorzystywane w medycynie jako lek — tkankowy aktywator plazminogenu (26).

Aby skierować ekspresję obcych gatunkowo białek do gruczołu mlecznego transgenicznych myszy zastosowano różne promotory genów białek mleka (tab. 2). Do tego celu jako jednego z pierwszych wykorzystano promotor owczej  $\beta$ -laktoglobuliny, który okazał się promotorem „silnym” i dość specyficznym; u większości zwierząt transgenicznych ekspresja genów obcych białek połączonych z tym promotorem zachodziła w gruczole mlecznym. W innych doświadczeniach wykorzystano promotory mysiego i króliczego genu WAP, kazeiny  $\beta$  królika, bydlęcej kazeiny  $\alpha$ S1 wirusa MMTV i inne.

Do badania funkcji genów białek mleka zastosowano takie wyszukane techniki biologii molekularnej jak homologiczna rekombinacja, umożliwiająca zastąpienie jednych genów innymi i ukierunkowana mutageniza, pozwalająca na wyłączenie (*knock-out*) wybranych genów. Zastosowanie tych technik pozwoliło na celową i zaplanowaną modyfikację składu mleka myszy (tab. 3).

TABELA 3  
MODYFIKACJA SKŁADU MLEKA MYSZY NA DRODZE INŻYNIERII GENETYCZNEJ

Manipulacja genetyczna	Wpływ na skład mleka	Wpływ na laktację i rozwój potomstwa
<i>knock-out</i> genu $\alpha$ -laktoalbuminy	brak $\alpha$ -laktoalbuminy i laktozy	brak laktacji; lepka ciecz wydzielana zamiast mleka
<i>knock-out</i> genu kazeiny $\beta$	brak kazeiny $\beta$	normalna laktacja; rozwój potomstwa nieznacznie opóźniony
zastąpienie genu $\alpha$ -laktoalbuminy genem ludzkim	obecność ludzkiego białka zamiast mysiego; normalne stężenie laktozy	normalna laktacja; normalny rozwój potomstwa
wprowadzenie zmutowanego genu kazeiny $\beta$ bydła	ekspresja zmutowanych białek w mysim mleku; zwiększona średnica miceli kazeinowych	normalna laktacja; normalny rozwój potomstwa
wprowadzenie genu kodującego rybozym do genomu transgenicznych myszy z genem bydlęcej $\alpha$ -laktoalbuminy	redukcja syntezy bydlęcej $\alpha$ -laktoalbuminy i normalny poziom mysiej $\alpha$ -laktoalbuminy u podwójnie transgenicznych myszy	normalna laktacja; normalny rozwój potomstwa

Techniki homologicznej rekombinacji i komórki ESC wykorzystano m.in. do uzyskania transgenicznych myszy ze zinktywowanym genem kazeiny  $\beta$  (48) lub genem  $\alpha$ -laktoalbuminy (84). Zastąpiono także u myszy własny gen  $\alpha$ -laktoalbuminy jego ludzkim odpowiednikiem (81). Wprowadzając do genomu myszy zmutowane geny bydlęcej kazeiny  $\beta$  połączone z promotorem byd-

łęcej  $\alpha$ -laktoalbuminy uzyskano transgeniczne zwierzęta wydzielające zmutowane białka, które wraz z mysimi kazeinami tworzyły micelle kazeinowe o zwiększonej średnicy (15).

Badania przeprowadzone na myszach, chociaż nie miały bezpośrednio praktycznego znaczenia, pozwoliły na opanowanie technik transgenezy gruczołu mlecznego, a także dzięki nim wykazano, że zastosowując metody inżynierii genetycznej można zmienić skład i jakość mleka.

## 6. Zwierzęta gospodarskie

Biotechnologia gruczołu mlecznego i inżynieria genów białek mleka zwierząt gospodarskich jest znacznie mniej zaawansowana niż u myszy. Uzyskano transgeniczne świnię (77,93) i owcę (94), do genomu których wprowadzono mysiego gen kwaśnego białka serwatki (WAP). Jest to białko występujące w serwatce mleka kilku gatunków ssaków, głównie gryzoni, królika i wielbłąda. Chociaż w mleku świni i owcy białko to normalnie nie występuje, transgeniczne zwierzęta wytwarzały w gruczole mlecznym znaczne ilości mysiego białka. W przeprowadzonych doświadczeniach wykazano, że także mleko zwierząt gospodarskich można wzbogacić w obce gatunkowo białka mleka i w ten sposób zwiększyć jego wartość jako produktu spożywczego. Inne doświadczenia prowadzone na zwierzętach gospodarskich miały na celu wykorzystanie tych zwierząt jako „żywych bioreaktorów” — producentów ludzkich białek leczniczych.

## 7. „Żywe bioreaktory”

Jednym z pierwszych nierolniczych zastosowań transgenicznych zwierząt gospodarskich będzie niewątpliwie produkcja aktywnych biologicznie białek w gruczole mlecznym. Zapotrzebowanie na nie jest bardzo duże, a ich podaż zawsze niewystarczająca. Niektóre z prostszych ludzkich białek, np. insulina czy hormon wzrostu, mogą być wytwarzane w rekombinowanych bakteriach. Jednak nie są one zdolne do przeprowadzenia większości posttranslacyjnych modyfikacji, stąd też bardziej skomplikowane białka, wymagające do swojej aktywności glikozylacji, fosforylacji,  $\gamma$ -karboksylacji, czy aktywacji przez proteolizę, nie mogą być w ten sposób wytwarzane. Wiele z nich obecnie izoluje się z ludzkiej krwi (co wymaga ogromnych ilości krwi pobranej od dawców), albo z hodowanych *in vitro* ludzkich komórek (co z kolei wymaga stosowania bardzo skomplikowanych i kosztownych bioreaktorów komórkowych). Zwierzęta transgeniczne, raz uzyskane mogą same, bez specjalnej interwencji człowieka, produkować duże ilości ludzkich białek, i co więcej, przekazywać tę cechę swojemu potomstwu. W teorii takie podejście pozwala na wytworzenie każdej potrzebnej ilości białek o znaczeniu leczniczym. Komórki gruczołu mlecznego zwierząt transgenicznych, same wyspecjalizowane w produkcji skomplikowanych białek, są także zdolne do przeprowadzania modyfikacji post-

translacyjnych białek kodowanych przez obce geny. W mleku transgenicznych myszy udało się już wytworzyć aktywne biologicznie ludzkie białka o bardzo skomplikowanej strukturze, np. dysmutazę nadtlenkową, metaloproteinę o budowie tetrameru, podlegającej posttranslacyjnej glikozylacji (32). Produkcja białek leczniczych w mleku transgenicznych zwierząt ma także inne zalety. Ograniczy, np. możliwość nieumyślnego rozprzestrzenienia wirusa HIV lub wirusa żółtaczk C, zmniejszy zagrożenie środowiska przez przemysł chemiczny czy farmaceutyczny. Co prawda niektórzy autorzy uważają, że stosowanie w medycynie białek produkowanych przez zwierzęta spowodzi niebezpieczeństwo zarażenia BSE (choroba szalonych krów), ale jak dotąd, nie wykazano obecności prionów w ekstraktach gruczołu mlecznego lub w mleku krów chorych na BSE, a poza tym jako „bioreaktory” będą wykorzystywane tylko zwierzęta wszechstronnie przebadane i oczywiście zdrowe.

W tabeli 4 przedstawiono najważniejsze etapy badań, w rezultacie których doprowadzono do uzyskania transgenicznych zwierząt produkujących białka lecznicze.

TABELA 4  
NAJWAŻNIEJSZE OSIĄGNIĘCIA NA DRODZE DO UZYSKANIA „ŻYWYCH BIOREAKTORÓW”  
— TRANSGENICZNYCH ZWIERZĄT PRODUKUJĄCYCH BIAŁKA O DZIAŁANIU LECZNICZYM

Rok	Osiągnięcie	Literatura
1980	uzyskanie pierwszych transgenicznych myszy	(25)
1982	fuzyjny gen wprowadzony do genomu myszy	(9)
1987	uzyskanie transgenicznych myszy wytwarzających w gruczole mlecznym obce gatunkowo białko (owczą $\beta$ -laktoglobulinę)	(78)
1987	uzyskanie transgenicznych myszy wytwarzających w gruczole mlecznym ludzkie białko o działaniu leczniczym (aktywatora plazminogenu)	(26)
1988	uzyskanie transgenicznych zwierząt gospodarskich (owiec) wytwarzających w gruczole mlecznym ludzkie białka o działaniu leczniczym ( $\alpha$ -antytrypsyny i IX czynnika krzepliwości krwi)	(79)
1994	uzyskanie transgenicznego bydła — buhaja z genem laktoferyny człowieka; wytwarzanie ludzkiej laktoferyny w gruczole mlecznym krów	(46, 50)

Pierwszymi, którzy wykazali, że ludzkie białko lecznicze może być produkowane w gruczole mlecznym transgenicznego zwierzęcia byli Gordon i wsp. (26), którzy uzyskali transgeniczne myszy wytwarzające w gruczole mlecznym i wydzielające z mlekiem ludzki aktywator plazminogenu (tPA). W ciągu 10 lat jakie upłynęły od ich publikacji, nie tylko uzyskano wiele zwierząt transgenicznych produkujących w mleku ludzkie białka, ale powstał cały nowy przemysł farmaceutyczny oparty na wykorzystaniu transgenicznych zwierząt jako „bioreaktorów”. Tylko w Stanach Zjednoczonych istnieje co najmniej

tuzin takich przedsiębiorstw, z budżetem ocenianym na 3 mld USD rocznie (91). Wyniki badań prowadzonych w laboratoriach tych przedsiębiorstw rzadko są publikowane, stąd dane na ten temat nie są pełne. Wiadomo jednak, że uzyskano już wiele transgenicznych zwierząt gospodarskich — producentów ludzkich białek. Jako pierwsze uzyskano transgeniczne owce w Roslyn k. Edynburga wytwarzające w mleku, pod kierunkiem promotora owczej  $\beta$ -laktoglobuliny, IX czynnik krzepnięcia krwi człowieka lub ludzką  $\alpha$ 1-antytrypsynę (79). Początkowo stężenie ludzkich białek w mleku owiec było stosunkowo niskie (rzędu kilku ng/ml). Jednak z ostatnich doniesień z tego samego laboratorium wynika, że udało się uzyskać transgeniczne owce wytwarzające średnio 35 g, a maksymalnie aż 60 g ludzkiej  $\alpha$ -antytrypsyny na litr mleka (98). Rekombinacyjne białko było w pełni aktywne biologicznie, jego glikozylacja nie różniła się od glikozylacji natywnego białka ludzkiej krwi (13). W innych laboratoriach uzyskano: owce produkujące VIII czynnik krzepliwości krwi; kozy produkujące ludzki hormon wzrostu, tkankowy aktywator plazminogenu (tPA) lub antytrombinę; krowy wytwarzające laktoferynę lub erytropoetynę; świny wytwarzające białko C lub VIII czynnik krzepliwości krwi oraz króliki wytwarzające interleukinę-2, ludzki tPA lub IGF-I (tab. 5). Wysokie stężenie ludzkich białek w mleku niektórych z tych transgenicznych zwierząt rokuje nadzieje na rychłe praktyczne wykorzystanie transgenezy do produkcji ludzkich farmaceutyków.

TABELA 5  
PRODUKCJA LUDZKICH BIAŁEK W MLEKU TRANSGENICZNYCH ZWIERZĄT GOSPODARSKICH

Gatunek	Konstrukcja genowa		Ekspresja w mleku	Literatura, firma
	promotor	gen struktury		
1	2	3	4	5
owca	owczej $\beta$ -laktoglobuliny	$\alpha$ 1-antytrypsyny	niska 5 mg/l 1,5-33 g/l	(79) (14) (98)
	owczej $\beta$ -laktoglobuliny	czynnika IX	0,25 mg/l	(79)
	owczej $\beta$ -laktoglobuliny mysiego WAP	czynnika VIII	b.d.	(31)
koza	MoMLV	GH	12-60 $\mu$ g/l	(1)
	?	antytrombiny	b.d.	Genzyme Transgenics (USA)
	mysiego WAP	tkankowego aktywatora plazminogenu	3 mg-3 g/l	(21, 22)
	koziej kazeiny $\beta$	tkankowego aktywatora plazminogenu	1,5-4,5 g/l	(18)
świnia	mysiego WAP	białka C	1 g/l	(20, 86)
		czynnika VIII	2,7 mg/l	(65)

1	2	3	4	5
królik	króliczej kazeiny $\beta$	interleukiny-2	0,43 mg/l	(11)
	bydlęcej kazeiny $\alpha$ S1	IGF-I	1g/l	(7)
	mysiego WAP	GH	50 mg/l	(53)
	bydlęcej kazeiny $\alpha$ S1	$\alpha$ -glukozydazy	b.d.	Gene Pharming Europe (Holandia)
	owczej $\beta$ -laktoglobuliny	erytropoetyny	0,5 g/l	(44)
krowa	bydlęcej kazeiny $\alpha$ S1	erytropoetyny	b.d.	(38)
	bydlęcej kazeiny $\alpha$ S1	laktoferyny	g/l	(46, 50)

## 8. Jakie zwierzęta?

Planuje się wykorzystać jako „żywe bioreaktory” różne gatunki ssaków, ale przede wszystkim te uważane za typowe zwierzęta mleczne — krowy, kozy i owce. Jednak brane są pod uwagę także inne, np. świnię i króliki. Oczywiście mleczna krowa byłaby najlepszym „bioreaktorem”. Szacuje się, że krowa wyposażona w ludzki gen połączony z promotorem genu kazeiny  $\alpha$ S1 byłaby zdolna wyprodukować rocznie 60-80 kg ludzkiego białka (oczywiście pod warunkiem, że ekspresja tego białka dorównywałaby ekspresji kazeiny krowiej). Taka transgeniczna krowa mogłaby zaspokoić całe światowe zapotrzebowanie na białko stosowane w niewielkich ilościach do leczenia jakiejś rzadko występującej choroby. Trzeba jednak wziąć pod uwagę, że uzyskanie transgenicznej krowy jest bardzo kosztowne, a jeśli w początkowym etapie uzyskamy transgenicznego buhaja, jak to miało miejsce w przypadku buhaja Hermana z genem ludzkiej laktoferyny (46), to na uzyskanie jego laktujących córek trzeba będzie czekać kilka lat (50).

Wydaje się, że optymalnymi „bioreaktorami” mogłyby być transgeniczne kozy lub owce. Zwierzęta te można łatwiej hodować, szybciej rozmnażać, a ich utrzymanie jest znacznie tańsze niż utrzymanie krów; produkują one dość duże, w stosunku do swoich rozmiarów, ilości mleka. Niektórzy autorzy (87) uważają, że świnia ma wiele zalet zarówno jako model doświadczalny jak i jako przyszły producent ludzkich farmaceutyków. Krótka ciąża, krótki odstęp międzypokoleniowy i liczne mioty powodują, że wytworzenie transgenicznych świń zajmuje mniej czasu niż genetyczna modyfikacja innych gatunków zwierząt gospodarskich. Chociaż świnia nie jest zwierzęciem typowo mlecznym to od laktującej maciory można uzyskać około 300 litrów mleka rocznie.

Planuje się także wykorzystanie jako żywych „bioreaktorów” znacznie mniejszych zwierząt transgenicznych, np. królików (35,53). Tylko na pierwszy rzut oka wydaje się to nielogiczne. Stężenie białka w mleku królika jest trzy razy większe niż w mleku krowy; poza tym, transgeniczne króliki jest łatwiej otrzymać i następnie rozmnożyć niż transgeniczne krowy. Króliki można doić mechanicznie i podobno uzyskać nawet do 100 ml mleka dziennie od jednego zwierzęcia.

Oblicza się, że przy wydajności ekspresji ludzkiego białka rzędu 1 g/l mleka, do produkcji 4 kg czynnika krzepliwości IX (tak szacuje się zapotrzebowanie w USA na to białko lecznicze) trzeba będzie wykorzystać 1 transgeniczną krowę, 13 owiec, 7 kóz, 10 świń lub 714 transgenicznych królików (91). Do wytworzenia 21 kg antytrombiny III trzeba by użyć już 3 transgenicznych krów lub aż 3750 transgenicznych królików. Rachunek ekonomiczny zdecyduje, które transgeniczne zwierzęta zostaną wykorzystane jako bioreaktory. Wydaje się jednak, że w wielu przypadkach taniej i szybciej będzie użyć do tego celu królików.

## 9. Nie tylko sukcesy

Pomimo niewątpliwych sukcesów biotechnologiczne wykorzystanie gruczołu mlecznego wciąż jeszcze napotyka na liczne trudności (tab. 6). Jedną z najważniejszych jest nadal bardzo niska wydajność transgenezy, szczególnie w odniesieniu do zwierząt gospodarskich. W danych zebranych z wielu publikacji wynika, że jedną transgeniczną mysz uzyskuje się przeciętnie z 40 zarodków nastrzykniętych DNA; u owiec i kóz wskaźnik ten wynosi około 1 na 100, a u bydła zaledwie 1 na 1600 nastrzykniętych zarodków (89). Co więcej, tylko około 50% transgenicznych zwierząt wykazuje ekspresję wprowadzonych genów.

TABELA 6

TRUDNOŚCI NA JAKIE NAPOTYKA SIĘ W BADANIACH NAD TRANSGENEZĄ GRUCZOŁU MLECZNEGO

- wysokie koszty uzyskania transgenicznego zwierzęcia gospodarskiego, szczególnie krowy — mała wydajność transgenezy, długi odstęp międzypokoleniowy, mała płodność, wysokie koszty utrzymania
- brak ekspresji lub mała ekspresja wprowadzonego genu — małe stężenie produkowanego białka w mleku
- nieprawidłowa (ektopowa) ekspresja genu w tkankach innych niż epitelium gruczołu mlecznego
- niekorzystny wpływ ekspresji aktywnego białka — hormonu wzrostu, IGF-I, TGF- $\beta$ , WAP — na rozwój gruczołu mlecznego lub na laktację, np. skrócona laktacja u świń i owiec z genem WAP i tPA lub brak involucji gruczołu mlecznego u myszy z genem IGF-I
- niepełna modyfikacja posttranslacyjna produkowanego białka, np. białka C u transgenicznych świń, z powodu niedoboru furyny (proteazy serynowej) w komórkach gruczołu mlecznego
- niemożność przeprowadzenia bardziej skomplikowanych manipulacji genetycznych (homologiczna rekombinacja) na genach białek mleka zwierząt gospodarskich ze względu na brak linii komórek ESC
- możliwość niezaakceptowania leków białkowych produkowanych przez transgeniczne zwierzęta przez odpowiednie komisje (np. FDA) lub przez społeczeństwo (pierwszym takim lekiem poddawanym obecnie testom klinicznym jest antytrombina-III, produkcji Genzyme Transgenics Co, USA).

Przy obecnie stosowanych technikach koszt uzyskania transgenicznego zwierzęcia gospodarskiego jest bardzo wysoki. Według oceny Ministerstwa Rolnictwa w USA uzyskanie jednej transgenicznej krowy z funkcjonującym transgenem wynosi 300-500 tys. USD (90). Tylko niewiele instytucji naukowych, czy firm biotechnologicznych, może pozwolić sobie na prowadzenie takich badań, szczególnie, że ich efekt końcowy, zarówno naukowy jak i komercyjny, jest bardzo niepewny. Poza tym, ocenia się, że na uzyskanie stada laktujących transgenicznych krów (a takie właśnie będą potrzebne do produkcji ludzkich białek leczniczych) trzeba co najmniej 7-8 lat. Nawet przy szybkim postępie w technikach wytwarzania transgenicznych zwierząt, na pojawienie się znaczących ilości leków produkowanych przez transgeniczne zwierzęta trzeba będzie zatem jeszcze poczekać.

Poważnym problemem, na jaki natrafia się prowadząc badania nad biotechnologicznym wykorzystaniem gruczołu mlecznego, jest niska ekspresja lub brak ekspresji wprowadzonych genów. W rzeczywistości tylko w jednym na kilka doświadczeń uzyskuje się ekspresję białka na poziomie wyższym niż 1 g/l mleka (tab. 2 i 5). Wyników nieudanych doświadczeń, w których nie uzyskano ekspresji transgenów, w zasadzie się nie publikuje, ale jest ich przypuszczalnie wiele. Nie wiadomo dlaczego u jednych zwierząt transgenicznych gen podlega ekspresji, a u innych nie. Ekspresja zależy od miejsca integracji genu (tzw. efekt pozycji). Gen może się włączyć do transkrypcyjnie nieaktywnej chromatyny). Możliwe są także inne mechanizmy inaktywacji włączonych genów, np. przez ich metylację. W naszych doświadczeniach wykazaliśmy, że metylacja genu *lacZ* połączonego z promotorem genu kazeiny  $\beta$ , powoduje brak jego ekspresji u transgenicznych królików (72). Przyczyną braku ekspresji może być także niewłaściwa konstrukcja genu, np. ze zbyt krótkim promotorem pozbawionym sekwencji aktywujących ekspresję (enhancerów), lub przeciwnie, konstrukcja zbyt długa, zawierająca sekwencje hamujące ekspresję (silencery). Wiadomo też, że konstrukcje zawierające cDNA rzadziej podlegają wydajnej ekspresji niż te posiadające pełne geny, z eksonami i intronami.

Chociaż konstrukcje genowe zawierające promotory genów białek mleka są zazwyczaj specyficzne, jeśli chodzi o ekspresję w gruczole mlecznym, niekiedy obserwuje się nieprawidłową, tzw. ektopową ekspresję w innych tkankach i narządach. Ekspresję obcych genów wykrywano w śliniankach, mózgu i w innych narządach transgenicznych myszy (3,30,95) i owiec (64,74,94). Obecność ludzkiej  $\alpha 1$ -antytrypsyny wykrywano w surowicy transgenicznych owiec (samice i samców), które wytwarzały to białko pod kierunkiem promotora owczej  $\beta$ -laktoglobuliny (13,92). Podczas laktacji u transgenicznych owiec stężenie  $\alpha 1$ -antytrypsyny w surowicy osiągało wartość aż 4 g/l, ponad 10% stężenia tego białka w mleku. Nie wiadomo czy obecność  $\alpha 1$ -antytrypsyny w surowicy była spowodowana ektopową ekspresją transgenów czy „wyciekaniem” białka z gruczołu mlecznego do krwiobiegu. Obecność  $\alpha 1$ -antytrypsyny we krwi nie wpływała na zdrowie zwierzęcia; transgeniczne owce były całkowicie zdrowe i normalne. Jednak inne, aktywne biologicznie białka, takie jak GH, TGF- $\beta$  IGF-I mogą oddziaływać niekorzystnie zarówno na gru-

czoł mleczny jak i na całe zwierzę. Produkt wprowadzonego genu może wpływać niekorzystnie na przebieg laktacji i syntezę własnych białek mleka, jak to miało miejsce u transgenicznych kóz, u których zaobserwowano zatrzymanie laktacji pod wpływem wytwarzanego w gruczole mlecznym ludzkiego aktywatora plazminogenu (18,22). Ekspresja ludzkiej erytropoetyny w gruczole mlecznym królików (57) i myszy (85) prowadziła do nadmiernego wytwarzania komórek krwi (polycytēmii) u transgenicznych zwierząt — zarówno samców jak i u samic, zaburzeń w reprodukcji i braku laktacji. Nawet nadekspresja homologicznego, mysiego białka WAP u transgenicznych myszy może prowadzić do nieprawidłowego rozwoju gruczołu mlecznego i braku laktacji (10). Obserwowano także „wyciekanie” aktywnych biologicznie białek do krwiobiegu. Nawet u normalnych krów niektóre białka uważane za typowe białka mleka, np.  $\alpha$ -laktoalbumina, odnajdywane są we krwi, szczególnie podczas laktacji (60). Także u królików białka serwatki —  $\alpha$ -laktoalbumina i WAP są spontanicznie przenoszone podczas laktacji z mleka do krwi (27). Nic zatem dziwnego, że także produkty wprowadzonych genów u zwierząt transgenicznych wykrywa się niekiedy we krwi. Stężenie we krwi transgenicznych myszy ludzkiego hormonu wzrostu, produktu genu GH połączonego z promotorem genu WAP, może być dość wysokie, co prowadzi do gigantyzmu i zaburzeń w rozrodzie (17).

Ekspresja wprowadzonego genu w gruczole mlecznym transgenicznych zwierząt może odbywać się kosztem syntezy endogennych białek mleka. Stwierdzono, że wysokie stężenie owczej  $\beta$ -laktoglobuliny w gruczole mlecznym transgenicznych myszy wiązało się ze znacznym obniżeniem stężenia własnych białek mleka — kazeiny  $\beta$  i WAP (59).

Nie zawsze obce gatunkowo białko wytwarzane w gruczole mlecznym transgenicznego zwierzęcia podlega prawidłowej modyfikacji posttranslacyjnej. U transgenicznych świń tylko około 1/3 ludzkiego białka C była aktywna biologicznie, przypuszczalnie na skutek braku furyny, enzymu aktywującego prekursor białka C na drodze proteolizy (87). Także glikozylacja białka C wytwarzanego w gruczole mlecznym transgenicznych myszy (20) i transgenicznych świń (63) różniła się od glikozylacji natywnego białka wyizolowanego z ludzkiej surowicy.

Nie wiadomo jeszcze jakie skutki będą miały drastyczne zmiany w składzie mleka zwierząt gospodarskich. W badaniach przeprowadzonych na myszach wskazuje się na to, że można spodziewać się niepożądanych, ubocznych efektów takich manipulacji. Inaktywacja genu  $\alpha$ -laktoalbuminy spowodowała u homozygotycznych, transgenicznych myszy całkowity brak laktozy w mleku (84). Ponieważ, poza znaną funkcją odżywczą dla potomstwa ssaków, laktoza reguluje ciśnienie osmotyczne mleka, homozygotyczne myszy transgeniczne z nieaktywnym genem  $\alpha$ -laktoalbuminy nie były zdolne do odchowania potomstwa, gdyż zamiast mleka wytwarzały lepka ciecisz, bogatą w białka i tłuszcze, lecz pozbawioną  $\alpha$ -laktoalbuminy i laktozy (tab. 3). Możliwe, że podobne trudności napotka się przy próbach modyfikacji składu mleka krów, kóz czy owiec.



## 9. Jak przezwyciężyć trudności?

Pomimo 15 lat badań nad transgenezą, których wynikiem są już tysiące transgeniczných myszy, postęp w wytwarzaniu transgeniczných zwierząt gospodarskich nie jest bynajmniej oszałamiający. Wspomniano, że jednym z najpoważniejszych problemów jest brak ekspresji wprowadzonych genów. Aby uniknąć niepotrzebnych kosztów i straty czasu, nowe konstrukcje genowe, przed ich zastosowaniem u dużych zwierząt, często testuje się na transgeniczných myszach. Okazuje się jednak, że ekspresja genu u zwierząt laboratoryjnych nie zawsze koreluje z późniejszą ekspresją u zwierzęcia gospodarskiego (93). Można także zbadać ekspresję nowej konstrukcji genowej w hodowli komórkowej. W ten sposób wykorzystano rosnące *in vitro* komórki gruczołu mlecznego kozy do przetestowania wpływu różnych wektorów retrowirusowych na ekspresję genu GH człowieka (1). Hodowle komórkowe mogą być także wykorzystywane do zbadania wpływu na ekspresję genów różnych kombinacji eksonów, intronów sekwencji flankujących 5' i 3' i innych sekwencji regulacyjnych (68). Jednak ograniczeniem dla tego typu procedur jest fakt, że ekspresję genów białek mleka i ich konstrukcji można badać tylko w hodowlach komórek nabłonka wydzielniczego gruczołu mlecznego. Jak na razie istnieje bardzo niewiele linii komórkowych pochodzących z gruczołów mlecznych przeżuwaczy (58), a te które są obecnie dostępne nie bardzo nadają się do badań nad transfekcją genów.

Inna możliwość testowania konstrukcji genowych polega na wstrzykiwaniu lub wstrzeliwaniu DNA za pomocą „armatki genowej” bezpośrednio do gruczołu mlecznego. Po raz pierwszy uzyskano w ten sposób myszy wykazujące w gruczole mlecznym ekspresję genu reporterowego CAT połączonego z promotorem WAP (24). Podobne techniki wykorzystano do zbadania ekspresji ludzkiego genu GH, połączonego z promotorem i enhancerem cytomegalowirusa (42) lub z promotorem genu owczej  $\beta$ -laktoglobuliny (43), w gruczole mlecznym laktującej owcy. Obecność mRNA GH i samego hormonu wykrywano w dwa dni po wprowadzeniu DNA.

Trwają próby zwiększenia prawdopodobieństwa uzyskania transgeniczných zwierząt przez wczesne monitorowanie integracji i ekspresji wprowadzanych genów. Okazuje się, że ekspresję niektórych genów można wykazać u nowo narodzonych zwierząt w próbkach zawiązków gruczołu mlecznego, pobranych metodą biopsji (34). Obecność wprowadzonego genu można stwierdzić jeszcze w zarodkach, przed ich przeniesieniem do zastępczych matek (16,40,47). Jednak wykorzystywana w tym celu metoda PCR nie daje możliwości odróżnienia DNA zintegrowanego od niezintegrowanych kopii genu jakie mogą przetrwać w zarodkach podczas kilku pierwszych podziałów. Jedną z podstawowych trudności na jaką napotyka się przy uzyskiwaniu transgeniczných zwierząt gospodarskich jest niewielka liczba zarodków dostępnych do manipulacji, szczególnie w przypadku zwierząt „jednorodnych”, np. bydła. Można tę trudność ominąć wykorzystując zapłodnione *in vitro* oocyty otrzymane z rzeźni. W ten sposób uzyskano transgeniczne krowy

wytwarzające w mleku ludzką erytropoetynę pod kierunkiem promotora kazeiny  $\alpha$ S1 (38,39) i buhaja z genem ludzkiej laktoferyny (46). Takie zarodki, przed przeniesieniem ich do zastępczych matek, można dodatkowo „seksować” pobierając jeden lub dwa blastomery i oznaczyć ich płeć metodą PCR (39). Zwiększy to znacznie prawdopodobieństwo uzyskania transgenicznych samic. Jest to niezmiernie ważne, gdy chce się otrzymać zwierzęta produkujące białka w gruczole mlecznym.

Wydaje się jednak, że kluczem do uzyskania szybkiego postępu w transgenezie gruczołu mlecznego jest opracowanie nowych, lepszych konstrukcji genowych zapewniających specyficzną tkankowo i regulowaną przez hormony ekspresję wprowadzonych genów. Wykazano np., że konstrukcje zawierające pełne geny (z intronami i eksonami) częściej podlegają ekspresji niż odpowiadające im cDNA, które teoretycznie zawiera całą informację genetyczną (14). Dlatego w transgenezie, w miarę możliwości, wykorzystuje się całe geny, lub jeżeli są to geny bardzo duże, trudne do klonowania, tworzy się konstrukcje zbudowane częściowo z DNA genomowego, częściowo z cDNA, pozostawiając, np. 1 lub 2 introny. Stwierdzono, że introny nie muszą pochodzić z danego genu aby zwiększać jego ekspresję; można uzyskać podobny efekt wprowadzając do konstrukcji genowej introny pochodzące z innego genu (68).

Znaczną poprawę efektywności ekspresji wprowadzonych genów będzie można przypuszczalnie uzyskać wykorzystując geny lub konstrukcje genowe sklonowane w komórkach drożdży za pomocą YACs (sztucznych chromosomach drożdży). Wektory te pozwalają na klonowanie i przenoszenie bardzo dużych odcinków DNA, nawet o długości rzędu mega pz. Takie duże konstrukcje będą zawierały wszystkie sekwencje niezbędne dla prawidłowej, niezależnej od pozycji, ekspresji genu, włączając w to odległe sekwencje regulacyjne typu MAR (*matrix-attachment regions*) i LCR (*locus control regions*). Wydajną, niezależną od miejsca integracji ekspresję ludzkiego genu  $\alpha$ -laktoalbuminy uzyskano u transgenicznych szczurów, do których genomu wprowadzono fragment ludzkiego DNA o długości 210 kilo pz sklonowanego za pomocą YAC (23).

Ekspresję mało aktywnego genu u zwierząt transgenicznych można zwiększyć przez tzw. kointegrację, czyli wprowadzenie do komórek zwierząt transgenicznych innego genu, o wysokiej, sprawdzonej ekspresji. W ten sposób „uratowano” (*rescue*) ekspresję dwóch różnych ludzkich białek —  $\alpha$ -antytrypsyny i IX czynnika krzepnięcia krwi u linii transgenicznych myszy, do których wprowadzono dodatkowo gen owczej  $\beta$ -laktoglobuliny, gen którego ekspresja była bardzo wysoka (14).

Aby zapobiec brakowi ekspresji spowodowanemu integracją genu do nieaktywnej chromatyny można, jak wykazali McKnight i wsp. (61) dołączyć do konstrukcji genowej sekwencje warunkujące wiązanie DNA z matriks jądrową (MARs). W ten sposób uzyskano, np. ekspresję genu WAP u wszystkich linii transgenicznych myszy (bez MAR tylko u około połowy linii myszy). Dodanie sekwencji MAR do konstrukcji genowych oBLG-hFVIII nie wpłynęło na ekspresję genu ludzkiego czynnika krzepliwości krwi u transgenicznych owiec

(64), a u transgenicznych myszy, dodanie sekwencji MAR wręcz hamowało ekspresję genu ludzkiej albuminy krwi pod kierunkiem promotora owczej  $\beta$ -laktoglobuliny (4).

Efektów ubocznych, związanych z ektopową ekspresją wprowadzonych genów lub z „wyciekaniem” białek do krwiobiegu będzie można uniknąć tak projektując konstrukcje genowe aby ich ekspresja następowała wyłącznie w gruczole mlecznym lub tak aby kodowały one białka nieaktywne, których aktywacja następowałaby dopiero w miejscu ich działania.

Teoretycznie obcy gen zintegrowany w genomie transgenicznego zwierzęcia powinien się dziedziczyć zgodnie z prawami Mendla, tak jak inne geny (6). Nie ma jeszcze żadnych danych pozwalających przewidzieć jak takie geny będą się zachowywały w większych populacjach zwierząt gospodarskich, i czy z jednego transgenicznego zwierzęcia będzie można w rozsądnym czasie uzyskać stado (lub przynajmniej stadko) transgenicznego potomstwa. W badaniach przeprowadzonych przez nas na zwierzętach modelowych — transgenicznych myszach wyposażonych w gen *lacZ* wykazano, że chociaż u poszczególnych zwierząt gen dziedziczy się zgodnie z przewidywaniem, to większa populacja myszy wykazuje tendencję do odrzucania obcej informacji genetycznej w kolejnych pokoleniach (45). U dużych zwierząt gospodarskich charakteryzujących się dużym odstępem międzypokoleniowym szybkie uzyskanie transgenicznego potomstwa jest niemożliwe. Pewną nadzieję na przyspieszenie postępu w tej dziedzinie daje możliwość klonowania transgenicznych zwierząt. Pierwsza transgeniczna owca Polly wyposażona w ludzki gen została już uzyskana w laboratorium I. Wilmuta w Roslyn k. Edynburga, drogą klonowana z jąder komórkowych transfekowanych *in vitro* płodowych fibroblastów.

Niespodziewanie dość poważnym problemem rzutującym na efektywność produkcji ludzkich białek przez zwierzęta transgeniczne może się okazać brak modyfikacji lub nieprawidłowa modyfikacja posttranslacyjna wytwarzanych białek. Przypuszczalnie tym trudnościom można by zapobiec wyposażając dodatkowo transgeniczne zwierzęta w geny kodujące enzymy biorące udział w modyfikacji wytwarzanych białek leczniczych. Uzyskano już podwójnie transgeniczne myszy wytwarzające w gruczole mlecznym ludzkie białko C i furynę — proteazę serynową modyfikującą przez proteolizę nowo syntetyzowane białka (19). Ilość wytwarzanego aktywnego biologicznie białka C znacznie wzrosła u tych myszy w porównaniu z myszami wyposażonymi tylko w gen białka C. Jednak w przypadku zwierząt gospodarskich koszty takiego „poprawiania natury” mogą się okazać bardzo wysokie, stawiając opłacalność takich manipulacji pod znakiem zapytania.

## 10. Perspektywy

Niewątpliwie najbliższym zastosowaniem biotechnologicznego wykorzystania gruczołu mlecznego będzie produkcja farmaceutyków — ludzkich białek — przez zwierzęta transgeniczne. W dotychczasowych pracach wykazano, że

praktycznie każde białko będzie można wytworzyć w gruczole mlecznym transgenicznego zwierzęcia. Obecnie, ciężar badań zostanie przeniesiony na obniżenie kosztów uzyskiwania transgenicznych zwierząt, zapewnienie prawidłowej posttranslacyjnej modyfikacji produkowanych białek, opracowanie ekonomicznych metod ich izolacji z mleka i na bezpieczeństwo ich stosowania w medycynie.

Czy transgeniczne zwierzęta będą powszechnie hodowane w naszych fermach? Transgeniczne zwierzę, szczególnie krowa, będzie niewątpliwie bardzo drogie, lecz jego utrzymanie nie będzie ani bardziej kłopotliwe ani bardziej kosztowne niż utrzymanie typowej mlecznej krowy, kozy czy owcy. Takie zwierzę będzie samo pobierało pokarm i rozmnażało się w sposób naturalny. Dlatego hodowla takich „żywych bioreaktorów” może być źródłem niemal nieograniczonych zysków. Zważywszy jednak, że aktywne białko trzeba będzie izolować na miejscu, z bardzo świeżego mleka, to na utrzymanie stada transgenicznych zwierząt stać będzie tylko bogate i dobrze wyposażone zespoły.

Przyszłość innych manipulacji genetycznych jakie planuje się przeprowadzić na gruczole mlecznym jest trudniejsza do przewidzenia. Zmniejszenie produkcji określonego białka w gruczole mlecznym jest na pewno trudniejsze niż sprowokowanie zwierzęcia do wytwarzania dodatkowego białka, ale i ten cel można osiągnąć wprowadzając do komórki nową informację genetyczną, np. geny kodujące antysensowe RNA lub rybozomy związane z odpowiednim antysensowym RNA. Jednak tego typu genetyczne manipulacje przeprowadzono, jak dotąd tylko na myszach (52). Także inne manipulacje, takie jak *knock-out* wybranych genów czy wymiana genów na drodze homologicznej rekombinacji przeprowadzono tylko na myszach (tab. 3). Dalszy postęp w inżynierii genów białek mleka zwierząt gospodarskich będzie zależał od uzyskania linii pierwotnych komórek zarodkowych (ESC) zwierząt gospodarskich. Badania nad uzyskaniem pluripotentnych komórek pochodzących z zarodków owiec (41), świń (97) i bydła (82) trwają i są nawet dość zaawansowane. Uzyskano już jagnięta urodzone po transplantacji jąder komórkowych z utrwalonej linii komórek pochodzących z zarodków owcy (12,96). Nie wiadomo jednak, czy te komórki można będzie wyposażać *in vitro* w obce geny i selekcjonować je przed transferem ich jąder do enukleowanych oocytów.

## Literatura

1. Archer J. S., Kennan W. S., Gould M. N., Bremel R. D., (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 6840-6844.
2. Archibald A. L., McClenagan M., Hornsey V., Simons J. P., Clark A. J., (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 5178-5182.
3. Barash I., Faerman A., Ratovitsky T., Puzis R., Nathan M., Hurwitz D. R., Shani M., (1994), Transgenic Res., 3, 141-151.
4. Barash I., Ilan N., Kari R., Hurwitz D.R., Shani M., (1996), Mol. Reprod. Dev., 45, 421-430.
5. Bleck T. G., Bremel R. D., (1994), J. Dairy Sci., 77, 1897-1904.
6. Brem G. B., (1993), Mol. Reprod. Dev., 2, 242-244.

7. Brem G., Hartl P., Besenfelder U., Wolf E., Zinovieva N., Pfaller R., (1994), *Gene*, 149, 351-355.
8. Bremel R. D., Yom H. C., Bleck G. T., (1989), *J. Dairy Sci.*, 72, 2826-2833.
9. Brinster R. L., Chen H. Y., Palmiter R. D., (1982), *Nature (London)*, 296, 39.
10. Burdon T., Wall R. J., Shamay A., Smith G. H., Hennighausen L., (1991), *Mech. Develop.*, 36, 67-74.
11. Bühler T. A., Bürüyere T., Went D. F., Stranzinger G., Burki K., (1995), *Bio/Technology*, 8, 140-143.
12. Cambell K. H. S., McWhir J., Rithie W. A., Wilmut, I., (1996), *Nature*, 380, 64-66.
13. Carver A., Wright G., Cottom D., Cooper J., Dalrymple M., Temperley S., Udell M., Reeves D., Percy J., Scott A., Barrass D., Gibson Y., Jeffrey Y., Samuel C., Colman A., Garner I., (1992), *Cytotechnology*, 9, 77-84.
14. Clark A. J., Archibald M., McClenaghan M., Simons J. P., Wallace R., Whitelaw C. B. A., (1993), *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 339, 225-232.
15. Choi B.-K., Bleck G. T., Wheeler M. B., Jiménez-Flores., (1996), *J. Agric. Food Chem.*, 44, 953-960.
16. Cousens C., Carver A. S., Wilmut I., Colman A., Garner I., O'Neill G. T., (1994), *Mol. Reprod. Dev.*, 39, 384-391.
17. 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.
18. DiTullio P., Ebert K. M., Pollock J., Edmunds T., Meade H. M., (1997), in: *Transgenic Animals: Generation and Use*, L-M. Houdebine, Harwood Academic Publishers, 465-467.
19. Drews R., Paleyanda R. K., Lee T. K., Chang R. R., Rehemtulla A., Kaufman R. J., Drohan W. N., Lubon H., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 10462-10466.
20. Drohan W. N., Zhang D. W., Paleyanda R. K., Chang R., Wroble M., Velander H., Lubon H., (1994), *Transgenic Res.*, 3, 355-364.
21. Ebert K. M., Selgrath, J. P., DiTullio P., Denman J., Smith T.E., Memon M. A., Schindler J. E., Monastersky G. M., Vitale J. A., Gordon K., (1991), *Bio/Technology*, 9, 835-838.
22. Ebert K. M., Schindler J. E. S., (1993), *Theriogenology*, 39, 121-135.
23. Fujiwara Y., Miwa, M., Takahashi R., Hirabayashi M., Suzuki T., Ueda M., (1997), *Molec. Reprod. Develop.*, 47, 157-163.
24. Furth P. A., Shamay A., Wall R. J., Hennighausen L., (1992), *Anal. Biochem.*, 205, 365-368.
25. Gordon J. W., Scangos G. A., Plotkin D. J., Barbosa J. A., Ruddle F. H., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 7380-7384.
26. Gordon K., Lee E., Vitale J. A., Smith A. E., Westphal H., Hennighausen L., (1987), *Bio/Technology*, 5, 1183-1129.
27. Grabowski H., Le Bars D., Chene N. Attal J., Malineoungassa R., Puissant C., Houdebine L.-M., (1991), *J. Dairy Sci.*, 74, 4143-4154.
28. Groenen M. A. M., van der Poel J. J., (1994), *Livestock Production Science*, 38, 61-78.
29. Gutiérrez-Adán A., Maga E. A., Meade H., Shoemaker C. F., Medrano J. F., Anderson G. B., Murray J. D., (1996), *J. Dairy Sci.*, 79, 791-799.
30. Günzburg W. H., Salmons B., Zimmermann B., Müller B., Erfle V., Brem G., (1991), *Mol. Endocrinol.* 5, 123-133.
31. Halter R., Carnwath J., Espanion G., Herrmann D., Lemme E., Niemann H., Paul D., (1993), *Theriogenology*, 39, 137-149.
32. Hansson L., Edlund M., Edlund A., Johansson T., Marklund S. L., Fromm S., Strömqvist M., Törnell J., (1994), *J. Biol. Chem.*, 269, 5358-5363.
33. Hennighausen L., Robinson G. W., Wagner K.-U., Liu X., (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 7567-7569.
34. Hirabayashi M., Kodaira K., Takahashi R., Sagara J., Suzuki T., Ueda M., (1996), *Mol. Reprod. Dev.*, 43, 145-149.
35. Houdebine L.-M., (1994), *J. Biotechnology*, 34, 269-287.
36. Hurwitz D. R., Nathan M., Barsh I., Iian N., Shani M., (1995), *Transgenic Res.*, 3, 365-375.

37. Hübscher K. J., (1990), *Diploma Msc thesis, Institut für Nutztierwissenschaften, Zürich, Switzerland.*
38. Hyttinen J.-M., Peura T., Tolvanen M., Aalto J., Alhonen L., Sinervirta R., Halmekytö M., Myöhänen S., Jänne J., (1994), *Bio/Technology*, 12, 606-608.
39. Jänne J., Hyttinen J.-M., Peura T., Tolvanen M., Alhonen L., Sinervirta R., Halmekytö M., (1994), *Int. J. Biochem.*, 26, 7, 859-870.
40. Jura J., Smoraż Z., Kańska L., Skrzyszowska M., Houdebine L.-M., (1997), *Biotechnology*, 4(39), 71-81.
41. Karasiewicz J., Szablisy E., Guszkiwicz A., Kossakowski M., Stefański G., Reed M., Modliński J. A., (1996), *Roux's Arch. Biol.*, 205, 437-442.
42. Kerr D. E., Furth P. A., Powell A. M., Wall R. J., (1996), *Anim. Biotechnol.*, 7, 33-45.
43. Kerr D. E., Wall R. J., (1996), *J. Anim. Sci.*, 74, (Suppl.), 121.
44. Korhonen V.-P., Tolvanen M., Hyttinen J.-M., Uusi-Oukari M., Sinervirta R., Alhonen L., Jauhianen M., Jänne O. A., Jänne J., (1997), *Eur. J., Biochem.*, 245, 482-489.
45. Kownacki, M., Sobczyńska, M., Zwierzchowski, L., (1997), *Przegląd Hodowlany*, 8, 97, 48-49.
46. Krimpenfort P., Rademakers W., Eyestone W., Van B., Kooioman P., Kootwijk E., Platenburg G., Pieper R., de Boer H. A., (1991), *Bio/Technology*, 9, 844-847.
47. Krisher R. L., Gibbons J. R., Gwazdauskas F. C., (1995), *J. Dairy Sci.*, 78, 1282-1288.
48. Kumar S., Clarke A. R., Hooper M. L., Horne D. S., Law A. J. R., Leaver J., Springbett A., Stevenson E., Simons J. P., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91, 6138-6142.
49. Lebrun J.-J., Kelly P. A., (1994), *Medicine/Sciences*, 10, 1018-1020.
50. Lee S. H., de Boer H., (1996), *9<sup>th</sup> World Holstein-Friesian Conference, Sapporo (10-13 September)*, 83-95.
51. Lee K.-F., Demayo F. J., Atiee S. H., Rosen J. M., (1988), *Nucl. Acid. Res.*, 16, 1027-1041.
52. L'Huillier P. J., Soulier S., Stinnakre M.-G., Lepourry L., Davis S. R., Mercier J.-C., Vilotte J.-L., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93, 6698-6703.
53. Limonta J. M., Castro F. O., Martinez R., Puentes P., Ramos B., Aguilar A., Leonart R. L., de la Fuente J., (1995), *J. Biotech.*, 40, 49-58.
54. Maga E. A., Anderson G. B., Murray J. D., (1995), *J. Dairy Sci.*, 78, 12, 2645-2652.
55. Malewski T., Zwierzchowski L., (1995a), *BioSystems*, 36, 109-119.
56. Malewski T., Zwierzchowski L., (1995b), *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 13, 4, 185-193.
57. Massoud M., Attal J., Thepot D., Pointu H., Stinnakre M. G., Theron M. C., Lopez C., Houdebine L. M., (1996), *Reprod. Nutr. Develop.*, 36, 555-563.
58. Matitashvili E., Bramley A. J., Zavizion B., (1997), *Biotech. Adv.*, 15, 17-41.
59. McClenaghan M., Springbett A., Wallace R. M., Wilde C. J., Clark A. J., (1995), *Biochem. J.*, 310, 637-641.
60. McFadden T. B., Akers R. M., Kazmer G. W., (1987) *J. Dairy Sci.*, 70, 259-264.
61. McKnight R. A., Shamay A., Sankaran L., Wall R. J., Hennighausen L., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 6943-6947.
62. Meade H., Gates L., Lacy E., Lonberg N., (1990), *Bio/Technology*, 8, 443-446.
63. Morcol T., Akers R. M., Johnson J. L., Williams B. L., Gwazdauskas F. C., Knight J. W., Lubon H., Paleyanda R. K., Drohan W. N., Velandar W. H., (1994), *Ann. New York Acad. Sci.*, 721, 218-233.
64. Niemann H., Halter R., Espanion G., Wrenzycki C., Herrmann D., Lemme E., Carnwath J. W., Paul D., (1996), *J. Anim. Breed. Genet.*, 113, 437-444.
65. Paleyanda R. K., Velandar W. H., Lee T. K., Scandella D. H., Gwazdauskas F. C., Knight J. W., Hoyer L. W., Drohan W. N., Luboń H., (1997), *Nature Biotech.*, 15, 971-975.
66. Persuy M. A., Legrain S., Printz C., Stinnakre M. C., Lepourry L., Brignon G., Mercier J. C., (1995), *Gene*, 165, 291-296.
67. Persuy M.-A., Stinnakre, M.-G., Printz C., Mahe M.-F., Mercier J.-C., (1992), *Eur. J. Biochem.*, 205, 887-893.
68. 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. Biotech.*, 40, 169-178.

69. Pittius C. W., Sankaran L., Topper Y. J., Hennighausen L., (1988), *Mol. Endocrinol.*, 2, 1027-1032.
70. Platenburg G. J., Kootwijk E. P. A., Kooiman P. M., Woloshuk S. L., Nuijten J. H., Krimpenfort P. J. A., Pieper F. R., de Boer H. A., Strijker R., (1994), *Transgenic Res.*, 3, 99-108.
71. Prunkard D., Cottingham I., Garner I., Bruce S., Dalrymple M., Lasser G., Bishop P., Foster D., (1996), *Nature Biotech.*, 14, 867-871.
72. Raczowska M., Zwierzchowski L., Żebrowska T., Malewski T., Went D. F., (1995), *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 13, 4, 193-203.
73. Reddy V. B., Vitale J. A., Wei C., Montoya-Zavala M., Stice S. L., Balise J., Robl J. M., (1991), *Anim. Biotech.*, 2, 15-29.
74. Rexroad C. E., Powell A., Shamay A., McKnight R., Hennighausen L., (1995), *Theriogenology*, 43, 346 (Abstr.).
75. Rosen J. M., Li S., Raught B., Hadsell D., (1996), *Am. J. Clin. Nutr.*, 63, 627S-632S.
76. Rottmann O., Antes R., Höfer P., Sommer B., Wanner G., Görlach, Grummt F., Pirchner F., (1996), *J. Anim. Breed. Genet.*, 113, 401-411.
77. Shamay A., Pursel V. G., Wilkinson E., Wall R. J., Hennighausen L., (1992), *Transgenic Res.*, 1, 124-132.
78. Simons J. P., McClenaghan M., Clark A. J., (1987), *Nature*, 328, 530-532.
79. Simons J. P., Wilmut I., Clark A. J., Archibald A. L., Bishop J. O., (1988), *Bio/Technology*, 6, 179-183.
80. Soulier S., Vilotte, J. L., Stinnakre M. G., Mercier J. C., (1992), *FEBS Lett.*, 297, 13-18.
81. Stacey A., Schnieke A., McWhir J., Cooper J., Colman A., Melton D. W., (1994), *Mol. Cell. Biol.*, 14, 1009-1016.
82. Stice S. L., Strelchenko N. S., Keefer C. L., Matthews L., (1996), *Biol. Reprod.*, 54, 100.
83. Stinnakre M. G., Devinoy E., Thepot D., Chene N., Bayat-Sarmadi M., Grabowski H., Houdebine L. M., (1993), *Livest. Prod. Sci.*, 36, 35-38.
84. Stinnakre M. G., Vilotte J. L., Soulier S., Mercier J. C., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91, 6544-6548.
85. Suk K., Jung D.-J., Kang S.-K., Kang S.-W., Seo E. J., Kang H. A., Yu M.-H., Seo J.-S., (1995), *Mol. Cells*, 5, 6, 634-640.
86. 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.
87. Velander W. H., Luboń H., Drohan W. N., (1997), *Świat Nauki*, 3 (67), 42-46.
88. Vilotte J. L., Soulier S., Stinnakre M.-G., Massoud M., Mercier J. C., (1989), *Eur. J. Biochem.*, 186, 43-48.
89. Wall R. J., (1996), *Theriogenology*, 45, 57-68.
90. Wall R. J., (1997), *Nature Biotech.*, 15, 416-417.
91. Wall R. J., Kerr D.E., Bondioli K. R., (1997), *J. Dairy Sci.*, 80, 2213-2224.
92. Wall R. J., Pursel V. G., Hammer R. E., Brinster R. L., (1985), *Biol. Reprod.*, 32, 645-651.
93. Wall R. J., Pursel V. G., Shamay A., McKnight R. A., Pittius C. W., Hennighausen L., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1696-1700.
94. Wall R. J., Rexroad Jr. C. E., Powell A., Shamay A., McKnight R. A., Hennighausen L. A., (1996), *Transgenic Res.*, 5, 67-72.
95. Wei Y., Yarus S., Greenberg N., Whitsett J., Rosen J., (1995), *Transgenic Res.*, 4, 232-240.
96. Wells, D. N., Misica P. M., (Tony) Day A. M., Tervit H. R., (1997), *Biol. Reprod.*, 57, 385-393.
97. Wheeler M. B., (1994), *Reprod. Fertil. Dev.*, 6, 563.
98. Wright G., Carver A., Cottom D., Reeves D., Scott A., Simons P., Wilmut I., Garner I., Colman A., (1991), *Bio/Technology*, 9, 830-834.
99. Yom H.-C., Bremel R. D., First N., (1993), *Anim. Biotech.*, 4, (1), 89-107.

100. Zwierzchowski L., (1996), *Biotechnologia*, 2 (33), 81-94.  
101. Zwierzchowski L., (1997), *Struktura, ekspresja i inżynieria genów białek mleka*, w: *Biotechnologia zwierząt*, PWN, Warszawa, 158-204.

## **Biotechnology of the mammary gland — perspectives of genetic engineering of milk proteins**

### **Summary**

In this article, state of art and perspectives in mammary gland biotechnology are reviewed. Recent progress in recombinant DNA technology as well in embryo manipulation and transfer has made the introduction of specific genes into the germline of animals relatively easy. With appropriate genetic constructs, the expression of the inserted genes in transgenic animals can be controlled in a tissue-specific and in a differentiation-specific manner. Thus, it is now possible to consider alteration of the composition of milk produced by lactating animals in a variety of ways. There is a growing list of foreign milk proteins that have been expressed, and one can envisage placing almost any protein gene of interest under the control of promoter of a milk protein gene. Many human proteins of a potential pharmaceutical use may be now produced in the mammary glands of laboratory or farm animals. Modification of milk composition can be extended not only to produce proteins of commercial value but also, by manipulation of key metabolic enzymes, to fat, lactose, and other components of milk. Many alternations in ruminants milk composition, including „humanization” of cow’s milk, are planned, however, these manipulations must await the development of totipotent embryonic cell lines (ESC) of farm animals, cells that enable gene manipulation by homologous recombination. In spite of a great progress, many obstacles and difficulties still exist on the way to economical production of human pharmaceuticals in farm „transgenic bioreactoractors”. These difficulties are discussed in detail.

### **Key words:**

mammary gland, milk proteins, genetic engineering.

### *Adres do korespondencji:*

Lech Zwierzchowski, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt, Polska Akademia Nauk, Jastrzębiec, 05-551 Mroków.