

Transzgenikus gazdasági állatok

Transzgenikusnak nevezünk minden olyan állatot, melynek genomja emberi közreműködéssel bejuttatott DNS-t tartalmaz. Amióta napvilágot látott az első olyan közlemény, amely bebizonyította, hogy lehetséges idegen DNS bevitelle emlős genomba (Gordon és mtsai, 1980), transzgenikus egerek ezreit állították elő a génműködés *in vivo* szabályozásának vizsgálatára, illetve humán betegségek modelljeként. A Medline keresés alapján a transzgenikus állatokkal foglalkozó tudományos publikációk száma napjainkig 15 720, ám ezeknek kevesebb mint 10%-a foglalkozik transzgenikus haszonállatokkal. Még az ilyen irányú, 1496 publikáció tekintélyes hányada is irodalmi összefoglaló. A transzgenikus haszonállatok körébe tartozónak tekintjük a szarvasmarhát, sertést, birkát, kecskét és nyulat. A transzgenikus haszonállatokkal foglalkozó tudományos közlemények alacsony száma világosan mutatja előállításuk rendkívül magas költségét és azokat a technikai nehézségeket is, melyekkel mind a mai napig szembe kell nézni a kutatóknak. Ugyanezen okból azon a területen, nevezetesen a transzgenikus állatok bioreaktorként történő felhasználása terén történt a legjelentősebb előrehaladás, ahol a befektetések leggyorsabb megtérülése várható.

A máig fennálló nehézségek ellenére már 1985-ben közlemény jelent meg első transzgenikus sertés és birka *mikroinjektálással* való előállításáról, és ez a technika gazdasági állatok esetében — az egérmodelltől eltérően — egészen 1997-ig egyeduralkodó volt. Az első felnőtt állati szövettől nyert sejtmag donorral történt sikeres átültetés, melyből Dolly, a világhírű bárány született (*Wilmut és mtsai, 1997*), frontátörést eredményez a transzgenikus haszonállatok előállításában. A sejtmagátültetés módszere emlősállatokban csaknem egyidejű a *mikroinjektálásos* technikával, először birkákon alkalmazták 1986-ban (*Willadsen és mtsai*). Sejtmagdonorként azonban „klasszikusan” korai embriósejteket használtak, melyek száma igen korlátozott. A kutatók számára az okozta a legfőbb nehézséget, hogy haszonállatokban — az egérmodellel ellentétben — nem sikerült olyan embriónális őssejt vonalak (ES sejt) *in vitro* tenyésztése, melyekből kiindulva sikeres ivarsejt kiméra állatok születtek volna. Egér esetében a pluripotens ES sejtvonalak a hólyagcsira állapotban levő embriócsomóból származnak. Első ízben 1981-ben számoltak be létrehozásukról (*Evans és Kaufman, 1981; Martin, 1981*). Az ES sejtek folyamatosan osztódnak és optimális tenyésztési feltételek mellett nem differenciálódnak. Jelentőségük abban áll, hogy más szövettenyésztési sejtekhez hasonlóan az ES sejteket transzfektálni lehet *exogén* DNS vektorral, majd a módosított ES sejtekből kiméraképzéssel hozhatóak létre a transzgenikus állatok.

A testi sejtekből történő sejtmagátültetés jelentőségét pedig az adja meg, hogy haszonállatokban ez a módszer pótolhatja az ES sejtvonalak hiányát. Ha felnőtt állatokból származó szöveti sejtekből is lehetséges sikeres sejtmagátültetés — amint az Dolly esetében már beigazolódott —, akkor ezen sejtek szöveti kultúrájába is bejuttatható az idegen DNS. A transzfektált sejtek *in vitro* szelekciója pedig lehetővé teszi, hogy csak a kívánt módosítást hordozó sejtek sejtmagjainak átültetésével kísérletezzenek, és így idő- és költségtaka-

rékos módon állítsanak elő transzgenikus haszonállatokat. A sejtmagátültetés módszerét már fel is használták transzgenikus birkák (Schnieke és mtsai, 1997) és szarvasmarha (Cibelli és mtsai, 1998) előállítására. Végso soron az in vitro transzfektált sejtek sejmagi donorként történő felhasználása ugyanolyan spektrumban teszi lehetővé a transzgenikus haszonállatok előállítását, mint az ES sejt technológia egerekben.

Mezőgazdasági alkalmazások

A hagyományos szelekciós eljárásokkal gyakran nem lehet elválasztani egy kívánatos tulajdonságot egy vagy több nemkívánatos jellegtől. Természetszerűen kizárt volt a genetikai információ fajok közötti átvitele, a fajok közötti kereszteződés. Ez okból a kedvező tulajdonságokért felelős géneket (például egy betegség elleni rezisztencia génjét) korábban nem lehetett egyik fajból a másikba átvinni. Ezen célok elérésére a molekuláris genetika és a rekombináns DNS mikroinjektálás módszerének együttes alkalmazása teremtett lehetőséget.

Transzgenikus haszonállatok előállítására minőségi vagy mennyiségi tulajdonságok megváltoztatása céljából azonban csak akkor kerül sor, ha a hagyományos tenyésztési eljárásokkal a kívánt változtatást nem, vagy csak nagyon hosszú idő alatt lehet előidézni. Az eddigi kísérletek az endokrin rendszer, a tej és gyapjú szerkezeti fehérjéi, az immunrendszer megváltoztatását, illetve betegség rezisztencia létrehozását célozták.

Mikroinjektálás során a megtermékenyített nőivarú egyed petevezetőjéből nyernek embriókat. Ebben az állapotban a megtermékenyült petesejt két sejtmagja még nem egyesült, jól látható a sarki test és a két előmag. Az exogén DNS-t egy finom üveg kapilláris segítségével az egyik előmagba juttatják. Az előmag láthatóvá tétele szarvasmarhában, sertésben és birkában is sokkal nehezebb, mint egérben. Jelentős előrehaladást jelentett ezért a donor embriók számának növelését lehetővé tevő szuperovulációs protokoll fajokra szabott kidolgozása. A legmagasabb költségvonzatú szarvasmarha esetében egy olyan módszert is kidolgoztak, amely a vágóhídi petefészkekből származó petesejtek érlelésével és in vitro megtermékenyítésével nagyszámú és viszonylag olcsó embrió létrehozását teszi lehetővé. Sokat fejlődött a szarvasmarha embriók in vitro tartási körülményeinek optimalizálása is. Az injektált embriók hólyagsíra (100–200 sejt) állapotukig kultúrában tarthatóak, mely lehetőséget ad előzetes DNS-vizsgálatokra, mint pl. a transzgen beépülés és az állat nemének meghatározása PCR technikával. Ezáltal jelentősen csökkenthető az adott kísérlethez szükséges recipiens állatok száma is. Recipiens állatoknak nevezzük azokat a hormonálisan előkészített ún. álvemhes nőtényeket, melyek a mikroinjektált embriókat kihordják. Az előszelektált szarvasmarha embriókat laporoszkópos eljárással ültetik a recipiensbe. A sertés, birka és kecske embriók in vitro tenyésztésének körülményei kevésbé kidolgozottak, az embriókat 1–4 sejt állapotukban sebészeti eljárással kell a recipiens nőtények petevezetőjébe ültetni. A birka és a kecske évszakhoz kötött ivarozása is lényegesen növeli a transzgenikus állatok előállításának költségét és csökkenti a módszer hatékonyságát. Amint azt az 1. táblázatban összefoglalt adatok is alátámasztják, minden technikai előrehaladás ellenére a transzgenikus haszonállatok előállítása alacsony hatásfokú, nagy technikai felkészültséget igényel és rendkívül időigényes. Ez utóbbi tényező az első homozigóta transzgenikus állat (F₂ generáció) megszületéséig eltelt hónapok számával jellemezhető.

Fajok	Embriók száma/ szuper-ovuláció	Vemhesülési arány (%)	Donorok száma/ recipiens	Születési arány (%)	Transzgenikus állatok (születés %-ában)	F2 generáció születéséig eltelt idő (hónap)
Egér	20	50	2	10—20	15	7,5
Nyúl	20	50	2	10	10	17
Sertés	15	40	2	5—8	10	38
Juh	4	40	1—5	15	5	52
Szarvasmarha	5	20	1	10	5	100

A növekedési erély fokozása

A legelső transzgenikus gazdasági állatok előállítása óta eltelt másfél évtizedben folyamatosan jelennek meg publikációk, melyek célja a növekedési erély megváltoztatása. Az ilyen irányú kísérletek indíttatását *Palmiter* és mtsai (1982) úttörő kísérlete adta, melyben bizonyították, hogy transzgenikus egerekben a keringésben levő növekedési hormon mennyiségének megemelésével az egerek növekedési erélye és felnőttkori mérete is befolyásolható. A kezdeti lelkesedés után, mikor a kutatók megfogható közelségben érezték a gigantikus sertések és szarvasmarhák létrehozását, kiderült, hogy a háziállatok az egértől eltérő módon válaszolnak a növekedési hormon megemelt szintjeire. A transzgenikus sertések és juhek sem mutattak fokozott növekedési erélyt, annak ellenére, hogy a tápanyag-hasznosítási mutatóik kedvezőbbek voltak, mint a kontroll állatoké. Ezen túlmenően a növekedési hormon folyamatosan megemelt szintje abnormális életteni folyamatokat indított el, melyek keringési és kiválasztási rendellenességeket és a fertilitás csökkenését okozták.

Az elmúlt időszakban húsznál több génkonstrukciót próbáltak ki — túlnyomórészt transzgenikus sertésekben melyek magukban foglalták a növekedési hormont kiválasztó faktor (GRF), a szomatostatint, a növekedési hormon és az inzulin típusú növekedési faktor (IGF-I) valamelyikének kódoló DNS szakaszát, fuzionáltatva több típusú például virális eredetű, illetve májspecifikus enzimeket kódoló gén (metallothionein [MT], PEPCCK) szabályozó elemeivel. A legkedvezőbb fenotípussal a MT-bGH transzgenikus sertések bírtak. A transzgenikus malacok nem nőttek nagyobbra, mint az azonos alomból származó kontroll állatok, de 13%-kal nagyobb súlygyarapodást mutattak és 18%-kal hatékonyabban hasznosították a takarmányt. A megemelt növekedési hormonszint jelentősen és a potenciális fogyasztók számára kedvezően változtatta meg a hasított tömeg (karkasz) összetételét is. A GH transzgenikus sertések hasított tömegének zsírtartalma 85%-kal alacsonyabb volt (*Pursel* és *Solomon*, 1993).

Az eredmények összességükben elmaradtak a várakozástól, ennek tudható be, hogy az utóbbi években egyes kutatócsoportok visszatértek az egér modellhez (*Vidal* és mtsai, 1999), illetve alacsony költséggel előállítható transzgenikus nyulakat használtak modellállatnak (*Costa* és mtsai, 1998). Ez utóbbi kísérletek is alátámasztották a transzgenikus sertéseken, illetve birkákon nyert adatokat, nevezetesen hogy GH szint egész életen át tartó megemlése káros mellékhatásokat (transzgenikus nyulakban pl. akromegáliát és cukorbetegséget) okoz, ezért ez az út így nem járható.

Az utóbbi három évben megjelent közlemények előrevetítik egy sokkal specifikusabb beavatkozás lehetőségét. Egy szabályozó gén működésének megértéséhez vezethet, ha ún. null mutáns egeret állítanak elő, melyben a vizsgált gént úgy változtatják meg, hogy arról működőképes termék ne keletkezhesen, majd analizálják az állat fenotípusát. A növeke-

dést és differenciálódást szabályozó TGF- β faktorok családjába tartozó, az izomfejlődési gének működését represszáló, miosztatin gén esetében is ez történt (McFerron és mtsai, 1997). A miosztatinhiányos egerek vázizomzata fejlettebb, mint a kontroll egereké, mely fenotípust nem kísérik negatív mellékhatások, mint például a termékenység csökkenése. Egy magyar kutatócsoport kimutatta, hogy az ún. kompakt egér fenotípusát is a miosztatin génben bekövetkezett mutáció okozza, melyről aberráns fehérje termék képződik (Szabó és mtsai, 1998). Bebizonyosodott továbbá, hogy tenyésztők által régóta ismert Belga kék, illetve Piedmonti és az ún. kettősen izmolt fajták esetében ugyancsak a szarvasmarha miosztatin gén mutációi eredményezik az állatok habitusát, melyekre mint a húsállattenyésztők számára kedvező küllemre szelektálva alakultak ki ezen szarvasmarhafajták. Miosztatin-hiányos szomatikus sejtek *in vitro* létrehozása, majd az ezen sejtekből kiinduló sejtmagátvitel elvben lehetővé teszi miosztatin-hiányos húsállatok, elsősorban sertés és szarvasmarha létrehozását, melyekben az extra mennyiségű hús remélhetően az állatok egészségkárosodása nélkül termelhető meg.

A gyapjú minőségének javítása

Az öltözködést szolgáló természetes és szintetikus anyagoknak csak mintegy 5%-át adja a gyapjútermelés, azonban a természetes anyagok népszerűsége folyamatosan növekszik. A legelőterületek növelését ellenző környezetvédők és az ezzel párhuzamosan lejtászódó népességrobbanás következtében alternatív, gazdasági haszonnal is kecsegtető lehetőségként vetődött fel a transzgenikus birkák előállítását. A transzgén technika így lehetőséget adhat a gyapjútermelés volumenének növelésére, illetve a termelt gyapjú minőségi javítására. A módosított gyapjút termelő transzgenikus birkák előállításával döntően ausztráliai és új-zélandi kutatócsoportok foglalkoznak.

Damak és mtsai (1996) abból indultak ki, hogy a gyapjú növekedését a szórtüszőben lévő epiteliális sejtek osztódása és differenciálódása döntően befolyásolja. Ezért a növekedési hormon hatását közvetítő IGF-1 cDNS-ét, az egér egyik keratin génjének szabályozó régióját irányítása alá helyezve, a hibrid génnel transzgenikus birkákat állítottak elő. A transzgén öröklődését és a gyapjútermelésre gyakorolt hatását két nemzedéken át követték nyomon 51, illetve 59 állaton végzett egyedi mérésekkel. Az első nemzedékhez tartozó transzgenikus birkák fokozott — de évszaktól függően változó — gyapjútermelő képességet mutattak. A maximális különbség a transzgenikus állatok javára 17%-os volt. A transzgenikus állatok gyapjúja durvább volt és kisebb szálerősségű. A második transzgenikus nemzedékben viszont a gyapjú súlya nem különbözött szignifikánsan a kontrol állatokétól, bár a transzgén öröklődését és kifejeződését ezekben az állatokban is ki tudták mutatni (Su és mtsai, 1998).

A gyapjú minőségének megváltoztatását célozták azok a kísérletek, melyekben a II. típusú keratin túltermelésének hatását vizsgálták transzgenikus birkákon. Azokban az állatokban, melyekben a transzgén magas szinten fejeződött ki, a gyapjúsál mikro- és makroszerkezete is markáns változást mutatott (Bawden és mtsai, 1998).

Betegség elleni rezisztencia kialakítása

Az állati termékek előállításai költségeinek 10–20%-át az állatállomány betegségből eredő elhullása, illetve a megelőzés és gyógyítás költségei teszik ki. A betegségekkel szembeni rezisztencia kialakítása ezért már a transzgenikus állatokkal kapcsolatos legkorábbi elképzelések között is szerepelt. A védekezés másik lehetséges módja az intracelluláris immunizálás alatt eredetileg csak azt értették, amikor egy mutáns vírusfehérjét fejeztetnek ki transzgenikus állatokban. Ez azután interferál a vad típusú vírus sejtbe történő belépésével, illetve gátolja annak szaporodását. Újabb ide sorolják a sejten belüli ellenanya-

gok, illetve antiszenz RNS-ek kifejeztetésével történő védekezési módot is, melyek ez idáig elsősorban a humán gyógyászatban, illetve transzgenikus növényekben kerültek kipróbálásra.

Kevés olyan állati betegséget ismerünk, amellyel szembeni rezisztencia egyetlen génhez kötött. Az Mx1 gén kifejeződése transzgenikus egerekben az influenza A vírussal szemben rezisztenciát hozott létre (Arnheiter és mtsai, 1996). A birkaállomány jelentős része fertőzött a lentivirus családba tartozó visna vírussal. A kutatók visna vírus burok fehérje génjét juttatták transzgenikus juhokba. Elméletileg azt az eredményt várták, hogy a transzgén kifejező állatokban a burok fehérje kötődik az endogén visna receptorokhoz és így valós fertőzőeszkor majd interferál a vírusfelvétellel. Mindhárom transzgenikus bárány kifejezte a vírusfehérjét, nem ismeretesek azonban utódjaik vírusellenállósági tesztjeinek eredményei (Clements és mtsai, 1994).

Alternatív megközelítésként az újszülött állatok védettségét az anyai immunitás fokozásával próbálják elérni. Ezen elképzelés jegyében transzgenikus egereket állítottak elő, melyek nagy mennyiségben termelik a sertés gasztroenteritisz vírust neutralizáló ellenanyagot (Sola és mtsai, 1998). Ez a vírusfertőzöttség csaknem 100% mortalitást okoz újszülött sertésekben. A transzgenikus egereken kapott biztató eredmények alapján remélhetjük, hogy a kísérletet kiterjesztik transzgenikus sertésekre is. Más kutatók az IgA típusú ellenanyag transzportjában résztvevő receptor fehérjét fejeztették ki transzgenikus egerek emlőszövetében, azt remélve, hogy ez lehetővé teszi nagyobb mennyiségű IgA kiválasztódását a tejben (de Groot és mtsai, 1999).

A tejösszetétel megváltoztatása

A tej és tejtermékek képezik a fejlett világ teljes fehérjefogyasztásának kb. 30%-át. A tejösszetétel megváltoztatására irányuló kísérletek haszonállatok esetében ez ideig az egyes tejfehérjék extra kópiáinak hozzáadására korlátozódtak. A jövőben lehetőség lesz bármely tejfehérje gén deléciójára vagy célzott megváltoztatására is. Az eddigi eredmények az olyan célok eléréséhez vittek közelebb, mint például a tej feldolgozhatóságának kedvezőbbé tétele, a tej tápértékének növelése, humanizált tehéntej előállítás.

A tehéntej hat fő fehérjekomponense az α 1-, α 2-, β -, és κ -kazein, továbbá két savófehérje: az α -laktalbumin és a β -laktoglobulin. Az összfehérje-tartalom 80%-át adják a kazeinek (24–28 gr/l) míg a savófehérjék 5–7 gr/l, koncentrációban vannak jelen. A kazeinek CaPO₄-tal kapcsolódva 20–600 nm méretű micellákat alkotnak.

Transzgenikus egereken és haszonállatokon végzett kísérletek tanulsága szerint nem lehet lényegesen változtatni az összfehérje-tartalmat, mert egy pontosan még nem tisztázott mechanizmus a nagy mennyiségben termelődő transzgén fehérje mellett csökkenti az endogén fehérjék termelését. Lehetséges azonban az egyes tejfehérjék egymáshoz viszonyított arányának megváltoztatása. A kazein fehérjék arányának növelése a savófehérjékhez képest a sajtgyártás számára kedvező irányú változás lenne. Mivel a szarvasmarha esetében a kazein gének kapcsolatosan helyezkednek el a 6. kromoszóma egy 260 kb nagyságú szegmensén, az egyik lehetőség a teljes kazein régió mikroinjektálása YAC klón transzgenézissel, melynek technikai akadályai ma már nincs (Brem és mtsai, 1996), az eredmények azonban mégis váratnak magukra. Megtörtént viszont — igaz, túlnyomórészt transzgenikus egérmódellen — az egyes kazein és savófehérje gének mikroinjektálása és az így túltermelt fehérjék megjelenéséből adódó következmények vizsgálata. A tejfehérje gének extra kópiáinak beépítéséből azt a fontos következtetést lehetett levonni, hogy a laktáló nőtények egészségének károsítása nélkül valósítható meg egy tejfehérje nagy mennyiségben (a normális érték 2–3-szorosa) történő termelése az emlőmirigyben (Clark, 1996).

Egyes esetekben részletesebb analízist is végeztek: a szarvasmarha β -kazeint túltermelő egerek esetében pl. megállapították, hogy a transzgén termék az eredeti fehérjével

megegyező mértékben foszforilált és képes az egér kazeinek alkotta micellába beépülni (Hitchin és mtsai, 1996). Ugyanakkor Bleck és mtsai (1995) azt is kimutatták, hogy azon laktáló egerek, melyek tejében a legmagasabb koncentrációban termelődött szarvasmarha β -kazein, a normálisnál rövidebb laktációs idejűeknek bizonyultak és tejük viszkozitása oly mértékben megemelkedett, ami megnehezítette, illetve lehetetlenné tette hogy a tej eltávozzon az emlőkből.

A kazein micellák méretét a felszínen elhelyezkedő κ -kazein befolyásolja, ezért számos olyan összefoglaló jelent meg az elmúlt 15 évben, amely prognosztizálta, hogy a κ -kazein mennyiségének növelésével a micellák mérete csökkenni fog és ennek következményeként fokozódhat a tej hőstabilitása. Egy ilyen módosulás kedvező lehet a tejgyártás sterilizálási folyamatában, illetve tejtermékek előállításánál, ahol nőhet az alvadáskor keletkező gél erőssége. Az eddig elvégzett kísérletek során szarvasmarha κ -kazeint túltermelő egerek tejében beigazolódott a kazein micellák méretének csökkenése és kimutatták, hogy az ilyen tej alvadáskor keletkezett gél erőssége megnövekedett. *Munkacsoportunk* κ -kazein túltermelő egerek tejének vizsgálatával megállapította, hogy azoknak a laktáló nőtényeknek a tejében, amelyek a legnagyobb mennyiségben termelik a nyúl κ -kazeint, az, a micellák mellett, a savó frakcióban is megjelenik. A micellák mérete ebben az esetben is csökkent, mégpedig a tejben mért nyúl κ -kazein mennyiségével fordított arányban. A κ -kazein túltermelő transzgenikus nőtények ivadéknévelő képességét összehasonlítva nem transzgenikus alomtársaikéval azt tapasztaltuk, hogy bár a kisebb micellaméret megkönnyíti az emésztést, a transzgenikus nőtények által táplált alom súlygyarapodása mégis elmaradt a kontroll nőtény által szoptatott egerekéhez képest (Hiripi és mtsai, 1999).

Az α -laktalbumin, mely a tehéntej összes fehérjetartalmának mindössze 3%-át kitevő savófehérje, fontos szerepet játszik a tejcukor szintézisében. A kazein fehérjékkel szemben, ahol extra kópiák bejuttatásával azok mennyiségének növelése a kívánatos cél, az α -laktalbumin esetében olyan transzgenikus stratégiákat dolgoztak ki, mellyekkel a tejcukor mennyiségének csökkenése érhető el. Csökkentett tejcukortartalmú tej már ma is kapható, ezt a tehéntej utókezelésével állítják elő. Erre a termékre azért van szükség, mert világméretben a felnőtt populáció jelentős hányada szenved a tejcukor elégtelen feldolgozásának következményeként fellépő bélrendszeri betegségekben. Ezen megbetegedések oka, hogy a legtöbb felnőttben a csecsemőkor végén lecsökken a vékonybélben termelődő tejcukor hidrolizáló enzim mennyisége.

Az α -laktalbumin szerepének vizsgálatára a kutatók α -laktalbumin-hiányos egereket állítottak elő. A homo- illetve heterozigóta nőtények tejmintáinak analízisével kimutatták, hogy a várakozásoknak megfelelően az α -laktalbumin mennyisége és a tejcukortartalom direkt összefüggést mutat. Ugyanakkor az is kiderült, hogy a tejcukor mennyiségének drasztikus csökkentése nem járható út, mivel a homozigóta nőtények tejének viszkozitása oly mértékben megnőtt, hogy az gátolta a tejelválasztást. Ugyanezen okból ezek a nőtények nem tudták táplálni utódaikat (Stinnakre és mtsai, 1994). Ezért egy újabb kísérletben szarvasmarha α -laktalbumin mRNS specifikus ribozim molekulát fejeztettek ki transzgenikus egerek emlőszövetében. Mikor ezen egérvonal egyedeit keresztezték olyan transzgenikus egerekkel, melyekben szarvasmarha α -laktalbumint termeltettek, azt tapasztalták, hogy a kettős hemizigótákban a szarvasmarha α -laktalbumin mennyisége 50–78%-kal csökkent (*L'Huillier és mtsai, 1996*). Másfajta megközelítést követtek azok a kutatók, akik a normálisan csak a vékonybélben termelődő tejcukor hidrolizáló enzim (laktáz) emlőszövet specifikus kifejeződését érték el transzgenikus egerekben. A tejcukor hidrolizáló enzim termelődése az emlőszövetben a tejcukortartalom 50–85%-os csökkenését eredményezte, anélkül hogy a tejsír- vagy fehérjetartalom, illetve a laktáló nőtények ivadéknévelő képessége megváltozott volna (*Jost és mtsai, 1999*).

A tejösszetétel megváltoztatásának az eddig tárgyaltaktól elvben különböző lehetősége egy másik fajban jelenlevő tejalkotórész kifejeztetése, vagy egy tejfehérje módosítása. Az eredmény mindkét esetben a tej felhasználhatóságának előnyös megváltoztatása lehet. Ebbe az irányzatba tartoznak azok az elképzelések, melyek humanizált tejet termelő

transzgenikus haszonállatok előállítását tűzik ki célul. Humán lactoferrin termeltetés céljából már 1991-ben transzgenikus szarvasmarhákat állítottak elő, sajnos azonban nem ismeretesek a génkifejeződésre vonatkozó adatok (*Krimpenfort és mtsai, 1991*). A lactoferrin, mely a humán tejben 1,7 mg/ml, míg a tehéntejben 0,02–0,2 mg/ml-es koncentrációban van jelen, a legfontosabb vaskötő tejfehérje és jelentős antibakteriális hatása is van. Megemelt koncentrációja csökkenthetné az emlőgyulladás gyakoriságát. Emellett az ilyen tehéntejjel táplált csecsemőkben megelőzhetővé válhatna a vashiányos állapot kialakulása. Egyelőre csak tervben léteznek olyan transzgenikus haszonállatok, melyek módosított — fenilalanin-mentes — tejfehérjéiből készítenek majd pl. sajtot. Az ilyen genetikailag módosított tejből (GMO) készült sajt kiegészíthetné az örökletes fenilketonureában szenvedő emberek étrendjét. A fenilketonureában szenvedő betegek nem képesek a fenilalanin lebontására, ezért, hogy mentesüljenek a felhalmozódó fenilalanin idegrendszeret károsító hatásától, egész életükben gyakorlatilag fehérjementes diétára kényszerülnek. Itt kell megjegyezni, hogy transzgenikus állati eredetű termékek felhasználása emberi táplálékként ma még jogi akadályokba is ütközik.

Érdekes eredményt adott, amikor transzgenikus egérmodellel vizsgálták a humán lizozim előszövet specifikus kifejeződésének következményeit. A lizozim fehérjék jelentős antimikrobiális aktivitással bírnak, természetes körülmények között előfordulnak többek között a különböző testnedvekben. A transzgenikus egerek tejből kivont humán lizozim megőrizte antibakteriális hatását és pozitív töltésénél fogva kölcsönhatásba lépett a kazein micellákkal, csökkentve ezáltal a micellák átlagos méretét és az alvadási időt (*Maga és mtsai, 1995*).

*A mezőgazdasági céllal előállított transzgenikus állatokkal végzett kísérletek számos előremutató részeredményt hoztak, ezek azonban elmaradnak a kezdeti várakozásoktól. A kutatók nem várt nehézségekkel találták szemben magukat, amikor komplex, több gén által befolyásolt élettani folyamatokat akartak befolyásolni. Az alap kutatás új eredményei számos problémát megoldottak, így ma már lehetséges olyan transzgen konstrukciókat tervezni, amelyek szövet- és fejlődésspecifikusan fejeződnek ki (például az izomszövetben) és ezáltal elkerülhetőek a korai kísérleteket jellemző mellékhatások. Az elvégzett kísérletek számát elsősorban etikai megfontolások alapján korlátozták, de ahhoz hozzájárultak az üzleti, költség/haszon számítások is. Mezőgazdasági célú hasznosulás esetén a gazdaságossági számítások kiindulópontját annak kell képeznie, hogy — szelektált géntől függően — hatékony hagyományos szelekcióval évi 1–3%-os javulást, ún. genetikai előrehaladást lehet elérni. Ehhez járul még hogy a hatékonyságot növelendő egyre több molekuláris genetikai markert vonnak be a szelekcióba, illetve hogy folyamatosan bővülnek a háziállatok genetikai térképeiről rendelkezésünkre álló információk is (*Fésűs, 1998*).*

Mivel a transzgenikus haszonállatok mezőgazdasági felhasználásának célja a genetikai előrehaladás felgyorsítása, a kutatóknak azzal a ténnyel kell szembe nézniük, hogy bár a transzgen kifejeződése miatt ez az állat egy tulajdonság szempontjából kiemelkedő lehet, ugyanakkor fel kell tételezniük, hogy az összes többi szelektált marker szempontjából átlagos tulajdonságú lesz. Így a transzgent hordozó egyed olyan állatokkal kerül összehasonlításra, melyek sok más szempontból kiválóbbak. Ehhez a szelekciós hátrányhoz korábban hozzáadódott még az a tény is, hogy lehetetlen volt megoldani egy már meglévő pozitív tulajdonság gyors elszaporítását nagy állományokban. Ez a probléma azonban a sejtmagátültetés széles körben történő elterjedésével meg fog oldódni. A módszerrel az alapító állat testi sejtjeiből kiindulva tetszőleges számú és nemű — az alapító egyeddel genetikailag identikus — utódot hozhatnak létre. Ez a korábban alkalmazott (*1. táblázat*) két generációnyi időintervallumot igényel, az utódokban pedig a transzgen kimutatását igénylő módszerhez képest jelentős idő- és költségmegtakarítással jár majd. Ugyanakkor ez az új módszer fokozza a teljesen azonos genetikai állománnyal rendelkező állatok elszaporodásából eredő kockázatokat (pl. járványokkal szembeni védtelenség) is.

Feltétlenül figyelembe kell azt is venni, hogy a közvéleményben növekvő ellenállás tapasztalható a kereskedelmi céllal előállított, transzgenikus eredetű termékekkel szemben. Feltételezhetően lesznek olyan genetikai változtatások, amelyek társadalmi fogadtatása kedvezőbb lesz. Ilyen lehet például a prion fehérje gén deléciója birkákban és szarvasmarhákban, ami kergékór, illetve BSE elleni rezisztenciát eredményezne. Mindezen okokból nehéz megjósolni, hogy várható-e olyan robbanásszerű térnyerés ezen a vonalon is, mint amely a transzgenikus növények vetésterület növekedésében bekövetkezett.

Gyógyászati alkalmazások

Számos betegség, illetve örökletes rendellenesség gyógyítható sikeresen a transzgenikus állatok által termeltetett gyógyszerekkel. A rekombináns fehérjék világpiaca 1998-ban 12,8 milliárd USD volt. A transzgenikus haszonállatok bioreaktorként való felhasználása ma már realitás, nem egy olyan termék van, amely a klinikai kipróbálás különböző stádiumába ért. Ezen túlmenően a transzgenikus haszonállatok előállításának további fontos célja az állattenyésztők igényeinek kielégítése: több vagy jobb minőségű hús, tejtermék és gyapjú termelésére képes haszonállatok létrehozása. Ezen célokhoz csatlakozott egy újabb gyógyászati célú felhasználás, nevezetesen olyan transzgenikus minisertések előállítása, melyek szervei (szív, vese) ideiglenes vagy állandó xenograftként beültethetők.

Transzgenikus állatok bioreaktorként alkalmazása

Rekombináns fehérjék előállítása a biotechnológiai ipar első sikerei közé tartozott. Hamar kiderült azonban, hogy egyes gyógyhatású fehérjék több típusú poszttranszlációs módosítást igényelnek a teljes aktivitáshoz és stabilitáshoz. A poszttranszlációs módosítók típusai a teljesség igénye nélkül: szignál peptid kivágódás; -s-s- hidak kialakítása; fehérje folding; alegységek egyesülése; (O⁻ és N) glikozilálás; amidálás; acetilálás; foszforilálás stb. A rekombináns fehérjék előállítására korábban használt rendszerek (pl. baktériumok, élesztők, gombák, transzgenikus növények) nem képesek bizonyos típusú poszttranszlációs módosításokra, ezért az ilyen típusú fehérjék előállítása a transzgenikus haszonállatok alkalmazását megelőzően csak emlőssejt kultúrában volt lehetséges. Az emlőssejt kultúra rendkívül költséges és kis hatékonysággal képes csak fehérjét termelni. Transzgenikus állatok bioreaktorként történő felhasználásánál, mivel a termelt fehérjét tovább kell tisztítani elsősorban a testfolyadékok (vér, tej, vizelet) jöhettek szóba, mint nagy mennyiségű és újra felhasználható forrás. Bár a vér fehérjék nagy mennyiségben történő feldolgozása és frakcionálása mint kiindulási pont már sok éve rendelkezésre állt, idegen fehérjék vérben történő termeltetése mégsem terjedt el széles körben, elsősorban azért, mert ha az idegen fehérje biológiailag aktív, az káros hatással lehet a termelő állat egészségére. Az emlőszövet mellett szól, hogy a benne termelt tej kiválasztódik, sokkal kevésbé bonyolult összetételű, mint a vér, és nagy mennyiségben könnyen nyerhető. Az is az emlőszövet felhasználása mellett szól például, hogy a viszonylag kis számú tejfehérje szinte mindegyikének génjét izolálták és szabályozó régióikat analizálták. Ez a körülmény megkönnyítette a hatékony emlőszövet-specifikus vektorok kifejlesztését. Az emlőszövet sejtjei specializálódtak a nagy mennyiségben történő termelésre, rendelkeznek azokkal a transzportfolyamatokkal, melyek lehetővé teszik a prekursor molekulák felvételét a vérből és olyan intracelluláris sejtalkotó részekkel, melyek megengedik a fehérjék poszttranszlációs módosítását és kiválasztását.

A skóciai Roslin Intézetben hoztak létre elsőként α -1-antitripsint nagy mennyiségben termelő transzgenikus egereket, majd egy transzgenikus birkanyáját is (Carver és mtsai, 1993). A kísérletben részt vevő kutatók egy csoportja már 1987-ben megalapította a PPL Therapeutics Ltd. céget. A 2. táblázatban foglaltam össze azokat a gyógyhatású fehérjéket,

melyeket a különböző biotechnológiai cégek transzgenikus birka-, illetve kecskenyájak által termeltetnek és már a közeli jövőben várható piacra kerülésük.

2. táblázat

Termék	Felhasználás	Gyártó	Fejlesztési fázis
Alfa-1-antitripszin	Cisztikus fibrózis Tüdőtágulás	PPL	Klinikai II. fázis
Alfa-1 proteináz inhibitor	Örökletes rendellenesség	GTC	Fejlesztés alatt
Antitrombin III	Szív koronáriák bypass műtétei	GTC	Klinikai III. fázis
Béta interferon	Szklerezis multiplex	GTC	Fejlesztés alatt
Epe só stimulálta lipáz	Cisztikus fibrózis Akut hasnyálmirigy- gyulladás	PPL	Klinikai kipróbálásra előkészítve
C-1 észteráz inhibitor	Akut szívinfarktus	PHARMING	Klinikai kipróbálásra előkészítve

Az eddigi kísérletek bebizonyították, hogy a teljes fehérjetartalom 50%-át is elérheti egy idegen fehérje koncentrációja a tejben, a legtöbb esetben anélkül, hogy károsan befolyásolná az állatok egészségét, emlőszövetük működését vagy a transzgenikus nőstények alomszámát, illetve az alom súlygyarapodását. Ahhoz, hogy az állati tejből tisztított gyógyhatású fehérjék végül forgalomba kerüljenek, a gyártóknak dokumentálniuk kell az állatok eredetét, egészségi állapotát, a transzgen stabilitását és az előállított fehérje részletes jellemzését. Az a tény, hogy sok éven keresztül alkalmaztak szarvasmarha-, illetve sertésinzulint és sertés VIII. véralvadás faktort a humán gyógyászatban, anélkül, hogy a fajok között vírus transzmisszió előfordult volna, csökkenteni látszik a transzgenikus termékekkel kapcsolatos ez irányú aggodalmakat.

Xenotranszplantáció

Az utóbbi öt évben egyre több közlemény lát napvilágot, melyben transzgenikus egereket, illetve minisertéseket állítanak elő, azzal a céllal, hogy végül létrejöjjön egy olyan minisertés, mely immunológiai szempontból tökéletesen megfelelő emberi szervdonor. A xenotranszplantáció legfőbb akadálya az ún. hiperakut reakció, melynek során a szervezetben már létező ellenanyagok a komplement rendszer közvetítésével a beültetett szerv vagy szövet azonnali kilökődéséhez vezetnek. Az eddigi eredmények két kérdéskör vizsgálatából születtek: egyfelől megállapították, hogy mely antigén determinánsok váltják ki a legerősebb ellenanyag választ, majd megpróbálták transzgenézissel eltüntetni azokat. Másfelől a befogadó szervezet komplement rendszerét szabályozó (gátló) fehérjéket fejezték ki a szervdonor állatokban. A kísérletek végzését a beültethető szervek iránti egyre növekvő igény motiválja (3. táblázat).

3. táblázat

Transzplantáció típusa	Regisztrált transzplantációra várók*
Vese transzplantáció	44307
Máj transzplantáció	13523
Hasnyálmirigy transzplantáció	481
Hasnyálmirigy sziget transzplantáció	114
Vese—hasnyálmirigy transzplantáció	1932
Bél transzplantáció	114
Szív transzplantáció	4348
Szív—tüdő transzplantáció	231
Tüdő transzplantáció	3360
Összesen	68410

*Az adatokat az UNOS (USA) tette közzé 1999-ben.

Megállapították, hogy az óvilági főemlősök (ide tartozik az ember is) nagy mennyiségű ellenanyaggal rendelkeznek olyan szénhidrát oldalláncokkal szemben — az egyik legfontosabb pl. a Gal(α 1-3)Gal — melyek ezen főemlősökben nem képződnek. Transzgenikus egeret állítottak elő, melyből eltávolították a Gal(α 1-3)Gal szintézisében részt vevő egyik enzim génjét. Megállapították, hogy az enzim hiánya nem okoz egészségkárosodást. Ez az út tehát járható lesz minisertésekben is, így olyan transzgenikus állatokat tudnak majd létrehozni, melyekben a hiperakut reakciót kiváltó legfőbb antigén determináns nem fog szintetizálódni (Sandrin és mtsai, 1997).

A komplement rendszer gátlására többfajta emberi fehérjét (decay accelerating factor [hDAF], CD 59) fejeztettek ki a szervdonor állatok epiteliális sejteiben (Platt, 1996). Beszámoltak hDAF-ot termelő transzgenikus minisertés szívének majomba történt transzplantációjáról, mellyel kéthónapos szervtúlélést értek el (Lambrigts és mtsai, 1998). A kutatócsoportok most olyan transzgenikus minisertések előállításán dolgoznak, melyek több transzgen egyidejű kifejezésére képesek. A sejtmagátültetés technikája módot ad több gén egyidejű kicserélésére, illetve eltávolítására is, ami jelentős előrelépést jelenthet a hiperakut reakció megelőzésében. Aggodalomra adhat viszont okot, hogy bebizonyosodott: egyes sertés retrovírusok képesek emberi szövettenyészetekben osztódni, így fennáll a veszély, hogy képesek átugrani a fajok közötti határokon. Ugyanakkor minisertésekből, könnyen létrehozható olyan speciális körülmények között tartott állomány (SPF), amelynek állandó ellenőrzésével ez a veszély minimálisra csökkenthető. A legtöbb országban moratórium van érvényben a xenotranszplantációra, de oly nagy a szervek iránti igény, hogy korlátozott klinikai kísérletek engedélyezésére már a közeli jövőben is sor kerülhet.

Transzgenikus haszonállatok gyógyászati célú felhasználásával kapcsolatban még számos etikai, jogi és tudományos kérdés vár megoldásra, mint például az állatok genetikai módosításának vallásfilozófiai következményei, a környezetszennyezés problémája, az azonos genetikai állománnyal rendelkező klónok felszaporításának veszélyei, vagy az, hogy jogos-e a transzgenikus állatok szabadalmi védelem alá helyezése.

IRODALOM:

- Arnheiter H., Kambadur R., Meier E., Haller O. (1996) Mx transgenic mice-animal models of health. In: Transgenic models of human viral and immunological disease (F.V. Chisari and M.B.A. Oldstone eds.) Springer-Verlag 119–147.
- Bawden C.S., Powell B.C., Walker S.K., Rogers G.E. (1998) Expression of a wool intermediate filament keratin transgene in sheep fibre alters structure. *Transgenic Res.* 7. 273–287.
- Bleck G.T., Jimenez-Flores R., Bremel R.D. (1995) Abnormal properties of milk from transgenic mice expressing bovine β -casein under control of the bovine α -lactalbumin 5' flanking region. *Inter. Dairy. J.* 5. 619–632.
- Brem G., Besenfelder U., Aigner B., Müller M., Liebl I., Schütz G., Montoliu L. (1996) YAC transgenesis in farm animals: rescue of albinism in rabbits. *Mol. Reprod. Dev.* 44. 56–62.
- Carver A.S., Dalrymple M.A., Wright G., Cottom D.S., Reeves D.B., Gibson Y.H., Keenan J.L., Barrass J.D., Scott A.R., Colman A., Garner I. (1993) Transgenic livestock as bioreactors: stable expression of human alpha-1-antitrypsin by a flock of sheep. *Bio/Technology* 11. 1263–1270.
- Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J., Kane J.J., Jerry J., Blackwell C., de Leon A.P., Robl J. (1998) Cloned transgenic calves from nonquiescent fibroblasts. *Science* 280. 1256–1258.
- Clark A.J. (1996) Genetic modification of milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* 63. 633S–638S.
- Clements J.E., Wall R.J., Narayan O., Hauer D., Schoborg R., Sheffer D., Powell A.M., Carruth L.M., Zink M.C., Rexroad C.E. (1994) Development of transgenic sheep that express the visna virus envelope gene. *Virology* 200. 370–380.
- Costa K., Solanes G., Visa J., Bosch F. (1998) Transgenic rabbits overexpressing growth hormone develop acromegaly and diabetes mellitus. *Faseb J.* 12. 1455–1460.
- Damak S., Su H.Y., Jay N.P., Bullock D.W. (1996) Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin-like growth factor 1. *Bio/technology* 14. 185–188.
- Evans M.J., Kaufman M.H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292. 154–156.
- Fésüs L. (1998) Szelekció az állattenyésztésben molekuláris genetikai markerekkel. *Magy. Tud. 1.* 32–44.
- Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J., Barbosa J.A., Ruddle F.H. (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77. 7380–7384.
- de Groot N., Kuik-Romeijn P., Lee S.H., de Boer H.A. (1999) Over-expression of the murine polymeric immunoglobulin receptor gene in the mammary gland of transgenic mice. *Transgen. Res.* 8. 125–135.
- Hitchin E., Stevenson E.M., Clark A.J., McClenaghan M., Leaver J. (1996) Bovine β -casein expressed in transgenic mouse milk is phosphorylated and incorporated into micelles. *Prot. Expr. Purif.* 7. 247–252.
- Híripi L., Baranyi M., Szabó L., Tóth Sz., Fontaine M-L., Devinoy E., Bősze Zs. (1999) Effect of rabbit κ -casein expression on the properties of milk from transgenic mice. *J. Dairy Res.* (submitted)
- L'Huillier P.J., Soulier S., Stinnakre M.G., Lepourry L., Davis S. R., Mercier J.C., Vilotte J. L. (1996) Efficient and specific ribozyme-mediated reduction of bovine α -lactalbumin expression in double transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93. 6698–6703.
- Jost B., Vilotte J. L.; Duluc I., Rodeau J. L., Freund J. N. (1999) Production of low-lactose milk by ectopic expression of intestinal lactase in the mouse mammary gland. *Nature Biotech.* 17. 160–164.

- Krimpenfort P., Rademakers A., Eyestone W., van der Schans A., van den Broek S., Kooiman P., Kootwijk E., Platenburg G., Pieper F., Strijker R., de Boer H. (1991) Generation of transgenic cattle using in vitro embryo production. *Bio/technology* 9. 844—847.
- Lambrigts D., Sachs D.H., Cooper D.K. (1998) Discordant organ xenotransplantation in primates: word experience and current status. *Transplant*. 15. 547—561.
- Maga E. A., Anderson G. B., Murray J. D. (1994) The effect of mammary gland expression of human lysozyme on the properties of milk from transgenic mice. *J. Dairy Sci.* 78. 2645—2652.
- Martin G.R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78. 7634—7638.
- McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.J. (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature* 387. 83—90.
- Palmiter R.D., Brinster R.L., Hammer R.E., Trumbauer M.E. (1982) Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300. 611—615.
- Platt J.L. (1996) Xenotransplantation: recent progress and current perspectives. *Curr. Op. Immunol.* 8. 721—728.
- Pursel V.G., Solomon M.B. (1993) Alteration of carcass composition in transgenic swine. *Food Rev. Int.* 9. 423—439.
- Sandrin M.S., Osmann N., McKenzie I. F. C. (1997) Transgenic approaches for the reduction in expression of GAL α (1,3) Gal for xenotransplantation. *Front. Biosci.* 2. 1—11.
- Schnieke A.E., Kind A.J., Ritchie W.A., Mycock K., Scott A.R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A., Campbell K.H.S. (1997) Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278. 2130—2133.
- Sola I, Castilla J, Pintado B, Sanchez-Morgado JM, Whitelaw CB, Clark AJ, Enjuanes L. (1998) Transgenic mice secreting coronavirus neutralizing antibodies into the milk. *J Virol.* 72. 3762—3772.
- Stinnakre M.G., Vilotte J.L., Soulier S., Mercier J.C. (1994) Creation and phenotypic analysis of α -lactalbumin deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91. 6544—6548.
- Su H.Y., Jay N.P., Gourley T.S., Kay G.W., Damak S. (1998) Wool production in transgenic sheep: results from first-generation adults and second-generation lambs. *Anim. Biotechnol.* 9. 135-147.
- Szabó G., Dallmann G., Müller G., Patthy L., Soller M., Varga L. (1998) A deletion in the myostatin gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice. *Mammalian Gen.* 9. 671—672.
- Vidal S., Stefanescu L., Thapar K., Aminyar R., Kovacs K., Bartke A. (1999) Lactatoroph hyperplasia in the pituitaries of female mice expressing high levels of bovine growth hormone. *Transgen. Res.* 8. 191—202.
- Willadsen S.M. (1986) Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320. 63—65.
- Wilmut I., Schnieke A. E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385. 810—813.