

LECH ZWIERZCHOWSKI

*Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN
Jastrzębiec, 05-551 Mroków
e-mail: lechzwierz@yahoo.com*

TRANSGENICZNE ZWIERZĘTA I ROŚLINY JAKO BIOREAKTORY PRZYSZŁOŚCI

WSTĘP

Postęp w metodach rekombinacji genów i inżynierii genetycznej umożliwia obecnie tworzenie organizmów transgenicznych, wyposażonych w nowe cechy lub w nowe, nie występujące w przyrodzie kombinacje cech. Organizmy transgeniczne — zwierzęta i rośliny — tworzy się wprowadzając do ich komórek obce geny lub konstrukcje genowe. Dzięki zastosowaniu odpowiednich sekwencji regulacyjnych — promotorów — ekspresję tych genów można skierować do wybranych komórek i narządów transgenicznego organizmu; na przykład, do gruczołu mlecznego zwierząt, czy, w przypadku roślin, do części jadalnych — ziaren, bulw i innych. Produkcja aktywnych biologicznie białek, na przykład ludzkich białek leczniczych, będzie niewątpliwie jednym z pierwszych zastosowań transgenicznych roślin i zwierząt. Zapotrzebowanie na takie białka jest bardzo duże, a ich podaż zawsze niewystarczająca. Niektóre z prostszych ludzkich białek, na przykład insulinę czy hormon wzrostu, można wytwarzać w rekombinowanych bakteriach. Jednak bakterie nie są zdolne do przeprowadzenia większości potranslacyjnych modyfikacji, stąd też bardziej skomplikowane białka, wymagające do swojej aktywności glikozylacji, fosforylacji, α -karboksylacji czy aktywacji przez proteolizę, mogą być wytwarzane jedynie w komórkach eukariotycznych. Wiele z tych białek 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 i rośliny wyposażone w geny struktury ludzkich białek mogą same, bez specjalnej interwencji człowieka, wytwarzać duże ilości tych białek. Co więcej, transgeniczne organizmy na ogół prze-

kazują tę cechę swojemu potomstwu, dzięki czemu taka „fabryka farmaceutyczna” będzie się sama odtwarzała, bez angażowania dużych pieniędzy na inwestycje. Pozwoli to na wytworzenie każdej potrzebnej ilości białek o znaczeniu leczniczym.

Jednym z najbardziej perspektywicznych „żywych bioreaktorów” jest niewątpliwie gruczoł mleczny. Komórki gruczołu mlecznego zwierząt, same wyspecjalizowane w produkcji skomplikowanych białek, są także zdolne do przeprowadzania modyfikacji potranslacyjnych białek kodowanych przez transgeny. Uzyskano już transgeniczne zwierzęta: krowy, kozy, owce i króliki wytwarzające w gruczole mlecznym ludzkie białka lecznicze takie jak: α 1-antytrypsyna, antytrombina III, czynniki krzepliwości krwi VIII i IX, aktywator plazminogenu. Niektóre z tych białek wytwarzane są w ilościach wystarczających, żeby rozważać ich komercyjne wykorzystanie. Produkcja białek leczniczych w mleku transgenicznych zwierząt ma także inne zalety. Ograniczy na przykład możliwość nieumyślnego rozprzestrzenienia wirusa HIV lub wirusa żółtaczki, zmniejszy zagrożenie środowiska przez przemysł chemiczny czy farmaceutyczny. Niektórzy autorzy uważają co prawda, że stosowanie w medycynie białek produkowanych przez zwierzęta spowodzi niebezpieczeństwo zarażenia chorobami odzwierzęcymi, na przykład BSE (choroba szalonych krów). Jednakże, jako „bioreaktory” będą na pewno wykorzystywane tylko zwierzęta wszechstronnie przebadane i oczywiście zdrowe.

Transgeniczne rośliny są także uważane za bardzo ważne i przyszłościowe źródło rekombinowanych białek, w szczególności takich, które mogą być wykorzystane jako leki. Produkcja farmaceutyków w transgenicznych roślinach

ma wiele zalet. Pod względem wyposażenia technicznego i kosztów o wiele łatwiej jest wytwarzać obce białka w transgenicznych roślinach, niż w transgenicznych zwierzętach. Już od kilku lat próbuje się wytwarzać w roślinach białka o potencjalnym znaczeniu leczniczym — ludzką albuminę krwi, interferon, enkefalinę, hemoglobinę, przeciwciała, antygeny wirusowe i bakteryjne, a nawet takich produktów jak poliestry, stosowane jako plastikowe opakowania (MOFFAT 1992). Szczególnie ekscytująca jest możliwość produkcji aktywnych immunologicznie antygenów. Wykazano na zwierzętach do-

świadczalnych, że niektóre z tych antygenów są aktywne po podaniu doustnym. Stwarza to możliwość wykorzystania w przyszłości transgenicznych roślin do masowej produkcji jadalnych szczepionek. W transgenicznych roślinach można także wytwarzać praktycznie każde przeciwciało. Takie roślinne przeciwciała (ang. plantibodies) można następnie izolować i wykorzystywać w diagnostyce i w leczeniu ludzi i zwierząt. Można je także wykorzystywać *in situ* w roślinach, jako jadalne szczepionki lub bezpośrednio do ochrony roślin przed patogenami.

TRANSGENICZNE ZWIERZĘTA

Na temat transgenicznych zwierząt i możliwości ich wykorzystania jako „żywych” bioreaktorów napisano wiele publikacji przeglądowych (JANNE i współaut. 1994, LUBOŃ 1998, HOUEBINE 1995, ZWIERZCHOWSKI 1998), a nawet opublikowano na ten temat książkę (HOUEBINE 1998).

Najpowszechniej stosowaną techniką wprowadzania nowej informacji genetycznej do genomu zwierząt jest mikroiniekcja DNA do męskiego przedjądrza zygoty (Ryc. 1). Z nielicznymi wyjątkami, tą właśnie technikę wykorzystywano do uzyskania transgenicznych zwierząt gospodarskich. Inne metody stosowano rzadko, a ich skuteczność nie została jeszcze sprawdzona. Próbowano wprowadzać DNA bezpośrednio do komórek zarodków za pomocą elektroporacji. Jako wektory do transferu genów wykorzystywano rekombinowane retrowirusy lub plemniki opłaszczone DNA. Po krótkiej hodowli *in vitro* zarodki przenoszono do matek zastępczych, gdzie rozwijały się aż do porodu, dając początek transgenicznym zwierzętom. Jedną z podstawowych trudności, na jaką napotyka się przy uzyskiwaniu transgenicznych zwierząt gospodarskich, jest niewielka ilość zarodków dostępnych do manipulacji, szczególnie w przy-

padku zwierząt, które rodzą zazwyczaj tylko jedno młode, na przykład bydła. Można tę trudność ominąć wykorzystując oocyty pozyskane z rzeźni, które zapładnia się *in vitro*. W ten sposób uzyskano transgeniczne krowy wytwarzające w mleku ludzką erytropoetynę i bydło (buhaja) z genem ludzkiej laktoferyny. Takie zarodki, przed przeniesieniem ich do zastępczych matek, można dodatkowo „seksować” pobierając jeden, dwa blastomery i oznaczając ich płęć metodą PCR. Zwiększy to znacznie prawdopodobieństwo uzyskania transgenicznych zwierząt o pożądanej płci, na przykład samic wytwarzających ludzkie białka w gruczole mlecznym.

Obecnie duże nadzieje wiąże się z możliwością wykorzystania klonowania do szybkiego, a być może także tańszego, wytwarzania transgenicznych zwierząt. Obce geny można wprowadzić do rosnących *in vitro* komórek, na przykład płodowych fibroblastów, a następnie jądra tych komórek transplantować do enukleowanych oocytów w celu uzyskania klonów transgenicznych zwierząt. Doniesiono już o uzyskaniu tym sposobem transgenicznej owcy wyposażonej w gen IX czynnika krzepliwości krwi (SCHNIEKE i współaut. 1997).

GRUCZOŁ MLECZNY JAKO BIOREAKTOR

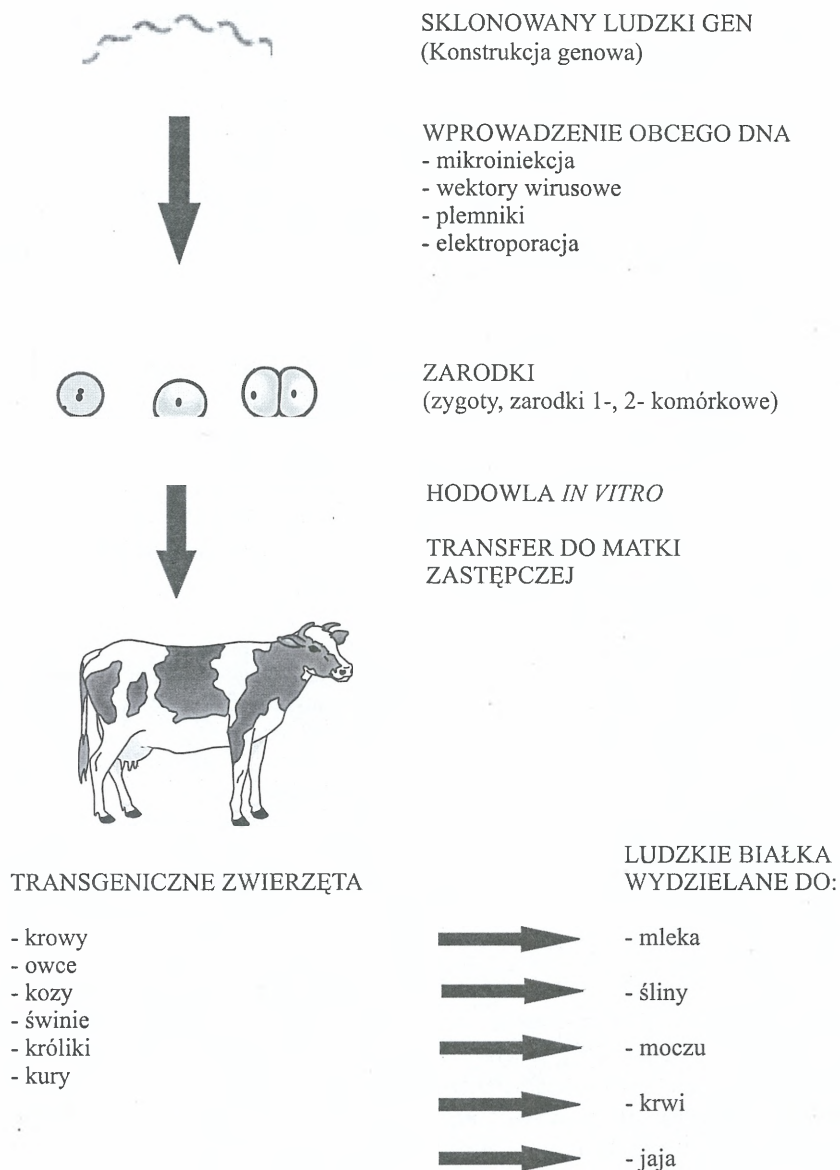
Gruczoł mleczny jest atrakcyjnym celem dla inżynierii genetycznej. Jest on czymś w rodzaju naturalnej fabryki białek, które są syntetyzowane w ogromnych ilościach i wydzielane na zewnątrz, co umożliwia ich odzyskanie bez konieczności zabijania zwierzęcia. Gruczoł mleczny jest miejscem potranslacyjnej modyfikacji białek, która bardzo często jest niezbędna dla ich biologicznej aktywności. Jak jednak wykazano, nie zawsze obce gatunkowo białka syntetyzowane w gruczole mlecznym transgenicznych zwie-

rząt podlegają prawidłowym modyfikacjom potranslacyjnym. Na przykład tylko około 1/3 ludzkiego białka C wytwarzanego przez transgeniczne myszy i świnię jest aktywna biologicznie. Prawdopodobieństwo prawidłowej modyfikacji potranslacyjnej białka można zwiększyć wprowadzając dodatkowy gen, którego produkt — enzym — uczestniczy w modyfikacji białek. Jak wykazali DREWS i współaut. (1995) wprowadzenie do genomu transgenicznych zwierząt wytwarzających ludzkie białko C dodatkowego

genu furyny, enzymu modyfikującego na drodze specyficznej proteolizy białka krwi, pozwoliło na zwiększenie ilości aktywnego biologicznie białka C.

uzyskano wiele transgenicznych myszy, do genomu których wprowadzono obce geny białek mleka lub konstrukcje genowe wyposażone w promotory genów białek mleka. Mysz była też

TRANSGENICZNE ZWIERZĘTA JAKO BIOREAKTORY



Ryc. 1. Transgeniczne zwierzęta.

Jako model doświadczalny do testowania technik transgenezy wykorzystano myszy, najlepiej poznane i najłatwiejsze do hodowli zwierzęta laboratoryjne. Pierwsze myszy transgeniczne, wytwarzające w mleku obce gatunkowo białko, uzyskali uczeni z Edynburga — SIMONS i współaut. (1987). Wytwarzały one w gruczole mlecznym owczą β -laktoglobulinę, białko serwatki, które nie występuje normalnie w mleku gryzoni. Od tego czasu, w wielu laboratoriach

pierwszym transgenicznym zwierzęciem wytwarzającym w gruczole mlecznym ludzkie białko lecznicze — ludzki tkankowy aktywator plazminogenu (GORDON i współaut. 1987). W mleku transgenicznych myszy uzyskano także ekspresję wielu innych białek ludzkich, o potencjalnym znaczeniu leczniczym (literatura — patrz ZWIERZCHOWSKI 1998). W większości, badania te miały na celu przetestowanie różnych konstrukcji genowych i promotorów zapewniających

wysoką ekspresję wprowadzonego genu po to, żeby takie same konstrukcje wykorzystać następnie do tworzenia transgenicznych zwierząt gospodarskich.

ktoglobuliny, IX czynnik krzepnięcia krwi człowieka lub ludzką α 1-antytrypsynę (SIMONS i współaut. 1988). Początkowo stężenie ludzkich białek w mleku owiec było stosunkowo niskie

Tabela 1. Ekspresja ludzkich białek w mleku transgenicznych zwierząt gospodarskich.

| Białko | Zwierzę | Ekspresja | Aktywność biologiczna; ewentualne działanie lecznicze |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------------|---|
| Tkankowy aktywator plazminogenu | Królik Koza | 50 ng/ml 3 μ g/ml | Proteaza przekształcająca plazminogen w plazminę; rozpuszczanie zakrzepów |
| Interleukina-2 | Królik | 430 ng/ml | Stymulacja proliferacji komórek T; powstawanie odpowiedzi immunologicznej |
| α -Glukozydaza | Królik | b.d. ¹ | Metabolizm glikogenu; leczenie genetycznie uwarunkowanych zaburzeń odkładania glikogenu — choroba Pompea |
| IGF-I | Królik | 1 mg/ml | Wzrost i różnicowanie komórek i tkanek; wzrost organizmu |
| NGF | Królik | 50–250 μ g/ml | Pobudzanie wzrostu neuronów; dysfunkcje neurologiczne centralnego i obwodowego układu nerwowego |
| Dysmutaza nadtlenkowa | Królik | 3 mg/ml | Przekształcenie anionów nadtlenkowych w H ₂ O ₂ ; liczne zastosowania terapeutyczne związane z obniżaniem stężenia wolnych rodników |
| GH | Królik Koza | 50 μ g/ml 12–60 ng/ml | Wzrost i różnicowanie komórek; regulacja wzrostu organizmu; karłowatość i starzenie |
| α 1-antytrypsyna | Owca | 35–60 mg/ml | Hamowanie aktywności elastazy; zapobieganie uszkodzeniom tkanek przez tą proteazę; mukowiscydoza, choroba pęcherzyków płucnych |
| Czynnik IX | Owca | 0,25mg/ml | Krzepnięcie krwi; hemofilia typu B |
| Czynnik VIII | Owca Świnia | b.d. 2,7 μ g/ml | Krzepnięcie krwi; hemofilia typu A |
| Erytropoetyna | Owca Krowa Królik | 0,5 mg/ml b.d. 50 mg/ml | Pobudzanie proliferacji i dojrzewania macierzystych komórek krwiotwórczych; erytropoeza, tworzenie czerwonych ciałek krwi; anemia; zwiększenie wydolności fizycznej |
| Antytrombina III | Koza | b.d. | Hamowanie aktywności trombiny; czynnik przeciwzakrzepowy |
| Albumina krwi | Koza | 16 mg/ml | Składnik krwi; transfuzje |
| Laktoferyna | Krowa | 1 mg/ml | Działanie przeciwbakteryjne; transport żelaza od matki do potomstwa; składnik odżywek dla dzieci; sepsis |

¹Brak danych

W ciągu kilkunastu lat jakie upłynęły od pierwszych doświadczeń nad transgenezą, nie tylko uzyskano wiele zwierząt transgenicznych — laboratoryjnych i gospodarskich — 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 dolarów rocznie. Wyniki badań prowadzonych w laboratoriach tych przedsiębiorstw rzadko są publikowane. Listę (zapewne niepełną) transgenicznych zwierząt gospodarskich wytwarzających w gruczole mlecznym ludzkie białka lecznicze pokazano w Tabeli 1.

Jako pierwsze uzyskano w Roslyn koło Edynburga transgeniczne owce wytwarzające w mleku, pod kierunkiem promotora owczej β -la-

(rzędu kilku ng/ml). Jednak z późniejszych doniesień z tego samego laboratorium wynika, że udało się uzyskać transgeniczne owce wytwarzające średnio 35 g, a maksymalnie aż 60 g ludzkiej α -antytrypsyny na litr mleka (WRIGHT i współaut. 1991). Białko było w pełni aktywne biologicznie. 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, świnie wytwarzające białko C lub VIII czynnik krzepliwości krwi oraz króliki wytwarzające interleukinę-2, ludzki tPA lub IGF-I. Aby skierować ekspresję obcych gatunkowo białek do gruczołu mlecznego stosowano promotory różnych genów białek mleka. Jako jeden z pierwszych wykorzystano do tego celu promotor owczej β -laktoglobuliny, który

okazał się „silny” i specyficzny. U większości zwierząt transgenicznych ekspresja genów ludzkich białek połączonych z tym promotorem zachodziła w gruczole mlecznym. W innych doświadczeniach wykorzystano promotory mysiego i króliczego genu kwaśnego białka serwatki — WAP, kazeiny β królika, bydłowej kazeiny α S1, LTR wirusa MMTV i inne.

Wysokie stężenie ludzkich białek w mleku niektórych z tych transgenicznych zwierząt rokuje nadzieje na rychle praktyczne wykorzystanie transgenezy do produkcji ludzkich farmaceutyków. Chociaż, o ile mi wiadomo, żadne z białek produkowanych w ten sposób nie zostało jeszcze dopuszczone na rynek farmaceutyczny, to niektóre z nich (np. antytrombina wytwarzana przez transgeniczne kozy) pomyślnie przeszły pierwsze testy kliniczne.

Planuje się wykorzystanie jako „żywych bioreaktorów” różnych gatunków zwierząt, ale przede wszystkim tych, uważanych za typowe zwierzęta mleczne — krów, kóz i owiec. Jednak brane są pod uwagę także inne — na przykład świnię i króliki. Oczywiście mleczna krowa byłaby najlepszym „bioreaktorem”. Szacuje się, że krowa wyposażona w ludzki gen połączony z promotorem genu kazeiny — α S1 byłaby zdolna wyprodukować rocznie 60–80 kg ludzkiego białka (oczywiście pod warunkiem, że ekspresja tego białka dorównywałaby ekspresji kazeiny krowiej). Taka krowa mogłaby zaspokoić całe światowe zapotrzebowanie na białko lecznicze. Trzeba jednak wziąć pod uwagę, że uzyskanie transgenicznej krowy jest bardzo kosztowne. Koszty wytworzenia jednej krowy z aktywnym transgenem szacuje się na 300–500 tys. dolarów. Jeśli zaś w początkowym etapie uzyskamy transgenicznego samca, jak to miało miejsce w przypadku buhaja Hermana z genem ludzkiej laktoferyny (KRIMPENFORT i współaut. 1991), to na jego laktujące córki trzeba będzie czekać kilka lat.

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. Wytwarzają one dość duże, w stosunku do swoich rozmiarów, ilości mleka. Niektórzy autorzy (VELANDER i współaut. 1997) uważają, że to świnię ma najwięcej zalet zarówno jako model doświadczalny, jak i przy-

szły 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 świnię nie jest typowym zwierzęciem mlecznym, to od laktującej maciory można uzyskać około 300 litrów mleka rocznie.

Planuje się także wykorzystanie jako żywych „bioreaktorów” znacznie mniejszych zwierząt transgenicznych, na przykład królików. Stężenie białka w mleku królika jest trzy razy większe niż w mleku krowy, a poza tym, transgeniczne króliki można łatwiej otrzymać a następnie rozmnożyć, niż inne zwierzęta. Króliki można doić mechanicznie i, podobno, uzyskać nawet do 100 ml mleka dziennie od jednej karmiącej samicy. 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 królików. Do wytworzenia 21 kg antytrombiny III trzebaby już użyć 3 transgenicznych krów lub aż 3750 królików (WALL i współaut. 1997). 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.

Inny kierunek badań nad transgenezą gruczołu mlecznego to zastosowanie inżynierii genetycznej do modyfikacji składu mleka tak, aby uzyskać bardziej wartościowy produkt spożywczy. Planuje się na przykład „humanizację” mleka przeżuwalcy przez wprowadzenie do genomu tych zwierząt dodatkowych genów białek mleka człowieka, a nawet zastąpienie genów bydłych genami ludzkimi (literatura — patrz ZWIERZCHOWSKI 1998). W odniesieniu do zwierząt gospodarskich są to na razie tylko plany. Skomplikowane manipulacje genetyczne przeprowadzono dotychczas tylko na myszach. Wymianę genów można przeprowadzić u zwierząt jedynie metodą homologicznej rekombinacji, wykorzystując linie pierwotnych komórek zarodkowych (ESC); takie komórki są, jak na razie, dostępne tylko u myszy.

INNE ZWIERZĘCE BIOREAKTORY

Nie tylko gruczoł mleczny transgenicznych zwierząt może być miejscem syntezy obcych gatunkowo białek. Badania nad produkcją lu-

dzkich białek we krwi zwierząt także mają już dość długą tradycję. Doświadczenia przeprowadzone na myszach przez BRINSTERA i współaut.

(1983) wykazały, że zwierzęta transgeniczne mogą być producentami aktywnych ludzkich przeciwciał. Przymuszczalnie, możliwe będzie więc także wytwarzanie funkcjonalnych cząsteczek immunoglobulin przez zwierzęta gospodarskie. Takie zwierzęta będzie można uzyskać przez wprowadzanie konstrukcji genowych składających się z genów kodujących ciężki i lekki łańcuch immunoglobuliny lub zwierząt wyposażonych tylko w jeden gen — łańcucha ciężkiego albo lekkiego — a następnie ich krzyżowanie w celu otrzymania zwierząt wytwarzających kompletne przeciwciała. Można będzie w ten sposób wytwarzać specyficzne przeciwciała — poli- lub monoklonalne, które będą wykorzystywane do leczenia ludzi lub w diagnostyce chorób. Uzyskano już transgeniczne świnię i owcę wykazujące ekspresję IgA w plazmie krwi lub w limfocytach w ilości około 1 mg przeciwciała na ml krwi. Przeciwciała te miały zdolność wiązania odpowiednich antygenów (WEIDLE i współaut. 1991).

Krew transgenicznych zwierząt może być także źródłem ludzkich białek krwi, na przykład hemoglobiny. Uzyskano transgeniczne świnię

wytwarzającą w komórkach krwi około 9% ludzkiej hemoglobiny o zdolności wiązania tlenu identycznej, jak dla hemoglobiny z krwi człowieka (SWANSON i współaut. 1992).

KERR i współaut. (1998) wykazali, że bioreaktorem może być także pęcherz moczowy transgenicznych zwierząt. Uzyskali oni transgeniczne myszy z genem hormonu wzrostu (GH) człowieka, wyposażonym w promotor genu uroplakiny II, które wytwarzały w moczu do 500 ng/ml ludzkiego białka. Autorzy, nie bez słuszności argumentują, że pęcherz moczowy jest lepszym bioreaktorem niż gruczoł mleczny, gdyż umożliwia wykorzystanie zwierząt obu płci, a nie tylko laktujących samic. Ponadto, w moczu jest niewiele białek, co pozwoli na łatwiejsze oczyszczenie produktu transgeny. W publikacjach przeglądowych wspomina się także o możliwości produkcji ludzkich białek w innych wydzielinach zwierząt, na przykład w ślinie lub w produktach zwierzęcych, na przykład w jajach kurzych. Jajko pochodzące od transgenicznej kury mogłoby być niejako gotową do użytku kapsułą z lekiem. Takich możliwości jednak na razie jeszcze nie zrealizowano.

TRANSGENICZNE ROŚLINY JAKO BIOREAKTORY

O możliwości wykorzystania transgenicznych roślin jako producentów rekombinacyjnych białek pisał między innymi FRANKEN i współaut. (1997).

Wektorem najczęściej wykorzystywanym do genetycznej transformacji roślin jest plazmid Ti *Agrobacterium tumefaciens*, bakterii powodującej powstawanie narośli nowotworowych u roślin dwuliściennych (Ryc. 2). Inne metody, takie jak bezpośrednia elektroporacja DNA do protoplastów roślinnych, transfekcja przy pomocy glikolu polietylenowego, ko-precypitacja DNA z chlorkiem wapnia, „bombardowanie” całych roślin lub ich komórek, za pomocą specjalnych działek genowych, są stosowane do wprowadzania genów do roślin jednoliściennych. Większość z tych metod wprowadzania obcego DNA wymaga izolacji protoplastów, ich hodowli *in vitro*, a następnie odtwarzania całych roślin.

O uzyskaniu pierwszych transgenicznych roślin doniesiono w 1983 roku (HERRERA-ESTELLA i współaut. 1983). Od tego czasu wytworzono wiele rekombinowanych białek w transgenicznym tytoniu, soi, pomidorze, ziemniaku i bana-

nie. Genetycznie zmodyfikowane rośliny mają wiele zalet w porównaniu do innych systemów, takich jak transgeniczne zwierzęta, rekombinowane bakterie czy transfekowane komórki. Jednak chyba najważniejszą z tych zalet jest niski koszt ich wytwarzania (LARRICK i współaut. 1998). Wyliczono w przybliżeniu koszty produkcji białek w różnych gatunkach roślin zakładając, że zawartość rekombinowanego białka osiągnie 10% całkowitego białka rośliny. Najtańsze byłyby koszty produkcji takich białek w soi (około 5 dolarów USA za kilogram), niewiele wyższe w lucernie, kukurydzy i słoneczniku. Cena rekombinowanego białka wytwarzanego w orzeszkach ziemnych osiągnęłaby już 26 dolarów za kilogram, a w najdroższych pod tym względem ziemniakach — 60 dolarów. Szacuje się, że produkcja rekombinowanych białek w soi byłaby 10–50 razy tańsza niż produkcja tego samego białka w bakterii *E. coli*. Rośliny są najtańszym źródłem jadalnych białek; możliwe, że w niedalekiej przyszłości będą także najtańszym źródłem białek rekombinacyjnych.

PRZECIWCIAŁA

O możliwości wytwarzania ludzkich przeciwciał w transgenicznych roślinach pisał między innymi

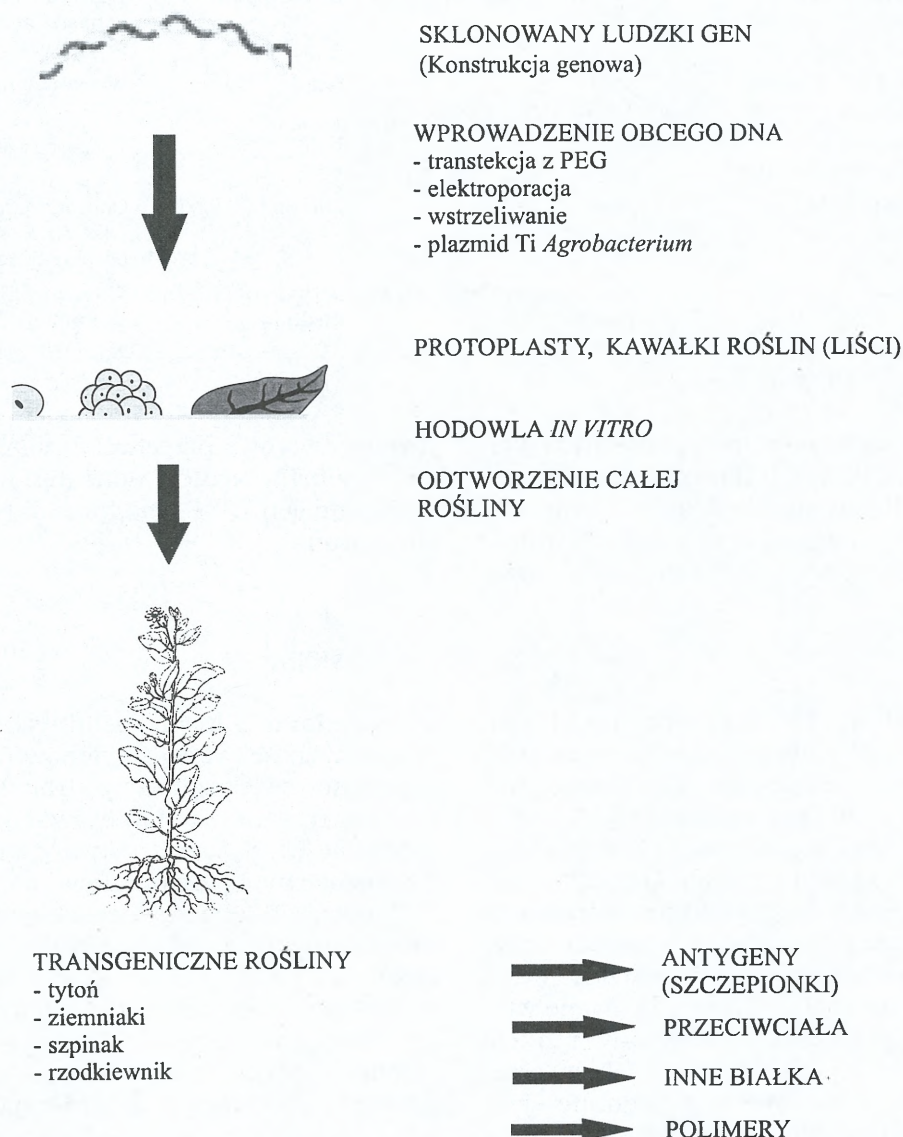
innyymi LARRICK i współaut. 1998. Pierwsze przeciwciała wyprodukowali w transgenicznych

roślinach w latach 80. dwaj niemieccy doktoranci — Steiger i During (patrz LARRICK i współaut. 1998). Ponieważ aktywne przeciwciała są zazwyczaj zbudowane z kilku łańcuchów białkowych połączonych wiązaniami dwusiarczkowymi, a w pierwszych doświadczeniach do rośliny wprowadzano gen kodujący tylko jeden łańcuch białkowy, uzyskanie aktywnego przeciwciała wymagało krzyżowania i selekcjonowania roślin potomnych. Późniejsze doświadcze-

przeciwciała, które przechodzą w ich komórkach procesy potranslacyjnej modyfikacji i tworzenia struktur II i III-rzędowych. Jedyna różnica wynika z innego przebiegu glikozylacji; roślinne przeciwciała nie zawierają kwasu N-acetylonuraminowego, który zazwyczaj stanowi główną końcową resztę cukrową złożonych glikanów u ssaków.

Trzy potencjalne leki o działaniu immunoterapeutycznym, wytwarzane w transgenicz-

TRANSGENICZNE ROŚLINY JAKO BIOREAKTORY



Ryc. 2. Transgeniczne rośliny.

nia wykazały, że do jednej rośliny można wprowadzić geny kodujące całe wielołańcuchowe przeciwciała. Listę przeciwciał produkowanych w transgenicznych roślinach przedstawiono w Tabeli 2. Rośliny „potrafią” wytwarzać gotowe

roślinach, przechodzą obecnie testy kliniczne. Są to przeciwciała SIgA przeciw bakterii *Streptococcus mutans*, głównego patogenu jamy ustnej, powodującego próchnicę zębów (MA i współaut. 1998). Przeciwciała to, pod nazwą

Tabela 2. Ekspresja przeciwciał i innych białek układu odpornościowego w transgenicznym roślinach

| Przeciwciało | Roślina | Ekspresja | Aktywność biologiczna ewentualnie działanie lecznicze |
|--|---|-------------------------------------|--|
| Przeciwciała Fv (przeciw wirusowi mozaikowatości) | Tytoń, ziemniak | 4,0–6,8% BR ¹ 3–4% BR | Aktywne biologicznie; w nasionach — trwałe |
| Czynnik stymulujący kolonie granulocyтарно-makrofagowe — GM-CSFT | Tytoń | b.d. | Aktywny biologicznie; stymuluje proliferację komórek FDC-P1. |
| Przeciwciała monoklonalne przeciw wirusowi opryszczki | Soja | b.d. | Zapobiegają zakażeniom wirusem HSV2 w pochwie myszy |
| Przeciwciała IgG fragment FAB | Rzodkiewnik pospolity | b.d. | Wiązanie odpowiednich antygenów |
| Jednonicowe przeciwciała Fv przeciw haptenowi (okszazon) | Tytoń (nasiona) | do 0,67% BR | Wiązanie antygeny; w nasionach aktywne przez rok |
| Przeciwciała FAB i IgG przeciw kinazie kreatyninowej człowieka | Tytoń Rzodkiewnik pospolity | b.d. | Wiązanie antygeny |
| Przeciwciała dAb przeciw neuropeptydowi — substancji P | Tytoń | b.d. | Wiązanie antygeny |
| Przeciwciała SIgA przeciw <i>S. mutans</i> | Tytoń | 200 do 500 µg/g | Ochrona jamy ustnej przed bakterią <i>S. mutans</i> ; leczenie próchnicy zębów u ludzi |
| Interleukina-2 Interleukina-4 | Tytoń (komórki hodowane <i>in vitro</i>) | 0,28 do 0,8 µg/ml medium | Aktywne biologicznie; stymulacja proliferacji komórek CTL-2 |

¹% białek rozpuszczalnych

CaroRxTM, wytwarzane w transgenicznym tytoniu przez firmę PLANET Biotech, przeszło pomyślnie fazę II badań klinicznych. Inne leki wytwarzane w transgenicznym roślinach poddawane obecnie testom klinicznym, to prze-

ciwnowotworowe przeciwciała IgA produkowane przez firmy NeoRx/Monsanto i Agracetus, a także antygen LT *E. coli*, produkt firmy Boyce Thompson.

ANTYGENY (SZCZEPIONKI)

Możliwościom wytwarzania jadalnych szczepionek w roślinach poświęcono wiele artykułów przeglądowych (m. in. MOR i współaut. 1998). Pomysł produkcji szczepionek w transgenicznym roślinach został przedstawiony przez MASON i współaut. (1992). Od tego czasu genetycznej transformacji poddano różne rośliny wprowadzając do nich geny kodujące antygeny wirusowe i bakteryjne. Wytwarzane w ten sposób białka na ogół zachowywały swoje właściwości antygenowe i wywoływały reakcję immunologiczną po wstrzyknięciu ich zwierzętom doświadczalnym. Niekiedy podobny efekt obserwowano po podaniu doustnym.

Na ogół uzyskiwano dość małą akumulację produkowanych białek w tkankach roślinnych: od 0,001% całego rozpuszczalnego białka w przypadku glikoproteiny wirusa wścieklizny w transgenicznym pomidorach do 0,3% podjednostki B toksyny cholery (Tabela 3). Próby zwiększenia ekspresji polegają między innymi na

wykorzystaniu silnych roślinnych promotorów i roślinnych sekwencji regionów 5' i 3' genów, co powinno zwiększać tempo transkrypcji wprowadzonych genów i stabilizować mRNA. Enterotoksynę LT-B *E. coli* wytwarzano w bulwach transgenicznym ziemniaków w ilościach od 0,01% wszystkich rozpuszczalnych białek (HAQ i współaut. 1995) do około 0,15% (MASON i współaut. 1998). Ponieważ u myszy karmionych transgenicznymi ziemniakami antygen ten okazał się aktywny i wywoływał reakcję immunologiczną, postanowiono przetestować go także na ludziach (TACKET i współaut. 1998). Jest to pierwsza na świecie szczepionka pochodząca z transgenicznej rośliny, poddawana testom klinicznym na ludziach. U ochotników, którzy zjadali od 50 do 100 g surowych ziemniaków (odpowiednik około 0,5–1,0 mg LT-B), dochodziło do powstania przeciwciał i do odpowiedzi immunologicznej, zarówno lokalnej (w śluzówce jelita), jak i systemowej.

W dotychczas przeprowadzonych doświadczeniach, do produkcji szczepionek (antygenów) najczęściej wykorzystywano tytoń i ziemniaki jako rośliny, które stosunkowo łatwo poddają się transformacji genetycznej. Jednak ani tytoń ani nawet ziemniaki nie mogą być dobrym źródłem jadalnych szczepionek. Roślin tych nie spożywa się w stanie surowym, a gotowanie na ogół inaktywuje wytwarzane białka. Co prawda uzyskano już produkcję obcych antygenów w pomidorach (MACGARVEY i współ-

ogół niewiele białek, dlatego stężenie obcego białka także nie może być w nich wysokie. Pod tym względem idealne wydają się ziarna różnych roślin, w których stężenie białek jest bardzo wysokie. Mogą być one bez szkody dla zawartych w nich białek przechowywane przez dość długi czas, a ponadto można je spożywać w stanie surowym.

Ostatnio doniesiono o wyprodukowaniu w polskim laboratorium w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN, transgenicznej sałaty zawierają-

Tabela 3. Ekspresja antygenów — potencjalnych szczepionek — w transgenicznych roślinach

| Antygen | Roślina | Ekspresja | Aktywność biologiczna, ewentualne działanie lecznicze |
|--|-----------------------------------|-----------------------------|--|
| Antygeny wirusowe | | | |
| Antygen wirusa żółtaczk B | Tytoń | 0,01% BR ¹ | Immunizacja myszy po podaniu pozajelitowym |
| Glikoproteiny wirusa wścieklizny | Pomidor Tytoń Szpinak | bardzo niska (0,001% BR) | Neutralizacja przeciwciał; immunizacja myszy po podaniu pozajelitowym |
| Białko kapsydu wirusa MEV (zapalenia jelita norki) | Fasola | b.d. | Po podaniu podskórnym uodparnia norkę przed zakażeniem wirusem MEV |
| Białka kapsydu wirusa Norwalk | Ziemniak Tytoń | 10–20 µg/g 0,23% BR | U myszy, indukcja przeciwciał w błonach śluzowych i we krwi |
| Białko VP1 kapsydu wirusa pryszczycy | Rzodkiewnik pospolity | b.d. | Uodpornienie myszy na wirus pryszczycy po podaniu dootrzewnowym |
| Antygen wirusa żółtaczk B | Sałata | b.d. | Indukcja przeciwciał po zjedzeniu sałaty |
| Antygeny bakteryjne | | | |
| Enerotoksyna LT-B <i>E. coli</i> | Ziemniak | 0,15% BR (3–4 µg/g) | U ludzi i u myszy, indukcja przeciwciał we krwi i błonach śluzowych po zjedzeniu surowych ziemniaków |
| Toksyna CT-B przecinkowca cholery | Ziemniak | 30 µg/g (0,3 % BR) | Immunizacja myszy po podaniu doustnym |
| Dekarboksylaza kwasu glutaminowego (autoantygen związany z cukrzycą) | Rzodkiewnik pospolity Ziemniak | ~ 0,4 % BR 150 µg/g | Podawane w paszy hamuje rozwój cukrzycy u myszy cukrzycowych |

¹% białek rozpuszczalnych

laut. 1995), ale była ona bardzo niska. Transformowano także banany (CLENDENNEN i współaut. 1997), które, jak się wydaje, mogą być bardzo dobrym źródłem jadalnych szczepionek. Trzeba jednak pamiętać, że owoce zawierają na

jącej antygen wirusa żółtaczk B (KAPUSTA, 1999). Po dwukrotnym, w odstępie 2 miesięcy, zjedzeniu transgenicznej sałaty ludzie wytwarzali przeciwciała w ilości, która powinna zapobiec zakażeniom wirusem.

INNE BIAŁKA

W roślinach transgenicznych można także wytwarzać inne białka ludzkie o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym lub spożywczym. Ekspresja α-laktoalbuminy w ziemniaku i tytoniu osiągała poziom 5 µg na gram świeżych liści (TAKASE I HAGIVARA 1998). Białko było biochemicznie identyczne z natywną α-laktoalbuminą izolowaną z ludzkiego mleka. W transgenicznych ziemniakach uzyskano ekspresję innego białka mleka człowieka — kazeiny β CHONG i współaut. 1997). Było ono immunologicznie

identyczne z kazeiną izolowaną z ludzkiego mleka, a jego stężenie w liściach i bulwach osiągało około 0,01% wszystkich białek rozpuszczalnych. Także laktoferyna ludzka wytwarzana w roślinach tytoniu była biochemicznie nieodróżnialna od natywnego białka; wiązała się z receptorami w komórkach T i HT29-18-C1 (SALMON i współaut. 1998). Co więcej, obecność laktoferyny powodowała odporność tytoniu na zakażenie bakterią *Ralstonia solanacearum* (ZHANG i współaut. 1998). Jej ekspresja była na poziomie

0,1–0,8% wszystkich białek rozpuszczalnych. Badania te wykazały, że możliwa jest ekspresja białek mleka ludzkiego w jadalnych roślinach, co, być może, pozwoli w przyszłości wytwarzać takie odżywki dla niemowląt, które będą cennym substytutem ludzkiego mleka. Dodatkowo, dzięki obecności laktoferyny, będzie chronić dzieci przed zakażeniami bakteryjnymi przewodu pokarmowego.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że perspektywy wytwarzania różnych białek w trans-

genicznych zwierzętach i roślinach są całkowicie realne i niezbyt odległe. Szczególnie ekscytująca wydaje się możliwość wytwarzania w ten sposób białkowych leków wykorzystywanych w medycynie. Trzeba jednak pamiętać o tym, że droga „od pomysłu do przemysłu” bywa niekiedy daleka. Szczególnie procedura testowania i zatwierdzania leków jest długa i skomplikowana. Dlatego, jak sądzę, pierwsze transgeniczne farmaceutyki pojawią się na rynku nie wcześniej niż za około 5 lat.

TRANSGENIC ANIMALS AND PLANTS — BIOREACTORS OF THE FUTURE

S u m m a r y

Recombinant DNA technology has enabled construction of transgenic organisms — animals and plants. These organisms can produce large amounts of foreign proteins, including human proteins of potential pharmaceutical use. Mammary gland is the most promising „animal bioreactor”. There is a growing list of human proteins expressed in transgenic animals under the control of milk protein gene promoters: blood clotting factors VIII and IX, α -antitrypsin, tissue plasminogen activator, antithrombin and others. Projects to produce human proteins in animal blood and

urine are also in progress. Plants can also express a wide variety of foreign proteins. Some transgenic plants that have been constructed, are capable of producing human proteins of potential pharmaceutical use. These include viral and bacterial antigens, poly- and monoclonal antibodies, and even human milk proteins. Some antigens produced by transgenic plants proved to be immunogenetic, upon oral application, thus opening an exciting possibility for producing food-based „edible vaccines”.

LITERATURA

- BRINSTER R. L., RITCHE K. A., HAMMER R. E., O'BRIEN R. L., ARP B., STROB U., 1983. *Expression of a microinjected immunoglobulin gene in the spleen of transgenic mice.* Nature 306, 332–336.
- CHONG D. K., ROBERTS W., ARAKAWA T., ILLES K., BAGI G., SLATTERY C. W., LANGRIDGE W. H., 1997. *Expression of the human milk protein beta-casein in transgenic potato plants.* Transgenic Res. 6, 289–96.
- CLENDENEN S. K., LOPEZ-GOMEZ R., GOMEZ-LIM M., ARNZEN C. J., MAY G. D., 1997. *The abundant 31-kilodalton banana pulp protein is homologous to class-III acidic chitinases.* Phytochemistry 47, 613–619.
- DREWS R., PALEYANDA R. K., LEE T. K., CHANG R. G., REHETTULLA A., KAUFMAN R. J., DROHAN W. D., LUBOŃ H., 1995. *Proteolytic maturation of protein C upon engineering of the mouse mammary gland to express furin.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 10462–10466.
- FRANKEN E., TEUSCHEL U., HAIN R., 1997. *Recombinant proteins from transgenic plants.* Curr. Opin. Biotechnol. 8, 411–416.
- GORDON, K. LEE, E. VITALE, J. A. SMITH, A. E. WESTPHAL, H. HENNIGHAUSEN, L., 1987. *Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk.* Biotechnology 5, 1183–1192.
- HAG T. A., MASON H. S., CLEMENTS J. D., ARNZEN C. J., 1995. *Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants.* Science 268, 714–716.
- HERRERA-ESTELLA L. DE BLOK M., MESSENES E., HERNALSTEENS J. P., VAN MONTAGU M., SCHELL J., 1983. *Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells.* EMBO J. 2, 987–995.
- HOUBEINE L.-M. 1995. *The production of pharmaceutical proteins from the milk of transgenic animals.* Reprod. Nutr. Dev. 35, 609–617.
- HOUBEINE L.-M., 1998 (red.), *Transgenic Animals: Generation and Use.* Harwood Academic Press Publishers.
- JANNE J., HYTINEN J. M., PEURA T., TOLVANEN M., ALHONEN L., SINERVITRA R., HALMEKYTO M., 1994. *Transgenic bioreactors.* Int. J. Biochem. 26, 859–870.
- KAPUSTA J., 1999. *Nowe podejścia w dziedzinie otrzymywania i stosowania szczepionek.* Biotechnologia — Przegląd Informacyjny 3, 94–105.
- KERR D. E., LIANG F., BONDIOLI K. R., ZHAO H., KREIBICH G., WALL, R. J., SUN T. T., 1998. *The bladder as a bioreactor: urothelin production and secretion of growth hormone into urine.* Nature Biotech. 16, 75–79.
- KRIMPENFORT P., RADEMAKERS A., EYESTONE W., VAN DER SCHANS A., VAN DER BROEK S., KOOIMAN E., PLATENBURG G., PIEPER F., STRIJKER R., DE BOER H., 1991. *Generation of transgenic dairy cattle using „in vitro” embryo production.* Biotechnology 9, 844–847.
- LARRICK J. W., CHEN Y. J., JAISWAL S., WYCOFF K., 1998. *Production of antibodies in transgenic plants.* Res. Immunol. 149, 603–608.
- LUBOŃ H., 1998. *Transgenic animal bioreactors in biotechnology and production of blood proteins.* Biotechnol. Annu. Rev. 4, 1–54.
- MA J. K.-C., HIKMATK B. Y., WYCOFF K., VINE N. D., CAHRGELEGUE D., Y, L., HEIN M., 1998. *Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans.* Nat. Med. 4, 601–606.
- MASON H. S., HAG T. A., CLEMENTS J. D., ARNZEN C. J., 1998. *Edible vaccine protects mice against Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene.* Vaccine 16, 1336–43.
- MASON H. S., LAM D. M. K., ARNZEN C. J., 1992. *Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 11745–11749.
- MACGARVEY P. B., HAMMOND J., DIENELT M. M., HOOPER D. C., FU Z. F., DIETZSCHOLD B., KOPROWSKI H., MICHAELS F. H., 1995. *Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes.* Biotechnology 13, 1484–1487.
- MOFFAT A. S., 1992. *High-tech plants promise a bumper crop of new products.* Science 256, 770–771.
- MOR T. S., GÓMEZ-LIM MA., PALMER K. E., 1998. *Perspective: edible vaccines — a concept coming of age.* Trends Microbiol. 6, 449–453.

- SALMON V., LEGRAND D., SLOMIANNY M. C., EL YAZIDI I., SPIK G., GRUBER V., BOURNAT P., OLAGNIER B., MISON D., THEISEN M., MEROT B., 1998. *Production of human lactoferrin in transgenic tobacco plants*. Protein Expr. Purif. 13, 127-135.
- SCHNIEKE A. E. KIND A. J. RITCHIE W. A. MYCOCK K. SCOTT A. B. 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.
- SIMONS, J. P. MCCLENAGHAN, M. CLARK, A. J., 1987. *Alternation of the quality of milk by expression of sheep β -lactoglobulin in transgenic mice*. Nature 328, 530-532.
- SIMONS J. P. WILMUT I. CLARK A. J. ARCHIBALD A. L. BISHOP J. O. LATHE R. L., 1988. *Gene transfer into sheep*. Biotechnology 6, 179-183.
- SWANSON M. E. MARTIN M. J. O'DONNELL K. O. HOOVER K. LAGO W. HUNTRES V. PARSONS C. T., PINKERT C. A., PILDER S., LOGAN J. S., 1992. *Production of functional human hemoglobin in transgenic swine*. Biotechnology 5, 557-559.
- TACKET C. O., MASON H. S., LOSONSKY G., CLEMENTS J. D., LEVINE M. M., ARNSEN C. J. 1998. *Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato*. Nat. Med. 4, 607-609.
- TAKASE K., HAGIVARA K., 1998. *Expression of human alpha-lactalbumin in transgenic tobacco*. J. Biochem. 123, 440-444.
- VELANDER W. H. LUBON H. DROHAN W. N., 1997. *Transgeniczne zwierzęta jako fabryki leków*. Świat Nauki 3, 42-46.
- WALL R. J., KERR D., E. BONDIOLI K. R., 1997. *Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale*. J. Dairy Sci. 80, 2213-2224.
- WEIDLE U. H., LENZ H., BREM G., 1991. *Genes encoding a mouse monoclonal antibody are expressed in transgenic mice, rabbits and pigs*. Gene 98, 185-191.
- WRIGHT G., CARVER A., COTTOM D., REEVES D., SCOTT A., SIMONS P., WILMUT I., GARNER I., COLMAN A., 1991. *High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep*. Biotechnology 9, 830-834.
- ZHANG Z., COYNE D. P., VIDAVER A. K., MITRA A., 1998. *Expression of human lactoferrin cDNA confers resistance to Ralstonia solanacearum in transgenic tobacco plants*. Phytopathology 7, 730-734.
- ZWIERZCHOWSKI L., 1998. *Biotechnologiczne wykorzystanie gruczołu mlecznego — perspektywy manipulacji genetycznych białek mleka*. Biotechnologia — Przegląd Informacyjny 2, 33-56.