SZENT ISTVÁN EGYETEM

A NYÚL KAPPA-KAZEIN GÉN JELLEMZÉSE, ÉS TERMELTETÉSÉNEK HATÁSA TRANSZGÉNIKUS ÁLLATOKBAN

Doktori értekezés

Hiripi László

Gödöllő
2002

A DOKTORI ISKOLA

neve:	Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola
tudományága:	Állatenyésztési tudományok
vezetője:	Dr. Horváth László Egyetemi tanár, a mezőgazdasági tudományok doktora Szent István Egyetem
témavezető:	Dr. Bősze Zsuzsanna Tudományos főmunkatárs, biológiai tudományok kandidátusa Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont

---------- ----------

A doktori iskola vezetőjének jóváhagyása

A témavezető jóváhagyása

Rövidítések jegyzéke

• BAC	Baktériális mesterséges kromoszóma
• bp	Bázispár
• DEPC	Dietil pirokarbonát
• ECM	Extracelluláris mátrix
• EG	Ivar őssejtek
• ES	Embrionális őssejt
• FCS	Magzati borjú savó
• GFP	Zöld fluorescens fehérje
• HCG	Human chorionic gonadotropin
• ICM	Belső sejtcsomó
• ICSI	Intracitoplazmatikus sperma injektálás
• Ile	Izoleucin
• kb	Kilobázis, körülbelül
• LCR	Lókusz kontroll régió
• Leu	Leucin
• MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
• MOPS	3-N-morpholino-propanesulfonic acid
• NMR	Magmágneses rezonancia
• PBS	Foszfát pufferelt fiziológiás sóoldat
• PCR	Polimeráz láncreakció
• Phe	Fenilalanin
• PMSG	Pregnant mare serum gonadotropin
• RER	Durva felszínű endoplazmás retikulum
• RFLP	Restrikciós fragment hosszúság polimorfizmus
• RP-HPLC	Fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfia
• RT-PCR	Reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció
• SAR-MAR	Matrix attachement régió
• SDS-PAGE	Denaturáló poliakrilamid-gélelektroforézis
• TGN	Transz golgi hálózat
• ún	Úgynevezett
• WAP	Savó savas fehérje
• YAC	Élesztő mesterséges kromoszóma

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	I
TARTALOMJEGYZÉK	II
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1. Az emlősállatok tejösszetétele , és a tejfehérjék alapvető jellemzői	3
2.2. A kazeinek szerkezete és jellemzői	4
2.2.1. Az alfa1-kazein	4
2.2.2. Az alfas2-kazein	5
2.2.3. A béta-kazein	5
2.2.4. A kappa-kazein	6.
2.2.4.1. A kappa-kazein genetikai variánsai, és hatásuk a tej minőségére	10
2.2.4.2. A kappa-kazein allélvariánsok hatása tej alapvető fizikai-kémiai tulajdonságára	11
2.2.4.3. A tejfehérje variánsok szerepe a sajtgyártásban	11
2.2.4.4. A tejösszetétel és a kappa-kazein allélek kapcsolata	12
2.2.4.5. Kappa-kazein variánsok egyéb fajokban	12
2.3. A tejfehérje gének általános felépítése.	13
2.3.1. A kazein gének részletes jellemzése	13
2.3.1.1. A béta-kazein gének felépítése	14
2.3.1.2. alfas1- és az alfas2-kazein gének szerkezete	15
2.3.1.3. A kappa-kazein gének jellemzése	15
2.3.1.4. A nyúl kappa-kazein, és az őt kódoló gén jellemzése	15
2.3.2. A kazein gének evolúciója	18
2.3.3. A nyúl savó savas fehérje génjének jellemzése	19
2.4. A tejfehérje gének működésének szabályozása	19
2.4.1. A tejfehérje géneket szabályozó fontosabb transzkripciós faktorok	20
2.4.2. A transzkripciós faktorok kölcsönhatásai	22
2.4.3. A kromatin szerkezet fontossága	22
2.4.4. A laktogén hormonok szerepe a génműködés szabályozásában	23
2.4.5. Az inzulin és az inzulin szerű növekedési faktor (IGF-I) szerepe	23
2.4.6. Az extracelluláris mátrix jelentősége	24
2.5. A tejfehérjék bioszintézise, kiválasztása	25
2.5.1. A tejfehérje kiválasztás szabályozása	27

2.6. A kazein micellák felépítése 29
2.6.1. A kazeinek önasszociációja 29
2.6.2. A kappa-kazein molekulák összekapcsolódása 29
2.6.3. A kazeinek kötődése fémionokhoz 30
2.6.4. A kazeinek elhelyezkedése a micelláris struktúrában 31
2.6.5. Micella modellek 32
2.6.5.1. Mag–takaró modellek 32
2.6.5.2. Belső szerkezeti modellek 32
2.6.5.3. Alegység modellek 32
2.7. A tej alvadása, a micelláris felépítés megszűnése 34
2.7.1. A kimozin enzim hatása 35
2.7.2. A megemésztett micellák szétesése 36
2.8. Transzgénikus emlősállatok 36
2.8.1. Rövid történelem 37
2.8.2. A transzgénikus technika módszerei, ezek előnyei, illetve hátrányai 38
2.8.2.1. Mikroinjektálás 38
2.8.2.2. Retrovírus segítségével létrehozott transzgénikus állatok 38
2.8.2.3. Transzgénikus állatok spermium közvetítésével 39
2.8.2.4. Transzgénikus állatok előállítása ES sejt technológiával 40
2.8.2.5. Klónozás 40
2.8.3. A mikroinjektálás korlátjai: problémák és megoldások 41
2.8.4. A transzgénikus állatok felhasználása 42
2.8.4.1. Mezőgazdasági felhasználások 43
2.8.5. Emlőspecifikus transzgénikus állatok, "Transzgénikus bioreaktorok" 44
2.8.5.1. Transzgénikus nyulak mint bioreaktorok 46
2.8.6. A tejösszetétel megváltoztatása transzgénikus állatokban 49
2.8.6.1. A laktóz tartalom mérséklése 50
2.8.6.2. A béta-laktoglobulin csökkentése 50
2.8.6.3. A kazeinek arányának megváltoztatása transzgénikus állatokban 51
2.8.6.3.1. Kappa-kazein túltermelése 52
2.8.6.4. Egyéb tervek 53
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 55
3.1. Anyagok 55
3.1.1. Vegyszerek, kitek, enzimek 55
3.1.2. Radioaktív készítmények 55
3.1.3. Membránok 55

3.1.4. Táptalajok, inkubációs médiumok 55
3.1.5. Laboratóriumi egér és nyúl törzsek 56
3.1.6. Oligonukleotidok 56
3.1.7. Baktérium törzsek és plazmid vektorok 56
3.1.8. Oldatok 56
3.2. Módszerek 57
3.2.1. Általános nukleinsav technikák 57
3.2.1.1. Plazmid DNS izolálás 57
3.2.1.2. Genomiális DNS izolálása állati szövetekből 58
3.2.1.3. RNS izolálása állati szövetekből 58
3.2.1.4. DNS fragmentumok izolálása gélből 58
3.2.1.5. DNS és RNS gélelektroforézis 58
3.2.1.6. Southern-Northern analízis 59
3.2.1.7. Slot-blot hibridizáció 59
3.2.1.8. DNS szekvencia meghatározás 59
3.2.1.9. Radioaktív próbák készítése 60
3.2.1.10. PCR vizsgálatok 60
3.2.1.10.1. A különböző kappa-kazein genotípusú nyulak PCR vizsgálata 60
3.2.1.11. Egyéb eljárások 60
3.2.2. Transzgénikus állatok előállítása 61
3.2.2.1. Fragmentum tisztítás 61
3.2.2.2. A transzgénikus technika lépései egérben 61
3.2.2.2.1. A transzgénikus egérvonalak alapítása és fenntartása 62
3.2.2.3. A transzgénikus technika lépései nyúlban 62
3.2.2.3.1. A transzgénikus nyúl vonalak alapítása és fenntartása 62
3.2.3. Reverz transzkripció-polimeráz láncreakció (RT-PCR) 63
3.2.3.1. A PCR termékek tisztítása 63
3.2.4. Western blot analízis 63
3.2.4.1. SDS-PAGE 63
3.2.4.2. Immunfestés 63
3.2.4.3. Western analízis Slot blot segítségével. 64
3.2.5. Micella méret meghatározás 64
3.2.5.1. Micella mérés transzmissziós elektronmikroszkóp segítségével 64
3.2.6. A kazein és savó frakciók elkülönítése 65
3.2.7. Rennin emésztés 65
3.2.8. A humán VIII-as faktor koncentráció mérése 65

3.2.9. Termelési tulajdonságok meghatározása 65
3.2.10. Súlygyarapodás vizsgálata egereknél 65
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK 67
4.1. A nyúl kappa-kazein HindIII polimorfizmusa 67
4.2. Az első intron vizsgálata 69
4.3. Szekvenciaelemzések az első és a negyedik intronban 71
4.4. A nyúl kappa-kazein gén kódoló régiójának jellemzése 73
4.5. A két allélra jellemző mRNS vizsgálatok a laktáció során 74
4.6. Fehérje vizsgálatok 77
4.7. Evolúciós feltételezések 77
4.8. PCR alapú teszt kidolgozása a nyúl kappa-kazein genotípus meghatározására 77
4.9. A két allél gyakorisága 79
4.10. A nyúl kappa-kazein gén polimorfizmusa, valamint a termelési tulajdonságok kapcsolata 80
4.11. A termelési tulajdonságok, és a nyúl kappa-kazein allélok kapcsolata szelektált állományokban 82
4.12. A nyúl kappa-kazein túltermelése transzgénikus egerekben 83
4.12.1. A WAP-kappa-kazein génkonstrukció elkészítése 83
4.12.2. A kiméra génkonstrukció tesztelése 85
4.12.3. A konstrukció mikroinjektálása egér embriókba 86
4.12.4. A transzgén kimutatása az alapító egyedekben 88
4.12.5. Az integrálódott transzgén kópiaszám-meghatározása 89
4.12.6. A nyúl WAP-kappa-kazein gén kifejeződése transzgénikus egerekben RNS szinten 89
4.12.7. Szövetspecifikus megjelenés 91
4.12.8. A nyúl kappa-kazein kifejeződése fehérje szinten 92
4.12.9. A rekombináns fehérje beépülése a micellákba 93
4.12.10. A nyúl kappa-kazein termelésének hatása tej micellák méretére 94
4.12.11. A kimozin emésztés vizsgálata transzgénikus állatok tejében 97
4.12.12. A transzgénikus állatok emlőjének szöveti felépítése 98
4.12.13. A nyúl kappa-kazeint hordozó transzgénikus anyák utódnevelő képessége 98
4.13. Kapilláris viszkoziméter építése 100
4.14. Reológiai mérések 101
4.15. A nyúl kappa-kazein túltermelése transzgénikus nyulakban 102

4.15.1. A nyúl Wap-kappa-kazein gén mikroinjektálása nyúl zigótákba 102
4.15.2. A transzgén kimutatása Southern hibridizációval 104
4.15.3. A kópiaszám meghatározása az alapító egyedben 105
4.15.4. A transzgén kifejeződése a transzgénikus alapító egyedben 105
4.15.5. A micellák mérete a transzgénikus alapító nyúlban 107
4.16. Az emberi VIII-as véralvadási faktor termeltetése transzgénikus nyúlban 108
4.16.1. A transzgén detektálása 110
4.16.2. A transzgénikus homozigóta nyúlvonal létrehozása 110
4.16.3. A génkifejeződés vizsgálata 112
4.17. Új tudományos eredmények 114
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK 115
6. ÖSSZEFOGLALÁS 119
SUMMARY 121
7. MELLÉKLETEK 123
M1. Irodalomjegyzék 123
M2. Saját publikációk jegyzéke 143
M2.1. A dolgozat alapját képező publikációk 143
M2.2. Egyéb publikációk 144
KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS 146

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az emberi táplálkozásban a tej valamint a tejtermékek rendkívül fontos szerepet töltenek be. A fejlett ipari országokban a tejfehérjék az összfehérje szükségletnek több mint 30 %-át biztosítják. Természetes hogy mind az állatenyésztési, mind a genetikai kutatások már igen korán a tejfehérje gének felé fordultak. A nagyüzemi állatenyésztés során az elmúlt időszakban a tejtermelés olyan méretű növekedést mutatott, hogy a fejtett európai országokban a túltermelés miatt szükség volt a gazdasági kvóták alkalmazására is a tejtermelési ágazatban. Így talán érthető hogy egyre inkább előtérbe kerülnek azok az alapkutatások, melyeknek célja nem a mennyiségi növekedés biztosítása, hanem a speciális igényeket is kielégítő minőségi termékek létrehozása.

Ennek a célnak az elérésében a genetika illetve a molekuláris biológia több irányból is segíthet. A ritka és fontos genetikai variánsok feltárásával, valamint felhasználásával a szelekció során a genetikai előrehaladás felgyorsítható. A különböző változatok megőrzésével biztosítható az a genetikai variabilitás, mely nélkülözhetetlen előfeltétele a későbbi nemesítési programoknak. A legújabb rekombináns DNS technológiai kutatások még előrébb mutatnak. Ma már megoldott a legkülönbözőbb emlős gének -köztük a tejfehérje gének- azonosítása, jellemzése, szabályozásának vizsgálata, valamint az izolált gének sejtvonalakba és állatokba való bejuttatása és *in vivo* vizsgálata. Ez az ún. "transzgénikus" technika alkalmazható haszonállatok esetében is, így az elért eredmények közvetlenül felhasználhatóak az állatnemesítésben.

Az eljárás költségei egyelőre igen magasak, de a legfrissebb klónozási technológiák előreláthatóan csökkenthetik azokat. Az elmúlt évben a célzott génbeviteli módszerek alkalmazása megindult haszonállatok esetében is.

A fent említett okok bizonyára elegendőek annak a belátására, hogy a tej minőségének javítása transzgénikus technika alkalmazásával ígéretes lehetőségeket biztosít.

A dolgozat célkitűzései:

- A nyúl kappa-kazein gén allélvariánsainak jellemzése molekuláris biológiai módszerekkel.
- A nyúl kappa-kazein túltermeltetése transzgénikus állatokban. A termelődő rekombináns fehérje hatásának vizsgálata a tej minőségére, valamint a szoptató anyák ivadéknevelő képességre
- Az emberi nyolcas véralvadási faktor termeltetése transzgénikus nyulak tejében.

Mivel transzgénikus állatokról magyar nyelvű összefoglaló munka még nem születetett, igényét éreztem annak, hogy az irodalmi áttekintés fejezetben ez hangsúlyozottan szerepeljen. Ennek köszönhető, hogy bizonyos részek nem kapcsolódnak legszorosabban a dolgozat címéhez.

A nyúl amellett hogy kitűnő laborállat, igen fontos haszonállat -elsősorban Európa dél-nyugati felén. A húsnyúltenyésztés során nagyon fontos az a súly mely az utódokat jellemzi az anyáktól való leválasztás idejében, és ez természetesen nagymértékben függ a tej minőségétől. Így az az elképzelés hogy egy adott nyúltejfehérje gén legjobb alléljait használjuk a nemesítés során kombinálva a transzgénikus technikával, fontos gazdaságossági előnyöket is magában rejt.

Természetesen azok a kísérletek melyek a dolgozat alapját alkotják, és a tej minőségének javítását célozzák, olyan alapvető modellkísérletek is, melyek nélkül a transzgénikus haszonállatok nem hozhatóak létre.

Magyarországon a tejtermelő ágazat az elmúlt két évben nagymértékű növekedést mutatott, hasonlóan a régió más országaihoz. Ez a növekedési ütem azonban nem tartható abban az esetben, ha csatlakozunk az Európai Unióhoz, ahol szigorú szabályok kötik a termelési ágazatot [*FAO jelentések* 1998-1999, www.fao.org]. Ez rendkívül fontos szempont a kutatások tervezésekor is, hiszen a csatlakozás után, a kvótarendszer miatt csak a speciális igényeket kielégítő termékek exportálhatók, és ezek alkalmasak megfelelően magas profit elérésére. Ez pedig úgy tűnik leggyorsabban a transzgénikus technikák gyakorlati alkalmazásával érhető el.

Természetesen nem szabad megfelejtkezni arról a tényről sem, hogy Európa sokkal nehezebben fogadja a "genetikailag módosított" termékeket, mint Észak-Amerika. Ez azonban leginkább annak tudható be, hogy nem elég pontosak a szabályozások, és a fogyasztó bizonytalan. A tudomány olyan gyorsan halad a genetika területén, hogy a jog képtelen követni. Ha ezt sikerül kiküszöbölni, meggyőződésem hogy az az ellenállás, melyet most tapasztalhatunk kontinensünkön hamarosan megszűnhet, és zöld utat biztosít többek között a genetikailag módosított tejtermékeknek is.

A fenti kutatások nyitják meg azt az útvonalat is melynek során gyógyászatilag fontos fehérjéket termeltethetünk különböző állatok tejében, s viszonylag egyszerű tisztítási lépésekkel, olcsó, nagytisztaságú gyógyszereket, illetve gyógyhatású készítményeket nyerünk.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az emlősállatok tejösszetétele , és a tejfehérjék alapvető jellemzői

A különböző emlősállatok tejösszetétele igen nagy variációt mutat (2.1. táblázat) Ez természetesen nagymértékben függ az állatok életmódjától. A legjobban jellemzett tej a tehéntej átlagosan 3-3,5% fehérjét, 3,7% tejzsírt, valamint 4.8% tejcukrot tartalmaz. Az egér valamint a nyúltej magasabb tápértékű, sűrűbb állományú. Ez a tény a rövid generációs időnek köszönhető. Az egértej több mint 9% fehérjét, míg a nyúltej körülbelül 14% tejfehérjét tartalmaz.

2.1 táblázat. Emlősállatok tejösszetétele [*Jennes és mtsai* 1974]

	Zsír %	Fehérje %	Kazein%	Savó fehérje %	Tejcukor %
Ember	3,8	1	0,4	0,6	7,0
Szarvasmarha	3,7	3,4	2,8	0,6	4,8
Kecske	4,5	2,9	2,5	0,4	4,1
Juh	7,4	5,5	4,6	0,9	4,8
Egér	13,1	9,0	7,0	2,0	3,0
Nyúl	18,3	13,9	9,5	4,4	2,1

A tejből kimutatható több száz fehérje közül tejspecifikusnak csak néhányat tekinthetünk. A tejspecifikus fehérjék adják a tejben található proteinek mintegy 90%-át. A maradék rész elsősorban a vérrendszerből származik, és az érfalon átjutva kerül a tejbe. Ezek között is igen fontos fehérjéket találunk, például az immunoglobulinokat, melyek az újszülött védekező rendszerét segítik. [*Larson és mtsai* 1992]. A tejspecifikus tejfehérjék a tejmirigy alveoláris sejtjeiben termelődnek. Két csoportba oszthatóak: a savófehérjék (alfa-laktalbumin, béta-laktoglobulin, savó-savas fehérje), és kazeinek (alfas1-kazein, alfas2-kazein, béta-kazein, kappa-kazein).

A savófehérjék jellemzője, hogy szobahőmérsékleten alacsony PH érték mellett sem csaphatók ki. Az α-laktalbumin minden emlősállatban megtalálható, szerepe a tejcukor szintézisében jelentős. A galaktozil-transzferáz szőlőcukorhoz való kötődését segíti elő [*Brodbeck és mtsai* 1967, *Bremel és mtsai* 1995].

A β-laktoglobulin szerepe máig nem tisztázott. Igen értékes fehérjeforrás, de feltételezhetően részt vesz kis molekulasúlyú hidrofób molekulák szállításában is (A vitamin)

Mivel savas közegben is igen stabil, a gyomron átjutva, ezen anyagok vékonybélbeli felszívódását segítheti. [*Papiz és mtsai* 1986, *Said és mtsai* 1989, *McAlpine és mtsai* 1990]. A kérődzők és a ragadozók körében nagy mennyiségben fordul elő, de hiányzik az ember illetve a rágcsáló állatok tejéből is. A harmadik fontos savófehérje a savó-savas fehérje- angol rövidítése WAP (whey acidic protein). A savó-savas fehérje a rágcsálók mellett megtalálható még a teve tejében is. A WAP pontos szerepe sem tisztázott de szekvencia összehasonlítások alapján a proteináz inhibítorok közé sorolható [*Ranganathan és mtsai* 1999, *Simpson és mtsai* 2000]. Kis molekulasúlyú ciszteinben gazdag fehérje. Szerepet játszhat még az oxitocin és vazopresszin szállításában az emlőszövetben [*Henninghausen és mtsai* 1982].

A kazeinek alkotják a tejfehérjék több mint 80%-át [S*waisgood és mtsai* 1992]. Savas kicsapással a tejből elkülöníthetőek mint savas kazein. Ultracentrifugálással natív kazeinként ülepíthetők. [S*waisgood és mtsai* 1992]. Négy fő összetevőjük az αs1-, αs2- β- és kappa-kazeinek. Elsődleges szerepük a fehérje szükségletek biztosítása az utódok számára. Mivel erősen foszforilált fehérjék, nagy mennyiségű kationt képesek megkötni. Így a kálcium, magnézium és foszfát ionok szállításában - ezen keresztül a csont felépítésében- is fontos szerepet töltenek be. A tejben az alfas1-, alfas2- béta-kazeinek a hagyományos értelemben nem oldódnak. A kappa-kazeinnel közösen, mely fontos stabilizáló szerepet tölt be (lásd később), a tejben kolloid oldatot alkotnak. [H*ill és mtsai* 1969, W*alstra és mtsai* 1979] A létrejövő makromolekuláris szerkezet a tejmicella.

2.2. A kazeinek szerkezete és jellemzői

2.2.1. Az alfas1- kazein

Az alfas1-kazein alkotja a legnagyobb frakciót az emlősállatok tejében. Foszforilált protein, a szarvasmarha esetében relatív molekula súlya 23.5 kD. A fehérje szekvenciavizsgálatát közvetlenül végezték, vagy a génszerkezetből következtettek az elsődleges szerkezetre. [*Alexander és mtsai* 1992, *Devinoy és mtsai* 1988,]. A szignál peptid minden esetben 15 aminosav hosszú. A szarvasmarha esetében a teljes fehérje hossza 199 aminosav, a rágcsálók esetében ez egy kissé hosszabb, mivel tartalmaznak hexapeptid ismétlődő egységeket, melyek a szarvasmarhából hiányoznak.[*Grusby és mtsai* 1990,] Az aminosavak hasonlósága a kérődzők között 85%-os, a rágcsálóknál 80%

homológiát mutattak ki. Nagy különbségek tapasztalhatók a C-terminális és N-terminális végeken ahol a hasonlóság a szarvasmarha és a patkány között csak 29%. Igen jellemző az alfas1-kazeinekre a 100-110. aminosav körül található többszintű foszforilációs hely jelenléte. Ez a molekula elsődleges foszforilációs helye [*Mercier és mtsai* 1981], de ezenkívül további foszforilációra hajlamos szekvencia motívumok találhatók a molekulán belül.

Természetes variációk gyakoriak mind a szarvasmarha, mind egyéb állatok esetében. [*Thompson és mtsai* 1962, *Grosclaude és mtsai* 1972, 1966, *Mercie*r *és mtsai* 1971, *Brignon és mtsai* 1990, *Baranyi és mtsai* 1995].

2.2.2. Az alfas2-kazein

Az alfas2-kazein szintén erősen foszforilált fehérje. Gyakran különbözőképpen foszforilált izoformok találhatók. [*Eigel és mtsai* 1984]. A leginkább hidrofil jelleggel rendelkező kazein. Míg három molekulaszakasz mondható hidrofilnek, addig csak kettőre jellemző a hidrofób jelleg.

Érdekes módon az egérben két gén is kódolja az alfas2-kazein fehérjét. Az egér gamma-kazein gén, valamint az egér epszilon-kazein gén. Míg az egérben található két fehérje egymáshoz képest csak 40% homológiát mutat, addíg pl. a sertés és szarvasmarha szekvenciák hasonlósága 64%-os. A különböző állatfajtákban több variánsát írták le, így a szarvasmarhában négy ismert változata van. A nyúlban két variáns ismert [*Baranyi és mtsai* 1995].

2.2.3. A béta-kazein

A béta-kazein szerkezete, sok emlősállatban ismert [*Alexander és mtsai* 1992, *Bonsing és mtsai* 1988, *Greenberg és mtsai* 1984, *Provot és mtsai* 1989, *Thepot és mtsai* 1991]. A molekula amfoter jellegű, két doménra különül. A C-terminális rész első két harmada apoláros, míg az N-terminális poláros [*Bonsing és mtsai* 1987]. Ez minden béta-kazeinre jellemző és a biológiai funkcióhoz kötött. Ennek ellenére a béta-kazein a leginkább hidrofób az összes kazein közül. A szignálpeptid nagyon konzervált, és 15 aminosavból áll. A foszforiláltság foka sokkal kisebb, mint a többi kálcium szenzitív kazein esetében. Mindösze egy régióban található ún. foszfát központ, mely foszforilált szerin oldalláncok közeli, csoportos elhelyezkedését jelenti. A molekulában nagy mennyiségű prolil oldallánc található, mely a másodlagos szerkezet kialakításában tölt be fontos szerepet, hiszen a prolil oldalláncok megtörik a molekula szerkezetét.

Szarvasmarhában nyolc variánsa ismert [*Aschaffenburg és mtsai* 1961, 1966, 1968, *Peterson és mtsai* 1966*, Voglino és mtsai* 1972, *Visser és mtsai* 1995].

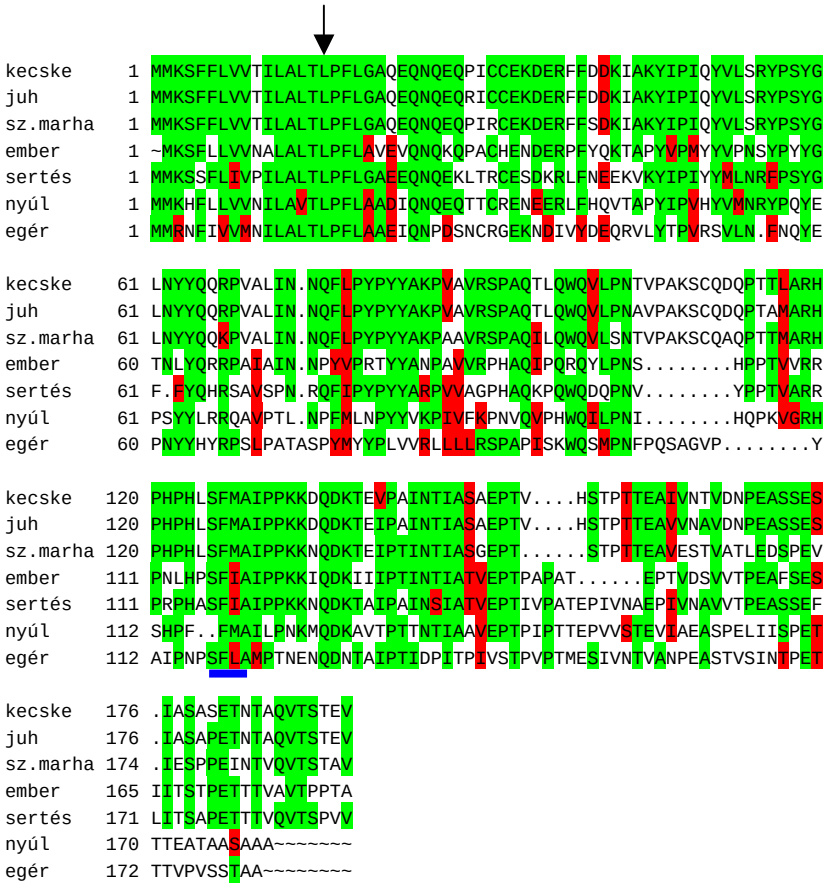
A nyúlban két allélját írták le. Az egyik allél a hetes exonban hordoz egy rövid deléciót, valamint további 3 nukleotid különbség van a kódóló régióban. Érdekes módon a különböző allélek expressziós szintje változó. Homozigóta B/B állatok esetében a béta-kazein RNS/össz RNS aránya nagyobb, mint az A/A vagy A/B genotípusú egyedeknél [D*evinoy és mtsai* 1999].

2.2.4. A kappa-kazein

A kappa-kazein 169 aminosavból álló foszfoglikoprotein. Relatív molekulatömege 19,0 kDa. Fiziológiai szerepe a kalciumérzékeny kazeinek stabilizálása a kalcium ionok jelenlétében. Diszulfid hidak segítségével a kappa-kazein oligomereket hoz létre, átlagosan 125 kD méretekben. A legkisebb ismert oligomer mérete 60 kD, ami trimernek felel meg. [*Swaisgood és mtsai* 1964]. A fehérje bioszintézise során azonban a monomerek valószínűleg először a kalcium érzékeny fehérjékkel lépnek kölcsönhatásba, majd ezt követi a monomerek összekapcsolódása [*Pepper és mtsai* 1982].

Elsődleges szerkezete sok emlősállatban ismert, és nagyon konzervatív [*Bősze és mtsai* 1993, *Brignon és mtsai* 1985, *Furet és mtsai* 1990, *Levine és mtsai* 1992, *Mercier és mtsai* 1973, *Thompson és mtsai* 1985] [1.1 ábra]. Az adatok részben közvetlen fehérjeszekvenálással, valamint a cDNS és genomiális DNS szekvencia adatok alapján ismertek. Az elsőleges szerkezet, valamint a DNS adatok is arra mutatnak, hogy a kappa-kazein nem a többi tejfehérjével, hanem a γ-fibrinogénnel mutat hasonlóságot. Erre utal a kappa-kazein néhány különleges tulajdonsága is mely a többi kazeinre nem jellemző.

A kappa-kazein nem tartalmazza a foszforilált szeril oldalláncok halmazát - melyet foszfát-központoknak is szokás nevezni. Hiányzik a treonil oldalcsoportok foszforilációja is. Ezzel szemben a protein a C-terminális régióra korlátozódó egyenként foszforilált szeril oldalláncokat tartalmaz. [*Ginger és mtsai* 1999]. Ennek eredményeként a kappa-kazein nem képes olyan mértékben a pozitív ionokat- elsősorban a kalcium ionokat- kötni, mint a többi kazein, így az ionszállítás szempontjából a kappa-kazein nem funkcionális [*Holt* 2000, személyes közlés]. Így oldékonyságát sem befolyásolja olyan mértékben a kalcium ionok jelenléte, mint a többi kazeinét. Ezért szokás a kappa-kazeint kálciumstabil, míg az egyéb kazeineket a kalciumérzékeny jelzővel illetni.



1.1 Ábra

Emlősállatok kappa-kazein szekvenciaösszehasonlítása. A szekvenciák a Genbank adatbázisból származnak, az összehasonlításhoz a Genetics Computer Group (GCG) programcsomag Pileup szoftverjét használtam. Az azonos aminosavakat zöld háttér, a hasonlóakat piros háttér jelzi. A kimozim hasítási helyét kékkel jelöltem, a szignál peptid határát fekete nyíl jelzi.

A kappa-kazein szénhidrátban gazdag peptidrészletet tartalmaz. Ez egyedülálló a kazeinek között. A szénhidrát csoportok a kappa-kazeinhez O-glikolizációs szerin valamint treonin oldalláncokon keresztül kapcsolódnak a molekula C terminális

szakaszán. A glikolizáció poszttranszlációs eseményként az emlő epiteliális sejtjeinek Golgi apparátusában történik [*Jolles és mtsai* 1979, *Takeuchi és mtsai* 1984]. A különböző fajok kappa-kazeinjének glikoziláltsági foka eltérő lehet.

Az emberi kappa-kazein sokkal jobban glikozilált, mint a juh vagy a szarvasmarha. A szénhidrátcsoportok összetétele is fajfüggő. A szarvasmarha például galaktóz, N-acetil-galaktózamin és N-acitil-neuraminsavat, a juh N-glikolil-neuraminsavat is tartalmaz a fentieken kívül. Az ember esetében a szénhidrát még komplexebb egységet alkot. Fukóz, galaktóz, N-acetil-glukózamin, és N-acetil-neuraminsavat tartalmaz [*Fiat és mtsai* 1980, *Yamauchi és mtsai* 1981].

A szignál peptid hosszúsága is eltérő, összehasonlítva a többi kazeinnel. Míg pl. embernél a kappa-kazein szignálpeptid 21 aminosav hosszúságú, addig ez csak 15 aminosav hosszúságú a többi emberi kazein esetében. A kappa-kazein struktúrájából adódóan erősen amfoter jelleget mutat. [*Hill és mtsai* 1969]. Az N-terminális rész hidrofób jellegű, míg a C-terminális rész erősen poláros.

A kappa-kazein tartalmaz egy specifikus proteáz hasító helyet is. Ez a hasítóhely a kimozin (más néven rennin) hasítóhelye. A hasítóhely a molekula C-terminális részéhez közelebb helyezkedik el a 105 Phe és 106 Met között történik a hasítás. [*Delfour és mtsai* 1965, *Jolles és mtsai* 1968]. A hasítás eredményeképpen a C-terminális erősen poláros részét (makropeptid ill. glikomakropeptid), valamint a hidrofób N-terminális részt a para-kappa-kazeint kapjuk eredményül. Ez a hasítás fontos szerepet játszik a tej alvadásában.

Az elsődleges szerkezeti adatok alapján az emlősállatok kappa-kazeinjeit két nagy csoportba lehet sorolni [*Nakhasi és mtsai* 1984]. A két csoport eltérő tulajdonságokat mutat a hidrófób tulajdonságokban, a szénhidrát oldalláncok mennyiségében, és az aminosav összetételében. Az első csoport alkotja az ősi típust, ahova a kérődző állatok tartoznak.

A másik - a patkány, egér, ember alkotta csoport a kimozin hasítás helyén is különbséget mutat, ami Phe-Ile illetve Phe-Leu lehet. Ez a különbség valószínűleg a kérődzők és a nem kérődzők közötti emésztési különbségek miatt alakult ki [*Herskovitis és mtsai* 1966].

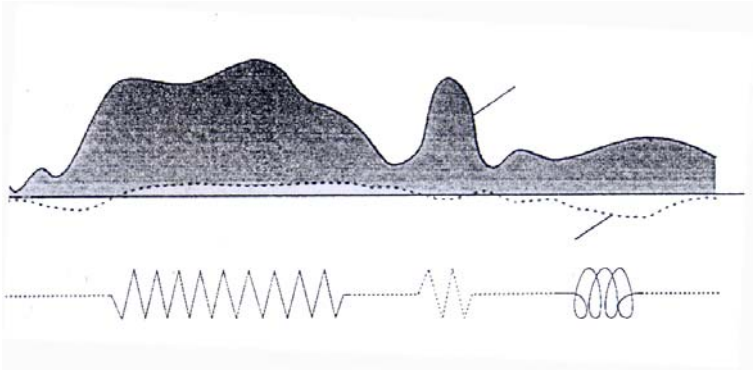
A kazeinek másodlagos szerkezetéről kevés információ áll rendelkezésre. Ez annak köszönhető, hogy nem kristályosíthatóak, így röntgenkrisztallográfiai adatok nem ismertek. A másodlagos, valamint harmadlagos szerkezetvizsgálatokat így indirekt módszerekkel végezték. Ilyenek az ismert szekvenciából számítógépes előrejelzések, de sokkal pontosabb adatokat biztosít a "Cirkular Dichorism" spektroszkópia. A 2.2 számú táblázat a különböző szerkezeti elemek eloszlását mutatja százalékosan.

2.2 táblázat. A szarvasmarha kappa-kazein másodlagos szerkezeti elemei százalékos arányban

Szekvencia előrejelzés		CD spektroszkópia	
α-hélix	β-redő	α-hélix	β-redő
23	31	14	31

A vizsgálatok arra is utalnak, hogy a kappa-kazein β-α-β struktúrális egységet tartalmaz a hidrofób régióban, [*Raap és mtsai* 1983] valamint "turn-β-turn" motívumot a kimozim emésztési hely környékén. [*Holt és mtsai* 1988]

További információkat sikerült nyerni szintetikus peptidrészletek nagyfelbontású NMR vizsgálatával. [*Creamer és mtsai* 1998]. A módszer természetesen tartalmaz hibaforrásokat, (Nem biztos, hogy egy peptidrészlet tökéletesen azt a konformációt veszi fel önmagában, mint ha a teljes peptid jelen van) de sokkal pontosabb információkat ad, mint az egyéb módszerek.
Így sikerült a molekula majdnem teljes hosszában tisztázni a szerkezet jellegzetességeit (2.3 ábra)

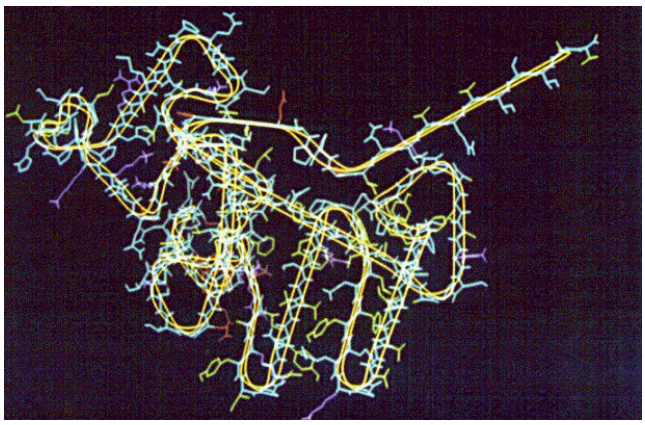


2.2. ábra
A szarvasmarha kappa-kazein másodlagos szerkezete NMR vizsgálatok alapján.
A folyamatos vonal mutatja a relatív hidrofób tulajdonságokat, míg a szaggatott vonal a relatív töltést jelzi. Cikk-cakk vonal mutatja a β-redő szerkezetet , a helikális struktúrát az ennek megfelelő vonal jelképezi.

A szarvasmarha kappa-kazein lehetséges harmadlagos szerkezetét Raman spektroszkópiai módszerekkel sikerült meghatározni. A feltételezett harmadlagos szerkezet a 2.3 ábrán látható [*Creamer és mtsai* 1998].

2.2.4.1. A kappa-kazein genetikai variánsai, és hatásuk a tej minőségére

A kappa-kazeinnek a legtöbb genetikai variánsát a szarvasmarhában írták le. Mivel a tehéntej a legfontosabb az emberi táplálkozás szempontjából, természetesen a különböző genetikai variánsok hatása is itt ismert a legjobban. Szarvasmarhában a kappa-kazeinnek két gyakori, valamint hét ritka variánsát írták le. [*Baranyi* 2000]



2.3. ábra
A Kappa-kazein feltételezett harmadlagos szerkezete Raman spektroszkópiai módszerek alapján

2.2.4.2. A kappa-kazein allélvariánsok hatása tej alapvető fizikai-kémiai tulajdonságára

A tejfehérjék a tejben ún. micelláris struktúrát alkotnak, ahol a kappa-kazein a micellák felszínén helyezkedik el, és stabilizáló hatása van. Az ismert szarvasmarha allélok közül a kappa-kazein B variáns kisebb micellákat alkot mint az A variáns *[Morini és mtsai* 1982]. Ez a tulajdonság hatással van a kazein micellák stabilitására is [*El-Negoumy és mtsai* 1974, *Ng-Kwai-Hang és mtsai* 1990]. A B variáns esetében a hőstabilitás is magasabb mint az A változatnál [*Kirchmeier és mtsai* 1983, *McLean és mtsai* 1987]. A kisebb micellákat tartalmazó tej hőalvadása is másként történhet, nemcsak gyorsabb, de a kétlépéses folyamat egylépéses folyamattá egyszerűsödik [*O'Conell és mtsai* 2000].

A tejalvadás folyamán a tej micelláris felépítése megszűnik. A gyomorban, szopós korban található kimozim enzim hatására a kappa-kazein oldalláncok elhasadnak, a micellák koagulálnak. Így a különböző micellaméretű tejek alvadási, valamint feldolgozhatósági tulajdonságai is különbözni fognak. Széles szakirodalom mutat rá arra a tényre, hogy a szarvasmarha kappa-kazein B típusú tej jobb alvadási tulajdonságokkal rendelkezik mint az A változat. Nemcsak az alvadási idő kedvezőbb, de a keletkező alvadék is keményebb jellegű. [*Sherbon és mtsai* 1967, *Losi és mtsai* 1973, 1975 *Mariani és mtsai* 1976, *Tervala és mtsai* 1983, 1985, *Schaar* 1984, 1985, *Jakob és mtsai* 1986a,b, *Marziali és mtsai* 1986a, *Aaltonen és mtsai* 1987 *Rampilli és mtsai* 1988]. A ritka genetikai variánsok közül a C és az E változat az A-hoz hasonlóan rossz alvadási tulajdonságokat eredményez. [*Jakob és mtsai* 1993, *Lodes és mtsai* 1997, *Oloffs és mtsai* 1992].

2.2.4.3. A tejfehérje variánsok szerepe a sajtgyártásban

A tejfehérje variánsok a tej alvadási tulajdonságait is befolyásolhatják. Mindez szoros összefüggésben áll a kinyerhető sajt mennyiségével és minőségével egyaránt. A kappa-kazein B variáns már a legkorábbi vizsgálatokban is jobbnak mutatkozott a A allélnál [*Russo és mtsai* 1978].

A későbbi részletes vizsgálatok feltárták, hogy a B típusú tejből több sajt nyerhető *[Morini és mtsai* 1979, *Marzial*i *és mtsai* 1986b,c, *Remeuf és mtsai* 1991]. Ez a sajtok széles körére igaz, úgymint parmigiano, svecia, cheddar, camambert, és mozarella sajtok.

A sajt zsír és fehérjetartalma is kedvezőbb [*Rahali és mtsai* 1991, *Marziali és mtsai* 1986c]. Ez különösen igaz az úgynevezett kemény sajtok esetében, mint pl. a parmezán.

2.2.4.4. A tejösszetétel és a kappa-kazein allélek kapcsolata

A vizsgálatok azt mutatják, hogy a a kappa-kazein B variánsa magasabb kappa-kazein tartalommal párosul. A magasabb kazein tartalom pedig kisebb micellaméretet eredményez. *[Aleandri és mtsai* 1986 *Gonyon és mtsai* 1987, *Mariani és mtsai* 1976, *Kroeker és mtsai* 1985, *Ng-Kwai-Hang és mtsai* 1986, 1987, 1990a, *Rampilli és mtsai* 1988, *Eenennaam és mtsai* 1991a]. Egyes kutatók nemcsak az összkazein, hanem az összfehérjetartalmat is magasabbnak találták [*Castagnetti és mtsai* 1994, *Jakob és mtsai* 1986b, *Schaar és mtsai* 1984 *Rampilli és mtsai* 1988]

A ritka C allélről ismert, hogy több fehérjét és magasabb összkazeint tartalmaz mint az A, illetve a B allélek [*Machaboeuf és mtsai* 1993]. A legmagasabb fehérjetartalmat a BC genotípusú tej mutatta [*Delacroix-Buchet és mtsai* 1993]. Az E variáns az A hoz hasonló tulajdonságokkal rendelkezik *[Oloffs és mtsai* 1991].

Bizonyos szarvasmarha fajtákban a fenti állítást nem sikerült igazolni Fleckvieh és Brown swiss állományokban nem találtak különbséget a kazeintartalomra vonatkozóan [*Graml és mtsai* 1985].

A zsírtartalom a kappa-kazein A allélt hordozó állatok esetében magasabbnak bizonyult mint a B allélnál *[Aleandri és mtsai* 1986, 1990, *Buchberger és mtsai* 1986, *Graml és mtsai* 1985].

2.2.4.5. Kappa-kazein variánsok egyéb fajokban

Kecskében több allélt sikerült találni RFLP módszerrel, de ezek részletes jellemzése nem történt meg. [*Russo és mtsai* 1986, *Di-Luccia és mtsai* 1990 *Law és mtsai* 1993]. *Sanchez* [2000] és munkatársai BEES (Base Excision Sequence Scanning) módszerrel, majd az ezt követő szekvencia ellenőrzéssel a kecske kappa−kazein cDNS−ben 7 variációt találtak. Ebből négy alkotott aminosavcseréket is a fehérjében. A négy aminosavcsere 3 allélt takart, a spanyol és francia kecskefajtákban. A kaukázusi hegyi-kecske egy ősi negyedik típust hordozott.[*Sanchez és mtsai* 2000 kézirat].

Birkában [*Leveziel és mtsai* 1991] két allélt találtak RFLP vizsgálatok során. Egyelőre nem jellemzett a két allél, így biológiai hatásukat sem ismerjük. A szarvasmarhához közel álló fajokban a kappa-kazein két jelentős allélja megtalálható.

Indiai kutatók indiai szarvasmarhafélékben *[Mitra és mtsai* 1998], míg Észak-Amerikában bölényben [*Udina és mtsai* 1995] és rénszarvasban [*Cronin és mtsai* 1995], írták le a kappa-kazein két fontos alléljának jelenlétét. A rénszarvasnál találtak egy harmadik C allélt is.

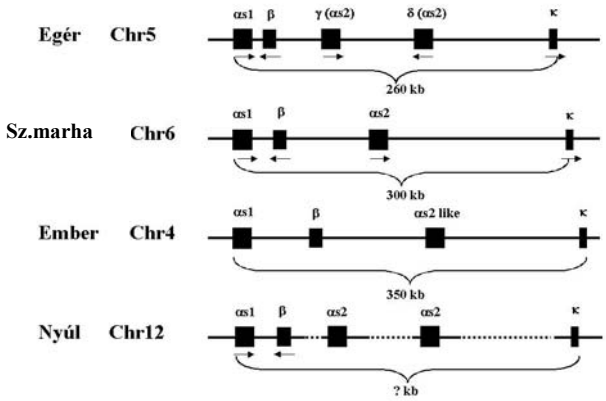
Nyúlban Baranyi [*Baranyi és mtsai* 1996] és munkatársai találtak két allélt, melynek jellemzését lásd az eredmények fejezetben.

2.3. A tejfehérje gének általános felépítése.

A tejfehérje gének szerkezetéről az első adatokat [*Yu-Lee és mtsai* 1983] a nyolcvanas évek közepétől ismerünk. A tejfehérje gének felépítése megegyezik a szövetspecifikusan kifejeződő eukarióta gének felépítésével. Az alappromóter tartalmazza a TATA "boxot" és a CAAT motívumot, mely az RNS polimeráz II enzim indulását segíti a transzkripció során. A promóter a tejfehérje gének szövet- és fejlődésspecifikus bekapcsolódását segítő további szabályozó elemeket tartalmaz. Egyéb szakaszok is találhatóak itt, melyek a hormonspecifikus válasz kialakításában játszanak szerepet. A gének pre-mRNS-é átíródó szakaszai tartalmazzák az exonokat és intronokat. A tejfehérje gének esetében az első 1-2 exon az 5' nem transzlálódó régiót tartalmazza, majd ezt követi egy szignál peptidet kódoló szakasz. Az érett fehérjét kódoló egység 2-16 exont tartalmaz, változó hosszúságú intronokkal elválasztva. Az utolsó 1-3 exon az 3' nem transzlálódó régió a konzervatív AATAAAA poliadenilációs jellel.

2.3.1. A kazein gének részletes jellemzése

A kazein gének a kromoszómán kapcsoltan helyezkednek el (2.4. ábra). A szarvasmarha esetében a kazein gének a 6. kromoszóma 250 kb hosszúságú szakaszán találhatóak [*Ferretti és mtsai* 1990]. Meghatározták sorrendjüket is: alfas1-, béta-, alfas2-, kappa-kazein. Az alfas1- és béta-kazeinek igen közel mintegy 20 kb távolságra vannak egymástól, az alfas2-kazein 70 kilobázis, míg a kappa-kazein mintegy 200 kb távolságra található a béta-kazeintől, az átírásuk azonos irányú. Ez a leírás megfelel az egér esetében tapasztaltakkal, azzal az apró különbséggel, hogy az egér 5. kromoszómáján található még egy alfas2-kazein szerű gén az epszilon-kazein gén is [*Rijnkels és mtsai* 1997]. Az ember esetében is megegyezik a kazein gének sorrendje, de a transzkripció irányáról nincsenek adatok [*Rijnkels és mtsai* 1997].



2.4. ábra A kazein gének elhelyezkedése a kromoszómán egér, szarvasmarha, ember és nyúl esetében. Chr a megfelelő kromoszómát jelenti.

A kazein gének közeli elhelyezkedése valamint a komplex hormonális szabályozásának jellemzői felvetik egy távoli közös szabályozó egység az ún. "Lókusz kontrol régió" létezését is. [*Orkin és mtsai* 1990].
Habár a kappa-kazein gének pontos szabályozása nem ismert, a promóteren elhelyezkedő lehetséges transzkripciós faktor kötőhelyeket ismerjük. Ezek hasonlóságot mutatnak a többi kazeinével. [*Malewski és mtsai* 1998, *Gerencsér és mtsai* 2001 kézirat].

2.3.1.1. A béta-kazein gének felépítése

A jelenleg ismert szekvencia adatok alapján a béta-kazein gén szerkezete rendkívül konzervált [*Hansson és mtsai* 1994, *Bonsing és mtsai* 1988, *Provot és mtsai* 1989, *Thepot és mtsai* 1991, *Yoshimura és mtsai* 1989]. Az exonok mérete általában megegyezik, vagy nagyon hasonló méretűek, s csak az őket elválasztó intronok mérete különböző. Az első exon az 5' nem transzlálódó régiót, a második a nem transzlálódó régió maradékát és a szignál fehérjét kódolja. A 3-6 exonok rövidek, és az N-terminális hidrofil domént kódolják. A 7 exon a legnagyobb, és a C terminális régió elsődleges szerkezetét hordozza. A 8. exon az érett fehérje végső szekvenciáját hordozza. A 3' nem transzlálódó régió a 8-9 exonokhoz köthető.

2.3.1.2. alfas1- és az alfas2-kazein gének szerkezete

Az alfas1-kazein gén leírása nyúlból, szarvasmarhából és kecskéből ismert. Az alfas2-kazein gént patkányban és szarvasmarhában tanulmányozták [*Devinoy és mtsai* 1988, *Groenen és mtsai* 1993, *Jolivet és mtsai* 1992, *Leroux és mtsai* 1992, *Yu-Lee és mtsai* 1986].

Nagyméretű gének, 17-18 kb hosszúságúak. Az alfas1-kazeint 19 exon míg a alfas2-kazeint 18 exon kódolja. Több tulajdonságban nagyon hasonlítanak egymásra. Az 5' exonok kis mérete, a második exon azonos hosszúsága és szerkezete, a fő foszforilációs helyek elhelyezkedése, valamint a legnagyobb exon által kódolt hidrofób domén jellege mind közeli rokonságra utal. Nagyon hasonló felépítésű az ún. "kalcium szenzitív" kazein gének 5' határoló régióinak felépítése is, mely a megfelelő hormonális szabályozásért felelős.

2.3.1.3. A kappa-kazein gének jellemzése

A kappa-kazein gén felépítése néhány lényeges jellemzőben különbözik a többi kazein gén szerkezetétől. A szignál peptid mérete, a foszforilációs helyek elhelyezkedése jelentős eltérést mutat. A teljes kappa-kazein gén ismert szarvasmarhában, emberben, valamint nyúlban. Részleges adatok ismertek a kecske és a juh esetében. [*Alexander és mtsai* 1988, *Baranyi és mtsai* 1996, *Edlund és mtsai* 1996, *Groenen és mtsai* 1994, *Coll és mtsai* 1995, *Spira és mtsai* 1994]. A kappa-kazein gének szerkezete nagyon konzervatív. Öt exont és négy intront tartalmaznak. Az első exon 5' nem transzlálódó régiót, a második exon egy kevés nem transzlálódó részt valamint a szignál peptid nagy részét, a harmadik exon a szignál peptid végét, valamint a fehérje N-terminális részét kódolja. A legnagyobb exon a negyedik mely az érett fehérje túlnyomó szakaszát kódolja, míg a negyedik exon vége, és az ötödik exon a 3' nem transzlálódó részért felelős.

Az intronok mérete az ember és a szarvasmarha esetében hasonló, míg a nyúl kappa-kazein intronjai kissé rövidebbek. Ennek köszönhetően a teljes gén hosszúsága is kisebb.

2.3.1.4. A nyúl kappa-kazein, és az őt kódoló gén jellemzése

A nyúl kappa-kazein gén jellemzésében először a cDNS leírása történt meg [*Bősze és mtsai* 1993]. Az akkor ismert kappa-kazeinek szekvencia összehasonlítása alapján nyúl

emlőszövet cDNS könyvtárból két klónt is sikerült izolálni. A két klón átfedőnek bizonyult, és majdnem a teljes hosszúságú cDNS-t reprezentálta. A szekvencia alapján a nyúl kappa-kazein érett fehérjéje 159 aminosavat tartalmaz, a szignál peptid hosszúsága 22 aminosav. Az első Start kodon (ATG) a klón 71. bázispárjánál található, s mivel az ATG környezete megfelelt a Kozak szekvenciának [K*ozak és mtsai* 1991], továbbá a régió nagy homológiát mutatott a már ismert szekvenciákkal, ezért feltételezték hogy ez a valós indító kodon. Ez később be is igazolódott.

A fehérje teljes hosszában az aminosavak hasonlósága 81% a birkához, és 70% az egérhez viszonyítva. Ez megerősíti azt a feltevést, mely szerint a nyúl alakúak közelebb állnak a kérődzőkhöz, mint a rágcsálókhoz [*Li és mtsai* 1990, *Novacek és mtsai* 1992]

Nukleotid szinten a legnagyobb homológiát a szignál peptid nukleotid sorrendje mutatja- 93% homológia a birkával, és 83% homológia az egérrel szemben. Leszámítva ezt a szakaszt, a kódoló régió csak 71 illetve 61% homológiát mutat.
(Összehasonlítva a többi kazeinekkel nem fedezhető fel az elsődleges szerkezetben hasonlóság.)

A kazeinek esetében a foszforiláció a ser(Thr)-X-Y szekvenciáknál történik [*Mercier és mtsai* 1981], ahol Y glutaminsav vagy foszforilált szerin oldallánc. Ez alapján a nyúl kappa-kazein öt potenciális foszforilációs helyet tartalmaz. Akárcsak a többi kazeinnél, az összes foszforilációs hely a fehérje C-terminálisán található. Az egyik ezek közül a helyek közül minden kazeinben konzervált, míg egy másik a nyúlon kivül a kérődzőkre jellemző.

A kappa-kazeinek foszfoglikoproteinek, a glikolizáció általában O-glikolizáció [*Mercier és mtsai* 1982]. A nyúl kappa-kazein 14 lehetséges O-glikolizációs szignált tartalmaz, az ismert konszenzus szekvenciák alapján. N-glikolizációs szignált a peptid nem tartalmaz [*Thompson és mtsai* 1985].

A nyúl kappa-kazein, hasonlóan az egérhez és az emberhez egyetlen ciszteint hordoz. A cisztein helye minden ismert esetben konzervált. Ennek köszönhető, hogy a kappa-kazein oligomerizációra képes a tejmicellák felszínén más kappa-kazein láncokkal. Közöttük a kapcsolatot stabil kovalens kötés létrehozása biztosítja.[*Rasmussen és mtsai* 1992] A fehérje tartalmaz kimozin hasítási helyet mely az érett fehérje 95. aminosava után fenilalanin és metionin mellett hasít.

A nyúl kappa-kazein 520 bp hosszúságú szakaszát próbaként használva Northern hibridizációkat végeztek nőstény nyulak emlőszöveteit felhasználva, a fejlődés különböző stádiumaiban. A szűz nyulakban a kappa-kazein RNS még nem mutatható ki, ez először a vemhesség nyolcadik napján tapasztalható [*Bősze és mtsai* 1993].

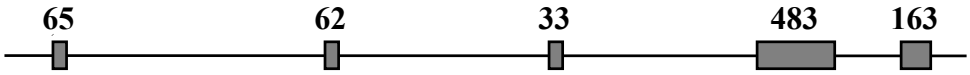
Ezt követően a kappa-kazein transzkriptum mennyisége a vemhesség 21. napjáig a 7-8 szorosára növekedik. A maximumot a laktáció során éri el, további háromszoros növekedés után. A leválasztás után 8 nappal az expresszió értéke lecsökken újra a vemhesség 20. napjának megfelelő szintre.
A vemhesség 14. napján izolált emlőszövetből készített szövetkultúrában néhány nap múlva a kappa-kazein mRNS már nehezen mutatható ki Northern hibridizáció segítségével, prolaktin hozzáadására azonban az mRNS mennyisége jelentős növekedést mutat. Kortizol és inzulin hozzáadása nem emeli jelentősen tovább az expresszió mértékét.

A cDNS jellemzését a genomi klón izolálása követte [*Baranyi és mtsai* 1996]. A már ismert cDNS darabját próbaként használva λEMBL-3 SP6/T7 nyúl genomi könyvtárból hét klónt sikerült azonosítani. Ezek közül kettő tartalmazta a teljes gént, valamint 0,8 ill. 2,1 kb hosszúságú darabot melyek a gén 5' határoló szekvenciáját hordozták, valamint 9 ill. 4 kb hosszúságú darabokat tartalmazott a gént övező 3' régióból. A DNS darabok pontos restrikciós térképét is elkészítették.

A restrikciós helyeket számos nyúlból származó genomi DNS segítségével ellenőrizték Southern hibridizációs kísérletekben. Ennek során kiderült, hogy a nyúl kappa-kazein gén HindIII RFLP polimorfizmust mutat, tehát valójában létezik a klónozott allélen kívül még egy allél is.

A kapott DNS darabokat M13 vektorba klónozták, és meghatározták a bázissorendjüket. Ez 3 helyen különbözött a már közölt szekvenciától [*Bősze és mtsai* 1993], ebből kettő nem okozott változást a fehérje aminosavsorrendjében, egy pedig a 3' nem transzlálódó részen található. Az exon-intron határok megfelelnek az ismert exon-intron szabálynak [*Mount és mtsai* 1982].

A nyúl kappa-kazein hasonlóan a többi emlős kappa-kazein génjéhez 5 exonból és négy intronból áll. [2.5. ábra].



2.5. ábra
A nyúl kappa-kazein gén felépítése. A szürke téglalapok jelentik az exonokat,
Számokkal jelöltem exonok méretét (bp)

A nyúl kappa-kazein módosított TATA boxot tartalmaz, mely szekvenciája TTAAATT és -25 től -31ig helyezkedik el 5' irányban a transzkripció feltételezett startpontjától. Ez a módosított TATA box nagy hasonlóságot mutat elhelyezkedésében és bázissorrendjében is a szarvasmarhában és birkában találhatókhoz.

A gén 3' végén a feltételezett poly-A szignál is megtalálható, mely a cDNS-ről hiányzott [*Bősze és mtsai* 1993].

Az első intronban kimutatott 25 egymást követő timidin, melyet 41 nukleotid hosszúságú repetitív szakasz követ. Ennek a fordított komplementer változata kis különbséggel megtalálható a negyedik intronban is. Ez a szakasz nagyon hasonlít az úgynevezett nyúl C ismétlődő egységre vagy *LINE* szekvenciára. Pontos szerepe nem ismert, de feltételezhetően a DNS replikációban játszhat szerepet [*Cheng és mtsai* 1984, *Hardison és mtsai* 1985].

A fent leírt és klónozott kappa-kazein működőképesnek bizonyult transzgénikus egérkísérletekben is. A szövetspecifikus expressziót az izolált promóter szakasz biztosította, bár az expresszió mértéke igen csekély volt. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a gén fő szabályozó régiói függetlenek a többi nyúl kazein génjétől, bár közös enhanszer szakaszok létezése továbbra sem kizárható [*Baranyi és mtsai* 1996].

2.3.2. A kazein gének evolúciója

A fent jellemzett kazein gének esetében érdekes evolúciós kapcsolatokat lehet feltárni a szerkezetből kiindulva. Mint említettem a kalcium szenzitív kazeinek esetében nagyfokú hasonlóságot lehet felfedezni a szignál szekvenciában, az 5' határoló szekvenciák esetében csakúgy, mint a foszforilációs helyek elhelyezkedésében és a kicsiny exonok jelenlétében. Ennek a három kazein félének valószínűsíthetően volt egy közös őse, mely azután "exon shuffling" és duplikációs eseményeket követően fejlődött a most ismert állapotig [*Yu-Lee és mtsai* 1986].

A kappa-kazein fejlődése más utakat járhatott be. Egyes szerzők szerint a fibrinogén γ-láncával mutat rokonságot [*Threadgill és mtsai* 1990]. A két gén között konzervált a cisztein oldalláncok, valamint a kimozin enzim hasítási hely pozíciója. A másodlagos szerkezet vizsgálatok szerint a kimozin hasítási hely környezete is hasonló struktúrát mutat. A véralvadás végső szakaszának valamint a tej megalvadásának funkcionális hasonlóságai is feltűnőek. [*Jolles és mtsai* 1982]. A rokonság esetében feltételezhető lenne, hogy az intron pozíciók is konzerváltak. Ez azonban nem így van. Ennek két magyarázata lehet. Az egyik szerint a hasonlóságot nem biztosan a közös eredet, hanem a hasonló funkció alakította ki.

Erre bizonyíték lehet az, hogy szekvenciaszinten csekély a hasonlóság, de a funkcionális jellemzők gyakran egyeznek. Elvégezve a szekvencia összehasonlítást a legújabb programcsomagokkal (Blast), nem kapunk egyértelműen pozitív eredményt. A másik elmélet szerint a géncsalád fejlődése során nagyon gyakori volt az intronok elvesztése, és ez magyarázza a mai állapotot [*Crabtree és mtsai* 1985]. Erre bizonyíték lehet a család többi tagjának elemzése, mely azt mutatja, hogy az intronok helyzete gyengén konzervált.

2.3.3. A nyúl savó savas fehérje génjének jellemzése

A savófehérjék közül a dolgozat érinti a nyúl savó savas fehérje génjét is. A gént francia kutatók izolálták és jellemezték [*Devinoy és mtsai* 1988, *Thepot és mtsai* 1990]. Négy rövid exon és az azokat elválasztó intronok alkotják. Az első exon az 5' nem transzlálódó régiót, valamint a szignál peptidet kódolja. A második és a harmadik exon kódolja a fehérje túlnyomó részét, a negyedik exon pedig a fehérje C-terminális végét és a 3' nem transzlálódó régiót hordozza. A nyúl savó savas fehérje génjének promóter régióját széleskörűen alkalmazzák emlőspecifikus transzgénikus állatok előállítása során (lásd 4.12.1. fejezetet)

2.4. A tejfehérje gének működésének szabályozása

A tejfehérje gének működése szövet- és fejlődésspecifikus jelleget is mutat. Ennek megfelelően ezeknek a géneknek a ki- és bekapcsolása, az expresszió erősségének irányítása komplex szabályozási feladat. Az extracelluláris mátrixból induló jelek (melyek általában hormon jellegűek) szignál-transzdukciós útvonalakon keresztül transzkripciós faktorokat aktiválnak. A transzkripciós faktorok a tejfehérje gének promóterén található kötőhelyekhez kapcsolódnak serkentve, illetve gátolva az adott gén megnyilvánulásának erősségét.

A tejfehérje géneknél a promóter régióban transzkripciós faktorok kötőhelyei szoros csoportokba rendeződnek, melyek funkcionális egységet képeznek. Ezt angol rövidítése alapján CoRe (Composite response elements) rövidítéssel illetik. Külön-külön az egyes transzkripciós faktor kötőhelyek nem korlátozódnak kizárólagosan a tejfehérje génekre, de az említett közös funkcionális megjelenésük jellemző, specifikus vonás. A legjobban a savó fehérjék közül a WAP, míg a kazeinek esetében a béta-kazein gén szabályozása tisztázott. a A WAP esetében az NF-I, a glikokortikoid receptor (GR), és a STAT5, míg a béta-kazeinnél a STAT5, GR, C/EBPβ és a YinYang(YY)-I

transzkripciós faktorok játsszák a legfontosabb szerepet, s alakítják ki az emlőszövetspecifikus laktáció függő expressziót. [*Doppler és mtsai* 1995, *Lechner és mtsai* 1997, *Meier és mtsai* 1994, *Raught és mtsai* 1994, 1995, *Schmitt-Ney és mtsai* 1991, *Seagroves és mtsai* 1998, *Wakao és mtsai* 1994]

2.4.1. A tejfehérje géneket szabályozó fontosabb transzkripciós faktorok

A STAT5 fehérjét laktáló juh emlőszövetből izolálták először, mint új tagját a már ismert STAT fehérjecsaládnak. [*Wakao és mtsai* 1994]. A STAT5 nem kizárólag emlőspecifikus és nem csak a laktáció során működik [*Kazansky és mtsai* 1995]. Egérben két génje ismert, melyek vélhetően duplikációval keletkeztek, és rendkívül hasonlóak egymáshoz. Ezek a STAT5A és STAT5B gének. Mai ismereteink szerint minden tejfehérjének legalább egy STAT5 kötőhelye ismert, és a STAT5 jelenléte elengedhetetlen a hormonális indukció során [*Jolivet és mtsai* 1995, *Pierre és mtsai* 1996]. A STAT5 a prolaktin hormon hatására aktiválódik, tirozin foszforilációval reagálva [*Liu és mtsai* 1996]. Miután megtörtént a STAT5a és STAT5b foszforilációja is, a két fehérje heterodimert képez. A STAT5 fehérjék funkcióját null-mutáns egerekben vizsgálták. A STAT5a null-mutáns egér képtelen a laktációra, és a lobulo-alveoláris fejlődés leáll. Ezekben az egerekben a STAT5b fehérje foszforilációja teljesen visszaesik, és a STAT5b mennyisége is lecsökken [*Liu és mtsai* 1997]. A STAT5b delécios mutánsokban a lobulo-alveoláris fejlődés szintén gátolt, bár a fenotípus nem mutat olyan "erős" jelleget mint a STAT5a mutáns egér [*Teglund és mtsai* 1998, *Udy és mtsai* 1997]. Meglepő módon bármelyik esetet is vizsgáljuk, a béta-kazein szint nem változik lényegesen, viszont WAP expresszió jelentősen csökken. Ez azt mutatja, hogy az egyik STAT5 jelenléte elégséges a béta-kazein gén indukálásához.

A C/EBP transzkripciós faktorcsaládra jellemző az erősen konzervált leucin-cippzár jelenléte a C-terminális végen. Ezek a motívumok biztosítják a DNS kötését és a dimerizációt. A család β- és δ- tagjai játszanak fontos szerepet a tejfehérje gének expressziójában. A béta-kazein esetében a promóter 4 C/EBP kötőhelyet tartalmaz, s ez a megfelelő érzékenységet biztosítja a hormonális indukció során. A C/EBP mRNS-ek több fehérjevariációt kódolnak. A C/EBPβ-LIP (a rövid fehérje változat) a korai vemhesség során gátolja a többi C/EBPβ fehérje aktivitását, gátolván a kazein gén expresszió [*Gigliotti és mtsai* 1998, *Robinson és mtsai* 1998]. A C/EBPβ-LAP (a teljes hosszúságú fehérje változat) szintje a vemhesség végére a háromszorosára emelkedik, míg a C/EBPβ-LIP (rövid változat) szintje több mint a százszorosára nő. A laktáció kezdetekor a LIP szintje lezuhan, a LAP szint csak mérséklődik. Ennek köszönhetően a

LIP/LAP arány jelentősen megváltozik a vemhesség, és a laktáció során, befolyásolva a transzkripció erősségét. A C/EBP-δ szint hasonlóan változik a vemhesség és a laktáció során mint a LAP. Ennek a faktornak az emlőszövet fejlődése során a sejtciklus szabályozásában lehet szerepe [*O'Rourke és mtsai* 1997]. A C/EBP-α is jelen van az emlőszövet minden fejlődési stádiumában. A vemhesség kezdetén szintje a felére csökken, ezt követően a szintje stabil marad [*Gigliotti és mtsai* 1998, *Seagroves és mtsai* 1998]. A fent említett faktorok expressziója kaszkádszerűen jelentkezik, β-, δ-, α-sorrendben.

C/EBPβ null mutáns egerek vizsgálata érdekes eredményt adott [*Seagroves és mtsai* 1998, *Robinson és mtsai* 1998]. A szűz állatokban az emlőszövet fejlődése késedelmet szenved, mikor elérte a megfelelő fejlettséget, abnormálisan nagy elsődleges tejcsatornák alakulnak ki, kevés másodlagos elágazással. Az állatok sterilek, petefészek problémáknak köszönhetően, így a későbbi fejlődést külön be kell indítani hormonális kezelésekkel. Ezeket elvégezve a laktációra jellemző alveolo-lobuláris fejlődés is sérült. Nagy és kevés elágazást tartalmazó tejcsatornák jönnek létre, a kiválasztó sejtekben hiányoznak a szekréciós vezikulumok és a zsírcseppecskék. C/EBPβ hiányában a WAP szintje minimálisra csökkent, míg a béta-kazein szintje is legalább 85%-kal csökkent. Ezzel szemben a c/EBPα delécióját hordozó egerekben a kazein expresszió, valamint az emlőszövet fejlődése nem sérül lényegesen [*Seagroves és mtsai* 1998].

Az NF-I általánosan ismert transzkripciós faktor szerteágazó szerepekkel. A gerincesekben négy gén felelős a kódolásáért, és a különböző transzkripciós és transzlációs folyamatoknak köszönhetően igen sok izoform alakot ismerünk. Az emlőszövet-specifikus NF-I a WAP és más savófehérje gének szabályozásában játszik kiugróan fontos szerepet, amit transzgénikus kísérletekben igazoltak [*Li és mtsai* 1994a, 1994b, 1995].

Habár a glikokortikoid hormonok alapvető szerepet játszanak a tejfehérje gének szabályozásában a gének ennek ellenére nem tartalmazzák a konzervatív "glucocorticoid response" egységeket. A WAP esetében, a promóter "fél" elemeket tartalmaz palindróm ismétlődésként [*Li és mtsai* 1994b]. Ugyanez tapasztalható a béta-kazein esetében is. [*Welte és mtsai* 1993]. Az utóbbinál sikerült igazolni, hogy ezen elemek elvesztése megakadályozza a hidrokortizon és a prolaktin hatásának kifejeződését az emlőszövetben [*Lechner és mtsai* 1997].

A yinyang-I multifunkcionális hormonindukciós faktor. Mind pozitív, mind negatív regulátorként is szerepet játszhat, mivel tartalmaz aktiváló és represszáló domént is. Neve is innen ered. A béta-kazein promóter és más kazein promóterek is tartalmazzák a YY-1 faktor kötőhelyet. A béta-kazein esetében az YY-1 faktor, mint

negatív reguláló vesz részt a szabályozásban. A laktációt befolyásoló hormonok hiányában az alaptranszkripciót a minimálisra csökkenti. Ha a kötőhelyet mutációval megváltoztatjuk, a gén alapaktivitása nagyon magasra ugrik [*Schmitt-Ney és mtsai* 1991]. A hormonális indukciót a mutáció nem befolyásolja.

2.4.2. A transzkripciós faktorok kölcsönhatásai

A protein-protein kölcsönhatásoknak fontos szerep jut a tejfehérje gének szabályozásában, hiszen a transzkripciós faktorok együttműködnek, és így alakítják ki a megfelelő mértékű génkifejeződést. A STAT5 és a GR faktorok szinergista hatása bizonyított [*Stocklin és mtsai* 1996]. A kapcsolat több szinten jelentkezik. Egyfelől a STAT5 és a GR közvetlen protein-protein kölcsönhatásban állnak egymással, s a kapcsolat erőssége független a DNS-hez való kötődéstől [*Stocklin és mtsai* 1997]. Ráadásul a GR faktor DNS kötődése az aktivált STAT5 nélkül, önmagában nem is zajlik le. A közvetlen hatáson kívül a két fehérje közvetett úton is kapcsolatban áll. Az aktív GR molekulák segítik a STAT5 tirozin foszforilációját is [*Wyszomierski és mtsai* 1999].
A szinergista hatás mellett antagonista hatás is érvényesülhet. Erre jó példa az NF-κB és a STAT5 fehérjék kölcsönhatásai. A két transzkripciós faktor kötőhelye a rágcsálókban közvetlenül egymás mellett helyezkedik el, így a két fehérje erős versenyben van a DNS kötéséért. A közvetett hatás ebben az esetben is már az aktiváció során létrejön. A feltételezések szerint a STAT5 foszforilációját is gátolja az NF-κB. Az emlő epiteliális sejtekben a két fehérje aktív és gátolt állapota mindig ellentétes előjelű [*Doppler és mtsai* 2000].

2.4.3. A kromatin szerkezet fontossága

A hisztonok acetiláltsága közvetlenül kapcsolatban van a transzkripciós aktivitással. Az acetilált hisztonok esetén a kromatin szerkezet kinyílik, és lehetőség van a transzkripció beindulására. Deacetiláltság esetén az expresszió gátolt, a kromatin struktúra tömöttebb jelleget mutat.

Az elfogadott modell szerint a tejfehérje gének esetében a STAT5, GR, és C/EBP faktorok létrehoznak egy közös komplexet, mely kölcsönhatásba lép az ún. p300/CBP fehérjével [*Chakravarti és mtsai* 1996, *Mink és mtsai* 1997]. A p300/CBP elvégzi a hiszton acetilálást, magas transzkripciós aktivitást biztosítva ezzel.

Alapállapotban az YY-I gátolja a promótert a hiszton deacetilázokkal közösen. AZ YY-I faktor kölcsönhatásban van a C/EBPβ-val. Mikor a vemhesség vége felé a C/EBPβ-LIP szint lecsökken, a komplex szétesik, lehetőséget biztosítva az aktiválásra.

2.4.4. A laktogén hormonok szerepe a génműködés szabályozásában

A prolaktin hormonnak a laktáció során kitüntetett szerepe van a tejfehérje gének szabályozásában. A prolaktin hormon a prolaktin-receptorhoz kapcsolódik, és beindítja a JAK/STAT szignál-transzdukciós útvonalat. A szignál-transzdukciós útvonal egyik lépése a már korábban említett STAT5 tirozin foszforilációja, majd ezt követi a dimer képződés. A dimer képződést követően a dimer a sejtmagba jut, ahol is kapcsolódik a specifikus DNS kötőhelyre, például a tejfehérje gének promóter régiójában [*Darnell és mtsai* 1997].

A glikokortikoidok közül a laktáció során a hidrokortizon a legfontosabb. A hidrokotizon szerepe a WAP gén transzkripciójának szabályozásában valószínűleg közvetlen eseményként jelentkezik. A glikokortikoid-receptor kölcsönhatásba lép WAP promóteren található GRE (glucocorticoid response element) egységekkel, nyitja a kromatin szerkezetet, lehetővé téve az NF-I kapcsolódását is. Ezt követően a STAT5 emeli a WAP transzkripcióját a prolaktin hatására [*Li és mtsai* 1994b]. A kazeinek esetében valószínűleg direkt és indirekt folyamatok is lejátszódnak. A glikokortikoidok befolyásolják a LAP/LIP szintet és ezen keresztül hatnak egyfelől [*Raught és mtsai* 1995], másfelől a STAT5 a hidrokortizon és a glikokortikoid receptor közvetlenül vesz részt a szabályozásban. A STAT5 transzaktivációs doménje és a glikokortikoid receptor közötti kölcsönhatás ebben a folyamatban a kulcslépés.

2.4.5. Az inzulin és az inzulin szerű növekedési faktor (IGF-I) szerepe

Az inzulin jelentősen befolyásolja a tejfehérje gének expresszióját, és az emlőszövet fejlődését. Már korán felismerték hogy mind az inzulin, mind a inzulin eredetű növekedési faktor kölcsönhatásba lép a petefészekben termelődő szteroid-hormonokkal, s ez az emlőszövet szerkezeti felépítésében játszik szerepet. Ma már bizonyított, hogy az IGF-I és/vagy az inzulin a sejtciklus befolyásolásán és az apoptózis visszatartásán keresztül, az emlőszövet epitéliális sejtjeinek növekedésére hat, különösen az emlő korai fejlődésében. A későbbi fejlődés folyamán, mikor az állat eléri a laktációs kort, az inzulin szintén belép a tejfehérje gének szabályozási folyamataiba. Az a mód, ahogyan az inzulin hormon a prolaktinnal és a glikokortikoid hormonokkal együtt hat, máig sem

tisztázott pontosan, de úgy tűnik, hogy több útvonalon valósul meg. Fontos szerep jut a C/EBPα és C/EBPβ gének inzulin-függő transzkripciójának. A C/EBP faktorok szerepe pedig nélkülözhetetlen mind a kazeinek, mind a savófehérjék esetében. Feltételezhetően az inzulin közvetlenül befolyásolja a JAK/STAT útvonalat is. [Gual *és mtsai* 1998, Okajima *és mtsai* 1998].

2.4.6. Az extracelluláris mátrix jelentősége

Az extracelluláris mátrix (ECM) a szűz állatokban az emlőszövet fejlődése során komoly szerepet tölt be az epitéliális sejtek megfelelő működési állapotának létrehozásában, a tejcsatornák, felépítésében, és a csatornák megfelelő elágazásrendszerének kialakításában. Később a tejfehérje expresszió alakításában is részt vesz. Ezen a területen adatok egyelőre a béta-kazein és a β-laktoglobulin esetében elérhetőek. Természetesen az említett morfológiai változások is szükséges, de nem elégséges feltételei a tejfehérje génexpressziónak. A sejtek közötti állomány fontos a megfelelő szignálok elindításában, melyek a laktogén hormonokkal közösen végül a megfelelő génműködést eredményezik. A laminin az egyik fehérje komponens az ECM-ben mely a szignált elindítja [*Streuli és mtsai* 1995], de a β1-integrinek is közreműködnek az említett folyamatban [*Streuli és mtsai* 1991].

A szarvasmarha béta-kazein esetében ismerünk egy 160 bázispár hosszúságú DNS szakaszt, mely emlőszövetspecifikus ECM-enhanszerként létezik. Ez a béta-kazein elem 1 (BCE) nevet viseli [*Schmidhauser és mtsai* 1992]. Ez az elem emlőszövet-kultúrában ECM jelenlétében és természetesen megfelelő hormonális indukció hatására erősen megemelte a béta-kazein expresszió mértékét. ECM hiányában különösebb változást nem tapasztaltak [*Schmidhauser és mtsai* 1992].

Nagyon hasonló szerepe van a β-laktoglobulin esetében egy 406 bp hosszúságú egységnek. Ez az elem STAT5 és NF1 kötőhelyeket hordoz. Itt már az is bizonyított, hogy ECM jelenlétében az NF-I kötődése megemelkedik. STAT5 kötődése is csak abban az esetben jelentkezik, ha a sejtek ECM jelenlétében tenyésztettek [*Streuli és mtsai* 1995]. Fontos továbbá az a tény is, hogy az ECM hiányában tenyésztett emlő epitéliális sejtekben a prolaktin receptor foszforilációja is sérülést szenved [*Edwards és mtsai* 1998].

Ezek a tények mind azt igazolják, hogy a kutatások ez irányokban tervezett lépései további lényegi kérdéseket tisztázhatnak a tejfehérje gének expressziójának szabályozásában.

2.5. A tejfehérjék bioszintézise, kiválasztása

Az emlő epiteliuma nemcsak a lipid, cukor és tejfehérje termeléséért felelős, de fontos szerepe van a plazmából eredő biológiailag aktív anyagok szűrésében is. Az emlőszövetben az epitélium apró "acinusokat" alkot, ahol a szekréciós sejtek gömbszerűen veszik körül a sejtközötti teret. Itt az extracelluláris térben tárolódik a tej, mely innen az apró tejcsatornácskákba ürül. Az ürítést az acinusokat körülölelő mioepitélium sejtek segítik elő. A mioepitélium sejtek összehúzódását pedig az oxitocin hormon irányítja. Az emlő szekrécióért felelős epitélium sejtjei polarizált sejtek. Három alapvető felszínnel rendelkeznek. Az alapfelszín kapcsolódik a hajszálerekhez. A csúcsi felszínen történik a tej kiválasztása, az oldalsó felszínek a sejt-sejt kommunikációért felelnek. A laktáció során a sejtek közötti transzport lehetősége korlátozódik, és a plazmából származó anyagok már kizárólag csak a sejteken keresztül alapi-csúcsi irányban vándorolhatnak. Az epitélium sejtek által kiválasztott termékek sem közlekedhetnek az interstíciális térbe. A tejfehérjék bioszintézise az emlő epiteliális sejtjeiben a riboszómák segítségével a durva felszínű endoplazmás retikulumon történik, majd ezt követi a sejten belüli vándorlás a sejtalkotók között. A vándorlás szorosan összekötött az érési folyamatokkal, és a folyamat végeredményeként a tej eljut a tejcsatornácskákba. A frissen elkészült fehérjék Golgi apparátus elülső (cisz), középső, majd végső (transz) állomásain haladnak keresztül. A vándorlás a részek között apró vezikulumok formájában zajlik, majd a következő állomás elején a vezikulumok a "fogadó" résszel fuzionálnak. A fehérjék szortírozása már a Golgit követő ún. transz-Golgi-komplexben (TGN) zajlik [*Rothman és mtsai* 1992]. A folyamatot nyúlban is részletesen leírták [*Pauloin és mtsai* 1997].

A tejfehérjék, s közte a kappa-kazein is foszfoproteinek, ráadásul a kappa-kazein glikozilált is. Ez a két esemény a Golgi apparátusban, valamint a TGN-ben zajlik (2.6 ábra) [*Mercier és mtsai* 1981, 1991].

A brefeldin A nevű anyag tönkreteszi a Golgi ciszternáit, a Golgi készülék összeesik, és szeparálódik a TGN hálózattól. A brefeldin kezelések során a béta-kazein foszforilációja gátlódott, míg az alfa-kazeinek foszforilációja megmaradt. Ez bizonyítja, hogy legalább két kazein kináz végzi a feladatot, és a két munka egymástól elválasztva játszódik le a Golgiban illetve a TGN-ben. [*Turner és mtsai* 1993]. Biokémiai vizsgálatok megerősítették a két kazein kináz működését. [*Brooks és mtsai* 1989].

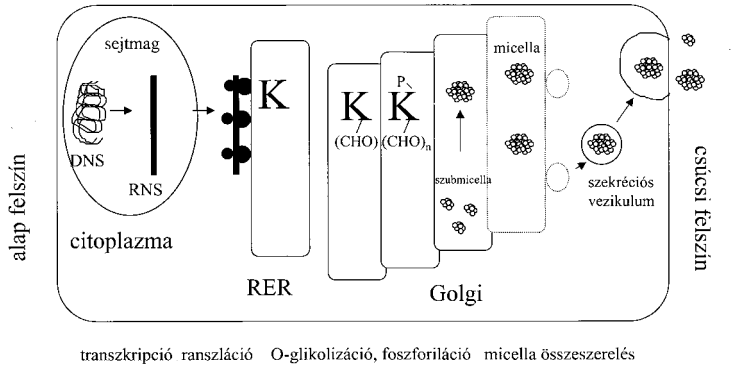
A kazein molekulák szubmicellákat, majd micellákat képeznek. Korábbi elképzelések szerint ez a folyamat a TGN-ben zajlik [*Clermont és mtsai* 1993], újabb kutatások azonban arra utalnak, hogy ez a folyamat már az igen korai transzport

lépéseknél elkezdődik. Kecskében létezik egy olyan allél, mely nagymértékben csökkent mennyiségű alfas1-kazeint tartalmaz. Finomszerkezeti vizsgálatok bizonyították, hogy a csökkent kazein szint hatással van a RER szerkezetére is. Ez bizonyítja az összeszerelődés korai létezését.

A fehérjék szétosztása után a tejfehérjék bejutnak a szekréciós vezikulumokba. A vezikulumok nemcsak kazeineket, hanem savófehérjéket is tartalmaznak, laktóz valamint különböző sók kíséretében. A laktoferrin is bizonyítottan ugyanabba a vezikulumba csomagolódik, ahol a kazein micellák találhatóak. Ezt elektronmikroszkópos vizsgálatok bizonyították. Transzgénikus egérkísérletek igazolták, hogy a rekombináns fehérjék is ugyanabba a vezikulumba csomagolódnak ahol a tejmicellák helyezkednek el, sőt ismerjük az epiteliális felszín csúcsi szakaszán a pontos transzportfolyamatot [*Devinoy és mtsai* 1995]. A folyamat végén a vezikulumok exocitózissal hagyják el a sejtek csúcsi membránját [*Wooding és mtsai* 1977, *Franke és mtsai* 1976].

A nagymennyiségű protein kiválasztás mellett, az emlő epiteliális sejtjei hormonokat is termelnek. Ezekben a sejtekben sikerült bizonyítani hipotalamo-hipofízeális hormonok expresszióját *[Olivier-Bousquet* Személyes közlés]. Növekedési hormon termelése bizonyított kutyákban, macskában, emberben [*Mol és mtsai* 1996]. Frissen termelődött prolaktint találtak daganatos emlő-sejtvonalakban [Clevenger *és mtsai* 1997], és laktációs patkány emlőszövetben [*Lkhider és mtsai* 1997]. A prolaktint nemcsak a RER-ben hanem a transz Golgi hálózatban, sőt a szekréciós vezikulumokban is megtalálták. [*Lkhider és mtsai* 1996, 1997]. Egyelőre nem tudjuk, vajon a prolaktin kötődik-e itt valamilyen receptorhoz, és hogy egyáltalán mi a pontos fiziológiai szerepe ebben az esetben.

Az eddig vizsgált szárazföldi emlősökben az emlő epitélium felépítése és szerkezete nagy hasonlóságot mutat. Így ismerjük az epitélium finomszerkezetét rágcsálókban [*Clermont és mtsai* 1993], nyúlban [*Olivier-Bousqet és mtsai* 1969], birkában [*Denamur és mtsai* 1972], kecskében [*Linzell és mtsai* 1971], szarvasmarhában [*Akers és mtsai* 1981]. Az emlő epitéliumára jellemző a plazmamembránról lefűződő sok zsákocska. A citoplazma jelentős részében jellegzetes durva felszínű endoplazmás retikulum található, szoros kapcsolatban a mitokondriumokkal. Az epitélium sejtek csúcsi részéhez közel helyezkedő ún. "transz Golgi hálózat", ahol a tejmicellák összeszerelése zajlik különösen fejlett (2.6. ábra). A sejtek közötti térben találhatóak a kazein micellák , valamint a hatalmas lipid cseppek, melyek már kiválasztásra kerültek. Előfordul itt néhány mitokondrium, valamint az endoplazmás retikulumról leszakadó darabok is.



2.6. ábra Az emlő epiteliális sejtjeiben lejátszódó folyamatok sematikus rajza. Nagy K betű jelzi a kazeineket. A RER a durva felszínű endoplazmás retikulum. P jelzi a foszforilációt, CHO a glikolizációt

2.5.1. A tejfehérje kiválasztás szabályozása

A tejfehérje gének kiválasztását radioaktívan jelzett kén segítségével lehet egyszerűen nyomon követni [*Turner és mtsai* 1992b, *Rennison és mtsai* 1992]. A kísérletek során kiderült, hogy a tejfehérjék kiválasztása részben állandó, részben szabályozott folyamatok végeredménye. A frissen termelődött fehérjék kb. 30%-a 60-120 percen belül ki is ürül [*Turner és mtsai* 1992]. Meglepő módon a fehérjék nagyobb része (70%) nem választódott ki közvetlenül a szintézis, vándorlás és csomagolás után. Ezt az elektronmikroszkópos vizsgálatok is bizonyították [Franke *és mtsai* 1976]. A folyamatos kiválasztás során olyan rövid a fél életideje a vezikulumoknak, hogy az elektronmikroszkópos képek csak kevés vezikulát mutatnának. Ez volt az első indirekt jelzés a szabályozott szekréciós folyamatok létezésére. A bizonyítás kalcium ionofórok felhasználásával sikerült. Megnövelve a kalcium ion koncentrációját az alap szekréció befejezését követően további kiválasztást sikerült elérni [*Turner és mtsai* 1992]. A két független folyamatot sikerült egyszerre is tanulmányozni digitonin segítségével [*Turner és mtsai* 1992b].

Nocodasol-al kezelt sejtekben- a kezelés tönkreteszi a mikrotubulusokat, így a fehérje teljes szállítása és érése sérül- az ionofór indukált szekréció megmarad [*Rennison és mtsai* 1992]. A kiválasztó sejtek kalcium ion koncentrációját mechanikai inger emeli [*Furuya és mtsai* 1993], így elképzelhető egy mechanikai ingeren keresztül beindított

szabályozott folyamat. Egyenlőre azonban ilyen mechanikai ingert nem ismerünk. Egyesek feltételezik, hogy a folyamatot a prolaktin szabályozza [*Ollivier-Bousquet és mtsai* 1978] arachidonsavon keresztül [*Ollivier-Bousquet és mtsai* 1991, *Blachier és mtsai* 1982]. A prolaktin aktiválja a foszfolipáz A2 működését [*Blachier és mtsai* 1982] növelve ezáltal a vezikulák fúziós esélyeit az exocitózis során [*Ollivier-Bousquet és mtsai* 1993 *Pauolin és mtsai* 1997]. A folyamat azonban még nem bizonyított.

Mások feltételezik, hogy a folyamat szabályozásában szerepet játszhat az annexin II nevű fehérje [*Burgoyne és mtsai* 1989], mely alapállapotban elszórt expressziót mutat a sejten belül, a vemhesség során azonban az expresszió az epiteliális sejtek csúcsi részére korlátozódik [*Handel és mtsai* 1991].

Felvetődik a kérdés, vajon a két folyamat által külön szabályozott ürítésben résztvevő vezikulák külön úton is csomagolódnak? A kérdés tisztázatlan, bár valószínűbb hogy nincs két külön csomagolási útvonal.

Az alap kiválasztás szabályozása nagy valószínűséggel negatív visszacsatolási folyamatok eredménye [*Blatchford és mtsai* 1982, *Wilde és mtsai* 1990]. Ha a lumenben túlságosan felszaporodott a kazein, akkor az alapszekréció lecsökken. Az egyik jelölt, mely szabályozhatja a visszacsatolási folyamatokat a TGFβ, melyről ismert hogy magas koncentrációja esetén emlőszövet kultúrában csökkenti a kazein szekréciót [*Robinson és mtsai* 1993]. A magas koncentráció miatt, azonban valószínűleg csak szerepet játszik a szabályozásban.

Egy másik jelölt az angol neve után FIL- nek nevezett peptid (feedback inhibitor of lactation) [*Wilde* és mtsai 1987, 1995]. A FIL bizonyítottan gátolja az alapszekréciót [*Rennison* és mtsai 1993]. A FIL a kálcium függő folyamatokra nem volt hatással. A FIL nemcsak a kiválasztást, hanem az endoplazmás retikulum finomszerkezetét, is megváltoztatta, ez a hatás azonban visszafordítható folyamat [*Burgoyne és mtsai* 1995]. A FIL valószínűleg leállítja az endoplazmás retikulum és a Golgi közötti transzport folyamatokat, ez csökkenti az alapszekréciót, az endoplazmás retikulumban azonban - szállítás hiányában - felhalmozódnak a fehérjék, az endoplazmás retikulum megduzzad, ez tovább csökkenti a fehérjeszintézist. A szignál útja azonban nem ismert, de a leggyakoribb másodlagos hírvivők nem játszanak szerepet ebben a folyamatban [*Rennison és mtsai* 1993].

2.6. A kazein micellák felépítése

2.6.1. A kazeinek önasszociációja

A tej elsődleges szerepe az újszülött állatok táplálása. Ezt a szerepét oly módon látja el, hogy a tejfehérjék nagy része kalcium-foszfáttal bonyolult komplexet alkot. Ez a komplex nagyméretű kolloid részecskékből, a micellákból áll.

A kazeinekre jellemző az a képesség, hogy önmagukban is képesek összekapcsolódni. Ez azzal magyarázható, hogy általában erősen hidrofób tulajdonságokkal rendelkeznek, és jellegzetes töltéseloszlásuk van. A fehérjéket ezáltal összekötő erők természetesen a környezet hőmérsékleti és pH viszonyaitól is függnek.
Az alfas1-kazein lúgos közegben monomer. [*Schmidt és mtsai* 1970]. A pH csökkenésével lépésenként kapcsolódnak a molekulák oligomerekké [*Payens és mtsai* 1966]. Az összekapcsolódás végeredménye: pálcika alakú halmazok [*Thurn és mtsai* 1987a,b].

Az alfas2-kazein semleges pH körülmények között amfoter jelleget mutat. A C-terminális része erősen pozitív, míg az N-terminális erősen negatív. A fehérje oligomerizációja szintén lépésenként következik be [*Snoeren és mtsai* 1980].

A béta-kazein a leginkább hidrofób jellegű kazein molekula. N-terminális részén erősen negatív, míg a molekula C-terminálisa jellegzetesen hidrofób, természetes tehát hogy hasonlóan a többi kazein molekulához, önasszociációra képes. Ultracentrifugával, valamint fényszóródáson alapuló vizsgálatokkal sikerült igazolni, a béta-kazeinek polimerizációját. Érdekes módon a polimerek egy szűk mérettartományba esnek. [*Payens és mtsai* 1969]. A szűk tartományon belül is két méret az, mely kitüntetett szerepet visel [*Buchheim és mtsai* 1979]. A polimer alakja szférikus [*Andrews és mtsai* 1979], illetve ellipszoid alakú *[Kajiwara és mtsai* 1988]. Az összeépülést alapvetően a molekulák C-terminálisai biztosítják. A végső három aminosav eltávolítása az asszociáció mértékét jelentősen gátolja [*Evans és mtsai* 1979], míg az utolsó húsz aminosav levágása után a molekulának ez a tulajdonsága megszűnik [*Berry és mtsai* 1975].

2.6.2. A kappa-kazein molekulák összekapcsolódása

A kazeinek között a kappa-kazein a második leginkább hidrofób molekula, jellegzetesen amfoter tulajdonságokkal, habár kevésbé mint azt a béta–kazein esetében már láttuk. Az alacsony foszfát–észter tartalomnak köszönhetően a kappa-kazein

kálcium oldékony fehérje. Ez a két tulajdonság biztosítja a molekula különleges tulajdonságait.
A molekula oxidált (S–S) kötéseket tartalmazó, valamint redukált (S–H) kötéseket tartalmazó változata is képes az önasszociációra. [*Swaisgood és mtsai* 1964, *Talbot és mtsai* 1970, *Slattery és mtsai* 1973]. Az összekapcsolódás monomer–polimer jellegű [*Vreeman és mtsai* 1977,1979,1981]. A polimerizáció megfelelő körülmények között harmincas méretet érhet el. A molekulahalmaz alakja leginkább szférikus, 23 nm méretű [*Vreeman és mtsai* 1981]. Tej ultrafiltrátumban bizonyos körülmények között 140 molekula összefonódását is megfigyelték, s a struktúrában alegységek (szubmicellák) jöhetnek létre [*Thurn és mtsai* 1987b]. NMR adatok szerint a polimer viszonylag merev maggal, és rugalmas héjjal rendelkezik [*Rollema és mtsai* 1988]. A kazeinek N végei alkotják a magot, míg a karboxi végek a külső rugalmas részt építik fel.

Ellentétben a többi kazeinnel a kappa–kazein polimerizációs hajlama független a hőmérséklettől és az ionerősségtől. Ez a karboxi–terminális alacsony töltésével magyarázható, mely végső soron a micellaméret meghatározásában döntő jelentőségű [*Vreeman és mtsai* 1979].

2.6.3. A kazeinek kötődése fémionokhoz

Az ismert kazeinek mind képesek a kétértékű fémionok kötésére. Mivel ennek a kötődésnek fontos szerepe van a kálcium esetében, így a kálcium ionok kötődése a kazein molekulákhoz, régóta jól ismert fiziko–kémiai folyamat. Az elsődleges kálcium kőtők a kazein fehérjék foszfoszeril oldalláncai, de enyhe kötést képesek létrehozni az aszparaginsav, valamint glutaminsav oldalláncok is [*Dicson és mtsai* 1971]. A kazeinek kálciumkötése az alfas1-; alfas2-;béta-; kappa-kazein sorrendben csökken. A fémionok kötése csökkenti a fehérjék töltését, így a közöttük lévő kapcsolat fokozatosan csökken, majd a fehérjék emelkedő ionkoncentráció mellett kicsapódnak [*Thompson és mtsai* 1969].
Az alfas1; alfas2; béta-kazeinek a tejben olyan koncentrációban kötik a kálciumot, hogy alapállapotban ez a kicsapódásukhoz vezetne. A kappa–kazein molekulák azonban megakadályozzák, hogy ez a kicsapódás végbemenjen a tejben [*Toma és mtsai* 1973, *Jang és mtsai* 1990], így tartva oldatban a többi kazeint.

2.6.4. A kazeinek elhelyezkedése a micelláris struktúrában

A kazein fehérjék micellán belüli elhelyezkedését részben elektronmikroszkópos, részben méret szerint elválasztott, specifikusan jelölt micellák segítségével lehet tanulmányozni. A korai eredmények kissé ellentmondanak egymásnak. Ezüstfestéses mikroszkópos eljárások szerint a glikolizált kappa−kazein a micellát teljes egészében átszövi, bár a felszínen jelentősebb mennyiségben található meg [*Kudo és mtsai* 1979]. Más esetben a micellán belül nem sikerült kimutatni, csak a felszínen, mint összekötő, molekulát [*Horisberger és mtsai* 1980]. Máskor teljesen egyenletes eloszlást figyeltek meg ugyanezen technikát alkalmazva [*Horisberger és mtsai* 1984a,b]. Mesterséges micellák vizsgálata megerősítette a kappa−kazein felszíni jelenlétét, míg az alfas- és béta−kazeinek egyenletesen oszlottak el [*Schmidt és mtsai* 1982]. Elektronmikroszkópos immunológiai technikák szerint a nagy micellák felszínén található meg a kappa−kazein, míg a kisméretű micelláknál eloszlása egyenletes, nem korlátozódik a felszínre [*Caroll és mtsai* 1983].

Méret szerint elválasztott micellafrakciók elemzése megbízhatóbb adatokkal szolgált. A szerzők megegyeznek abban, hogy a micellaméret csökkenésével nő a kappa−kazein tartalom a különböző frakciókban, míg az alfas1 és béta−kazeinek mennyisége csökken [*McGann és mtsai* 1980, *Donnelly és mtsai* 1984]. Az adatokat megerősítette *Dagleish* [1989], aki a frakciókat spektroszkópiai elemzésnek vetette alá, s megállapította, hogy a micellák felszínén alfas1- és kappa−kazein található, jelentéktelen mennyiségű béta−kazeinnel, míg a micellák belsejét alfas1- és béta−kazeinek alkotják, kappa-kazeintől azonban mentes ez a terület. NMR adatok szerint a micellák belsejéből rugalmas polipeptid láncok nyúlnak ki −ez feltehetően a kappa-kazein molekulák C−terminális vége [*Griffin és mtsai* 1985], s más fehérjék kevésbé fordulnak elő a felszíni részeken [*Rollema és mtsai* 1988]. Végül úgy tűnik, a kappa−kazein oldalláncok felszíni elhelyezkedése bebizonyított tény. A belső részek felépítését valószínűleg az alfas1- és béta−kazeinek végzik [*Heth és mtsai* 1982].

Továbbra is vita tárgyát képezi az, vajon a glikolizált és a nem glikolizált kappa−kazeinek azonos módon viselkednek−e? Egyesek szerint ugyanúgy [*Donnelly és mtsai* 1984, *Dalgleish és mtsai* 1985], mások szerint a glikolizált forma csak a nagyobb micellákra jellemző [*Creamer és mtsai* 1973, *Slattery és mtsai* 1978].

A kazein micellák elektronmikroszkópos képeken inhomogén felépítést mutatnak. [*Knoop és mtsai* 1973, *Kalab és mtsai* 1982]. Az elektronmikroszkópos technika azonban bizonyos esetekben hibás következtetéseket enged levonni.

A neutron és röntgen sugárzás szóródásán alapuló vizsgálatok azonban megerősítették az inhomogén felépítés jellegét. [*Stothart és mtsai* 1982, 1989*, Kumosinszki és mtsai* 1988].

2.6.5. Micella modellek

Az előző fejezetben leírt tények tükrében több modell született, melyek közül az újabb adatok (NMR, neutron és röntgen adatok) többet felülbíráltak.

2.6.5.1. Mag−takaró modellek

A mag−takaró modellek szerint a micellát belső mag, és az azt körülölelő réteg alkotja. A két részben a fehérjék eloszlása is különböző. *Waugh és Noble* [1965] szerint a micella szférikus alakkal rendelkezik. A magot alfas és béta−kazeinek, a takarót a kappa−kazein alkotja. *Payens* [1966] finomított modellje szerint a magban kompakt módon feltekeredett alfas1-kazein molekulák kapcsolódnak a béta−kazein hálózathoz, míg a külső burok a kappa−kazein. A kálcium−foszfát itt is, ott is jelen van. *Parry és Carroll* 1969 immunotechnikával sem talált kappa−kazeint a felszínen, így a magba helyezte azt.

2.6.5.2. Belső szerkezeti modellek

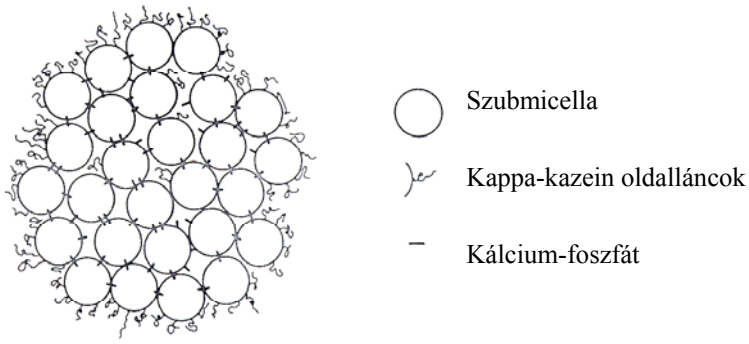
Az első belső szerkezeti modellt [*Rose és mtsai* 1969] alkotta. E szerint a béta−kazeinek elkezdenek összekapcsolódni, ezt követően az alfas kazeinek tapadnak a már létrejött polimerhez, míg végül a kappa−kazein az alfas kazeinekhez kötődik, kialakítva a végső méretet. Ezután csatlakoznak csak a kálium−foszfát molekulái. A végső micellát ezek az aggregátumok alakítják ki, melyek egymásba is kapcsolódnak, mégpedig úgy, hogy a kappa−kazein alkotja a külső réteget. *Garnier és Ribadeau−Dumas* [1970] más modellt alkotott, melyben a micella egy háromdimenziós lukacsos hálózat. Három kappa−kazein alkot egy csomópontot, és ebből ágaznak le az alfas és béta−kazein fehérje oldalláncok. Azóta ez a modell túlhaladottá vált.

2.6.5.3. Alegység modellek

Ma a legelfogadottabb modellnek az alegységmodellek számítanak melyet először *Morr és mtsai* [1967] alkottak meg. A modell alapján a micella alegységekből épül fel, ezeket szubmicelláknak nevezzük. A szubmicella belső struktúrával

rendelkezik. Magja (alfas és béta), míg felszíneit kappa–kazein és kevés alfas kazein alkotja. Az alegységeket kálium–foszfát hidak kötik össze. *Slattery és Evard* [1973] már dinamikusabb modellel jelentkezett, ahol az alegységek felépítése változó lehet. Egyesek tartalmaznak, mások nem tartalmaznak kappa–kazeint. A micella növekedésének az vet véget, mikor a kappa–kazeint tartalmazó alegységek összeérnek, és egységes külsőt alkotnak. A modell sok mindent megmagyaráz, de hiányzik belőle a kálium–foszfát szerepe. Ennek a gondolatnak a továbbfejlesztett változata *Schmidt és mtsai* [1982] munkája, ahol szintén különböző alegységek léteznek. A kappa–kazein tartalmúak a felszínen vannak, a többi belül. Minden alegység tartalmaz hidrofób magvat. Az alegységek egymással kizárólag kálcium–foszfát segítségével kapcsolódnak össze. Kálcium–foszfát minden észter foszfáthoz kapcsolódik, így a CaP csoportok (clusterek) alakulhatnak ki. A modellt *Walstra és mtsai* [1984, 1990] egészítette ki, belevonva azt, hogy a szférikus stabilitást a kappa–kazein biztosítja azáltal, hogy a molekula C terminálisa kilóg a felszínre. Egy alegységet 15–25 kazein molekula épít fel [*Walstra és mtsai* 1990].

Neutron és röntgen-szóródáson alapuló vizsgálatok is alátámasztják a fenti modell hitelességét [*Stothart és mtsai* 1989, *Pessen és mtsai* 1989]. Az alegységmodell a 2.7. ábrán látható.



2.7.ábra A tejmicellák alegység modelleje

A fenti ismeretek mind szarvasmarhára vonatkoznak. Más állatfajokban végzett kísérletek is alátámasztják a fent leírtakat, bár apróbb eltérések nyilvánvalóan léteznek. (például a kecske és az emberi micellák viszonylag kevés alfas1-kazeint tartalmaznak) A micellák mérete adott határértékek között változik a különbözõ fajokban. (2.3. táblázat)

Újabban Holt és munkatársai ismét támadják az alegység modellt.[*Holt és mtsai* 1998]. Véleményük szerint a kálcium−foszfát által létrehozott magot protein burok határolja. (visszatérés a mag−takaró modellhez.) Ezt mesterséges kálcium−foszfát/béta−kazein molekularészlet elegyével sikerült is modellezni megfelelő *in vitro* környezetben. A modell állítása szerint a kazeinek szerepe abban áll, hogy megakadályozza a kálcium ionok kicsapódását, ezáltal gátolván az emlőszövet kalcifikálódását. A tejnek sokkal inkább kálcium szállító, mint tápláló szerepe van ?!! A kappa-kazeint ebből a szempontból funkció nélkülinek tekinti, mivel nem tartalmaz foszfát központot. A modell megad egy empirikus formulát is a micelláris felépítésre.
Az empirikus formula képlete: $[Ca_{13.2}[P_i]_{6.5}Mg_1Cit_{1.3}[SerP]_sCas_{1/F}]_{49}$, ahol S a foszfát központok száma, F pedig a foszfát központok száma kazein molekulánként.
A felvetés sok mindent magyaráz, azonban igen sok tényt nem vesz figyelembe. A ma elfogadott szemlélet szerint is a kálcium−foszfát csoportok szerepe valószínűleg nagyobb, mint azt korábban gondolták. Ezt a tényt azonban már a módosított Walstra−féle szerkezet is magában foglalja.

2.3. táblázat. Különböző állatfajok micellaméretei [*Rollema és mtsai* 1992] Az alábbi adatok csak tájékoztatásul szolgálnak, mert még azonos mérési körülmények között is a micellák mérete erős szezonalitást mutat. Nyáron kisebbek a micellák mint télen. [*Holt és mtsai* 1978].

faj	Átmérő elektronmikroszkóp [nm]	Átmérő fényszóródás [nm]
szarvasmarha	47	182
bivaly	104	167
kecske	52	282
juh	59	122
ember	33	64
sertés	65	133
ló	140	255
szamár	187	293
teve	27	243

2.7. A tej alvadása, a micelláris felépítés megszűnése

A tej aludt tejjel való beoltása után hamarosan alvadásnak indul. A sajtgyártás eme első lépése két részfolyamatra osztható. Az első lépés a kappa-kazein emésztése

proteolitikus enzimek által (kimozin, pepszin, mikrobiális proteázok). Ez a lépés teszi lehetővé a micelláris struktúra megbomlását. Az ezt követő egység az alvadás második szakasza, melyre a micellák szétesése, és összecsapódása jellemző. Természetesen a két folyamat egymásba fonódik, és az alvadás már nagyrészt megtörténhet, amikor a kappa-kazein egy része még emésztetlen marad [*Green és mtsai* 1978]. A folyamat természetesen nem csak a sajtgyártás folyamán fontos, hanem az újszülött állatok gyomrában is hasonlóképpen játszódik le, elősegítve táplálásukat.

2.7.1. A kimozin enzim hatása

A kappa-kazein szerkezetéből adódóan a micella stabilitását biztosítja. A hidrofób para−kappa−kazein molekularész a felszínről befelé, míg a hidrofil makropeptid szakasz a környező oldatba nyúlik, stabilizálva a szerkezetet [*Holt és mtsai* 1975, *Walstra és mtsai* 1981, *Horne és mtsai* 1984, 1986, *Holt és mtsai* 1986].

A fent említett proteinázok pontosan a hidrofób−hidrofil határon hasítják a kappa-kazeint. Ez szarvasmarhában specifikusan a 105−106 Phe−Met aminosavak között történik meg [*Jollés és mtsai* 1968]. Ezt követően a makropeptid a tejszérumba vándorol, a stabilizáló hatás megszűnik, megindul a kicsapódás. Azok az enzimek melyek a hasításért felelősek, a savas proteázok családjába tartoznak [*Foltmann és mtsai* 1987]. Igen fontos, a (tej)ipar által legnagyobb mennyiségben használt enzimek. Régebben borjúgyomorból izolálták mint oltóenzimet a sajtgyártáshoz, ma már természetesen rekombináns formában is kapható. Az enzimatikus reakciót nehéz nyomon követni, mert a kappa-kazein polimorf fehérje, ráadásul különböző glikoziláltsági fok jellemző rá [*Schmidt és mtsai* 1966, *Armstrong és mtsai* 1967]. Így ma is inkább a keletkező para−kappa-kazein, vagy a makropeptid alapján vizsgálható az emésztés hatékonysága. Az enzim reakció egylépéses esemény, mely a Michaelis−Menten kinetikát követi [*Visser és mtsai* 1980].

A szarvasmarhánál az enzimreakcióban kitüntetett szerepe van a kappa-kazein 97. és 129. aminosavak által közrezárt területnek. Aminosav cserék a régión belül a reakció sebességét befolyásolják [*Beeby és mtsai* 1976 *Hill és mtsai* 1978]. A hasításhoz minimálisan a környező öt aminosavra van szükség [*Hill és mtsai* 1968, 1969], ami nem meglepő, mivel az enzimreakció létrejöttéhez szükséges háromdimenziós szerkezetnek létre kell jönnie.

A különböző glikolizált kappa-kazein formák emészthetősége között nincs komoly különbség, bár a glikolizált forma kissé lassabban hasad [*Vreeman és mtsai* 1986].

A kimozin, (illetve más savas proteinázok) hasítása nem korlátozódik kizárólag a kappa-kazeinre, jellemző az alfas-, és a béta–kazeinekre is, bár itt a hasítás jóval lassúbb, kevésbé specifikus. Szerepe a micellák szétesésében nincs, de a sajt érlelése során van [*Holmes és mtsai* 1977].

2.7.2. A megemésztett micellák szétesése

Az alvadás előtt a micellák nem mutatnak összetapadási hajlamot. Ezt két dologgal magyarázhatjuk: egyrészt a micellák felületükön negatív töltést hordanak, így taszítják egymást [*Dalgleish és mtsai* 1989b]. Másrészt a kilógó makropeptid régió által létrejött ″szőrös″ struktúra is akadályozza ezt [*Horne és mtsai* 1986,].
Alvadáskor a felület negatív töltéseinek nagy része elveszik, elvándorol a makropeptid által [*Dalgleish és mtsai* 1984]. A micellák mérete a felületi töltés csökkenésével fokozatosan csökken, egészen 5−12 nm határig [*Guthy és mtsai* 1989]. A folyadék viszkozitása szintén csökken ebben a szakaszban. A töltés és a szférikus gátlás elvesztése –nincs többé makropeptid– egyre több és több micellát tesz alkalmassá az összecsapódásra. Az összecsapódás valószínűleg ún. ″forró pontok″ irányából indul el [*Green és mtsai* 1981]. Úgy tűnik, az aggregáció sebessége független a micellák méretétől. Az események ezután felgyorsulnak, mire a proteolízis a maximumához ér, az összecsapódás is lezajlott [*Dalgleish és mtsai* 1979]. A micellák aggregációja a Smoluchowski kinetikát követi, mely általános jelleg a kolloid oldatok esetében.

A kicsapódás sebességét természetesen a fiziko–kémiai paraméterek erősen befolyásolják– úgymint hőmérséklet pH, kálciumion koncentráció, kálciumfoszfát tartalom.

2.8. Transzgénikus emlősállatok

Transzgénikus emlősállatoknak nevezzük azokat az emlősöket, melyek valamilyen külső segítséggel bejuttatott ″idegen″ genetikai információt hordoznak. Az információt stabilan a kromoszómába épülve minden sejtjük tartalmazza, azt mendeli módón örökítik is. Ez nyilvánvalóan csak úgy valósítható meg, ha az embrionális korai fejlődési szakaszokat érinti a beavatkozás.

A fenti kitételek nagyon fontosak, mivel ezek teszik lehetővé az új tulajdonság megnyilvánulásának vizsgálatát. Más állatokban, mint például a halakban, a transzgenezisnek nincsenek ilyen szigorú feltételei. A bejuttatott DNS ugyanis általában minden állatfajban több napig fennmaradhat. A halakban, az embrionális fejlődés

roppant gyorsan lezajlik– akár néhány nap alatt. A stabilan be nem épült genetikai információ–episzómaként megmaradt DNS is- komoly eszköze lehet a fejlődésbiológiának [Müller *és mtsai* 1993]. Az episzómális DNS akár az utódokba is bejuthat.

2.8.1. Rövid történelem

Emlősállatok genetikai anyagának megváltoztatására először a hetvenes években tettek kísérletet. Ekkor sikerült retrovírus DNS–t egér zigótába juttatni mikroinjektálás segítségével [*Jaenisch és mtsai* 1974, 1975]. Nem virális eredetű DNS bevitele az egér genomba szintén mikroinjektálással sikerült 1980–ban. [*Gordon és mtsai* 1980]. Ezt követően sikerült bebizonyítani, hogy a bejutatott DNS öröklődik is [*Gordon és mtsai* 1981, *Brinster és mtsai* 1981]. Ezt követte az a kutatási eredmény, mely a technikát világhíressé tette. Emberi növekedési hormon gént juttattak egérbe, mely szinte patkány méretűre növekedett [*Palmiter és mtsai* 1982].

Az események ezt követően roppant gyorsan követték egymást. Sikerült hasonló módszerrel transzgénikus juhot, sertést, és nyulat létrehozni [*Hammer és mtsai* 1985]. 1981–ben számoltak be elő ízben ES (embrionális őssejt) sejtvonalból létrehozott kiméra állatok születéséről egérben [*Evans és mtsai* 1981 *Martin és mtsai* 1981]. (Sajnos háziállatokban a mai napig nincs jól működő ES sejtvonal.) 1986–ban alkották meg az első transzgénikus egeret ES sejtek felhasználásával [*Robertson és mtsai* 1986]. Homológ rekombináció (helyspecifikus gene targeting) ES sejtekben–1987 újabb mérföldkőnek tekinthető [*Thomas és mtsai* 1987]. Ebben az évben sikerült először olyan transzgénikus állatot bemutatni, amely a tejben expresszált idegen fehérjét [Simons *és mtsai* 1987]. 1989–ben a célzott genetikai változtatás (gene targeting) is sikerült egérben. [*Koller és mtsai* 1989].

A kilencvenes évek vége újabb technikai áttörést hozott. Dolly példája megmutatta, hogy már differenciálódott sejtek sejtmagátültetése petesejtekbe, felnőtt egyed kifejlődését eredményezi [*Wilmut és mtsai* 1997]. A technika alkalmazása nem csak a klónozás miatt fontos lépés, hanem lehetőséget ad transzgénikus állatok létrehozására is. A testi sejtek transzformálása megoldható, ez kombinálva a klónozási lépéssel újabb módszert biztosít a kutatóknak. Ezt a lépést először szintén 1997–ben sikerült megtenni. Transzgénikus birkát hoztak létre klónozással [*Schnieke és mtsai* 1997]. Az új évezredben megszületett az a klónozott juh, amelyben már célzott genetika változtatást eszközöltek [*Mccreath és mtsai* 2000].

2.8.2. A transzgénikus technika módszerei, ezek előnyei, illetve hátrányai

2.8.2.1. Mikroinjektálás

A mikroinjektálás tekinthető a legelső sikeres transzgénikus technikának [*Gordon és mtsai* 1980]. A frissen megtermékenyült emlős zigóta, adott fejlődési szakaszban két előmagvat tartalmaz, az apait, valamint az anyai eredetűt. Ezek később összeolvadnak, és megindulhat az osztódás. Az embriókat ebben a fázisban kell kimosni az anyaállatok petevezetőiből. A genetikai információ bevitele még az összeolvadás előtt megtörténik. Inverz mikroszkóp segítségével, speciális optikát használva (differenciál interferencia optika– Nomarski, ill. Hoffman optika), az előmagvak jól láthatóvá tehetők. Az embrió vékony, megfelelő alakú üvegkapillárissal megfogható, ezt követően egy másik 1–2 mikrométer átmérőjű kapillárissal az alacsony koncentrációjú DNS oldat (1–2 ng/µl) bejuttatható valamelyik előmagba. Mivel az apai előmag általában nagyobb és jobban látható, a szúrás ezt az előmagvat érinti. A kapillárisok mozgatását mikromanipulátorok végzik. A bejuttatott DNS térfogata embriónként roppant kevés, néhány pikoliter. Ez a DNS méretétől függően azért még mindig több száz, esetleg egy–két ezer kópiát jelent [*Hogan és mtsai* 1986]. A beépülés a kromoszómába véletlenszerű és általában konkatamerek formájában (mint a vonatban a kocsik- egymás után) történik. A manipulált embriókat visszaültetik álvemhes nőstényekbe, majd a megszületett utódokat tesztelik az adott transzgénre (PCR, Southern technika).

Előnye a technikának, hogy jól jellemzett, viszonylag egyszerűen kivitelezhető, aránylag olcsó, és nagy DNS szakaszok (többszáz megabázis) integrálhatók.

Hátrányai: munkaigényes, képzett technikus alkalmazása szükséges, kis hatékonyságú (a megszületett utódok kb. 10 százaléka hordozó egérben, más állatokban ez az arány sokkal rosszabb is lehet), a transzgén beépülése véletlenszerű, függ a kromoszómális környezettől, (pozíció effektus) így sok transzgénikus vonal létrehozása szükséges a megfelelő eredmények eléréséhez.

2.8.2.2. Retrovírus segítségével létrehozott transzgénikus állatok

A retrovírusok felhasználása transzgénikus állatok létrehozására 1985-ben történt meg először több független kutatócsoportban [*Huszar és mtsai* 1985, *Jahner és mtsai* 1985, *Van der Putten és mtsai* 1985].

A retrovírusok genetikai anyaga képes a vírusfertőzés után stabilan integrálódni a sejt kromoszómális környezetébe, lehetőséget biztosítva idegen gének bejuttatására. A megfelelő vektor konstrukció a hordozott idegen génen kívül tartalmaz az integrációhoz, valamint a megfelelő csomagolódáshoz szükséges virális szabályozó szakaszokat is.

A sikeres működéshez a jól megtervezett vektoron kívül egy ún. "pakoló" sejtvonal szükséges, mely képes fertőző vírusokat összeszerelni, melyek tartalmazzák a számunkra fontos gént (transzgént), de képtelenek összeszerelni valódi retrovírusokat.

A virális fertőzés az embrió néhány sejtes állapotában történik meg, majd az embriókat hólyagcsíra állapotban beültetik álvemhes nőstényekbe.

A módszer előnye a rendkívül jó hatásfok (közel 100%), valamint az egykópiás beépülés.[Soriano *és mtsai* 1986]. Fontos előny, hogy nincs szükség mikromanipulációra.

Hátrányok: A keletkező állat mindig mozaikos lesz (azaz nem minden sejt tartalmazza a transzgént), hiszen a fertőzés nem egysejtes zigótán történik. Ez azonban lehetőséget nyújt az embriófejlődés során a sejtleszármazások tanulmányozására [Soriano *és mtsai* 1986]. További hátrány, hogy a maxium 8 kilobázis hosszúságú DNS szakaszok juttathatók be a sejtmagba, ami leggyakrabban csak cDNS konstrukciók esetében elérhető mérettartomány. A legfontosabb ellenérv azonban az, hogy a bejuttatott konstrukció retrovirális szabályozó elemeket hordoz, fenntartva azt a lehetőséget, hogy valamilyen rekombinációs esemény során új retrovírusok képződhetnek. A módszert mikroinjektálással kombinálva sikerült kiterjeszteni szarvasmarha petesejtekre is [*Chan és mtsai* 1998], ami óriási ugrást jelent hatékonyság növelésben. A fenti kételyek miatt a módszer használata egyelőre korlátozott.

2.8.2.3. Transzgénikus állatok spermium közvetítésével

Már a hetvenes években sikerült kimutatni, hogy az emlősök spermiuma képes a DNS kötésére [*Brackett és mtsai* 1971]. Ez azután felvetette a lehetőségét annak, hogy, a spermiumokat natív DNS-el összekeverve transzgénikus állatokat hozzunk létre [*Lavitrano és mtsai* 1989]. Az eredmények reprodukálása azonban nehézségekbe ütközött. Máig tart a vita a módszer működőképességéről. Úgy tűnik egyes munkacsoportok képesek a módszert sikeresen használni, máshol a hatékonyság nagyon rossz. A Lavitrano csoport továbbra is kitart sikere mellett, felhívta a figyelmet sok apró dologra, mely akadályozhatja a munka hatékonyságát (embriók minősége). Újabban fagyasztással előzetesen mozgáskorlátozták a spermiumokat, majd összekeverve a DNS-sel, azokat petesejtek citoplazmájába injektálták (ICSI) [*Perry és mtsai* 1999]. Így azonban a módszer előnye- “keverd össze a DNS-t a spermiummal csinálj *in vitro* fertilizációt”- elveszik.

2.8.2.4. Transzgénikus állatok előállítása ES sejt technológiával

Egér hólyagcsírák belső sejtcsomójából (ICM), sejtek izolálhatók. Ezek a sejtek gyakorlatilag pluripotensek, azaz még nem differenciálódott sejtek, az embrió bármely részének felépítésében részt vehetnek. Az említett sejtekből sejtvonalat lehet létrehozni *in vitro* körülmények között, melyek megőrzik pluripotens képességüket. A sejtek könnyen transzformálhatóak. A transzformált sejteket egér blasztocisztákba injektálva, esetleg az ún szendvicstechnikával [*Nagy és mtsai* 1990] (két 8 sejtes embrió és ES sejtcsomó normál embriót alkot) normális embriók képezhetők, melyeket álvemhes anyákba lehet beültetni. A megszületett utódgeneráció mozaikos, ha szerencsések vagyunk akkor ivarsejt−mozaikos állatokat kapunk (az ivarsejtek egy része hordozza a transzgént). Az F2 generáció már tartalmaz tisztán transzgénikus egyedeket. Ez a technika teszi lehetővé a homológ rekombinációt egérben. Ennek hatékonysága mindössze 10^{-6}–10^{-7}, de sejttenyészetben- ahol ennél jóval több sejtet transzformálnak egyszerre- ez kivitelezhető, megfelelő szelekciós rendszer mellett. Ezáltal nyílt lehetőség célzatosan tervezett transzgénikus és null mutáns állatok létrehozására. Manapság a Cre-LoxP rekombinációs rendszert kombinálva az ES technológiával, szövetspecifikusan célzott mutációk állíthatók elő. A Cre-LoxP rendszer virális eredetű. Lényege: a két rövid DNS szekvenciaelem (LoxP) között található DNS darabot a Cre rekombináz enzim képes teljesen kivágni. Léteznek indukálható promóter által szabályozott indukálható rendszerek is [*Gossen és mtsai* 1995*, Mayford és mtsai* 1995], melyekben a megfelelő kivágódást csak az adott indukcióval lehet kiváltani.

A technika hátrányai: a mikromanipuláció mellett sejtes munkát is igényel, munkaigényes, jó sejtvonal kell hozzá, csak az F2 generáció ad transzgénikus utódot- ezért lassú.

Egy komoly előnye van: a tervezhető expresszió, és a helyspecifikus rekombinációból adódó előnyök. Hátrányai miatt hagyományos transzgénikus állatok létrehozására ritkán használják, null mutáns egereket azonban már több ezer gén esetében leírtak.[KO adatbázis: www.bimedvet.com/database/currbiol/Mko/dataset.exe].

Úgynevezett EG sejtek is hasonló ígérettel kecsegtetnek, mint az ES sejtek. Az EG sejtek differenciálatlan ivar−őssejtek. Izolálhatók [*Wheeler és mtsai* 1994], blasztocisztákba visszajuttathatók [*Wheeler és mtsai* 1994]. A technika még részletes kidolgozás alatt áll.

2.8.2.5. Klónozás

A sejtmagátültetéses klónozás egyedülálló lehetőséget biztosít transzgénikus állatok alkotására. Különböző eredetű testi sejtek (pl fibroblasztok), a saját sejtmagjától

megfosztott petesejtbe ültethetők. Megfelelő aktiválás után, az embrionális fejlődés elkezdődik. A testi sejtek transzformálhatók, biztosítva a transzgénikus állatok létrehozását. Ez eddig birkában [*Schienke és mtsai* 1997], és szarvasmarhában [Cibelli *és mtsai* 1998] sikerült.

A módszer előnyei: minden állat transzgénikus, egy generációval lerövidíthető a transzgénikus állatok létrehozása, a sejtvonal lefagyasztható és korlátlan ideig tárolható, mód nyílik a célzott génbevitelre [*McKreath és mtsai* 2000].

Az előnyök roppant ígéretesek, de van még néhány megoldandó probléma. A hatékonyság alacsony [*Cibelli és mtsai* 1998b, *Wilmut és mtsai* 1997, *Wakayama* 1998]. Még nem értjük pontosan hogy történik a sejtek reprogramozódása, ráadásul igen nagy a születéskori halálozás [*Wilmut és mtsai* 1997, *Kato és mtsai* 1998].

2.8.3. A mikroinjektálás korlátai: problémák és megoldások

A mikroinjektálás fő problémája az alacsony hatásfok. A hatásfok növelését több oldalról lehet megközelíteni. Lehetőség van riporter gének koinjektálására, és csak azoknak az embrióknak a beültetésére melyekben működik a riportergén. Koinjektáláskor általában együtt épül be a kettő esetleg több gén. Nemcsak luciferáz [*Thompson és mtsai* 1995], hanem újabban GFP (green fluorescens protein) [*Chiocchetti és mtsai* 1997] is felhasználható erre a célra. Lehetőség van az embriókból nyert blasztomérák genetikai elemzésére is. Ez PCR segítségével történik, bár a hibalehetőség igen nagy [*King és mtsai* 1988, *Ninomiya és mtsai* 1989]. Injektálhatunk mindkét pronukleuszba kétszeresére emelve a hatékonyságot, kétszeres munka árán.

A másik probléma az expresszió változatos, és gyakran alacsony megjelenése. A probléma a transzgén készítésénél kezelhető. Fontos, hogyha lehetőség van rá akkor genomi konstrukciókat használjunk a cDNS kópiák helyett. Már korán rájöttek, hogy az introni szabályozó szakaszok fontosak lehetnek [*Brinster és mtsai* 1988*, Palmiter és mtsai* 1991]. Sokat segíthet a konstrukció *in vitro* tesztelése, de ez sem mindig elegendő [*Petitclerck és mtsai* 1995].

Hasznosak lehetnek speciális szekvenciák beépítései is. A SAR–MAR (matrix attachement regio) beépítése általában hatásos [*Thompson és mtsai* 1994, *Mcknight és mtsai* 1992, *Whitelaw és mtsai* 2000]. Emeli a beépülés hatékonyságát, és az expresszió szintjét is. Más inzulátor elemekre is igaz a hatás [*Takada és mtsai* 2000, *Potts és mtsai* 2000,]. Hasonló sikereket érhetünk el, ismert LCR (locus control region) felhasználásával [*Pawlik és mtsai* 1995]. Az alacsony expressziós szinten lehet segíteni a transzgén "kimentésével" is. Ilyenkor egy ismert jól működő transzgént kell koinjektálni.

A konkatamer beépülés során kapunk olyan transzgénikus állatokat is, ahol a transzgént kívülről a másik transzgén határolja, ezzel olyan kromoszómális környezetet biztosítva, hogy a transzgén átírása meginduljon [*Clark és mtsai* 1992*, Langley és mtsai* 1998].

Gyakori probléma az ektopikus– nem megfelelő helyen történő- génműködés. Két oka lehet. A nem megfelelő szabályozó régiók alkalmazása, valamint a kromoszómális környezet hatása (pozíció effektus). Ennek megfelelően a pontos szabályozó elemek felhasználása, valamint a több független transzgénikus vonal létrehozása segíthet. Előfordul, hogy a transzgén valamilyen ún. silencing–csillapodás folyamaton megy keresztül. Ez gyakran csak a túl magas kópiaszám következménye [*Wolffe és mtsai* 1997], de valószínűleg a növényekben egyre jobban jellemzett RNS interferencia is szerepet játszhat a transzgének csillapodásában [*Wianny és mtsai* 2000]. A fenti problémák megoldhatók mesterséges kromoszómák mikroinjektálásával. Ez a módszer kiküszöböli a kromoszómális környezet hatásait, az ektopikus, és alacsony expressziós szinteket. YAC (élesztő mesterséges kromoszóma) mikroinjektálása sikeres volt egérben, nyúlban, és patkányban is [*Schedl és mtsai* 1992, *Brem és mtsai* 1996, *Fujiwara és mtsai* 1997, 1999]. BAC (bakteriális mesterséges kromoszóma) transzgénikus egeret 1997-ben alkottak először [*Yang és mtsai* 1997]. Magyar kutatók közreműködésével emlős minikromoszómát hordozó transzgénikus egér is létezik [*Co és mtsai* 2000]. A technika egyetlen hátránya hogy nehezebb vele dolgozni, mint a hagyományos DNS darabokkal. Hajlamos a törésekre, speciális injektálási technikát igényel.

2.8.4. A transzgénikus állatok felhasználása

Az alapkutatásban a transzgénikus állatok mindenütt jelen vannak. Rendkívül jó modellállatok *in vitro* folyamatok *in vivo* vizsgálatára. Fehérjék túltermeltetése, csökkentett termelése, hiánya, illetve hibás fehérjék termeltetése a legtöbb biokémiai útvonalról értékes információkkal szolgálhat. Fontos terület a különböző szabályozó DNS régiók vizsgálata transzgénikus állatok segítségével.

Az orvosi kutatásban a transzgénikus állatok modellállatként használhatók. A legtöbb emberi betegség, vagy legalább annak valamilyen részfolyamata kiváltható transzgénikus állatokon. Ez nem csak a folyamatok könnyebb megértését segíti, hanem a gyógyszerek tesztelésére is kiváló alkalmat ad [*Arbeit és mtsai* 1999, *Price és mtsai* 1998, *Isola és mtsai* 1991, *Thomas és mtsai* 1994]. Érdemes megemlíteni a xenotranszplantációs kísérleteket, melyek célja transzgénikus állatok szerveinek felhasználása emberi szervek pótlására [*Cozzi és mtsai* 2000, *French és mtsai* 1998].

2.8.4.1. Mezőgazdasági felhasználások

A mezőgazdaság természetesen a transzgénikus haszonállatok gyakorlati felhasználását tűzte ki célként. A "többet, jobban, esetleg olcsóbban" elv szerint indultak a kutatások. A hagyományos termékeket (hús,tej, gyapjú) mind érintik a vizsgálatok.

A növekedési ütem fokozása, és a végső méretek növelése eleinte járható útnak tűnt. Növekedési hormont, illetve növekedési faktorokat túltermelő állatok kialakítása volt a cél. A legtöbb esetben azonban csak fél sikereket sikerült elérni. Hosszú távon gyakori volt a káros mellékhatás az állatok szervezetében [*Rexroad és mtsai* 1989, 1991] A legsikeresebb kísérlet cink által szabályozható növekedési hormon gén bejuttatása volt sertésbe. (humán metallotionenin promoter− sertés növekedési hormon gén) Ez a gén a táplálékban található cinkkel szabályozható. Gyorsabb növekedést, kellemesebb izom/zsír arányt értek el [*Pursel és mtsai* 1993]. Az állatok hamarosan piacra kerülhetnek [*Nottle és mtsai* 1999]. A fő probléma, a technológia drága volta. Ráadásul nehéz ún. nagyhatású géneket találni, melyek a mennyiségi viszonyokat jelentősen befolyásolják. A kísérletekben gyakoriak a mellékhatások, és a hagyományos nemesítési eljárások segítségével időarányosan, jósolhatóbb módon lehet legalább akkora eredményt elérni. Ez alól talán csak a myostatin gén kivétel, mely nagyhatású izomnövekedést szabályozó (represszáló) fehérjét kódol. [*McPherron és mtsai* 1997]. Ennek a génnek természetes null mutáns változata a belga kék szarvasmarha, a húsmarha tenyésztők álma. Az egyetlen probléma vele, hogy izmoltsága oly mértékű, hogy természetes úton képtelen utódokat a világra hozni (császármetszést kell alkalmazni).

A juhgyapjú termelésének növelésére irányuló kísérletek sem hoztak igazi áttörést. Bár sikerült a gyapjú növekedését fokozni, specifikusan a szőrtüszőkben (keratin promóter−IGF1 faktor gén) [*Damak és mtsai* 1996a,b], a hatás az F2 generációban már nem tapasztalható [*Su és mtsai* 1998].

Másik fontos mezőgazdasági irány a betegségekkel szemben rezisztens transzgénikus állatok alkalmazása [*Muller és mtsai* 1994]. Lehetőség van olyan állatok kialakítására, melyek túltermelnek egy, az immunválaszban szerepet játszó fehérjét, ezáltal fokozva a rezisztenciát (interferon−β egérben erős virusrezisztenciát okoz) [*Chen és mtsai* 1988]. Használhatunk specifikus rezisztenciagéneket (viszonylag kevés ismert). Az ezt expresszáló állatok védetté válnak (pl. Mx1 gén egérben influenza−A reszisztenciát indukál) [*Kolb és mtsai* 1992]. Termeltethetünk monoklonális antitesteket, sőt megtehetjük ezt specifikusan a tejben, közvetlenül védve az utódgenerációt pl. gastroenteritisz ellen [*Castilla és mtsai* 1998]. Termelhetünk mutáns vírusfehérjéket, gátolva ezzel a vírus-összeszerelést. Sikeresen termeltek lentivirus ellen burokfehérjét birkában [*Clement és mtsai* 1994].

Antiszenz RNS gátlás, illetve ribozim molekulák által segített gátlás is járható út rezisztencia kialakítására [*Han és mtsai* 1991, *Cantor és mtsai* 1993].

A legjobb módszernek azon gének "kiütése" tűnik, melyek betegséget okozhatnak. Egerekben a PrP gén deletált változata megakadályozza a prionok fertőzését [*Bueler és mtsai* 1992, 1993]. Haszonállatokban ez nagy előrelépést jelenthetne.

2.8.5. Emlőspecifikus transzgénikus állatok, "Transzgénikus bioreaktorok"

Az orvosi kutatások elsősorban az emlőrák kialakulását tanulmányozzák emlőspecifikus transzgénikus állatokban, modellállatként használva az egeret. [*Dankort és mtsai* 2000, 1996, *Amundadottir és mtsai* 1996]

A gyógyszerészeti ipar elsősorban mint bioreaktorokat használja, illetve szeretné használni a transzgénikus haszonállatokat. Ezek az állatok valamilyen gyógyászatilag fontos fehérjét termelnek tejükben. Az első úttörő munka a területen 1987−ben jelent meg [*Simons és mtsai* 1987]. A transzgénikus állatok bioreaktorként való alkalmazása fontos előnyöket rejt magában. Ezen a módon viszonylag olcsón, igen nagy mennyiségben, nagy tisztaságban, és ami a legfontosabb pontos poszttranszlációs módosításon átesett érett fehérjét lehet kinyerni a tejből. Erre csak az állati szövettenyészetek alkalmasak még, de fenntartásuk költsége nagyságrenddel nagyobb [*Bremel és mtsai* 1996]. Ráadásul előfordul, hogy a sejtek növekedésének biztosítása még magas áron sem garantálható (eritropoietin) [*Houdebine* 1995], sőt arra is van példa, hogy a poszttranszlációs módosításokat sem képes a sejtkultúra megfelelő mértékben biztosítani (protein C) [*Yan és mtsai* 1990]. Elméletileg bármely testfolyadék alkalmas rekombináns fehérjék termelésére. Ismertek próbálkozások vérben (hemoglobin sertésvérben [*Swanson és mtsai* 1992]; alfa−antitripszin nyúlban [*Massoud és mtsai* 1991]), vizeletben (növekedési hormon [*Kerr és mtsai* 1998]), ondóban (humán növekedési hormon egérben[*Dyck és mtsai* 1999]).

A tej azonban továbbra is szinte egyeduralkodó e téren. Nagy mennyiségben, könnyen gyűjthető, viszonylag csekély számú fehérjét tartalmaz, így a tisztítás olcsóbb. Más szervekben nem okoz zavart a rekombináns fehérje megjelenése.

A 2.6. táblázat összefoglalja a tejben termeltetett, és potenciálisan a gyógyászatban hasznosítható fehérjéket. Elsősorban a haszonállatokra érdemes figyelni, de megemlítem az egérmodelleket is. Az azonosnak tűnő adatok különböző csoportok által előállított azonos transzgénikus állatok. A korai kísérletek teljes körű átfogó interaktív adatbázisát a http://tyrosine.biomedcomp.com honlapon lehet megtalálni. Itt azok az állatok is megkereshetők, melyekben az expresszió nem volt kimutatható.

A tejben termeltetett fehérjék emelkedését az indokolja, hogy csak az amerikai piacon 3 milliárd dollár értékben lehetne ilyen jellegű terméket eladni. A következő táblázat mutatja a mai helyzetet az amerikai piacon néhány termék esetében

2.4. táblázat. A gyógyhatású fehérjék piaca az Egyesült Államokban

	faktor VIII	Faktor IX	Protein C	Antitrombin III	Fibrinogén	Albumin
szükséglet kg/év	0,3	4	10	21	150	315000
Mai költség dollár/g	2,9 millió	40000	10000	7000	1000	3,56
Piac millió dollár	882	160	100	150	150	1120

Ha átlagosan egy gramm/liter terméket nyerhetünk (ami manapság elég átlagos teljesítmény a transzgénikus állatoknál), akkor a fenti piac ellátásához kis számú állat elegendő. (2.5. táblázat)

2.5. táblázat. Az Egyesült Államok piacát ellátni képes transzgénikus haszonállatok becsült száma (db)

	Faktor VIII	Faktor IX	Protein C	Antitrombin III	Fibrinogén	Albumin
Nyúl	54	714	1785	3750	27000	56 millió
Sertés	1	10	25	53	380	800000
Juh	1	13	33	70	500	1 millió
Kecske	1	7	17	35	250	525000
sz.marha	1	1	2	3	17	35000

Ez a szám magasabb expressziónál természetesen csökken. Alfa1 antitripszint birkákban sikerült 37g/l mennyiségben termeltetni, ami a tejben lévő összfehérjének több mint 50%−át adta. [*Clark és mtsai* 1998]. Ez egy homozigóta F2 generációjú állat volt, aminek a létrehozásához birkában 52 hónap, sertésban 38 hónap szarvasmarhában 100 hónap szükséges!!! Nem elég azonban az állatot előállítani, a termék tisztítását is meg kell oldani. A terméknek mentesnek kell lenni minden lehetséges bakteriális, virális, sőt prion fertőzéstől is [*Garner és mtsai* 1998]. Ezt követik a klinikai kísérletek fázisai,

melyek szintén éveket igényelnek. Ráadásul minél nagyobb az állat, annál drágább egy expresszáló transzgénikus egyed létrehozása. Ez egérben 120, sertésban 25000, birkában 60000, szarvasmarhában 550000 dollár, illetve ennek a fele, ha vágóhídról szerzik be az embriókat [*Niemann* 2000].

A fenti tényekkel magyarázható, hogy a piacon még nincs ilyen termék (2000 novemberében).

Három termék jutott el eddig a klinikai tesztekig. Kecskében termeltetett antitrombin III (Genzyme cég terméke) a klinikai kísérletek 3. fázisában van, birkában termeltetett humán alfa-1-antitripszin a klinikai kísérletek 2. fázisában áll (PPL cég) [*Dove és mtsai* 2000]. Érdekes módon, a helyzet három évvel ezelőtt pontosan ugyanez volt [*Groet és mtsai* 1997]. A harmadik aspiráns az alfa glukozidáz a klinikai kísérletek 2 fázisában van, szintén a Genzyme cég terméke.

2.8.5.1.1. Transzgénikus nyulak mint bioreaktorok

A transzgénikus haszonállatok között a nyúl a legkisebb termetű, legkönnyebben elérhető állatfaj. Jól jellemzett laboratóriumi törzsei vannak, könnyen szuperovuláltatható, és az embriók manipulálása is egyszerű feladat. Generációs ideje rövid, és nagyszámú utódot hoz létre. Ideális emiatt akár modellállatként is, de felhasználható bioreaktorként is. Utóbbi funkcióját természetesen akkor láthatja el, ha a termelni kívánt fehérje mennyisége csupán néhány kilogramm pl. véralvadásfaktorok [*Brem és mtsai* 1998]. További előnye, hogy patogén mentes környezetben is nevelhető, és jól jellemzett tejet termel [*Baranyi és mtsai* 1995].

Mikroinjektálással 100 megszúrt embrióból kb. egy–kettő állat lesz transzgénikus, ami kicsit alacsonyabb arány mint az egér esetén, de még elfogadható a haszonállatokhoz képest [*Brem és mtsai* 1998]. A siker sok összetevőtől függ, az állatok minőségétől, a beültetés technikájáig a folyamat több helyen optimalizálható [*Brem és mtsai* 1998]. Sajnos magas a mozaikos alapító egyedek száma, így gyakran előfordul, hogy az utódgenerációba nem örökítik a transzgént (kb. 30 %).[*Castro és mtsai* 1999]. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy a nyúl korai embrionális fejlődése sokkal gyorsabb mint az egéré, emiatt a beépülés gyakran többsejtes korban játszódik le. A 2.4. táblázatban vastag betűvel jelzem a transzgénikus nyulakat, mint bioreaktorokat. A nyúltejben elérhető fehérje mennyiségek megegyeznek a többi haszonállatban, illetve az egérben termeltetett mennyiségekkel. Az expressziós szint itt is gyakran változó a kromoszómális környezet miatt, de már nyúlban is sikerült YAC transzgénikusokat létrehozni, kiküszöbölvén ezt a problémát [*Brem és mtsai* 1998].

Sajnos jól működő ES sejtvonal nem ismert nyúlban, ráadásul a sejtmagátültetéses klónozás sem működik egyenlőre. Így a jövő a nyulak esetében még mindig a mikroinjektálás [*Castro és mtsai* 1999].

2.6. táblázat. Gyógyhatású fehérjék termeltetése transzgénikus állatokban. A transzgénikus nyúl eseteit vastag betűvel jelölöm

Termelt fehérje	Promóter	transzgénikus állat
alfa glikozidáz		**nyúl**
alfa 1 proteináz inhibítor	kecske béta-kazein	egér
alfa 1 proteináz inhibítor	kecske béta-kazein	kecske
anti lewis y, br96 monoklonális	kecske béta-kazein	egér
anti lewis y, br96 monoklonális	kecske béta-kazein	kecske
juh trofoblaszt interferon	sz.marha alfas1-kazein	egér
c1 észteráz		
CD6 monoklonális ellenanyag	nyúl wap	**nyúl**
cftr	kecske béta-kazein	egér
epesó stimulálta lipáz		juh
fibrinogén	juh béta-laktoglobulin	juh
Follikulusz Stimuláló Hormon	patkány béta-laktoglobulin	egér
humán alfa antitripszin	nyúl wap	egér
humán alfa antitripszin	kecske béta-kazein	kecske
humán alfa antitripszin	juh béta-laktoglobulin	egér
humán alfa antitripszin	juh béta-laktoglobulin	juh
humán alfa antitripszin	kecske béta-kazein	kecske
humán alfa antitripszin	kecske béta-kazein	**nyúl**
humán antitrombin III	kecske béta-kazein	kecske
humán antitrombin III	kecske béta-kazein	kecske
humán b interferon	egér wap	egér
humán C1 inhibítor		**nyúl**
humán cf transzmembrán receptor	kecske béta-kazein	egér
humán eritropoietin	nyúl wap	**nyúl**
humán eritropoietin	nyúl wap	**nyúl**
humán eritropoietin	nyúl wap	**nyúl**

A TÁBLÁZAT FOLYTATÓDIK A KÖVETKEZŐ OLDALON

humán eritropoietin	juh béta-laktoglobulin	**nyúl**
humán eritropoietin	sz.marha béta-laktoglobulin	egér
humán eritropoietin	sz.marha béta-laktoglobulin	**nyúl**
humán faktor IX	juh béta-laktoglobulin	juh
humán faktor IX	juh béta-laktoglobulin	egér
humán faktor IX	juh béta-laktoglobulin	juh
humán faktor VIII	egér wap	sertés
humán faktor VIII	juh béta-laktoglobulin	juh
humán faktor VIII	juh béta-laktoglobulin	egér
humán fibrinogén	juh béta-laktoglobulin	juh
humán gamma interferon	juh béta-laktoglobulin	egér
humán GM csf	marha alfas1-kazein	egér
humán ideg növekedési faktor	marha alfas1-kazein	**nyúl**
humán IGF-1	marha alfas1-kazein	**nyúl**
Humán interleukin 2	nyúl béta-laktoglobulin	**nyúl**
humán növekedési hormon	nyúl wap	egér
humán plazminogén aktivátor	egér wap	egér
humán plazminogén aktivátor	marha alfas1-kazein	egér
humán plazminogén aktivátor	marha alfas1-kazein	**nyúl**
humán plazminogén aktivátor	egér wap	Kecske
humán plazminogén aktivátor	kecske béta-kazein	Kecske
humán plazminogén aktivátor	egér wap	Egér
humán protein c	juh béta-laktoglobulin	Sertés
humán protein c	egér wap	Egér
humán protein c	egér wap	Sertés
humán protein c	juh béta-laktoglobulin	**nyúl**
humán protein c	juh béta-laktoglobulin	juh
humán protein c	egér wap	sertés
humán protein c	juh béta-laktoglobulin	juh
humán szérum albumin	juh béta-laktoglobulin	egér
humán szuperoxid dizmutáz	juh béta-laktoglobulin	egér
humán szuperoxid dizmutáz	egér wap	egér
humán szuperoxid dizmutáz	egér wap	**nyúl**
humán urokináz	marha alfas1-kazein	egér

A TÁBLÁZAT FOLYTATÓDIK A KÖVETKEZŐ OLDALON

humán alfa1 antitripszin	kecske béta-kazein	**nyúl**
humán növekedési hormon	egér wap	**nyúl**
humán növekedési hormon	egér wap	**nyúl**
Kalcitonin	juh béta-laktoglobulin	**nyúl**
marha antimikróbiális protein	Egér wap	egér
Monoklonális antitest	kecske béta-kazein	kecske
Rákellenes monoklonális	kecske béta-kazein	kecske

2.8.6. A tejösszetétel megváltoztatása transzgénikus állatokban

A tejösszetétel megváltoztatására transzgénikus állatokban több lehetőségünk adódik. Fontos szempont lehetne a tejfehérjék összkoncentrációjának megemelése. Valamely tejfehérje túltermelése azonban nagyon gyakran vezet a többi fehérje termelődésének gátlásához. [*McClenaghan és mtsai* 1995, *Simons és mtsai* 1987]. Az okok egynelőre nem ismertek, de a gátlás valószínűleg transzkripciós szinten történik.

Lehetőségünk van a a tejben megnövelni az antimikrobiális hatást. Az emberi tej nagy mennyiségben tartalmaz laktoferrint, mely antibakteriális hatású, ráadásul a vaskötésben is fontos szerepet tölt be. A szarvasmarha tejben nem található meg ez a fehérje, így megjelenése ott kívánatos lenne. Transzgénikus egerekben alacsony koncentrációban termelődött csak a laktoferrin [*Platenburg és mtsai* 1994]. Szarvasmarhában transzgénikus bikát sikerült alkotni, mely hordozza a transzgént. A nőivarú utódokról azonban nincs információnk [*Krimpenfort és mtsai* 1991]. Másik lehetőség a lizozim termeltetése. A lizozim szintén jelen van az emberi tejben, a tehéntejből azonban hiányzik. Transzgénikus modellállatban (egérben) sikerült aktív formában expresszáltatni. Az eredmények nagyon biztatóak, mivel nemcsak az antibakteriális hatását tartotta meg, hanem egy sor kedvező tulajdonságra tett szert. A micellák mérete lecsökkent, (!!!) ezzel együtt a tejalvadási sebessége is nőtt, s az alvadék keménysége is kedvezőbb lett [*Maga és mtsai* 1995]. Azok a szarvasmarhák melyek mind a humán laktoferrint és lizozimot is termelték, a mastitiszfertőzéssel szemben ellenállónak bizonyultak. [*Bawden és mtsai* 1994]

A tejben található zsír összetételének és mennyiségének megváltoztatása ígéretes kutatási terület. Hagyományos tenyésztési eljárásokkal nagyon nehéz a változtatás, mert a tejzsír mennyisége szoros kapcsolatban áll a fehérjék arányával. Arányaik változtatása ezért igen nehéz feladat. Ráadásul a tej fizikai paraméterei is megváltozhatnak [*Gibson és mtsai* 1991]. Tervek vannak az acetyl-koenzim A csökkentésére az emlőben, mely a zsírsavak *de novo* szintézisét mérsékelné.

A sztearoil-koenzim A expressziójának növelésével, pedig kedvező arányba lehet eltolni a telítetlen-telített zsírsavarányt [*Pintado és mtsai* 1999].

2.8.6.1. A laktóz tartalom mérséklése

A laktóz a legfontosabb tejcukor. A felnőtt lakosság jelentős része azonban képtelen lebontani, emiatt emésztési problémákkal küszködik. Már létezik olyan tej a piacon (magyar piacon is) mely mérsékelt mennyiségben tartalmazza a laktózt. Ezek a tejek laktáz enzim hozzáadásával készülnek, emiatt elég drágák. Alternatív lehetőség a transzgénikus állatok felhasználása ezen a területen is. Az alfa-laktalbumin fontos szerepet játszik a tejcukor építésében, mivel a laktóz-szintetáz komplex részét képezi. A gén kiütése sikerült egerekben, az eredmény azonban meglepő volt. Habár az alfa-laktalbumin mennyisége és a laktóz koncentráció egyenes arányban állt egymással, a tej olyan töménnyé vált az alfa laktalbumint nem hordozó null mutáns állatokban, hogy az utódokat képtelen volt az anya táplálni, a tejelválasztás gyakorlatilag megszűnt [*Stinnakre és mtsai* 1994]. Ennek az az oka, hogy a laktóz fontos szerepet tölt be a tej ozmotikus koncentrációjának szabályozásában. Mások ribozim segítségével csökkentették a tejcukor koncentrációt. Először szarvasmarha laktalbumint termelő egereket alkottak, majd a ribozim segítségével a kettős transzgénikusokban vizsgálták a szarvasmarha alfa-laktalbumin mennyiségének csökkenését. A hatás jónak mondható-50-80% csökkenés [*L'Huillier és mtsai* 1996]. Azóta sikerült a bélben termelődő laktáz enzimet is termeltetni transzgénikus egerek tejében. A hatás hasonlóan jó volt, ráadásul a tejzsír-tejfehérje arányok nem változtak, és az anyák utódnevelő képessége is megmaradt [*Jost és mtsai* 1999].

2.8.6.2. A béta-laktoglobulin csökkentése

A béta laktoglobulin a tehéntejben található savófehérje. A humán tejben nem található meg. A legfontosabb allergén tejfehérje, nem szükséges a laktációhoz és a tejfehérjék termelődéséhez. Ráadásul akadályozza a kappa-kazein kimozines emésztését egy tiol csoportja miatt. Így az allergiás egyének számára kívánatos lenne az eltávolítása. Sajnos a null mutánsok létrehozása egyelnőre nem lehetséges szarvasmarhában. Modellállatként létrehoztak azonban olyan egereket, melyek termelik a béta-laktoglobulint. [*Gutierrez-Adan és mtsai* 1999]. Ezt követően ribozim-transzgénikus technikával létrehozták a kettős transzgénikus állatot [*Pintado és mtsai* 1999], melyben várhatóan sikerül lecsökkenteni a béta-laktoglobulin mennyiségét.

2.8.6.3. A kazeinek arányának megváltoztatása transzgénikus állatokban

A kazeinek arányának megváltoztatása csakis transzgénikus állatok segítségével lehetséges, mivel a kazeinek egy lókuszon helyezkednek el az emlősök kromoszómáján. A tehéntej kazein arányainak eltolása technológiai szempontból jelentős. A kálcium érzékeny fehérjék mennyiségének emelése (alfas- és béta-kazeinek) a termék kálcium tartalmának növekedését, valamint jobb hőstabilitást eredményezhet. Ezzel szemben a kappa-kazein koncentráció emelése csökkent micellaméretet, stabilabb kazein aggregátumokat hoz létre, mely jobb alvadási tulajdonságokat, és jobb minőségű kemény sajtok gyártását eredményezi [*Wall és mtsai* 1997]. A lehetőségeket természetesen modellállatokon kell(ett) először igazolni.

A szarvasmarha alfas1-kazeint emlőszövet-specifikusan 1994-ben sikerült először túltermelni transzgénikus egérben [*Clarke és mtsai* 1994]. A magas szintű expressziót Rijnkels és munkatársai érték el, saját promótert használva [*Rijnkels és mtsai* 1995]. A transzgénikus egérmodell legjobban működő vonala a szarvasmarháénál nagyobb mértékben termelte a fehérjét szerv és fejlődésspecifikus módon. Az expresszió erősen függött a beépülés helyétől. A tej fiziko-kémiai paramétereit a kísérlet nem vizsgálta [*Rijnkels és mtsai* 1998]. A gént BAC klónként is sikerült transzgénikus egérbe beültetni [*Zuelke és mtsai* 1999], A kutatók remélik, hogy az expresszió itt már független lesz az integráció helyétől. Próbálkoznak a teljes kazein lókusz YAC klónjának injektálásával is, a vizsgálatok azonban még csak most kezdődtek [*Zuelke és mtsai* 1999].

Alfas2-kazeint hordozó transzgénikus állatot eddig csak egy kutatócsoport vizsgált [Rijnkels *és mtsai* 1995]. A szarvasmarha gént hordozó egerekben RNS szinten az expresszió nagyon alacsony mértékű volt. Az RNS molekulák mérete nem a várt volt, és gyakori volt az ektopikus megjelenés. A kísérletben a szarvasmarha gén saját promóterét használták, mely nem volt megfelelő a szövet és fejlődésspecifikus expresszió biztosításához.

A legtöbben a béta-kazein gének megjelenését vizsgálták transzgénikus állatokban.

A patkány gén genomi kópiájának beépülése transzgénikus egerekben nem hozta meg a várt eredményt. Az expresszió mértéke igen alacsony volt, az endogén jelnek mindössze 0.1-1%-a. Gyakori volt az ektopikus expresszió. Ez mind bizonyítja, hogy a választott 3.5kb hosszúságú patkány szabályozó régió nem elégséges a megfelelő termelődéshez. [*Lee és mtsai* 1988]. Persuy és munkatársai [*Persuy és mtsai* 1992] a kecske genomi kópiáját használták a 3 kb hosszúságú 5’ illetve a 6 kb hosszú 3’ határoló régiókkal együtt. A transzgénikus egerek nagy mennyiségben termelték a béta-kazeint, ennek mennyisége elérte a 40 mg/ml-t is !! A tej paraméterek megváltozásáról nincsenek

adataink. Nagyon hasonló eredményt értek el ugyanezt a gént használva Roberts és munkatársai [*Roberts és mtsai* 1992]. Az expresszió magas szintű volt (1mg/ml), bár előfordult ektopikus megjelenés az izomban.

Szarvasmarha béta-kazein termeltetése is sikeres volt egérmodellben. A kísérletben a szarvasmarha béta kazein saját promóterét használva magas szintű (20 mg/ml max.) fejlődésspecifikus, és szövetspecifikus expressziót találtak. Egyetlen vonalnál volt ektópikus expresszió, mégpedig a csecsemőmirigyben [*Rijnkels és mtsai* 1995].

Hitchin és munkatársai [*Hitchin és mtsai* 1996] szintén szarvasmarha béta kazeint termeltettek transzgénikus egerekben. Promóterként a juh béta-laktoglobulin promótert használták. Magas szintű termelődést értek el, és bebizonyították, hogy a micellákba beépült a fehérje, a savó frakcióban pedig nem lelhető fel. A protein foszforiláltsága is megegyezett az eredetivel. Hasonló eredményre jutottak *Jeng* és munkatársai is [J*eng és mtsai* 1997].

A béta-kazeint a modellkísérletek után transzgénikus haszonállatba is sikerült bejuttatni. A kísérlet nem várt eredménnyel zárult. A transzgénikus sertések, melyek a szarvasmarha alfa-laktalbumin promóter-szarvasmarha béta-kazein transzgént tartalmazták ugyan emlőspecifikusan, nagy mennyiségben termelték a fehérjét [1-10 mg/ml], de a tej fizikai paraméterei megváltoztak. A tej oly mértékben viszkózussá vált, hogy az 1-3 mg /ml mennyiségben termelődve a laktációt a 10-18 napon leállította. Abban a vonalban mely a legtöbb fehérjét termelte, a laktáció már a harmadik napon befejeződött [*Bleck és mtsai* 1995].

Egérben sikerült a béta-kazein null mutánst is létrehozni [*Kumar és mtsai* 1994]. Érdekes módon a homozigóta null mutáns egerek laktációja normális lefolyású volt, az utódokat tudták gondozni. A tejben a micelláris összeszerelődés mind a heterozigóta, mind a homozigóta egyedekben megmaradt, csökkent béta-kazeinnel, illetve anélkül is!! A homozigóta egerekben a micellák mérete kisebb lett, feltehetően azért mert a béta-kazein hiányában a kappa-kazein/kálciumszenzitív kazeinek aránya megnőtt. Lényegében a kappa- kazeint sikerült "túltermelni" ebben a kísérletben, nem várt módon. Az utódok növekedési üteme azonban lecsökkent.

2.8.6.3.1. Kappa-kazein túltermelése

A kappa-kazein túltermelését már a kilencvenes évek elején is többször próbálták, általában saját promótert használva. Ezek a kísérletek azonban nem hoztak sikert. Sem a kecske kappa-kazeint [*Sanchez* nem közölt adat], sem a szarvasmarha kappa-kazeint nem sikerült expresszáltatni saját promóterrel [*Rijnkels és mtsai* 1995].

Saját szabályozó elemet használva eddig csak a nyúl kappa-kazeint sikerült expresszáltatni transzgénikus egérben csoportunknak [*Baranyi és mtsai* 1996]. Az expresszió azonban nagyon alacsony szintű volt (15 μg/ml max), és előfordult ektopikus megjelenés is izomban. Az eredmények azt mutatják, hogy a konstrukciókról hiányoztak távoli szabályozó elemek, esetleg a feltételezett közös kazein szabályozó régió.

Magas szintű expressziót először kecske béta-kazein szabályozó régióval értek el [*Persuy és mtsai* 1995]. A hibrid gén nemcsak a promótert, hanem a szignál peptidet, valamint az első két aminosavat kódoló részt is tartalmazta a béta kazeinből. A transzgén a kecske kappa-kazeint a szignál peptid utolsó két aminosavát kódoló szakasztól egészen a 0.47 kb. hosszú 3' nem transzlálódó régióig tartalmazta. A rekombináns fehérje mennyisége jelentős szórást mutatott, de a legmagasabb expresszió elérte a 3 mg/ml-t. A fehérje megfelelő szövet és fejlődésspecificitást mutat, annak ellenére hogy N terminálisa négy aminosavval hosszabb a normálisnál. A rekombináns fehérje beépült a micellákba. Mesterséges micellákat is képes volt létrehozni, bizonyítván azt, hogy képes a kálcium érzékeny kazeineket megvédeni a kicsapástól.

Gutierrez-Adan és munkatársai [*Gutierrez-Adan és mtsai* 1996] kecske béta-kazein promótert használva a szarvasmarha kappa-kazein genomi kópiáját építették be transzgénikus egerekbe. A transzgén megfelelő fejlődésspecifikus jelleget mutatott, és általában szövetspecifikus volt. Egyes vonalakban azonban a nyálmirigyben gyenge expressziót mutattak ki. A termelt fehérje mennyisége változó volt (gyakran még azonos vonalon belül is), a maximális rekombináns fehérje mennyisége 3.85mg/ml volt. A kutatók megvizsgálták a legjobbnak mutatkozó egerek tejének fizikai-kémiai tulajdonságait. A homozigóta egerekben a tejmicellák mérete 15-30 százalékkal csökkent. A tej alvadási sebessége nem változott, azaz a kimozin hasítási hely a kisebb micellákban ugyanúgy hozzáférhető volt, mint a nagyobbakban. A kimozin emésztéses kísérletekben a létrejött "kazein-gél" azonban sokkal tömörebb, erősebb volt [*Gutierrez-Adan és mtsai* 1996]. A tej ezen tulajdonsága kemény sajtok gyártása esetén jelentős lehet.

2.8.6.4. Egyéb tervek

A kazeinek harmadlagos szerkezete meglehetősen laza. Aminosavcserék létrehozása nem ütközik különösebb nehézségekbe. A kazeinek foszforilált fehérjék, így az aminosavcserékkel a foszforiláltság foka is változtatható. Lehetőség van kazein kináz felismerő helyek beépítésére is, ezáltal növelve a foszforiláltság fokát [*McClenaghan és mtsai* 1999]. A béta- és alfa-kazeinek esetében új foszfát központok létesítésével a fehérjék kálcium kötése megnőne, növelve a micellák hőstabilitását is.

Ez a kemény sajtok gyártása esetén előnyt jelent. Ellenkezőleg, a foszforiláltság csökkentése lágy sajtok gyártása esetén kedvező [*Clark és mtsai* 1996].

Lehetőség van további proteolitikus helyek beépítésére is a kazein fehérjékbe, ez pedig a sajtérlelés során kedvező hatású [*Wall és mtsai* 1997].

Megindultak a kísérletek a humanizált tej előállítása felé is. Első lépésként ezt szintén transzgénikus egérmodellen sikerült bemutatni. Alfa-laktalbumint nem hordozó null mutáns egértörzsbe juttattak humán alfa laktalbumint, mely tökéletesen működött, és a laktáció lefolyása normális volt [*Stacey és mtsai* 1995]. Ez a kísérlet modellértékű, és a távoli jövőben talán haszonállatokon is alkalmazható. Elméletileg hasonló módon aminosavcserékkel a tej tápértéke is növelhető.

Tervbe vették olyan transzgénikus állatok létrehozását is, melyekben a tejfehérjék fenilalanin mentesek, ezért a fenilketonuriás betegek is fogyaszthatják a tisztított fehérjékből készült termékeket [*Colman és mtsai* 1995, *Bősze és mtsai* 2000].

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Anyagok

3.1.1. Vegyszerek, kitek, enzimek

A kísérletekhez használt finomvegyszerek Sigma, Merck, Fluka vagy Aldrich, gyártmányúk voltak. A restrikciós endonukleázok és egyéb enzimek, kitek beszerzési forrásai a következők voltak: restrikciós endonukleázok (Amersham, Boehringer Mannheim, New England Biolabs); T4 ligáz (New England Biolabs), klónozó kit (Stratagene); Klenow-fragment, Multiprime DNS jelölő kit (Amersham). A DNS Szekvencia meghatározáshoz fmol DNA Sequencing kitet (Promega) használtunk.

3.1.2. Radioaktív készítmények

Az α32P-dCTP-t és az γ-35S-dATP-t az Izotóp Intézet Kft szállította. Az autoradiográfiához Amersham, Kodak, vagy Fuji röntgenfilmet használtunk.

3.1.3. Membránok

Nukleinsavak rögzítéséhez Hybond-N vagy N+ (Amersham) nylonmembránokat, sterilizáláshoz Sartorius cellulóz-acetát lapokat és Millipore szűrőket használtunk. Dializáló membrán: SERVA dializáló membrán

3.1.4. Táptalajok, inkubációs médiumok

LB: 10 g Bacto tripton, 5 g Bacto élesztő kivonat és 10 g NaCl literenként (pH 7.2)
LB-agar: LB kiegészítve 2% Bacto agarral
SOC médium: Bacto tripton 20 g/l, élesztő kivonat 5.0 g/l, NaCl 0.5 g/l, $MgCl_2$ 2.03 g/l, $MgSO_4$ 1.2 g/l, glükóz 3.60 g/l és desztillált víz
M2 médium: NaCl 5.532 g/l, KCl 0.356 g/l, $CaCl_2$x2 H_2O 0.251 g/l, KH_2PO_4 0.162 g/l, $MgSO_4$ 0.293 g/l, Na-piruvát 0.036 g/l, glükóz 1.0 g/l, szarvasmarha szérum albumin (V faktor) 4.0 g/l, fenol vörös 0.01 g/l, HEPES 4.969 g/l
M16 médium: NaCl 5.532 g/l, KCl 0.356 g/l, $CaCl_2$x2 H_2O 0.251 g/l, KH_2PO_4 0.162 g/l, $MgSO_4$ 0.143 g/l, Na-piruvát 0.036 g/l, glükóz 1.0 g/l, szarvasmarha szérum albumin (V faktor) 4.0 g/l, fenol vörös 0.01 g/l

PBS médium szérum kiegészítéssel: (100 ml-re) 16mg KCl, 16 mg KH_2PO_4, 8 mg $MgCl_2$, 640 mg NaCl, 92 mg Na_2HPO_4, 8 mg $CaCl_2$, 80 ml millipore víz, 2.4 mg penicillin, 8 mg streptomicin, 20 ml FCS (magzati borjú savó)

3.1.5. Laboratóriumi egér és nyúl törzsek

A kísérleteknél felhasznált egereket CBA törzsből származó hím és C57/BL6 nőstény szülőpárok keresztezésével állítottuk elő az intézet állatházában. Tenyészállatainkat a Charles Rivers cégtől szerezzük be.
Nyulaink a gödöllői Kisállattenyésztési Kutatóintézet újzélandi fehér törzsállományából származnak.

3.1.6. Oligonukleotidok

Az oligonukleotidokat az MBK Biokémiai Intézete készítette.

elnevezés	szekvencia (5'-3')
5R	GTGGCATGAATGTAAAATTG
4B	GAAGTGATTGCAGAGGCTTC
primer1	CTTTGCTATAGCTAAGAGGT
primer2R	GGTTACTGCCAGGATGTTCA

3.1.7. Baktérium törzsek és plazmid vektorok

Törzsek:
DH-5α: *supE44 Δlac U169 (ϕ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*
XL1- Blue: *MRF': Δ(mcrA) 183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F' proAB lacIq Z ΔM15 Tn10(tetr)]*
Plazmidok: PBluescript II KS(+), pCR-Script SK(+), pPolyIII,

3.1.8. Oldatok

ALK.LYS (alkáli lízis puffer) I.: 50 mM glükóz, 25 mM Tris (pH 8.0), 10mM EDTA
ALK.LYS II.: 0.2 M NaOH, 1 % SDS
ALK.LYS III.: 3 M K-Acetát (pH 4.8)
TE puffer pH 8: 10 mM Tris (pH 8), 1mM EDTA (pH 8)
1XTAE: 40 mM Tris-acetát, 1 mM EDTA

1XTBE: 45 mM Tris-borát, 1 mMEDTA
40XMOPS: 167,4g MOPS, 16,48g Na-Acetát 80 ml EDTA (PH=7.0),1liter vízben oldva, (pH=7.0)
D oldat: 4M guanídium-izothiocianát, 25 mM Na-Citrát, 100 mM (-merkapto-etanol, 0,5% lauril-szarkozinát, 0,1 % antifoam-A.
Injektáló puffer, dializáló oldat: 5-10mM Tris pH:7,4 és 0,1-0,25mM EDTA
"Low salt" puffer: 0.2 M NaCl, 20 mM Tris HCl, 1.0 mM EDTA (pH 7.4)
"High salt" puffer: 1.0 M NaCl, 20 mM Tris HCl, 1.0 mM EDTA (pH 7.4)
Lízis puffer: 100 mM TrisHCl (pH 8.5), 5mM EDTA, 0.2 % SDS, 200 mM NaCl , 100 (g/ml proteináz K
LS oldat: 1 M HEPES (pH 6.6): 250 mM Tris (pH 8.0) + 25 mM MgCl2: 30 Od units/ ml hexamer (pH 8) 25:25:1 arányú keveréke
Church hibridizációs oldat: 0.5 M dinátrium-hidrogénfoszfát (pH 7.2), 7% SDS, 1 mM EDTA (pH 8)
Church mosóoldat : 40 mM dinátrium-hidrogénfoszfát (pH 7.2) , 1% nátrium dodecil szulfát(SDS)
20XSSC: 3 M NaCl, 0.3 M trinátrium-citrát
Diffúziós puffer: 10 mM CAPS (3-cyclohexylamino-1-propanesulfát) (pH11), 10% metanol, 0,05% SDS

3.2. Módszerek

3.2.1. Általános nukleinsav technikák

Az általános nukleinsav technikák leírásánál azokat a módszereket részletezem, ahol kisebb-nagyobb mértékben eltértem az irodalmi hivatkozásban megadott eljárástól.

3.2.1.1. Plazmid DNS izolálás

Kis mennyiségű plazmid izolálásához (miniprep) a hagyományos alkáli lízises eljárást alkalmaztuk [*Birnboim és mtsai* 1979].
Nagy mennyiségű (maxiprep) plazmid izolálásához Wizard Plus (Promega) kitet, vagy Qiagen plazmid tisztító oszlopokat használtunk a gyártó utasításainak megfelelően.

3.2.1.2. Genomiális DNS izolálása állati szövetekből

Egér és nyúl szervekből történő rutin DNS izoláláshoz Laird és mtsai eljárását alkalmaztuk[*Laird és mtsai* 1991].

3.2.1.3. RNS izolálása állati szövetekből

Gyors össz-RNS izolálásához a savas gunídium-izothiocianát-fenol-kloroform extrakciós eljárás módosított változatát használtuk [*Puissant és mtsai* 1990]. Röviden: a friss vagy folyékony nitrogénben lefagyasztott szervet 8 ml D oldatban elhomogenizáltuk (30 másodperc, Ultra turrax T25Ika homogenizáló). A homogenizátumot 0,8 ml 2M nátrium-acetáttal (pH=4.0) savanyítottuk, majd fenol-kloroformmal (8ml fenol 1,6ml kloroform) extraháltuk. A fázisokat centrifugálással választottuk szét (10000 rpm,15 perc). Az RNS-t a vizes fázisból 1 térfogat izopropanollal kicsaptuk, centrifugáltuk, és az üledéket 2ml D oldatban újra oldottuk. A nem oldódó szennyeződéseket centrifugálással távolítottuk el (6000 rpm 10 perc), majd az RNS-t ismét kicsaptuk 2 térfogatrész etanollal. a tiszta RNS csapadékot 70%-os etanollal történő mosás után dietil-pirokarbonáttal (DEPC) kezelt vízben vettük fel. A mintákat –80oC-on tároltuk. Kis mennyiségű szöveti mintából a guanídium-izothiocianát/cézium-klorid izolálási eljárás segítségével nyertünk RNS-t [*Chirgwin és mtsai* 1979]. A D-oldatban elhomogenizált mintát 5,7 M CsCl oszlop fölé rétegeztük, és 16 órán át ultracentrifugáltuk (15°C, 35000 rpm).

3.2.1.4. DNS fragmentumok izolálása gélből

A radioaktív próbák készítéséhez a fragmentumokat szilikonozott üveggyapoton át történő centrifugálással, majd ezt követő alkohol kicsapással nyertük [*Heery és mtsai* 1990].
Ligálási reakciókhoz a fragmenteket DNS gélextrakciós kittel (Qiagen GmbH) tisztítottuk.

3.2.1.5. DNS és RNS gélelektroforézis

A DNS horizontális agaróz gélelektroforézist a standard technikának megfelelően végeztük [*Sambrook és mtsai* 1989]. A megfelelő restrikciós endonukleázzal emésztett genomiális mintákat 0,8-1% os, a vektorokat és fragmenteket 1-2%-os SeaKem GTG (FMC) agarózon szeparáltuk. A PCR termékek vizsgálatát 1.5-

2% SeaKem GTG és 3% Nusieve/1% SeaKem GTG agaróz koncentrációt használtunk. A 0,5 μg etidium-bromidot tartalmazó RNS mintákat [*Gong és mtsai* 1992] 0,8-1% agaróz/2,2M formaldehid tartalmú horizontális géleken futtattuk meg 1XMOPS pufferben

3.2.1.6. Southern-Northern analízis

A DNS géleket 15 percig depurináltuk 0,25 M sósavban, majd kétszer 30 percig mostuk denaturáló oldatban, majd ugyanebben az oldatban végeztük a nukleinsav transzfert a kapillaritás elve alapján nylon membránra (Hybond-N). Az RNS tartalmú géleket az elektroforézist követően közvetlenül blottoltuk 20XSSC-ben. A nukleinsavakat a membránon 80°C-os szárítással és UV sugárzással rögzítettük a filteren. A hibridizációt 3-5 millió cpm/ml (Southern) valamint 1-2 millió cpm/ml (Northern) koncentráció mellet Church módszerével végeztük [*Church és mtsai* 1984]

3.2.1.7. Slot-blot hibridizáció

A transzgénikus egérvonalak DNS analíziséhez a Southern technika mellett a Slot-blot eljárást is alkalmaztuk. A 20μg genomiális DNS-t tartalmazó mintákat 0,4M NaOH és 10 mM EDTA jelenlétében 100°C-on 10 percig denaturáltuk. Ezt követõen egyenlő térfogat 2M-os ammónium-acetát (pH=7.0) hozzáadásával neutralizáltuk, majd a DNS-t vákuumban Hybond-N membránra transzferáltuk egy slot-blot készülék segítségével (Bio-Dot SF Apparatus BioRad, USA). A transzfer után a membránt 0,4M NaOH-ban 10 percig mostuk, majd a Southern eljárásnál részletezett módon a DNS-t rögzítettük, és 1-2 millió cpm/ml koncentráció mellett Church módszerével hibridizáltunk a megfelelő próbával [*Church és mtsai* 1984].

3.2.1.8. DNS szekvencia meghatározás

A pBluescriptII SK és KS (Stratagene) vektorokba klónozott kettős szálú DNS minták nukleotid sorrendjét láncterminációs módszerrel [*Tabor és mtsai* 1987] határoztuk meg a Sequenase T7 DNS polimeráz szekvenáló kit (USB) segítségével. A G és C nukleotidokban gazdag régiókat módosított eljárással szekvenáltuk [*DeShazer és mtsai* 1994]. A templát DNS-t és az oligonukleotid primert 97°C-on 5 percig

denaturáltuk, majd a szekvenáló puffer hozzáadása után 37°C-on, 15 percig hibridizáltunk. A jelölési reakciót 3U T7 DNS polimeráz és 1U Klenow fragment egyidejű jelenlétével végeztük, mely módszerrel a GC gazdag régiókban fellépő ún. stop reakciót sikerült kiküszöbölnünk.
A PCR termékek direkt szekvenálását a Promega cég fmol DNA Sequencing System elnevezésű kitjével végeztük, a gyártó utasításainak megfelelően.

3.2.1.9. Radioaktív próbák készítése

A hibridizációs kísérletekhez a próbákat a random priming módszerrel jelöltük α-32P-dCTP jelenlétében [*Feinberg és mtsai* 1983]. A radioaktív DNS-t a be nem épült nukleotidoktól izopropanolos kicsapással különítettük el.

3.2.1.10. PCR vizsgálatok

A PCR analízis során minden alkalommal a Perkin-Elmer Cetus DNA thermal cycler készülékét használtuk.

3.2.1.10.1. A különböző kappa-kazein genotípusú nyulak PCR vizsgálata

Az AA, AB valamint BB kappa-kazein genotípusú nyulak elkülönítését a nyúl-kappa-kazein első, valamint második exonjára tervezett specifikus primerek segítségével végeztük. Reakciókörülmények: 100 ng templát DNS 50µl végtérfogatban; 10 mM Tris-HCl pH 9.0; 50 mM KCl; 2.5 mM $MgCl_2$; 0.01% Triton X-100; 200 µM dNTP; 1 µM primer 1 illetve primer 2. Az amplifikálás körülményei. 1 perc 95°C, 2 perc 55°C 3 perc 72°C, 35 cikluson keresztül.

3.2.1.11. Egyéb eljárások

A molekuláris biológiai munkák során rendszeresen alkalmazott technikákat (restrikciós endonukleázokkal történő emésztések, ligálás, baktérium transzformálás) az általánosan elterjedt módon végeztük [*Sambrook és mtsai* 1989]

3.2.2. Transzgénikus állatok előállítása

3.2.2.1. Fragmentum tisztítás

A transzgénikus állatok létrehozásához a megfelelő DNS fragmentumokat gélből történő elektroelúció után Schleier and Schuell oszlopokon tisztítottuk. Etanolos kicsapás után a fragmentet az injektáló pufferben 1-3 ng/µl koncentrációban feloldottuk, majd az oldatot kis részekre osztva –20°C-on tároltuk. A mikroinjektálás előtt 0,22(µm pórusátmérőjű szűrőegységen (Millipore, Ultrafree-MC Filter Unit) át történő centrifugálással sterilizáltuk.

3.2.2.2. A transzgénikus technika lépései egérben

Nagy mennyiségű embrió érlelése hormonális indukcióval (szuperovuláció): C57BL/6 X CBA F1 hibrid nőstény egereket 6-8 hetes korban 5 egység PMSG-vel (Pregnant mare serum gonadotropin), majd 48 órával később szintén 5 egység HCG-vel (human chorionic gonadotropin) oltottunk be intraperitoniálisan. A kezelt állatokat a HCG oltása után C57BL/6 X CBA F1 hibrid hímekkel pároztattuk. A megtermékenyülést a másnap kialakuló kopulációs dugó jelzi. Az egereket cervikális diszlokációval megöltük, a petevezetőt kimetszettük, majd az egysejtes zigótákat M2 médiumba mostuk ki. A cumulus sejteket hyaluronidáz kezeléssel távolítottuk el. A mikroinjektálás megkezdéséig az embriókat M16 médiumban 37°C-on, 5% CO_2-al telített atmoszférában tartottuk.

Mikroinjektálás: Az embriókat mélyített tárgylemezre helyeztük, melyet előzőleg kezeltünk, és sterilizáltunk. Az injektálást Nomarski differenciál interferencia kontraszt egységgel és háromdimenziós mozgást biztosító mikromanipulátor karokkal (Narishige, Japán) felszerelt IMT-2 invert mikroszkópban (Olympus, Japán) végeztük. Az embriók rögzítéséhez és a DNS bejuttatásához szükséges tartó, illetve injektáló (Clark, Anglia) kapillárisokat Bachofer D-7410 mikropipetta húzóval, valamint Narishige mikroalakítóval készítettük el. A DNS oldatot automata mikroinjektorral (PLI-100 Medical System Corp., USA), valamint manuálisan fecskendeztük be a zigóták nagyobbik, rendszerint hím előmagjába.

Embrió beültetés: A mikroinjektálást túlélt embriókat 2,5% avertinnel altatott, 2-4 hónapos álvemhes F1 nőstényekbe ültettük be. Az álvemhes egereket vazektomizált, Swiss Albino hímekkel történő pároztatással állítottuk elő. A beültetést az akupunktúrás ("szúrásos") módszerrel végeztük, petevezetőnként 10-15 embriót transzferálva.

3.2.2.2.1. A transzgénikus egérvonalak alapítása és fenntartása

Az embriótranszferből született egerekben a transzgén jelenlétét a farokból kivont DNS-ből Southern hibridizációval mutattuk ki. A pozitív ún. alapító (founder) hímeket és nőstényeket nem transzgénikus F1 állatokkal keresztezve több almon keresztül analizáltuk a transzgén szegregációját. Valódi transzgénikus vonalnak csak azt az ágat fogadtuk el, ahol a transzgén öröklődése a mendeli törvényeknek megfelelt. A transzgénre homozigóta egereket a vonalon belüli pároztatásokkal állítottuk elő.

3.2.2.3. A transzgénikus technika lépései nyúlban

Szuperovuláció: Újzélandi Fehér nőstény nyulakat 3-4 hónapos korban (minimális testsúly 3,5 kg) 120 egység PMSG-vel (Pregnant mare serum gonadotropin) oltottunk intramuszkulárisan. 72 órával később 180 egység HCG-vel (human chorionic gonadotropin) oltottuk be a nyulakat. A HCG kezelést intravénásan végeztük. A kezelt állatokat a HCG oltása után mesterségesen termékenyítettük, illetve újzélandi fehér hímekkel pároztattuk. A megtermékenyülést követő napon az állatokat 3ml nembutallal megöltük, a petevezetőt kimetszettük, majd az egysejtes zigótákat 20% FCS-el kiegészített PBS médiumba mostuk ki. A mikroinjektálás megkezdéséig az embriókat 20% FCS-el kiegészített PBS médiumban 38,5°C-on, 5% CO_2-al telített atmoszférában tartottuk.
Mikroinjektálás: Az egereknél leírt módon történik.
Embrió beültetés: A mikroinjektálást túlélt embriókat altatott, kb 4 hónapos áltvemhes nőstényekbe ültettük be, altatás alatt. Az altatást 0,4ml Rompun (Bayer AG)/ 0,7ml SBH-ketamin (Selbruha Állatgyógyászati Kft) keverékkel végeztük. Az álvemhes állatokat 120 egység HCG hormonnal a beültetést megelőző nap intravénásan kezeltük. A recipiens állatok ciklusának szinkronizálását a beültetést megelőző 21. napon 0,2 ml Receptal (GnRH analóg, Hoechst GmbH) intramuszkuláris beadásával segítettük elő A beültetést műtéti úton végeztük. Az állatok hasi oldalának leborotválása után a bőrt és a hasfalat megnyitottuk, majd a petevezetőbe kapillárist vezettünk. Petevezetőnként 8-12 zigótát transzferáltunk. Ezt követően a hasfalat, és a bőrt műtőfonallal zártuk.

3.2.2.3.1. A transzgénikus nyúl vonalak alapítása és fenntartása

A transzgénikus nyúl vonalak alapítása és fenntartása az egereknél leírt módon történt.

3.2.3. Reverz transzkripció-polimeráz láncreakció (RT-PCR)

A nyúl kappa-kazein A és B variáns kódoló részének szekvencia analíziséhez a laktáló állatok emlőszövetéből izolált össz-RNS-ekből 1μg- ot használtunk fel az első szál cDNS- ek átírásához. A reakciót MMLV reverz transzkriptázzal (Promega), 20μl térfogatban végeztük az alábbi körülmények között: 500ng poly(dT); 500mM dNTP; 50 mM Tris-HCl; 3 mm $MgCl_2$; 75 mM KCl; 10 mM DTT; 200 U MMLV reverz transzkriptáz enzim 20 U RNase inhibítor. A mintákat 37°C-on 1 óráig majd 95°C-on 5 percig inkubáltuk. A fragment amplifikálását 50μl térfogatban végeztük az alábbi összetétel mellett: 10mM Tris-HCl; 15 mM $MgCl_2$; 50 mMKCl; 200 μmol dNTP; 5 egység TAQ polimeráz és 200 pmol génspecifikus primerek (primer 4B, primer 5R) Ciklusok száma 35: 94°C,1perc; 55°C, 1perc; 71°C,1perc

3.2.3.1. A PCR termékek tisztítása

A PCR termékek tisztítását High pure PCR purification kit (Boehringer) végeztük.

3.2.4. Western blot analízis

3.2.4.1. SDS-PAGE

A transzgén expresszióját protein szinten Western blot analízissel végeztük. A minta előkészítése során a tejmintákat először centrifugálással zsírtalanítottuk, (20 perc 2000 rpm) 0,004% nátrium-aziddal tartósítottuk, majd megfelelő koncentrációra hígítottuk. A higítás során a tejfehérjéket SDS tartalmú 8 illetve 10% poliakrilamid-gélen választottuk el. A kísérleteknél használt rendszer a Phast System (Pharmacia) volt. A kísérleteknél a gyártó utasításainak megfelelően jártunk el.
Az elválasztást követően fehérjéket Hybond-C extra (Amersham) membránra transzferáltuk a diffúziós puffer jelenlétében, 100 mA áramerősség mellett.

3.2.4.2. Immunfestés

Az immunfestést az ECL Western blotting (Amersham) rendszer segítségével végeztük a gyártó utasításainak megfelelően. Az anti-nyúl kappa-kazein elsődleges

ellenanyagot 1:2000 higításban használtuk. Az anti nyúl kappa-kazein ellenanyagot birkában Baranyi Mária termeltette [*Baranyi és mtsai* 1995].

3.2.4.3. Western analízis Slot blot segítségével.

A transzgénikus egérvonalak analízise során a rekombináns fehérje pontos mennyiségi meghatározásának vizsgálata során a fehérje mintákat minifold II (Schleier and Schuell) Slot-blot készülék segítségével rögzítettük Hybond-C extra nylon membránra. Az immunfestést a 3.2.4.2 pont szerint végeztük.

3.2.5. Micella méret meghatározás

A tejben található kazein micellák mérésére a fényszóródáson alapuló Coultronics N4 típusú gépet használtuk. A friss tejmintákat 100-150-szeres higításban mértük. A higítás során 10 g tejport 100ml vízben oldottunk, majd Amicon YM10 filteren ultrafiltráltunk. Az ultrafiltrátumot használtuk hígítószerként a friss tejminták higítására. A méréseket Margency-ben, Franciaországban F. Remeuf segítségével végeztük.

3.2.5.1. Micella mérés transzmissziós elektronmikroszkóp segítségével

A micellák transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatát a Mezőgazdasági Biotechnológiai OTKA műszerközpontban (A334) végeztük Dr. Szabó László segítségével.
A micellaméret meghatározásához uranil-acetátos negatív festéses eljárást alkalmaztunk. Ennek során a friss zsírtalanított tejminták 5µl mennyiségét a mintatartó rácsra cseppentettük, majd 2% uranil-acetáttal festettük 5 percen keresztül. A vizsgálatokat Zeiss EM 910-es elektronmikroszkóppal végeztük, a kiértékelés Soft Imaging System DigiVision pro 2.11 kép analizáló program segítségével történt. A hisztológiai analízis a 3.2.5.1 pontban említett elektronmikroszkóppal történt. A transzgénikus, valamint kontrol egerek laktáló emlőszövetét a fejés után kimetszettük, 2% glutáraldehidet tartalmazó kakodilát (pH=7.6) pufferben fixáltuk. Az elsődleges fixálást 1%-os ozmium-tetroxid másodlagos fixálás követte.
A fixálás után a mintákat víztelenítettük, majd propilénoxidos mosás után Durcupanba ágyaztuk. Az ultravékony metszeteket RMC-MT 7000 típusú ultramikrotómmal készítettük.

3.2.6. A kazein és savó frakciók elkülönítése

A tejmintákat tízszeresére hígítottuk 10mM Tris (pH=8.8) és 0,05M CaCl2 oldatában, majd 1 órát centrifugáltuk 30000g mellett. A csapadékot, mely a kazein frakciót tartalmazta, elkülönítettük a felülúszótól, mely a savót reprezentálta.

3.2.7. Rennin emésztés

250µl tejmintát 32°C-on 90 percig emésztettünk 1 vagy 2 nemzetközi egység renninnel (Sigma).

3.2.8. A humán VIII-as faktor koncentráció mérése

A humán VIII-as faktor koncentráció mérését az Immunochrom FVIII:C blood Reagent Kit (Immuno, Heidelberg, Németország) segítségével végeztük a gyártó előírásainak megfelelően. 1 ml nyúl-tejmintához $CaCl_2$ -t adtunk úgy hogy annak végkoncentrációja 250 mM legyen. 10 percnyi szobahőmérsékleten való rázatást követően a mintákat lecentrifugáltuk 15000 rpm fordulaton fél órán keresztül 4°C hőmérsékleten. A centrifugálás után a tejmintákat zsírtalanítottuk, majd a tejsavó frakciót eltávolítottuk, és ismételten lecentrifugáltuk. A savót 1:5 arányban hígítottuk a kitben található hígító pufferben. A mérést ezután a kitnek megfelelően végeztük.

3.2.9. Termelési tulajdonságok meghatározása

A nyulakban mért termelési tulajdonságokat A gödöllői Kisállatenyésztési Kutatóintézetben, Dr Virág Györgyi segítségével végeztük. Három tulajdonságot vizsgáltunk: a fialáskori alomsúlyt, az élő alomszámot, valamint a tej-indexet mely az utódok súlygyarapodását mutatja 1-21 napos koruk között. A vizsgálatokat kiegyenlített alomszámok mellett végeztük. Elhullás esetén azonos korú és súlyú utóddal helyettesítettük az elhullott állatokat.

3.2.10. Súlygyarapodás vizsgálata egereknél

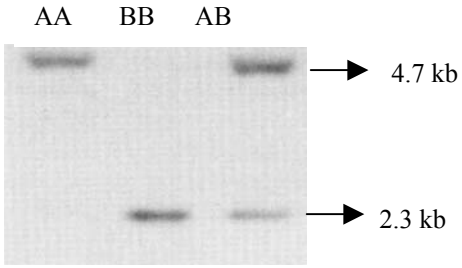
A súlygyarapodási vizsgálatokat egereknél azonos genetikai hátterű, kiegyenlített alomszámok mellett vizsgáltuk a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet állatházában.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

4.1. A nyúl kappa-kazein Hind*III* polimorfizmusa

A dolgozat fő célkitűzése a nyúl kappa-kazein termeltetése transzgénikus állatokban. A sikeres túltermeltetés eléréséhez nélkülözhetetlen az ismert allélek molekuláris jellemzése is.

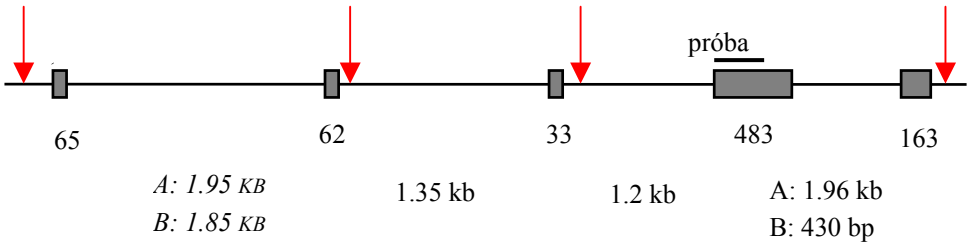
Új zélandi fehér nyulak két független populációiban -a gödöllői Kisállatenyésztő Kutatóintézet állománya, valamint az INRA Jouy en Josasban található populációja-DNS mintát tisztítottunk az állatok véréből, valamint füléből. A kitisztított DNS mintákat Hind*III* restrikciós enzimmel emésztettük, majd Southern hibridizációt végeztünk rajtuk (RFLP). A radioaktív cDNS próba megfelelt a nyúl kappa-kazein gén harmadik exonjának végén található 31 nukleotidnak, valamint a negyedik exon első 398 bázisának. A kapott RFLP mintázat mindkét populációban azonos volt. Bizonyos egyedekben egy 4.7 kb hosszúságú szakasz adott hibridizációs jelet, míg másokban ez 2.3 kb hosszúságú volt. A nyulak harmadik csoportja mindkét jelet hordozta (4.1. ábra).



4.1. ábra
A nyúl kappa-kazein gén HindIII RFLP polimorfizmusa.AA,BB,AB jelöli a megfelelő genotípusokat, a méreteket kb-kilobázis jelöli.

Ez azt mutatja, hogy a nyúl kappa-kazeinnek legalább két allélja van. Ez okozza a Hind*III* polimorfizmust. A gyakoribb allél (mely a 4,7 kb jelet adja) klónozása és jellemzése megtörtént [*Baranyi és mtsai* 1996].

Az A allélt a Hind*III* eznim a harmadik intronban, valamint a 3' nem transzlálódó régióban hasítja. Ez a hasítási mintázat megegyezik a klónozott génben jellemzettel. (4.2. ábra)

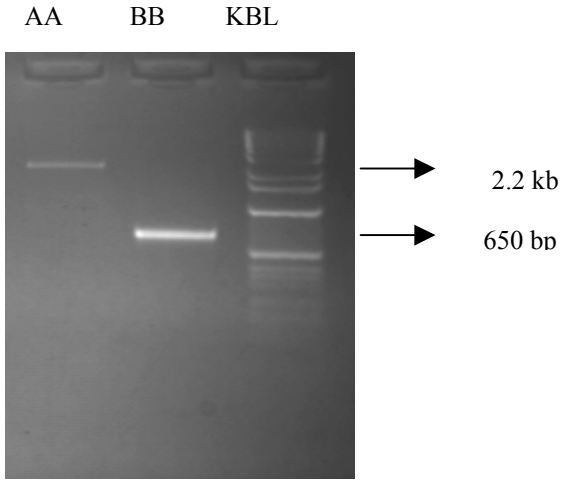


4.2. ábra

A nyúl kappa-kazein gén sematikus szerkezete. A szürke téglalapok jelölik az exonokat alatta jelöltem a méretüket. Az intronok méretét külön feltüntettem a két allél esetében. Nyilakkal jelöltem a HindIII restrikciós enzim hasítási helyeit.

A különbséget az A és a B alél között több dolog okozhatja. Egyfelől pontmutációk miatt a Hind*III* hasítási helye megváltozhat, vagy a hasítási helyek nem változtak, de ebben az esetben valamilyen méretbeli különbség alakult ki a gén szerkezetében. Ezt mind deléció, mind inszerció létrehozhatja. Az utóbbi hipotézis eldöntése egyszerűen elvégezhető volt a mi esetünkben néhány PCR reakció segítségével, mivel az exonok szekvencia adatai rendelkezésünkre álltak. Így az exonok határaira tervezett oligonukleotid párok segítségével a hármas valamint a négyes intront felszaporítottuk A/A, valamint B/B genotípusú egyedekben. A harmadik intron mérete mindkét esetben megegyezett. Hind*III* enzimmel emésztve a PCR termékeket, az emésztési kép is ugyanaz volt. A harmadik intron mérete tehát mindkét esetben megegyező, valamint a Hind*III* enzim hasító helye is ugyanott található a harmadik intronban. A negyedik intron esetében hasonló vizsgálatot végeztünk el. B allélnál a kapott termék mérete mindössze 650 bp volt, szemben az A allél esetében tapasztalható 2.2 kb-al. A negyedik intron mérete a kísérlet alapján 430 bp a B intron esetében, szemben az A allélnál tapasztalható 1.96 kb-al. (4.3. ábra). (A termék mérete, és az intron mérete közötti különbséget az okozza, hogy az oligonukleotidok nem közvetlenül az exon-intron határrégióra kapcsolódnak.)

Ez 1550 bp különbséget takar, mely részben megmagyarázza a Hind*III* RFLP eredményeket. A maradék különbség a restrikciós térkép alapján a 3' nem transzlálódó régióban tapasztalható.

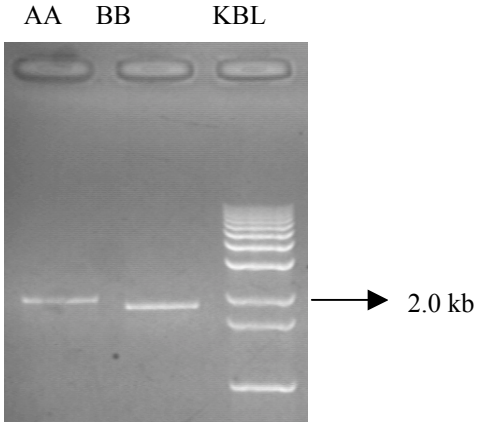


4.3. ábra

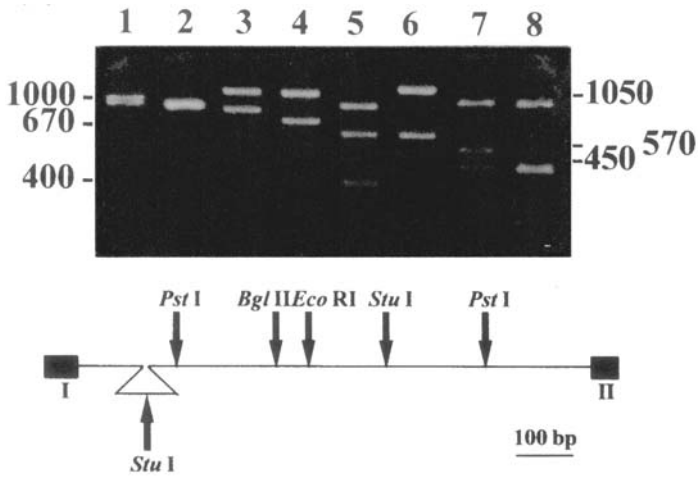
A negyedik intron felszaporítása PCR segítségével.AA, valamint BB genotípusú nyulaknál. KBL-el jelöltem a Gibco cég 1kb-os DNS molekula méret markert.

4.2. Az első intron vizsgálata

Vizsgálatainkat kiterjesztettük az első két intronra is, mivel a régiót a hibridizációnál használt próba segítségével nem tudtuk jellemezni. A második intron mérete megegyezett mindkét allélnál. Az első intron méretében azonban ismételten különbséget találtunk: az A allél első intronjának hossza 1.95 kb volt, a B allélnál a méret 1.85 kb (4.4. ábra) A klónozott gén esetében ez ismételten az A allélnak felelt meg. A felszaporított PCR terméket restrikciós elemzésnek vetettük alá. A B/B genotípusú egyedek restrikciós elemzése kimutatta, hogy hiányzik a Stu*I* enzim hasítóhelye, illetve az ezt körülvevő körülbelül 100 bp nagyságú szakasz. (4.5. ábra)



4.4. ábra
Az első intron vizsgálata PCR reakcióval AA, valamint BB genotípusú nyulaknál. KBL-el jelöltem a Gibco cég 1kb-os DNS molekula méret markert



4.5. ábra
Az első intron PCR termékének restrikciós elemzése. A páratlan számú csatornákban az A allél elemzése, a páros csatornákban a B allél elemzése látható. Az emésztések a következőek: Eco*RI* 1-2; Bgl*II* 3-4; Stu*I* 5-6; Pst*I* 7-8. A kép alatt az adott szakasz restrikciós térképe látható

4.3. Szekvenciaelemzések az első és a negyedik intronban

Az első intron azon részét, melyben a száz bázispáros különbség mutatkozott az A és a B allél között, szekvenciaelemzésnek vetettük alá. A szekvenálást a Promega fmol kit segítségével végeztük. Az első exontól 3' irányban a 315. nukleotid pozíciónál sikerült megtalálni azt a helyet, ahol az inszerciós/delécios esemény történt. Összesen 106 bp hosszúságú átrendeződést találtunk. Ez az átrendeződés érint egy jellegzetes poliT motívumot is mely huszonöt nukleotidból áll. Ez a szakasz az átrendeződés 3' végét jellemzi. További különbségek tapasztalhatók az ezt követő szakaszon is, mely már megtalálható mindkét allélban. Található itt egy mikroszatellita szakasz is, mely az A allél esetében $(GA)_8C(AG)_3$ a B aléll esetében azonban $(GA)_9$ (4.6. ábra) A szekvenciaösszehasonlító elemzések szerint a DNS ezen része (összesen 377 nt), nagyfokú hasonlóságot mutat (70,2%) egy nyúlban leírt LINE (hosszú beékelődő ismétlődő egység) szekvenciaelemmel [*Cheng és mtsai* 1994].

```
                                                exon 1
...TTGGTGTTCAGTCATTTATTTTGGGGCTTTGCTATAGCTAAGAGGTCAATTCAACCTACTGCCAAGCAAG      A allele
   ACCCGACAGACAGAAGGAAAGGTAATGGTCCTAAAATGCCCAGAAAATTATTTTTCAAGGTAGTTAGTTA      A allele
   ATTGGGTCAATGGCAAAGATATTATAGAATCACATTTTTTTTATTTTAGCCTTTATTATTAACCCTCAAT      A allele
   ATGTCCTAGCATTGTTTCAATACTAATTTCTAATTTAAACTTTAGATTCTGGATGATGTGACAATCAAAT      A allele

   TTAGTTTTAACTTTACTTTGGATTAAAGTCAAGATTTATTACTTGTTAGACATTGTAAATTTTAAATAAA      A allele
                                    ...TTATTACTTGTTAGACATTGTAAATTTTAAATAAA      B allele

   AAGCTGTCCAAGCAACGGACCTGTTCCTACAGTCAAATGCTGATAACTTCTTAGGCCTCTGAATCTGTAA      A allele
   AAGCTGTCCAAGCAACAGACCTGTTCCTACAGTCAAATGCTGA---CTTCTTAGGC--------------      B allele

   TAATAATCAAGATATAATCCCTTAATACTTTCAAGTTTTATTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTG      A allele
   ------------------------------------------------------------------------   B allele

   ACAGGCAGAGTGGACAGTGAGA------GAGAGAGAGAGACAGAGAGGAGAGAAAGGTCTTCCTTTATCG      A allele
   ----------------------AGAATGGATAGTGAGAGAGAGAGAG-AGAGAAAGGTCTTCCTTT-GCC      B allele

   GTTGGTTCACCCCTCAATGGCTGCTGCAGCCGGCCAACCACGCTGATCTGAAGCCAGGAGCCAGGAGCTT      A allele
   ATTGGTTCACC...                                                           B allele
```

4.6. ábra

Az első intron szekvencia elemzése. Vastag betűvel jelöltem az első exont, az azt követő szakasz az első intron. Egymás alá helyeztem az A illetve a B allél szekvenciáit. A B allélban található deléciót folyamatos gondolatjellel jelöltem. Aláhúzás mutatja a LINE szekvenciához hasonló szakaszt.

A LINE szekvenciamotívumok gyakran megváltoztatják annak a génnek az expresszióját, ahova beékelődnek. Jelenlétük ezért fontos lehet egy gén különböző alléljainak esetében.

A negyedik intron esetében 350 bázispár távolságra a negyedik exon végétől szintén átrendeződés tapasztalható a B allélnál (4.7. ábra). Teljes hosszúságban nem végeztük el a DNS elsődleges bázissorendjének meghatározását a negyedik intronon, de találtunk egy nagyon hasonló motívumot mint az első intron esetében. Az átrendeződés érint egy 235 bp hosszúságú szakaszt, mely 79% hasonlóságot mutat a már említett nyúl LINE szekvenciához (4.8. ábra) A LINE motívum 3' végét $(CT)_3G(TC)_3$ mikroszatellita jellemzi, melyet 19 bázispár távolságban 25 nukleotid hosszúságú poliA követ. Ez a rész a B allélből teljesen hiányzik, viszont pontosan (nukleotidra megegyezően) megtalálható a fordított kiegészítő szekvencia párja az A allél első intronjának fent említett szakaszában, beleértve a 19 bázispáros elválasztó szakaszt is. A B/B szekvenciaadatok, valamint az A/A , illetve klónozott gén kiegészített szekvenciaadatai megtalálhatóak a GenBank adatbázis AF033505, U44054, U44057 számai alatt.

```
AAAATTAGAAATTTTTATTATCAAACTTCTCACTATTTAAACTCCTAAAATCACTTAATTTTATTTTATC   A allele
AAAATTAGGAATTTT-ATTATCAAACTGCTCACTATTTAAACTCCTAAAATCACTTAAATTTATTTTATC   B allele

CCTTTTTACACACAAACTATTACAGAAGAATTAAATACTATTAACAAGTGAAATTTTTCTTCTCAAATAA   A allele
CCTTTTTACA-A-A--CTATTACAGAAGAATTAAATACTAATAACAAGTGAGATTTTTTTCCTTTCTCAA   B allele

.............//.................AGATCACCGTGGTGCGCCGACGCAGCGCGCTGGCCGAG   A allele
------------------------------------------------------------------------   B allele

GCAGCCATTGGAGGGTGAACCAACGGCAAAGGAAGACCTTTCTCTCTGTCTCTCTCTCTCTCACTGTCCA   A allele
------------------------------------------------------------------------   B allele

CTCTGCCTGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCATTATGAGCTAAATTTCTAAAATGTTATTTAT   A allele
AAATAATAGATACCACATAGCATGAGAACTGTTAAAACATTATGAGCTAAATTTCTAAAATGTTATTTAT   B allele

TTTTACAGGTCTTCCTAAAACCAAATGATTTCTTCAAACTCTTCAGCAGCTGTTTGCCTCCATCCATCAA   A allele
TTTTACAGGTCTTCCTAAAACCAAATGATTTCTTCCAACTCTTCAGCAGCTGTTTGCCTCCATCCATCAA   B allele

GAGAAGTGATTTCACTCATCCAGCTGCTTTTTC...                                     A allele
AAGAAGTGATTTCACTCATCCAGCTGCTTTTTC...                                     B allele
```

4.7. ábra

A negyedik intron szekvencia elemzése. Vastag betűvel jelöltem az ötödik exont. Egymás alá helyeztem az A illetve a B allél szekvenciáit. A B allélban található deléciót folyamatos gondolatjellel jelöltem. Aláhúzás mutatja a LINE szekvenciához hasonló szakaszt

```
1. intron...CCAACCGATAAAGGAAGACCTTTCTCTCCTCTCTGTCTCTCTCTCTCTCTCACT
4. intron...TGGAGGGTGAAAGGAAGACCTTT-----CTCTCTGTCTCTCTCTCTCTC--ACT
line     ...TGGAGGGTGAAAGGAAGACCTTT-----CTCTCTGTCTCTC

1.intron    GTCCACTCTGCCTGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAA…
4.intron    GTCCACTCTGCCTGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCAT...
line        GTCCACTCTGCCGGTCAAAAAAATAAAAAAAAAA-------TATG...
```

4.8. ábra.
A negyedik intron, az első intron, és a LINE szekvencia nagyfokú egyezést mutató szakaszai. A teljesen megegyező részeket vastag kiemelés jelöli

4.4. A nyúl kappa-kazein gén kódoló régiójának jellemzése

Mivel a az eredmények nagyfokú eltéréseket mutattak az intronok területén, a kódoló régiók nukleotid sorrendjét is megvizsgáltuk a két allél esetében. Első lépésként kappa-kazein genotipizált laktáló nyulak emlőszövetéből RNS kivonást végeztünk, majd reverz-transzkripciót követő PCR segítségével felszaporítottuk a nyúl kappa-kazeinnek megfelelő cDNS szakaszt, majd meghatároztuk a bázissorendjét. Az összehasonlító vizsgálatok öt helyen mutattak pontmutációkat az A és a B allél között. Ezek közül 3 pontmutáció a 3' nem transzlálódó régióban található, míg két pontmutáció a negyedik exonban lelhető fel. Az utóbbiak azonban neutrális módosulások (4.1. táblázat), tehát a talált különbségek fehérje szintű változást nem okoznak!

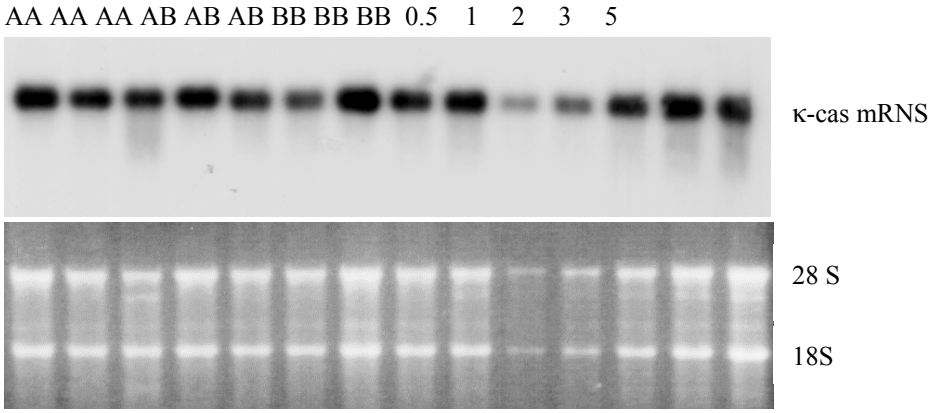
4.1. táblázat. A kódoló régióban található pontmutációk

nukleotid sorszáma	cDNS A/A	CDNS B/B	a klónozott gén	a klónozott cDNS	B/B Genomi DNS	kódolt aminosav
245-247	TAC	TAT	TAC	TAT	-	Tyr
308-310	CCA	CCG	CCA	CCG	-	Pro
671	A	C	A	C	C	-
706	G	A	G	A	A	-
741	T	C	T	C	-	-

Az A allél szekvenciája megfelelt a már korábban klónozott nyúl kappa-kazein génnek [*Baranyi és mtsai* 1996], míg a B allél szekvencia adatai megegyeztek a már korábban jellemzett cDNS klónéval [*Bősze és mtsai* 1993].

4.5. A két allélra jellemző mRNS vizsgálatok a laktáció során

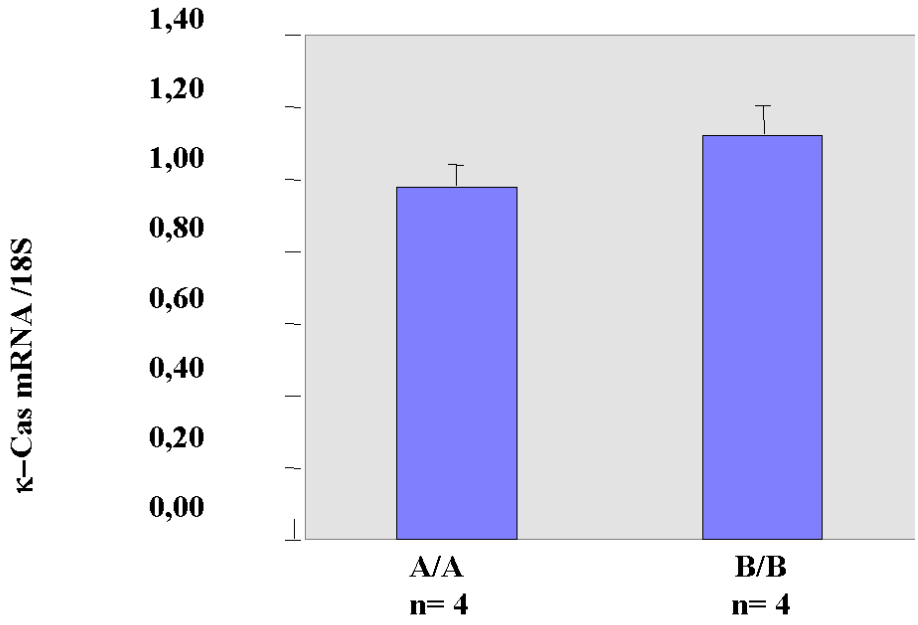
A nyúl kappa-kazein A/A , A/B, B/B genotípusú laktáló nyulak emlőszövetéből készítettünk össz RNS tisztítást. Northern hibridizáció segítségével vizsgáltuk a különböző genotípusú egyedekben a kappa-kazein mRNS mennyiségeket. Ismert hogy a kappa-kazein koncentrációja a laktáció során különböző egyedeket vizsgálva nagyjából azonos [*Puissant és mtsai* 1994], így ha különbségeket találunk, az az eltérő allélekkel lehet kapcsolatban, bár csekély egyéni különbségek tapasztalhatóak az egyes egyedek között (4.9. ábra),



4.9. ábra

A kappa-kazein mRNS mennyisége a laktáció során, különböző genotípusú egyedekben, Northern lenyomaton. (Felső panel) Számokkal jelöltem a kontrollként felvitt AA genotípusú RNS-ek különböző mennyiségeit μg-ban kifejezve. A minták esetében minden csatornában két mikrogramm RNS-t futtattunk. Az alsó panelen a megfuttatott RNS gél fényképe látható.

Összességében a kappa-kazein RNS arányok csak kis mértékben térnek el egymástól. Az eltérések nem szignifikánsak. Összehasonlító adatként a 18S RNS mennyiségét vettük figyelembe minden egyes vizsgálatnál (4.10. ábra).

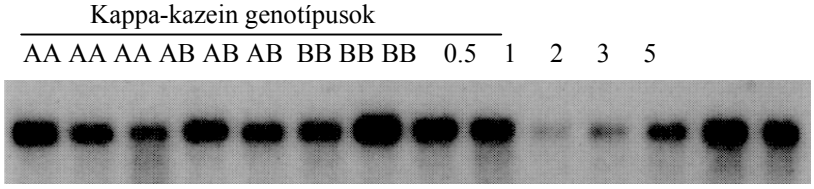


4.10. ábra
A különböző genotípusú kappa-kazein RNS-ek arányai a 18S RNS-hez képest.A méréseket képanalizáló szoftver segítségével készítettük. A látható eltérések nem szignifikánsak

Ezek a vizsgálatok azért lényegesek, mivel az A allél LINE szekvenciát hordoz. Ezek a hosszú beékelődő ismétlődő szekvenciamotívumok kb 50-100000 kópiában vannak jelen genomonként. Beékelődésük valamilyen gén közelében, gyakran befolyásolhatja annak expresszióját. Ez a hatás tejfehérjegéneknél is ismert. Szarvasmarhában létezik egy LINE elemekkel határolt, α-laktalbumin pszeudogén, ahol transzkripció egyáltalán nem mutatható ki [*Vilotte és mtsai* 1993].

Kecske alfas1-kazein esetében az E allél hordoz egy LINE szekvencia darabot a gén 3' nem transzlálódó szakaszában, ez csökkent fehérje mennyiséggel jár együtt [*Perez és mtsai* 1994]. A nyúl kappa-kazeinnél ezt a hatást nem sikerült kimutatnunk.

Nyúlnál a béta-kazeinről bizonyosodott be, hogy a különböző genotípusok eltérő mennyiségű mRNS-t termelnek. A különbséget itt a kódoló régióban található kisebb változások okozzák. A BB genotípusú egyedekben sokkal nagyobb az mRNS/összRNS arány, mint az AA vagy A/B nyulaknál [*Devinoy és mtsai* 1999]. A kazein gének egy lókuszon helyezkednek el a kromoszómán, és előfordulhat hogy a kappa-kazein egy bizonyos allélja, más kazein gének bizonyos alléljaival kapcsoltan öröklődik. Ráadásul a kappa-kazeinhez legközelebb a béta-kazein helyezkedik el a kromoszómán. Ezért az mRNS vizsgálatokat kiterjesztettük a béta kazeinre is. Habár egyéni különbségeket itt is tapasztaltunk, összességében a kappa-kazeinre különböző genotípusú nyulak esetében a béta-kazein mRNS-ek felhalmozódása a laktáció során nem mutatott lényegi különbségeket. (4.11. ábra).



4.11. ábra

A béta-kazein mRNS mennyisége a laktáció során, különböző kappa-kazein genotípusú egyedekben, Northern lenyomaton. Számokkal a kontrollként felvitt AA genotípusú RNS-ek különböző mennyiségei láthatók μg-ban kifejezve. A minták esetében minden csatornában két mikrogramm RNS-t futtattunk. A hibridizációt ugyanazon a lenyomaton végeztük mint a 4.9. ábra esetében. Próbaként a nyúl béta-kazein cDNS-t használtuk. A próbát Eve Devinoy bocsátotta rendelkezésünkre

41 nyulat vizsgálva 11 homozigóta kappa-kazein A/A nyúlból nyolc homozigóta B/B-nek bizonyult béta-kazeinre, és 22 heterozigóta volt. A κ-cas B allél 28% gyakorisággal volt kapcsolt a β-cas B allélal, és sohasem kapcsolódott az A allélal. Ezzel szemben a a κ-cas A allél nagyjából azonos gyakorisággal volt kapcsolt a β-cas B allélal mint az A allélal.

4.6. Fehérje vizsgálatok

Az mRNS vizsgálatokhoz hasonlóan elvégeztük a fehérje mennyiség vizsgálatokat is. Hasonló eredményre jutottunk mint az RNS-ek esetében. A kappa-kazein mennyiségét nyúl kappa-kazein elleni ellenanyaggal vizsgáltuk és nem találtunk lényeges különbségeket.

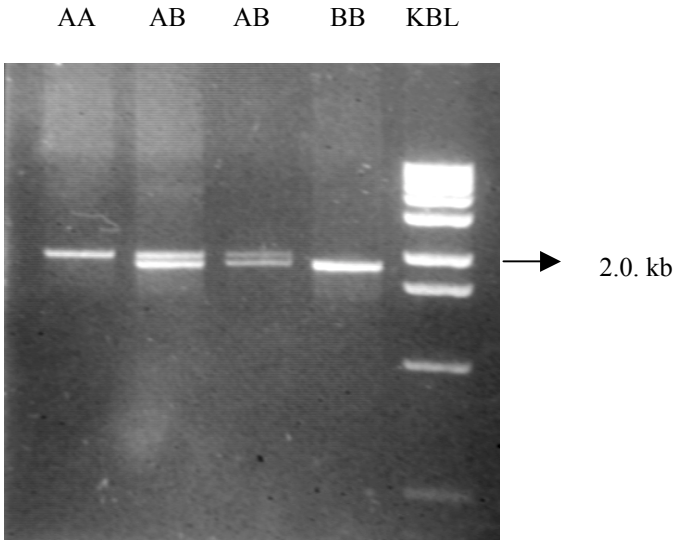
4.7. Evolúciós feltételezések

Felvetődik a kérdés, hogy vajon melyik allél az ősibb allél, és pontosan mi történt a nyulak evolúciója során. Az a tény hogy a B allélban a LINE szekvencia töredékét találjuk az első intronban, arra enged következtetni, hogy az A allél az ősibb, és deléciós esemény történt. Másik lehetőség az, hogy mindegyik allél közös őstől eredeztethető, mely az első intronban hordozta a LINE motívumot. Ezt követően alakult ki az A allél úgy, hogy "összeszedett" egy LINE motívumot a 4. intronban. A B allél pedig elveszített 106 bázist az első intronban. Természetesen ez mind csak spekuláció. Ennek az elméletnek a megerősítése akkor lenne lehetséges ha találnánk olyan nyulakat, mely az egyik intronjában (elsősorban az elsőben) hordozza a LINE szekvenciát, a másikban viszont nem. Ezt elsősorban a nagyon ősi dél-spanyolországi üregi nyúl állományokban érdemes vizsgálni. A mitokondriális DNS elemzések alapján ez tűnik az "őseurópai" populációnak [*Hardy és mtsai* 1995].

4.8. PCR alapú teszt kidolgozása a nyúl kappa-kazein genotípus meghatározására

A nyúl kappa-kazein genotípusának gyors meghatározása fontos feladat volt. 1996-ban alakult egy európai program (RESGEN) francia vezetéssel, melynek célja az európai nyúlfajták jellemzése, kiválasztott nyúlpopulációban megtalálható biodiverzitás leírása, és lehetőség szerinti megőrzése.

Tíz kiválasztott fajtában a szaporasági, növekedési, és termelési tulajdonságok leírása mellett sor kerül a genetikai diverzitás leírására mitokondriális DNS, mikroszatellita markerek, vérben található fehérjék polimorfizmusai, az immunrendszer génjeinek polimorfizmusai, valamint tejfehérjék polimorfizmusai szerint. Csoportunk a különböző fajták tejfehérje génjeiben fellelhető polimorfizmusok meghatározásában vett részt, felhasználva a nyúlban általunk jellemzett kappa- valamint alfas1- és alfas2-kazein variánsokat.



4.12. ábra
PCR alapú teszt kidolgozása nyulak kappa-kazein genotipizálására. A megfelelő betűvel jelöltem a megfelelő genotípusokat (AA,AB,BB), KBL jelöli a Gibco cég 1kb DNS molekula méret markert.

A cél érdekében a kappa-kazein genotípusok jellemzésére PCR alapú módszert fejlesztettünk ki, mely sokkal gyorsabb mint a korábban leírt RFLP jellemzés. Több lehetőségünk volt. Az egyik lehetőség a négyes intron felszaporítása genomiális DNS mintákból. A probléma csupán az, hogy az A és B allélok túlságosan nagy méretbeli különbséget mutatnak. Ezért az AB genotípusú egyedek nem jellemezhetőek nagy biztonsággal, mert a rövidebb allél a PCR reakcióban nagymértékű előnyre tesz szert, és végül "kititrálhatja" az A allélt.

A másik lehetőség az első intron PCR vizsgálata. Ebben az esetben a fenti probléma nem áll, mivel a különbség csak 100 bp. Ez a különbség elegendő arra, hogy egyszerű agaróz gélen elválaszthassuk az allélokat egymástól. A módszer során vérből izolált genomi DNS-t használunk. Az indító szekvenciák (primerek) megegyeznek azokkal a primerekkel (primer1, primer2R), melyekkel sikerült az első intront felszaporítani az allélek jellemzése során. A primereket az első és a második exon határaira terveztük.

A 4.12. ábrán a tesztelés végeredménye látható, mely tartalmaz A/A; A/B; B/B genotípusokat is. A PCR alapú tesztet felhasználva több nyúlfajtában határoztuk meg a kappa kazein gén allélgyakoriságokat.

4.9. A két allél gyakorisága

Először két azonos fajtában (új zélandi fehér), de különböző állományokban végeztük el az allélgyakorisági vizsgálatokat kis egyedszámon. Az eredményeket az alábbi táblázat tartalmazza. Összesítve az eredményeket, mindkét populációban az A allél gyakorisága 71.6 % volt, míg a B allél 28.4 %-al képviseltette magát. (4.2. táblázat)

4.2. táblázat. A nyúl kappa-kazein genotípus gyakoriságok új-zélandi fehér állományokban. A különböző genotípusok százalékos arányát zárójelben jeleztem.

Nyulak származása	A/A egyedek száma	A/B egyedek száma	B/B egyedek száma
Jouy-en-Josas	23 (42)	24 (43)	8 (15)
Gödöllő	41 (58.5)	27 (38.5)	2 (3)

Mindkét állományra jellemző, hogy a B allél gyakorisága kisebb, valamint a B/B genotípusú egyedek viszonylag ritkák. A gödöllői populáció jellemzően húsnyulakat tartalmaz. Az állomány tehát folyamatosan szelektált, míg a franciaországi állomány véletlenszerűen keresztezett. Elképzelhető, hogy az allélgyakoriság különbségeit ez okozza.

Az allélgyakorisági vizsgálatokat később kiterjesztettük további 12 különböző európai nyúlfajtára, megemelt egyedszám mellett. Az A allél minden esetben sokkal gyakoribbnak mutatkozott, sőt egy esetben a csincsillánál kizárólag ez az allél van jelen a populációban. (4.3. táblázat) Az eredményeket a 4.3. táblázat mutatja. Kontroll populációként egy 1976 óta létező francia populációt is megvizsgáltunk, melynek egyedeit sosem szelektálták. (C77-es állomány)

4.10. A nyúl kappa-kazein gén polimorfizmusa, valamint a termelési tulajdonságok kapcsolata

Habár a nyúltej közvetlenül nem hasznosítható a mezőgazdaság számára, minősége mégis nagy jelentőséggel bír.

4.3. táblázat. Allélgyakorisági vizsgálatok a nyúl kappa-kazein gén esetében, különböző európai nyúlfajtákban. N;-a vizsgált egyedszám, A-allélok száma

Fajta	N	A	A allél gyakorisága
Francia ezüst	29	2	0.8103
Belga vitás	27	2	0.6667
Csincsilla	31	1	1.000
Angol tarka	37	2	0.9189
Burgundi vörös	60	2	0.9000
Flamand óriás	9	2	0.6667
Francia kosorrú	37	2	0.7027
Magyar óriás	18	2	0.7778
Himalájai	25	2	0.9200
Türingiai	53	2	0.9906
Spanyol óriás	25	2	0.5600
Bécsi fehér	33	2	0.9394
C77 kontrol törzs	23	2	0.7292

Az anyatej ugyanis az alom választásáig az egyetlen elérhető tápanyagforrás. Az első 21 nap súlygyarapodásában tehát elengedhetetlenül fontos a tej minősége. Nyilvánvaló, hogy a választáskori súly hatással van arra az időszakra mely alatt a húsnyulak elérik a vágási súlyukat is.

Mivel gyakorlatilag minden vizsgált populációban a nyúl kappa-kazein A allél gyakoribb mint a B allél, felvetődik a kérdés, hogy van- e valamilyen mezőgazdasági, termelési esetleg szaporasági hatása a különböző nyúl kappa-kazein genotípusoknak.

Az a fenti kísérletekből kiderült, hogy sem a kódolt fehérjében, sem annak mennyiségében nincsen ismert különbség a különböző kappa-kazein genotípusok között, ez azonban továbbra sem zárja ki annak a lehetőségét, hogy valamely közeli gén adott alléljai kapcsoltan öröklődnek a kappa-kazein megfelelő alléljaival. Az eredményeket ebben az esetben mint markereket lehet felhasználni akár tenyésztés során is.

Ezt a módszert angol rövidítése után MAS-nak (marker assisted selection) nevezik. A kapott eredményeket természetesen folyamatosan ellenőrizni kell minden populációban.

Csoportunk A gödöllői Kisállatenyésztési Kutatóintézet segítségével három termelési tulajdonságot vizsgált különböző kappa-kazein genotípusú nyulakban. A vizsgált tulajdonságok: születéskori alomsúly, a születéskori alomszám (élő utódok), valamint az utódok súlygyarapodása az első 21 napban. Az eredményeket a 4.4 táblázat tartalmazza.

A kísérleteket kiegyenlített alomszám mellett, dajkásítás segítségével végeztük. Ezzel ki lehet küszöbölni az alomszám okozta különbségeket a súlygyarapodás mérése során.

4.4. táblázat. A termelési tulajdonságok és a kappa-kazein genotípus közötti összefüggések.
P értéke a konfidencia határokat jelzi. Az azonos oszlopban azonos betűjellel jellemzett értékek nem különböznek szignifikánsan.

kappa-kazein genotípus (egyedszám)	Születéskori (g) alomtömeg P<0,05	születéskori (db) alomszám P<0,01	gyarapodás (g) P<0,05
AA (29)	4259,21± 47,16 ab	7,22± 0,44 a	2634,28± 73,62 b
AB (22)	4384,33±50,57 b	8,91±0,47 b	2609,38± 73,62 b
BB (8)	4167,00±85,66 a	7,75±0,79 ab	2398,68± 144,1 a
Átlag	4314,65±50,08	8,23±0,26	2541,79± 51,21

A születéskori alomszám a heterozigóta egyedekben volt a legmagasabb, hasonlóan a születéskori alomsúlyra. Ez nem túl meglepő, mivel az ilyen típusú polimorfizmus kedvez a heterozigóta egyedeknek [*Falconer és mtsai* 1990].
A születéskori alomszám egyike azoknak a tulajdonságoknak, melyekre a heterozigócia nagy hatással van. Mivel a születéskori alomsúly befolyásolja a súlygyarapodást, kovarianciaanalízist végeztünk, hogy kizárjuk ezt a hatást.

A súlygyarapodás az első 21 napon a B/B genotípus esetében volt a leggyengébb, míg az A/A és A/B genotípus nem különbözött ezen a téren egymástól. Mivel az adott populáció húsnyulakat tartalmaz, talán ez a legfontosabb tulajdonság a mértek közül. A hatás leginkább azzal lenne magyarázható, ha bebizonyosodna hogy a B/B genotípusú egyedek teje bizonyos szempontból gyengébb minőségű.

A nyúl kappa-kazein gének polimorfizmusainak közvetlen hatását a tej minőségére azonban továbbra sem sikerült igazolni.

Tenyésztés során célszerű tehát a B/B genotípusú egyedek számát csökkenteni a populációban. A vadon élő üregi nyúl populációban is csak azért maradhatott fent a B allél, mert bizonyos tulajdonságok viszont a heterozigóta illetve B/B egyedeknek kedveznek.

4.11. A termelési tulajdonságok, és a nyúl kappa-kazein allélok kapcsolata szelektált állományokban

A termelési tulajdonságok vizsgálatát A RESGEN program keretében sikerült tovább folytatni. Adott tulajdonságokra hosszú idő óta szelektált állományokban vizsgáltuk a kappa-kazein allélok eloszlását, valamint összefüggésüket az adott termelési tulajdonsággal.

A Franciaországban fenntartott ún. A1077-es populációt 28 generáció óta szelektálják a minél nagyobb születéskori alomszámra. A populáció 127 egyedében 23 A/A; 68 db A/B és 36db B/B genotípusú egyedet találtunk. Az A allél tehát 45%-ban, míg a B allél 55%-ban jellemzi az adott populációt. Ez rendkívül érdekes, hiszen ez az első olyan nyúlpopuláció, ahol a kappa-kazein B allélja gyakoribb. A születéskori alomszám a B/B genotípusú egyedeknél volt a legkedvezőbb, míg az A/A genotípus mutatta a leggyengébb eredményeket!! A B/B genotípusú egyedek tehát valamilyen szempontból előnyt élveznek az A/A egyedekkel szemben, ha a születéskori alomszám volt a fő szelekciós nyomás.

Fontos megjegyezni hogy ebben az esetben a teljes megszületett utódokat számításba vettük, míg korábban csak az élve született utódokat számoltuk!
Sajnos a kiindulási populációról nincsenek adataink, így nem tudjuk hogy a szelekció hogyan változtatta meg az allélok arányait.

Egy másik beltenyésztett nyúltörzs az A2066-os. A szelekció az elválasztáskori alomtömegre irányult, 28 generáción keresztül. Ez a tulajdonság nagymértékben függ az anyák tejminőségétől. 51 egyed genotipizálása után kizárólag A/A genotípust találtunk. Ennek két oka lehet: a kiindulási egyedek mind A/A genotípusúak, vagy a B/B genotípus az erős szelekciós nyomás hatására eltűnt a populációból.

Ha a 1077-es populációban vizsgáljuk a genotípus és a választáskori alomtömeg összefüggéseit, akkor azt tapasztaljuk, hogy ebből a szempontból az A/A genotípusú egyedek mutatják a legjobb eredményeket, és a B/B egyedek a leggyengébbeket. Ez tény

inkább azt sugallja, hogy a B/B genotípus kiszelektálódott a 2066-os populációban. Ez az eredmény összecseng az általunk korábban mért eredményekkel.

Összességében elmondható, hogy a nyúl kappa-kazein polimorf gén, két allélal rendelkezik. Bár a két allél azonos fehérjét kódol, úgy tűnik a tej minősége szempontjából az A/A allél kedvezőbb. Bár ennek pontos oka továbbra sem ismert, a termelési adatok ezt alátámasztják.

4.12. A nyúl kappa-kazein túltermelése transzgénikus egerekben

4.12.1. A WAP-kappa-kazein génkonstrukció elkészítése

A nyúl kappa-kazein túltermelését csoportunk először a nyúl kappa-kazein gén promóterének felhasználásával próbálta elérni [*Baranyi és mtsai* 1996]. Az alacsony mértékű expresszió azzal magyarázható, hogy hiányoztak fontos szabályozó elemek, melyek a magas szintű termelődést biztosították. Így elhatároztuk, hogy más tejfehérje promótert használunk a cél elérése érdekében. Választásunk a nyúl savó savas fehérje (WAP) 6.3 kb hosszúságú szakaszára esett. A választás legfőbb oka az volt, hogy a WAP promóter korábbi kísérletekben magas szintű, szövetspecifikus expressziót biztosított az emlőszövetben. A humán növekedési hormon [*Devinoy és mtsai* 1994], a szarvasmarha növekedési hormon [*Thepot és mtsai* 1995], a humán alfa-1-antitripszin [*Bischoff és mtsai* 1992] mindegyike megfelelő módon működött.

Mivel a tejfehérje specifikus transzgénikus konstrukciók szinte kizárólag genomi kópia felhasználásával működnek, ezért a WAP promóter mellett a nyúl kappa-kazein genomi kópiájának 13 kb hosszúságú szakaszát építettük be a konstrukcióba.

A konstrukció elkészítése több részletben történt (4.13. ábra)

Első lépésként a jellemzett genomi klón felhasználásával, PCR reakció segítségével felszaporítottuk a nyúl kappa-kazein első exonját, valamint az első intron felét. A PCR reakciót úgy terveztük hogy a termék 5' vége tartalmazzon egy Hind*III* restrikciós helyet, míg 3' vége SalI helyet hordozzon, a későbbi klónozást elősegítése miatt.

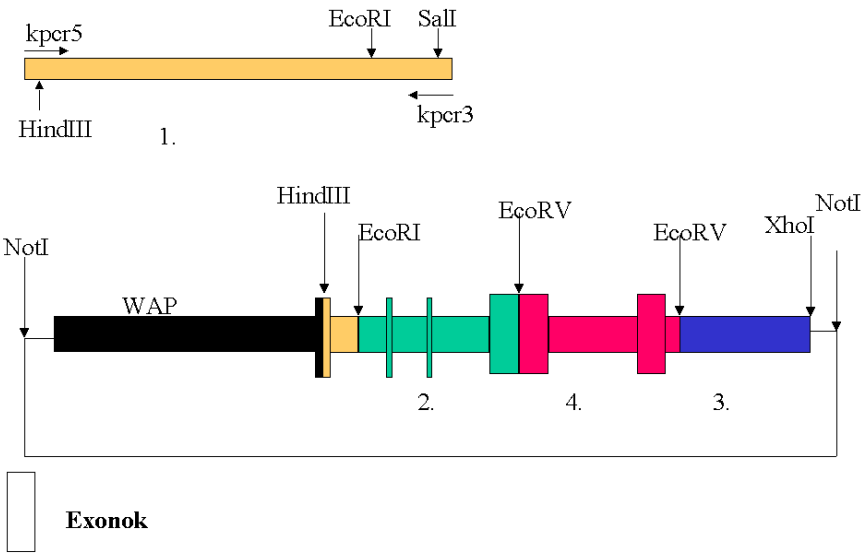
A használt primerpárok a következők voltak:

kpcr5: CTTTGCTA**AAGCTT**AGAGGTCAAT
kpcr3: AATCCTTGA**GTCGAC**CAGAGTTGC

Vastag betűvel jelöltem a tervezett restrikciós hasítóhelyek szekvenciáit. A konstrukcióban a Hind*III* hely beépítése mindössze két nukleotidcserét érintett az első

exonban, mely nem kódóló szakasz, így reméltük hogy drasztikus változásokat ezzel nem okozunk.
A következő két sor tartalmazza az eredeti nyúl kappa-kazein szekvencia részletét, valamint a konstrukció szekvencia darabját.

5′....CTTTGCTA**T**AGCT**A**AGAGGT....3′ nyúl kappa-kazein
5′....CTTTGCTA**A**AGCT**T**AGAGGT....3′ a génkonstrukció
Vastag betűvel jelölöm a kicserélt bázisokat.



4.13. ábra
A WAP-kappa-kazein génkonstrukció rajza. Jelöltem a klónozás során fontos restrikciós helyeket, az exonokat a nagyobb téglalapok jelölik. Különböző színekkel rajzoltam a szövegben említett DNS darabokat.

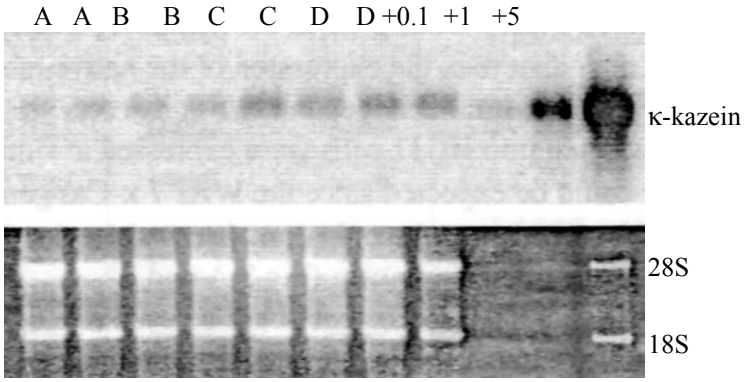
A másik létrehozott mutáció (mesterséges SalI hely) a következő klónozási lépésben elveszik.

A kapott termék Hind*III*-SalI restrikciós emésztését követően a kapott fragmentet beépítettük a C1-WAP plazmid Hind*III*-SalI helyére (4.13.ábra sárga fragment).

A C1-WAP plazmid pPOLY*III* eredetű plazmid, mely tartalmazza a nyúl WAP promóter 6.3 kb hosszú szakaszát. A C1-WAP plazmidot Eve Devinoy bocsátotta rendelkezésünkre. Az első lépés eredményeként a hibrid konstrukció tartalmazza a WAP promótert, valamint huszonnyolc nukleotidot a nyúl WAP gén első exonjából, mely a nem transzlálódó régiót hordozza, valamint a nyúl kappa-kazein gén első 1.1 kb hosszúságú szakaszát az első exon 10. nukleotidjától kezdődően.
Második lépésként nyúl kappa-kazein 3.6 kb hosszúságú Eco*RI*-Eco*RV* fragmentjét építettük be plazmidunk Eco*RI*/Eco*RV* helyére (zöld fragment). Harmadik lépés volt a gén 3' végének klónozása Eco*RV*-Xho*I* helyre (6 kb kék fragment). Utolsó lépésként a gén középső Eco*RV*-Eco*RV* fragmentjét klónoztuk be létrehozva a végső konstrukciót (2.9 kb piros fragment). Az orientáció ellenőrzése után a kapott plazmidot Not*I* enzimmel emésztettük, mely a teljes hibrid gént tartalmazza, de kivágja a felesleges pPoly*III* szekvenciát. A lineáris DNS darabot kitisztítottuk, és 1-2 ng/mikroliter koncentrációban használtuk az egér zigóták mikroinjektálása során. A konstrukciót WAP-kappa-kazein konstrukciónak neveztük el.

4.12.2. A kiméra génkonstrukció tesztelése

Az elkészített konstrukció tesztelését HC11 jelű egér emlő sejtvonalon végeztük el. Az ellenőrzés elvégzése általában célszerű, habár nem mindig ad pontos jóslatot a transzgénikus modellekre. A sejtvonalon nem működő konstrukciót nem érdemes transzgénikus kísérletbe vinni, a működő konstrukció azonban nem biztos hogy hasonlóan jól teljesít *in vivo* is. A konstrukciót stabil transzfekcióval építettük be egér eredetű HC11 sejtvonalba. A gén működését hormonális hatással indítottuk be [*Burdon és mtsai* 1994]. Az eredmények a 4.14. ábrán láthatóak. Hormonális indukciót inzulinnal, inzulinnal és prolaktinnal, inzulinnal és dexametasonnal, valamint prolaktin és dexamethason hormonok segítségével végeztük. Az emlő sejtekben az eredményt Northern hibridizációval ellenőriztük, próbaként használva a nyúl kappa-kazein cDNS próbát (mely a 3. exon végét, és a negyedik exon nagy részét tartalmazza) Az ábrán is jól látható, hogy hormonális hatásra a kiméra génkonstrukció a várt módon reagált, azaz bekapcsolódott működése. Pozitív kontrollként nyúl emlő RNS-t használtunk. Az egyes hormonkombinációk között vannak egyedi különbségek, de minden kezelés hatására beindult a génműködés.



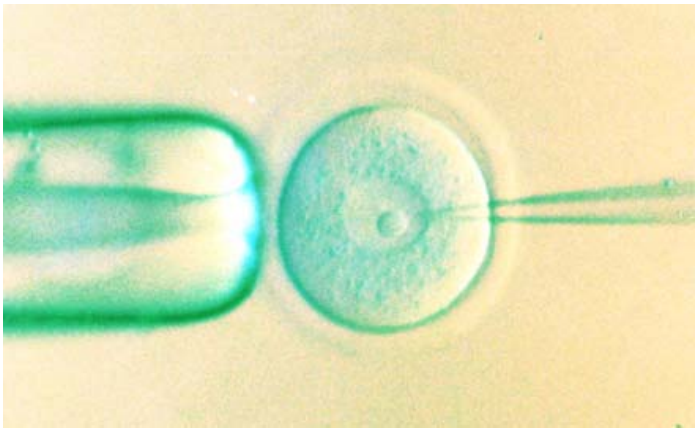
4.14. ábra
A WAP-kappa-kazein génkonstrukció tesztelése HC-11 jelű emlős sejtvonalon.A felső panel a különböző hormonokkal kezelt sejtvonalak Northern lenyomata, az alsó panel az RNS-ek gélelektroforézis fotója. A-inzulin; B-inzulin+prolaktin; C inzulin+dexamethason; D- prolaktin+dexamethason Az azonos jelű oszlopok párhuzamos izolátumok

4.12.3. A konstrukció mikroinjektálása egér embriókba

A sejtvonalban tesztelt génkonstrukció Not*I*-Not*I* lineáris fragmentjét injektáltuk megtermékenyített egérzigóták hím előmagvába. (4.15. ábra) A transzgénikus kísérletek folyamán a lineáris konstrukciók szúrása elengedhetetlen, mert ez a konstrukció kromoszómába épülését segíti. A kísérletek során 384 egérzigótát nyertünk, ebből mikroinjektálásra 342 embrió volt alkalmas. A 342 injektált embrióból 292 élte túl a beavatkozást. 274 embriót ültettünk be 15 recipiens nőstény egérbe. A 15 nőstény kétharmada azaz 10 állat összesen 47 utódot hozott világra. Az állatok tesztelése során 4 bizonyult pozitívnak, ami a megszületett utódok 8.5%-át jelenti. Ez az eredmény jónak minősíthető, különösen akkor ha figyelembe vesszük a transzgén méretét. A közel 20 kb hosszúságú DNS szakasz ugyanis kisebb valószínűséggel épül be a genomba, mint egy kisebb konstrukció. Minden transzgénikus alapító egyedből külön homozigóta vonalat létesítettünk.

A

B

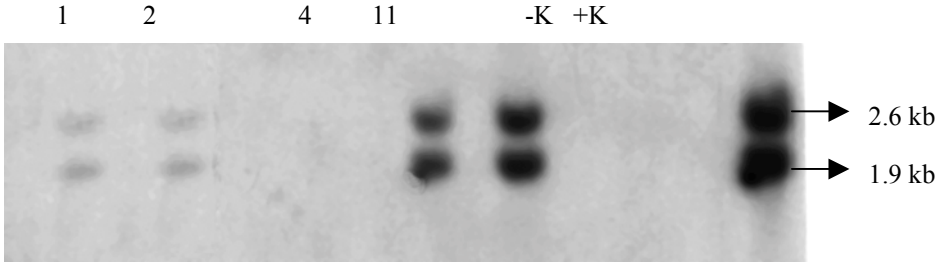


4.15. ábra
A képen az egér zigóták mikroinjektálása látható. A felső A jelű panel a mikroinjektálás előtti állapot, míg a B panel a szúrás pillanatát mutatja. A szúrás hatására az előmag térfogata megnő

4.12.4. A transzgén kimutatása az alapító egyedekben

A transzgénikus egyedeket Southern hibridizációval válogattuk ki. A tesztelendő állatok farkából DNS preparátumot készítettünk, majd Sac*I* enzimmel emésztettük meg. Próbaként a nyúl WAP promóter 4.0 kb hosszúságú szakaszát használtuk. A várt jeleknek 2.6 kb és 1.9 kb hosszúságúnak kellett lennie. A két várt fragmentumot 4 egyed esetében sikerült kimutatni. (4.16. ábra.) Pozitív kontrolként a mikroinjektált fragment 1ng mennyiségét használtuk megfelelő genomi háttér jelenlétében. A transzgént hordozó állatokat nem transzgénikus egyedekkel pároztattuk, majd az utódgenerációban a fentihez hasonlóan vizsgáltuk az utódokat.

Megállapítottuk, hogy mind a négy alapító Mendel törvényeinek megfelelően örökíti tovább a WAP-kappa-kazein transzgént, ezért csíravonal transzgénikus állatoknak tekinthetők.

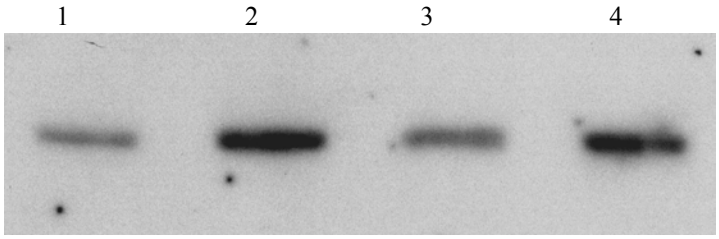


4.16. ábra

A transzgén detektálása Southern hibridizációval. Számokkal jelöltem a négy alapító egyedet. A várt fragment 2.6 kb, és 1.9 kb hosszúságú. –K- negatív nem transzgénikus egyedből származó minta, +K- pozitív kontroll az injektált konstrukció 1 ng mennyiségben.

Próbaként a már említett WAP 4.0 kb hosszúságú szakaszát használtuk. A kiválogatott homozigóta egyedeket "visszakereszteztük" vad egyedekkel. Ha a kapott utódok mind transzgénikusak voltak, akkor fogadtuk el valódi homozigótának az állatokat. A transzgénikus vonalakat a továbbiakban homozigóta formában tartottuk fent. A transzgénikus állatok teljesen egészségesek voltak, utódaikat megfelelően felnevelték.

Az utód generáció pozitív egyedeit keresztezve egymással, slot-blot hibridizácóval kiválogattuk a homozigóta egyedeket (4.17. ábra).



4.17. ábra

Slot blot hibridizáció. A képen a WAP-kappa-kazein 1. vonal második generációjának autoradiográfiás képe látható. Az 1. és 3. egyed hemizigóta, a 2. és a 4. homozigóta formában hordozza a transzgént.

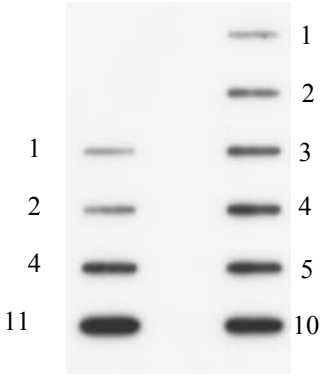
4.12.5. Az integrálódott transzgén kópiaszám-meghatározása

Az alapító egerek genomjába integrálódott WAP-kappa-kazein gén kópiaszámát kvantitatív slot-blot hibridizációval határoztuk meg. Kontrollként nem transzgénikus egerekből származó DNS-t növekvő mennyiségű 1, 2, 3, 4, 5, 10, kópia/genomnak megfelelő injektált fragmentummal kevertük össze, és rögzítettük a membránon (4.18. ábra) A számításnál figyelembe vettük, hogy az egér genom becsült nagysága körülbelül $6X10^9$ bp, mely megfelel 6 pigogrammnak. Ebből következően 20 mikrogramm DNS $3,3X10^6$ genomot tartalmaz. A 19.4 kb hosszúságú transzgén esetében egyszerű aránypárokkal kiszámítható, hogy 20 mikrogramm DNS-ben 64 pg injektált fragmentum felel meg 1 kópiának. A radioaktív próba a fent leírttal megegyező volt.

A kapott eredmények a következők. Az 1. egér vonal egykópiás, a kettes vonal 1-2 kópiás a négyes vonal 4 kópiás, míg a 11-es vonal 10-12 kópiás beépülést tartalmaz.

4.12.6. A nyúl WAP-kappa-kazein gén kifejeződése transzgénikus egerekben RNS szinten

A hibrid génünk kifejeződését RNS szinten Northern hibridizációval végeztük laktáló egér emlőből nyert RNS-ből. A mintavétel a laktáció csúcspontján a 10-12. napok között történt. (4.19. ábra) Próbaként a nyúl kappa-kazein cDNS próbát használtuk.



4.18. ábra

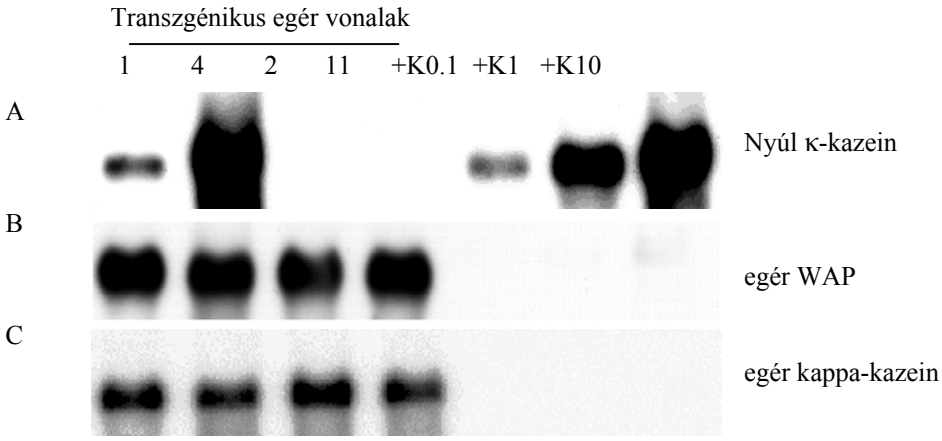
Az alapító egyedekben található transzgén kópiaszámának meghatározása. Baloldalt az alapító egér számozása alapján kapott transzgénikus vonalak eredményei láthatók, jobboldalt a transzgént tartalmazó oldat higítási sora helyezkedik el (1,2,3,4,5,10 kópia)

Nem találtunk közvetlen összefüggést a transzgén kópiaszáma és a génkifejeződés erőssége között. Négy vonalunkból kettő nem expresszált. A kettes vonal feltehetően az integráció helye miatt. A 11-es vonal expressziója két okból gátlódhatott, az egyik szintén a beépülés helye. A másik ok a magas kópiaszámú beépülés lehet.

Az egyes vonalban a nyúl WAP-kappa RNS mennyisége körülbelül 1/40-ed része a nyúlban mérhető saját mRNS mennyiségnek. Míg a 4. vonalban ez a mérték elérte a nyúl endogén szintet is.

Ez az erős kifejeződés (különösen a négyes vonal esetében) felveti annak lehetőségét, hogy a saját tejfehérjék expressziója esetlegesen lecsökkenhet. A transzkripciós faktorok mennyisége azonos marad, s ez mint limitáló tényező befolyásolhatja az endogén gén kifejeződését. Ennek a kérdésnek az ellenőrzése céljából az endogén (egér) kappa-kazein, valamint az egér WAP kifejeződését is ellenőriztük, felhasználva ugyanazt a Northern lenyomatot. Azért választottuk ennek a két génnek a kifejeződését, mivel a konstrukció WAP promótert és kappa-kazein gént tartalmaz. Az egér WAP próbát L. Henninghausen, az egér kappa-kazein cDNS próbát J.C. Mercier bocsátotta rendelkezésünkre. Köszönet érte.

A vizsgált gének kifejeződése nem változott, még a nagyon erős nyúl kappa-kazein kifejeződés mellett sem (4. vonal, 4.19. ábra)



4.19. ábra.

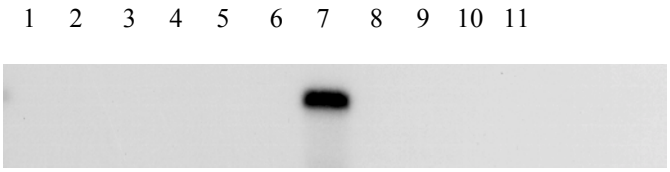
A transzgén megjelenése RNS szinten. Az A blokk a négy transzgénikus egérvonal Northern analízisét mutatja, nyúl kappa-kazein próbával. Megfelelő számokkal jelöltem a megfelelő transzgénikus vonalakat (1,4,2,11). Pozitív kontrollként laktáló nyúl RNS-ek megfelelő mennyiségeit vittem fel az utolsó három csatornába. +K0.1-0.1 mikrogramm kontroll RNS; +K1- 1 migrogramm RNS; +K10-10 mikgrogramm RNS. A B panel szintén ennek a lenyomatnak a Northern analízise az egér WAP próbával, míg a C elem az egér kappa-kazein próbával készített Northern analízis eredménye. Az A panel első csatornájának (az egyes vonal) expozíciós ideje 1 óra, a panel többi része 6 perc expozíciós idővel készült. A B és a C panelek nem szerkesztett panelek, azonos expozíciós idővel (1 óra) készültek.

4.12.7. Szövetspecifikus megjelenés

A gén szövetspecifikus megjelenésének vizsgálatát szintén Northern hibridizációval végeztük. Első eredményként gyakorlatilag minden szövetben ektopikus expresszió megjelenését tapasztaltuk. Később beigazolódott, hogy mindez kísérleti műtermék volt, mivel a béta-kazein expressziót is ugyanúgy mutatták a szövetek. A szövetek kimetszési sorrendje nagyon fontos. A tejmirigy kivágását minden esetben utolsó lépésként kell megtenni, mivel a laktáló egerek szétfolyó teje könnyen összeszennyezheti a többi szövetet. Ez különösen lényeges a nyálmirigyek kimetszésénél, melynek kivétele majdnem mindig megsérti az emlőmirigyet is.

A tejfehérje specifikus transzgénikus állatoknál előforduló (és gyakran közölt) nyálmirigy ektopikus expresszió is gyakran műtermék [*Stinnakre* 1998, személyes közlés].

Megismételt vizsgálataink mind az 1. vonalban, mind a 4. vonalban a nyúl kappa-kazein korrekt, kizárólag emlőspecifikus kifejeződését mutatta. A 4.20 ábra a 4.vonal emlőspecifikus megjelenését bizonyítja.



4.20. ábra

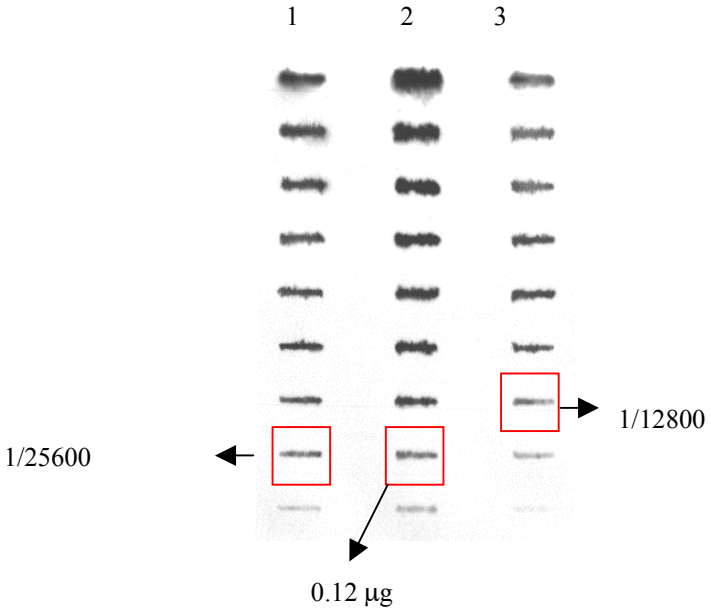
A transzgén szövetspecifikus megjelenése a 4. transzgénikus vonalban. A kép Northern hibridizáció autoradiográfiás képe. A számokkal jelölt szövetek. 1-nyálmirigy; 2-szív; 3-tüdő; 4-máj; 5-vese, 6-emlőszövet; 7-agy, 8-lép;9-here; 10 bőr; 11-izom

4.12.8. A nyúl kappa-kazein kifejeződése fehérje szinten

A laktáció 10 és 14. napja között gyűjtöttünk tejet a laktáló egér anyáktól. Az "egérfejés" a transzgénikus állatoknál nehezebb volt, mint a kontroll állatok esetében. A tejben található fehérje mennyiségét Western Blot technikával állapítottuk meg, nyúl kappa-kazein elleni ellenanyag felhasználásával. A 2. vonal, valamint a 11-es vonal, hasonlóan a Northern hibridizációhoz nem mutatott kifejeződést. Az 1. vonalban valamint a 4. vonalban sikerült kimutatni a fehérjét. (4.21. ábra) A fehérje mennyisége a 4. vonalban átlagosan 2,5-3 mg/ml mennyiséget (egyes egyedek esetében néha a 6-7 mg/ml) ért el. Az 1. vonal 1.3 mg/ml mennyiségben termelte a nyúl kappa-kazeint. Az expresszió a négyes vonal esetében nagyon magasnak tekinthető, hiszen az endogén szinthez képest több mint 100%-al sikerült megemelni a fehérje mennyiségét. Az egyes vonalban több mint 50%-al emelkedett a tejfehérje mennyisége a tejben. A rekombináns fehérje mérete megegyezik a várt mérettel (4.22. ábra).

4.12.9. A rekombináns fehérje beépülése a micellákba

Fontos kérdés, hogy a nyúl kappa-kazein fehérje valóban részt vesz-e a micellák felépítésében. Ennek eldöntésére el kell választani a kazein frakciót a savó frakciótól. Ez kétféle úton valósítható meg: Savas kicsapással, valamint nagysebességű centrifugálással. Mi az ultracentrifugálás módszerével választottuk szét a két frakciót egymástól. (4.22. ábra)

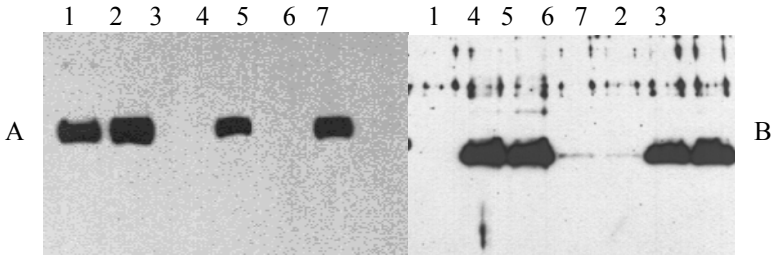


4.21. ábra

A rekombináns fehérje megjelenése a tejben (western hibridizáció). 1. oszlop: a 4. vonal higításai, 2. oszlop: az 1. vonal higításai, 3. oszlop: a tisztított nyúl kappa-kazein különböző mennyiségei. A négyzettel bekeretezett higítások, valamint mennyiségek megfelelnek egymásnak. Ez alapján számítható ki a rekombináns fehérje koncentrációja a tejben.

Ebben a kísérletben a legjobban expresszáló vonalat választottuk ki. Bebizonyítottuk, hogy a kappa-kazein részt vesz a micellák felépítésében, hiszen jelen van a kazein frakcióban. Érdekes módon a rekombináns fehérje körülbelül 70%-a volt csak micelláris forma, egy kisebb rész kb. 30% a savóban maradt.

Ennek valószínűleg az az oka, hogy a kappa-kazein arányát csak korlátozott mértékben lehetséges megnövelni a többi kazeinhez képest. Nálunk az túltermelés mértéke átlépte ezt a határt, így a fehérje egy része a savó frakcióban maradt.



4.22. ábra

A rekombináns fehérje beépülése a tej micellákba. A csatornák jelölése 1-tisztított nyúl kappa-kazein, 2-transzgénikus tejminta, 3-nem transzgénikus tejminta, 4- transzgénikus kazein frakció, 5-nem transzgénikus egértej kazein frakciója, 6-transzgénikus tejsavó, 7-nem transzgénikus tejsavó. Az A panel nyúl kappa-kazein ellen termeltetett ellenanyaggal készült Western blot, a B panel egér béta-kazein ellen termeltetett ellenanyaggal készült Western blot képe

A frakciók pontos elválasztását hasonló lenyomaton a béta-kazein elleni antitesttel mutattuk ki. A 4.22. ábrán jól látható, hogy a béta-kazein, mely szintén a micellákba épülten tapasztalható, a centrifugálás után minden mintában kizárólag a kazein frakcióban van jelen.

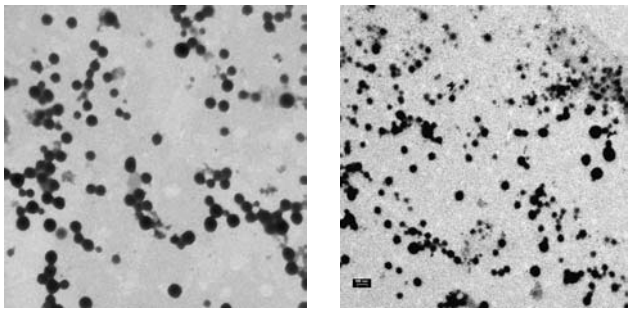
Ez a kontroll kísérlet egyben kontroll kísérlet az endogén béta-kazein kifejeződésére is. Látható, hogy a fehérje mennyisége azonos mind a transzgénikus, mind kontroll egerekben. Sajnos más tejfehérjékkel a kísérletet nem végezhettük el, mivel más antitestek elérhetetlenek voltak.

4.12.10. A nyúl kappa-kazein termelésének hatása tej micellák méretére

A nyúl kappa-kazeint túltermelő állatokban a tejmicellák méretének változását sikerült kimutatni. A micellák mérete szignifikáns módon kisebb volt!! Kísérleteink tehát elérték alapvető céljukat, és hipotézisünk beigazolódott.

A micellák méretét több független módszerrel sikerült igazolni. Az érzékenyebb módszernek az elektronmikroszkópos mérés bizonyult (4.23 ábra).

A natív tejminták elektronmikroszkópos képeit képanalizáló software segítségével először digitalizáltuk. (A képeken lévő micellák egyöntetűen feketék, míg a háttér egyöntetűen fehér lett.) Ezt követően a számítógépes program az esetlegesen összetapadt micellákat külön választotta, majd automatikusan megmérte az összes micella átmérőjét. A mérések eredményeit a 4.5. táblázat mutatja.



4.23. ábra
A natív tejmicellák elektronmikroszkópos képe. A bal oldali kép kontroll állat tejmintája, a jobb oldali a transzgénikus. A nagyítás azonos mindkét esetben (8000X)

4.5. táblázat. A tejmicellák méretei elektronmikroszkópos vizsgálatokkal

	Kontroll	Transzgénikus egér vonalak		
vonal neve		23	1	4
micella méret nm (szórás)	94 (28.5)	103 (26,7)	74(27.7)	61 (25)
nyúl kappa-kazein koncentráció		15 μg/ml	1,3 mg/ml	2.5mg/ml

A mérések során megmértük a Baranyi és munkatársai által létrehozott transzgénikus egér adatait is (23-as vonal). A huszonhármas vonal micella mérete nem különbözik a kontroll állatokétól. Ez érthető, hiszen a rekombináns fehérje ebben az esetben nagyon kevés volt, mindössze 15 μg/ml. Az egyes vonal és a négyes vonal értékei mind szignifikáns módon különböznek egymástól, és a kontroll egerekétől is ($p<0,001$). A micellaméret változása arányosságot mutat a termelt kappa-kazein mennyiségével. A magasabb koncentrációjú kappa-kazeinben kisebb a micellaméret értéke is. A 4. vonalban a mért micellaméret csökkenése 35%-os.

Méréseinket megerősítettük fényszóródáson alapuló micella méréssel is. A mérések adatai a 4.6. táblázatban láthatók.

4.6. táblázat. A tejmicellák méretei fényszóródás alapján. Az adatok nm-ben vannak megadva, zárójelben az adott értékhez tartozó szórások vannak feltüntetve.

	Kontroll		Transzgénikus egér vonalak			
Vonal neve			1		4	
Micella méret nm (szórás)	268(19)	288(20)	262 (17)	282 (19)	226 (16)	247(8)
Nyúl kappa-kazein koncentráció			1.3mg/ml		2.5 mg/ml	

Az abszolút eredmények természetesen nem azonosak a két módszer esetén, mert a fényszóródás során a micellák hidrátburkát is mérjük. A micellák fiziológiás körülmények között hidrátburokkal rendelkeznek [*Schmidt és mtsai* 1974], és ebben az esetben a micellák abszolút méretét mérjük. Ezzel szemben az elektronmikroszkópos vizsgálatok során a csupasz micellák átmérőit számoljuk, mert a hidrátburok a fixálás során elveszik. A fényszóródás független mérései nem hasonlíthatók egymással össze, mivel a fényszóródás mérése sok tényezőtől jelentősen változik (hőmérséklet). Ezért a két független mérést külön jelöltem. (A mérőműszer Magyarországon nem elérhető, méréseinket Franciaországban végeztük. A két mérés között a laborhőmérséklet is jelentősen különbözött.)

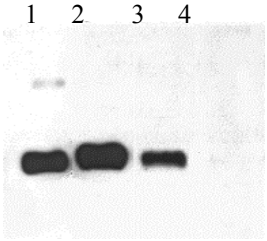
A fényszóródásos mérések során is sikerült kimutatni a legerősebben expresszáló vonalban a micellaméret csökkenését. A csökkenés mértéke ebben az esetben 15%. A különbségek ($p<0,001$) érték mellett is szignifikánsnak bizonyultak.

Az 1. vonal fényszóródás alapján ugyan kissé kisebbnek mutatkozik mint a kontroll, az eredmények azonban nem szignifikánsak. Az eredmények további megerősítése látható ultravékony szöveti metszeteken is. Azonos nagyítások mellett, a micellaméretek sokkal kisebbeknek látszanak.

4.12.11. A kimozim emésztés vizsgálata transzgénikus állatok tejében

Mivel az injektált konstrukcióban a struktúrgén nyúlból származik, felvetődik a kérdés, hogy a micellák koagulációja során a gyomorban az egér kimozim enzim képes-e a megfelelő emésztés indukálására. Kísérleteinket a 4. vonalban végeztük el. A tej alvadása során képződő gél erőssége jellemzi az alvadás tulajdonságait. Mivel az egértej kissé másként viselkedik mint a többi állat teje, ezért gélerősség vizsgálatokat nem végezhettünk. Az egértejben ugyanis a kimozim enzim hatására sem a kontrol, sem a transzgénikus tejmintákban két óra elteltével sem sikerült megfelelő gélt létrehozni. Habár az éjszaka során végzett kísérletek tanulsága szerint a transzgénikus egerek teje keményebb alvadékot alkotott, (illetve csak az alkotott kemény alvadékot a kontrol tejek nem) ezt egzakt mérésekkel nem igazoltuk.

A kimozim enzim emésztő képességét Western blot analízis segítségével követtük nyomon. 90 perc elteltével az emésztés során 1 nemzetközi egység (IU) enzim hatására az ép fehérje mennyisége jelentősen lecsökkent a tej mintában, 2 IU enzim hatására pedig teljesen lebomlott. Ezzel igazoltuk, hogy a kimozim enzim hasítási helye (105 Phe-106 Met) a rekombináns fehérjében is megfelelő módon megtalálható. (4.24. ábra) A transzgénikus egerek teje tehát emészthető, feldolgozható az újszülött állatok számára. Ezt az is bizonyítja, hogy az anyák képesek utódaikat felnevelni.

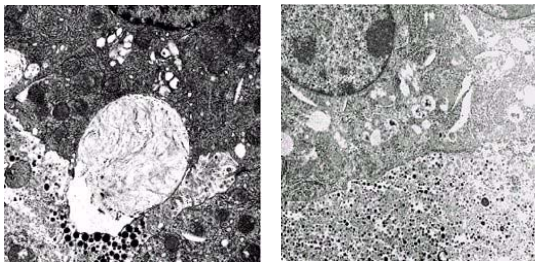


4.24. ábra

Kimozim emésztő képesség Western blot segítségével nyomon követve.
A különböző csatornák adatai: 1-tisztított nyúl kappa-kazein, 2-transzgénikus tejminta 4. vonal, 3-transzgénikus tejminta 1 IU. kimozimnal emésztve, 4- megegyező minta 2 IU. enzimet felhasználva. Az emésztések szobahőmérsékleten 90 percig tartottak. A Western blot nyúl kappa-kazein elleni ellenanyaggal készült

4.12.12. A transzgénikus állatok emlőjének szöveti felépítése

A 4. vonal emlőszövetéből ultravékony metszeteket készítettünk. Vizsgálataink során nem találtunk a szöveti felépítésben lényeges különbségeket (4.25. ábra).
Habár a micellák a transzgénikus állatokban kisebbnek mutatkoznak a kiválasztó vezikulumokban valamint a tejcsatornácskákban egyaránt, a szöveti felépítés sem mikroszkópos, sem elektronmikroszkópos szinten nem különbözik. Ultravékony metszeteken vizsgáltuk a kiválasztó vezikulumban található micellák számát, valamint a micellák által elfoglalt terület nagyságát is.



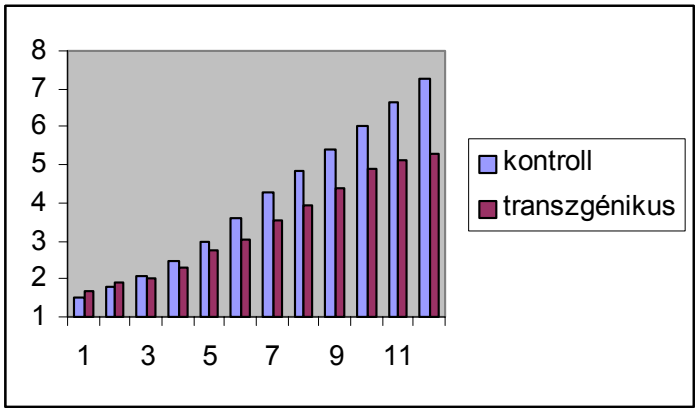
4.25. ábra
Az emlő szöveti felépítése ultravékony metszeten. A bal oldali kép kontroll egérből, a jobb oldali kép transzgénikus egérből származik.

Temészetesen ezek az adatok csak statisztikailag értelmezhetőek, mivel az ultravékony metszeteken a micellákat mindig máshol és máshol vágjuk keresztbe. Megállapítottuk, hogy kiválasztó vezikulumokban található micellák száma mindkét esetben nagyon hasonló. A micellák által elfoglalt metszeti terület kisebb a transzgénikus állatok esetében, de ez érthető, hiszen azonos számú de kisebb micella természetesen kisebb területű (illetve térfogatú).

4.12.13. A nyúl kappa-kazeint hordozó transzgénikus anyák utódnevelő képessége

Habár minden előzetes vizsgálat arra utalt, hogy a tej minősége az utódok szempontjából jobb lett (kisebb micellaméret, azonos emészthetőség, jobb alvadási idő) ennek ellenére a transzgénikus anyák utódai lassabban nőttek a legjobban termelődő vonal esetében. Ez a hatás két dologgal magyarázható.

Vagy a tej tulajdonságai változtak meg oly mértékben, hogy az az utódok számára valamilyen szempontból előnytelen, esetleg a transzgén olyan helyre integrálódott, mely az utódokban a növekedés során változásokat okoz. Ez utóbbi lehetőséget sikerült kizárni. A transzgénikus anyák utódait kicseréltük vad típusú alomból származó egyedekre közvetlenül a születés után, és az utódnevelő képességet ezután vizsgáltuk kontrolként azonos genetikai hátterű de nem transzgénikus anyákat használva. (4.26. ábra). Másik kontrolként a transzgénikus anyák utódait tápláltuk nem transzgénikus anyákkal. Eredményként ugyanazt kaptuk, azaz a transzgénikus anyák által nevelt alom lassabban növekedett. Így ez a hatás kizárólag a tej tulajdonságaira vezethető vissza.



4.26. ábra
Utódnevelő képesség vizsgálata transzgénikus, és kontroll egerekben. A vizszintes tengelyen az eltelt napokat, a függőleges tengelyen az utódok egyenkénti átlagos növekedését jelöltem. A világos oszlopok a normál utódok, a sötét oszlopok a transzgénikus utódok növekedését jelzik.

A méréseket 12 napon keresztül végeztük, és a 12. nap végére a transzgénikus és kontrol almok közötti különbség több mint húsz százalékos volt. Az utódok emellett teljesen egészségesek voltak, nem csökkent életképességük, sem élettartalmuk. A szilárd táplálékra való áttérés után a különbség nagyon hamar kiegyenlítődött. A tapasztalt hatást azzal magyaráztuk, hogy megfigyeléseink szerint a transzgénikus anyák nehezebben fejhetőek, a tej “töményebbnek”, és kevesebbnek tűnik.

A tej viszkozitásának megváltozásával, természetesen előfordulhat hogy az utódok nehezebben jutnak táplálékhoz, és ezért kevesebbet esznek. Ez azután negatív visszacsatolás útján tovább csökkenti az anyatej mennyiségét.

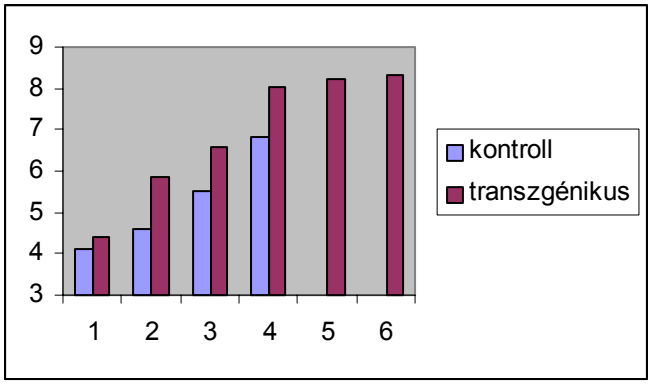
Hasonló eredményre más tejfehérje transzgénikus egerekben is volt már példa. Alfa-laktalbumin hiányos egér teje olyan mértékben viszkózus, hogy az anyák képtelenek utódaikat táplálni [*Stinnakre és mtsai* 1994]. Hasonló a helyzet béta-kazeint túltermelő egerekben is [*Bleck és mtsai* 1995]. Az ellentétes hatásra is van példa: az alfa laktalbumin koncentráció növelése transzgénikus egerekben [*Stinnakre és mtsai* 1999] enyhén hígítja a tejet [*Vilotte* 2000 személyes közlés], sertésekben a malacok súlygyarapodási ütemének emelkedését is megfigyelték [*Wheeler és mtsai* 1999].

4.13. Kapilláris viszkoziméter építése

A teória igazolására meg kellett mérnünk az egértej viszkozitását. Mivel a transzgénikus egerekből egy alkalommal maximálisan 200 mikroliter tejet lehetett lefejni (ekkora mennyiségű tej fejése gyakran az utódnevelő képesség elvesztését jelentette), ezért ebben a térfogatban kellett a mérést kivitelezni. Ezt Magyarországon sehol sem tudták megoldani a reológiai laboratóriumok, ezért kénytelenek voltunk építeni házilagos viszkozimétert.

A tej nem newtoni folyadékként viselkedik [*Dewan és mtsai* 1972], a viszkozitás mérését ezért kapilláris, vagy rotációs viszkoziméterrel lehet elvégezni. Rotációs viszkoziméter építésünk kudarcba fulladt, így kapilláris viszkozimétert készítettünk.

A kapilláris viszkoziméter alapja egy 5µl térfogatú konstrikciós pipetta volt. A szerkezet tartalmaz egy kapillárist, melyben megfelelő szűkítés van elhelyezve. A szűkítés felett kijelölt két mérce között a folyadék áthaladási ideje egyenesen arányos a folyadék viszkozitásával. Természetesen a készülék nem alkalmas abszolút viszkozitások mérésére, azonban relatív viszkozitások mérése a vízhez, illetve más tejmintákhoz képest kivitelezhető, és nagy biztonsággal reprodukálható. A kapilláris viszkoziméter elkészítése és a reológiai mérések Dr. Szabó László (Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont) segítségével történtek.



4.27. ábra

Reológiai mérések. A vízszintes tengelyen a különböző mérések szerepelnek számmal jelölve. A függőleges tengelyen a vízhez mért relatív viszkozitás értékek vannak feltüntetve. Világos oszlopok jelölik a normál egértejet, sötét oszlopok jelölik a transzgénikus egértejeket (4. vonal). Az utolsó két alkalommal (5., 6.) csak transzgénikus egér tejeket mértünk.

4.14. Reológiai mérések

A viszkozitás méréseket kiegyenlített alomszámok mellett végeztük. A mérések során 3-6 egyed méréseit átlagoltuk. A mérések eredményeit a 4.27. ábra mutatja. Minden egyes mérés alkalmával a vízhez viszonyított relatív viszkozitás kb 1.4-1.5-ször nagyobb volt a 4. vonalhoz tartozó nőstények tejében minta kontroll állatok esetében.

A termelt tej, valamint az utódok által elfogyasztott tej mennyiségeit azonban nem tudtuk megmérni. Az egér folytonosan szoptató állat, ezért a súlymérés szopás előtt-után módszer itt nem alkalmazható.

4.15. A nyúl kappa-kazein túltermelése transzgénikus nyulakban

4.15.1. A nyúl Wap-kappa-kazein gén mikroinjektálása nyúl zigótákba

Kísérleteinket új zélandi fehér nyulakon folytattuk tovább. Az injektált konstrukció az egerek esetén már leírt nyúl WAP-kappa-kazein kiméra gén volt.

A transzgénikus technika lépései, valamint a zigóták mikroinjektálása hasonló az egérnél leírtakhoz (4.28.ábra).

A nyúl embriók tartalmaznak egy külső ún. mucin réteget, ez hajlamos a zigótákat "összeragasztani". Hőmérsékleti és fényváltozásokra érzékenyebbek mint az egér embriók, ezzel szemben a kapillárissal történő szúrást jobban viselik, magasabb a túlélő embriók aránya. A mikroinjektálás eredményeit a 4.7. táblázat összegzi.

Transzgénikus nyulat Magyarországon először sikerült létrehoznunk. Mivel a módszert adaptálni kellett a hazai viszonyokhoz, az eredményesség még alacsony volt. Két transzgénikus utód közül az egyik újszülött korban elpusztult. Az esemény nem hozható összefüggésbe az utód transzgénikus voltával, a szoptató anya véletlenül összenyomta egynapos korában.

A másik alapító egyed elérte az ivarérettség korát. Ez az állat nőstény volt. Többszöri kísérlet után sem lehetett természetes úton keresztezni hím állatokkal.

4.7. táblázat. A transzgénikus nyúl előállítás adatai. Magyarázat a szövegben

Injektált konstrukció	nyúl WAP-kappa-kazein
Embriószám	3314
Injektált embriók száma	2560
Beültetett embriók száma	2250
Recipiens anyák száma	109
Kihordott vehem	42
Utódok száma	155
Transzgénikus utód	2
Transzgénikus utód %	1,29
Felnőtt transzgénikus utód	1
Örökít	0

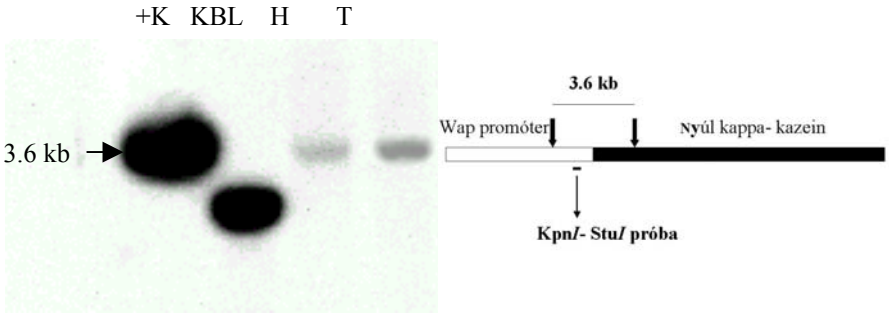
4.28. ábra
A nyúlzigóták mikroinjektálása. A felső ábrán a szúrás előtti állapot, az alsó fényképen a szúrás pillanata látható. A mikroinjektálás a hím pronukleuszba történik.

Többszöri mesterséges termékenyítés (hormonkezeléssel kombinálva) sem vezetett eredményre. Ezt követően szuperovuláltattuk, mesterségesen termékenyítettük, majd embriókat mostunk belőle. Összesen nyolc embriót sikerült kinyernünk. Az embriók teljesen egészségesek voltak. A termékenyítés tehát sikerrel járt.

A szaporítás sikertelenségének oka valószínűleg egy fiatalkori bakteriális fertőződés eredményeként kialakult szervi elváltozás volt, mely az embriók megtapadását akadályozta. A kapott embriókat ezután összekevertük normál nyúlból származó embriókkal, majd recipiens anyába ültettük. Az embriók keverésére azért volt szükség, mert előzetes megfigyeléseink szerint kevés embrió beültetése alacsonyabb vemhesülési arányt okoz. A recipiens anyába oldalanként 8-8 embriót ültettünk be. A beültetés eredményeként négy utód született. A fent leírtak miatt statisztikusan az embriók negyede lehetett volna transzgénikus (öröklődés és a kevert embriók miatt). Sajnos a négy utód egyike sem bizonyult transzgénikusnak.

4.15.2. A transzgén kimutatása Southern hibridizációval

Az utódok füléből származó genomiális DNS-t Bgl*II* enzimmel emésztettük. Próbaként a nyúl WAP promóterből származó 246 bp hosszúságú Kpn*I*-Stu*I* fragmentet használtuk a Southern hibridizáció során. A kapott eredmény a 4.29. ábrán látható.

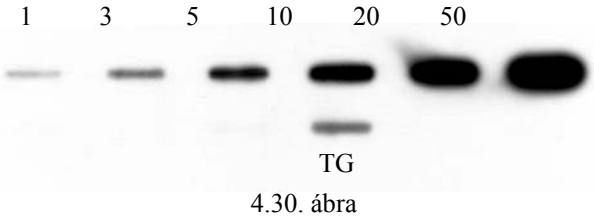


4.29. ábra

A transzgénikus nyúl alapító egyedek tesztelése Southern hibridizáció segítségével. A csatornák sorrendje +K-pozitív kontrol injektált DNS (5 μl). KBL-a Gibco cég molekulasúly markere. H-elpusztult transzgénikus nyúl DNS, T-az élő transzgénikus nyúl DNS. A fénykép mellett vastag fekete nyíllal jelöltem a konstrukción található Bgl*II* helyeket. Fekete vonallal jelöltem a használt Kpn*I*-Stu*I* próbát.

4.15.3. A kópiaszám meghatározása az alapító egyedben

A kópiaszám meghatározása transzgénikus nyulunkban az egereknél leírtaknak megfelelően történt. Az integráció során kb. 3 kópia épült be a genomba. Próbaként a nyúl WAP 246 bp hosszúságú KpnI-StuI szakaszát használtuk (4.30 ábra)



4.30. ábra

Kópiaszám meghatározása a transzgénikus nyúlban. A felső sorban 1, 3, 5, 10, 20 és 50 kópia DNS-t vittünk fel, megfelelő genomi háttér (20µg nyúl DNS) kíséretében. Az alsó sorban a transzgénikus nyúl DNS 20µg-ja látható, jelölése TG. Próbaként a fent leírt 246 bp-os fragmentet használtuk

4.15.4. A transzgén kifejeződése a transzgénikus nyúl alapító egyedben

A termelődött fehérje mennyiségét nem lehet mérni, hiszen a termeltetett fehérje, és a saját kappa-kazein minden tulajdonságukban megegyeznek, így elválasztásuk egymástól nem lehetséges. Lehetőség lenne esetleg a megemelkedett kappa-kazein szintet detektálni. Ehhez azonban ismerni kellene a nyúlpopulációkban a laktáció során termelődő fehérje mennyiségének átlagát, valamint azt, hogy ez mennyire mutat egyedi változásokat. Mivel a szakirodalomban ilyen jellegű vizsgálatot nem ismerünk, ezért a fehérje szintű kimutatást elvetettük.

A transzgén kifejeződését csak RNS szinten tudtuk kimutatni. Northern hibridizációval ez azonban nem volt megoldható, mert nem lehetett olyan megfelelő méretű próba DNS-t készíteni, amely csakis a transzgénre jellemző. A kérdés megoldása RT-PCR segítségével lehetséges. A konstrukció tartalmazza a WAP első exonjának 28 nukleotidját, mely a nyúl savó savas fehérje 5’ nem transzlálódó régióját kódolja. Ez a szakasz részt vesz az érett RNS felépítésében. Így az adott szakaszra tervezett oligonukleotid segítségével reverz transzkripciót követő PCR -rel csak a transzgénre jellemző RNS-t lehet detektálni. (4.31. ábra)

WAP 1. Exon 5'UTR κ-kazein 1. Exon

5′ **atccgacacctgcctg**ctgcccaccacaagcttagaggtcaattcaacctactgccaagcaagaccc

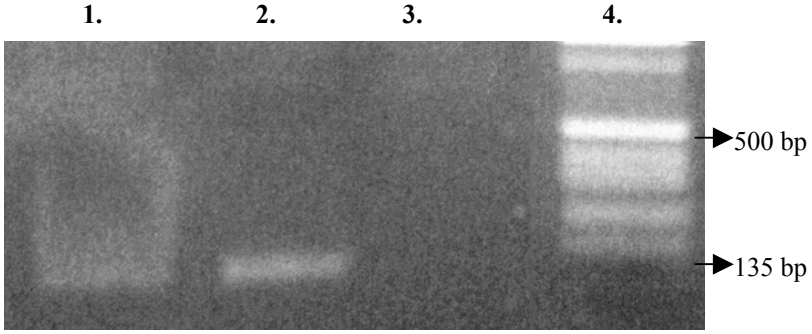
gacagacagaaggaaagatgcaatgatgaagcattttcttct**agttgtgaacatcctggcag**ta 3'

κ-kazein 2.exon

4.31. ábra

A reverz transzkripcióval létrehozott cDNS felszaporított szakasza. Vastagon jelöltem a tervezett oligonukleotid párt, határvonalakkal különítettem el a jellemző szakaszokat. A transzláció startpontját aláhúzás jelöli.

A kapott eredményeket a 4.32. ábrán lehet értékelni. A kapott 134 bp hosszúságú fragment jellemző a transzgénre. Negatív kontrollként álvemhes nyúlból származó RNS-t használtam, pozitív kontrollként a 4. számú transzgénikus egérvonalból származó laktáció során gyűjtött RNS RT-PCR képe azonosítható.



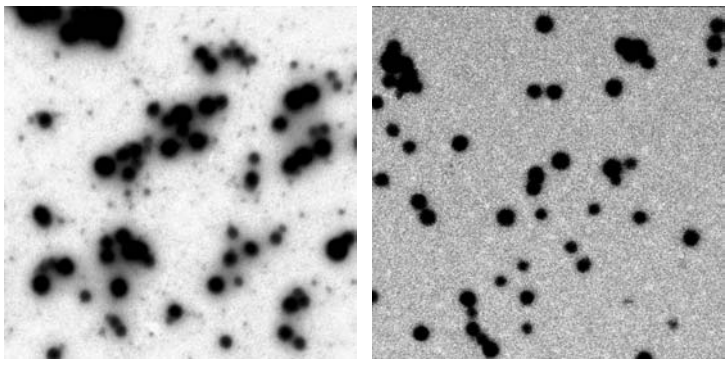
4.32. ábra

A nyúl WAP-kappa-kazein transzgén expressziójának vizsgálata álvemhes transzgénikus nyúl emlőszövetében RT-PCR segítségével. 1.csatorna- az álvemhes transzgénikus alapító egyed emlőszövetéből nyert reakció eredménye. 2.csatorna-ugyanezt a transzgént hordozó transzgénikus egérvonal (4.vonal) laktáló nőstényének emlőszövetéből nyert RNS minta RT-PCR képe. 3.csatorna- Nem transzgénikus, álvemhes nőstény nyúlból nyert RNS minta RT-PCR eredménye. 4. Molekulaméret marker (GIBCO)

Megállapítottuk, hogy a transzgénikus alapító egyed RNS szinten kifejezi a transzgént, bár az expresszió mértéke -összehasonlítva a 4. egérvonalban tapasztalttal- alacsony mértékű.

4.15.5. A micellák mérete a transzgénikus alapító nyúlban

A tejmicellák méretének meghatározása a laktáció csúcspontján szokásos. Transzgénikus alapító nyulunk normális laktáción nem esett át, mivel utódokat nem hozott világra. Így a tejmicellák mérését nem a szokásos úton végeztük. Lehetőség van álvemhesség előidézésére: 150 egység HCG (human chorionic gonadotropin) injekcióval. Két héttel a kezelést követően érdemes megpróbálkozni tej gyűjtésével. Mivel az elektronmikroszkópos vizsgálatokat kb. 5 µl tejből kivitelezhetőek, azért az álvemhes anyáktól való tejgyűjtés nem okozott problémát. Kontrollként természetesen nem lehetett normál tejmintát használni, mivel a micellaméret esetleges változásai a laktáció során sem ismertek, álvemhes nyulak micellaméretéről pedig semmilyen közlemény nem ismert. Ezért kontrol nyulakat kezeltünk hormonálisan, majd az így álvemhessé tett állatokból azonos napon szintén tejmintát gyűjtöttünk. A natív tej elektronmikroszkópos vizsgálata nem mutatott különbséget a transzgénikus és a normál tejminták között. (4.33. Ábra)



4.33. ábra
Natív nyúlmicellák elektronmikroszkópos képe. A bal oldalon látható kép nem transzgénikus egyedtől származik, a jobb oldali képen transzgénikus nyúl micellafelvétele látható. A méretek között statisztikailag nincsen különbség.

A képanalizáló program segítségével megmértük a tejmicellák pontos méreteit. Ez transzgénikus nyulunk esetében 146 ±24 nm, míg a kontroll állat esetében 152±17 nm volt. Mint látható a kapott érték a transzgénikus állat esetében ugyan kisebb, azonban a statisztikai elemzés alapján a kapott értékek a biológiában nem elfogadható hibahatárok mellett tekinthetők csak különbözőnek (P=0,19).

Összességében megállapítható, hogy az egyetlen transzgénikus nyúlban nem sikerült oly mértékben megemelni a nyúl kappa-kazein koncentrációt, hogy az észlelhető fiziológiai változásokat okozhasson. Természetesen ettől még a transzgén korrekt módon működhet, csak alacsony hatékonysággal. A pontosabb vizsgálatokhoz több alapító egyed vizsgálatára lenne szükség, mivel a transzgén nem tartalmazott olyan elemet, melyek az integráció helyétől független magas megjelenést biztosít.

4.16. Az emberi VIII-as véralvadási faktor termeltetése transzgénikus nyúlban

A nyúl kappa-kazeint hordozó transzgénikus nyulunk előállítása biztosította a lehetőséget arra, hogy megpróbálkozzunk gyógyhatású fehérje termeltetésével nyúltejben.

A nyolcas véralvadási faktor termeltetésére a nyúl mint transzgénikus bioreaktor ideális jelölt, mivel a faktorra csak kis mennyiségben van szükség (0,3 kg évente az USA területén). Így megfelelő expresszió mellett a feladatot kisebb nyúlpopuláció is elvégezheti, előállításuk ezzel szemben jóval olcsóbb mint az egyéb haszonállatoké.

A VIII-as véralvadási faktor a vérplazmában keringő glikoprotein, mely fontos szerepet játszik a vér alvadása során. A IX-es véralvadási faktorral közösen aktiválják a X-es faktort. A fehérje 2332 aminosav hosszúságú, mely proteolitikus hasítás után egy könnyű és egy nehéz láncként a von Willebrand faktorhoz kötötten kering a vérplazmában [*Weiss és mtsai* 1977]. A teljes gén 186 kb hosszúságú, és 9 kb hosszú mRNS-t kódol [*Gitschier és mtsai* 1992].

A VIII-as faktor génje az emberi X kromoszómán helyezkedik el. A fehérje hiánya, illetve abnormális jelenléte a gyakori hemofília-A betegséghez vezethet. Minden 5-10000 férfi szenved ebben a kórban.

Gyógyításuk nagy tisztaságú, és koncentrált vérplazma felhasználásával történik. Sajnos emiatt gyakoriak a virális fertőzések, valamint a heves allergiás reakciók. 1977 és 1985 között a betegek fele kapta meg az AIDS vírusát, és gyakori volt a Hepatítisz-C fertőzés is. Ennek a két vírusnak a szűrése ma már minden vérkészítményben megoldott, egyéb betegségeké azonban nem (új típusú hepatítisz, Creutzfeldt-Jakob kór) [*Paleyanda és mtsai* 1997].

Emberi sejtkultúrában termeltetett fehérje is megjelent a piacon. Ennek előállítása roppant drága (5000 dollár páciensenként évente), habár biztonsági szempontból eredményesebb. A drágaság oka abban keresendő, hogy a fehérje igen komplex szerkezetű, poszttranszlációs módosításai bonyolultak (N- O-glikolizáció, tirozin szulfonálás, proteolitikus hasítás). Tisztítása instabilitása miatt nehéz feladat. Termeltetése transzgénikus állatokban a fenti okok miatt lenne kívánatos.

Transzgénikus sertésekben sikerült a VIII-as faktort termeltetni nagy (2,7 μg/ml) mennyiségben. A használt génkonstrukció az egér WAP promóter- VIII-as faktor cDNS volt [*Paleyanda és mtsai* 1997]. A németországi Niemann és munkatársai transzgénikus birkában néhány ng/ml mennyiségben termeltették az aktív fehérjét. Az általuk használt konstrukció a VIII-as faktor cDNS mellett a juh β-laktoglobulin promótert, valamint az egér metallotionein intronjait hordozták [*Niemann és mtsai* 1999].

Az általunk használt génkonstrukciót szintén a Niemann és munkatársai készítették, mi azt injektálásra alkalmas formában (lineáris DNS 2-3 ng/ml koncentráció) kaptuk.

A konstrukció az egér WAP promóter (2.5 kb hosszú) által szabályozott emberi VIII-as faktor cDNS volt. A konstrukció tartalmazott egér metallotionein gén 5' végi szekvenciaelemeket is. Ez megfelelt a gén 5' végének és tartalmazta az első két intront. Sajnos a gén nagysága miatt csak cDNS konstrukció használata volt lehetséges, az egér WAP promótert azért használtuk, mert korábban a sertéseknél VIII-as faktor termelésénél jól működött [*Paleyanda és mtsai* 1997]. Az egér metallotionein gén 5' végét a benne található intronok miatt építették a konstrukcióhoz. Ismert, hogy az intronok használata cDNS konstrukciók esetében emeli a transzgén kifejeződésének mértékét [*Palmiter és mtsai* 1991, *Niemann és mtsai* 2000]. A gén injektálása, és a transzgénikus állatok létrehozása a korábban leírtaknak megfelelően történt.

A mikroinjektálás eredményeit a 4.8. táblázat tartalmazza. A táblázatból kiolvasható, hogy az eredményeink a beültetés hatékonysága (48%), valamint a transzgénikus utódok aránya 5.88% alapján megfelelnek a nemzetközi szakirodalomban közöltekkel. Fontos megemlíteni, hogy a kísérletek tervezésénél figyelembe vettük azt a tényt is, hogy a nyulak vemhesülési arányai tavasszal a legjobbak. Kísérleteinket ezért kora tavasszal végeztük.

A három megszületett transzgénikus utód közül kettő sajnos korán elpusztult. Egyik esetben sem a transzgén okozta változások miatt, hanem a rosszul tervezett nyúlketrecek okozták a pusztulást.

4.8. táblázat. Az emberi nyolcas véralvadási faktor génjének mikroinjektálási adatai

Injektált konstrukció	Egér WAP-humán faktor VIII
Embriószám	702
Injektált embriók száma	627
Beültetett embriók száma	570
Recipiens anyák száma	29
Kihordott vehem	14
Utódok száma	51
Transzgénikus utód	3
Transzgénikus utód %	5,88
Felnőtt transzgénikus utód	1
Örökít	1

4.16.1. A transzgén detektálása

A transzgén kimutatását az alapító egyedekben PCR segítségével végeztük. A nyulak füléből és véréből tisztított DNS mintákból a VIII-as faktor cDNS-re tervezett oligonukleotid pár segítségével szaporítottunk fel, csak a transzgénre jellemző 1020 bp hosszúságú szakaszt. A primerek szekvenciái:

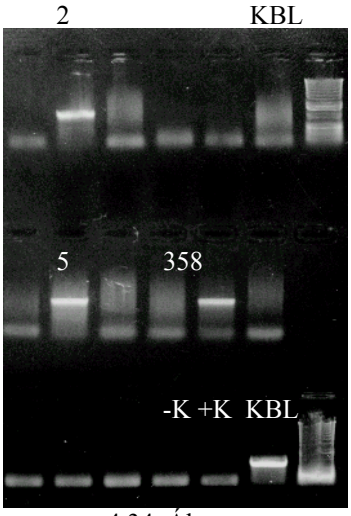
5’ primer 5’ AAGACGCTGGGTTGGTCCGATACTATT 3’
3’ primer 5’GCCTCTCAGAGTCACCACTTCCTCTCT 3’

Az alapító egyedek keresése a 4.34. ábrán látható.
Pozitív kontrollként az injektált DNS-t, negatív kontrollként a normál nyúl DNS-t használtuk. Az ábrán mindhárom alapító egyed látható, melyből az 5. számú, és a 2. számú pusztult el.

4.16.2. A transzgénikus homozigóta nyúlvonal létrehozása

A 358-as számú transzgénikus hím alapító egyedet kereszteztük nem transzgénikus nőstény állatokkal. 31 megszületett utódból 8 bizonyult transzgénikusnak.

Az F1 generáció vizsgálatát a fent leírt PCR módszerrel végeztük. Az F1 generációból továbbszaporításra a 126-os jelű nőstény, és 103-as hím utódot választottuk ki. (4.35. ábra)

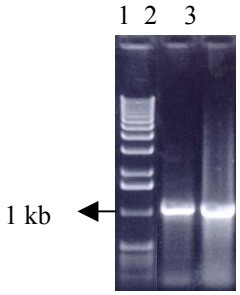


4.34. Ábra

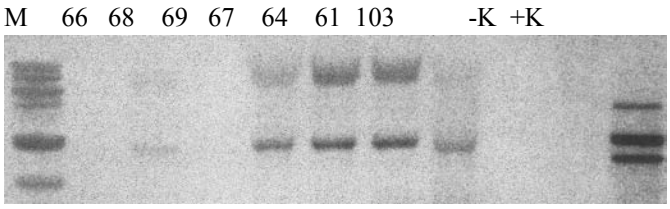
A nyolcas véralvadási faktort hordozó transzgénikus nyulak keresése. A jelölt csatornák: 2, 5, 358- a megfelelő számú alapító egyedek; -K- negatív kontroll (nem transzgénikus nyúl PCR eredménye) +K- a mikroinjektált fragment PCR képe; KBL- A Gibco cég 1kb nagyságú molekulasúly markere. A kapott DNS darab hossza a várt 1020 bp. A többi csatorna mikroinjektálást követő embrióátültetésből származó tesztelt, nem transzgénikus állatok eredményét mutatja.

A 126X103 testvér keresztezés eredményekét született utódokat Southern hibridizációval vizsgáltuk. A genomi nyúl DNS-eket BamH*I* enzimmel emésztettük. Próbaként a cDNS 7.5 kb hosszúságú Cla*I*-Sma*I* szakaszát használtuk. Negatív kontrollként nem transzgénikus nyúl DNS-t használtunk. A keresztezés eredményeként heterozigóta, nem transzgénikus és homozigóta állatoknak is születnie kell. A Southern hibridizáció Foszfor Image Analyser által készített képe a (4.36. ábrán) látható.

A legerősebb pozitív jelet adó nyulakat, -a 64-es és a 61-es- tekintettük homozigótának. Feltételezésünket visszakeresztezéssel ellenőriztük. A vonalat homozigóta formában fenntartjuk.



4.35. ábra
Az F1 generáció továbbszaporított egyedeinek PCR képe. Az 1. csatornában az 1 kb DNS marker (Gibco), a 2. csatornában a 103. számú egyed, a 3. csatornában a 126. számú egyed DNS-éből felszaporított szakasz látható.



4.36. ábra
Homozigóta teszt az F2 generációban Southern hibridizáció segítségével. A jelölt csatornák: M-molekulasúly marker; 66, 68, 69, 67, 64, 61- Az F2 generáció utódai; 103- az apaállat tesztje; -K- nem transzgénikus nyúl; +K- az injektált DNS szakasz.

4.16.3. A génkifejeződés vizsgálata

A génkifejeződés vizsgálatát fehérje szinten tanulmányoztuk. A vizsgálatok során a VIII-as faktor aktív formájának jelenlétét mutattuk ki Immunochrom FVIII: C blood Reagent kit segítségével.

A vizsgálat során a laktáció 12-16 napja között gyűjtöttünk tejmintát a laktáló 126-os számú heterozigóta állattól. A tejmintában található VIII-as faktor a hozzáadott IX-es faktor segítségével aktiválja a X-es véralvadási faktort. A reakciót kromogén szubsztrát jelenlétében sárga színreakció jelöli (p-nitroanilin), melyet 405 nm hullámhosszon lehet mérni. Negatív kontrollként természetesen nem transzgénikus állatok tejéből származó minták szolgáltak. Pozitív kontrolként tisztított VIII-as faktor koncentrációsort használtunk, melyet a kit tartalmazott.

A kitnek megfelelően a nyúltej mintákban megmértük a fehérje aktivitását. Méréseink szerint a hemizigóta humán VIII-as faktor transzgénikus nyúl 2-3 ng/ml koncentrációban termeli az aktív véralvadási faktort. Méréseink nagyságrendje megegyezik a Niemann és munkatársai által tapasztaltakkal transzgénikus birkában.

4.17. Új tudományos eredmények

A doktori dolgozatban az alábbi új tudományos eredmények születtek:

1. A nyúl kappa-kazein génnek legalább két allélja van, melyek közül a kevésbé gyakori két deléciót hordoz. Az első intronban 106 bp hosszúságú, míg a negyedik intronban 1550 bp hosszúságú hiány található.
2. A deléciók mindkét esetben érintik az intronokban található LINE szekvencia elemeket.
3. A két allél kódoló régiói csak pontmutációkban különböznek, melyek nem befolyásolják a fehérjék aminosav összetételét. A két allél által hordozott fehérje tehát megegyezik egymással.
4. A két allél esetén a kappa-kazein mRNS mennyiségekben nem mutathatók ki lényeges különbségek a laktáció során.
5. Minden vizsgált természetes nyúlpopulációban az A allél a gyakoribb.
6. A termelési tulajdonságok, és a nyúl kappa-kazein genotípusok között összefüggéseket találtunk. A választáskori alomsúly tekintetében az A allélt hordozó anyák utódai jobbnak mutatkoztak mint a B allélt hordozó anyák utódai.
7. A nyúl kappa-kazein A alléljá- a nyúl savó savas fehérje promóter által irányítva, egerek genomjába juttattuk. A rekombináns fehérje koncentrációja a transzgénikus egerek tejében elérte a 2.5 mg/ml értéket.
8. A rekombináns fehérje részt vesz a tejmicellák felépítésében.
9. A transzgénikus egerekben a micellaméret csökkenését sikerült elérni, mely a tej alvadási tulajdonságait előnyösen befolyásolja.
10. A transzgénikus anyák utódai lassabban fejlődnek, feltehetően a megnövekedett viszkozitású tej miatt.
11. Transzgénikus nyulat hoztunk létre, ugyanezzel a génkonstrukcióval, melyben RNS szinten sikerült kimutatni a transzgént. A micellaméret csökkenését ebben az egyedben nem sikerült kimutatni.
12. Hasonló módszerrel olyan transzgénikus nyulakat készítettünk, melyek a tejükben az emberi nyolcas véralvadási faktort termelik aktív formában, 3-4 ng/ml koncentrációban.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Az elmúlt évtizedben a szarvasmarha tenyésztők a tejfehérje gének polimorfizmusait a tenyésztés során tudatosan hasznosítják. különösen igaz ez a kappa-kazein génre. A bika-katalógusokban ma már feltüntetik a bikák kappa-kazein genotípusát.

Vizsgálataink során a nyúl kappa-kazein gén két alléljját jellemeztük molekulárisan. Megállapítottuk, hogy a két allél által kódolt fehérje minden tulajdonságában megegyezik, ráadásul a termelődött fehérje mennyisége sem különbözik az eltérő genotípusokban. Ennek ellenére a termelési, illetve szaporasági tulajdonságok mind a vágóállatok, mind a több generáció óta adott tulajdonságra szelektált állományokban jelentősen különböztek a két allél esetében. Ennek két oka lehet: a kappa-kazein allélok közvetlenül befolyásolják valamely gén (tejfehérje gén) működését, esetleg más gének meghatározott alléljaival kapcsoltan öröklődnek.

Akármelyik lehetőség bizonyul igaznak, a kappa-kazeint mint markert lehet hasznosítani a tudatos állattenyésztési programok során. A húsnyúl tenyésztésben célszerű a kappa-kazein A allél jelenlétét növelni a populációban. Olyan populációkban ahol elsősorban a megszületett alomszám az elsődlegesen fontos szempont (labor-állattenyésztés), célszerű a heterozigóta, illetve BB anyák jelenlétének növelése az állományban. A markerhez kötött szelekció alkalmazása a modern állattenyésztés során elkerülhetetlen.

Az általunk elkezdett vizsgálatok folytatása több generáción keresztül kívánatos lenne. A tudatosan egy tulajdonságra szelektált, beltenyésztett 1077-es és 2066-os nyúlpopuláció esetén a 29. valamint a 30. generáció jellemzése, az allélfrekvenciák megfelelő változásai további bizonyítékul szolgálna az általunk megállapított összefüggések igazolására. A két beltenyésztett populáció összekereszteződéséből származó utódok termelési tulajdonságainak vizsgálata, is megerősítő adatokkal szolgálna, jobban kizárhatóak lennének az esetleges "véletlen" hatások.

Habár a nyúl kappa-kazein alléljai csak az introni régiókban különböznek, a különbségek további vizsgálata is célszerű lenne. Az A allélban megtalálható, de a B allélból hiányzó mozgékony genetikai elem létezése érdekes evolúciós kérdéseket rejt.

Habár sikerült részletesen jellemeznünk az introni régiókat (1. és 4. intron), máig nem tudjuk, hogy a nyulak evolúciója során pontosan milyen esemény történt. Deléció avagy inszerció? A kérdés eldöntéséhez szükség lenne megvizsgálni ősi populációkat, pl. a dél-spanyolországi üregi nyulakat.

Ha a történt változások a két intronban nem egyszerre következtek be, akkor talán ezek az ősi populációk megőrizték ezt a jelleget, és találhatunk olyan egyedeket, melyekben a változás csak az egyik intront érintette.
Mivel úgy tűnik, hogy az európai állomány nagy részét egy igen szűk populációra lehet visszavezetni, a kérdés tisztázása ma már nem biztos hogy lehetséges.

A nyúl kappa-kazein génjének jellemzése után sikerült azt túltermeltetni transzgénikus egerekben. A kapott biológiai válasz egyértelmű volt. Van lehetőség a kappa-kazein túltermelésére, s ennek eredményeként a tejmicellák mérete csökken.
A csökkent tejmicellaméret kedvezően befolyásolhatja a tej feldolgozhatósági paramétereit. A kísérletek eredménye a gyakorlati állattenyésztés számára mint modellkísérlet hasznos. A tej minőségének hasonló megváltoztatása transzgénikus haszonállatokban is kivitelezhető, ennek csak a technológia ára szab határokat. Fontos következtetés, hogy a tej fizikai paramétereit csak bizonyos határok között lehet megváltoztatni. Hiába emeltük meg a kappa-kazein fehérje mennyiségét több mint száz százalékkal, az nem vett részt teljes mértékben a micellák kialakításában, egy része a savóban maradt. Eredményeink alapján az ideális túltermelés mértéke kb. 30-40%-os. Mindenképpen fontos ez a megállapítás, hiszen ha az eredményeket nagy volumenben alkalmazzuk transzgénikus haszonállatoknál, akkor ezt figyelembe kell venni.

Meglepő módon a legjobban expresszáló transzgénikus egérvonalunkban az anyák által nevelt utódok a várt hatással ellentétben lassabban fejlődtek. Kiderült hogy a megváltozott tejminőség egyben töményebb tejet is jelentett, melynek kinyerése az utódok számára gondot jelenthet. Célszerű lenne a kappa-kazeint túltermelő transzgénikus egeret keresztezni olyan transzgénikus egérrel, melynek a teje hígabb (pl. alfa-laktalbumint túltermelő egerek).

Alfa-laktalbumint túltermelő sertésekben a hígabb tej miatt az utódok fejlődése gyorsabb volt. Ezt a hatást bár kisebb mértékben megfigyelték az alfa laktalbumint hordozó transzgénikus egereknél is.
Az alfa laktalbumin és a kappa-kazeint túltermelő transzgénikus egerek esetében a két hatás kiegyenlíthetné egymást. Az utódok növekedése normális lehetne, a tejmicellák mérete pedig továbbra is kisebb mérettartományba esne, növelve ezzel a tej technológiai értékét. A probléma megoldása nemcsak gyakorlati, hanem elméleti szempontból is fontos. Lehet-e egy transzgén által okozott nem várt tulajdonságot kompenzálni egy másik transzgénnel, olyannal, mely végeredményként visszaállítja a nem várt hatást, de megtartja az eredeti, hasznos tulajdonságot?

Ezt a kísérletet mindenképpen tervezzük elvégezni francia kollaborációs partnereinkkel közösen.

Az elmúlt évtizedben derült ki, hogy a kazeinek, közöttük a kappa-kazein nem kizárólag az emlősállatok utódainak táplálásában vesznek részt. Proteolitikus hasítás eredményekén egy sor biológiai hatással rendelkező oligopeptid alakulhat ki. Ezeknek biológiai hatása igen szerteágazó lehet. A kazeinekből képződő oligopeptidek rendelkezhetnek ópioid agonista, illetve antagonista hatással, immunmoduláló szerepük lehet, valamint a vérlemezkék összekapcsolódását is gátolhatják a véralavadás során. Kappa kazeinből antibiotikus hatású peptideket is izoláltak, és jellemeztek. Mivel a biológiailag aktív peptidek felhasználása a gyógyászatban, az élelmiszeriparban egyre inkább előtérbe kerül, ezért a fent említett peptidek jellemzése, pontos hatásuk tisztázása különböző állatfajokban hasznos lehet. Adatok ezen a területen egyenlőre csak szarvasmarhából és emberből ismertek [*Bősze és mtsai* 1998].

Az általunk előállított nyúl kappa-kazeint túltermelő egér, esetleg nyúl felhasználható alapkutatási vizsgálatokra, melynek során a túltermelt fehérjéből származó peptid biológiai hatásait részletesebben lehet vizsgálni összehasonlítva nem transzgénikus állatokkal.

Azok a fehérjeszakaszok, melyek tartalmazzák az adott peptidszekvenciát, általában elég konzervatívak az egyes állatfajok között. A petidek között nagyon gyakoriak az átfedések.

```
szarvasmarha      ..dkiakYIPIQYVLSRYPSYGlnyy..
nyúl              ..qvtapYIPVHYVMNRYPQYEpsyy..
egér              ..eqrvlYTPVRSVLNFN.QYEpnyy..
```

Nagybetűvel jelöltem a szarvasmarhában jellemzett, nyúlban és egérben lehetséges biológiai hatású peptideket. Vastag betű jelöli a szarvasmarha Casoxin-C peptidet, valamint egér és nyúl megfelelőjét. Aláhúzással jelöltem a Casoxin-6 petidet és megfelelőit. Ezek a petidek opioid antagónistaként ismertek [*Chiba és mtsai* 1989].
Dőlt betűvel szedtem a szarvasmarhában jellemzett immuno-dipeptidet, mely *in vitro* körülmények között a limfocita érést serkenti [*Kayser és mtsai* 1996].

Érdekes az összehasonlítása a szarvasmarha casoplatelin, valamint megfelelő egér és nyúl szekvenciáknak. Látható hogy a szarvasmarhában jellemzett peptid nyúlban nagyon hasonló, míg egérben ez a szekvencia motívum kevésbé konzervált. Ez természetesen nem jelenti azt hogy nem lehet biológiai hatása.

A casoplatelin a vérlemezkék összekapcsolódását, valamint a fibrinogén γ láncának receptorhoz kötődését gátolja [*Jollés és mtsai* 1986].
Az összehasonlítás tartalmazza a γ-fibrinogén jellegzetes részét is. Érdemes megfigyelni, hogy az egér kivételével minden esetben három aminosav helye erősen konzervált. Ezeket vastag betűvel jelöltem.

Szarvasmarha	sfMA**I**PPK**K**NQ**D**Ktei
nyúl	ffMA**I**LPN**K**MQ**D**Kavt
egér	sfLAMPTNENQ**D**Ntai
γ-fibrinogén	qqHH**I**GGA**K**QAG**D**v

A fenti szekvenciaelemzések is mutatják, hogy a nyúl kappa-kazein eredetű biológiai hatással rendelkező peptidek vizsgálata akár önmagában, akár transzgénikus állatok felhasználásának segítségével eredeti, és új eredményeket rejthet magában.

Nyúl kappa-kazeint hordozó transzgénikus nyulunkban a fehérje esetleges túltermelődése nem eredményezett változásokat a micellák méretében. A várt eredmények eléréséhez több transzgénikus vonal előállítása és vizsgálata volna kívánatos. Előfordulhat, hogy azonos transzgén homológ rendszerben (mi esetünkben nyúl struktúrgén, nyúl promóterrel, nyúlban) kevésbé hatásos mint heterológ rendszerben (nyúl gén egérben).
A nyúl WAP-kappa-kazeint hordozó nyúl azonban biztosította a lehetőséget arra, hogy eredményeinket felhasználhassuk gyógyhatású fehérjék termelésére. A VIII-as véralvadási faktort aktív formában kis mennyiségben termelő nyúl az első próbálkozásunk ezen a téren. Ez a transzgénikus állat is bizonyítja azt, hogy a cDNS konstrukciót hordozó emlőspecifikus transzgénikus állatok általában alacsony expressziós szintet mutatnak. A jövőben érdemes lenne megpróbálni a transzgén "mentését", azaz olyan szekvenciaelemek beépítését, esetleg koinjektálását célozni meg, melyek az adott gént kifejeződését megemelik. Leghatékonyabb talán a YAC transzgénikus állatok létrehozása jelenthetné ebben az esetben, hiszen ezáltal a teljes 186 kb hosszúságú struktúrgén beépíthető és megfelelő kifejeződésre bírható.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A tejfehérje genetikai kutatások az elmúlt évtizedben nagy ütemben gyorsultak fel. Csoportunk a házinyúlban részint mint modellállatban, részben mint haszonállatban folytat genetikai kísérleteket. A nyúl kappa-kazein gén klónozását, jellemzését, csoportunk kezdte el 1992-ben. Célként nemcsak a részletes jellemzést tűztük ki, hanem a fehérje túltermelésének hatását transzgénikus állatokban. A kísérletek erdményei nemcsak alapkutatási, hanem alkalmazott állattenyésztési szempontból is jelentősek.

A nyúl kappa-kazein gén két allélel rendelkezik. A gyakoribb változat (A allél) klónozása és jellemzése 1996-ban történt meg. Munkám során a ritkább B allél molekuláris jellemzését végeztem el. Megállapítottuk, hogy az A allélban található, és az ún LINE (hosszú beékelődő, ismétlődő elem) szekvenciaelemmel nagyfokú hasonlóságot mutató DNS szakasz a B allélban megváltozott. Az A allél az első intronban hordoz egy fordított LINE elem darabot, valamint a negyedik intronban szintén egy LINE elemet. A B allél ezzel szemben hordoz egy 100 bp hosszúságú deléciót az első intronban, és egy 1550 bp hosszú deléciót a negyedik intronban. Mindkét változás érinti a fent leírt LINE szakaszt. Az első intronban található változás érinti a LINE elem 5' végét és az ott található Poly(T) szekvenciát. A negyedik intronban pedig a teljes LINE elem hiányzik. Így a B allél csak egy sérült részt hordoz az első intronban. Feltételezésünk szerint az A allél az ősibb variáns, de 55 nyúl vizsgálata során nem sikerült olyan egyedeket találnunk, melyben csak az egyik mutáció fordul elő.

A kódoló régiók összehasonlítása esetén két pontmutációt azonosítottunk, mely nem érint fehérjeváltozást, valamint 3 pontmutációt találtunk a 3' nem transzlálódó régióban is.

A két allélra homozigóta nyulak esetén (A/A, B/B) a laktáció során a kappa-kazein mRNS felhalmozódásában különbséget nem figyeltünk meg.

Az allélgyakorisági vizsgálatok minden európai populációban az A allélt mutatták gyakoribbnak.

A termelési tulajdonságok és a nyúl kappa-kazein allélváltozatok kölcsönhatását új zélandi fehér fajtában tanulmányoztuk. Az élve született alomszám a heterozigóták esetében volt a legkedvezőbb, míg a választáskori alomsúly vizsgálata az A allél fölényét mutatta. A húsnyúl termelő populációkban ezért a B allél arányának csökkentése kívánatos cél.

Az allélok jellemzése után, az általunk kedvezőbbnek ítélt kappa-kazein A allél túltermelését tűztük ki célként transzgénikus egerekben. A használt génkonstrukcióban a nyúl savó-savas fehérje promóterét kapcsoltuk a nyúl kappa-kazein struktúrgénhez.

Négy alapító egyedet hoztunk létre, melyek közül a gént legjobban kifejező állatban 2.5 mg/ml kappa-kazein koncentrációt mértünk a tejben. Az idegen fehérje részt vett a micellák kialakításában. A mérések szerint az említett transzgénikus egérvonalban a micellaméret 35%-os csökkenését igazoltuk. A rekombináns fehérjét legnagyobb mennyiségben termelő vonalban a tejsavó is tartalmazott kappa-kazeint. A rekombináns fehérjétől eltekintve a laktáló transzgénikus egerekben a tejösszetétel nem változott lényegesen. A transzgénikus állatok emlőszövetének felépítése normális volt. Meglepő módon a transzgénikus anyák által nevelt utódok minden esetben csökkent súlygyarapodást mutattak. A változás oka a tej megnövekedett viszkozitására vezethető vissza.

Ugyanezt a génkonstrukciót felhasználva transzgénikus nyulat is létrehoztunk. A transzgén megjelenését RNS szinten mutattuk ki. A transzgénikus állat tejében a tejmicellák mérete nem változott meg.

Felhasználva tapasztalatainkat olyan transzgénikus nyulat is alkottunk, mely a tejében gyógyhatású fehérjét termel.

A hemofília-A betegségben szenvedők nem képesek aktív nyolcas véralvadási faktor termelésére. A beteg számára, csak a tisztított, koncentrált vérplazma, illetve emberi sejtkultúrában termelt gyógyhatású fehérje jelent megoldást. Ezeknek a kezeléseknek az anyagi vonzata igen jelentős. A probléma megoldására transzgénikus állatok által termelt fehérje lenne a legalkalmasabb. Csoportunk olyan transzgénikus nyulat hozott létre, mely a tejben termeli az emberi nyolcas véralvadási faktort. A konstrukcióban az egér savó savas fehérje által irányított cDNS kópia van jelen. A transzgénikus állat a transzgént mendeli úton örökítette, és a hemizigóta utódgenerációban a fehérje aktív formáját 3-4 ng/ml koncentrációban termelte.

SUMMARY

The isolation and description of the rabbit kappa-casein gene was evaluated by our research group in 1996. It had been shown that at least two allels of the gene exist. The most frequent allele is the A allele. I pointed to the fact that the kappa-casein gene possesses two sequences similar to those found in the 5' end of long interspersed repeated elements (LINE). Part of an inverted rabbit LINE is present in the first intron and part of a direct rabbit LINE in the fourth intron. We describe herewith a less frequent allele (B allele) that lacks both 100bp in the first intron and 1550bp in the fourth intron. It was not possible to identify any allele exhibiting only one of the deletions in a population of 55 rabbits. The 100bp present in the first intron of the A allele, but absent from the B allele, are located at the 5' end of the inverse complementary LINE and include the poly (T) track of the LINE. The 1550bp present in the fourth intron of the A allele, but absent from the B allele, include the entire direct LINE sequence. Therefore, the B allele only possesses one partial LINE sequence that is located in the first intron and is truncated when compared to the copy found in the first intron of the A allele. The B allele might thus be more recent than the A allele.

Differences between the sequences of transcripts corresponding to each allele are limited to two silent mutations and three modifications in the 3' UTR. In the mammary glands of lactating rabbits, which are homozygous for both alleles, kappa-Cas mRNA accumulates to similar levels and translated into identical kappa-Cas that secreted at similar concentrations into milk. The A allele was found to be more frequent in different European breeds.

Correlation of the kappa-casein genotype with the breeding capacity in a New Zealand White rabbit stock has been also examined. Doe genotype at kappa-casein locus affects litter size born alive, AB heterozygotes had the highest litter sizes. The doe weight at kindling was found to be the highest in the kappa-Cas heterozygotes too. Litter weight at 21 days age and the milk index were the highest at the AA does and the lowest at the BB ones. In the NZW stock under consideration selection of the breeding animals is based upon the milk index. As a consequence of that, lower number of females with BB genotype could be selected for breeding.

Transgenic mice were produced carrying the coding region of the rabbit kappa-casein gene linked to the upstream region of the rabbit whey acidic protein gene. Mice from the highest-expressing line produced 2,5 mg/ml rabbit kappa-casein in their milk. The foreign protein was associated with the casein micelles and altered micelle size. The native micelle size was reduced by 35%.

Though in the high expressing line rabbit kappa-casein also segregated into the whey fraction obtained after centrifuging the milk samples. Milk from transgenic mice had the same overall protein content as that from non-transgenic mice, exept for the transgenic product. However, litters fed with this transgenic mouse milk grew less well than litters given milk from non-transgenic mice. This reduction in growth was not related to changes in mammary gland structure or mammary cell morphology. Results indicated that milk from the ransgenic mice had a higher viscosity.

Transgenic rabbit was produced bearing the same Wap-kappa konstruct. The expression of the transgene was evaluated at the RNA level. Micelle size analysis showed no alteration in the transgenic founder.

Using the same technique we produced transgenic rabbits producing pharmaceutical protein in their milk.

Congenital X-linked deficiency or abnormality of coagulation factor VIII (FVIII) causes a bleeding disorder called haemophilia A. Treatment of patients suffering haemophilia A involves administration of human FVIII concentrates purified from human plasma, or recombinant protein prepared from mammalian cell culture. The cost of these products is the major limiting factor in haemophilia therapy. An alternative approach to this problem is to use transgenic animals expressing recombinant protein in the mammary gland.

Here we describe the generation of a line of transgenic rabbits bearing a gene construct with the human blood clotting factor VIII cDNA plus introns of the murine metallothionein gene under the control of the mammary gland specific murine whey acidic protein promoter. The founder male was fertile and transmitted the transgene to its progeny. In the hemizigous F1 transgenic rabbit the hVIII clotting activity estimated about 3-4 ng/ml was detected in defatted milk.

7. MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

1. Akers, R.M., Bauman, D.E., Goodman, G.T., Capuco, A.V., Tucker, H.A. (1981) Prolactin regulation of cytological differentiation of mammary epithelial cells in periparturient cows. *Endocrinology*, 109, 31-40.
2. Aaltonen, M.L. és Antila, V. (1987). Milk renneting properties and the genetic variants of proteins. *Milchwissenschaft*, 42, 490-492.
3. Aleandri, R., Nardone, A. és Russo, V. (1986). Milk yield for the cheesemaking process: Quantitative trait loci and selection strategies. *III. World Congress on Genetics*, Applied to Livestock Production, Lincoln, Nebraska, USA, 64-69.
4. Aleandri, R., Schneider, J.C. és Buttazzoni, L.G. (1990). The effect of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability. *J. Dairy Sci.*, 73, 341-255.
5. Alexander, L.J. Beattie, C.W. (1992) The sequence of porcine alpha s1-casein cDNA: evidence for protein variants generated by altered RNA splicing. *Anim Genet*, 23, 283-8.
6. Alexander, L.J. Beattie, C.W. (1992) The sequence of porcine beta-casein cDNA. *Anim Genet*, 23, 369-71.
7. Alexander, L.J., Stewart, A.F., Mackinlay, A.G., Kapelinskaya, T.V., Tkach, T.M. és Gorodetsky, S.I. (1988). Isolation and characterization of the bovine kappa-casein gene. *Eur. J. Biochem.*, 178, 395-401.
8. Amundadottir, L.T., Merlino, G., Dickson, R.B. (1996) Transgenic mouse models of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 39, 119-35.
9. Arbeit, J.M. Hirose, R. (1999) Murine mentors: transgenic and knockout models of surgical disease. *Ann Surg*, 229, 21-40.
10. Armstrong, C.E., Mackinlay, A.G., Hill, R.J., Wake, R.G. (1967). The action of rennin on kappa-casein: the heterogenity and origin of the soluble product. *Biochim. Biophys Acta* 140, 123-31.
11. Aschaffenburg, R. (1961). Inherited casein variants in cow's milk. *Nature*, 192, 431-432.
12. Aschaffenburg, R. (1966). Modified procedure of starch gel electrophoresis for β-casein phenotyping. *J. Dairy Sci.*, 49, 1284-1285.
13. Aschaffenburg, R. (1968). Genetic variants of milk proteins: their breed distribution. *J. Dairy Res.*, 35, 447-460.
14. Baranyi, M. (2000). Tejfehérje genetikai vizsgálatok hazai szarvasmarha fajtákban *Doktori értekezés* 14-18.
15. Baranyi, M., Aszodi, A., Devinoy, E., Fontaine, M.L., Houdebine, L.M., Bosze, Z. (1996) Structure of the rabbit kappa-casein encoding gene: expression of the cloned gene in the mammary gland of transgenic mice. *Gene*, 174, 27-34.
16. Baranyi, M., Bősze, Zs., Buchberger, J. és Krause, I. (1996). Genetic polymorphism of milk proteins in Hungarian cattle. *Arch. Tierz., Dummerstorf*, 39, 489-496.
17. Baranyi, M., Brignon, G., Anglade, P., Ribadeau-Dumas, B. (1995) New data on the proteins of rabbit (Oryctolagus cuniculus) milk. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 111, 407-15.
18. Bawden, W.S., Passey, R.J., Mackinlay, A.G. (1994) The genes encoding the major milk-specific proteins and their use in transgenic studies and protein engineering. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 12, 89-137.
19. Beeby, R. (1976) A comparison between the amino acid compositions of 2 chymosin- sensitive polypeptides and C-terminal segments of kappa-casein. *J Dairy Res*, 43, 37-43.
20. Birnboim, H.C. Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7, 1513-23.

21. Bischoff, R., Degryse, E., Perraud, F., Dalemans, W., Ali-Hadji, D., Thepot, D., Devinoy, E., Houdebine, L.M., Pavirani, A. (1992) A 17.6 kbp region located upstream of the rabbit WAP gene directs high level expression of a functional human protein variant in transgenic mouse milk. *FEBS Lett*, 305, 265-8.
22. Blachier, F., Lacroix, M.C., Ahmed-Ali, M., léger, C., Ollivier-Bousquet, M. (1982) Arachidonic acid metabolism and casein secretion in lactating rabbit mammary epithelial cells: effects of inhibitors of prostaglandins and leukotrienes synthesis. *Prostaglandins* 35, 259-276.
23. Blatchford, D.R. Peaker, M. (1982) Effects of frequent milking on milk secretion during lactation in the goat: relation to factors which limit the rate of secretion. *Q J Exp Physiol*, 67, 303-10.
24. Bleck, G.T., Jimenez-Flores, R., Bremel, R.D., (1995). Abnormal properties of milk from transgenic mice expressing bovine beta-casein under control of the bovine alpha-lactalbumin 5' flanking region. *Inter. Dairy. J.* 5, 619-32
25. Bonsing, J. és Mackinlay, A.G. (1987). Recent studies on nucleotide sequences encoding the caseins. *J. Dairy Res.*, 54, 447-461.
26. Bonsing, J., Ring, J.M., Stewart, A.F., Mackinlay, A.G. (1988) Complete nucleotide sequence of the bovine beta-casein gene. *Aust J Biol Sci*, 41, 527-37.
27. Bosze, Z., Devinoy, E., Puissant, C., Fontaine, M.L., Houdebine, L.M. (1993) Characterization of rabbit kappa-casein cDNA: control of kappa-casein gene expression in vivo and in vitro. *J Mol Endocrinol*, 11, 9-17.
28. Bosze, Z., Hiripi, L., Virag, G., Toth, S., Makovic, F., Fontaine, M.L., Devinoy, E. (2000) Polymorphism of the rabbit kappa casein gene and its influence on performance traits. *Pflugers Arch*, 439, R2-3.
29. Bousquet, M., Flechon, J.E., Denamur, R. (1969) [Ultrastructural aspects of the rabbit mammary gland during lactogenesis]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 96, 418-36.
30. Bősze, Zs. (2000). Transzgenikus gazdasági állatok. *Magyar Tudomány* 5, 555-566.
31. Bősze, Zs., Baranyi, M., Hiripi, L., Barta, E., Fontaine, M.L., Devinoy, E. (1998). Altering milk composition through transgenesis: A new approach for producing biologically active proteins. In:*Peptides,* Akadémiai Kiadó, Budapest p128-129.
32. Brackett, B.G., Baranska, W., Sawicki, W., Koprowski, H. (1971) Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68, 353-7.
33. Brem, G., Besenfelder, U., Aigner, B., Muller, M., Liebl, I., Schutz, G., Montoliu, L. (1996) YAC transgenesis in farm animals: rescue of albinism in rabbits. *Mol Reprod Dev*, 44, 56-62.
34. Brem, G., Besenfelder, U., Castro, F.O., Muller, M. (1998). Mammary gland Transgenesis. In:*Therapeutic Protein Production,* Springer, Berlin 107-142.
35. Bremel, R.D. (1995). α-Lactalbumin regulation and its role in lactation. In: *Intracellular Signalling in the Mammary Gland*. Szerk.: Wilde, C.J. és mtsi., Plenum Press, New York. p. 121-129.
36. Bremel, R.D. (1996). Potential role of transgenesis in diary production and related areas. *Theriogenology*, 45, 51-56.
37. Brignon, G., Chtourou, A., Ribadeau-Dumas, B. (1985) Preparation and amino acid sequence of human kappa-casein. *FEBS Lett*, 188, 48-54.
38. Brignon, G., Mahe, M.F., Ribadeau-Dumas, B., Mercier, J.C., Grosclaude, F. (1990) Two of the three genetic variants of goat alpha s1-casein which are synthesized at a reduced level have an internal deletion possibly due to altered RNA splicing. *Eur J Biochem*, 193, 237-41.
39. Brinster, R.L., Allen, J.M., Behringer, R.R., Gelinas, R.E., Palmiter, R.D. (1988) Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 836-40.
40. Brinster, R.L., Chen, H.Y., Trumbauer, M., Senear, A.W., Warren, R., Palmiter, R.D. (1981) Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell*, 27, 223-31.

41. Brodbeck, U., Denton, W.L., Tanahashi, N. és Ebner, K.E. (1967). The isolation and identification of the B protein of lactose synthetase as alpha-lactalbumin. *J. Biol. Chem.*, 242, 1391-1397.
42. Brooks, C.L. (1989) Two physiological substrate-specific casein kinases are present in the bovine mammary gland. *FEBS Lett*, 243, 385-8.
43. Buchberger, J., Graml, R. és Klostermeyer, H. (1986*c*). Einfluss der Rassen Fleckvieh und Pinzgauer, der Krezungen Fleckvieh x Pinzgauer und Fleckvieh x Red Holstein sowie pleiotrope Wirkungen von Milchproteingenotypen suf Milchleistungseigenschaften. *Bayr. Landwirtsch. Jahrbuch*, 63, 817-831.
44. Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M., Weissmann, C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, 73, 1339-47.
45. Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M., Weissmann, C. (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell- surface PrP protein. *Nature*, 356, 577-82.
46. Burdon, T.G., Maitland, K.A., Clark, A.J., Wallace, R., Watson, C.J. (1994) Regulation of the sheep beta-lactoglobulin gene by lactogenic hormones is mediated by a transcription factor that binds an interferon-gamma activation site-related element. *Mol Endocrinol*, 8, 1528-36.
47. Burgoyne, R.D. Geisow, M.J. (1989) The annexin family of calcium-binding proteins. Review article. *Cell Calcium*, 10, 1-10.
48. Burgoyne, R.D., Handel, S.E., Sudlow, a.W., turner, M.D., Kumar, S., Simons, J.P., Blatchford, D.R., Wilde, C.J. (1995). The secretory pathway for milk protein secretion and its regulation. *In Intercellular signalling in the mammary gland szerk* Wilde C.J. Plenum Press New-York 253-263.
49. Cantor, G.H., McElwain, T.F., Birkebak, T.A., Palmer, G.H. (1993) Ribozyme cleaves rex/tax mRNA and inhibits bovine leukemia virus expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 10932-6.
50. Carroll, R.J., Farrell, H.M. (1983) Immunological approach to location of kappa-casein in the casein micelle by electron microscopy. *J. Dairy Sci.* 66, 679-86.
51. Castagnetti, G.B., Bagni, A., Chiavari, C., Ferri, G., Losi, G. és Mariani, P. (1994). Chemical composition and coagulation properties of milk from Reggia breed dairy cows with different casein β- and κ-genotypes. In *Cheese yield and factors affecting its control*, Int. Dairy Federation, Brüssel, 151-159.
52. Castilla, J., Pintado, B., Sola, I., Sanchez-Morgado, J.M., Enjuanes, L. (1998) Engineering passive immunity in transgenic mice secreting virus- neutralizing antibodies in milk. *Nat Biotechnol*, 16, 349-54.
53. Castro, F.O., Limonta, J., Rodriguez, A., Aguirre, A., de la Fuente, J., Aguilar, A., Ramos, B., Hayes, O. (1999) Transgenic rabbits for the production of biologically-active recombinant proteins in the milk. *Genet Anal*, 15, 179-87.
54. Chakravarti, D., LaMorte, V.J., Nelson, M.C., Nakajima, T., Schulman, I.G., Juguilon, H., Montminy, M., Evans, R.M. (1996) Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature*, 383, 99-103.
55. Chan, A.W., Homan, E.J., Ballou, L.U., Burns, J.C., Bremel, R.D. (1998) Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 14028-33.
56. Chen, X.Z., Yun, J.S., Wagner, T.E. (1988) Enhanced viral resistance in transgenic mice expressing the human beta 1 interferon. *J Virol*, 62, 3883-7.
57. Cheng, J.F., Printz, R., Callaghan, T., Shuey, D., Hardison, R.C. (1984) The rabbit C family of short, interspersed repeats. Nucleotide sequence determination and transcriptional analysis. *J Mol Biol*, 176, 1-20.
58. Chiba, H., Tani, F., Yoshikawa, M. (1989) Opioid antagonist peptides derived from kappa-casein. *J Dairy Res*, 56, 363-6.
59. Chiocchetti, A., Tolosano, E., Hirsch, E., Silengo, L., Altruda, F. (1997) Green fluorescent protein as a reporter of gene expression in transgenic mice. *Biochim Biophys Acta*, 1352, 193-202.
60. Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., Rutter, W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* , 18, 5294-9.

61. Church, G.M. Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 1991-5.
62. Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F.A., Robl, J.M. (1998) Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 280, 1256-8.
63. Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F.A., Robl, J.M. (1998) Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat Biotechnol*, 16, 642-6.
64. Clark, A.J. (1996) Genetic modification of milk proteins. *Am J Clin Nutr*, 63, 633S-8S.
65. Clark, A.J. (1998) The mammary gland as a bioreactor: expression, processing, and production of recombinant proteins. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 3, 337-50.
66. Clark, A.J., Cowper, A., Wallace, R., Wright, G., Simons, J.P. (1992) Rescuing transgene expression by co-integration. *Biotechnology (N Y)*, 10, 1450-4.
67. Clarke, R.A., Sokol, D., Rigby, N., Ward, K., Murray, J.D., Mackinlay, A.G. (1994). Mammary gland specific expression of bovine alpha-s1-casein-derived transgenes in mice. *Transgenics* 1, 313-19.
68. Clements, J.E., Wall, R.J., Narayan, O., hauer, D., Sheffer, D., Powell, A.M., Zink, M.C., Rexroad, C.E. (1994). Transgenic sheep that express the visna virus envelope gene. *Theriogenology,* 41, 180
69. Clermont, Y., Xia, L., Rambourg, A., Turner, J.D., Hermo, L. (1993) Transport of casein submicelles and formation of secretion granules in the Golgi apparatus of epithelial cells of the lactating mammary gland of the rat. *Anat Rec*, 235, 363-73.
70. Co, D.O., Borowski, A.H., Leung, J.D., van der Kaa, J., Hengst, S., Platenburg, G.J., Pieper, F.R., Perez, C.F., Jirik, F.R., Drayer, J.I. (2000) Generation of transgenic mice and germline transmission of a mammalian artificial chromosome introduced into embryos by pronuclear microinjection. *Chromosome Res*, 8, 183-91.
71. Coll, A., Folch, J.M., Sanchez, A. (1995) Structural features of the 5' flanking region of the caprine kappa- casein gene. *J Dairy Sci*, 78, 973-7.
72. Colman A., Wright, G., Sawyer, L., Rigden, D.J. (1995) Modified alpha-lactalbumin. Pharmaceutical Proteins Ltd. Assignee. WO 95/02692
73. Cozzi, E., Masroor, S., Soin, B., Vial, C., White, D.J. (2000) Progress in xenotransplantation. *Clin Nephrol*, 53, 13-8.
74. Crabtree, G.R., Comeau, C.M., Fowlkes, D.M., Fornace, A.J. Jr, Malley, J.D., Kant, J.A. (1985) Evolution and structure of the fibrinogen genes. Random insertion of introns or selective loss? *J Mol Biol*, 185, 1-19.
75. Creamer, L.K., Plowman, J.E., Liddell, M.J., Smith, M.H., Hill, J.P. (1998) Micelle stability: kappa-casein structure and function. *J Dairy Sci*, 81, 3004-12.
76. Creamer, L.K., Wheelock, J.V., Samuel, D. (1973) The distribution of glyco-kappa-casein and carbohydrate-free kappa- casein between large and small bovine casein micelles, and its implication in micelle structure. *Biochim Biophys Acta*, 317, 202-6.
77. Cronin, M.A., Renecker, L., Pierson, B.J., Patton, J.C. (1995) Genetic variation in domestic reindeer and wild caribou in Alaska. *Anim Genet*, 26, 427-34.
78. Dalgleish, D.G., Horne, D.S., Law, A.J.R., (1989). Size related differences in bovine caseine micelles. *Biochim. Biophys. Acta* 991, 383-87.
79. Dalgleish, D.G. (1979). Proteolysis and aggregation of casein micelles treated with immobilized or soluble chymosin. *J. Dairy Res.* 46, 643-61.
80. Dalgleish, D.G. (1984). Measurement of electrophoretic mobilities and zeta-potentials of particles from milk using Doppler electrophoresis. *J. Dairy Res.* 53, 425-38.
81. Dalgleish, D.G. (1985) Glycosylated kappa-caseins and the sizes of bovine casein micelles. Analysis of the different forms of kappa-casein. *Biochim Biophys Acta*, 830, 213-5.

82. Dalgleish, D.G.,Law, A.J.R. (1989). pH induced changes of bovine casein micelles. II. Dissociation of calcium and phosphate. *J.Dairy Res.* 56, 727-35.
83. Damak, S., Jay, N.P., Barrell, G.K., Bullock, D.W. (1996) Targeting gene expression to the wool follicle in transgenic sheep. *Biotechnology (N Y)*, 14, 181-4.
84. Damak, S., Su, H., Jay, N.P., Bullock, D.W. (1996) Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin-like growth factor 1. *Biotechnology (N Y)*, 14, 185-8.
85. Dankort, D.L. Muller, W.J. (1996) Transgenic models of breast cancer metastasis. *Cancer Treat Res*, 83, 71-88.
86. Dankort, D.L. Muller, W.J. (2000) Signal transduction in mammary tumorigenesis: a transgenic perspective. *Oncogene*, 19, 1038-44.
87. Darnell, J.E. Jr (1997) STATs and gene regulation. *Science*, 277, 1630-5.
88. Delacroix-Buchet, A., Lefier, D. és Nuyts-Petit, V. (1993). Polymorphisme de la caséine κ de trois races bovines francaises et aptitude a la coagulation. *Lait*, 73, 61-72.
89. Delfour, A., Jolles, J., alais, C., Jolles, P. (1965) Caseino-glycopeptides. Characterization of a methionine residue and of the N-terminal sequence. Biochem. *Biophys. Res. Commun. 19*, 452-5.
90. Denamur, R., Gaye, P., Houdebine, L., Bousquet, M., Delouis, C. (1972) Influence of hypophysectomy during lactation on nucleic acids, ribosomes, and ultrastructure of the mammary gland of the ewe. *Gen Comp Endocrinol*, 18, 534-44.
91. DeShazer, D., Wood, G.E. és Friedman, R.L. (1994). Klenow co-sequencing: a method for eliminating "stops". *BioTechniques*, 17, 286-287.
92. DeShazer, D., Wood, G.E., Friedman, R.L. (1994) Boiling eliminates artifact banding when sequencing double-stranded templates. *Biotechniques*, 17, 288, 290.
93. Devinoy E., Rat P., Baranyi, M., Hiripi, L., Fontaine, M.L., Hamer, I., Bősze, Zs. (1999). Polymorphisme de gene de la caséine-β dans une souche de lapins d' origine raciale Néo-Zélandais.8émes Journ. Rech. Cunicole Fr., 139-142.
94. Devinoy, E., Schaerer, E., Jolivet, G., Fontaine, M.L., Kraehenbuhl, J.P., Houdebine, L.M. (1988) Sequence of the rabbit alpha S1-casein cDNA. *Nucleic Acids Res*, 16, 11813.
95. Devinoy, E., Schaerer, E., Jolivet, G., Fontaine, M.L., Kraehenbuhl, J.P., Houdebine, L.M. (1988) Sequence of the rabbit alpha S1-casein cDNA. *Nucleic Acids Res*, 16, 11813.
96. Devinoy, E., Stinnakre, M.G., Lavialle, F., Thepot, D., Ollivier-Bousquet, M. (1995) Intracellular routing and release of caseins and growth hormone produced into milk from transgenic mice. *Exp Cell Res*, 221, 272-80.
97. Devinoy, E., Thepot, D., Stinnakre, M.G., Fontaine, M.L., Grabowski, H., Puissant, C., Pavirani, A., Houdebine, L.M. (1994) High level production of human growth hormone in the milk of transgenic mice: the upstream region of the rabbit whey acidic protein (WAP) gene targets transgene expression to the mammary gland. *Transgenic Res*, 3, 79-89.
98. Dewan, R.K., Bloomfield, V.A., Chudgar, A., Morr, C.V. (1973) Viscosity and voluminosity of bovine milk casein micelles. *J Dairy Sci*, 56, 699-705.
99. Dickson, I.R. Perkins, D.J. (1971) Studies on the interactions between purified bovine caseins and alkaline-earth-metal ions. *Biochem J*, 124, 235-40.
100. DiLuccia, A., Maurielo, R., Chianese, L., Moio, L., Addeo, F., (1990). Kappa-casein polimorphism in caprine milk. *Sci. Tec. Laittiero-caesaria* 41, 305-314.
101. Donnelly, W.J., McNeill, G.P., Buchheim, W., McGann, T.C. (1984) A comprehensive study of the relationship between size and protein composition in natural bovine casein micelles. *Biochim Biophys Acta*, 789, 136-43.
102. Doppler, W., Geymayer, S., Weirich, H.G. (2000) Synergistic and antagonistic interactions of transcription factors in the regulation of milk protein gene expression. Mechanisms of cross- talk between signalling pathways. *Adv Exp Med Biol*, 480, 139-46.

103. Doppler, W., Welte, T., Philipp, S. (1995) CCAAT/enhancer-binding protein isoforms beta and delta are expressed in mammary epithelial cells and bind to multiple sites in the beta-casein gene promoter. *J Biol Chem*, 270, 17962-9.
104. Dove, A. (2000) Milking the genome for profit. *Nat Biotechnol*, 18, 1045-8.
105. Dyck, M.K., Gagne, D., Ouellet, M., Senechal, J.F., Belanger, E., Lacroix, D., Sirard, M.A., Pothier, F. (1999) Seminal vesicle production and secretion of growth hormone into seminal fluid. *Nat Biotechnol*, 17, 1087-90.
106. Edlund, A., Johansson, T., Leidvik, B., Hansson, L. (1996) Structure of the human kappa-casein gene. *Gene*, 174, 65-9.
107. Edwards, G.M., Wilford, F.H., Liu, X., Hennighausen, L., Djiane, J., Streuli, C.H. (1998) Regulation of mammary differentiation by extracellular matrix involves protein-tyrosine phosphatases. *J Biol Chem*, 273, 9495-500.
108. Eenennaam, A.L. van és Medrano, J.F. (1991*a*). Differences in allelic protein expression in the milk of heterozygous κ-casein cows. *J. Dairy Sci.*, 74, 1491-1496.
109. Eigel, W.N., Butler, J.E., Ernstrom, C.A., Farrell, H.M. Jr., Har walker, V.R., Jenness, R, és Whitney, R.M. (1984). Nomenclature of proteins of cow`s milk: fifth edition. *J. Dairy Sci.*, 67, 1599-1631.
110. El-Negoumy, A.M. (1974). Effect of polymorphism on casein stability in salt solutions of varying complexity before and after mixing. *J. Dairy Sci.*, 57, 1170-1176.
111. Evans, M.J. Kaufman, M.H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-6.
112. Falconer, D.S. (1990). In: *Introductionto Quantitative Genetics.* Longman Scientific Technical, New-York p45.
113. Feinberg, A.P. Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, 132, 6-13.
114. Ferretti, L., Leone, P., Sgaramella, V. (1990) Long range restriction analysis of the bovine casein genes. *Nucleic Acids Res*, 18, 6829-33.
115. Fiat, A.M., Jolles, J., Aubert, J.P., Loucheux-Lefebvre, M.H., Jolles, P. (1980) Localisation and importance of the sugar part of human casein. *Eur J Biochem*, 111, 333-9.
116. Foltmann, B. (1987). General and molecular aspects of rennets. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* Szerk: Fox, P.F. Elsevier applied science London, 33-61.
117. Franke, W.W., Luder, M.R., Kartenbeck, J., Zerban, H., Keenan, T.W. (1976) Involvement of vesicle coat material in casein secretion and surface regeneration. *J Cell Biol*, 69, 173-95.
118. French, A.J., Greenstein, J.L., Loveland, B.E., Mountford, P.S. (1998) Current and future prospects for xenotransplantation. *Reprod Fertil Dev*, 10, 683-96.
119. Fujiwara, Y., Miwa, M., Takahashi, R., Hirabayashi, M., Suzuki, T., Ueda, M. (1997) Position-independent and high-level expression of human alpha- lactalbumin in the milk of transgenic rats carrying a 210-kb YAC DNA. *Mol Reprod Dev*, 47, 157-63.
120. Fujiwara, Y., Miwa, M., Takahashi, R., Kodaira, K., Hirabayashi, M., Suzuki, T., Ueda, M. (1999) High-level expressing YAC vector for transgenic animal bioreactors. *Mol Reprod Dev*, 52, 414-20.
121. Furet, J.P., Mercier, J.C., Soulier, S., Gaye, P., Hue-Delahaie, D., Vilotte, J.L. (1990) Nucleotide sequence of ovine kappa-casein cDNA. *Nucleic Acids Res*, 18, 5286.
122. Furuya, K., Enomoto, K., Yamagishi, S. (1993) Spontaneous calcium oscillations and mechanically and chemically induced calcium responses in mammary epithelial cells. *Pflugers Arch*, 422, 295-304.
123. Garner, I., Colman, A. (1998). Therapeutic proteins from livestock In: *Animal Breeding:Technology for the 21st Century*. Harwood academic Publishers, 64-71.
124. Garnier, J., Ribadeau-Dumas, B. (1970). Structure of the casein micelle. A proposed model. *J.Dairy Res*. 37, 493-504.

125. Gibson, J.P. (1991) The potential for genetic change in milk fat composition. *J Dairy Sci*, 74, 3258-66.

126. Gigliotti, A.P. DeWille, J.W. (1998) Lactation status influences expression of CCAAT/enhancer binding protein isoform mRNA in the mouse mammary gland. *J Cell Physiol*, 174, 232-9.

127. Ginger, M.R. Grigor, M.R. (1999) Comparative aspects of milk caseins. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 124, 133-45.

128. Gitschier, J., Wood, W.I., Goralka, T.M., Wion, K.L., Chen, E.Y., Eaton, D.H., Vehar, G.A., Capon, D.J., Lawn, R.M. (1992) Characterization of the human factor VIII gene. 1984. *Biotechnology*, 24, 288-92.

129. Gong, Z.Y. (1992) Improved RNA staining in formaldehyde gels. *Biotechniques*, 12, 74, 76.

130. Gonyon, D.S, Mather, R.E., Hines, H.C., Haenlein, G.F.W., Arave, C.W. és Gaunt, S.N. (1987). Association of bovine blood and milk polymorphisms with lactation traits: Holsteins. *J. Dairy Sci.*, 70, 2585-2598.

131. Gordon, J.W. Ruddle, F.H. (1981) Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science*, 214, 1244-6.

132. 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 U S A*, 77, 7380-4.

133. Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., Bujard, H. (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, 268, 1766-9.

134. Graml, R., Buchberger, J., Kirchmeyer, H. és Pirchner, F. (1985). Pleiotrope Wirkungen von beta-Lactoglobulin- und Casein Genotypen auf Milchinhaltsstoffe des Bayerischen Fleckviehs und Braunviehs. *Z. Tierzüchtg. Züchtungsbiol.*, 102, 355-370.

135. Green, M.L., hobbs, D.G., Morant, S.V., Hill. V.A. (1978). Intermicellar relationships in rennet-treated separated milk. II. Process of gel assembly. *J.Dairy Res.* 45, 413-22.

136. Green, M.L., Morant, S.V. (1981). Mechanism of aggregation of casein micelles in rennet-treated milk. *J. Dairy Res.* 48, 57-63.

137. Greenberg, R., Groves, M.L., Dower, H.J. (1984) Human beta-casein. Amino acid sequence and identification of phosphorylation sites. *J Biol Chem*, 259, 5132-8.

138. Griffin, M.C. Roberts, G.C. (1985) A 1H-n.m.r. study of casein micelles. *Biochem J*, 228, 273-6.

139. Groenen, M.A., Dijkhof, R.J., Verstege, A.J., van der Poel, J.J. (1993) The complete sequence of the gene encoding bovine alpha s2-casein. *Gene*, 123, 187-93.

140. Groenen, M.A.M., Van der Poel, J.J. (1994) Regulation of expression of milk protein genes: a rewiev. *Livestock Prod. Sci.* 38, 61-78.

141. Groet, S., Meade, H. (1997). AntithrombinIII- Clinical development results and future plans. In: *IBC Conference proceedings on transgenic therapeutics.* 23.

142. Grosclaude, F., Mahé, M.F., Mercier, J.C. és Ribadeau-Dumas, B. (1972). Caractérisation des variants génétiques des caséines □$_{S1}$ et □ bovines. *Eur. J. Biochem.*, 26, 328-337.

143. Grosclaude, F., Pujolle, J., Garnier, J. és Ribadeau-Dumas, B. (1966). Mise en évidence de deux variants supplémentaires des protéines du lait de vache: α_{S1}-Cn et Lg. *Anim. Biochim. Biophys.*, 6, 215-222.

144. Grusby, M.J., Mitchell, S.C., Nabavi, N., Glimcher, L.H. (1990) Casein expression in cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 6897-901.

145. Gual, P., Baron, V., Lequoy, V., Van Obberghen, E. (1998) Interaction of Janus kinases JAK-1 and JAK-2 with the insulin receptor and the insulin-like growth factor-1 receptor. *Endocrinology*, 139, 884-93.

146. Guthy, K., Auerswald, D., Buchheim, W. (1989) Electron microscopic and viscosimetric studies of the primary phase of rennet coagulation of milk. *Milchwissenschaft* 44,560-3.

147. Gutierrez-Adan, A., Maga, E.A., Behboodi, E., Conrad-Brink, J.S., Mackinlay, A.G., Anderson, G.B., Murray, J.D. (1999) Expression of bovine beta-lactoglobulin in the milk of transgenic mice. *J Dairy Res*, 66, 289-94.

148. Gutierrez-Adan, A., Maga, E.A., Meade, H., Shoemaker, C.F., Medrano, J.F., Anderson, G.B., Murray, J.D. (1996) Alterations of the physical characteristics of milk from transgenic mice producing bovine kappa-casein. *J Dairy Sci*, 79, 791-9.

149. Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad, C.E., Wall, R.J., Bolt, D.J., Ebert, K.M., Palmiter, R.D., Brinster, R.L. (1985) Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 315, 680-3.

150. Han, L., Yun, J.S., Wagner, T.E. (1991) Inhibition of Moloney murine leukemia virus-induced leukemia in transgenic mice expressing antisense RNA complementary to the retroviral packaging sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 4313-7.

151. Handel, S.E., Rennison, M.E., Wilde, C.J., Burgoyne, R.D. (1991) Annexin II (calpactin I) in the mouse mammary gland: immunolocalization by light- and electron microscopy. *Cell Tissue Res*, 264, 549-54.

152. Hansson, L., Edlund, A., Johansson, T., Hernell, O., Stromqvist, M., Lindquist, S., Lonnerdal, B., Bergstrom, S. (1994) Structure of the human beta-casein encoding gene. *Gene*, 139, 193-9.

153. Hardison, R.C. Printz, R. (1985) Variability within the rabbit C repeats and sequences shared with other SINES. *Nucleic Acids Res*, 13, 1073-88.

154. Hardy, C., Callou, C., Vigne, J.D., Casane, D., Dennebouy, N., Mounolou, J.C., Monnerot, M. (1995) Rabbit mitochondrial DNA diversity from prehistoric to modern times. *J Mol Evol*, 40, 227-37.

155. Heery, D.M., Gannon, F., Powell, R. (1990) A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices. *Trends Genet*, 6, 173.

156. Hennighausen, L.G. Sippel, A.E. (1982) Mouse whey acidic protein is a novel member of the family of 'four- disulfide core' proteins. *Nucleic Acids Res*, 10, 2677-84.

157. Henninghausen, L.G., Sippel, A.E. (1982). Mouse whey acidic protein is a novel member of family of ’four-disulfide core’ proteins. *Nucleic Acids Res.,* 10, 2677-84.

158. Herskovitis, T.T. (1966) On the conformation of caseins. Optical rotatory properties. Biochemistry 5, 1018-26.

159. Heth, A.A., Swaisgood, H.E. (1982). Examination of casein micelle structure by a method of reversible covalent immobilization. *J. Dairy Sci.* 65, 2047-54.

160. Hill, R.D. (1968) The nature of the rennin-sensitive bond in casein and its possible relation to sensitive bonds in other proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 33, 659-63.

161. Hill, R.D., (1969). Synthetic peptide and ester substrates for rennin. *J. Dairy Res.* 36, 409-15.

162. Hill, R.D., Hocking, V.M. (1978). A study of structural factors that affect the reactivity of the chymosine-sensitive bond in kappa-casein. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 13, 195-201.

163. Hill, R.J. és Wake, R.G. (1969). Amphiphile nature of kappa-casein as the basis for its micelle stabilizing property. *Nature*, 221, 635-639.

164. Hiripi, L., Devinoy, E., Rat, P., Baranyi, M., Fontaine, M.L., Bosze, Z. (1998) Polymorphic insertions/deletions of both 1550nt and 100nt in two microsatellite-containing, LINE-related intronic regions of the rabbit kappa-casein gene. *Gene*, 213, 23-30.

165. Hitchin, E., Stevenson, E.M., Clark, A.J., McClenaghan, M., Leaver, J. (1996) Bovine beta-casein expressed in transgenic mouse milk is phosphorylated and incorporated into micelles. *Protein Expr Purif*, 7, 247-52.

166. Hogan, B., Costantini, F., Lacy, E. (1986). Introduction of new genetic information into the developing mouse embryo In: *Manipulating the mouse embryo.* CSH, New-York. 151-197

167. Holmes, D.G., Duersch, J.W., Ernstrom, C.A. (1977) Distribution of milk clotting enzymes between curd and whey and their survival during cheesemaking. *J.Dairy Sci*. 60, 862-9.

168. Holt, C. Sawyer, L. (1988) Primary and predicted secondary structures of the caseins in relation to their biological functions. *Protein Eng*, 2, 251-9.

169. Holt, C. (1975). The stability of bovine casein micelles. In *Proceedings of the Conference on Colloid and Surface Science*, Szerk: Wolfram E. akadémiai kiadó, Budapest 641-44.

170. Holt, C., Dalgleish, D.G. (1986) Electrophoretic and hydrodynamic properties of bovine casein micelles interpreted in terms of particles with an outer hairy layer. *J. Colloid Interf. Sci.* 114, 513-24.

171. Holt, C., Muir, D.D. (1978) Natural variations in the average size of bovine casein micelles. *J.Dairy Res*. 45, 347-353.

172. Holt, C., Timmins, P.A., Errington, N., Leaver, J. (1998) A core-shell model of calcium phosphate nanoclusters stabilized by beta- casein phosphopeptides, derived from sedimentation equilibrium and small-angle X-ray and neutron-scattering measurements. *Eur J Biochem*, 252, 73-8.

173. Horisberger, M. Rouvet-Vauthey, M. (1984) Localization of glycosylated kappa-casein on thin sections of casein micelles by lectin-labelled gold markers. *Histochemistry*, 80, 523-6.

174. Horisberger, M. Vauthey, M. (1984) Localization of kappa-casein on thin sections of casein micelles by the gold method. *Histochemistry*, 80, 9-12.

175. Horisberger, M., Vonlanthen, M. (1980). Localization of glikosylated kappa-casein in bovine casein micelles by lectin labelled gold granules. *J.Dairy Res*.. 47, 185-191.

176. Horne, D.S. (1984) Steric effects in the coagulation of casein micelles by ethanol. *Biopolymers*, 23, 989-93.

177. Horne, D.S. (1986). Steric stabilisation and casein micelle stability. *J. Colloid Interf. Sci*. 111, 250-260.

178. Houdebine, L.M. (1995) The production of pharmaceutical proteins from the milk of transgenic animals. *Reprod Nutr Dev*, 35, 609-17.

179. Huszar, D., Balling, R., Kothary, R., Magli, M.C., Hozumi, N., Rossant, J., Bernstein, A. (1985) Insertion of a bacterial gene into the mouse germ line using an infectious retrovirus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 8587-91.

180. Isola, L.M. Gordon, J.W. (1991) Transgenic animals: a new era in developmental biology and medicine. *Biotechnology*, 16, 3-20.

181. Jaenisch, R. Mintz, B. (1974) Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71, 1250-4.

182. Jaenisch, R., Fan, H., Croker, B. (1975) Infection of preimplantation mouse embryos and of newborn mice with leukemia virus: tissue distribution of viral DNA and RNA and leukemogenesis in the adult animal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 4008-12.

183. Jahner, D., Haase, K., Mulligan, R., Jaenisch, R. (1985) Insertion of the bacterial gpt gene into the germ line of mice by retroviral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 82, 6927-31.

184. Jakob, E. (1993). Beziehungen zwischen dem genetischen Polymorphismus der Milchproteine und der Labfähigkeit von Milch. *Disszertáció*, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich.

185. Jakob, E. és Puhan, Z. (1986a). The significance of genetic variants of kappa-casein for rennetability of milk. *Deut. Molk. Zeit.*, 107, 833-834.

186. Jakob, E. és Puhan, Z. (1986b). Unterschiede zwischen labträger und normalgerinnender Milch unter besonderer Berücksichtigung der Caseinfraktion. *Scheiz. Milchw. Forschung*, 15, 27-29.

187. Jang, H.D. Swaisgood, H.E. (1990) Characteristics of the interaction of calcium with casein submicelles as determined by analytical affinity chromatography. *Arch Biochem Biophys*, 283, 318-25.

188. Jeng, S.Y., Bleck, G.T., Wheeler, M.B., Jimenez-Flores, R. (1997) Characterization and partial purification of bovine alpha-lactalbumin and beta-casein produced in milk of transgenic mice. *J Dairy Sci*, 80, 3167-75.

189. Jennes, R. (1974). The composition of milk. In *Lactation A Comprehensive treatise*. Academic Press, New-York p. 3-105.

190. Jolivet, G., Devinoy, E., Fontaine, M.L., Houdebine, L.M. (1992) Structure of the gene encoding rabbit alpha s1-casein. *Gene*, 113, 257-62.

191. Jolivet, G., L'Hotte, C., Pierre, S., Tourkine, N., Houdebine, L.M. (1996) A MGF/STAT5 binding site is necessary in the distal enhancer for high prolactin induction of transfected rabbit alpha s1-casein-CAT gene transcription. *FEBS Lett*, 389, 257-62.

192. Jolles, J., Alais, C., Jolles, P. (1968) The tryptic peptide with the renin-sensitive linkage of cow's kappa casein. *Biochim Biophys Acta*, 168, 591-3.

193. Jollés, J., Levy-Toledano, S., Fiat, A.M., Soria, C., Gillessen, D, Thomaidis, A., Dunn, F.W. és Caen, J.P. (1986). Analogy between fibrinigen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from kappa-casein on platelet function. *Eur. J. Biochem.*, 158, 379-382.

194. Jolles, P. Fiat, A.M. (1979) The carbohydrate portions of milk glycoproteins. *J Dairy Res* , 46, 187-91.

195. Jolles, P., Henschen, A. (1982) Comparison between the clotting of blood and milk. *Trends Biochem. Sci*. 7, 325-328.

196. 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. *Nat Biotechnol*, 17, 160-4.

197. Kalab M., Phibbs-Todd, b.E. allan-Wojtas, P. (1982). Milk gel structure XIII. rotary shadowing of casein micelles for electron microscopy. *Milchwissenschaft* 37, 87-98.

198. Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H., Tsunoda, Y. (1998) Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 282, 2095-8.

199. Kayser, H. Meisel, H. (1996) Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Lett*, 383, 18-20.

200. Kazansky, A.V., Raught, B., Lindsey, S.M., Wang, Y.F., Rosen, J.M. (1995) Regulation of mammary gland factor/Stat5a during mammary gland development. *Mol Endocrinol*, 9, 1598-609.

201. Kerr, D.E., Liang, F., Bondioli, K.R., Zhao, H., Kreibich, G., Wall, R.J., Sun, T.T. (1998) The bladder as a bioreactor: urothelium production and secretion of growth hormone into urine. *Nat Biotechnol*, 16, 75-9.

202. King, D. Wall, R.J. (1988) Identification of specific gene sequences in preimplantation embryos by genomic amplification: detection of a transgene. *Mol Reprod Dev*, 1, 57-62.

203. Kirchmeier, O., Mehana, A., Graml, R. Buchberger, J. és Pirchner, J. (1983). Studies on physico-chemical properties of casein: genetic and seasonal effects. *Milchwissenschaft*, 38, 589-591.

204. Knoop, A.M., Knoop, E., Wiechen, a. (1973). Electron microscopical investigation on the structure of casein micelles. *Neth Milk Dairy J*. 27, 121-7.

205. Kolb, E., Laine, E., Strehler, D., Staeheli, P. (1992) Resistance to influenza virus infection of Mx transgenic mice expressing Mx protein under the control of two constitutive promoters. *J Virol*, 66, 1709-16.

206. Koller, B.H. Smithies, O. (1989) Inactivating the beta 2-microglobulin locus in mouse embryonic stem cells by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 8932-5.

207. Kozak, M. (1991) Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem*, 266, 19867-70.

208. Krimpenfort, P., Rademakers, A., Eyestone, W., van der Schans, A., van den Broek, S., Kooiman, P., Kootwijk, E., Platenburg, G., Pieper, F., Strijker, R., et, a.l. (1991) Generation of transgenic dairy cattle using 'in vitro' embryo production. *Biotechnology (N Y)*, 9, 844-7.

209. Kroeker, E.M., Ng-Kwai-Hang, K.F., Hayes, J.F. és Moxley, J.E. (1985). Effects of environmental factors and milk protein polymorphism on composition of casein fraction in bovine milk. *J. Dairy Sci.*, 68, 1752-1757.

210. Kudo, S., Iwata, S., Mada, M. (1979). An electron microscopic study of the location of kappa-casein in micelles by periodic acid-silver methemine staining *J.Dairy Sci.* 62, 916-20.

211. Kumar, S., Clarke, A.R., Hooper, M.L., Horne, D.S., Law, A.J., Leaver, J., Springbett, A., Stevenson, E., Simons, J.P. (1994) Milk composition and lactation of beta-casein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 6138-42.

212. Kumosinski, T.F., Pessen, H., Farrell, H.M. Jr, Brumberger, H. (1988) Determination of the quaternary structural states of bovine casein by small-angle X-ray scattering: submicellar and micellar forms. *Arch Biochem Biophys*, 266, 548-61.

213. Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R., Berns, A. (1991) Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res*, 19, 4293.

214. Langley, B., Vilotte, J.L., Stinnakre, M.G., Whitelaw, C.B., L'Huillier, P.J. (1998) Rescue of an MMTV transgene by co-integration reveals novel locus control properties of the ovine beta-lactoglobulin gene that confer locus commitment to heterogeneous tissues. *Transgenic Res*, 7, 205-12.

215. Larson, B.R. (1992). Immunoglobulins of the mammary secretions In: *Advanced Dairy Chemistry-1: Proteins*. Szerk.: Fox, P.F., Elsevier, London és New York. 231-254.

216. Lavitrano, M., Camaioni, A., Fazio, V.M., Dolci, S., Farace, M.G., Spadafora, C. (1989) Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell*, 57, 717-23.

217. Law, A.J.R., Tzibuola, A. (1993). Fractionation of caprine kappa-casein and examination of polimorphism by FPLC. *Milchwisenschaft* 48, 68-70.

218. Lechner, J., Welte, T., Doppler, W. (1997) Mechanism of interaction between the glucocorticoid receptor and Stat5: role of DNA-binding. *Immunobiology*, 198, 112-23.

219. Lechner, J., Welte, T., Tomasi, J.K., Bruno, P., Cairns, C., Gustafsson, J., Doppler, W. (1997) Promoter-dependent synergy between glucocorticoid receptor and Stat5 in the activation of beta-casein gene transcription. *J Biol Chem*, 272, 20954-60.

220. Lee, K.F., DeMayo, F.J., Atiee, S.H., Rosen, J.M. (1988) Tissue-specific expression of the rat beta-casein gene in transgenic mice. *Nucleic Acids Res*, 16, 1027-41.

221. Leroux, C., Mazure, N., Martin, P. (1992) Mutations away from splice site recognition sequences might cis- modulate alternative splicing of goat alpha s1-casein transcripts. Structural organization of the relevant gene. *J Biol Chem*, 267, 6147-57.

222. Leveziel, H., Metenier, L., Guerin, G., Cullen, P., Provot, C., Bertaud, M., Mercier, J.C. (1991) Restriction fragment length polymorphism of ovine casein genes: close linkage between the alpha s1-, alpha s2-, beta- and kappa-casein loci. *Anim Genet* , 22, 1-10.

223. Levine, W.B., Alexander, L.J., Hoganson, G.E., Beattie, C.W. (1992) Cloning and sequencing of the porcine kappa-casein cDNA. *Anim Genet*, 23, 361-3.

224. 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 alpha- lactalbumin expression in double transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 6698-703.

225. Li, S. Rosen, J.M. (1994) Distal regulatory elements required for rat whey acidic protein gene expression in transgenic mice. *J Biol Chem*, 269, 14235-43.

226. Li, S. Rosen, J.M. (1994) Glucocorticoid regulation of rat whey acidic protein gene expression involves hormone-induced alterations of chromatin structure in the distal promoter region. *Mol Endocrinol*, 8, 1328-35.

227. Li, S. Rosen, J.M. (1995) Nuclear factor I and mammary gland factor (STAT5) play a critical role in regulating rat whey acidic protein gene expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol*, 15, 2063-70.

228. Li, W.H., Gouy, M., Sharp, P.M., O'hUigin, C., Yang, Y.W. (1990) Molecular phylogeny of Rodentia, Lagomorpha, Primates, Artiodactyla, and Carnivora and molecular clocks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 6703-7.

229. Linzell, J.L. Peaker, M. (1971) Mechanism of milk secretion. *Physiol Rev*, 51, 564-97.

230. Liu, X., Robinson, G.W., Hennighausen, L. (1996) Activation of Stat5a and Stat5b by tyrosine phosphorylation is tightly linked to mammary gland differentiation. *Mol Endocrinol*, 10, 1496-506.

231. Liu, X., Robinson, G.W., Gouilleux, F., Groner, B., Hennighausen, L. (1995) Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 8831-5.

232. Liu, X., Robinson, G.W., Wagner, K.U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A., Hennighausen, L. (1997) Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev*, 11, 179-86.

233. Lkhider, M., Delpal, S., Bousquet, M.O. (1996) Rat prolactin in serum, milk, and mammary tissue: characterization and intracellular localization. *Endocrinology*, 137, 4969-79.

234. Lkhider, M., Delpal, S., Le Provost, F., Ollivier-Bousquet, M. (1997) Rat prolactin synthesis by lactating mammary epithelial cells. *FEBS Lett*, 401, 117-22.

235. Lodes, A., Buchberger, J., Krause, I., Aumann, J. és Klostermeyer, H. (1997b). The influence of genetic variants of milk proteins on the composition and technological properties of milk. 2. Rennet coagulation time and firmness of the rennet curd. *Milchwissenschaft*, 51, 543-548.

236. Losi, G., Capella, P. Castagnetti, G.B., Grazia, L., Zambonelli, C., Mariani, P és Russo, V. (1973). Influenza delle variants genetiche della caseine sulla formazione e sulle caracteristiche della cagliata. *Scien. Tecn. Alimenti.*, 3, 373-376.

237. Losi, G., Castagnetti, G.B. és Morini, D. (1975). Importanza delle varianti genetiche delle proteine del latte per l'industria lattiero-casearia. *Mondo del Latte.*, 29, 727-739.

238. Macheboeuf, D., Coulon, J.-B. és D'Hour, P. (1993). Effect of breed, protein genetic variants and feeding on cow's milk coagulation properties. *J. Dairy Res.*, 60, 43-54.

239. Maga, E.A., Anderson, G.B., Murray, J.D. (1995) The effect of mammary gland expression of human lysozyme on the properties of milk from transgenic mice. *J Dairy Sci*, 78, 2645-52.

240. Malewski, T. (1998) Computer analysis of distribution of putative cis- and trans-regulatory elements in milk protein gene promoters. *Biosystems*, 45, 29-44.

241. Mariani, P., Losi, G., Russo, V., Castagnetti, G.B., Grazia, L., Morini, D. és Fossa, E. (1976). Caseification tests made with milk characterised by variant A and B of kappa-casein in the production of Parmigiano-Reggiano cheese. *Scien. Tecn. Latt. Casear.*, 27, 208-227.

242. 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 U S A*, 78, 7634-8.

243. Marziali, A.S. és Ng-Kwai-Hang, K.F. (1986*a*). Effects of milk composition and genetic polymorphism on coagulation properties of milk. *J. Dairy Sci.*, 69, 1793-1798.

244. Marziali, A.S. és Ng-Kwai-Hang, K.F. (1986*b*). Relationship between milk protein polymorphisms and cheese yielding capacity. *J. Dairy Sci.*, 69, 1193-1201.

245. Marziali, A.S. és Ng-Kwai-Hang, K.F. (1986*c*). Effects of milk composition and genetic polymorphism on cheese composition. *J. Dairy Sci.*, 69, 2533-2542.

246. Massoud, M., Bischoff, R., Dalemans, W., Pointu, H., Attal, J., Schultz, H., Clesse, D., Stinnakre, M.G., Pavirani, A., Houdebine, L.M. (1991) Expression of active recombinant human alpha 1-antitrypsin in transgenic rabbits. *J Biotechnol*, 18, 193-203.

247. Mayford, M., Abel, T., Kandel, E.R. (1995) Transgenic approaches to cognition. *Curr Opin Neurobiol*, 5, 141-8.

248. McAlpine, A.S. és Sayer, L. (1990). alpha-lactoglobulin: a protein drug carrier? *Biochem. Soc. Trans.*, 197 407-417.

249. McClenaghan, M., Hitchin, E., Stevenson, E.M., Clark, A.J., Holt, C., Leaver, J. (1999) Insertion of a casein kinase recognition sequence induces phosphorylation of ovine beta-lactoglobulin in transgenic mice. *Protein Eng*, 12, 259-64.

250. McClenaghan, M., Springbett, A., Wallace, R.M., Wilde, C.J., Clark, A.J. (1995) Secretory proteins compete for production in the mammary gland of transgenic mice. *Biochem J*, 310 (Pt 2), 637-41.

251. McCreath, K.J., Howcroft, J., Campbell, K.H., Colman, A., Schnieke, A.E., Kind, A.J. (2000) Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 405, 1066-9.

252. McGann, T.C., Donnelly, W.J., Kearney, R.D., Buchheim, W. (1980) Composition and size distribution of bovine casein micelles. *Biochim Biophys Acta*, 630, 261-70.

253. McKnight, R.A., Shamay, A., Sankaran, L., Wall, R.J., Hennighausen, L. (1992) Matrix-attachment regions can impart position-independent regulation of a tissue-specific gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 6943-7.

254. McLean, D.M., Graham, E.R.B., Ponzoni, R.W. és McKenzie, H.A. (1987). Effects of milk protein genetic variants and composition on heat stability of milk. *J. Dairy Sci.*, 45, 219-235.
255. McPherron, A.C. Lee, S.J. (1997) Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 12457-61.
256. Meier, V.S. Groner, B. (1994) The nuclear factor YY1 participates in repression of the beta-casein gene promoter in mammary epithelial cells and is counteracted by mammary gland factor during lactogenic hormone induction. *Mol Cell Biol*, 14, 128-37.
257. Mercier, J.C. Gaye, P. (1982) Early events in secretion of main milk proteins: occurrence of precursors. *J Dairy Sci*, 65, 299-316.
258. Mercier, J.C. (1981) Phosphorylation of caseins, present evidence for an amino acid triplet code posttranslationally recognized by specific kinases. *Biochimie*, 63, 1-17.
259. Mercier, J.C., Brignon, G. és Ribadeau-Dumas, B. (1973). Structure primaire de la caséine □B bovine. Séquence complete. *Eur. J. Biochem.*, 35, 222-235.
260. Mercier, J.C., Grosclaude, F. és Martin, P. (1991). La caséine κ et la famille multigénique des trois caséines « sensibles au calcium ». Polymorphisme, biosynthese et évolution. In: *Société Française de Génétique*, n° 3, vol. 7, p. I-VIII.
261. Mercier, J.C., Grosclaude, F. és Ribadeau-Dumas, B. (1971). Structure primaire de la caséine alpha$_{s1}$. Séquence complete. *Eur. J. Biochem.*, 23, 41-51.
262. Mercier, J.C., Grosclaude, F., Martin, P. (1991). La caséine kappa et la famille multigénique des trois caséines „sensibles au calcium". Polymorphisme, biosynthese et evolution. *Med. Sci.* 3, 1-
263. Mink, S., Haenig, B., Klempnauer, K.H. (1997) Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBPbeta. *Mol Cell Biol*, 17, 6609-17.
264. Mitra, A., Schlee, P., Krause, I., Blusch, J, Werner, T., Balakrishnan, C.R. és Pirchner, F. (1998). Kappa-casein polymorphism in indian dairy cattle and buffalo: A new genetic variant in buffalo. *Anim. Biotechn.*, 9, 81-87.
265. Mol, J.A., van Garderen, E., Rutteman, G.R., Rijnberk, A. (1996) New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary glands of dogs, cats and humans. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 57, 67-71.
266. Morini, D., Castagnetti, G.B., Chiavari, C., Grazia, L., Losi, G., Davoli, R. és Bosi, P. (1982). Prova di caseificazione con latte caratterizzato dalle varianti A e B della β-lattoglobulina nella produzione del fromaggio Parmigiano-Reggiano. *Scien. Tecn. Latt. Casear.*, 33, 475-492.
267. Morini, D., Losi, G., Castagnetti, G.B. és Mariani, P. (1979). Cheesemaking experiments with milk characterized by kappa-casein variants A and B: characteristics of the ripened cheese. *Scien. Tecn. Lett.-Casear.*, 30, 243-262.
268. Morr, C.V. (1967). Effect of oxalate and urea upon ultracentrifugation properties of raw and heated skim milk casein micelles. *J. Dairy Sci*. 50, 1744-51.
269. Mount, S.M. (1982) A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res*, 10, 459-72.
270. Muller, F., Lele, Z., Varadi, L., Menczel, L., Orban, L. (1993) Efficient transient expression system based on square pulse electroporation and in vivo luciferase assay of fertilized fish eggs. *FEBS Lett*, 324, 27-32.
271. Muller, M. Brem, G. (1994) Transgenic strategies to increase disease resistance in livestock. *Reprod Fertil Dev*, 6, 605-13.
272. Nagy, A., Gocza, E., Diaz, E.M., Prideaux, V.R., Ivanyi, E., Markkula, M., Rossant, J. (1990) Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development*, 110, 815-21.
273. Nakhasi, H.L., Grantham, F.H., Gullino, P.M. (1984) Expression of kappa-casein in normal and neoplastic rat mammary gland is under the control of prolactin. *J Biol Chem*, 259, 14894-8.

274. Ng-Kwai-Hang, K.F. és Imafidon, G.I. (1990). Effect of genetic variants of beta-casein and kappa-casein on stability of calcium-caseinate model systems. *23rd Int. Dairy Congr.* 2: No. 688.

275. Ng-Kwai-Hang, K.F., Hayes, J.F., Moxley, J.E. és Monardes, H.G. (1986). Relationship between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.*, 69, 22-26.

276. Ng-Kwai-Hang, K.F., Hayes, J.F., Moxley, J.E. és Monardes, H.G. (1987). Variation in milk protein concentration associated with genetic polymorphism and environmental factors. *J. Dairy Sci.*, 70, 563-570.

277. Ng-Kwai-Hang, K.F., Monardes, H.G. és Hayes, J.F. (1990). Association between genetic polymorphism of milk proteins and production traits during three lactations. *J. Dairy Sci.*, 73, 3414-3420.

278. Niemann, H. Kues, W.A. (2000) Transgenic livestock: premises and promises. *Anim Reprod Sci*, 60-61, 277-93.

279. Niemann, H., Halter, R., Carnwath, J.W., Herrmann, D., Lemme, E., Paul, D. (1999) Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep. *Transgenic Res*, 8, 237-47.

280. Ninomiya, T., Hoshi, M., Mizuno, A., Nagao, M., Yuki, A. (1989) Selection of mouse preimplantation embryos carrying exogenous DNA by polymerase chain reaction. *Mol Reprod Dev*, 1, 242-8.

281. Nottle, M.B., Nagashima, H., Verna, P.J., Du, Z.T., grupen, C.G., McIlfatrick, S.M., Asham, R.J., Harding, M.P., Wigley, P.L., Lyons, I.G., Harrison, D.T., Luxford, B.G., Campbell, R.G., Crawford, R.J., Robins, A.J. (1999). Production and analysis of transgenic pigs containing a metallothionein porcine growth hormone gene construct. In: *Transgenic Animals in Agriculture*. CABI Publ, New-York p. 145-156.

282. Novacek, M.J. (1992) Mammalian phylogeny: shaking the tree. *Nature*, 356, 121-5.

283. O'Connell, J.E., Fox, P.F. (2000). The two-stage coagulation of milk proteins in the minimum of the heat coagulation time-pH profile of milk: Effects of casein micelle size. *J. Dairy Sci*. 83 (3), 378-386.

284. Okajima, Y., Matsumura, I., Nishiura, T., Hashimoto, K., Yoshida, H., Ishikawa, J., Wakao, H., Yoshimura, A., Kanakura, Y., Tomiyama, Y., Matsuzawa, Y. (1998) Insulin-like growth factor-I augments erythropoietin-induced proliferation through enhanced tyrosine phosphorylation of STAT5. *J Biol Chem*, 273, 22877-83.

285. Ollivier-Bousquet, M. (1978) Early effects of prolactin on lactating rabbit mammary gland. Ultrastructural changes and stimulation of casein secretion. *Cell Tissue Res*, 187, 25-43.

286. Ollivier-Bousquet, M. (1993). Secretion des caseines: regulation hormonale. *In: Biologie de la lactation* ISERM/INRA 367-387.

287. Ollivier-Bousquet, M., Radvanyi, F., Bon, C. (1991) Crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from snake venom, interacts with epithelial mammary cells, is internalized and induces secretion. *Mol Cell Endocrinol*, 82, 41-50.

288. Oloffs, K. (1991). Genetische Grundlagen der Käsereitauglichkeit von Rohmilch. *Disszertáció*, Christian-Alberts-Universität Kiel.

289. Oloffs, K., Schulte-Coerne, H., Pabst, K. és Gravert, H.O. (1992). Die Bedeutung der Proteinvarianten für genetische Unterschiede in der Käsereitauglichkeit der Milch. *Züchtungskunde*, 64, 20-26.

290. Orkin, S.H. (1990). Globine gene regulation and switching: Circa 1990. *Cell*, 63, 665-672.

291. O'Rourke, J., Yuan, R., DeWille, J. (1997) CCAAT/enhancer-binding protein-delta (C/EBP-delta) is induced in growth- arrested mouse mammary epithelial cells. *J Biol Chem*, 272, 6291-6.

292. Paleyanda, R.K., Velander, W.H., Lee, T.K., Scandella, D.H., Gwazdauskas, F.C., Knight, J.W., Hoyer, L.W., Drohan, W.N., Lubon, H. (1997) Transgenic pigs produce functional human factor VIII in milk. *Nat Biotechnol*, 15, 971-5.

293. Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Hammer, R.E., Trumbauer, M.E., Rosenfeld, M.G., Birnberg, N.C., Evans, R.M. (1982) Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 300, 611-5.

294. Palmiter, R.D., Sandgren, E.P., Avarbock, M.R., Allen, D.D., Brinster, R.L. (1991) Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 478-82.

295. Papiz, M.Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E.E., North, A.C.T., Findlay, J.B.C., Sivaprasadarao, R., Jones, T.A., Newcomer, M.E. és

296. Parry, R.M. Jr Carroll, R.J. (1969) Location of kappa-casein in milk micelles. *Biochim Biophys Acta*, 194, 138-50.

297. Pauloin, A., Delpal, S., Chanat, E., Lavialle, F., Aubourg, A., Ollivier-Bousquet, M. (1997) Brefeldin A differently affects basal and prolactin-stimulated milk protein secretion in lactating rabbit mammary epithelial cells. *Eur J Cell Biol*, 72, 324-36.

298. Pawlik, K.M. Townes, T.M. (1995) Autonomous, erythroid-specific DNase I hypersensitive site formed by human beta-globin locus control region (LCR) 5' HS 2 in transgenic mice. *Dev Biol*, 169, 728-32.

299. Payens, T.A. Schmidt, D.G. (1966) Boundary spreading of rapidly polymerizing alpha-casein B and C during sedimentation. Numerical solutions of the Lamm-Gilbert-Fujita equation. *Arch Biochem Biophys*, 115, 136-45.

300. Payens, T.A. (1966) Association of caseins and their possible relation to structure of the casein micelle. *J Dairy Sci*, 49, 1317-24.

301. Pepper, L., Farell, H.M. (1982) *J.Dairy Sci.,* 65, 219.

302. Perez, M.J., Leroux, C., Bonastre, A.S., Martin, P. (1994) Occurrence of a LINE sequence in the 3' UTR of the goat alpha s1-casein E-encoding allele associated with reduced protein synthesis level. *Gene*, 147, 179-87.

303. Perry, A.C., Wakayama, T., Kishikawa, H., Kasai, T., Okabe, M., Toyoda, Y., Yanagimachi, R. (1999) Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science*, 284, 1180-3.

304. Persuy, M.A., Legrain, S., Printz, C., Stinnakre, M.G., Lepourry, L., Brignon, G., Mercier, J.C. (1995) High-level, stage- and mammary-tissue-specific expression of a caprine kappa-casein-encoding minigene driven by a beta-casein promoter in transgenic mice. *Gene*, 165, 291-6.

305. Persuy, M.A., Stinnakre, M.G., Printz, C., Mahe, M.F., Mercier, J.C. (1992) High expression of the caprine beta-casein gene in transgenic mice. *Eur J Biochem*, 205, 887-93.

306. Pessen, H.T.F., Kumosinski, Farrell, H.M. (1989). Small-angle X-ray scattering investigation of the micellar and submicellar forms of bovine casein. *J.Dairy. Res.* 56, 443-451.

307. Peterson, R.F. és Kopfler, F.C. (1966). Detection of new types of β-casein by poyacrylamide gel electrophoresis at acid pH: a proposed nomenclature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 22, 388-392.

308. Petitclerc, D., Attal, J., Theron, M.C., Bearzotti, M., Bolifraud, P., Kann, G., Stinnakre, M.G., Pointu, H., Puissant, C., Houdebine, L.M. (1995) The effect of various introns and transcription terminators on the efficiency of expression vectors in various cultured cell lines and in the mammary gland of transgenic mice. *J Biotechnol*, 40, 169-78.

309. Pierre, S., Jolivet, G., Devinoy, E., Houdebine, L.M. (1994) A combination of distal and proximal regions is required for efficient prolactin regulation of transfected rabbit alpha s1-casein chloramphenicol acetyltransferase constructs. *Mol Endocrinol*, 8, 1720-30.

310. Pintado, B. Gutierrez-Adan, A. (1999) Transgenesis in large domestic species: future development for milk modification. *Reprod Nutr Dev*, 39, 535-44.

311. Platenburg, G.J., Kootwijk, E.P., Kooiman, P.M., Woloshuk, S.L., Nuijens, J.H., Krimpenfort, P.J., Pieper, F.R., de Boer, H.A., Strijker, R. (1994) Expression of human lactoferrin in milk of transgenic mice. *Transgenic Res*, 3, 99-108.

312. Potts, W., Tucker, D., Wood, H., Martin, C. (2000) Chicken beta-globin 5'HS4 insulators function to reduce variability in transgenic founder mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 273, 1015-8.

313. Price, D.L., Sisodia, S.S., Borchelt, D.R. (1998) Genetic neurodegenerative diseases: the human illness and transgenic models. *Science*, 282, 1079-83.

314. Provot, C., Persuy, M.A., Mercier, J.C. (1989) Complete nucleotide sequence of ovine beta-casein cDNA: inter-species comparison. *Biochimie*, 71, 827-32.
315. Puissant, C. Houdebine, L.M. (1990) An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Biotechniques* , 8, 148-9.
316. Puissant, C., Bayat-Sarmadi, M., Devinoy, E., Houdebine, L.M. (1994) Variation of transferrin mRNA concentration in the rabbit mammary gland during the pregnancy-lactation-weaning cycle and in cultured mammary cells. A comparison with the other major milk protein mRNAs. *Eur J Endocrinol*, 130, 522-9.
317. Pursel, V.G. Rexroad, C.E. (1993) Recent progress in the transgenic modification of swine and sheep. *Mol Reprod Dev*, 36, 251-4.
318. Raap, J., Kerling, K.E., Vreeman, H.J., Visser, S. (1983) Peptide substrates for chymosin (rennin): conformational studies of kappa-casein and some kappa-casein-related oligopeptides by circular dichroism and secondary structure prediction. *Arch Biochem Biophys*, 221, 117-24.
319. Rahali, V. és Ménard, J.L. (1991). Influence des variants génétiques de la β-lactoglobuline et la κ-caséine sur la composition du lait et son aptitude fromagere. *Lait*, 71, 275-297.
320. Rampilli, M., Caroli, A., Bolla, P. és Pirlo, G. (1988). Relationi tra genotipi lattoproteici, composizione caseinica e attitudine alla coagulazione del latte nel corso della lattazione. *Scien. Tecn. Latt. Casear.*, 39, 262-279.
321. Ranganathan, S., Simpson, K.J., Shaw, D.C., Nicholas, K.R. (1999) The whey acidic protein family: a new signature motif and three- dimensional structure by comparative modeling. *J Mol Graph Model*, 17, 106-13, 134-6.
322. Rasmussen, L.K., Hojrup, P., Petersen, T.E. (1992) The multimeric structure and disulfide-bonding pattern of bovine kappa- casein. *Eur J Biochem*, 207, 215-22.
323. Raught, B., Liao, W.S., Rosen, J.M. (1995) Developmentally and hormonally regulated CCAAT/enhancer-binding protein isoforms influence beta-casein gene expression. *Mol Endocrinol*, 9, 1223-32.
324. Remeuf, F., Cossin, V., Dervin, C., Leonir, J. és Tomassone, R. (1991). Relations entre les caracteres physico-chimiques des laits et leur aptitude fromagere. *Lait*, 71, 397-421.
325. Rennison, M.E., Kerr, M., Addey, C.V., Handel, S.E., Turner, M.D., Wilde, C.J., Burgoyne, R.D. (1993) Inhibition of constitutive protein secretion from lactating mouse mammary epithelial cells by FIL (feedback inhibitor of lactation), a secreted milk protein. *J Cell Sci*, 106 (Pt 2), 641-8.
326. Rexroad, C.E. (1991) Production of sheep transgenic for growth hormone genes. *Biotechnology* , 16, 259-63.
327. Rexroad, C.E., Hammer, R.E., Bolt, D.J., Mayo, K.E., Frohman, L.A., Palmiter, R.D., Brinster, R.L. (1989) Production of transgenic sheep with growth-regulating genes. *Mol Reprod Dev*, 1, 164-9.
328. Rijnkels, M., Kooiman, P.M., de Boer, H.A. és Pieper, F.R. (1997). Organization of the bovine casein gene locus. *Mamm. Genome*, 8, 148-152.
329. Rijnkels, M., Kooiman, P.M., Krimpenfort, P.J., de Boer, H.A., Pieper, F.R. (1995) Expression analysis of the individual bovine beta-, alpha s2- and kappa- casein genes in transgenic mice. *Biochem J*, 311 (Pt 3) , 929-37.
330. Rijnkels, M., Kooiman, P.M., Platenburg, G.J., van Dixhoorn, M., Nuijens, J.H., de Boer, H.A., Pieper, F.R. (1998) High-level expression of bovine alpha s1-casein in milk of transgenic mice. *Transgenic Res*, 7 , 5-14.
331. Rijnkels, M., Meershoek, E., de Boer, H.A., Pieper, F.R. (1997) Physical map and localization of the human casein gene locus. *Mamm Genome*, 8, 285-6.
332. Roberts, B., DiTullio, P., Vitale, J., Hehir, K., Gordon, K. (1992) Cloning of the goat beta-casein-encoding gene and expression in transgenic mice. *Gene*, 121, 255-62.
333. Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M., Evans, M. (1986) Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature*, 323, 445-8.

334. Robinson, G.W., Johnson, P.F., Hennighausen, L., Sterneck, E. (1998) The C/EBPbeta transcription factor regulates epithelial cell proliferation and differentiation in the mammary gland. *Genes Dev*, 12, 1907-16.

335. Robinson, S.D., Roberts, A.B., Daniel, C.W. (1993) TGF beta suppresses casein synthesis in mouse mammary explants and may play a role in controlling milk levels during pregnancy. *J Cell Biol*, 120, 245-51.

336. Rollema, H.S. (1992). Casein association and micelle formation. In: *Advanced Dairy Chemistry-1: Proteins*. Szerk.: Fox, P.F., Elsevier, London és New York. 111-141.

337. Rollema, H.S., Brinkhuis, J.A., Vreeman, H.J. (1988). ^{1}H-NMR studies of bovine kappa-casein and casein micelles. *Neth. Milk Dairy J.* 42, 233-48.

338. Rose, D. (1969). A proposed model of micelle structure in bovine milk *Dairy.Sci. Abstr.* 31, 171-5.

339. Rothman, J.E. Orci, L. (1992) Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature*, 355, 409-15.

340. Russo, V. és Mariani, P. (1978). Polimorfismo delle proteine del latte e relazioni tra varianti genetiche e caratteristiche di interesse zootecnico, tecnologico e caseario. *Riv. Zootecn. Vet.*, 5, 289-304.

341. Russo, V., Davoli, R., Dall'olio, S., Tedeschi, M. (1986). Ricerche sul polimorfismo del latte caprino. *Zoot Nutr. Anim.* 12, 55-62.

342. Said, H.M., Ong, D.E. és Shingleton, J.L. (1989). Intestinal uptake of retinol: enhancement by bovine milk □-lactoglobulin. *Am. J. Clin. Nutr.*, 49, 690-694.

343. Sambrook, J., Fritsch, E.F. és Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Szerk.: Nolan, C., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. Book 1, p. 6.36-6.43.

344. Schaar, J. (1984). Effects of □-casein genetic variants and lactation number on the renneting properties of individual milks. *J. Dairy Res.*, 51, 397-406.

345. Schaar, J., Hansson, B. és Petterson, H.E. (1985). Effect of genetic variants of kappa-casein and beta-lactoglobulin on cheesemaking. *J. Dairy Res.*, 52, 429-437.

346. Schedl, A., Beermann, F., Thies, E., Montoliu, L., Kelsey, G., Schutz, G. (1992) Transgenic mice generated by pronuclear injection of a yeast artificial chromosome. *Nucleic Acids Res*, 20, 3073-7.

347. Schmidhauser, C., Casperson, G.F., Myers, C.A., Sanzo, K.T., Bolten, S., Bissell, M.J. (1992) A novel transcriptional enhancer is involved in the prolactin- and extracellular matrix-dependent regulation of beta-casein gene expression. *Mol Biol Cell*, 3, 699-709.

348. Schmidt, D.G. (1970) The association of alphaS1-casein B at pH 6.6. *Biochim Biophys Acta*, 207, 130-8.

349. Schmidt, D.G. (1982). Association of casein and casein micelle structure. In *Developments in Dairy Chemistry* Szerk: Fox. P.F. Applied Science Publishers, London. 61-86.

350. Schmidt, D.G., Both, P. (1982) Location of alfa-s1, beta- and kappa-casein in artificial casein micelles. *Milchwissenschaft* 25, 596-600.

351. Schmidt, D.G., Both, P., Koning, P.J. de (1966) Fractionation and some properties of kappa-casein variants. *J Dairy Sci*, 49, 776-82.

352. Schmidt, D.G., van der Spek, C.A., Bucheim, W., Hinz, a. (1974) On the formation of artificial casein micelles. *Milchwissenschaft* 29, 455-9.

353. Schmitt-Ney, M., Doppler, W., Ball, R.K., Groner, B. (1991) Beta-casein gene promoter activity is regulated by the hormone-mediated relief of transcriptional repression and a mammary-gland-specific nuclear factor. *Mol Cell Biol*, 11, 3745-55.

354. Schnieke, A.E., Kind, A.J., Ritchie, W.A., Mycock, K., Scott, A.R., Ritchie, M., Wilmut, I., Colman, A., Campbell, K.H. (1997) Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 278, 2130-3.

355. Seagroves, T.N., Krnacik, S., Raught, B., Gay, J., Burgess-Beusse, B., Darlington, G.J., Rosen, J.M. (1998) C/EBPbeta, but not C/EBPalpha, is essential for ductal morphogenesis, lobuloalveolar proliferation, and functional differentiation in the mouse mammary gland. *Genes Dev*, 12, 1917-28.

356. Sherbon, J.W., Ledford, R.A. és Regenstein, J. (1967). Variants of milk proteins and their possible relation to milk properties. *J. Dairy Sci.*, 50, 951.

357. Simons, J.P., McClenaghan, M., Clark, A.J. (1987) Alteration of the quality of milk by expression of sheep beta- lactoglobulin in transgenic mice. *Nature*, 328, 530-2.

358. Simpson, K.J., Ranganathan, S., Fisher, J.A., Janssens, P.A., Shaw, D.C., Nicholas, K.R. (2000) The gene for a novel member of the whey acidic protein family encodes three four-disulfide core domains and is asynchronously expressed during lactation. *J Biol Chem*, 275, 23074-81.

359. Slattery, C.W. (1978) Variation in the glycosylation pattern of bovine kappa-casein with micelle size and its relationship to a micelle model. *Biochemistry*, 17, 1100-4.

360. Slattery, C.W., Evard, R. (1973). A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition. *Biochim. Biophys. Acta* 622, 268-76.

361. Soriano, P. Jaenisch, R. (1986) Retroviruses as probes for mammalian development: allocation of cells to the somatic and germ cell lineages. *Cell*, 46, 19-29.

362. Soriano, P., Cone, R.D., Mulligan, R.C., Jaenisch, R. (1986) Tissue-specific and ectopic expression of genes introduced into transgenic mice by retroviruses. *Science*, 234, 1409-13.

363. Spira, C.P., Groenen M.A.M., Poel, J.J. (1994). Nucleotide sequence of the kappa-casein gene promoter in the sheep. *Genebank Accession* No. L31372.

364. Stacey, A., Schnieke, A., Kerr, M., Scott, A., McKee, C., Cottingham, I., Binas, B., Wilde, C., Colman, A. (1995) Lactation is disrupted by alpha-lactalbumin deficiency and can be restored by human alpha-lactalbumin gene replacement in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 2835-9.

365. Stinnakre, M.G., Soulier, S., Schibler, L., Lepourry, L., Mercier, J.C., Vilotte, J.L. (1999) Position-independent and copy-number-related expression of a goat bacterial artificial chromosome alpha-lactalbumin gene in transgenic mice. *Biochem J*, 339 (Pt 1), 33-6.

366. Stinnakre, M.G., Vilotte, J.L., Soulier, S., Mercier, J.C. (1994) Creation and phenotypic analysis of alpha-lactalbumin-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 6544-8.

367. Stocklin, E., Wissler, M., Gouilleux, F., Groner, B. (1996) Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature*, 383, 726-8.

368. Stothart, P.H. Cebula, D.J. (1982) Small-angle neutron scattering study of bovine casein micelles and sub- micelles. *J Mol Biol*, 160, 391-5.

369. Stothart, P.H. (1989) Subunit structure of casein micelles from small-angle neutron- scattering. *J Mol Biol*, 208, 635-8.

370. Streuli, C.H., Bailey, N., Bissell, M.J. (1991) Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. *J Cell Biol*, 115, 1383-95.

371. Streuli, C.H., Edwards, G.M., Delcommenne, M., Whitelaw, C.B., Burdon, T.G., Schindler, C., Watson, C.J. (1995) Stat5 as a target for regulation by extracellular matrix. *J Biol Chem*, 270, 21639-44.

372. 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, 135-47.

373. Swaisgood, H.E. (1992). Chemistry of the caseins. In: *Advanced Dairy Chemistry.-Vol.1: Proteins.* Szerk.: Fox, P.F. London: Elsevier Applied Science. p. 63-110.

374. Swaisgood, H.E., Brunner, J.R., Lillevik, H.A. (1964) *Biochemistry*, 3, 1616

375. Swanson, M.E., Martin, M.J., O'Donnell, J.K., Hoover, K., Lago, W., Huntress, V., Parsons, C.T., Pinkert, C.A., Pilder, S., Logan, J.S. (1992) Production of functional human hemoglobin in transgenic swine. *Biotechnology (N Y)*, 10, 557-9.

376. Tabor, S. és Richardson, C.C. (1987). DNA sequence analysis with a modified T7 DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 4767-4771.

377. Takada, T., Iida, K., Akasaka, K., Yasue, H., Torii, R., Tsujimoto, G., Taira, M., Kimura, H. (2000) Evaluation of heterologous insulator function with regard to chromosomal position effect in the mouse blastocyst and fetus. *Mol Reprod Dev*, 57, 232-7.

378. Takeuchi, M., Tsuda, e., Yoshikawa, M., Sasaki, R., Chiba, H. (1984) Post-translational modification of kappa-casein in the Golgi apparatus of mid-lactating mammary gland from rat and cow. *Agri. Biol. Chem*., 48, 2789-97.

379. Teglund, S., McKay, C., Schuetz, E., van Deursen, J.M., Stravopodis, D., Wang, D., Brown, M., Bodner, S., Grosveld, G., Ihle, J.N. (1998) Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell*, 93, 841-50.

380. Tervala, H.L., Antila, V. és Syvaejaervi, J. (1985). Factors affecting the renneting properties of milk. *Meij. Aika.*, 43, 16-25.

381. Tervala, H.L., Antila, V., Syvaejaervi, J. és Lindstroem, U.B. (1983). Variations in the renneting properties of milk. *Meij. Aika.*, 41, 24-33.

382. Thepot, D., Devinoy, E., Fontaine, M.L., Houdebine, L.M. (1991) Structure of the gene encoding rabbit beta-casein. *Gene*, 97, 301-6.

383. Thepot, D., Devinoy, E., Fontaine, M.L., Hubert, C., Houdebine, L.M. (1990) Complete sequence of the rabbit whey acidic protein gene. *Nucleic Acids Res*, 18, 3641.

384. Thepot, D., Devinoy, E., Fontaine, M.L., Stinnakre, M.G., Massoud, M., Kann, G., Houdebine, L.M. (1995) Rabbit whey acidic protein gene upstream region controls high-level expression of bovine growth hormone in the mammary gland of transgenic mice. *Mol Reprod Dev*, 42, 261-7.

385. Thomas, K.R. Capecchi, M.R. (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 51, 503-12.

386. Thomas, K.R. (1994) Impact of gene targeting on medicine. *Mol Genet Med*, 4, 153-78.

387. Thompson, E.M., Adenot, P., Tsuji, F.I., Renard, J.P. (1995) Real time imaging of transcriptional activity in live mouse preimplantation embryos using a secreted luciferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 1317-21.

388. Thompson, E.M., Christians, E., Stinnakre, M.G., Renard, J.P. (1994) Scaffold attachment regions stimulate HSP70.1 expression in mouse preimplantation embryos but not in differentiated tissues. *Mol Cell Biol*, 14 , 4694-703.

389. Thompson, M.D., Dave, J.R., Nakhasi, H.L. (1985) Molecular cloning of mouse mammary gland kappa-casein: comparison with rat kappa-casein and rat and human gamma-fibrinogen. *DNA*, 4, 263-71.

390. Thompson, M.P., Gordon, W.G., Boswell, R.T., Farell, H.M. (1969). Solubility, solvation, and stabilization of alfa-s_1- and beta-caseins *J. Dairy Sci*. 52, 1166-73.

391. Thompson, M.P., Kiddy, C.A., Pepper, L. és Zittle, C.A. (1962). Variations in the α_S-casein fraction of individual cow's milk. *Nature*, 195, 1001-1002.

392. Threadgill, D.W. Womack, J.E. (1990) Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. *Nucleic Acids Res*, 18, 6935-42.

393. Thurn, A., Burchard, W., Niki, R., (1987). Structure of casein micelles II. alfa-$s_1$casein *Colloid and Polimer Sci*. 265, 897-902.

394. Thurn, A., Burchard, W., Niki, R., (1987). Structure of casein micelles I.Small angle neutron scattering and light csattering from beta- and kappa-casein *Colloid and Polimer Sci*. 265, 653-66.

395. Toma, S.J. Nakai, S. (1973) Calcium sensitivity and molecular weight of alpha-s5-casein. *J Dairy Sci*, 56, 1559-62.

396. Turner, M.D., Handel, S.E., Wilde, C.J., Burgoyne, R.D. (1993) Differential effect of brefeldin A on phosphorylation of the caseins in lactating mouse mammary epithelial cells. *J Cell Sci*, 106 (Pt 4), 1221-6.

397. Turner, M.D., Rennison, M.E., Handel, S.E., Wilde, C.J., Burgoyne, R.D. (1992) Proteins are secreted by both constitutive and regulated secretory pathways in lactating mouse mammary epithelial cells. *J Cell Biol*, 117, 269-78.

398. Turner, M.D., Wilde, C.J., Burgoyne, R.D. (1992) Exocytosis from permeabilized lactating mouse mammary epithelial cells. Stimulation by Ca2+ and phorbol ester, but inhibition of regulated exocytosis by guanosine 5'-[gamma-thio]triphosphate. *Biochem J*, 286 (Pt 1), 13-5.

399. Udina, I.G., Badagueva, I.u.N., Sulimova, G.E., Zakharov, I.A. (1995) [Distribution of the kappa-casein gene alleles in the bison (Bison bonasus) population]. *Genetika*, 31, 1704-6.

400. van der Putten, H., Botteri, F.M., Miller, A.D., Rosenfeld, M.G., Fan, H., Evans, R.M., Verma, I.M. (1985) Efficient insertion of genes into the mouse germ line via retroviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 6148-52.

401. Vilotte, J.L., Soulier, S., Mercier, J.C. (1993) Complete sequence of a bovine alpha-lactalbumin pseudogene: the region homologous to the gene is flanked by two directly repeated LINE sequences. *Genomics*, 16, 529-32.

402. Visser, S., Slangen, C.J., Langenwerf, F.M., van Dongen, W.D. és Haverkamp, J. (1995). Identification of a new genetic variant of bovine β-casein using reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr.*, 711, 141-150.

403. Visser, S., Van Rooijen, P.J., Slangen, C.J. (1980) Peptide substrates for chymosin (rennin). Isolation and substrate behaviour of two tryptic fragments of bovine kappa casein. *Eur J Biochem*, 108, 415-21.

404. Voglino, G.F. (1972). A new β-casein variant in Piedmont cattle. *Anim. Blood Grps Biochem. Genet.*, 3, 61-62.

405. Vreeman, H.J., Visser, S., Slangen, C.J., Van Riel, J.A. (1986) Characterization of bovine kappa-casein fractions and the kinetics of chymosin-induced macropeptide release from carbohydrate-free and carbohydrate-containing fractions determined by high-performance gel- permeation chromatography. *Biochem J*, 240, 87-97.

406. Wakao, H., Gouilleux, F., Groner, B. (1994) Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *EMBO J*, 13, 2182-91.

407. Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson, K.R., Yanagimachi, R. (1998) Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394, 369-74.

408. Wall, R.J., Kerr, D.E., Bondioli, K.R. (1997) Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale. *J Dairy Sci*, 80, 2213-24.

409. Walstra, P. (1979). The voluminosity of bovine casein micelles and some of its implications. *J. Dairy Res.*, 46, 317-323.

410. Walstra, P. (1990). On the stability of casein micelles. *J.Dairy Res*. 73, 1965-79.

411. Walstra, P. és Jenness, R. (1984). *Dairy Chemistry and Physics*, John Wiley, New York.

412. Walstra, P., Bloomfield, V.A., Wei, G.J., Jenness, R. (1981) Effect of chymosin action on the hydrodynamic diameter of casein micelles. *Biochim Biophys Acta*, 669, 258-9.

413. Waugh, D.F., Noble, R.W., (1965). Casein micelles. Formation and structure II. *J. Am. Chem. Soc.* 87, 2246-57.

414. Weiss, H.J., Sussman, I.I., Hoyer, L.W. (1977) Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease. *J Clin Invest*, 60, 390-404.

415. Welte, T., Garimorth, K., Philipp, S., Doppler, W. (1994) Prolactin-dependent activation of a tyrosine phosphorylated DNA binding factor in mouse mammary epithelial cells. *Mol Endocrinol*, 8, 1091-102.

416. Wheeler, M. (1999). Transgenic alteration of sow milk: production and characterization bovine alpha-lactalbumin and human IGF-I transgenic swine *Transgenic Res.* 8, 459.

417. Wheeler, M.B. (1994) Development and validation of swine embryonic stem cells: a review. *Reprod Fertil Dev*, 6, 563-8.

418. Whitelaw, C.B., Grolli, S., Accornero, P., Donofrio, G., Farini, E., Webster, J. (2000) Matrix attachment region regulates basal beta-lactoglobulin transgene expression. *Gene*, 244, 73-80.

419. Wianny, F. Zernicka-Goetz, M. (2000) Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol*, 2, 70-5.

420. Wilde, C.J., Addey, C.V., Boddy, L.M., Peaker, M. (1995) Autocrine regulation of milk secretion by a protein in milk. *Biochem J*, 305 (Pt 1), 51-8.

421. Wilde, C.J., Calvert, D.T., Daly, A., Peaker, M. (1987) The effect of goat milk fractions on synthesis of milk constituents by rabbit mammary explants and on milk yield in vivo. Evidence for autocrine control of milk secretion. *Biochem J*, 242, 285-8.

422. Wilde, C.J., Knight, C.H., addey, C.V.P., Blatchford, D.R., Travers, M., Bennett, C.N., Peaker, M. (1990). Autocrine regulation of mammary cell differentiation *Protoplasma* 159, 112-

423. 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, 810-3.

424. Wolffe, A.P. (1997) Transcription control: repressed repeats express themselves. *Curr Biol*, 7, R796-8.

425. Wooding, F.B.P. (1977). Comparative mammary fine structure *Symp. Zool. Soc. Lond*.41, 1-

426. Wyszomierski, S.L., Yeh, J., Rosen, J.M. (1999) Glucocorticoid receptor/signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) interactions enhance STAT5 activation by prolonging STAT5 DNA binding and tyrosine phosphorylation. *Mol Endocrinol*, 13, 330-43.

427. Yamauchi, K., Azuma, N., Kobayashi, H., Kaminogawa, S. (1981) Isolation and properties of human kappa-casein. *J Biochem (Tokyo)*, 90, 1005-12.

428. Yan, S.C., Razzano, P., Chao, Y.B., Walls, J.D., Berg, D.T., McClure, D.B., Grinnell, B.W. (1990) Characterization and novel purification of recombinant human protein C from three mammalian cell lines. *Biotechnology (N Y)*, 8, 655-61.

429. Yang, X.W., Model, P., Heintz, N. (1997) Homologous recombination based modification in Escherichia coli and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nat Biotechnol*, 15, 859-65.

430. Yoshimura, M. Oka, T. (1989) Isolation and structural analysis of the mouse beta-casein gene. *Gene*, 78, 267-75.

431. Yu-Lee, L.Y. és Rosen, J.M. (1983). The rat casein multigene family. I. The fine structure of the gamma-casein gene. *J. Biol. Chem.*, 258, 10794-10804.

432. Yu-Lee, L.Y., Richter-Mann, L., Couch, C.H., Stewart, A.F., Mackinlay, A.G., Rosen, J.M. (1986) Evolution of the casein multigene family: conserved sequences in the 5' flanking and exon regions. *Nucleic Acids Res*, 14, 1883-902.

433. Zuelke, K.A., Walker, C., Price, K., Carfi, J., Christopoulos, H., Morrisey, W., Harris, S., Travers, A., Webster, T. (1999). Expression of a 100 kb bacterial artificial chromosome (BAC) genomic clone of bovine alphas1-casein in transgenic mice. *Theriogenology* 51, 430.

M2. Saját publikációk jegyzéke

M2.1. A dolgozat alapját képező publikációk

Hiripi L., Baranyi M., Szabó L., Tóth Sz., Fontaine M.L., Devinoy E., Bősze Zs.Effect of rabbit kappa-casein expression on the properties of milk from transgenic mice

J. Dairy. Res. 76. 541-550. 2000.

impact faktor: 1.356

1.Hiripi L., Devinoy E., Rat P., Baranyi M., Fontaine M.L., Bősze Zs.

Polymorphic insertions/deletions of both 1800nt and 100 nt in two microsatellite-containing, LINE-related intronic regions of the rabbit κ-casein gene.

Gene 213.23-30.1998.

Impact factor: 2,007

Bősze, Zs., Hiripi, L., Virág, Gy., Tóth, Sz., Makovics, F., Fontaine, M.L., Devinoy, E.

Polymorphism of the rabbit kappa casein gene and its influence on performance traits.

Pflügers Archiv - Eur. J. Physiol. 439/3 2-3 2000.

Impact factor: 2.352

Bősze, Zs., Baranyi, M., Hiripi, L., Fontaine, M.L., Devinoy, E.

High level expression of rabbit kappa casein in the milk of transgenic mice.

Transgenic Res. (abstract) 8. 56. 1999

Impact faktor: 2.181

Devinoy E., Rat P., Baranyi, M., Hiripi, L., Fontaine, M.L., Hamer, I., Bősze, Zs. Polymorphisme de gene de la caséine-β dans une souche de lapins d' origine raciale

8émes Journ. Rech. Cunicole Fr., Paris pp. 139-142. 1999

Bősze, Zs., Baranyi, M., Hiripi, L., Barta, E., Fontaine, M.L., Devinoy, E.

Altering milk composition through transgenesis: a new approach for producing biologicaly active proteins (abstract)

Journal of Peptide Science 4. Special Issue 22. 2000

Devinoy E., Baranyi M., Hiripi L., Aszódi A., Fontaine M-L., Bősze Zs.

Modifying milk composition, use of rabbit as a model. In: COST 825, Proceedings of the first international workshop on mammary gland biotechnology. pp. 54-59.1998. (EUR 18392 en, Luxemburg)

Bősze Zs., Baranyi M., Hiripi L., Barta E., Fontaine M-L., Devinoy E.

Altering milk composition through transgenesis: a new approach for producing biologically active protein. In:Peptides 1998 (eds. S. Bajusz &F. Hudecz) Akadémiai Kiadó,Budapest ISBN9630576228

5.2. Egyéb publikációk

Sasaki K., Hiripi L., Glumoff V., Brandau O., Eerola R., Vuorio E., Bosze Zs., Fassler R., Aszodi A.

Stage-and tissue-specific expression of a *Col2a1-Cre* fusion

gene in transgenic mice

Matrix Biology 19. (8) 761-767. 2001.

Impact faktor: 3.214

Aszódi A., Hauser N., Studer D., Paulsson M., Hiripi L., Bősze Zs.
Cloning, sequencing and expression analysis of mouse cartilage matrix protein cDNA
Eur. J. Biochem. 236. 970-977. 1996.
Impact factor: 3.275

Aszódi A., Beier D.R., Hiripi L., Bősze Zs., Fassler R.
Sequence, structure and chromosomal localization of Crtm gene encoding mouse cartilage matrix protein.
Matrix Biology 16. 563-573. 1998.
Impact factor: 2,844

Aszódi A., Pfeifer A., Wendel M., Hiripi L., Fassler R.
Mouse models for extracellular matrix diseases
J. Mol.Med 76: 238-252 1998
Impact factor: 3,721

Gerencsér Á., Hiripi L., Makovics F., Tóth Sz., Szabó G., Bősze Zs., Arányi P.,
In vivó testing of potential anti-amnesic therapeutic agents by transgenic animal model.
Arch. Tierz.42. 156-159. 1999.
Impact factor: 0.295

Whitelaw B., Webster J., Kastanis P., Farini E., Osman F., Kaempfer R., Hiripi L., Bősze Z.
Potential to exploit RNA processing elements in transgenic mice.
Cloning and Stem Sells (Abstract) 3. 170. 2001.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Az értekezés elkészítéséhez szükséges kísérleteket a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Géntechnológiai laboratóriumában és Franciaországban az INRA Kutatóközpont Endocrinologie Moléculaire Unité de Biologie Cellulaire et Moléculaire laboratóriumában végeztem.

Köszönöm Dr. Balázs Ervinnek, a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont volt főigazgatójának, hogy lehetővé tette a dolgozat elkészítését.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Bősze Zsuzsannának a munkám során nyújtott folyamatos és nélkülözhetetlen segítségért.

Köszönet munkatársaimnak a kísérletekben nyújtott segítségért, név szerint Aszódi Attilának, Baranyi Máriának, Basa Juditnak, Bucsy Lászlónak, Eve Devinoynak, Gerencsér Ákosnak, Lengyel Lászlónénak, Makovics Ferencnek, Marinka Erzsébetnek, Slezákné Harsányi Ibolyának, Szabó Lászlónak, Tóth Szabolcsnak és Virág Györgyinek.

Külön köszönettel tartozom családomnak, valamint szüleimnek, hogy végig segítették a dolgozat létrejöttét.