



Produkcja białek terapeutycznych w nasieniu transgenicznym zwierząt

Daniel Lipiński¹, Wojciech Juzwa², Joanna Zeyland²,
Ryszard Słomski^{1,2}

¹Instytut Genetyki Człowieka, Polska Akademia Nauk, Poznań

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

Production of therapeutic proteins in the semen of transgenic animals

Summary

The expression of the recombinant proteins by transgenic animals represents an opportunity to achieve cost-effective, large-scale production of a wide variety of therapeutics. Among transgenic animal production systems, the transgenic mammary gland is the most advanced. However, the production of proteins in milk is limited by a relatively long interval from birth to first lactation encountered with domestic livestock, the discontinuous nature of the lactation cycle and the substantial time and material investments required to produce transgenic dairy animals. The semen of transgenic boar represents an alternative platform for the production of therapeutic proteins. The expression of such proteins in the male accessory glands, particularly in the seminal vesicle epithelium can be controlled by gene regulatory sequences specific to these tissues. In this review, we consider the possibility of using such regulatory sequences to drive the production of foreign proteins into the seminal fluids of transgenic animals. Application of this technology to pigs which can be ejaculated 2-3 times per week (200-300 ml per ejaculate), could lead to the annual production of several grams of recombinant protein.

Key words:

transgenesis, bioreactor, secretory proteins, transgenic animals.

Adres do korespondencji

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

1. Wstęp

Transgeneza zwierząt jest przedmiotem zainteresowania laboratoriów biotechnologicznych na całym świecie, ze względu na możliwość wykorzystania transgenicznych zwierząt gospodarskich do produkcji aktywnych biologicznie peptydów i białek,

które mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób człowieka. W tym celu zwierzęta modyfikuje się genetycznie za pomocą konstrukcji genowych zawierających oprócz sekwencji genu kodującego określone białko, specyficzne sekwencje regulatorowe, ograniczające ekspresję transgenu do określonego typu tkanki i odpowiedniego stadium rozwoju organizmu. Po wprowadzeniu konstrukcji genowej do komórek eukariotycznych i jej integracji z genomowym DNA, transgen ulega ekspresji *in vivo* nadając organizmom nową cechę. Komórki zwierzęce w przeciwieństwie do innych systemów produkcji rekombinowanych białek, potrafią wystarczająco dokładnie wykonać wszystkie skomplikowane modyfikacje potranslacyjne, aby powstała funkcjonalna forma białka, która normalnie występuje w organizmie człowieka. Wykorzystanie komórek zwierzęcych pozwala również uniknąć zagrożenia ze strony niektórych patogenów, tj. wirus HIV czy wirus żółtaczkowy typu C, występującego w przypadku białek pozyskiwanych z naturalnych źródeł ich występowania. Biofarmaceutyki można produkować w krwi, mleku, moczu oraz nasieniu transgenicznych zwierząt.

Najbardziej zaawansowane prace nad wykorzystaniem zwierząt do produkcji biofarmaceutyków dotyczą wykorzystania gruczołu mlekowego. Kilka takich białek produkowanych w gruczołach mlekowych transgenicznych zwierząt, tj. antytrombina III, α_1 -antytrypsyna, tkankowy aktywator plazminogenu, α -glukozydaza i laktoferyna przechodzi już zaawansowane testy kliniczne i w najbliższych latach pojawi się na rynku. Ponieważ wykorzystanie gruczołu mlekowego do produkcji białek terapeutycznych ograniczone jest do okresu laktacji, rozważa się możliwość wykorzystania innych tkanek. Względnie długi okres pomiędzy narodzinami a pierwszą laktacją, cykliczna natura laktacji oraz wysokie nakłady, które należy ponieść na uzyskanie dużych zwierząt gospodarskich można zniwelować przez wykorzystanie do produkcji biofarmaceutyków mniejszych zwierząt gospodarskich, np. królika. Jednakże ilość mleka, jaką można uzyskać od tych zwierząt oraz konieczność utrzymania dużej liczby zwierząt w hodowli ogranicza ich zastosowanie do produkcji białek, na które zapotrzebowanie nie przekracza 1 kg rocznie (1). Ponadto niektóre aktywne biologicznie białka, produkowane w mleku w dużym stężeniu, mogą mieć niekorzystny wpływ na zdrowie zwierząt (2,3), co uniemożliwia ich produkcję w gruczołach mlekowych na skalę przemysłową. Problemem może być również oczyszczenie rekombinowanego białka z mleka. Obecne w mleku micelle kazeinowe oraz globulki tłuszczu utrudniają stosowanie standardowych metod separacji białek. Alternatywą dla pozyskiwania białek terapeutycznych w mleku zwierząt gospodarskich jest wykorzystanie nasienia.

Narządy rozrodcze dojrzałych płciowo samców zwierząt gospodarskich składają się z parzystych jąder (produkujących plemniki i wydzielających androgeny) i jądrzy leżących w worku mosznowym, nasieniowodów, gruczołów płciowych dodatkowych (dostarczających płynu i czynników odżywczych dla utrzymania i odżywiania plemników) i narządu kopolacyjnego – prącia, przez które przebiega ostatni odcinek dróg wyprowadzających plemniki – cewka moczowa. Gruczoły płciowe

dotatkowe stanowią parzyste gruczoły pęcherzykowe (pęcherzyki nasienne) i banieczkowe uchodzące do końcowego odcinka nasieniowodu, oraz gruczoł krokowy i parzysty gruczoł opuszkowo-cewkowy (Cowpera) uchodzące do cewki moczowej. Nasienie (sperma) składa się z plemników oraz plazmy (osocza nasienia) stanowiącej wydzielinę gruczołów dodatkowych oraz nabłonków wyścielających drogi wyprowadzające plemniki. Nasienie pochodzące z jednego wytrysku zwane jest ejakulatem.

Niewątpliwą zaletą nasienia jako źródła białek terapeutycznych jest obfitość i łatwość pozyskiwania, zwłaszcza u niektórych gatunków zwierząt np. świń (tab.). Świnia, w porównaniu z innymi zwierzętami gospodarskimi ma kilka zalet – ciąża trwa 114 dni, odstęp międzypokoleniowy tylko 12 miesięcy, a liczba prosiąt w miocie sięga zazwyczaj 10-12. Od knura można uzyskać 2-3 razy w tygodniu, 200-300 ml ejakulatu, zawierającego 37 mg/ml białka. W ciągu roku od transgenicznej świni produkującej rekombinowane białko w ilości 1 mg/ml można uzyskać 22,4 g produktu.

Tabela

Charakterystyka nasienia i ejakulatu wybranych gatunków zwierząt gospodarskich (<http://www.ansi.okstate.edu>)

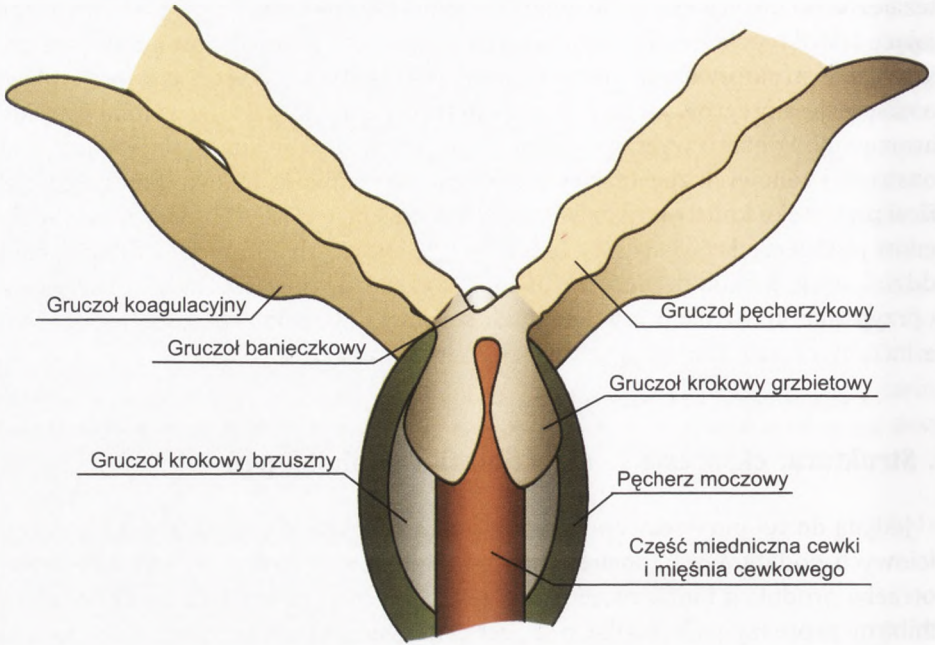
| Gatunek zwierzęcia | Objętość ejakulatu (ml) | Liczba ejakulatów/tydz. | Dojrzałość płciowa (mies.) | Ilość białka (g/100 ml) |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|
| buhaj | 4-6 | 4-6 | 10-12 | 6,8 |
| tryk | 1-2 | 6-20 | 4-6 | 5,0 |
| knur | 200-300 | 2-3 | 4-8 | 3,7 |
| ogier | 60-100 | 3-5 | 13-18 | 1-2 |

Wektory kierujące ekspresją transgenu w danej tkance lub wszystkich tkankach muszą zawierać odpowiednie regiony regulatorowe. W przypadku konstrukcji genowych mających ulegać ekspresji w tkankach wydzielających rekombinowane białko do płynu nasiennego zwierząt transgenicznych możliwe jest zastosowanie sekwencji regulatorowych genów kodujących białka specyficzne dla komórek gruczołów płciowych dodatkowych. Zastosowanie regionów regulatorowych tych genów pozwoliłoby ograniczyć ekspresję transgenu do komórek gruczołu krokowego oraz pęcherzyków nasiennych. W związku z tym obecność obcych białek w płynie nasiennej nie powinna wpływać na organizm zwierzęcia. Niekiedy jednak obserwuje się nieuprawnioną (ektopową) ekspresję w tkankach innych niż tkanki gruczołu krokowego (4). Wektory ekspresyjne powinny zawierać również inne sekwencje regulatorowe umożliwiające kontrolę ekspresji transgenu. W zależności od miejsca wbudowania, ten sam transgen wykazuje inną aktywność transkrypcyjną. Jest to tzw. efekt położenia na chromosomie (PEV, ang. *position effect variegation*). Aby temu zapobiec można zastosować w konstrukcjach genowych sekwencje regulacyjne typu LCR (ang. *locus control region*) (5) i MAR (ang. *matrix attachment regions*) (6), umożliwiające

niezależną od pozycji ekspresję genu. Regiony LCR zawierają liczne elementy wzmacniające transkrypcję genów znajdujących się pod ich kontrolą lub indukujące przekształcanie struktury chromatyny. Regiony połączenia z macierzą jądrową wpływają na ekspresję zintegrowanego z genomem transgeny modyfikując stabilną strukturę chromatyny. Ponadto wyższy poziom ekspresji obserwuje się częściej w przypadku konstrukcji genowych zawierających sekwencję genomową rekombinowanego białka niż w przypadku konstrukcji zawierających sekwencje cDNA (7). Większość ludzkich genów jest nieciągła: składa się z eksonów, zawierających informację kodującą białko, oddzielonych niekodującymi intronami. Wyższy poziom ekspresji obserwowany w przypadku konstrukcji zawierających sekwencje genomowe może wynikać stąd, że introny często zawierają sekwencje regulatorowe (8).

2. Struktura, ekspresja i rola fizjologiczna białka p12

Jedyną do tej pory sekwencją regulatorową specyficzną dla komórek gruczołów płciowych dodatkowych, analizowaną pod kątem możliwości jej wykorzystania na potrzeby produkcji biofarmaceutyków jest sekwencja promotora genu kodującego inhibitor proteazy p12. Białko p12 jest pojedynczym polipeptydem zbudowanym z 57 aminokwasów. Jego pierwszorzędowa struktura została określona na podstawie sekwencji cDNA wyizolowanego z dojrzałego płata gruczołu krokowego myszy (9). Fizjologiczna rola inhibitora proteazy p12 nie jest do końca poznana. Na podstawie sekwencji nukleotydowej genu *p12* oraz wydedukowanej na jej podstawie struktury I-rzędowej białka stwierdzono duże podobieństwo białka p12 do wydzielniczych inhibitorów proteaz należących do rodziny Kazal, a szczególnie do trzustkowych inhibitorów tripsyny. Białka te inaktywują tripsynę powstającą w wyniku aktywacji tripsynogenu, co zapobiega trawieniu własnych tkanek. Sugeruje się, że inhibitor proteazy p12 chroni nabłonek układu rozrodczego przed jego proteolitycznym zniszczeniem lub/i reguluje reakcję akrosomalną podczas procesu zapłodnienia lub bierze udział w neutralizacji akrozyny po jej aktywacji. Reakcja akrosomalna jest procesem zależnym od stężenia jonów Ca^{2+} . Sugeruje się, że inhibitor p12 może zapobiegać przedwczesnej reakcji akrosomalnej hamując pobieranie jonów Ca^{2+} przez plemniki (10). Akrozyna jest serynową proteazą występującą w akrosomie plemnika w postaci enzymatycznie nieaktywnej proakrozyny, aktywowanej do formy dojrzałej podczas reakcji akrosomalnej. Dzięki aktywności proteolitycznej zaangażowana jest w proteolizę osłonki przejrzystej i pokonanie przez plemnik bariery osłonki. Drugą funkcją przypisywaną akrozynie jest jej zdolność do zatrzymania na powierzchni komórki jajowej plemników, w których doszło do reakcji akrosomalnej. Jednakże, całkowity brak aktywności enzymu u myszy homozygotycznych z mutacją w *locus* genu akrozyny (*Acr⁻¹*) nie prowadzi do niepłodności. Rola akrozyny w procesie zapłodnienia oraz rola inhibitora proteazy p12 wymagają dalszych wyjaśnień.



Rys. Gruczoły płciowe dodatkowe samca myszy.

U myszy gruczoł krokowy dzieli się na kilka płatów (rys.) (11), różniących się m. in. rodzajem dostarczanych do płynu nasiennego białek (12). W gruczole koagulacyjnym w porównaniu z innymi płatami gruczolu krokowego obserwuje się wysoki poziom ekspresji genów *Plac8* (ang. *placenta specific 8*), *RNAse1* (ang. *ribonuclease 1*) oraz *Eapa1* (ang. *experimental autoimmune prostatitis antigen*). W płacie dogrzebiotowobocznym (ang. *dorsolateral prostate*) szczególnie wysoki poziom ekspresji cechuje geny kodujące białko *Ramp2* (ang. *receptor activity modifying protein 2*) oraz białko podobne do białka pęcherzyka akrosomalnego 1. Inhibitor proteazy p12 (13,14) o masie cząsteczkowej 6 kDa (15) jest obok białka wiążącego sperminę, p25 (ang. *spermine-binding protein*) (16) o masie cząsteczkowej 25 kDa, głównym białkiem wydzielanym przez dobrzuszny płat gruczolu krokowego (ang. *ventral prostate*). Ekspresję genu p12 u myszy obserwuje się również w gruczole koagulacyjnym (ang. *coagulating gland*), pęcherzykach nasiennych (ang. *seminal vesicle*) oraz trzustce (13). Ekspresja genu p12 w trzustce jest konstytutywna, natomiast w płacie dobrzuszным gruczolu krokowego, gruczole koagulacyjnym oraz pęcherzykach nasiennych jest stymulowana testosteronem (13). Testosteron jest androgenem, którego wpływ, razem z estrogenami i prolaktyną, na wydzielanie gruczołów płciowych dodatkowych u samców został dobrze poznany.

3. Regulacja ekspresji genu *p12*

W komórkach eukariotycznych aktywność transkrypcyjna zależy od interakcji konstytutywnych oraz komórkowospecyficznych czynników transkrypcyjnych z leżącymi powyżej regulowanego genu pozytywnymi i negatywnymi elementami działającymi w układzie *cis*. Niektóre elementy regulatorowe, tj. blok TATA, blok CCAAT czy blok GC leżące w pobliżu miejsca startu inicjacji transkrypcji tworzą promotor podstawowy, stanowiący miejsce składania kompleksu inicjacyjnego. Elementy regulatorowe działające w układzie *cis*, położone powyżej promotora podstawowego, do których zaliczamy sekwencje zwane wzmocniaczami (ang. *enhancer*) i wyciszaczami (ang. *silencer*), decydują o tym, w których komórkach i na jakim etapie ich rozwoju ma dochodzić do ekspresji regulowanego genu.

W obrębie sekwencji promotora genu *p12* zidentyfikowano kilka elementów regulatorowych (17). W pozycji -31 występuje sekwencja TATA, w pozycjach -69, -73, -360 oraz -762 sekwencje CCAAT, a w pozycji -926 miejsce wiązania glukokortykoidów, progesteronu i androgenów (17). W obrębie mysiego promotora *p12*, w regionie od -45 do -66, pomiędzy sekwencjami bloku TATA i CCAAT zidentyfikowano również miejsce (p12.A) wiązania pozytywnego czynnika transkrypcyjnego działającego w układzie *trans* (18). Tym pozytywnym czynnikiem transkrypcyjnym jest czynnik Sp1 (19). Miejsce wiązania p12.A (5'-GTGGGTGGAG-3') charakteryzuje się wysokim stopniem homologii z sekwencją konsensusową 5'-G/T_G/A_GGGCG_T^G/A_G^G/A_C/T-3' opisaną dla czynnika Sp1. Ponieważ ekspresja genu *p12* jest ograniczona do kilku rodzajów tkanek, powyżej promotora podstawowego powinny być obecne działające w układzie *cis* sekwencje wyciszające ekspresję genu *p12* w pozostałych rodzajach tkanek. Tego rodzaju sekwencje zlokalizowano w regionie promotora *p12* w pozycji od -394 do -843 oraz od -66 do -212 (18). Delecja regionu o wielkości 449 pb obejmującego nukleotydy od -394 do -843 prowadzi do 5-krotnego wzrostu aktywności promotora w komórkach GH4C1 oraz COS-1. Sekwencja leżąca pomiędzy -133 a -212 (79 pb) nukleotydem jest miejscem wiązania pozytywnego czynnika transkrypcyjnego w komórkach GH4C1 oraz negatywnego czynnika transkrypcyjnego w komórkach COS-1. Prawdopodobnie na terenie tego obszaru leżą bardzo blisko siebie lub nawet częściowo na siebie nachodzą dwie różne sekwencje wiążące dwa odrębne czynniki transkrypcyjne. W regionie pomiędzy -970 a -4000 zlokalizowane są inne, dużo słabsze sekwencje wiążące negatywne czynniki transkrypcyjne.

4. Ekspresja genów znajdujących się pod kontrolą promotorów genów specyficznych dla gruczołu krokowego u zwierząt transgenicznym

W 1999 r. udało się uzyskać pierwsze transgeniczne zwierzęta, wydzielające do płynu nasiennego rekombinowane białko (4). Dyck i wsp. zastosowali konstrukcję genową zawierającą gen kodujący hormon wzrostu człowieka pod kontrolą sekwencji

cji regulatorowej o długości 4,0 kpz genu *p12* myszy. Uzyskano dwie linie zwierząt, które przekazywały transgen potomstwu. Poziom ekspresji u potomstwa był zachowany. Ekspresja wprowadzonego genu miała miejsce w pęcherzykach nasiennych oraz nerkach transgenicznym samców oraz w nerkach transgenicznym samic. U jednej linii poziom ekspresji hormonu wzrostu w pęcherzykach nasiennych był o dwa rzędy wielkości wyższy niż w nerkach, a u drugiej w nerkach trzykrotnie wyższy niż w pęcherzykach nasiennych. Nie zaobserwowano ekspresji transgenu w trzustce mimo obserwowanego wcześniej w tej tkance konstytutywnego poziomu ekspresji endogennego genu *p12* (13). W surowicy transgenicznym zwierząt zaobserwowano obecność hGH w stężeniu wynoszącym kilkaset ng/ml. Obecność hormonu wzrostu w surowicy transgenicznym samic nie miała negatywnego wpływu na płodność samic, co sugerowano we wcześniejszych doniesieniach (20). Waga transgenicznym zwierząt w wieku 12 tygodni była odpowiednio 23 i 77% wyższa w porównaniu z myszami nietransgenicznymi, co było ściśle związane ze stężeniem hormonu w surowicy. Źródłem hormonu wzrostu w surowicy jest nerka. Hormon wzrostu produkowany w pęcherzykach nasiennych nie przedostaje się do krwiobiegu, o czym świadczy fakt, że poziom hormonu w surowicy nie zmienia się w 12 tygodniu życia myszy, gdy gwałtownie rośnie jego poziom w pęcherzykach nasiennych. W nasieniu transgenicznym myszy udało się uzyskać hormon wzrostu człowieka w ilości około 0,5 mg/ml. Dla porównania jest to ilość wielokrotnie wyższa niż ilość hormonu wzrostu produkowanego w moczu transgenicznym myszy (100-500 ng/ml) (21).

Wiele zespołów badawczych na całym świecie prowadzi intensywne badania dotyczące wykorzystania specyficznych dla gruczołu krokowego sekwencji regulatorowych w terapii genowej raka prostaty. Sekwencje promotorów, które mogą kierować ekspresją genów terapeutycznych, można również wykorzystać do produkcji rekombinowanym białek. Najbardziej obiecujące wyniki dotyczą promotora genu *PB* (ang. *probasin*) oraz promotora genu *PSA* (ang. *prostate specific antigen*). Krótki fragment promotora *PB* szczura (od -426 do +28 pz) ogranicza ekspresję znajdującego się pod jego kontrolą bakteryjnego genu kodującego acetylotransferazę chloramfenikolu (CAT, ang. *chloramphenicol acetyl transferase*) do komórek nabłonka gruczołu krokowego (22). Jednakże, poziom ekspresji transgenu był niewielki (22). Podobna konstrukcja zawierająca długi fragment promotora *PB* o wielkości 12 kpz pozwoliła uzyskać wielokrotnie wyższy poziom ekspresji genu *CAT* (23).

Specyficzną dla komórek gruczołu krokowego ekspresję transgenu uzyskano u transgenicznym myszy dzięki zastosowaniu promotora genu *PSA* człowieka o wielkości 6 kpz kierującego ekspresją bakteryjnego genu kodującego β -galaktozydazę (24). Podobny wynik uzyskano przy zastosowaniu regionu o wielkości 14 kpz obejmującego genomową sekwencję kodującą gen *PSA* człowieka wraz z sekwencjami flankującymi (25). W obrębie promotora podstawowego genu *PSA* o długości 632 pz zidentyfikowano oprócz sekwencji bloku TATA i GC, miejsca wiążące androgen ARE-I oraz ARE-II (AREs, ang. *androgen response elements*), odpowiednio w pozycji -170 i -394 (26,27). Powyżej promotora podstawowego zlokalizowano sekwencję

wzmacniającą (440 pz) położoną ok. 4 kbp powyżej miejsca startu transkrypcji, zawierającą kolejne miejsce wiążące androgen (ARE-III) (28).

5. Podsumowanie

Chociaż dotychczasowe wyniki badań dotyczących wykorzystania komórek gruczołów płciowych dodatkowych do produkcji biofarmaceutyków są bardzo zachęcające, dalsze prace w tym kierunku będą wymagać wytworzenia dużo większej liczby zwierząt transgenicznych i ich oceny, zanim znajdą zastosowanie praktyczne. Prowadzone w tym zakresie badania ograniczone były do tej pory do zwierząt laboratoryjnych (mysz, szczur). Dlatego też nie wiadomo czy wyniki uzyskane w przypadku zwierząt laboratoryjnych da się w prosty sposób ekstrapolować na zwierzęta gospodarskie tym bardziej, że nasienie poszczególnych gatunków zwierząt może mieć różny profil białkowy. Skład plazmy nasienia zależy od stopnia rozwoju poszczególnych gruczołów płciowych dodatkowych, udziału w nim wydzielin z poszczególnych narządów układu rozrodczego oraz objętości, jaką zajmują plemniki. Na przykład białka wydzielane przez gruczoły pęcherzykowe knura stanowią 80-90% wszystkich białek plazmy nasienia (29), podczas gdy u buhaja wydzieliny gruczołów pęcherzykowych stanowią około 50% objętości nasienia. Wybór sekwencji promotora powinien uwzględniać różnice gatunkowe. Ponieważ nie poznano jeszcze wszystkich białek występujących w nasieniu, istnieje również możliwość odkrycia innych specyficznych dla nasienia sekwencji regulatorowych, za pomocą których udałoby się uzyskać jeszcze większą ilość obcych białek.

Literatura

1. Houdebine L. M., (1995), *Reprod. Nutr. Dev.*, 35, 609-617.
2. Massoud M., Attal J., Thepot D., Pointu H., Stinnakre M. G., Theron M. C., Lopez C., Houdebine L. M., (1996), *Reprod. Nutr. Dev.*, 36, 555-563.
3. Palmer C. A., Lubon H., McManaman J. L., (2003), *Transgenic Res.*, 12, 283-292.
4. Dyck M. K., Gagne D., Ouellet M., Senechal J. F., Belanger E., Lacroix D., Sirard M. A., Pothier F., (1999), *Nat. Biotechnol.*, 17, 1087-1090.
5. Chow C. M., Athanassiadou A., Raguz S., Psiouri L., Harland L., Malik M., Aitken M. A., Grosveld F., Antoniou M., (2002), *Gene Ther.*, 9, 327-336.
6. Sperry A. O., Blasquez V. C., Garrard W. T., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 5497-5501.
7. Niemann H., Kues W. A., (2003), *Anim. Reprod. Sci.*, 79, 291-317.
8. Razin S. V., Farrell C. M., Recillas-Targa F., (2003), *Int. Rev. Cytol.*, 226, 63-125.
9. Mills J. S., Needham M., Thompson T. C., Parker M. G., (1987), *Mol. Cell Endocrinol.*, 53, 111-118.
10. Coronel C. E., Winnica D. E., Novella M. L., Lardy H. A., (1992), *J. Biol. Chem.*, 267, 20909-20915.
11. Jesik C. J., Holland J. M., Lee C., (1982), *Prostate*, 3, 81-97.
12. Abbott D. E., Pritchard C., Clegg N. J., Ferguson C., Dumpit R., Sikes R. A., Nelson P. S., (2003), *Genome Biol.*, 4, 79.
13. Mills J. S., Needham M., Parker M. G., (1987), *EMBO J.*, 6, 3711-3717.
14. Mirosevich J., Bentel J. M., Dawkins J. S., (2001), *J. Androl.*, 22, 449-457.

15. Chen L. Y., Lin Y. H., Lai M. L., Chen Y. H., (1998), *Biol. Reprod.*, 59, 1498-1505.
16. Mills J. S., Needham M., Parker M. G., (1987), *Nucleic Acids Res.*, 15, 7709-7724.
17. Needham M., Mills J. S., Parker M. G., (1988), *Nucleic Acids Res.*, 16, 6229.
18. Guerin S. L., Pothier F., Robidoux S., Gosselin P., Parker M. G., (1990), *J. Biol. Chem.*, 265, 22035-22043.
19. Robidoux S., Gosselin P., Harvey M., Leclerc S., Guerin S. L., (1992), *Mol. Cell Biol.*, 12, 3796-3806.
20. Cecim M., Kerr J., Bartke A., (1995), *Biol. Reprod.*, 52, 1144-1148.
21. Kerr D. E., Liang F., Bondioli K. R., Zhao H., Kreibich G., Wall R. J., Sun T. T., (1998), *Nat. Biotechnol.*, 16, 75-79.
22. Greenberg N. M., DeMayo F. J., Sheppard P. C., Barrios R., Lebovitz R., Finegold M., Angelopoulou R., Dodd J. G., Duckworth M. L., Rosen J. M., (1994), *Mol. Endocrinol.*, 8, 230-239.
23. Yan Y., Sheppard P. C., Kasper S., Lin L., Hoare S., Kapoor A., Dodd J. G., Duckworth M. L., Matusik R. J., (1997), *Prostate*, 32, 129-139.
24. Cleutjens K. B., van der Korput H. A., van Eekelen C. C., van Rooij H. C., Faber P. W., Trapman J., (1997), *Mol. Endocrinol.*, 11, 148-161.
25. Wei C., Willis R. A., Tilton B. R., Looney R. J., Lord E. M., Barth R. K., Frelinger J. G., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 6369-6374.
26. Riegman P. H., Vlietstra R. J., van der Korput J. A., Brinkmann A. O., Trapman J., (1991), *Mol. Endocrinol.*, 5, 1921-1930.
27. Cleutjens K. B., van Eekelen C. C., van der Korput H. A., Brinkmann A. O., Trapman J., (1996), *J. Biol. Chem.*, 271, 6379-6388.
28. Cleutjens K. B., van der Korput H. A., Ehren-van Eekelen C. C., Sikes R. A., Fasciana C., Leland W., Chung L. W., Trapman A., (1997), *Mol. Endocrinol.*, 11, 1256-1265.
29. Lavon U., Bournsnel J. C., (1971), *J. Reprod. Fertil.*, 27, 227-232.