



MBK

ÁLLATBIOTECHNOLÓGIA FŐOSZTÁLY

ALKALMAZOTT EMBRIOLÓGIA ÉS ÖSSEJTKUTATÓ CSOPORT

Gócza Elen, DSc
csoportvezető, tudományos tanácsadó

10:15-11:45

SZÜNET 11:45-12:00

12:00-13:00

Előzmények

ELTE TTK, Gödi Biológiai Állomás, Embriológiai Laboratórium (1984-1995)

- Egér ESC létrehozás módszerének kidolgozása
- Tetraploid aggregációs kiméra technika kidolgozása
- Egér embrionális őssejt eredetű utódok létrehozása

NAIK, MBK, ÁBSZ, AES (1996-)

- Transzgénikus egér és nyúl ESC vonalak létrehozása



NAIK MBK ÁB

❖ Nyúl mint modellállat

- ❖ Korai embrionális fejlődés vizsgálata
- ❖ Betegség modell - cukorbetegség, szív rendellenesség, érelmeszesedés
- ❖ Bioreaktor - tejbe kiválasztható biológiailag aktív fehérjék

❖ Transzgenezis ES sejteket felhasználva

- ❖ Célzott genetikai módosítások létrehozása lehetséges
 - ❖ Szövetspecifikus, időben szabályozható módosítások
- ## ❖ Madár ősvarsejtek tenyésztése, kimérák létrehozása



Transzgénikus állatok előállítási lehetőségei

DNS mikroinjektálás

Spermium közvetített génbevitel

Retrovírus közvetített génbevitel

Lentivírus közvetített génbevitel

Transzpozon-transzpozász rendszer felhasználásával

Minikromoszómák felhasználásával

DNS injektálás spermatogóniumba

Transzgénikus SC és ES sejtekből magátültetéses klónozással

Célzott génbevitel transzgénikus ES sejtvonalak felhasználásával

Transzgénikus spermatogóniális őssejtek beültetésével

Genom szerkesztés - ZFN, TALEN, CRISPR/CAS9



Transzgénikus állatok előállítási lehetőségei

DNS mikroinjektálás

Spermium közvetített génbevétel

Retrovírus közvetített génbevétel

Lentivírus közvetített génbevétel

Transzpozon-transzpozász rendszer felhasználásával

Minikromoszómák felhasználásával

DNS injektálás spermatogóniumba

Transzgénikus SC és ES sejtekből magátültetési klónozással

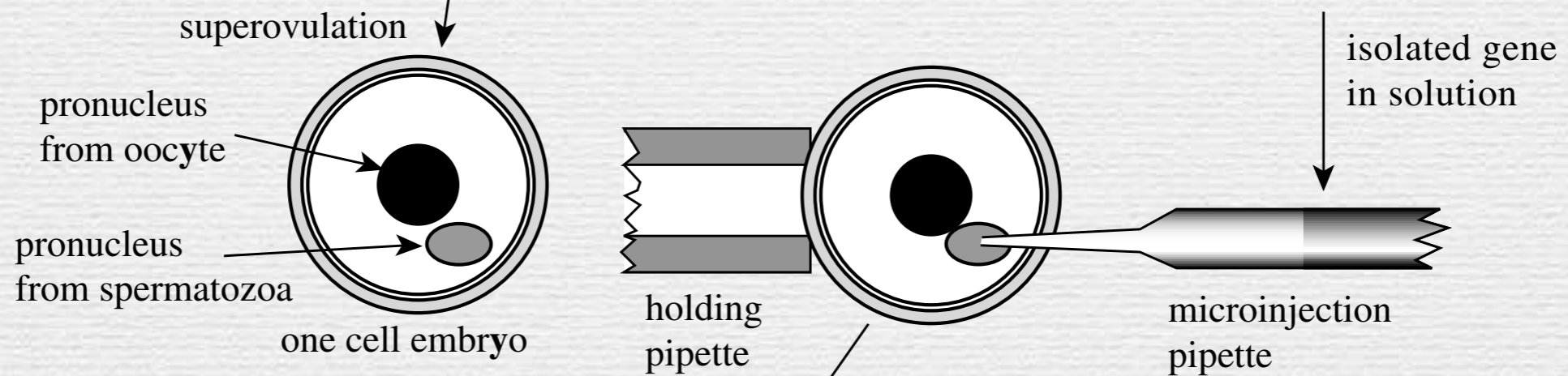
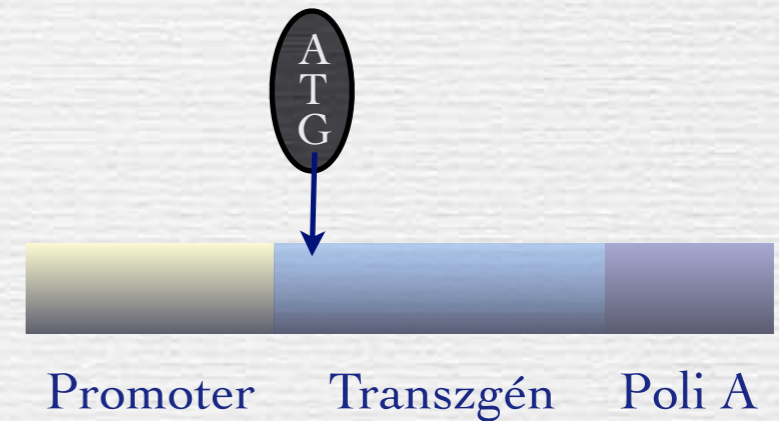
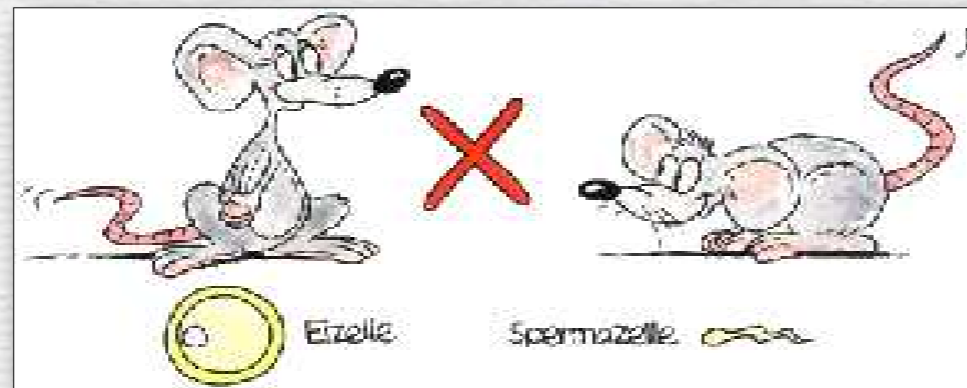
Célzott génbevétel transzgénikus ES sejt vonalak felhasználásával

Transzgénikus spermatogóniális őssejtek beültetésével

Genom szerkesztés - ZFN, TALEN, CRISPR/CAS9



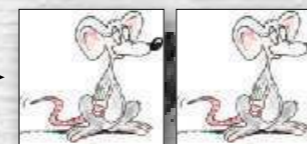
Transzgénikus egerek előállítása mikro-injektálással



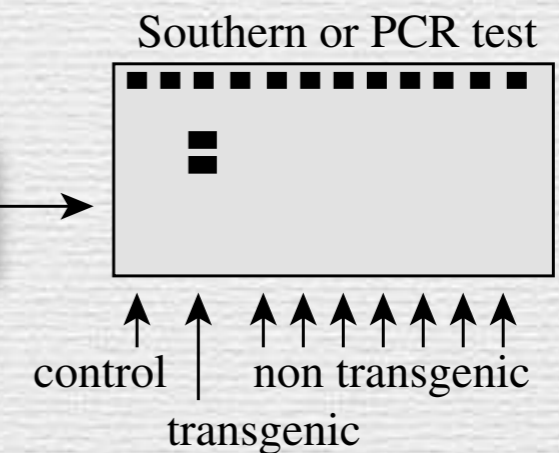
embryo implantation into oviduct of pseudopregnant female



♀



offspring



Transzgen mikroinjektálása egy sejt embrióba



Transzgénikus állatok előállítási lehetőségei

DNS mikroinjektálás

Spermium közvetített génbevétel

Retrovírus közvetített génbevétel

Lentivírus közvetített génbevétel

Transzpozon-transzpozász rendszer felhasználásával

Minikromoszómák felhasználásával

DNS injektálás spermatogóniumba

Transzgénikus SC és ES sejtekből magátültetéses klónozással

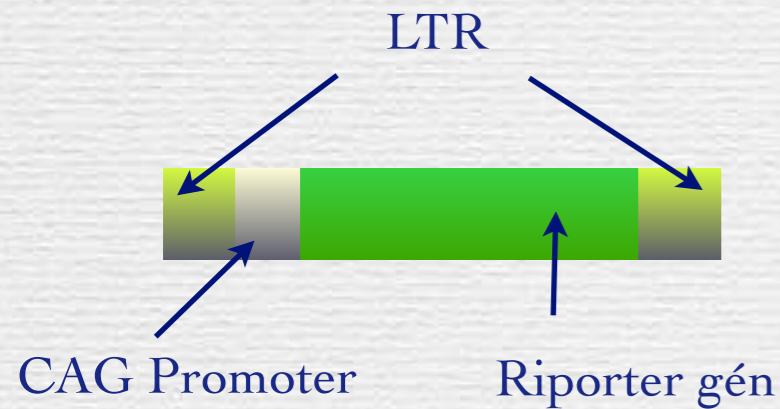
Célzott génbevétel transzgénikus ES sejt vonalak felhasználásával

Transzgénikus spermatogóniális őssejtek beültetésével

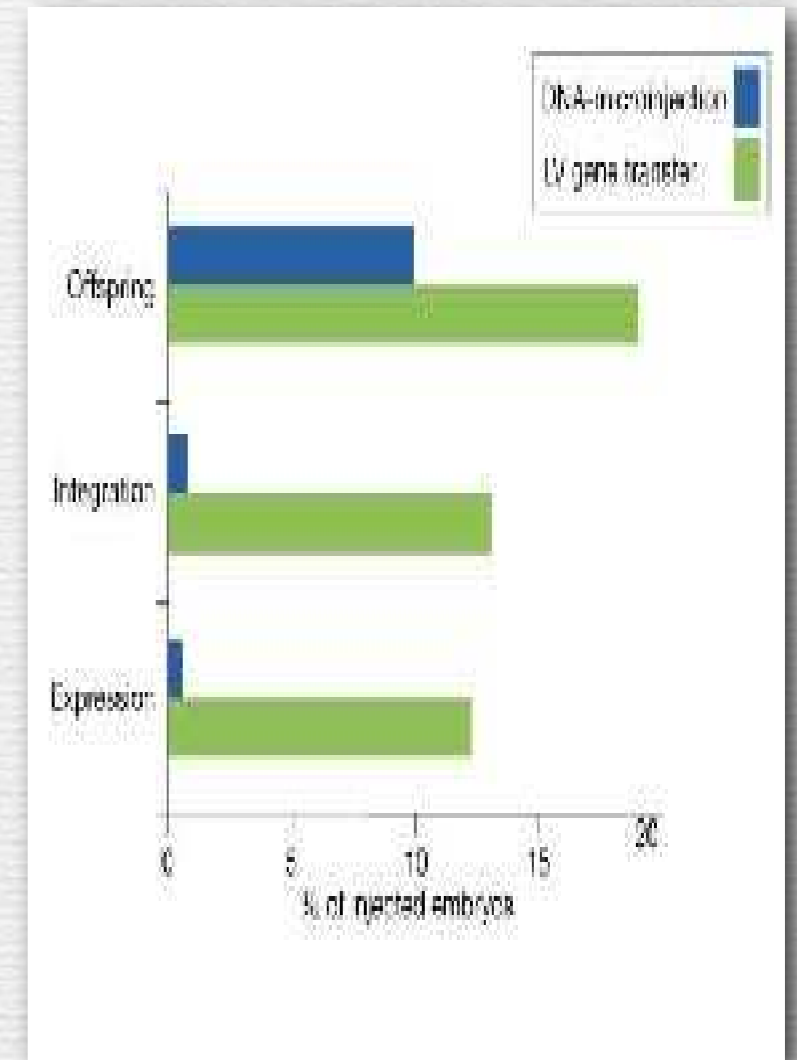
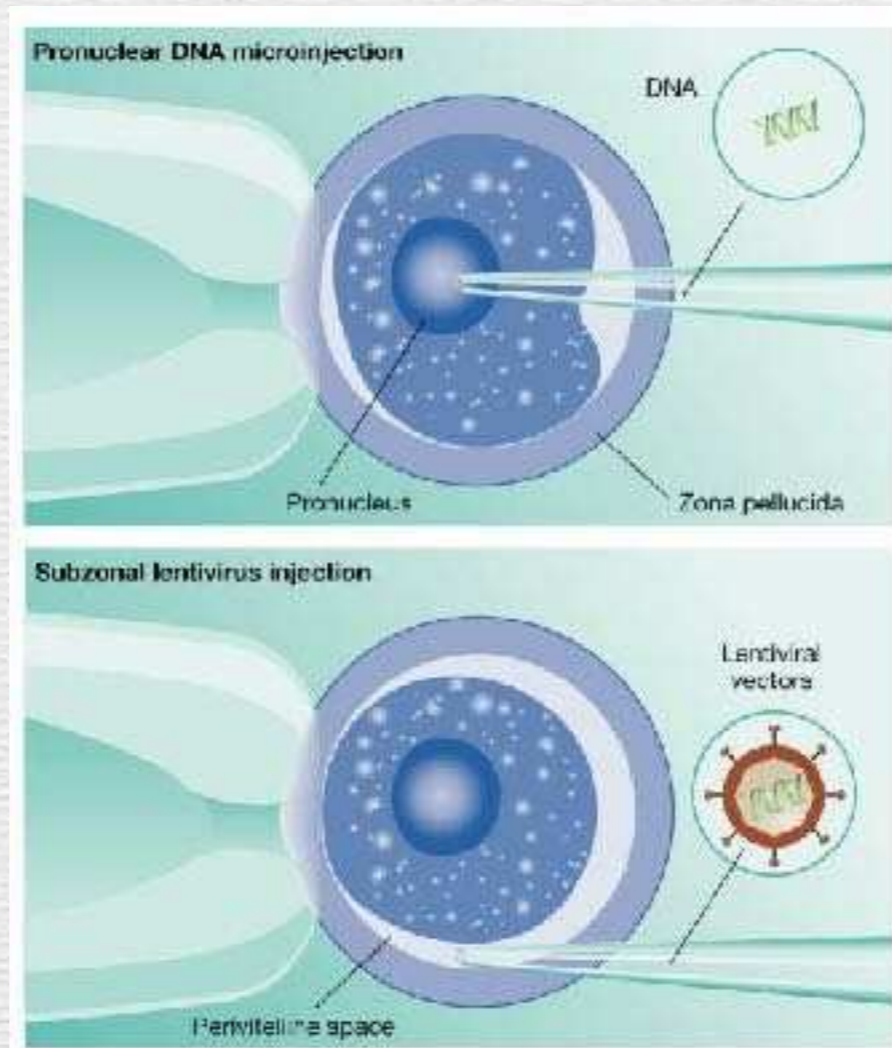
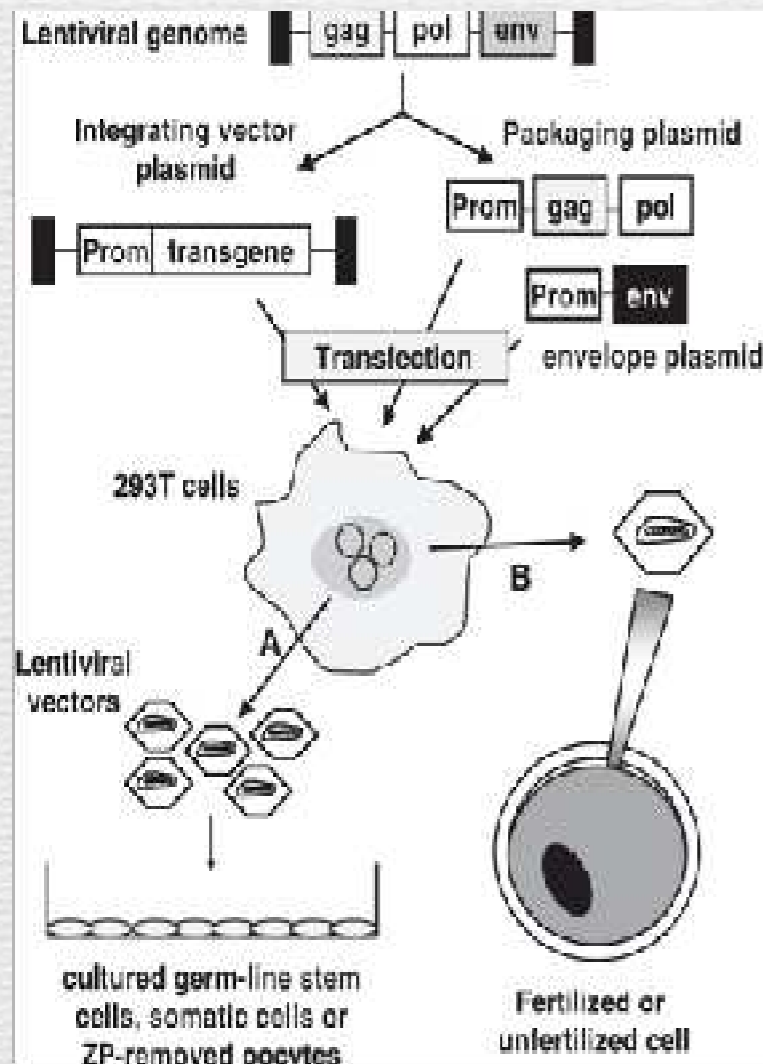
Genom szerkesztés - ZFN, TALEN, CRISPR/CAS9



Transzgénikus egerek előállítása lenti vírus vektor (LV) transzdukcióval

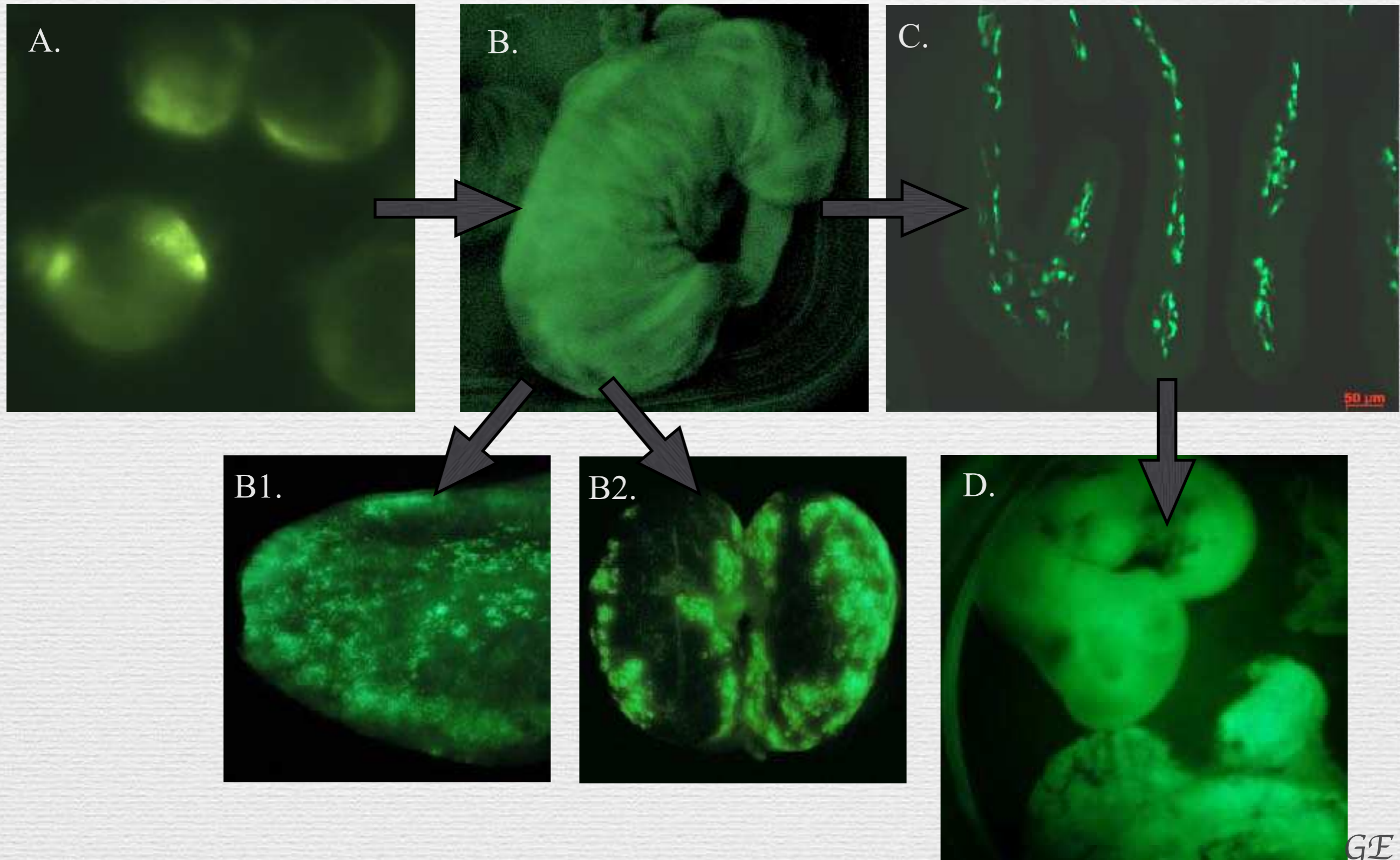


DNS és LV injektálás módszerének összehasonlítása



DNS és LV injektálás hatékonyságának összehasonlítása (sertés)

Transzgénikus nyulak előállítása lenti vírus vektor transzdukcióval





Transzgénikus állatok előállítási lehetőségei

DNS mikroinjektálás

Spermium közvetített génbevitel

Retrovírus közvetített génbevitel

Lentivírus közvetített génbevitel

Transzpozon-transzpozász rendszer felhasználásával

Minikromoszómák felhasználásával

DNS injektálás spermatogóniumba

Transzgénikus SC és ES sejtekből magátültetéses klónozással

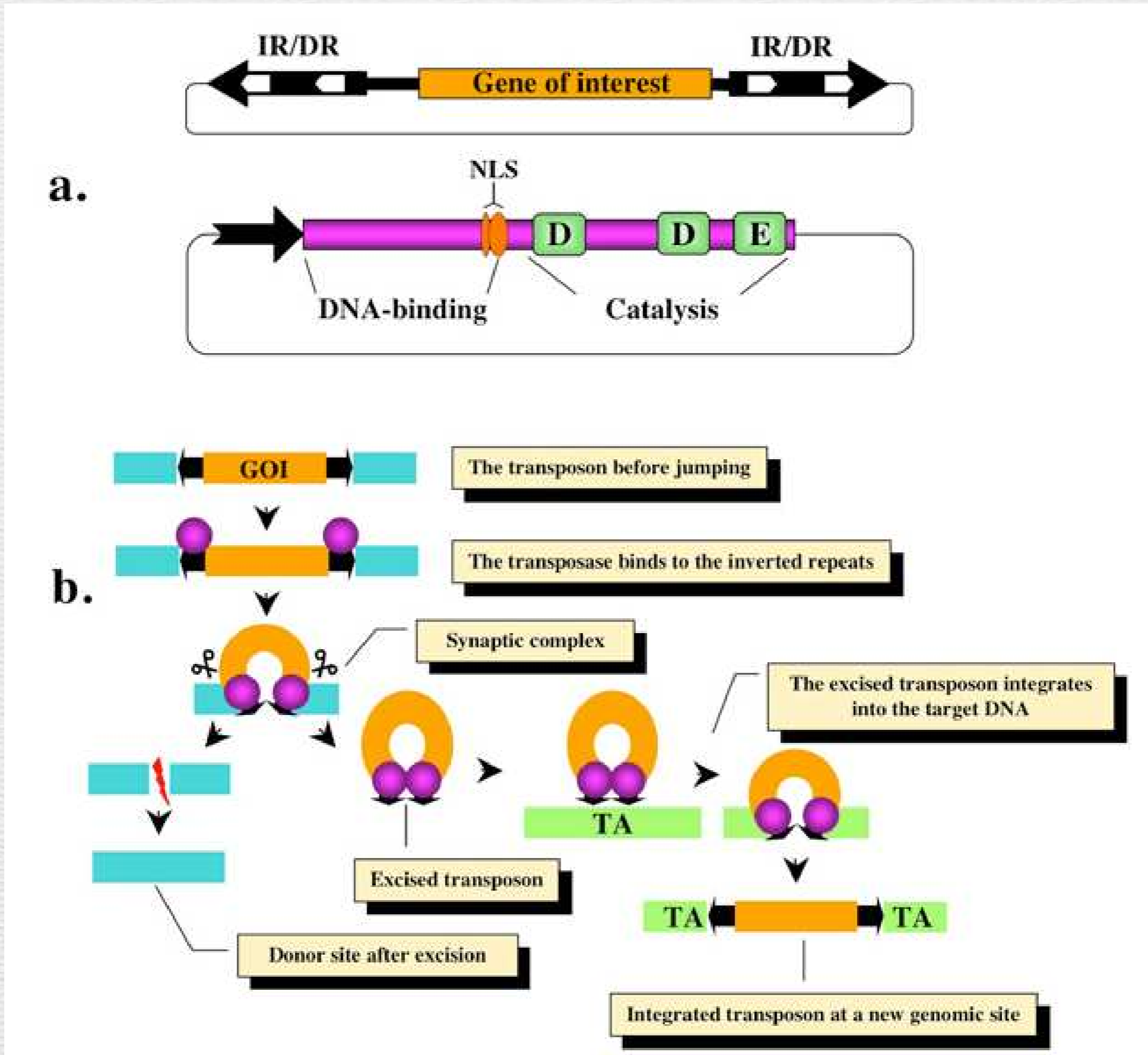
Célzott génbevitel transzgénikus ES sejtvonalak felhasználásával

Transzgénikus spermatogóniális őssejtek beültetésével

Genom szerkesztés - ZFN, TALEN, CRISPR/CAS9



Transzpozon közvetített génbevitel





Transzgénikus nyulak Venusz-”Sleeping Beauty” (SB 100x) transzozon-transzáz konstrukció injektálása után

Transzgénikus állatok előállítási lehetőségei

DNS mikroinjektálás

Spermium közvetített génbevitel

Retrovírus közvetített génbevitel

Lentivírus közvetített génbevitel

Transzpozon-transzpozász rendszer felhasználásával

Minikromoszómák felhasználásával

DNS injektálás spermatogóniumba

Transzgénikus SC és ES sejtekből magátültetéses klónozással

Célzott génbevitel transzgénikus ES sejtvonalak felhasználásával

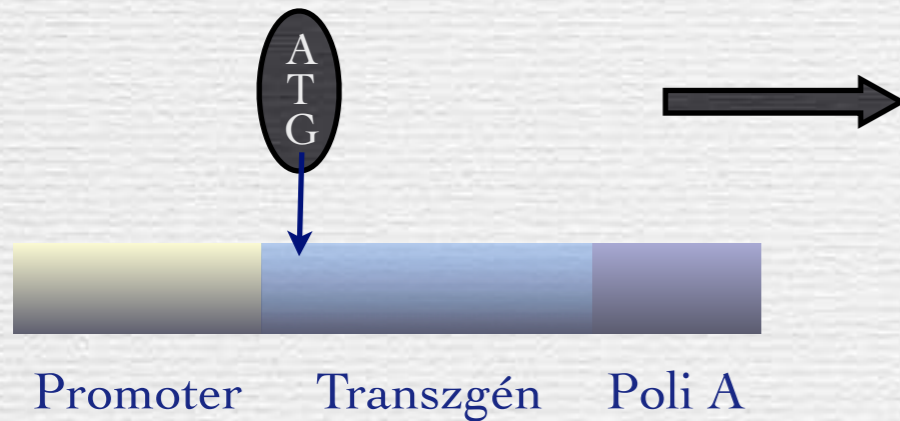
Transzgénikus spermatogóniális őssejtek beültetésével

Genom szerkesztés - ZFN, TALEN, CRISPR/CAS9

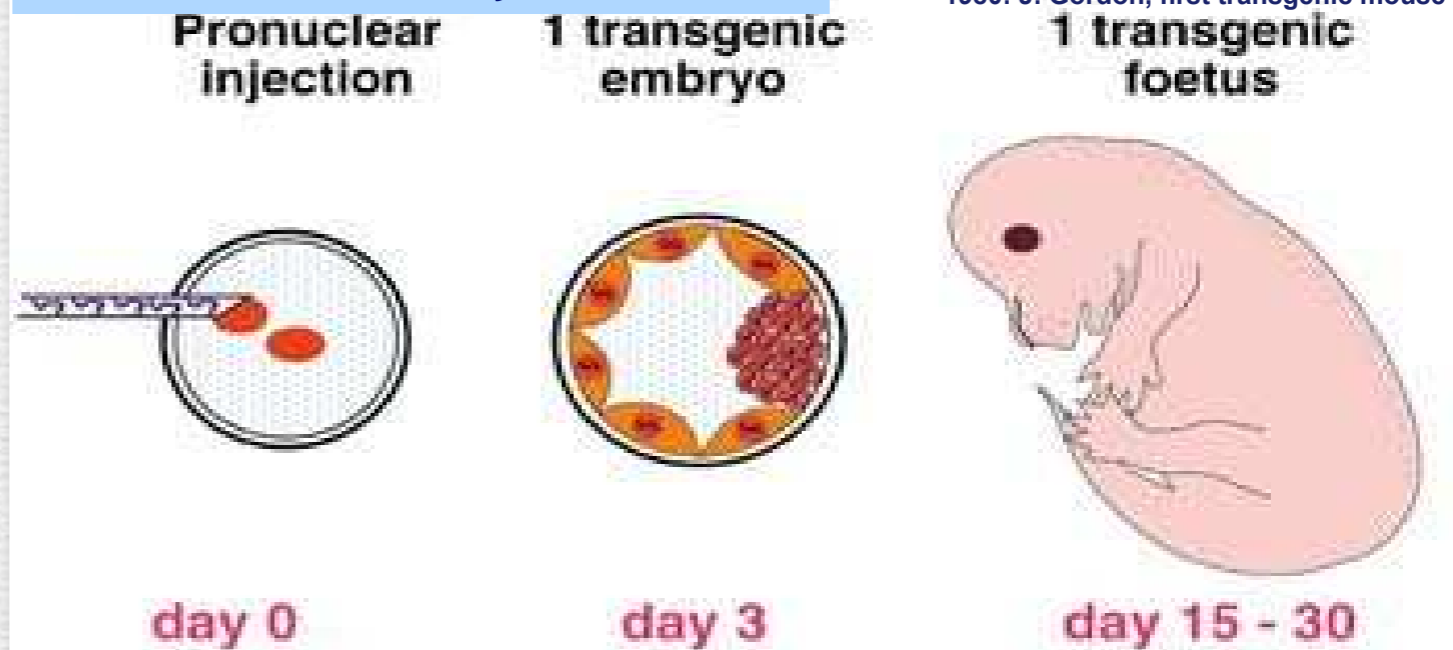


Transzgénikus egerek előállítása

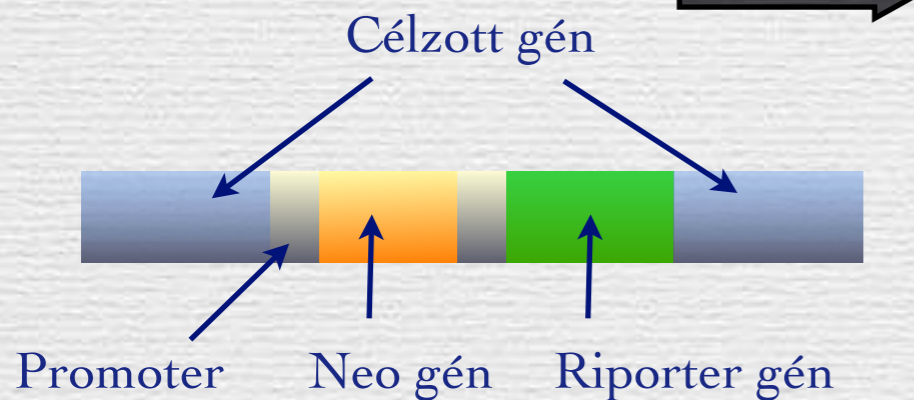
Random inszerció



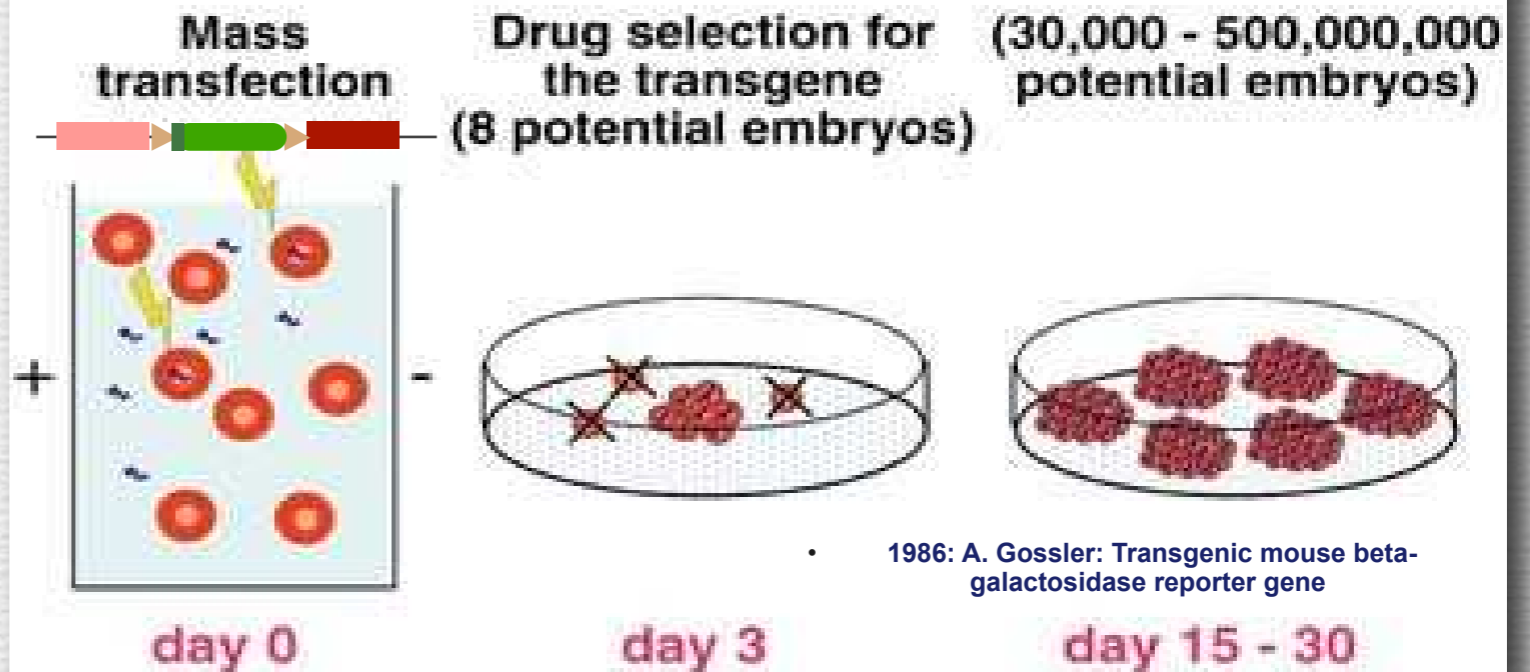
DNS mikrojektálás



Célzott génmódosítás

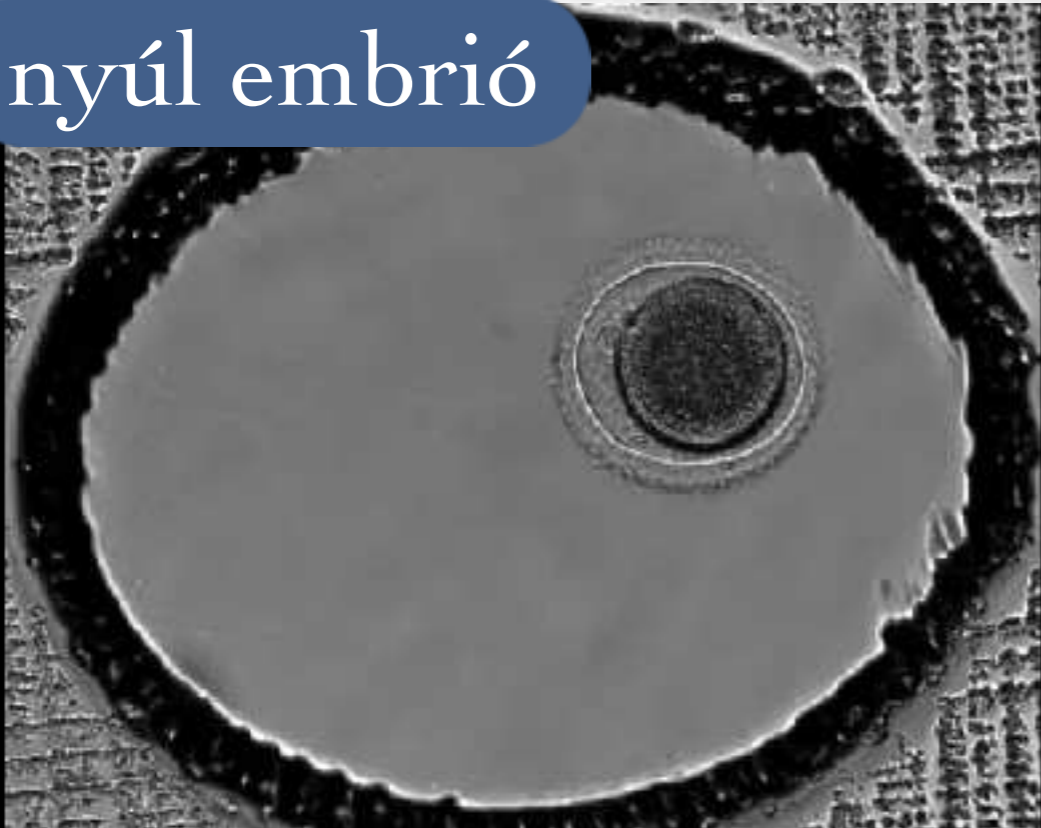


ES sejtek felhasználásával



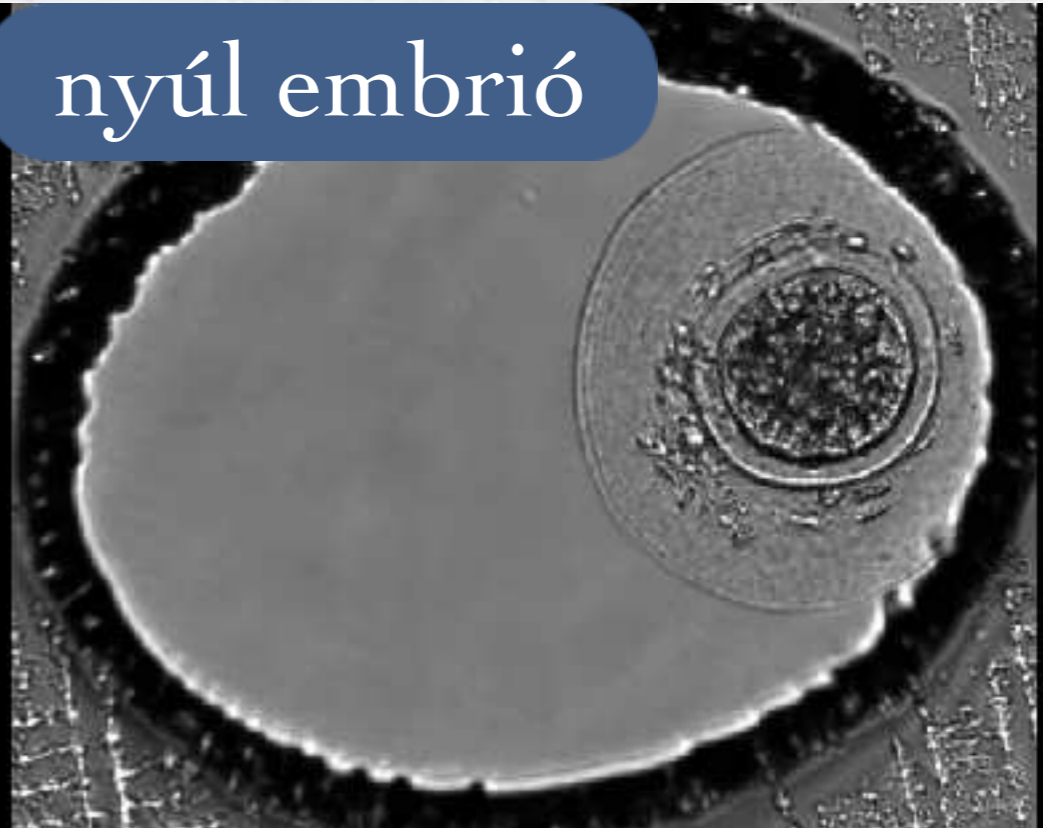
Embriók fejlődésének vizsgálata

nyúl embrió



1 sejtes → morula

nyúl embrió



morula → blaszto ciszta

szarvasmarha embrió

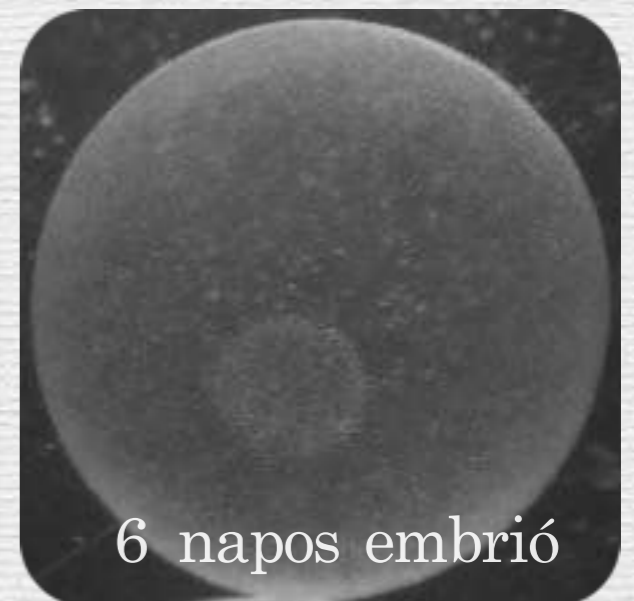


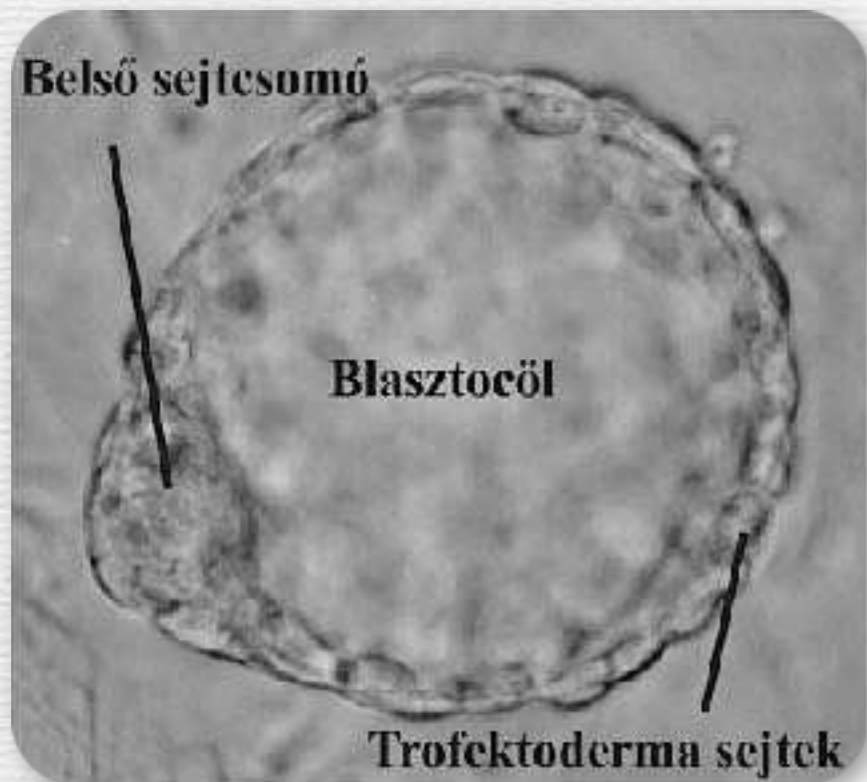
petesejt → IVF → 1 sejtes → 8 sejtes

egér embrió

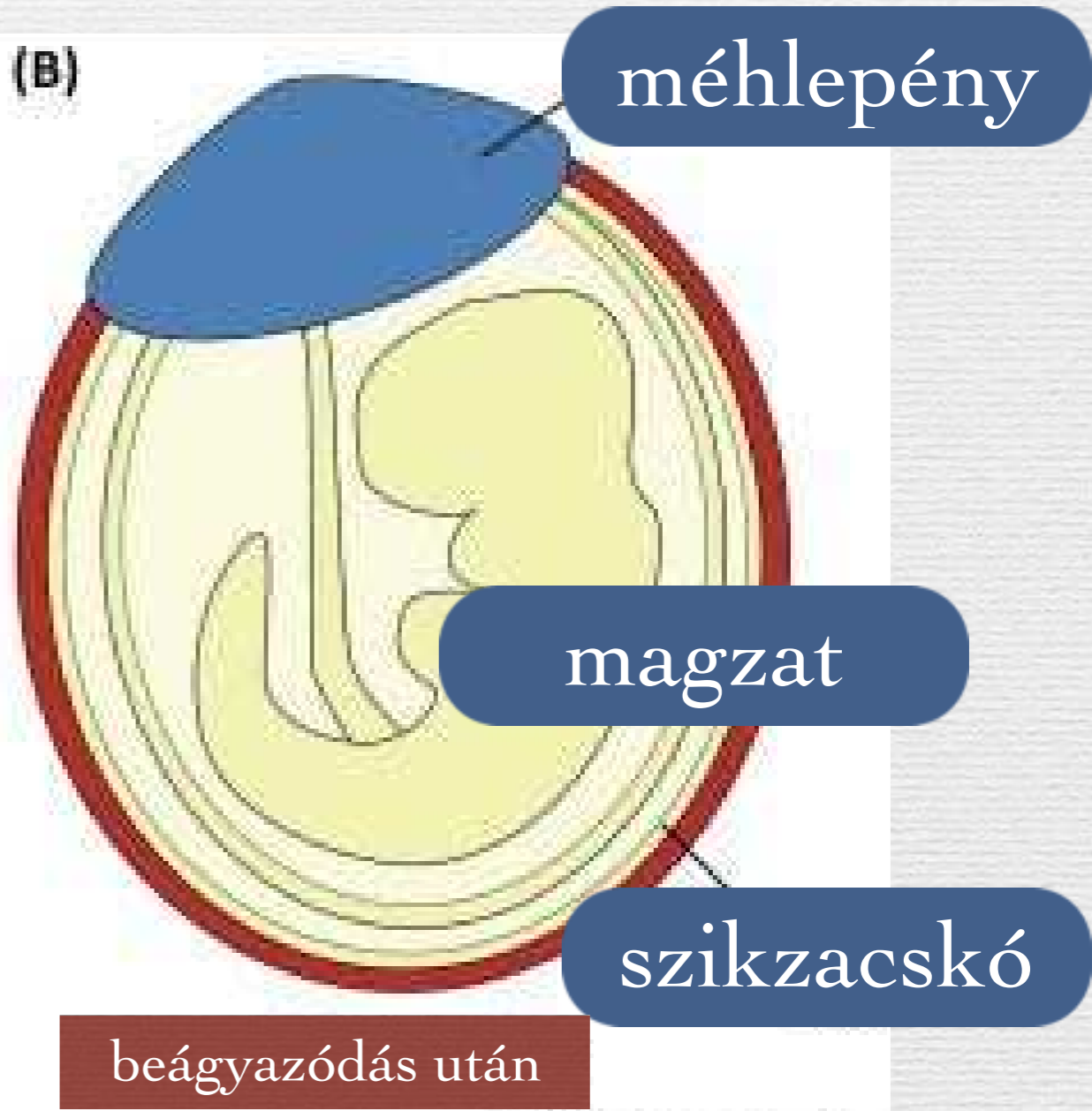
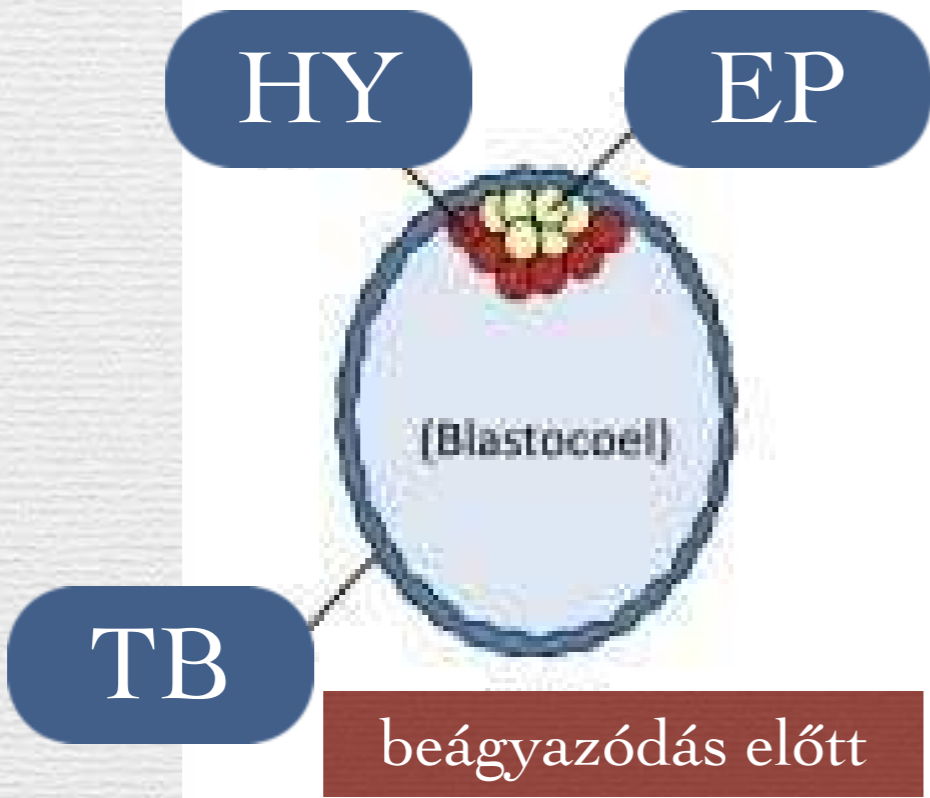


nyúl embrió

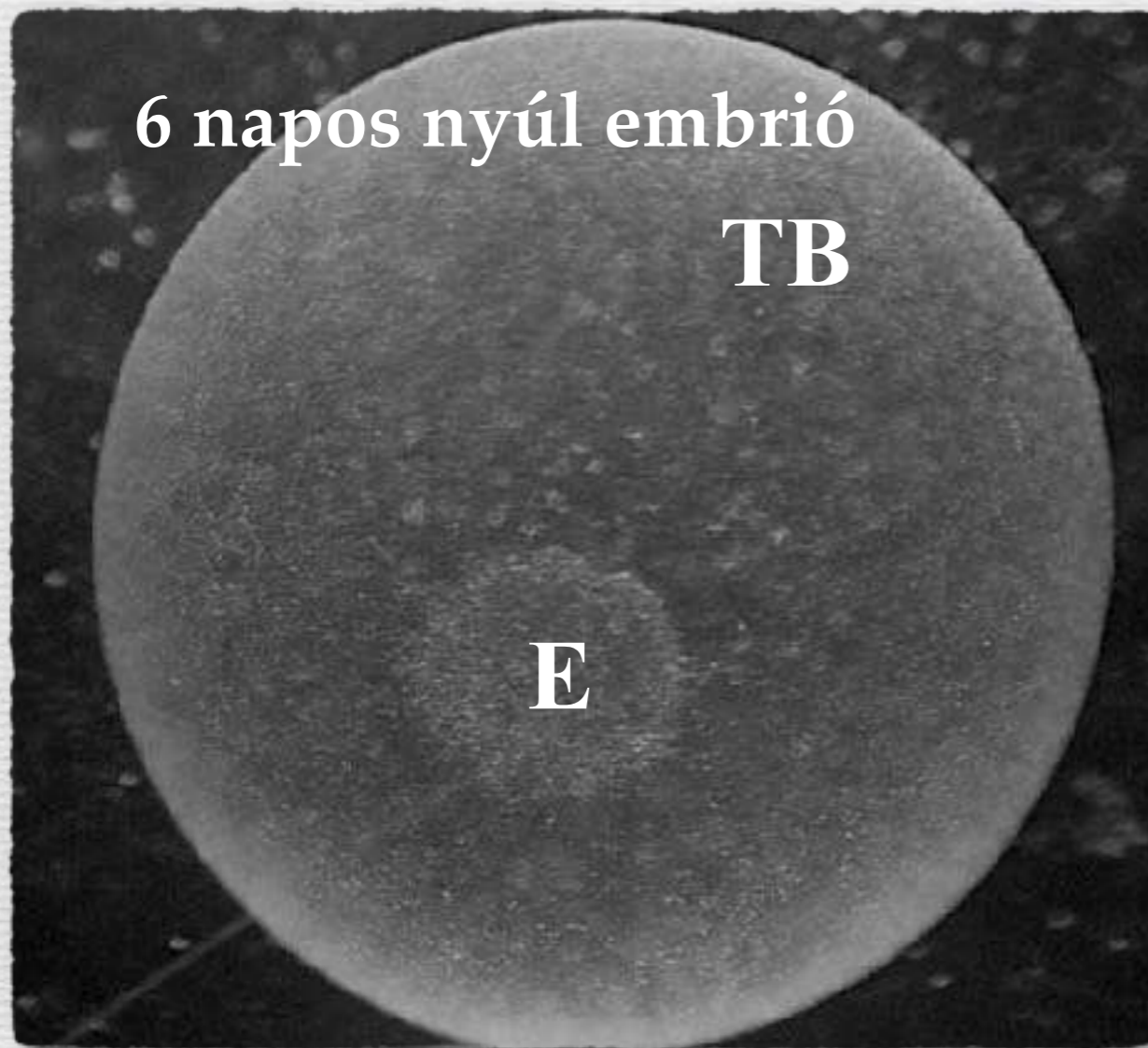




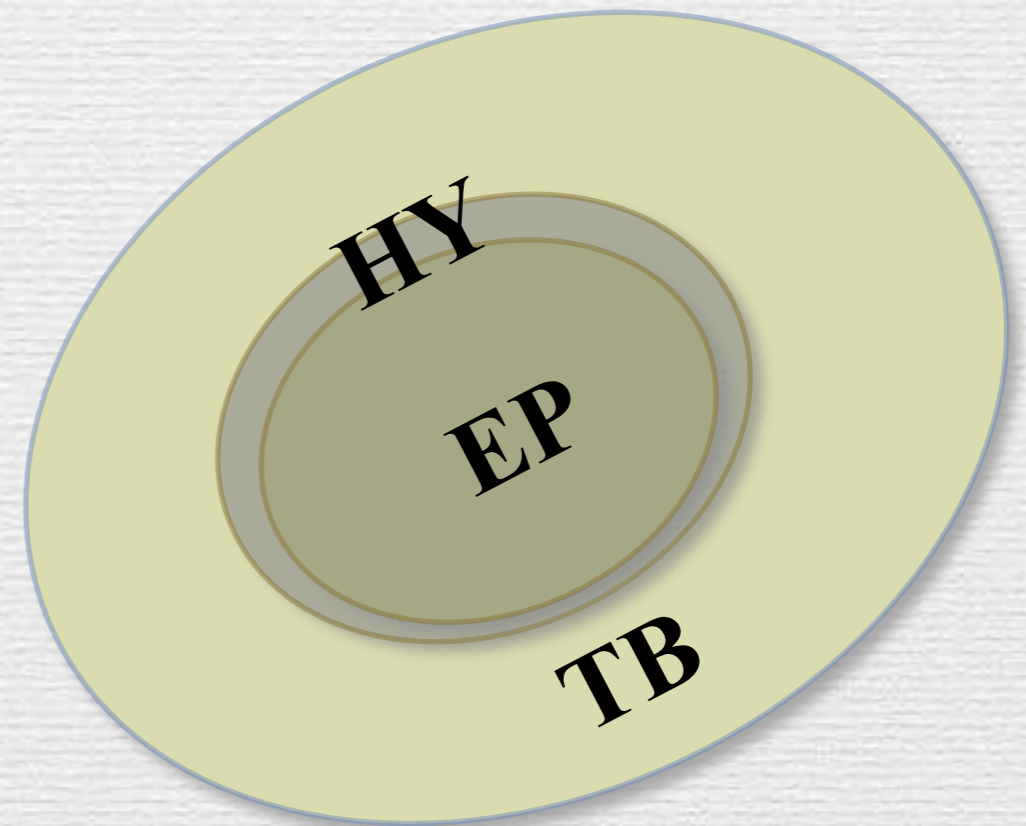
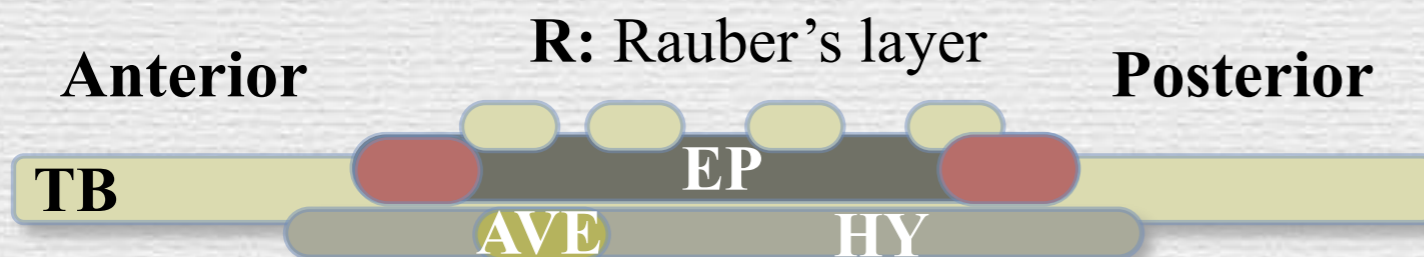
Egér embriók fejlődése



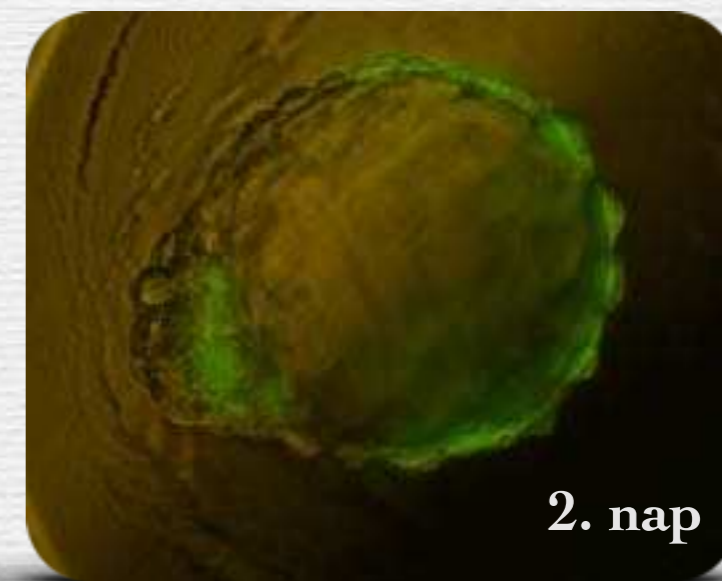
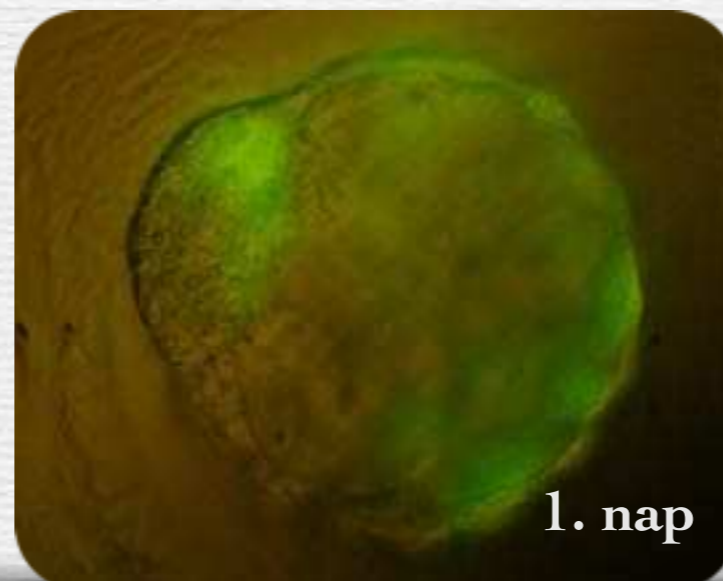
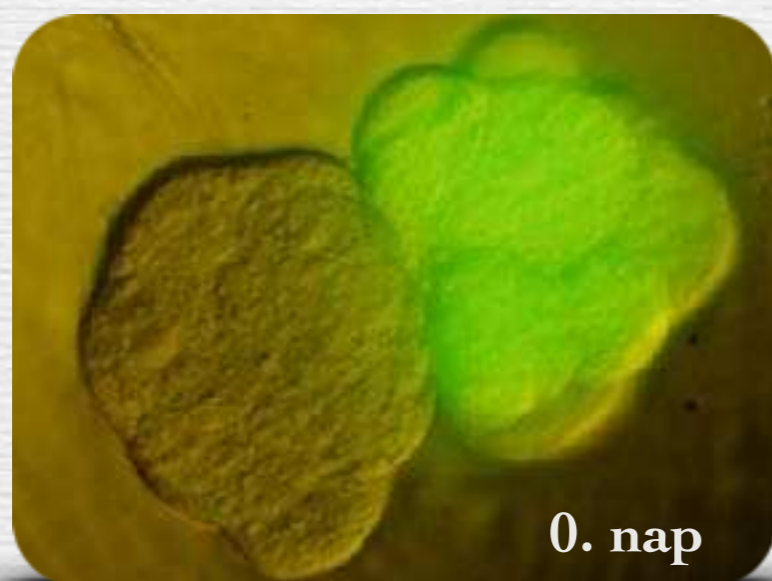
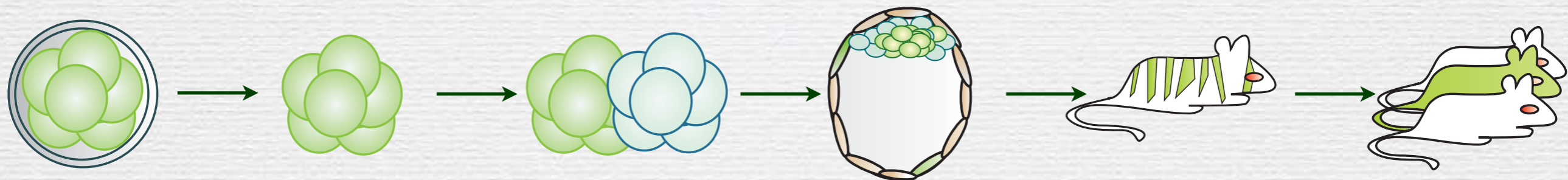
Nyúl embriók fejlődése



- ❖ E: embriódiszk → EP, HY
- ❖ TB: trofoblaszt → méhlepény
- ❖ HY: hipoblaszt → szik, amnion
- ❖ EP: epiblaszt → magzat



Kimérák a tudományban



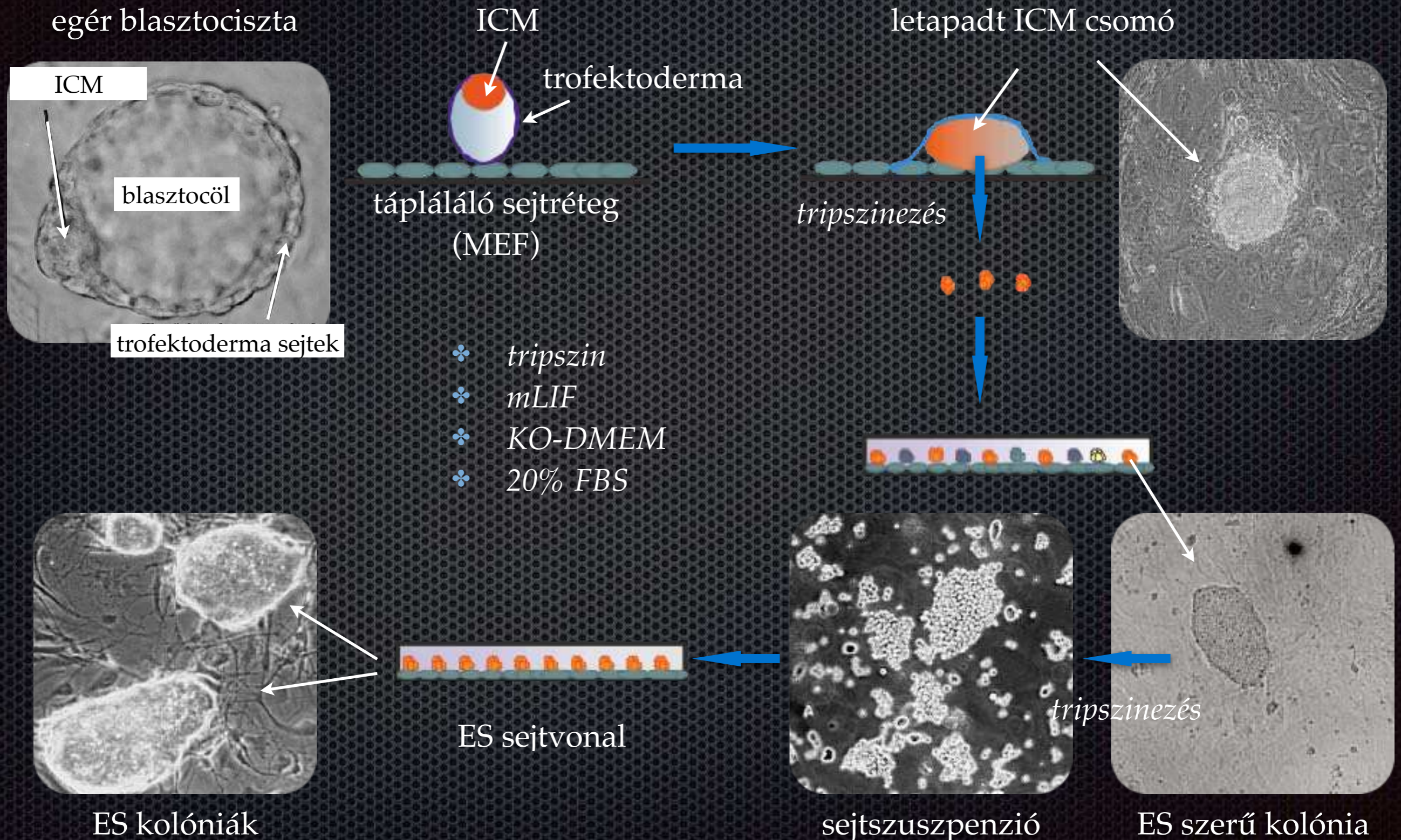
XX-XY, XY-XX, XX-XX, XY-XY → 75% hím utód

szexdetermináció vizsgálata

Tarkowski AK.: *Germ cells in XX in equilibrium XY mouse chimeras. Basic Life Sci. 1978*

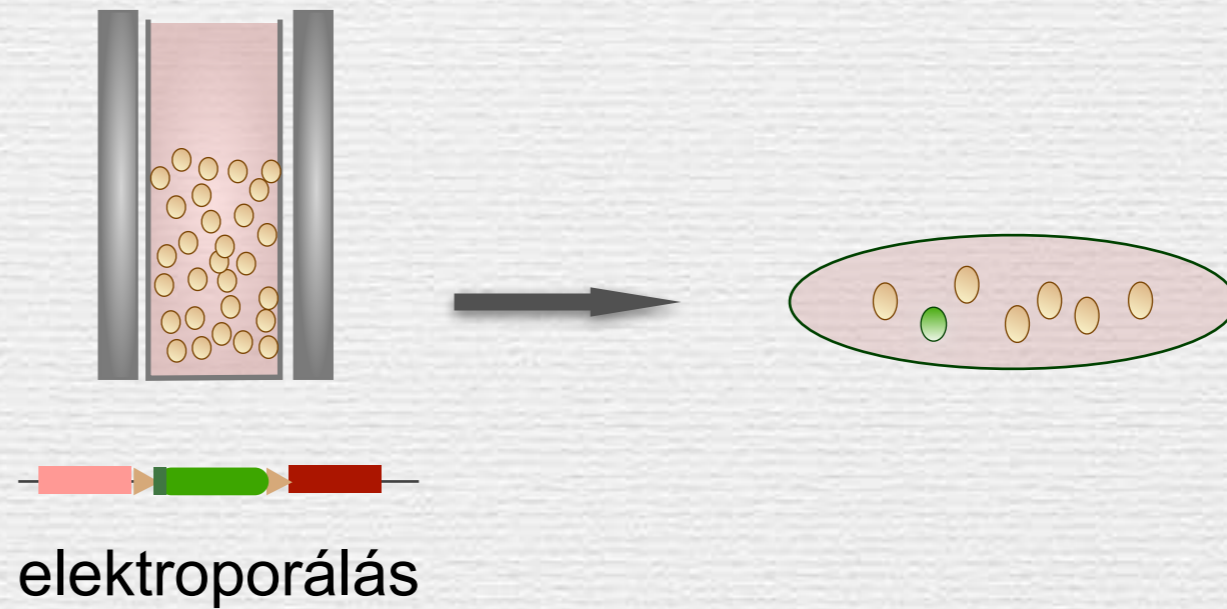


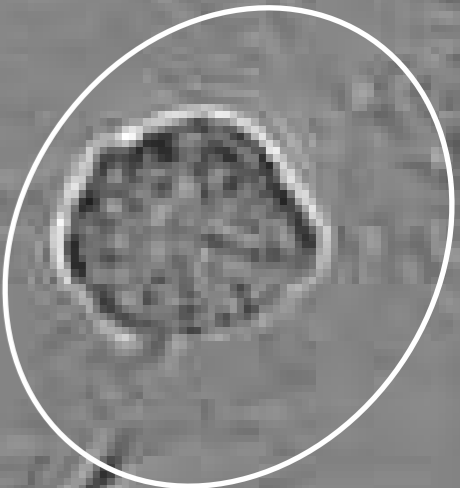
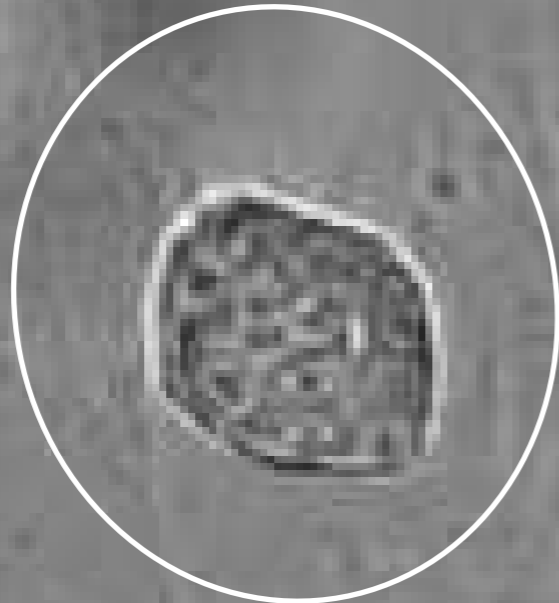
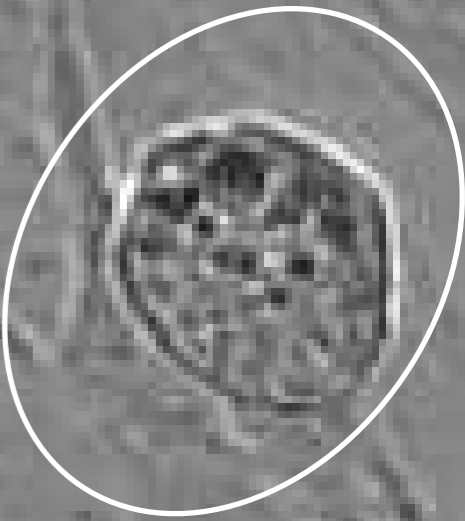
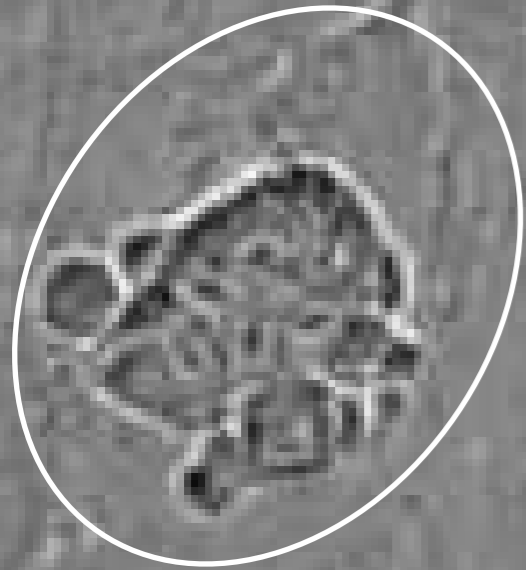
Pluripotens embrionális eredetű egér őssejtvonala (mESC)



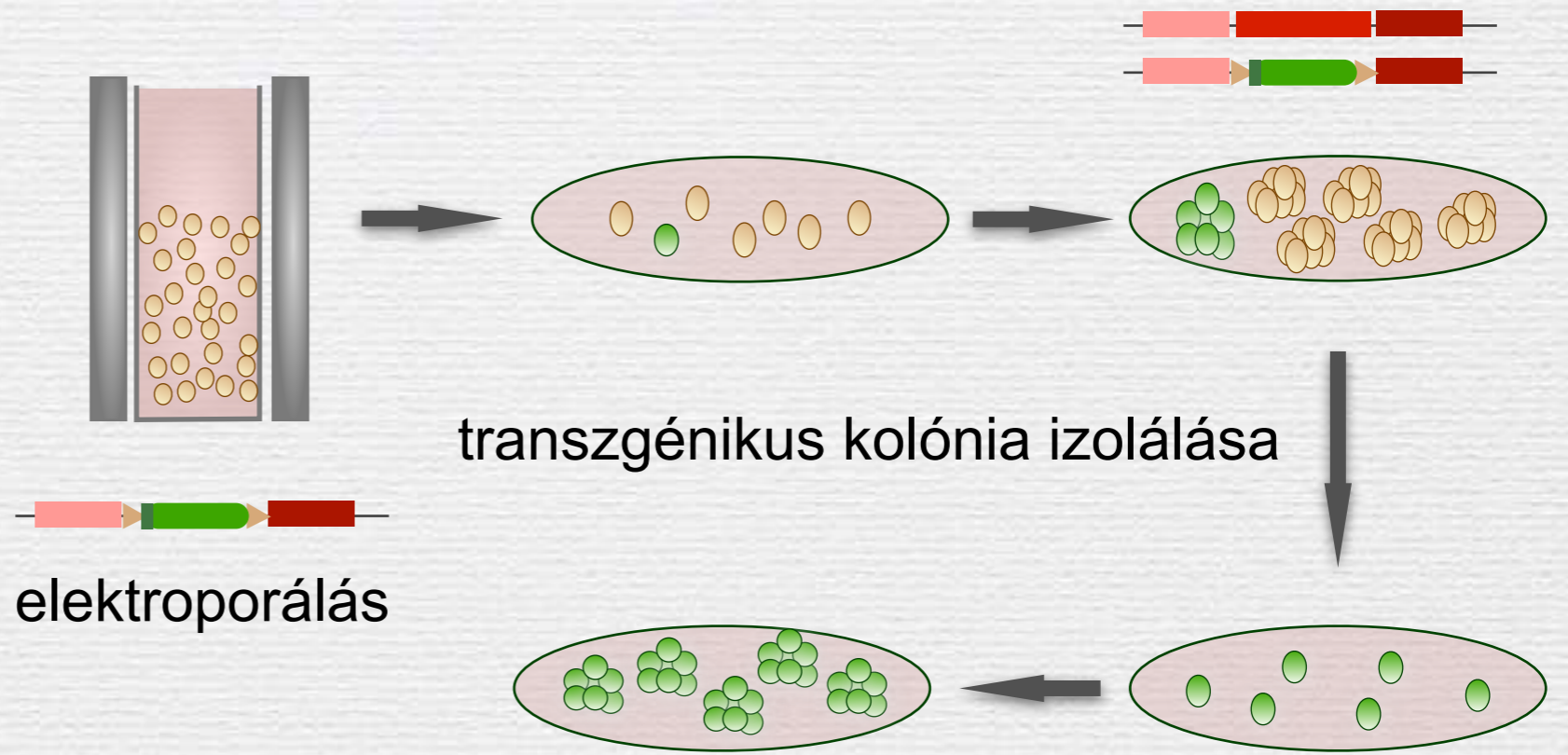
SZÜNET 11:45-12:00

DNS elektroporálás ES sejtekbe

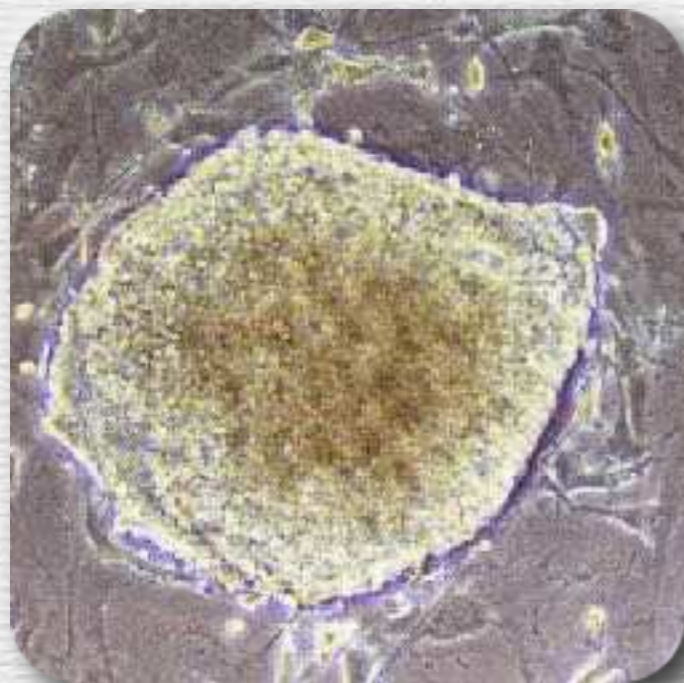




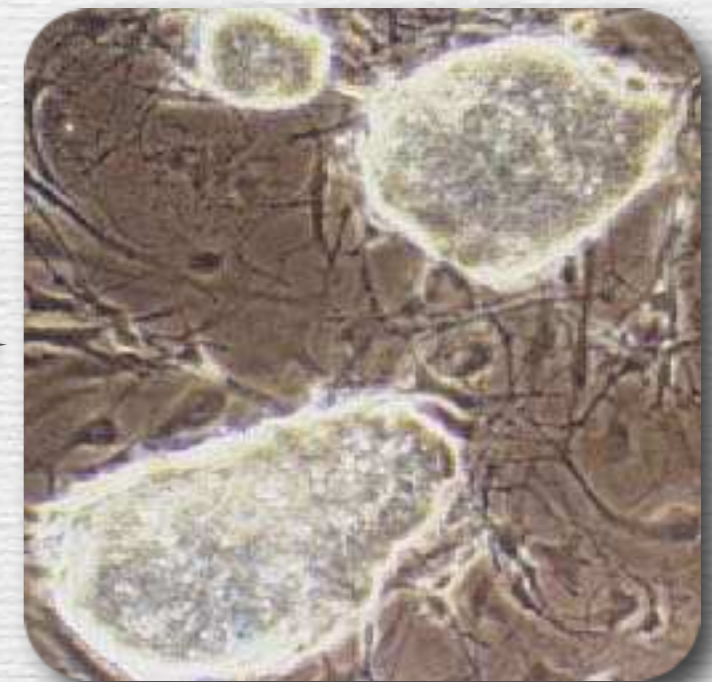
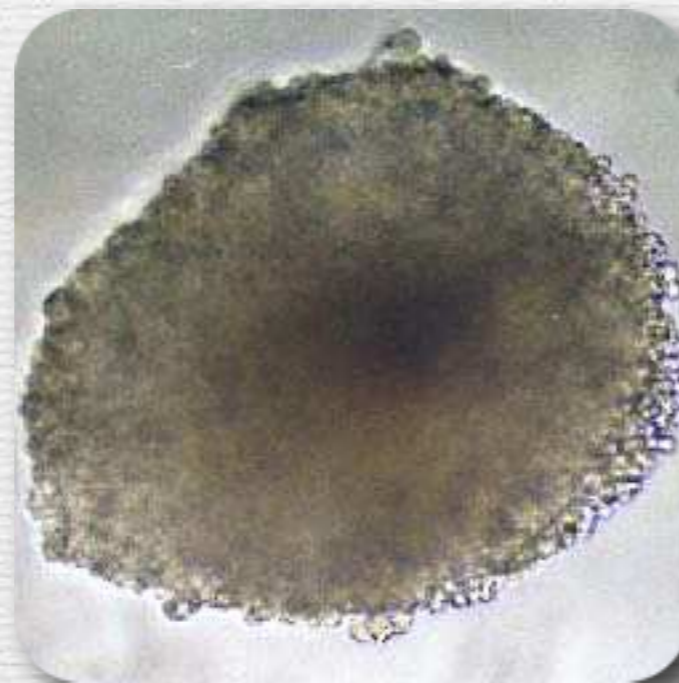
DNS elektroporálás ES sejtekbe



rezisztens kolónia

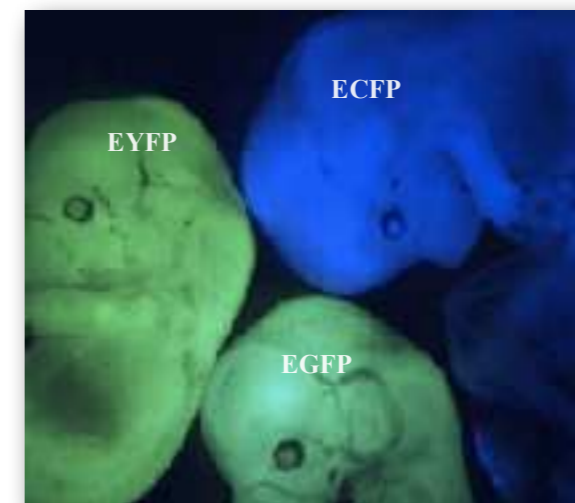
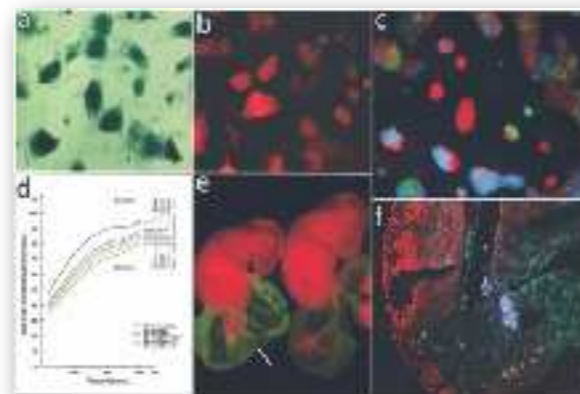
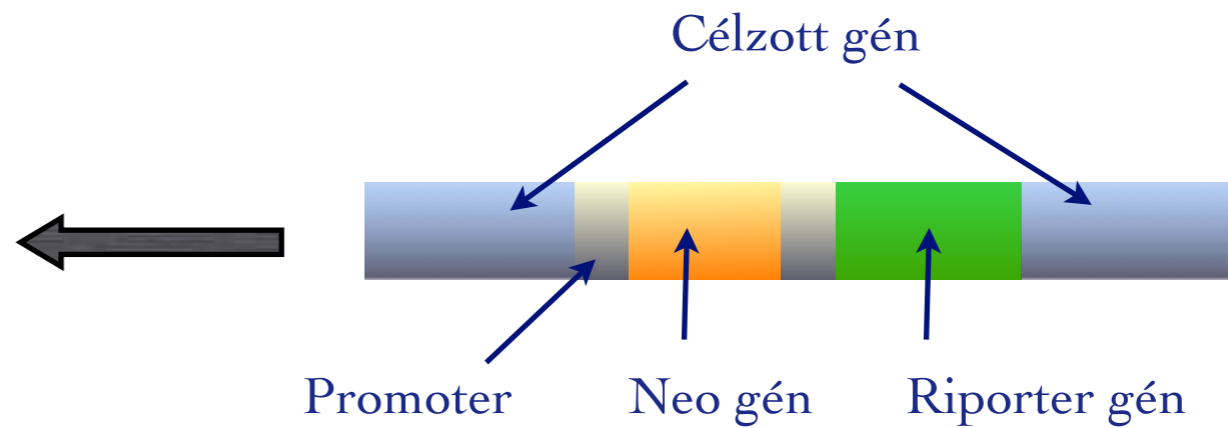
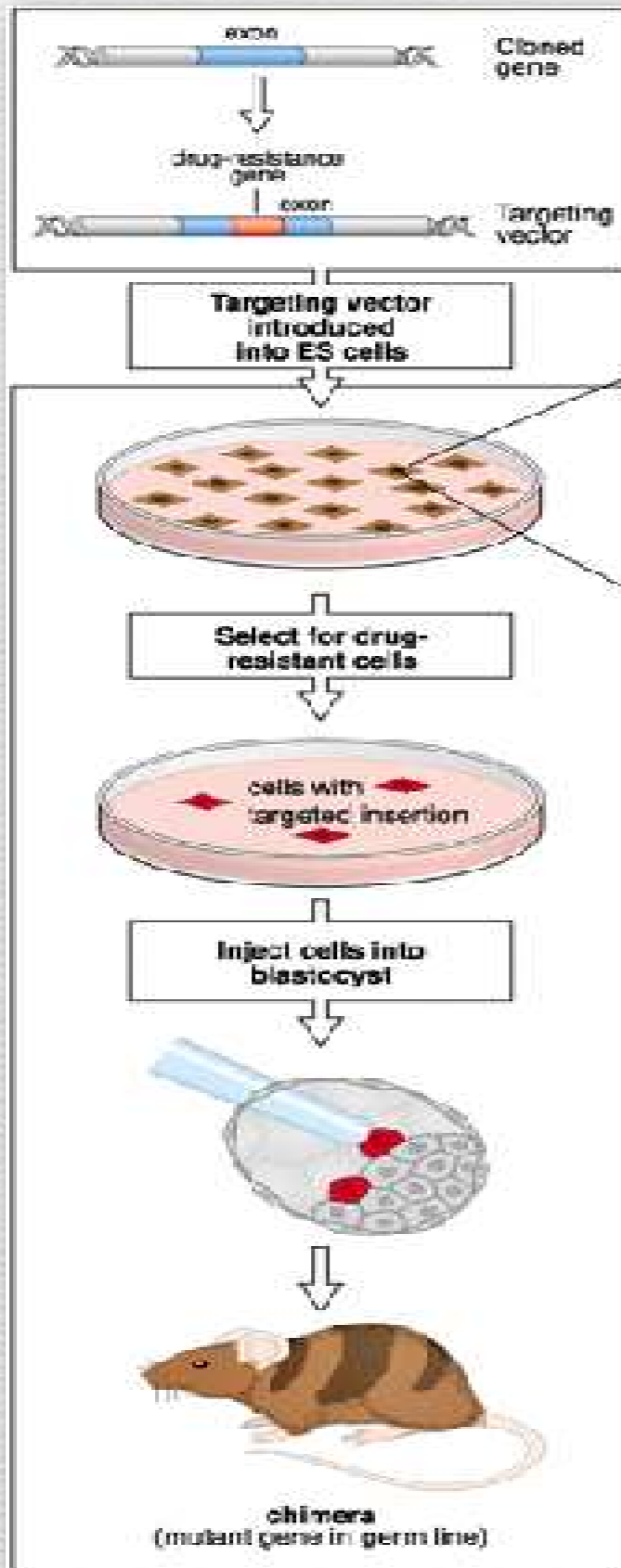


kolónia tripszinben

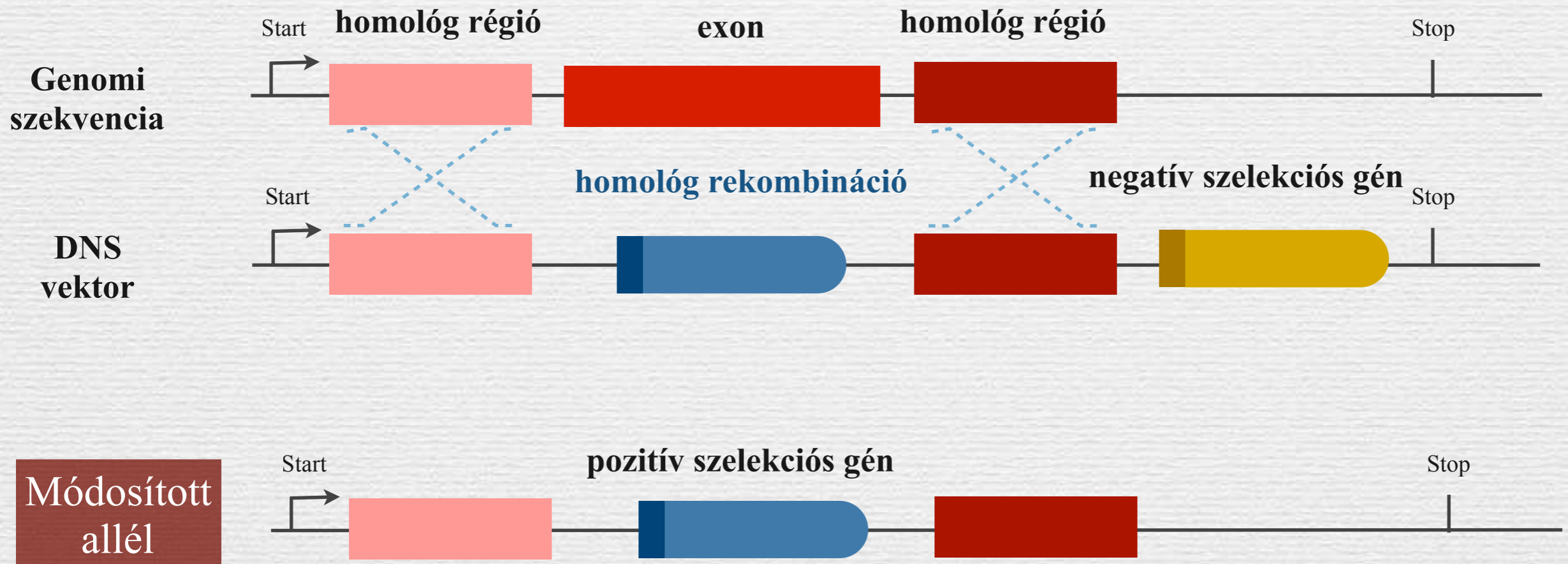


Transzgénikus ES sejtvonalak alkalmazása

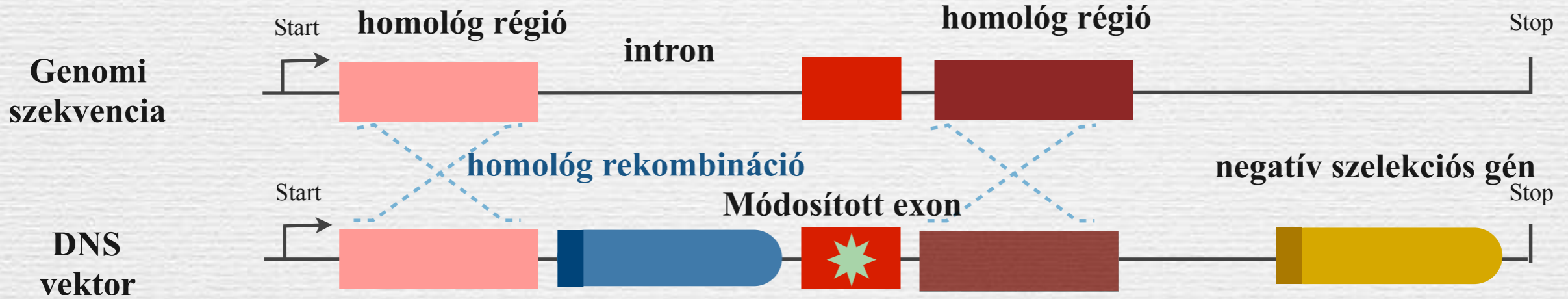
Célzott génmódosítás



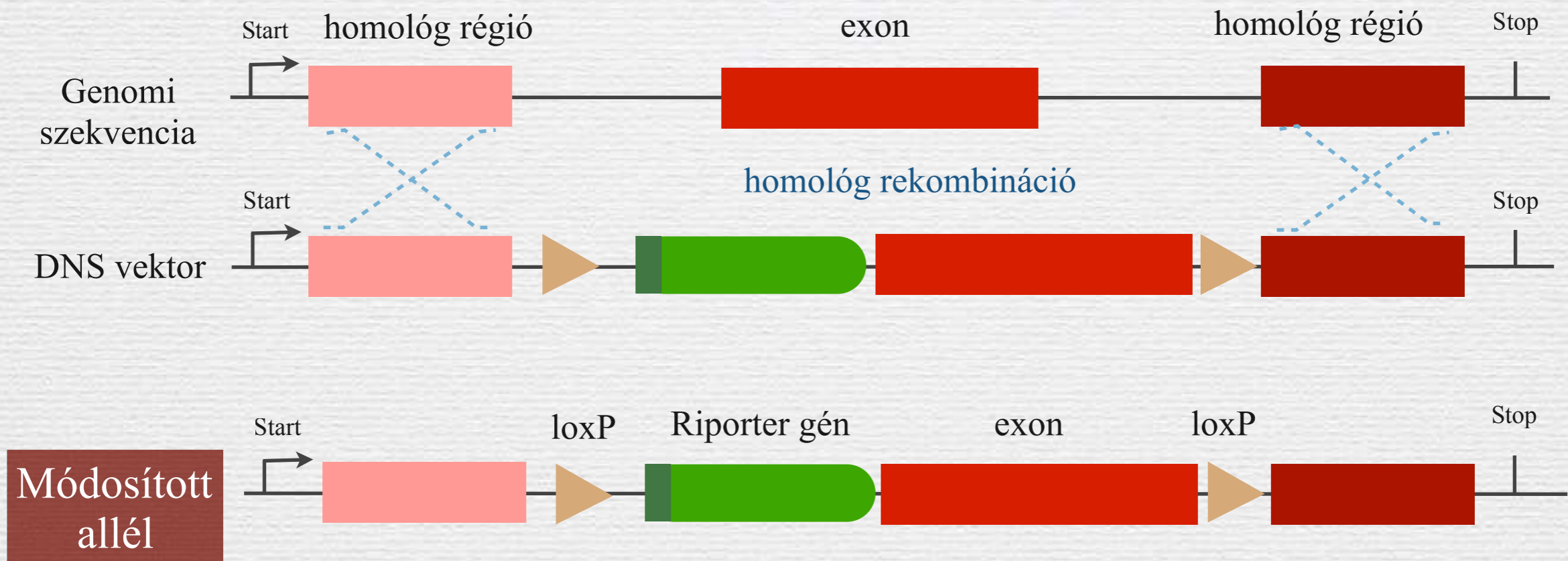
HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓ - CÉLZOTT GÉNKIÜTÉS



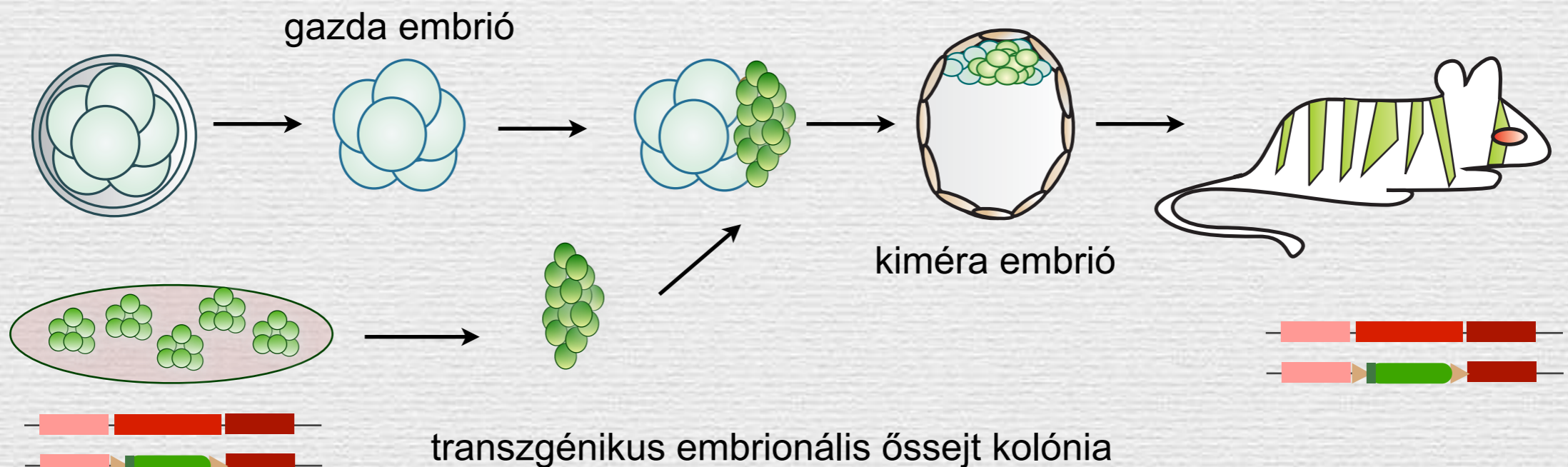
HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓ - CÉLZOTT GÉNMODOSÍTÁS



HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓ - KONDITIONÁLIS GÉNKIÜTÉS



TRANSZGÉNIKUS KIMÉRA EGEREK LÉTREHOZÁSA



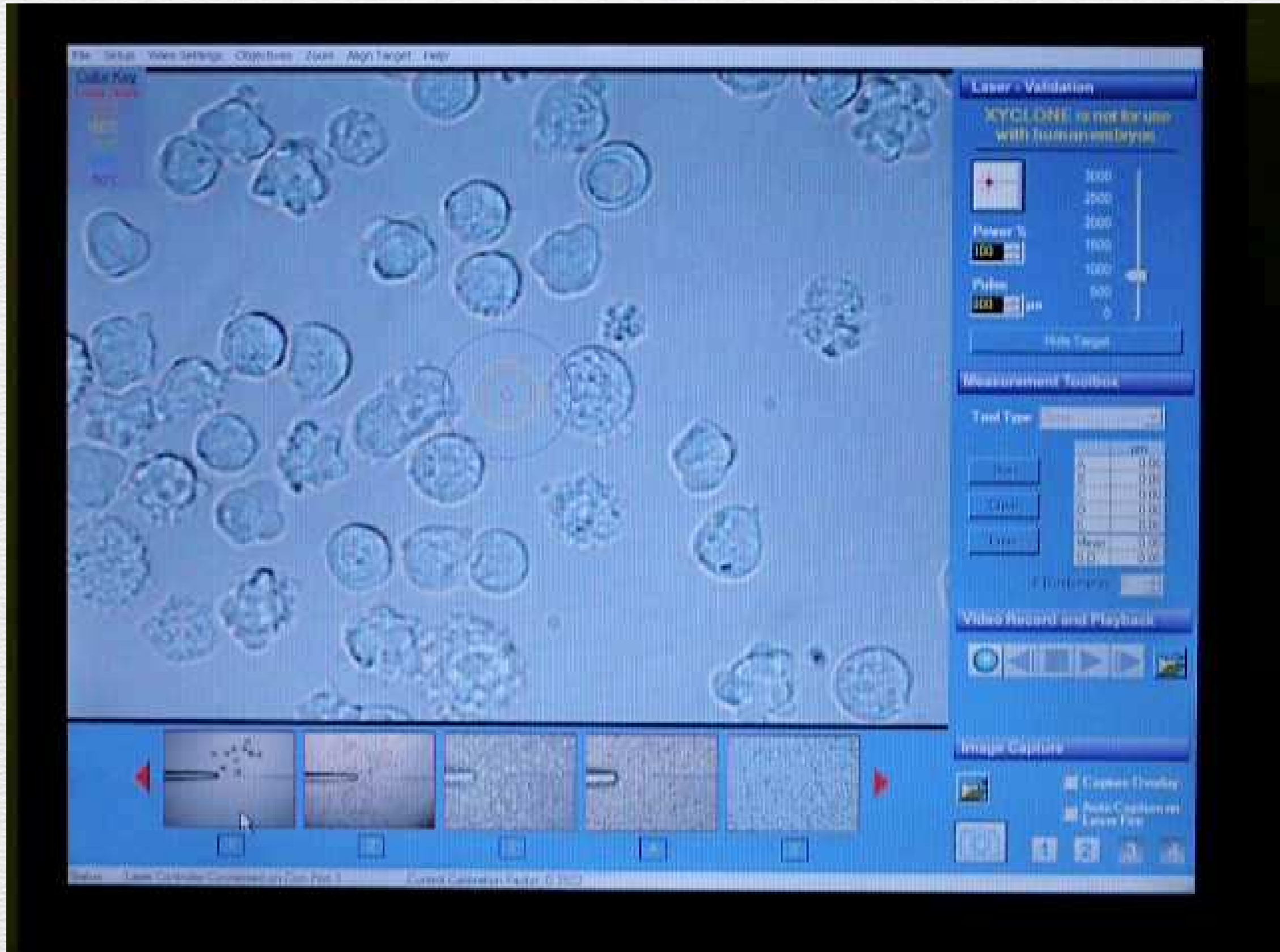
Transzgénikus ES sejtek összegyűjtése



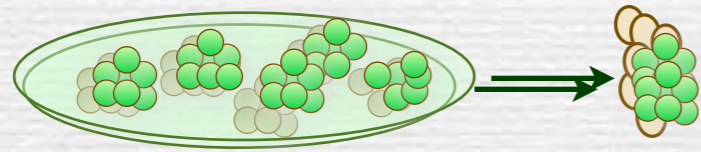
Transzgénikus ES sejtek gazda embrióba injektálása 1.



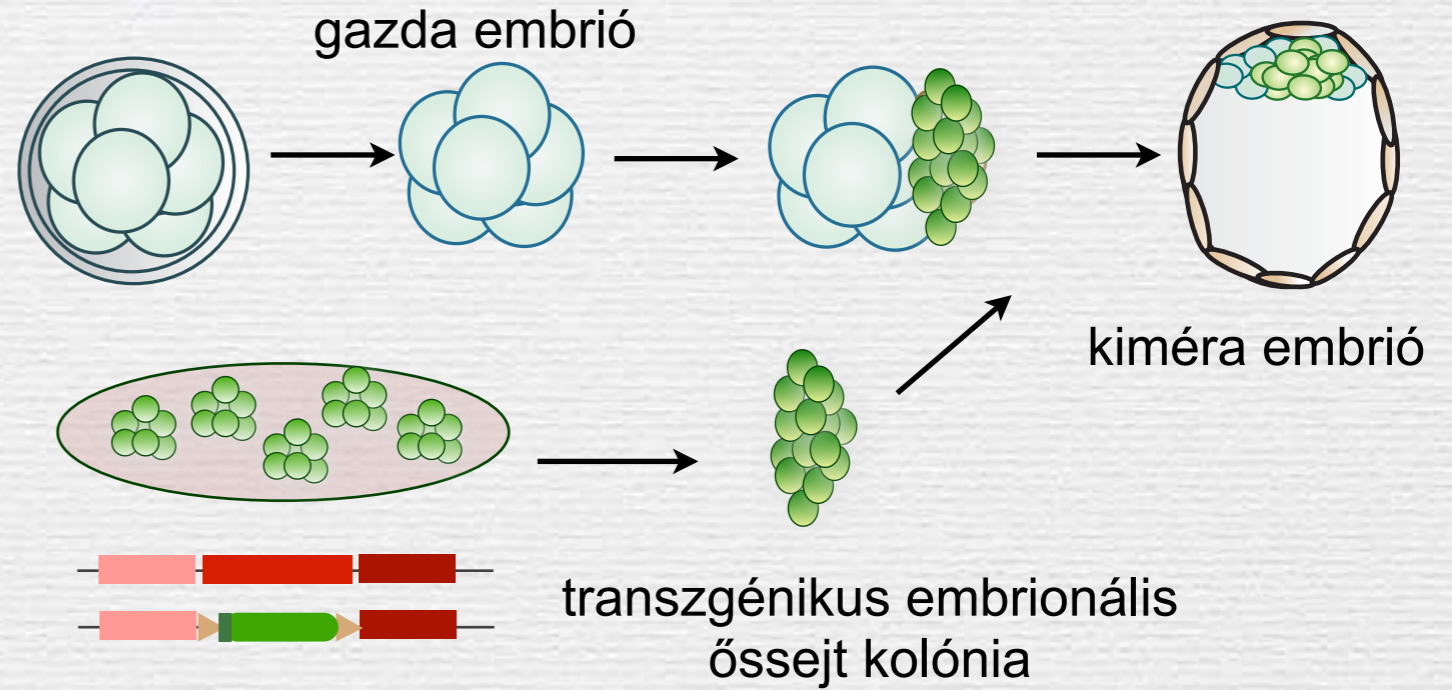
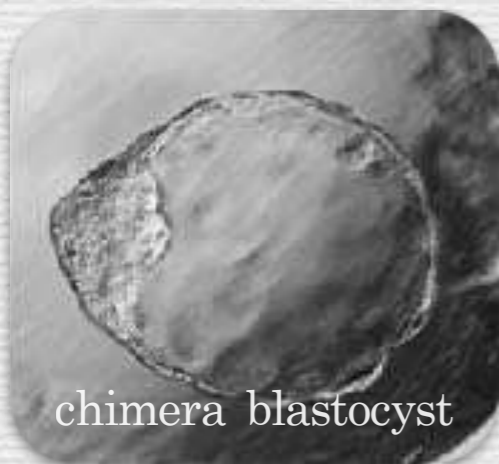
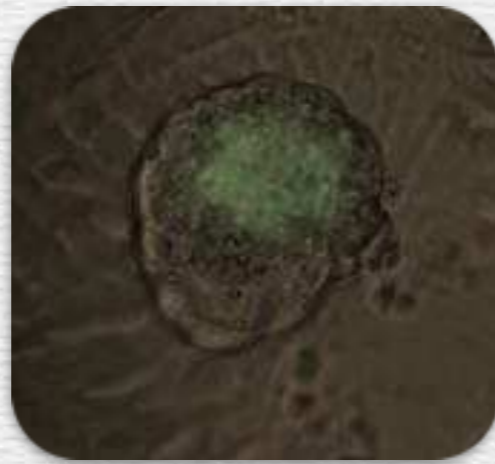
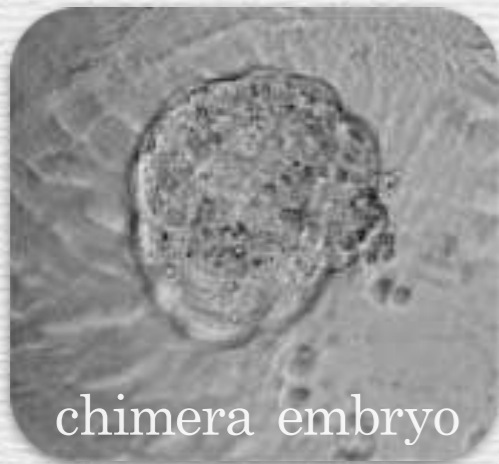
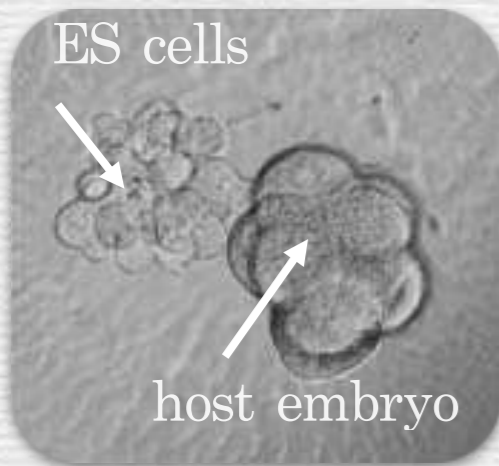
Transzgénikus ES sejtek gazda embrióba injektálása 2.



TRANSZGÉNIKUS ES SEJTEK AGGREGÁLTATÁSA GAZDA EMBRIÓVAL



AGGREGÁCIÓS KIMÉRÁK



GFP visualisation: BLS-Ltd

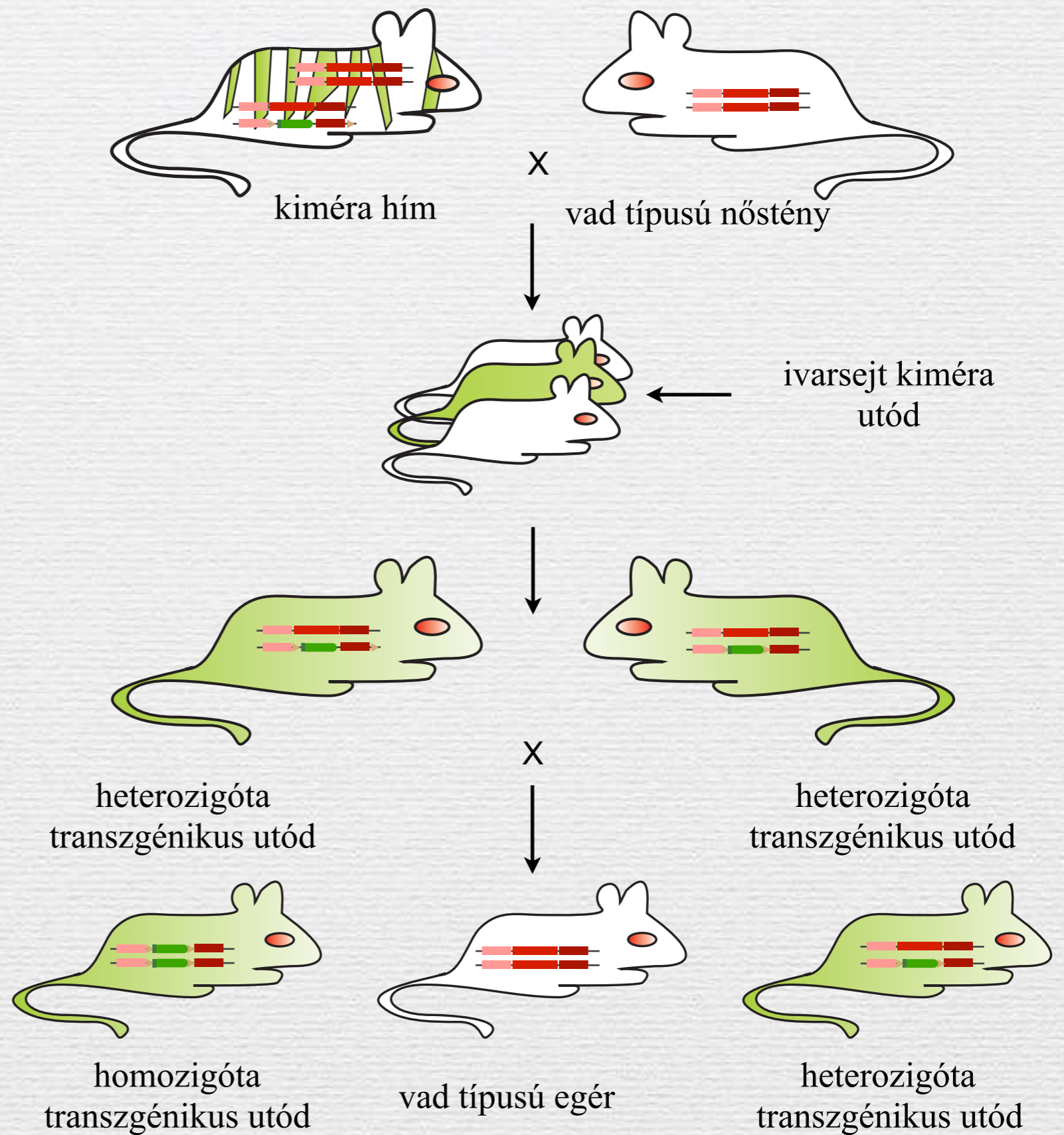
Transzgénikus ES sejt kiméra utódok



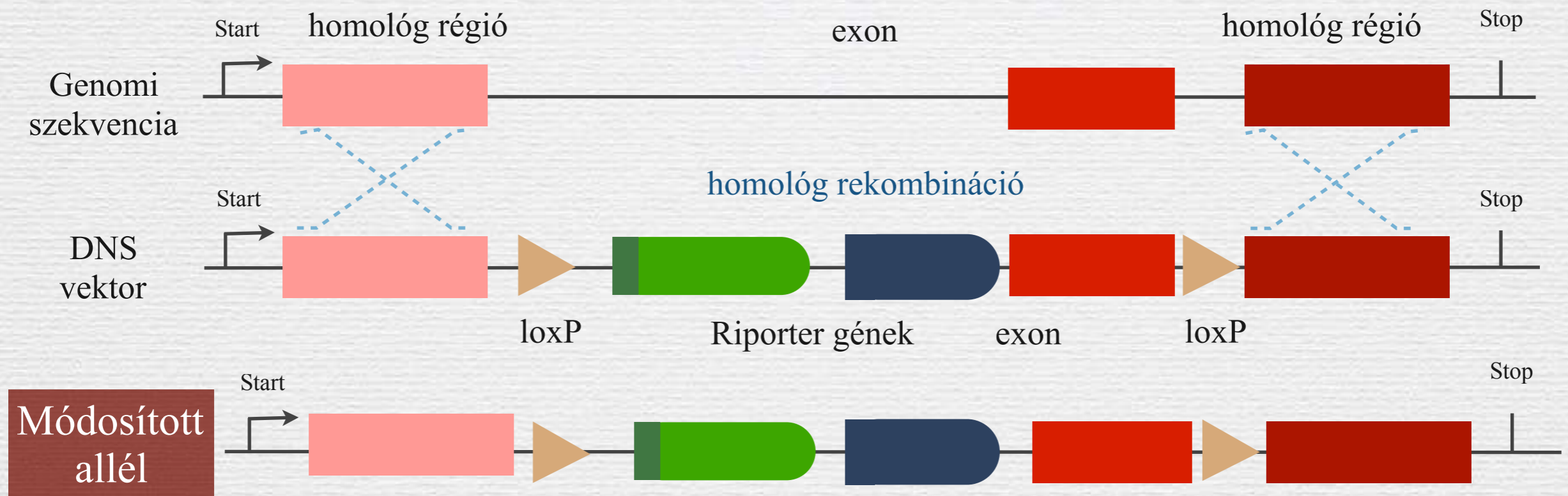
Transzgénikus ES sejt kiméra



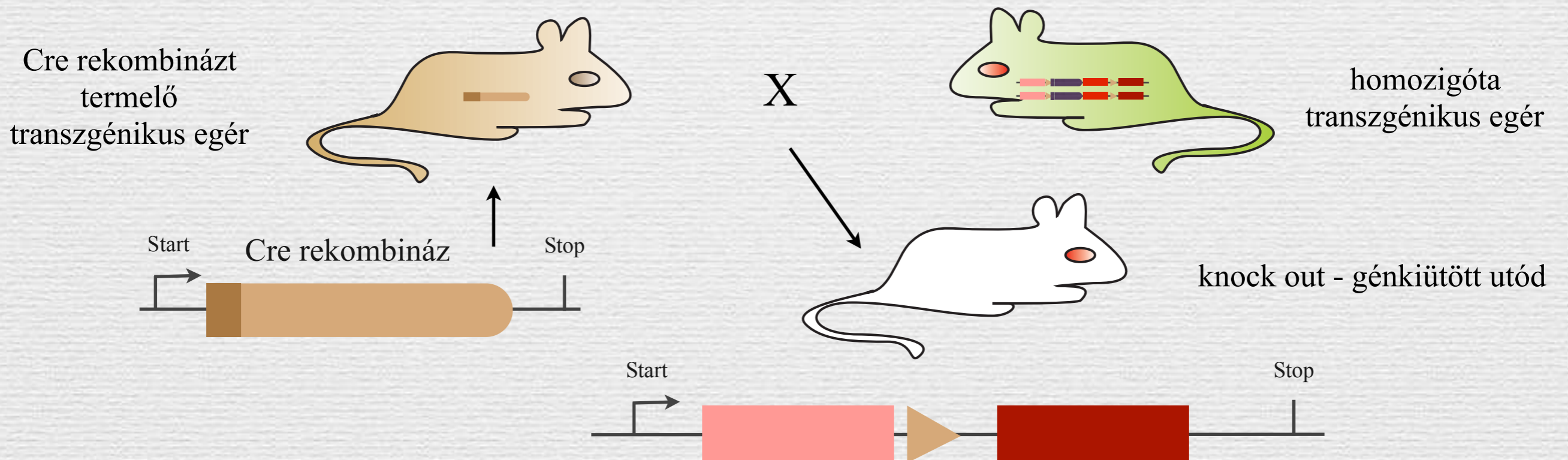
HOMOZIGÓTA TRANSZGÉNIKUS EGEREK LÉTREHOZÁSA



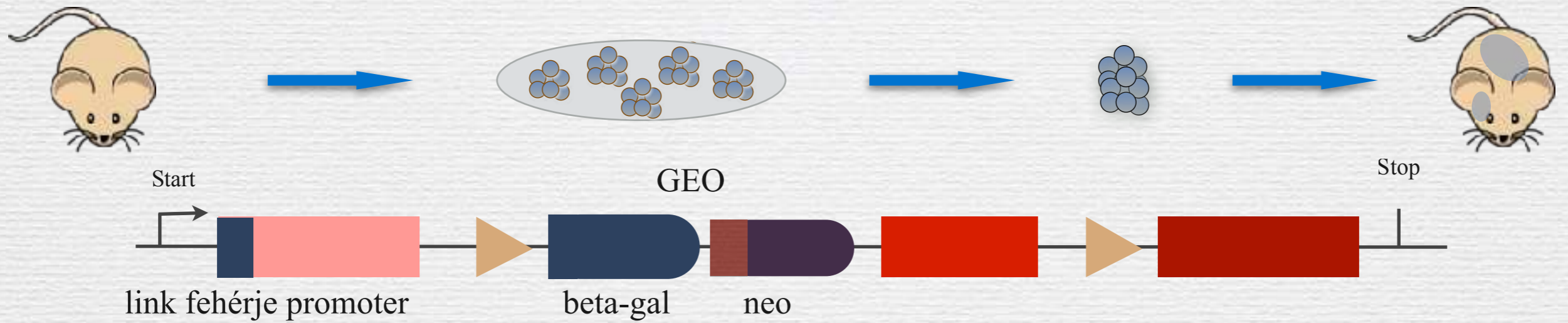
HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓ - KONDICIONÁLIS GÉNKIÜTÉS



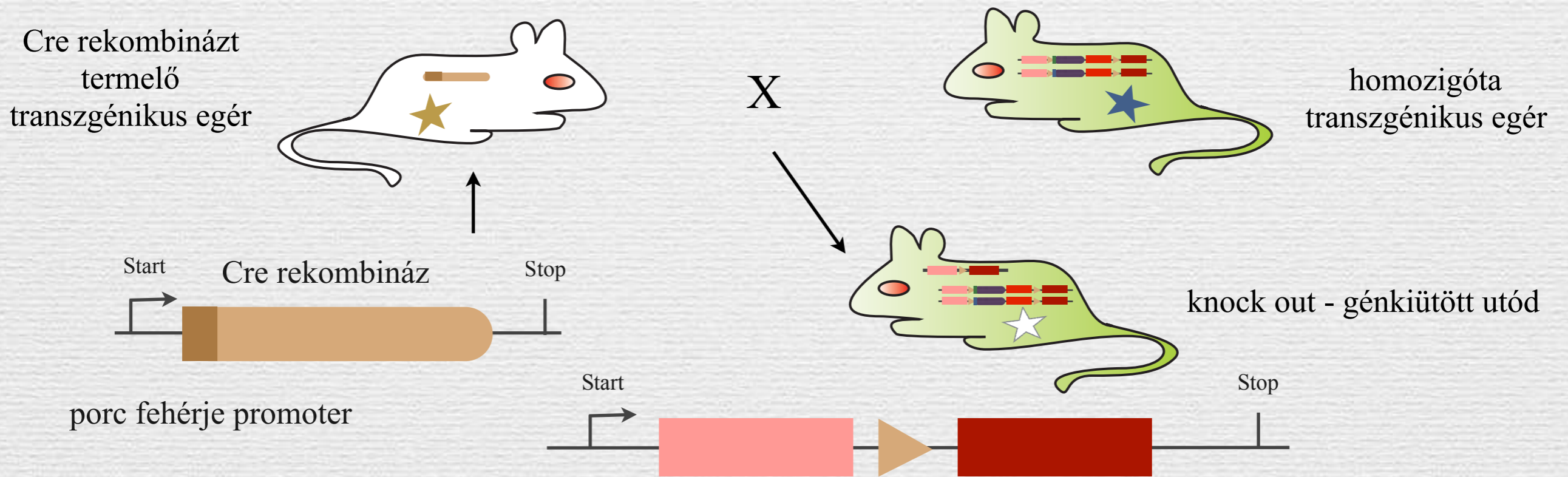
HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓ - KONDICIONÁLIS GÉNKIÜTÉS



HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓ - SZÖVETSPECIFIKUS RIORTER GÉN EXPRESSZIÓ - KONDITIONÁLIS GÉNKIÜTÉS



HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓ - KONDITIONÁLIS GÉNKIÜTÉS



link fehérje expresszió követése transzgénikus egerek porcszövetében

Transzgénikus egerek előállítása

Célzott genetikai módosításokat hordozó transzgénikus egerek
hasznos modell-rendszerként szolgálnak az orvosbiológiai
kutatásokban

16 napos egér embrió



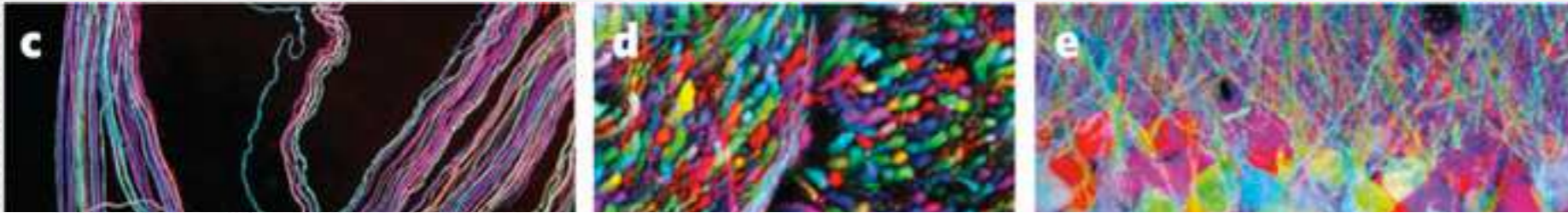
*link fehérje - (LP - CRTL1 (Cartilage Linking Protein 1) -
HAPLN1 (Hyaluronan and Proteoglycan Link Protein 1) -
expresszió követése transzgénikus egerekben*

16 napos egér embrió



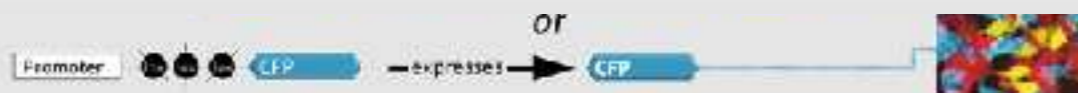
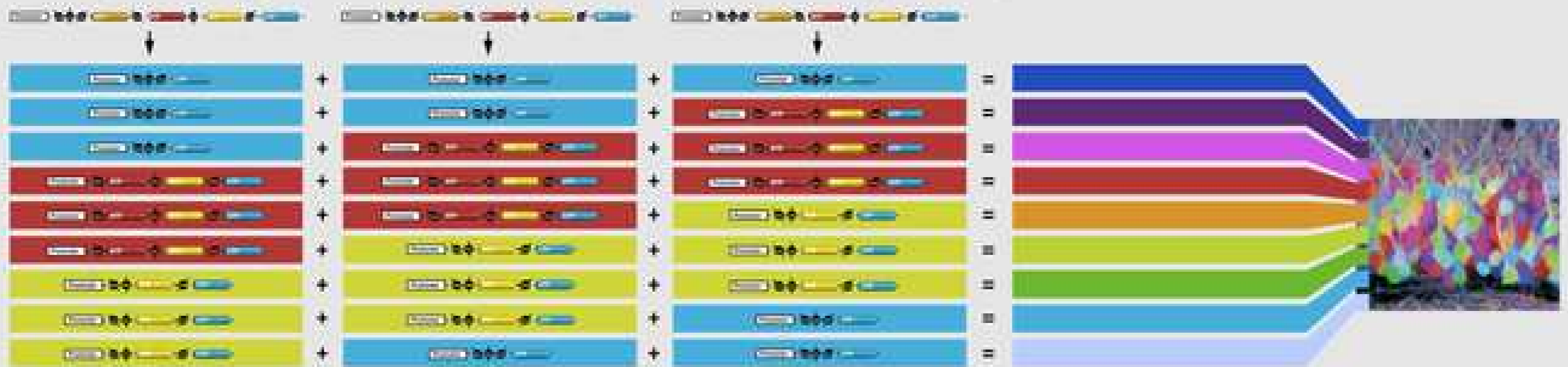
a link fehérje
porcspecifikusan
expresszálódik -
osteoarthritis
(porckopás)
vizsgálata

Brainbow mouse



Building Brainbow

Three copies of the genetic construct allow for the expression of multiple fluorophore color combinations.



Brainbow mouse

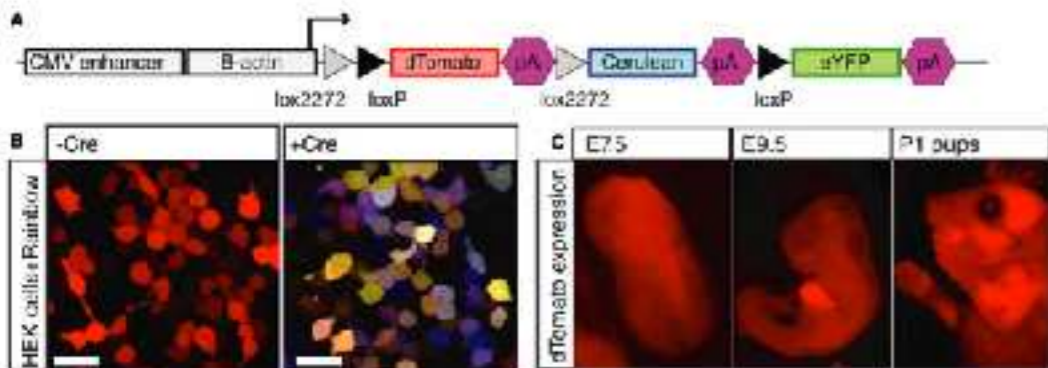
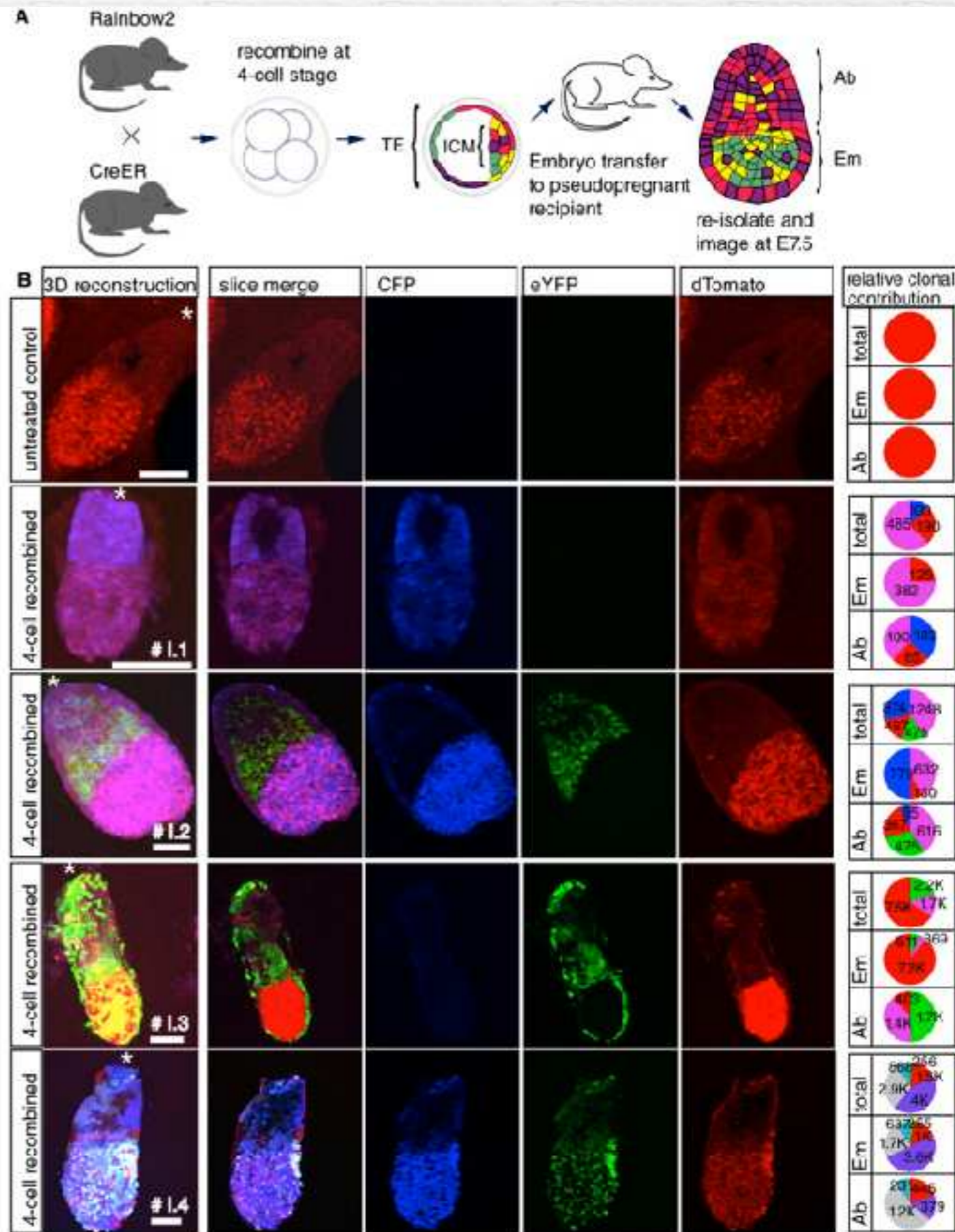
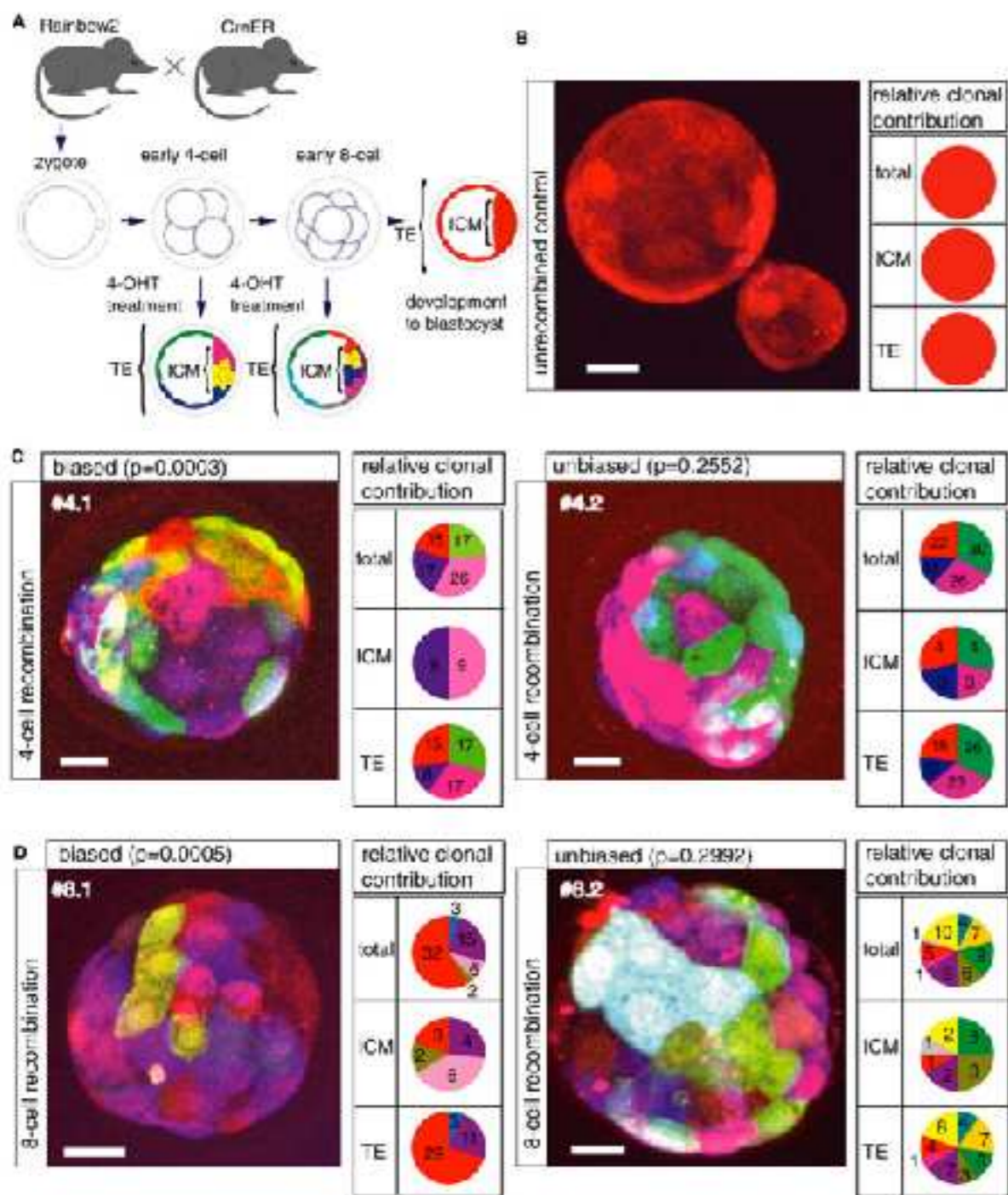


Figure 1. A Mouse for Rainbow Lineage Tracing (A) The Rainbow construct is shown. (B) Rainbow recombination after outcross recombination with Cre into HEK cells is shown. (C) dTomato expression at E6.5, E9.5, and in P1 Rainbow2 pups is shown. See also Figure S1.



ClonaCell® Ease





UCDAVIS

MOUSE BIOLOGY PROGRAM



Evans, Capecchi, Smitish - 2007 Nobel díj!



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2007

"for their discoveries of principles for introducing specific gene modifications in mice by the use of embryonic stem cells"



Photo: Tim Roberts/PR Newswire, © HHMI

Mario R. Capecchi

🕒 1/3 of the prize

USA

University of Utah;
Howard Hughes Medical
Institute
Salt Lake City, UT, USA

b. 1937
(in Italy)



Photo © Cardiff University

Sir Martin J. Evans

🕒 1/3 of the prize

United Kingdom

Cardiff University
Cardiff, United Kingdom

b. 1941



Photo: Scanpix/Dan Sears

Oliver Smithies

🕒 1/3 of the prize

USA

University of North
Carolina at Chapel Hill
Chapel Hill, NC, USA

b. 1925
(in United Kingdom)

- Martin J. Evans (első ES, EC sejtek)
- Mario R. Capecchi (homológ rekombináció, neo, HSV-tk, hpert gén bejuttatás)
- Oliver Smithies (homológ rekombináció humán sejtekben, mutáns hpert gén javítás)

Evans, Capecchi, Smitesh - 2007 Nobel díj - történeti áttekintés

EC sejtek (Evans M.J.; Martin G.R. 1972, 1974, 1975)

EC sejtek microinjektálása egér blasztocisztába (Papaioannou V.E., McBurney M., Gardner R.L., Evans M.J. 1975)

DNA microinjektálás sejtenyészeti sejtekbe (Capecchi MR, 1980)

Egér embrió transzformálása mikroinjektálással (Gordon J.W. 1980)

ES sejtvonalak léterhozása (Evans, M.J., Kaufman, M.H.; Martin G.R. 1981)

A humán beta-globin lokuszba DNS szekvencia bejuttatása homológ rekombinációval (Smithies, O. 1985)

Csíravonal kimérák előállítása retrovirus transzformált ES sejteket felhasználva (Robertson E, Bradley, A., Kuehn, M., Evans, M.; Gossler A, Doetschman, T. 1986)

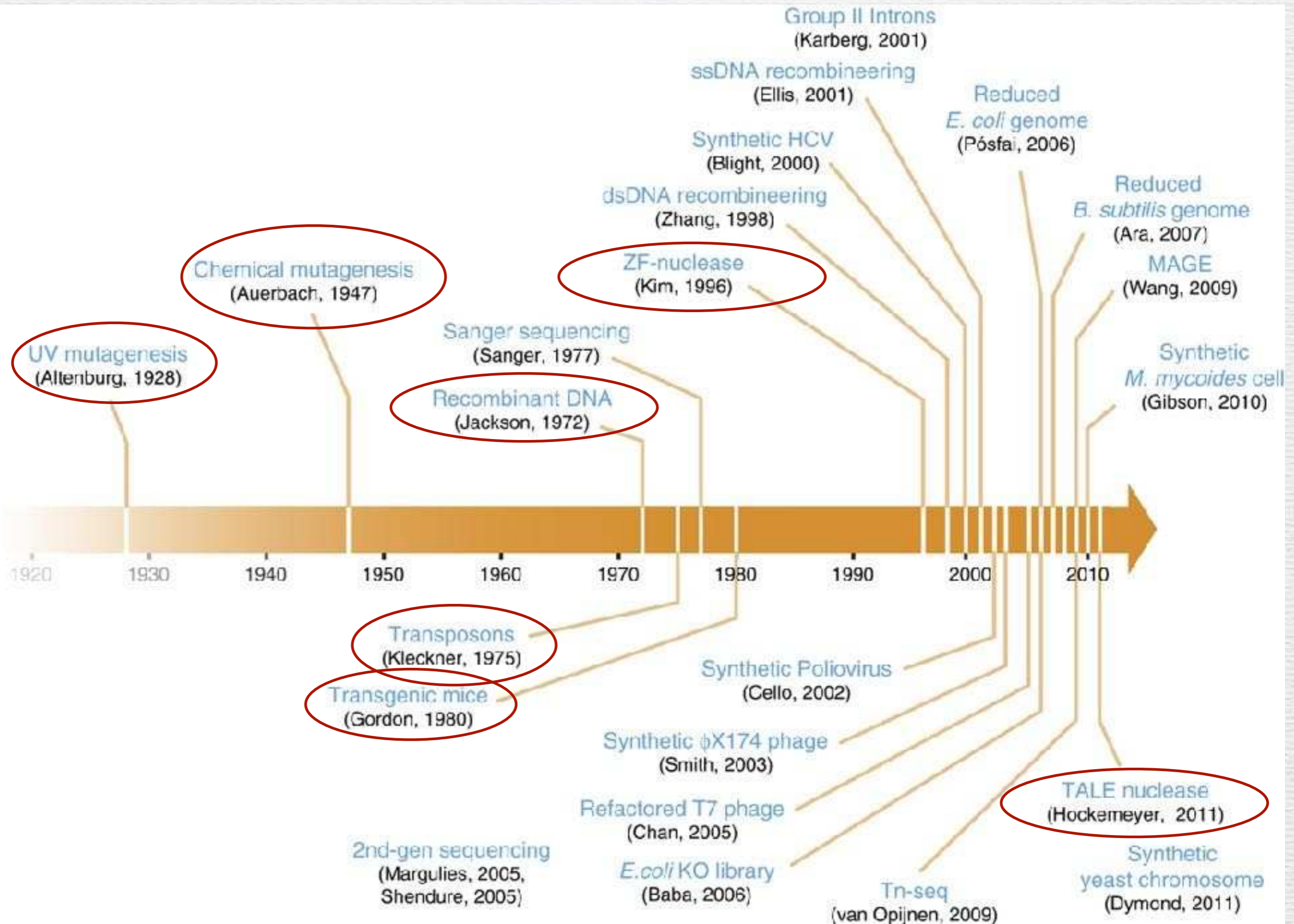
Mutáns Hprt gén kijavítása egérben homológ rekombinációval (Doetschman T., Thompson S., Smithies O. Nature.1987)

Mutagenézis célzott génmódosítással egér ES sejtekben (Thomas KR, Capecchi, M.R. 1987)

Szövet- és helyspecifikus DNS rekombináció transzgénikus egerekben (Orban P.C., 1992)

Indukálható génmódosítás egérben, Cre rekombináz alkalmazásával (Kuhn R., Schwenk F., Aguet M., Rajewsky K. 1995)

Genom módosítási technológiák



Transzgénikus állatok előállítási lehetőségei

technika	vektor	célzott sejt	vektor hossza	CÉLZOTT módosítás	hatás fok	technikai nehézség
Mikro-injektálás	DNS	zigóta sejtmagja	50-1000 kb	nem lehet	++	+++
	Vírus	zigóta perivitellináris	5-10 kb	nem lehet	+++	++
	Transzpozon (SB, PB)	zigóta citoplazmája	50-100 kb	nem lehet	+++	++
	ZFN, TALEN, CRISPR/CAS9	zigóta sejtmagja	18 bp célszekvencia	lehetséges	++	+++
	Mesterséges kromoszóma	zigóta sejtmagja	100-2000 kb	nem lehet	+	++++
Elektroporálás, liposzóma	DNS	őssejt, testi sejt	100-2000 kb	lehetséges	+++	+
	Vírus		5-10 kb		+++	
	Transzpozon		50-1000 kb		+++	
	Dupla szálú RNS		19-23 bp		++	