

Transzgénikus állatok felhasználási területei



Hiripi László

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont

Állati jólét biztosítása

3R szabály szem előtt tartása

- Replacement- alternatív lehetőségek
- Reduction- minél kevesebb állat
- Refinement- minél finomabb módszerek

Minden szabályozva van!!!



Miért jó transzgénikus állatokat előállítani?

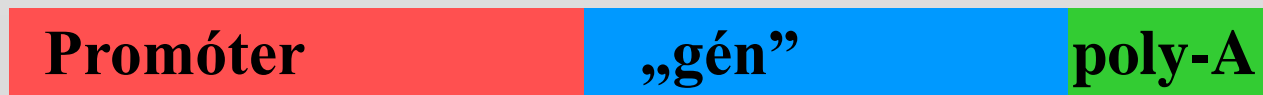
- Alap kutatás
- Mezőgazdaság
- Gyógyászat, Gyógyszeripar
- Ipar



Mikroinjektálással létehozott transzgénikus emlősállatok felhasználása



Egyszerű génkonstrukciók



Gén saját promóterrel

Intact gén intronokkal, exonokkal



Módosított gén „mutáns kódoló régióval”



cDNS konstrukciók- nincsenek intronok, csak a kódoló régiók

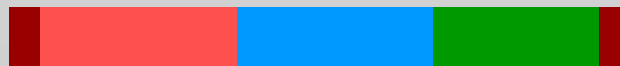
Mini génkonstrukciók: promóter + 1 intron + cDNS



Specifikus elemek beépítése: **IRES**- egy promóter két különböző gént irányít

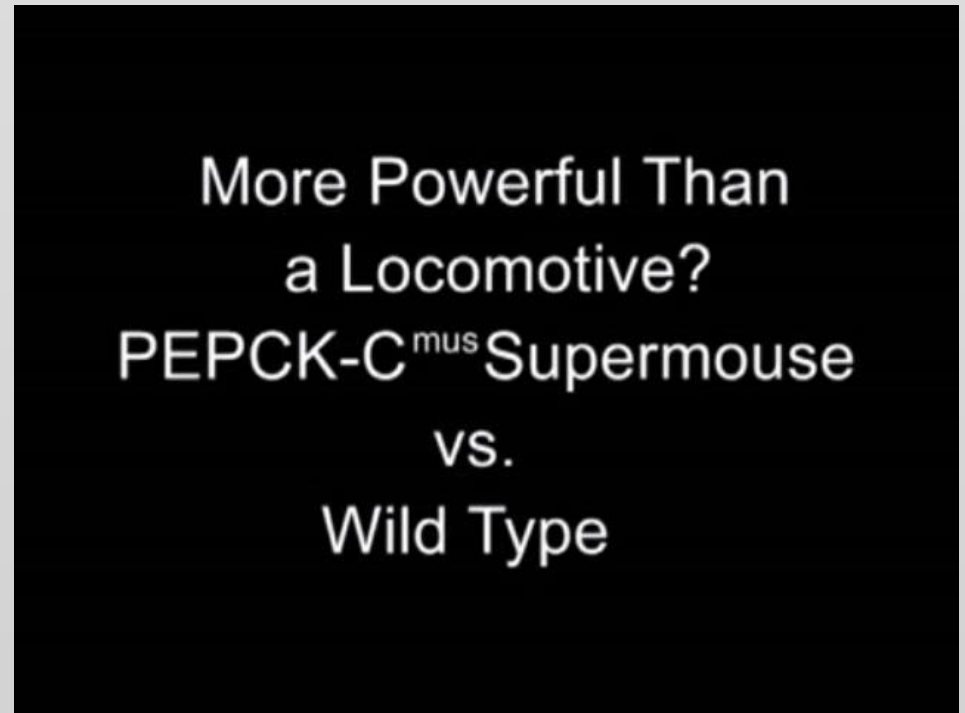


Izolátor szekvenciák beépítése (**SAR-MAR**)



Alap kutatás: Génfunkció vizsgálata

- phosphoenolpyruvate carboxykinase enzimet termeli túl az izomban. Ez az enzim egy kulcsenzim a glikoneogenezisben
- 6km-t fut 20 m/perc sebességgel megállás nélkül, tovább él, háromszor tovább szaporodik, nagyon aktív dobozban is, jóval több szex.
- Sokat ehet, és nem hízik
- Meg egy kicsit agresszívabb



PEPCK-C transzgénikus szuperegér

Várt és nem várt funkciók pontos vizsgálatához

Alap kutatás: okos egér



Nr2b gén, mely az NMDA receptort kódolja túltermelték. Ettől sokkal jobbak lettek a tanulási folyamatok.

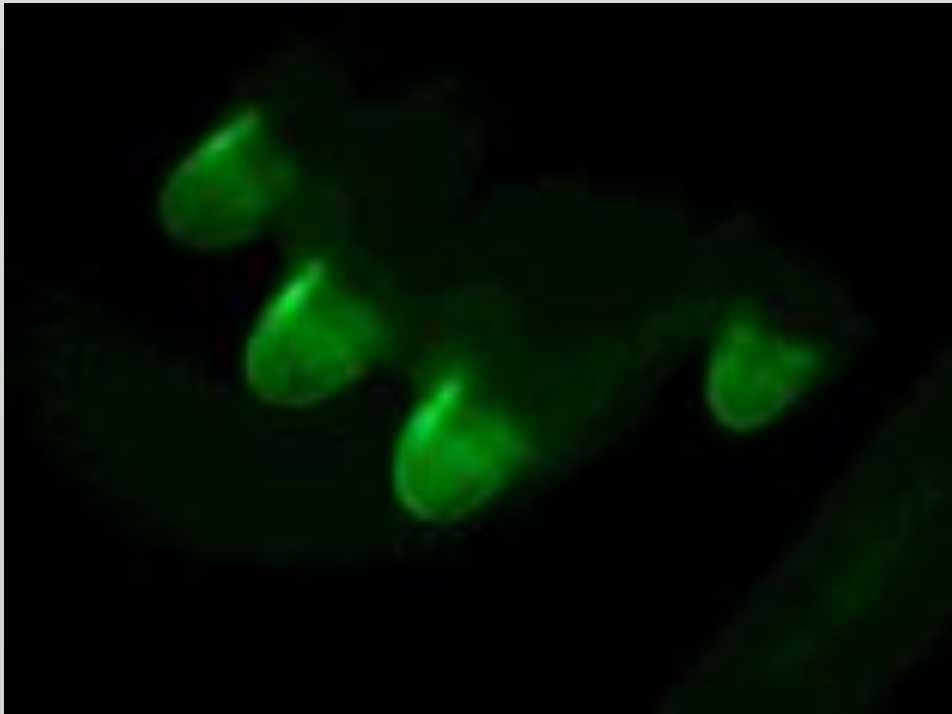
A bátor egér

A szaglógumó specifikus receptorsejtjeiben termeltetett diftéria-toxin gén alkalmatlanná teszi a sejteket funkciójukra. Ez az egér nem fél a ragadozók szagától



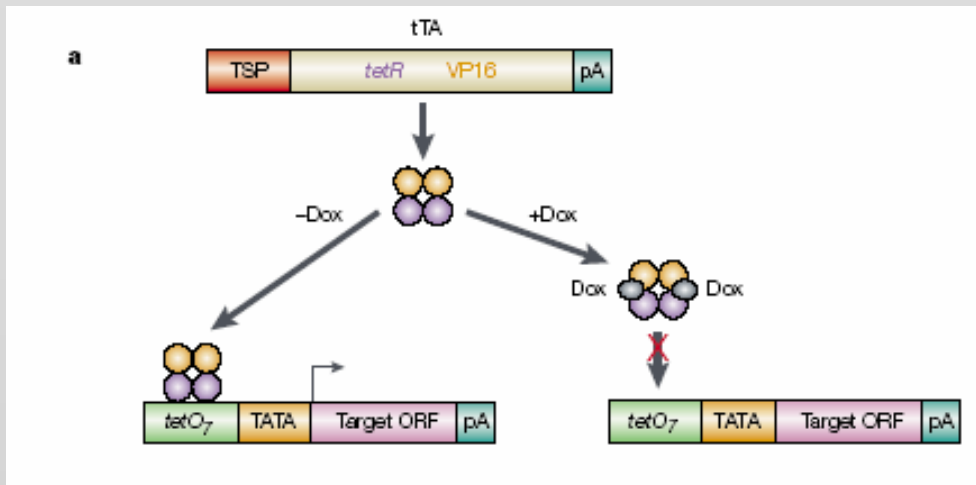
Alap kutatás: szabályozó régiók vizsgálata

Hoxc13-gfp transzgenikus egér



Pontosan megtudható, hogy egy gén milyen sejtekben működik

Néha szükség van a transzgén ki/bekapcsolására- lehetőség a Tetraciklin regulált promóter

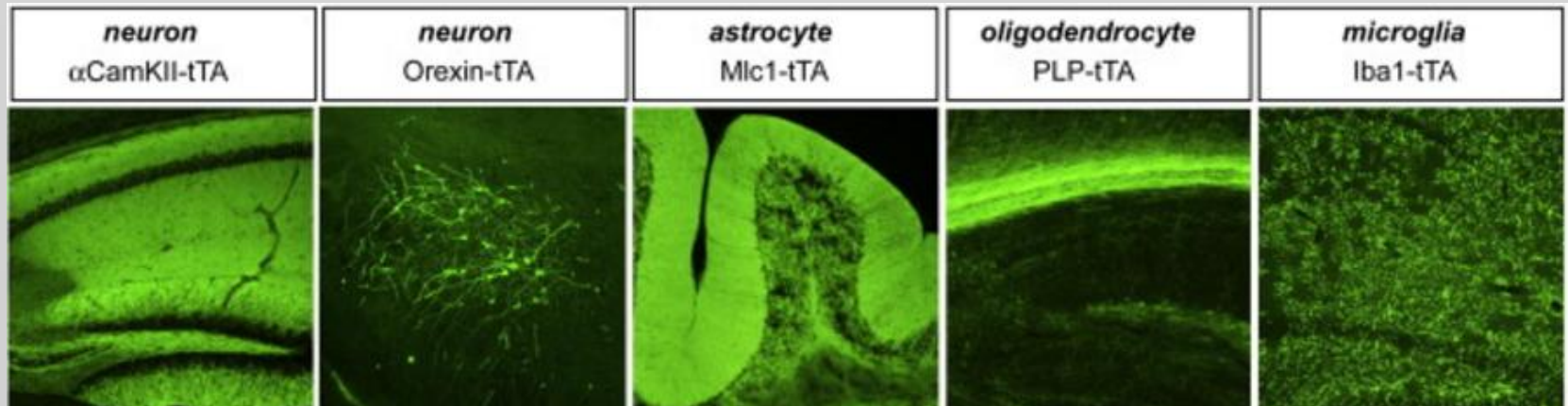


Elemei:

tTA tetraciklin
érzékeny fehérje

TetO7 tetraciklin
érzékeny promóter elem

Dox= tetraciklin



Kettős TG állat!!

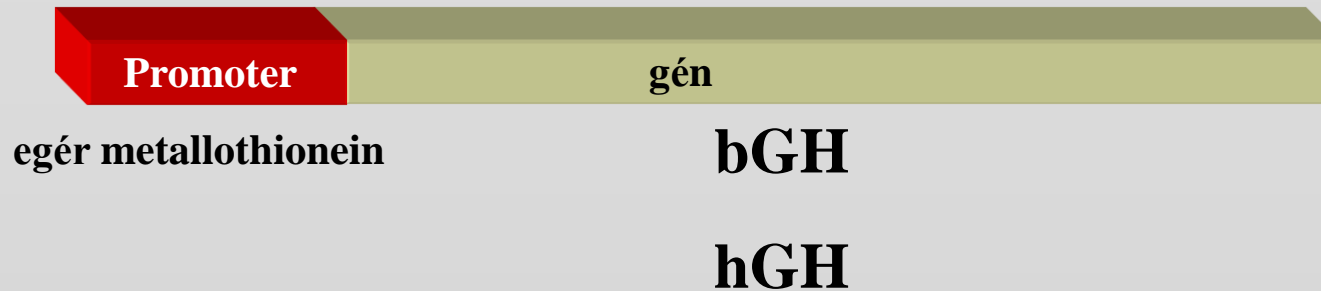
Mezőgazdaság: Növekedési erély fokozására

Növekedési hormont túltermelő állat



Haszonállatokban kevésbé sikeres, nagyon sok mellékhatással.

Növekedési hormont túltermelő sertések



Eredménye

Pozitív

1. Gyors növekedés
2. Táplálék jobb átalakítása hússá
3. Kevésbé zsíros

Negatív

1. Letargia
2. Izomgyengeség/sorvadás
3. Vércukorszint nem stimmel
4. Terméketlenség

Jobb hús

Növekedési hormon (IGF) termeltetése izomspecifikus promóterrel

Nincs elváltozás, nem stresszérzékeny

Jobb minőségű hús

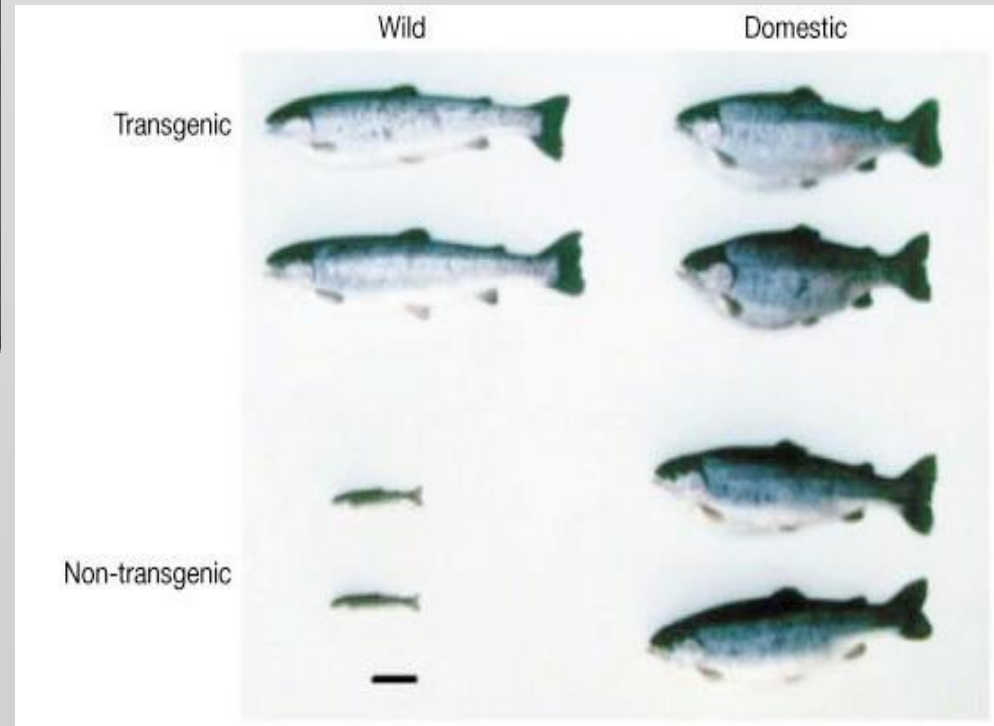


Növekedési hormon gén lazacban



Lazacban

**Pisztrángban csak a vad
fajtában működött**



Gyakori promóterek: CMV, metallothionein, antifreeze fehérje

AquAdvantage® lazac



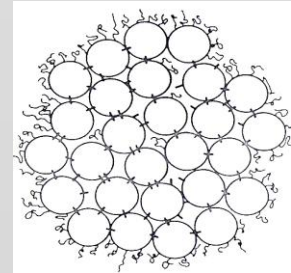
Chinook lazacból származó növekedési hormon túltermelése.

Gyors növekedés, csekély kockázatok, mert triploid

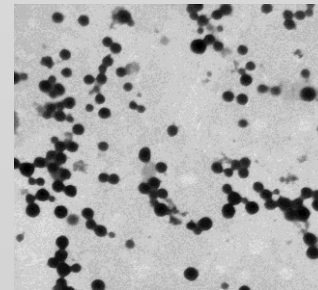
2015 őszén FDA engedélyt kapott

Transzgénikus szarvasmarha

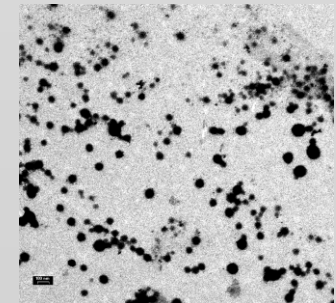
Tejminőség javítása A β - és κ -kazein túltermeltetésével



tejmicella



Normál



TG

Több kazein, jobb tejminőség, könnyebb sajtot gyártani belőle, egészségi állapotuk tökéletes

Kisebb micellaméretet a TG állatokban

Tejösszetétel megváltoztatása- alfa-laktalbumin túltermeltetése

Korai elhullás probléma a szopós malacoknál

Laktóz képződését segíti elő

A kritikus napokon (3-9) 30-50%-al több tej

Súlygyarapodás sokkal kedvezőbb a malacoknál



Tőgygyulladás megoldása transzgénikus módszerekkel

Az USA-ban az állományok harmada érintett

Kétmilliárd dollár/év költség

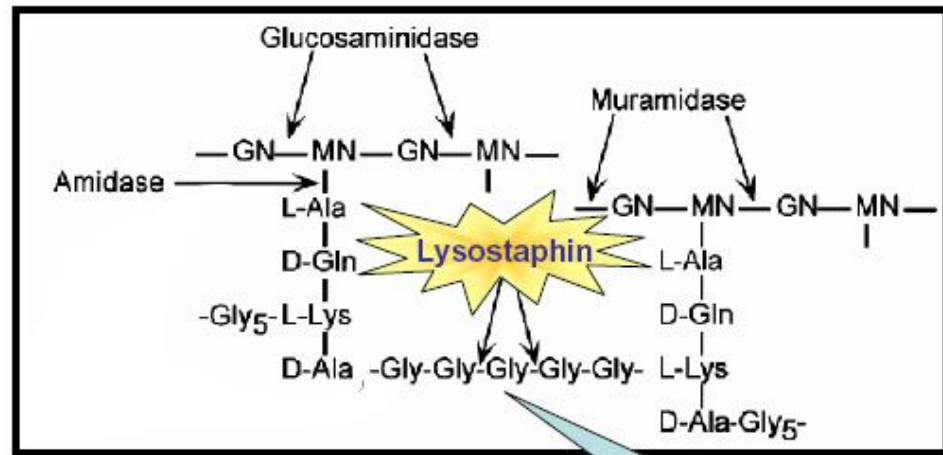
Kevesebb tej, kevesebb sajt

Vakcina nem elég hatékony, antibiotikum nem szerencsés



Staph. aureus

Esetek harmadát okozza



Peptidoglycan hydrolase

Unique S.aureus pentaglycin cross link

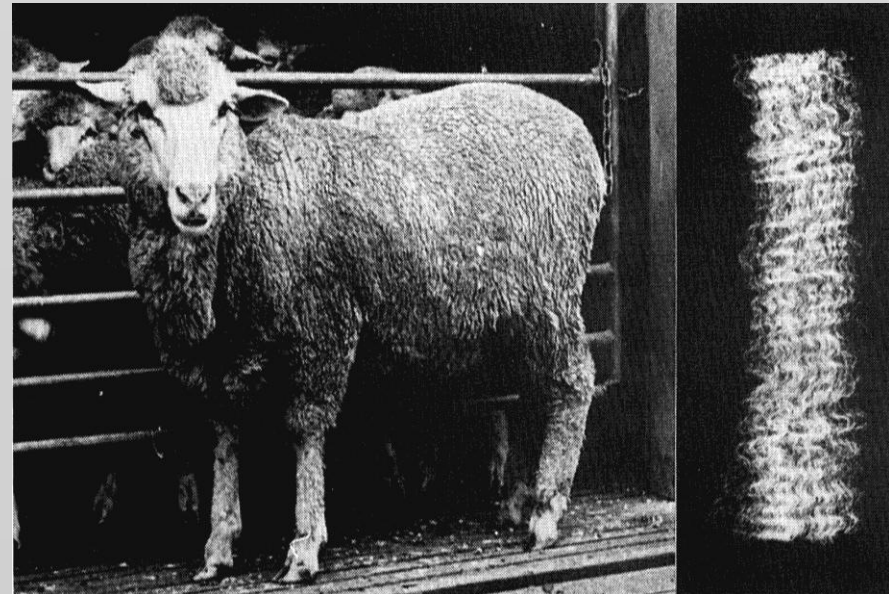
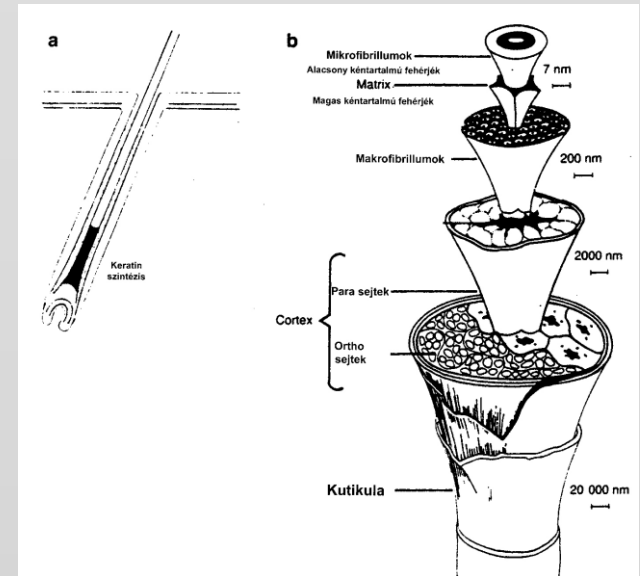
SV-40 virális promóterrel túltermeltetett Lysostaphin transzgénikus marha



90%-ban védettek mesterséges fertőzés után

TRANSZGENIKUS BIRKA –A GYAPJÚ ÖSSZETÉTEL MEGVÁLTOZTATÁSA

- Egy bizonyos keratin gén (MK2.10) túltermelése a szálak makro és mikrostruktúrájában komoly változást okozott
- Kevésbé göndör
- A szálak kialakításában szerepet játszó gének egy csoportja csökkent működésű lett



Hidegtűrő transzgénikus halak

**Jégképződést csökkentő fehérjék
találhatók pl egyes lepényhalfélékben**



**Antifreeze fehérjét termelő transzgénikus aranyhal
hidegtűrőbb**



**Lazacban is működik, csak kevés a fehérje, és kicsi az
aktivitása**

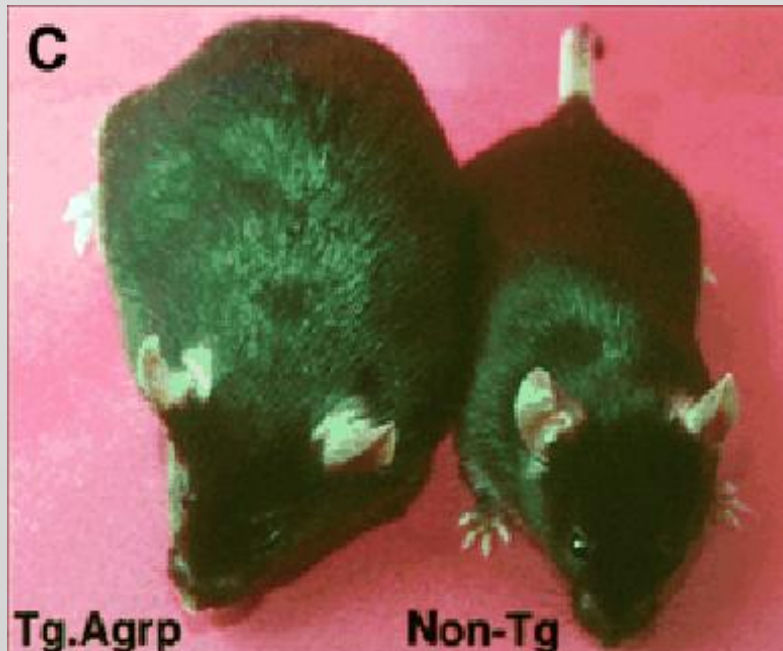


Túlhaladott elképzelések

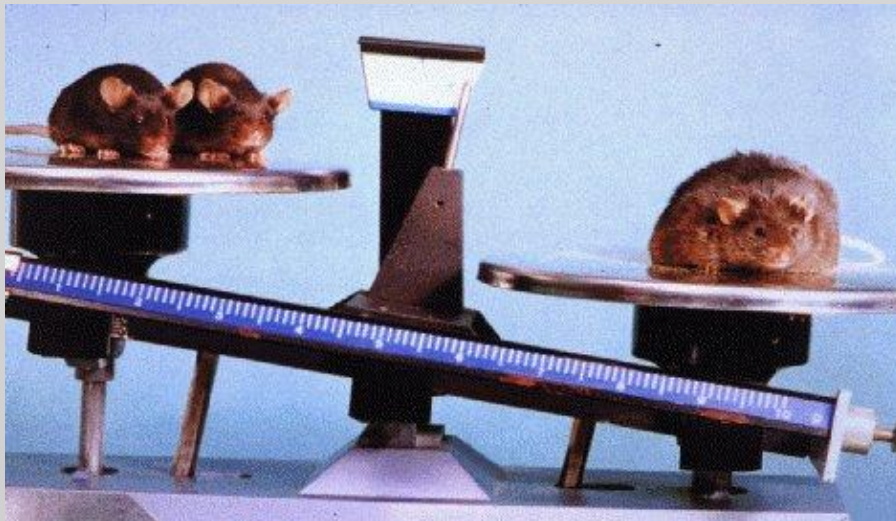
- ❖ **CSÖKKENTETT LAKTÓZ TARTALMÚ TEHÉNTÉJ**
- ❖ **ALACSONY ZSÍR TARTALMÚ TEHÉNTÉJ**
- ❖ **MÓDOSÍTOTT TEHÉNTÉJ AMELYBŐL KENHETŐBB VAJAT LEHET ELŐÁLLÍTANI**

Transzgénikusan megoldható, de ma már olcsóbb egyéb technológiával

Gyógyszeripar: Betegségmodellek, gyógyszermolekulák tesztelése



Az egér összes sejtében termeltetett Agrp fehérje elhízást okoz a transzgénikus egerekben. A fehérje szerepe eddig ismeretlen volt, csak annyit tudtak róla, hogy bizonyos túlsúlyos mutánsokban sokkal több fehérje termelődik.



„Rákrezisztens egér”



**Minden sejt termeli a Par-4 tumor szupresszor fehérjét.
Mindenféle spontán és indukált tumornak ellenáll**

Gyógyszeripar: transzgénikus bioreaktorok

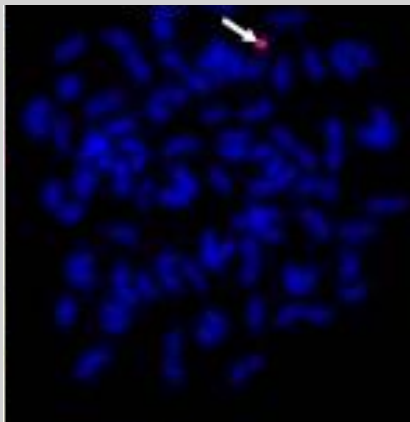
Gyógyhatású fehérjék kiválaszthatók az emlősállatok váladékaiba. Legjobb lehetőség a tej. Ebben az esetben emlőspecifikus szabályozó régióval kell kombinálni a gyógyhatású fehérje génjét

Külön előadás keretében Dr. Bősze Zsuzsanna

Humán antitestek termelése szarvasmarhában



**Hematech- humán antitestek
termeltetése**



**A végcél teljesen humanizált
szarvasmarha (ellenanyagtermelés
szempontjából)**

TRANSZGENIKUS SERTÉS MINT SZERV DONOR

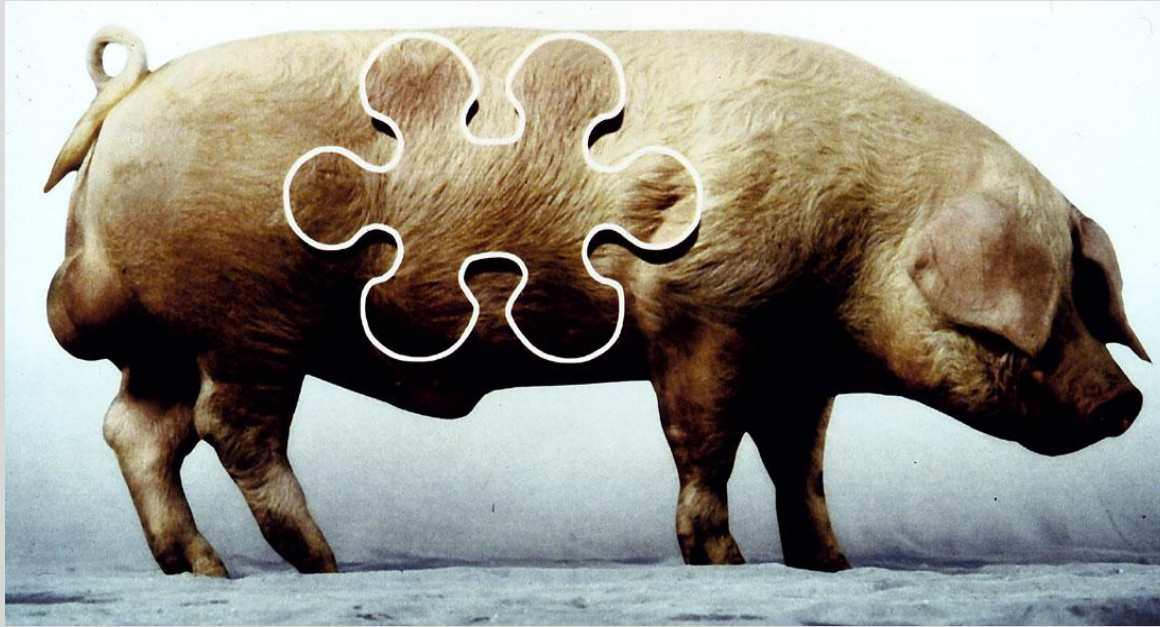
PROBLÉMA: A FŐEMLŐSÖK ELLENANYAGAI REAGÁLNAK MÁS FAJ SEJTFELSZINI FEHÉRJÉINEK SZÉNHIDRÁT OLDALLÁNCAIVAL

KÖVETKEZMÉNY: AZONNALI REAKCIÓ, A KOMPLEMENT RENSZER AKTIVÁLÓDÁSA, TROMBÓZIS, NEKRÓZIS, SZERVKILÖKÖDÉS

MEGOLDÁSI MÓDOK:

- **1. A KOMPLEMENTRENSZER GÁTLÁSA (A KOMPLEMENT RENDSZERT SZABÁLYOZÓ KOMPONENSEK TERMELTETÉSE) A SZERV DONOR ÁLLATOKKAL PL CD46,CD55,CD59**
- **GAL α 1,3-GAL EPITÓP CSÖKKENTÉSE, ELTÁVOLITÁSA**

A SERTÉS MINT POTENCIÁLIS SZERVADONOR



- JÓL SZAPORITHATÓ, RELATIV RÖVID GENERÁCIÓS IDEJE VAN
- AZ ANATÓMIÁJA ÉS FIZIOLÓGIÁJA HASONLIT AZ EMBERÉHEZ
 - SPF KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT IS LEHET TENYÉSZTENI

KOMPLENT SZABÁLYOZÓ FAKTOROKAT TÚLTERMELŐ SERTÉS SZERVEK TÚLÉLÉSE ÚJVILÁGI MAJMOKBA TÖRTÉNŐ ÁTÜLTETÉS SORÁN

faktor	szerv	Recipients	Immuno- szuppressió	Túlélés (nap)
hDAF	szív	Cynomologus	+++	~135
”	”	”	++	~ 90
”	”	Pávián	+++	~ 28
”	vese	Cynomologus	++	~ 90
hCD59	vese	Cynomologus	+++	~ 20
hCD46	szív	Pávián	++	~ 23

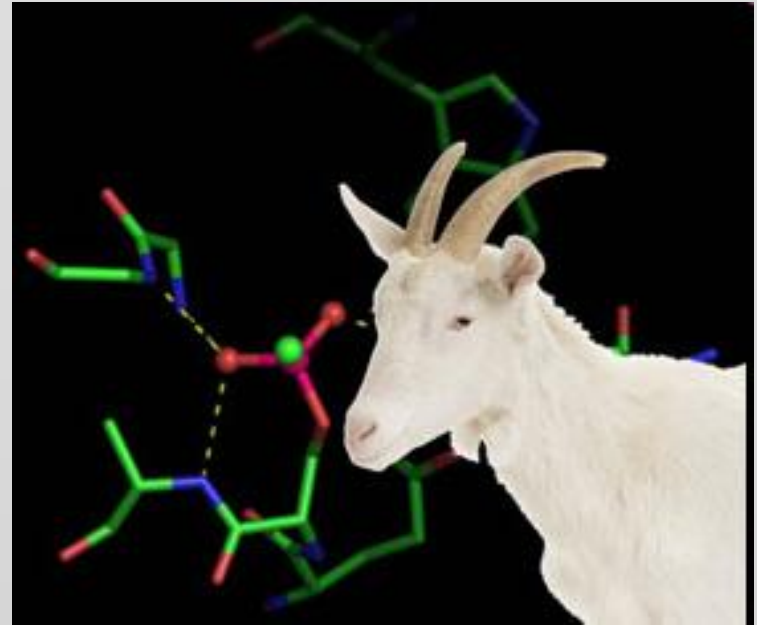
Hármas transzgenikus sertések



**hTM/CD59/DAF
hármas transzgenikus
malacok, a
komplement rendszer
3 szabályozóját
termelik**

Élelmiszeripar: egészséges tej

Tejükben patkány stearoyl-CoA-deszaturázt termel. Ez emeli az egyszeresen telített zsírsavak arányát. Szív-érrendszeri problémáknál jó.



**Magas Omega-3
tartalmú tej
laposféregből
származó gén termeli**

Ipari felhasználás



**Pókselyem termeltetése
kecskék tejében. Extra erős és
könnyű anyagok, golyóálló
mellények**

Ipari felhasználás



2. Butyrylcholinesterase termeltetése transzgénikus kecskék tejében. Ez az enzim képes megkötni ideggázokat, melyek a szervezetbe jutnak. Katonai oltások alkotórésze.

TG állatok mint „házi kedvencek”



Macska mely nem tartalmazza a leginkább humán allergén Feld1 glikoproteint



GloFish világító halak

**Fluorescens proteint hordoznak
(piros ill. zöld változatban)**

KÖRNYEZETVÉDELEM: TRANSZGENIKUS SERTÉS (Enviropig)

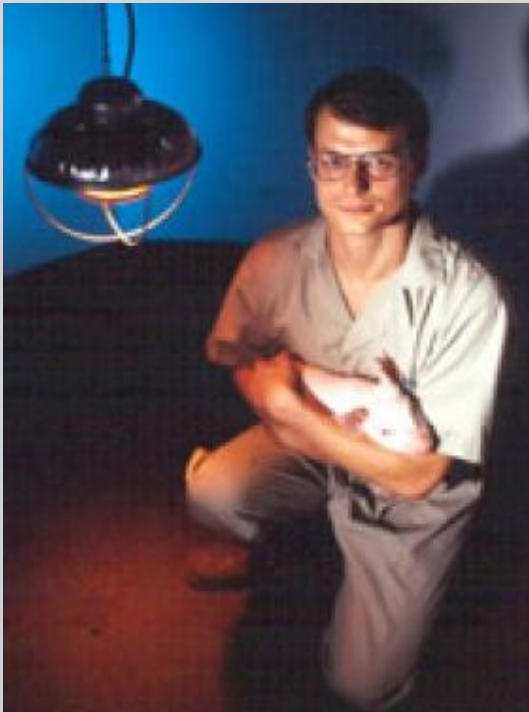
PROBLÉMA

A EMÉSZTHETETLEN FOSZFORVEGYÜLETEK /PHYTATE/ A TÁPBAN, TRÁGYÁVAL ÜRÜLNEK

KÖVETKEZMÉNYEK

ÉLŐVIZEK EUTROFIZÁLÓDNAK, ALGAVIRÁGZÁS, HALPUSZTULÁS STB.

MEGOLDÁS: PHYTASE HOZZÁADÁSA, ALACSONY PHYTATE TARTALMÚ GABONANÖVÉNY, VAGY PHYTASE TR SERTÉS



NYÁLMIRIGYSPECIFIKUSAN TERMELI AZ ENZIMET

Felére csökkent foszforterhelés

Kutatások leálltak támogatás hiányában

Ökotoxikológia/környezetvédelem

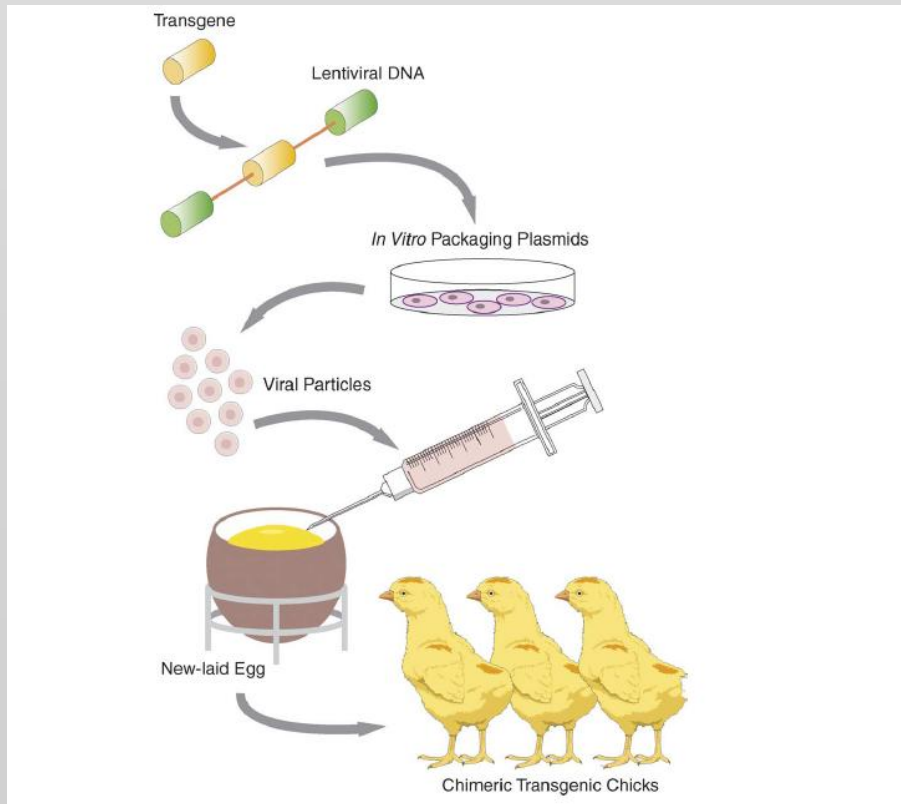


Stresszfehérje promóter- jelzőfehérje (gfp)

Stressz (szennyezés hatására világít), általában zebrahal

Fém, aromás vegyületek módosulata is van

Lentivirális technológia felhasználásával készült állatok



Mivel hasonlóan additív transzgenezis, felhasználási területük is hasonlók mint eddig. De madárban igazából csak ez a hatékony rendszer

Állategészségügy

Transzgénikus baromfi, mely nem képes a madárinfluenzát A(H5N1) továbbadni



Olyan rövid speciális RNS molekulát (shRNS-siRNS) termel, mely megakadályozza a vírus polimeráz működését.

Lentivírus alapú transzgénikus technológia felhasználásával készült, mert madarakban csak ez hatásos.

Lyall et.al. 2011

Őssejtek segítségével létrehozott transzgénikus állatok felhasználása



A technológia felhasználása Célzott mutációk létrehozására

- Génkiütött állatok- knock out**
- Knock-in állatok**
- Kondicionális génkiütött állatok**



Génfunkció vizsgálatok: nagyhatású gének kiütése



KO

Normál

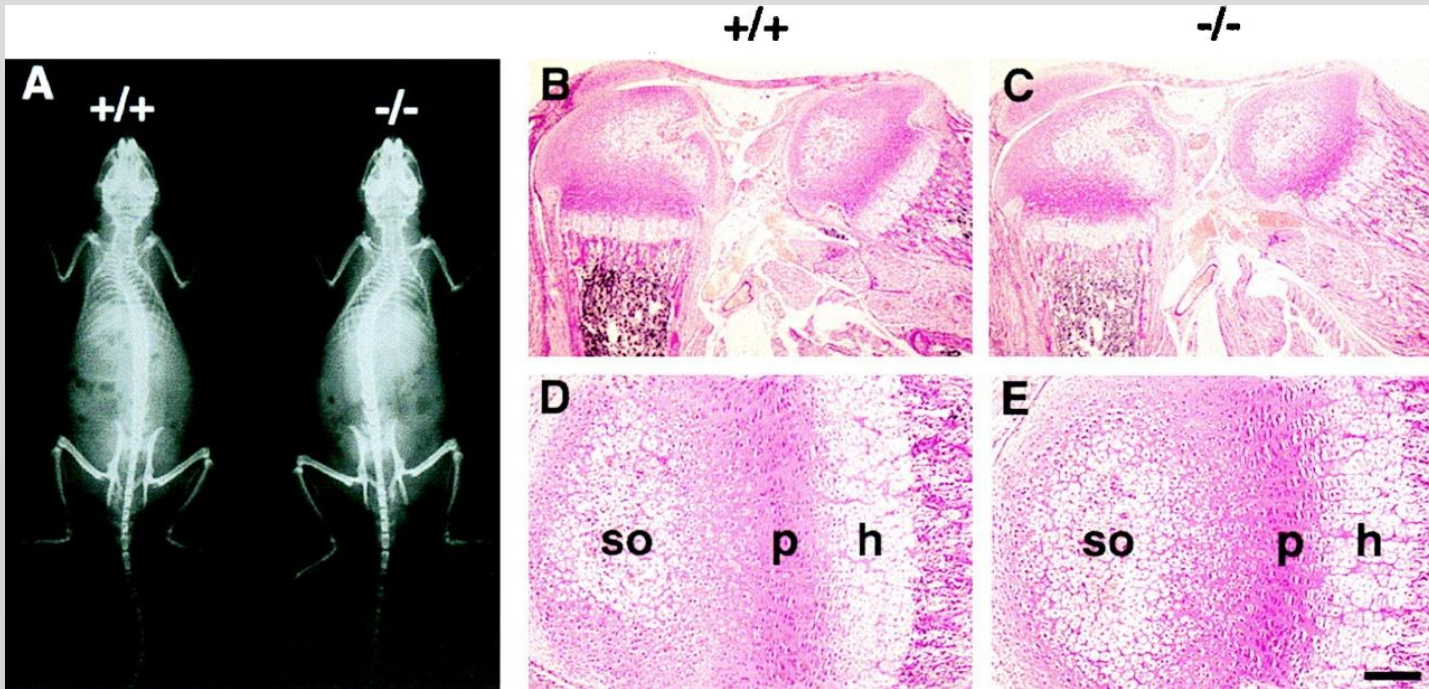
Lim1 homeobox gén

Génfunkció vizsgálatok: nagyhatású gének kiütése

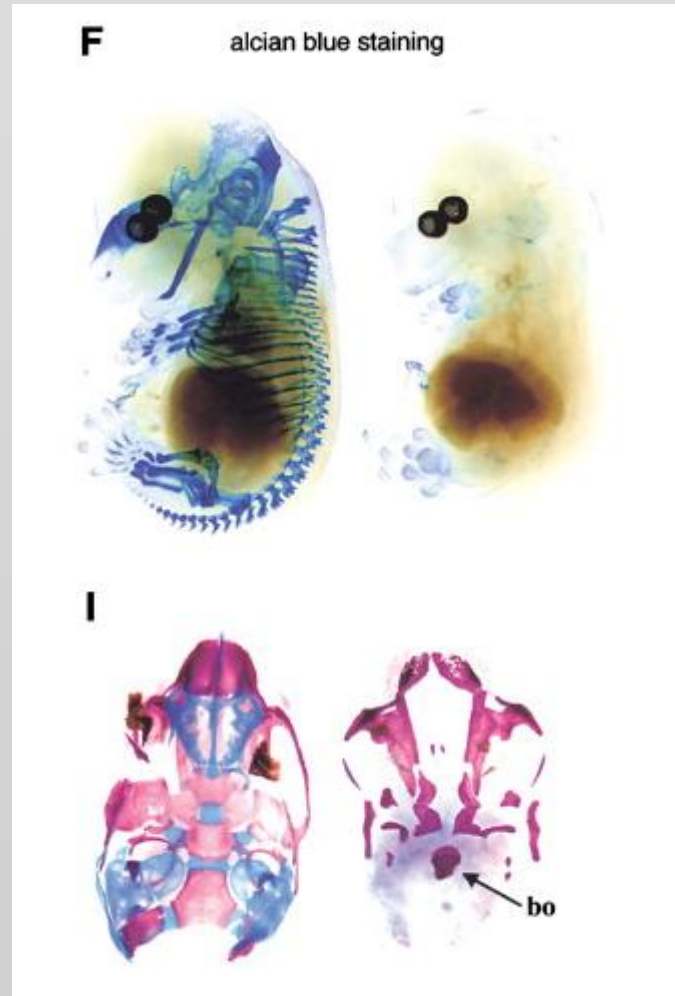


Tetranektin gén kiütése

„Kis hatású gén” pl matrilin1



Dupla KO állat, ha szimplán nincs eredmény SOX-5, SOX-6 esete



Nagyhatású gén kiütése, funkciónyeréssel

Myostatin KO egér



normál

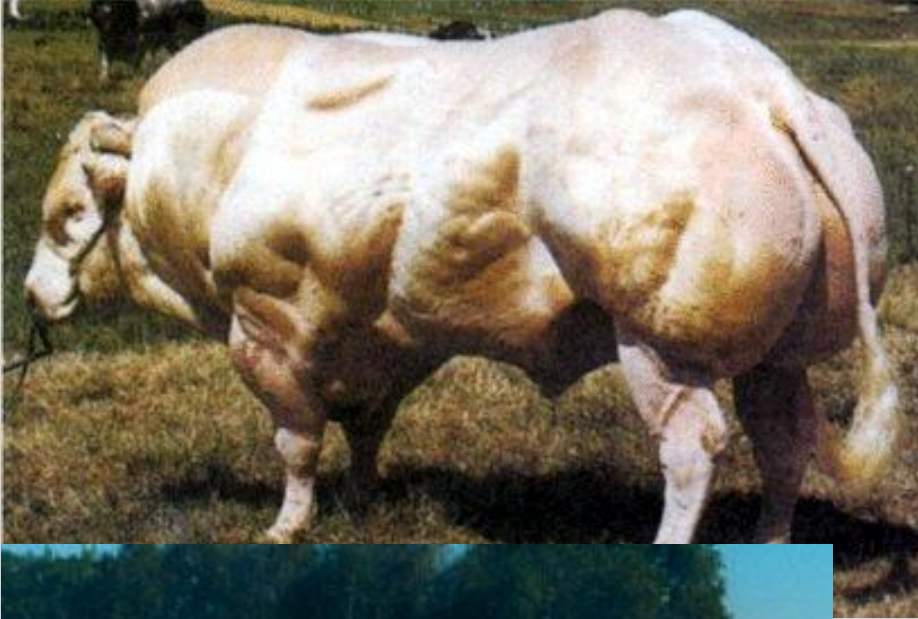


-/-

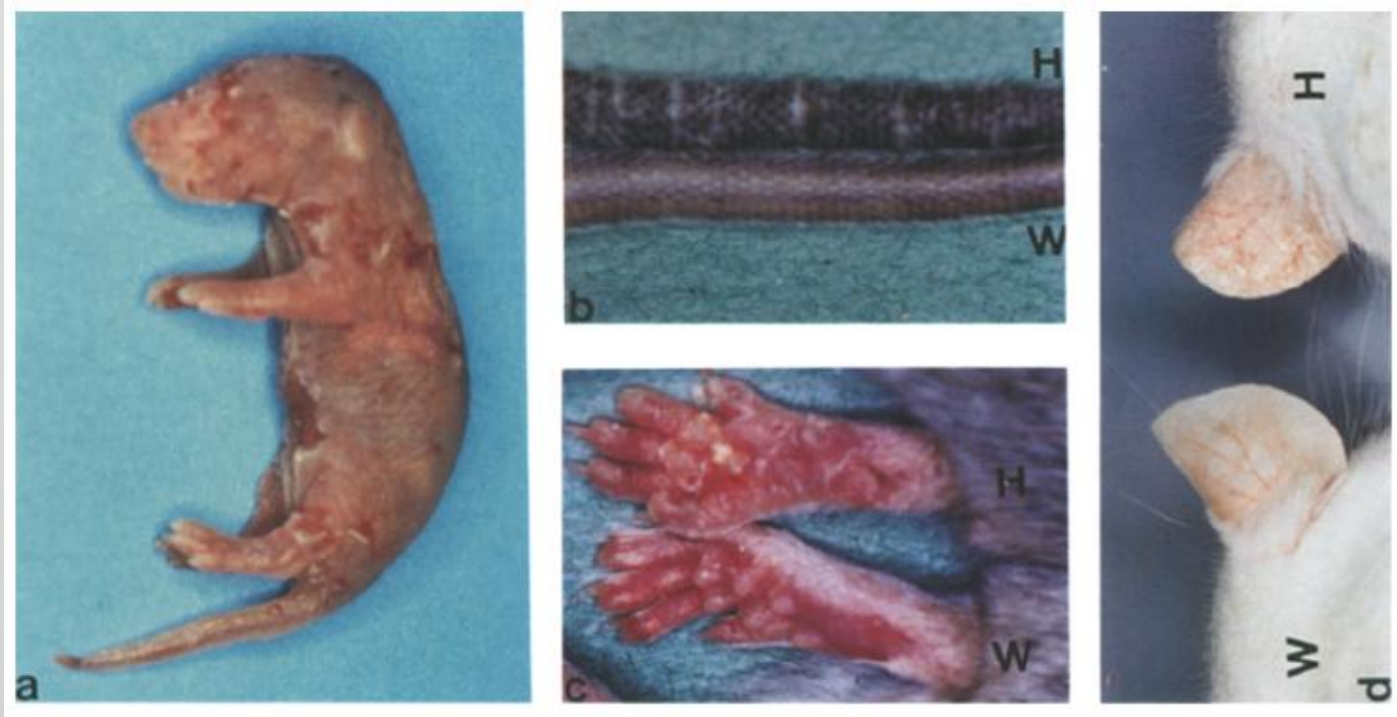


Természetes knock out állatok (belga kék, izmos agár)

Mutációt hordoz az izomnövekedést szabályozó myostatin génben



Géndózis vizsgálatok, citokeratin 10 gén kiütése



-/-

+/- és vad

+/- és vad

Knock-in állatok felhasználása: Modell az emberi Huntington kórra



normál

tg

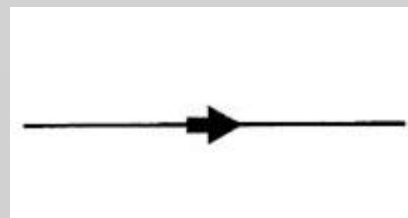
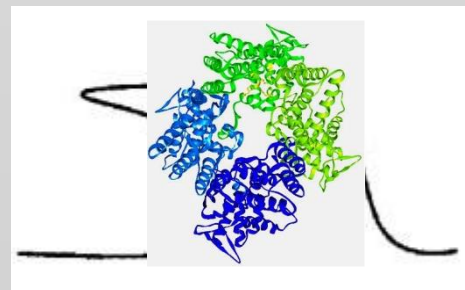
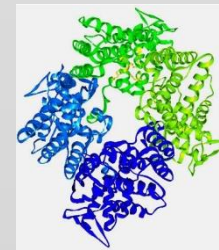
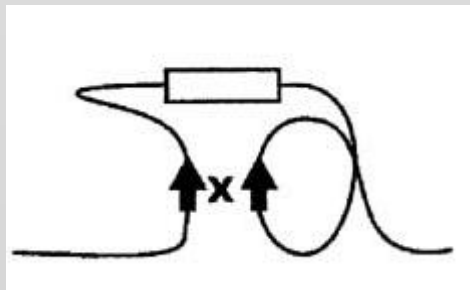
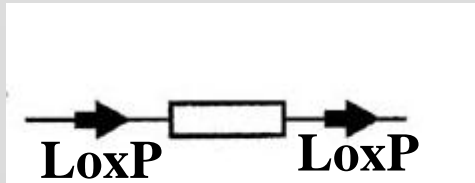


Rodopszin-GFP transzgénikus egér a gyógyszeriparban



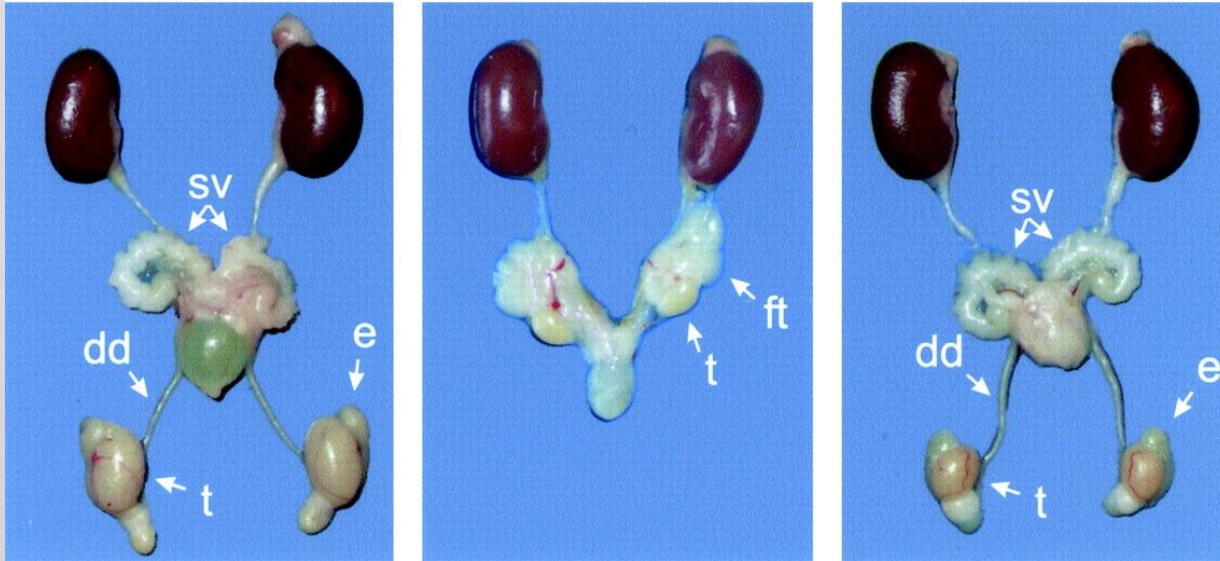
Retinitis pigmentosa

Cre-LoxP rendszer–kondicionális célzott mutációk

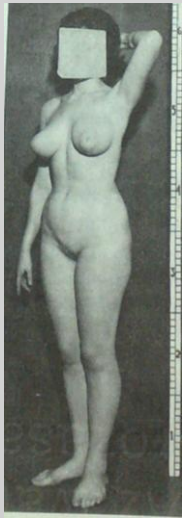


A Cre rekombináz működése

Kondicionális célzott mutációk : Androgén receptor kiütése általánosan, és sejt-specifikusan más problémát okoz.



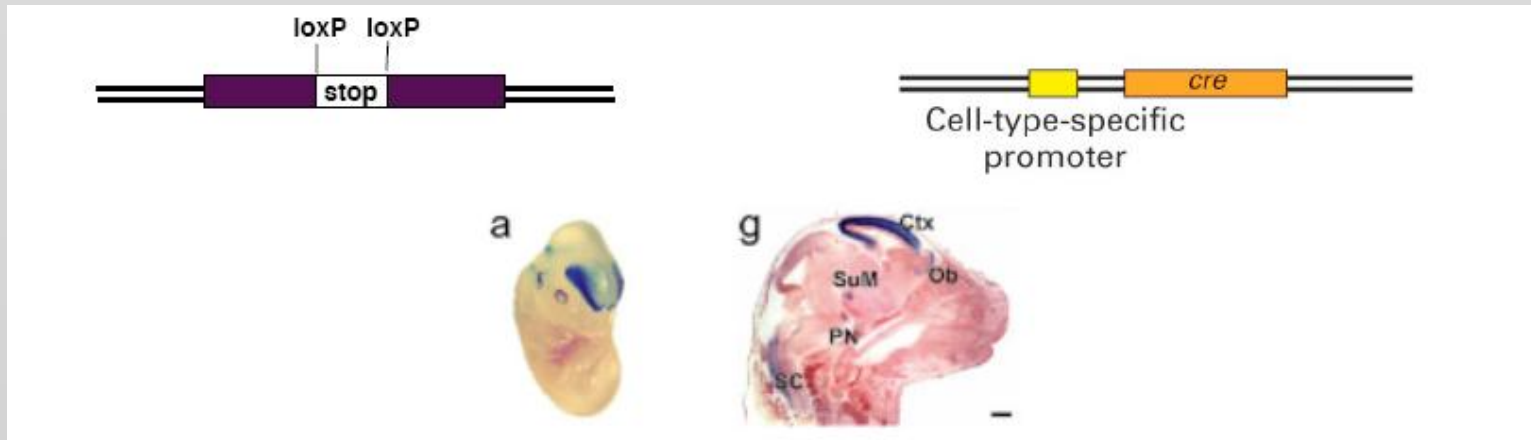
dd, herevezeték ; t, here; e, mellékhere; ft, zsírszövet



Gyógyászat

Kondicionális KO: szabályozóelemek vizsgálata Cre segítségével

Neocortex specifikus Cre-LacZ transzgénikus egér
Lac-Z transzgén Neocortex spec. Cre



Elsősorban alapkutatásra

Klónozással készített transzgénikus állatok



Polly az első klónozott, transzgénikus állat



Tejében IX. véralvadási faktort termel

Xenotranszplantáció

Állatból emberbe történő szervátültetés

Probléma: azonnali kilökődés

A kilökődés kiváltója egy sejtfelszíni „cukor-oldallánc” mely nincs meg az emberben (Gal-alfa-1,3-Gal)



Klónozással készült KO sertések, melyek nem képesek ezt a sejtfelszíni markert szintetizálni. Gyakorlatilag alkalmasak szívatültetésre.

Prionmentes biztonságos hús előállítása KO módszerekkel

- Prp (prion) mentes kecske, szarvasmarha



Klónozott transzgénikus macska (vörös fluoreszkáló fehérje)



A klónozás felhasználása: veszélyeztetett fajok



2001-ben Noah a gaur volt az első veszélyeztetett klónozott állat

Afrikai vadmacska
2005



Vastagszarvú juh
egy alfaja 2006



Banteng 2003

szürke farkas
2007



Junqueira fajta, 2005

Pireneusi hegyikecske 2009



Klónozás fagyott sejtekből



Mamut?