



**Alkalmazott biokémia, transzgénikus
organizmusok
TRANSZGENIKUS NYÚL ELŐÁLLÍTÁSA ÉS
ALKALMAZÁSI TERÜLETEI**

**BŐSZE ZSUZSANNA
MTA Doktora
NAIK-MEZŐGAZDASÁGI BIOTECHNOLÓGIAI
KUTATÓINTÉZET
2018**

TÖRTÉNETI ÁTTEKINTÉS

Eredet

- az egyik legkésőbbben házasított állatfaj, őse az üregi nyúl (*Oryctogalus cuniculus*)
- az üregi nyúl az utolsó jégkorszak után terjedt el Spanyolországból, részben oly módon hogy királyi vadas parkokba telepítették

Klasszikus alkalmazási területei

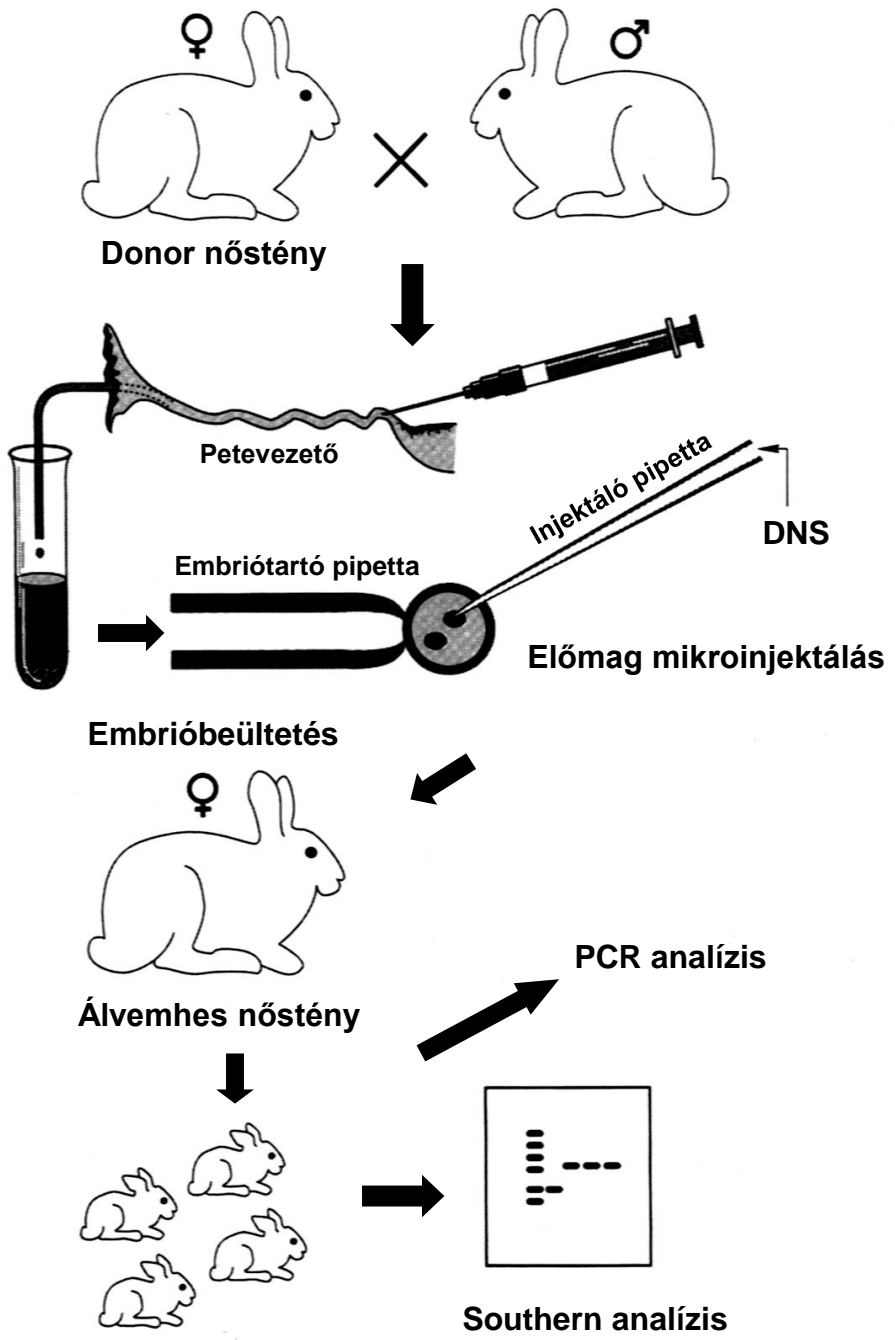
- fiziológia vizsgálatok pl. vérkeringés, vérnyomás,
- toxicitás vizsgálatok pl. gyógyszerek tesztjei
- ellenanyag termelés
- Korábban:értékes szarvasmarha embriók szállítása

Gyakorlati alkalmazás

- hús, szőrme és angóra fonál
- hobby állat



Transzgenikus nyúl előállítása mikroinjektálással - sematikus ábra



Előmag (pronukleusz) mikroinjektálás kis méretű plazmid alapú transzgen konstrukciókkal

- Plazmid alapú transzgen konstrukció elkészítése, a bakteriális eredetű szekvenciák eltávolítása, nagy tisztaságú injektáló oldat elkészítése**
- Embrió donor egerek hormon kezeléssel szuperovuláltatva, embriómosás**
- Előmag injektálást követően in vitro inkubálás az osztódó embriók beültetése álvemhes nőstényekbe**

Donor és recipiens nyulak hormonkezelése

Hormon kezelések:

Donorok

- **6x FSH** (follikulusz stimuláló hormon) **vagy 1xPMSG** (pregnant mare serum gonadotropin)
- **HCG (+ 2x termékenyít)**

Recipiensek-árvemhesség tétele

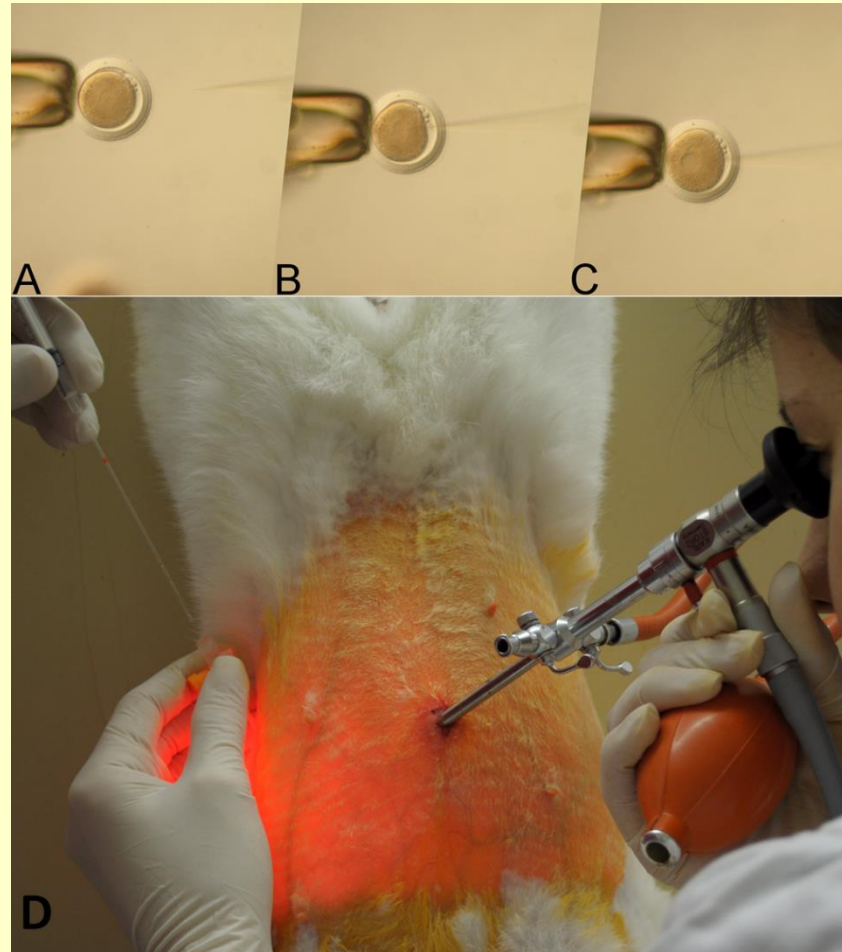
- **HCG** (humán coriogonadotropin) **vagy GnRH** (gonadotropin releasing hormon) **vagy vazektomizált hímekkel párosítás**

Embrió transzfer sebészeti vagy laparoskopos eljárással

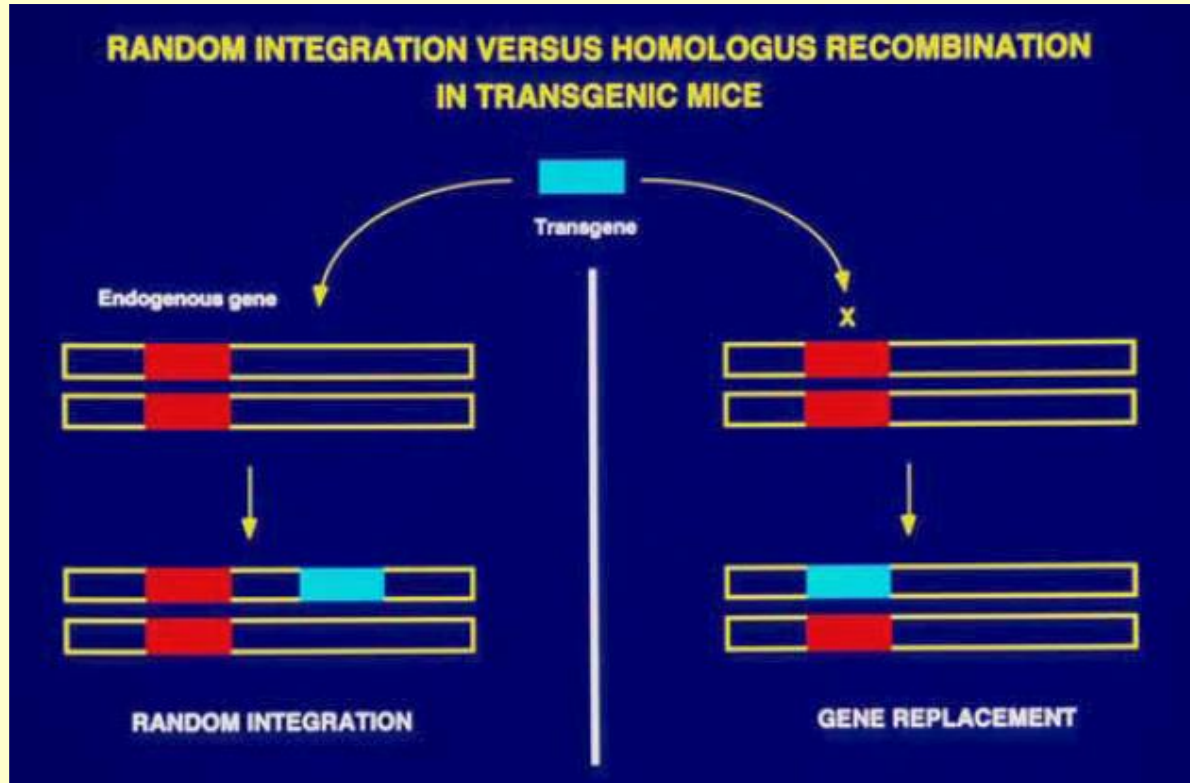
Módszer hatékonysága

- **1-2% transzgénikus alapító/ injektált és beültetett embrió**

Embriótranszfer laparoskopópos eljárással

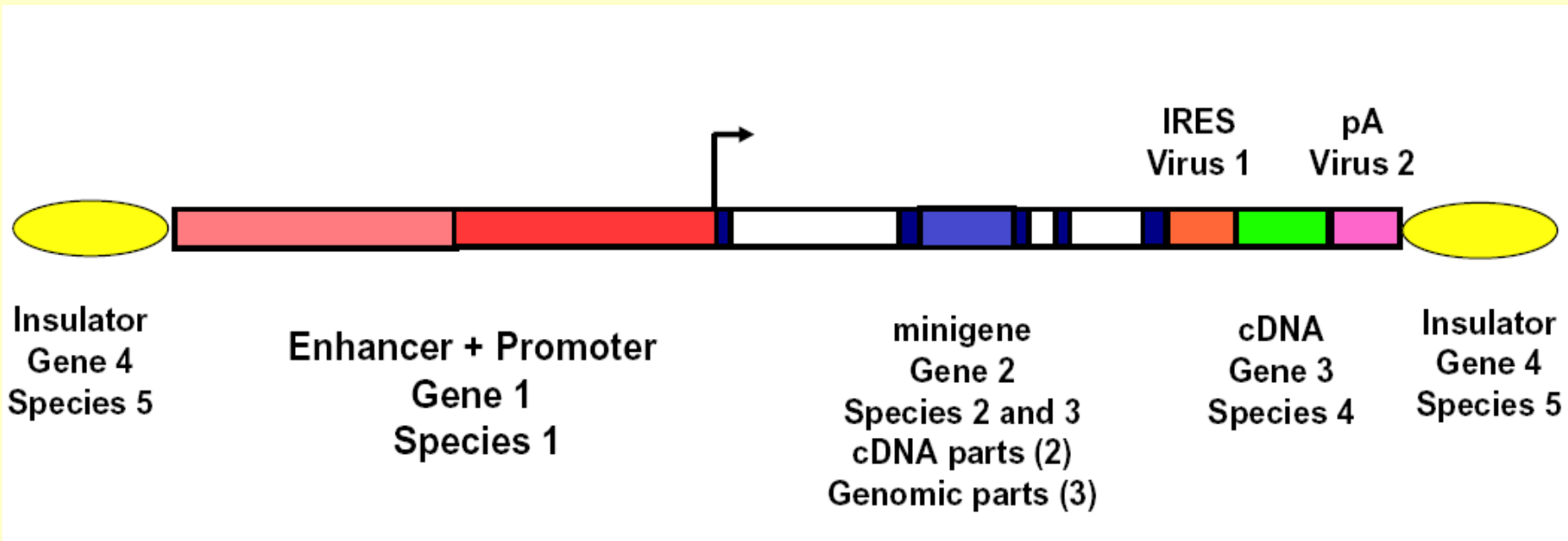


A transzgén előmag mikroinjektálásával kapott véletlenszerű transzgén beépülés és a célzott génbeépítés összehasonlítása /pl CRISPR/CAS-al/



„Hagyományos” előmag mikroinjektálással random, véletlenszerű transzgén beépülést tudunk elérni, sem a beépülés helyét sem a fej-farok tandem beépült transzgén kópiaszámot nem tudjuk befolyásolni

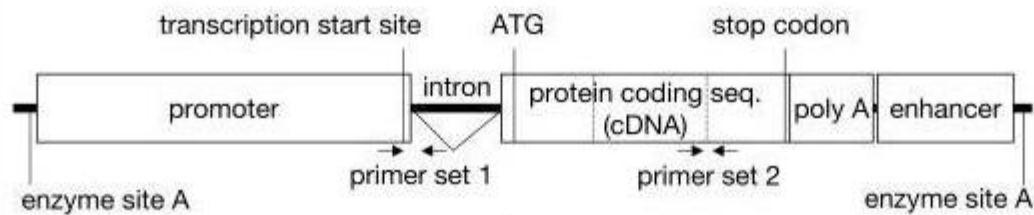
PLAZMID ALAPÚ TRANSZGÉN ELVI SZERKEZETE



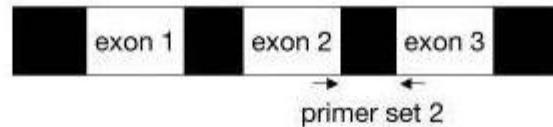
IRES (internal ribosomal entry site) = vírus eredetű DNS szekvencia, amely lehetővé teszi a transzláció iniciációját a mRNS 5' CAP-tól függetlenül

PLAZMID ALAPÚ TRANSZGÉN ELVI SZERKEZETE

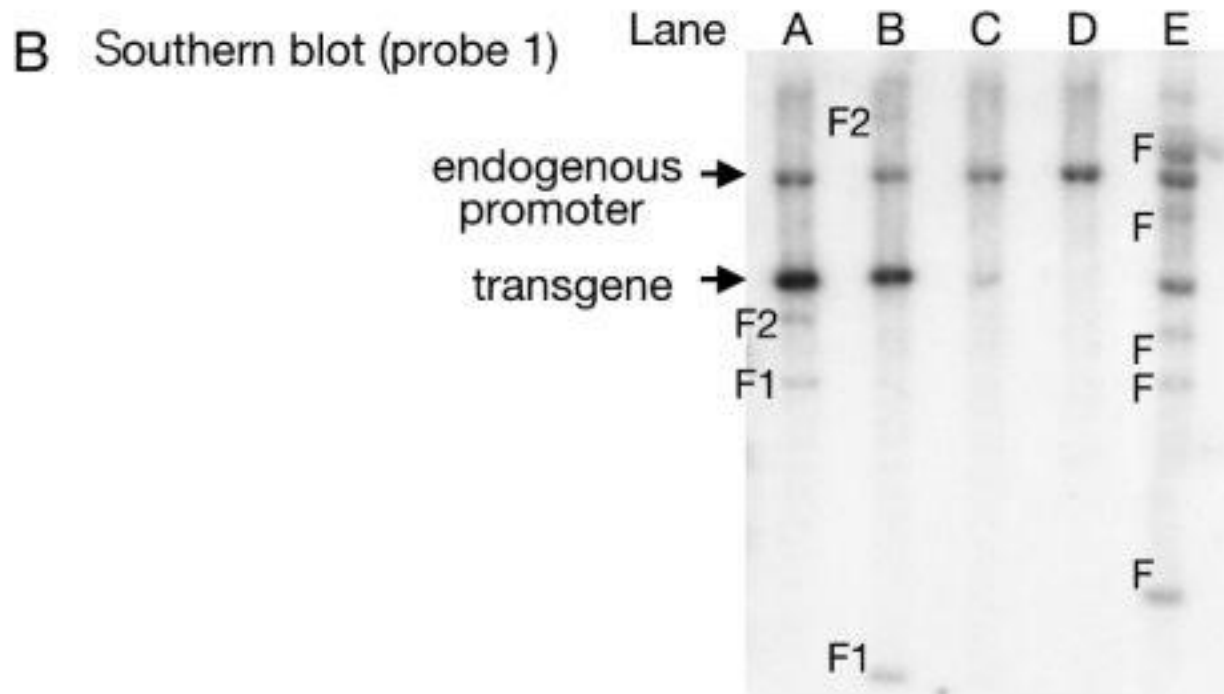
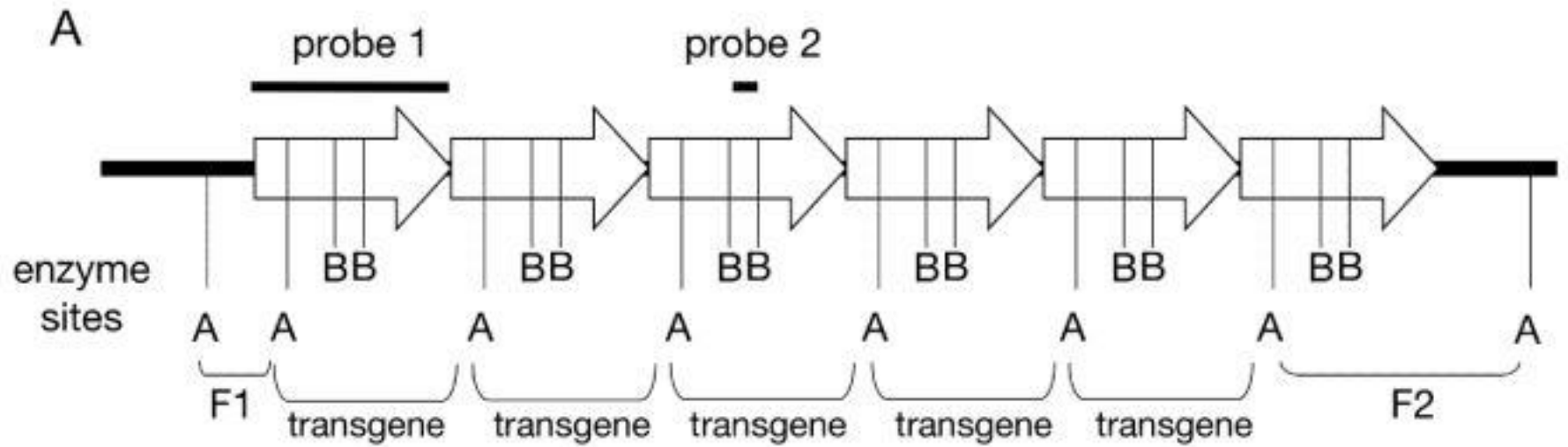
A Representative transgene construct and primer designs for genotyping

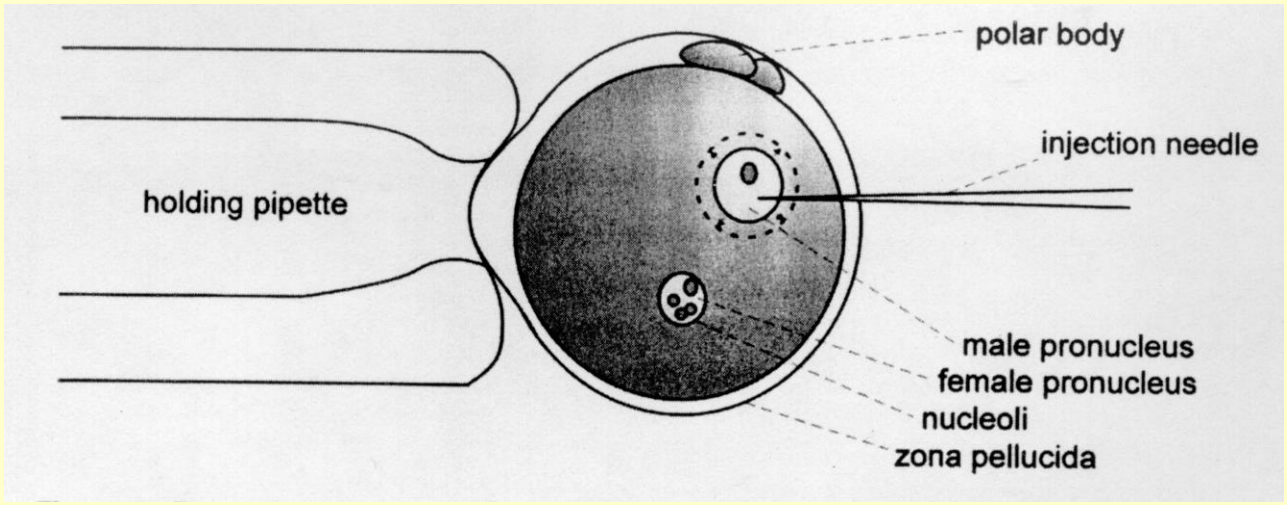


B location of primer set 2 in genomic DNA



Transzgén kópiaszám meghatározás Southern analízissel











MIKROINJEKTÁLÁS



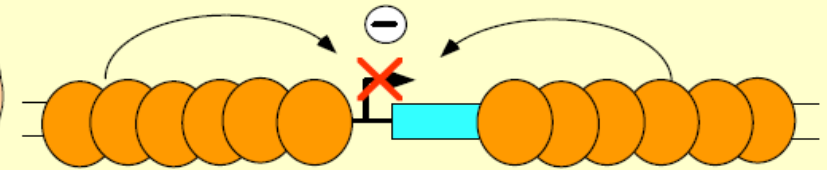
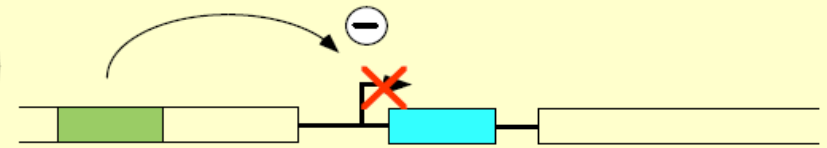
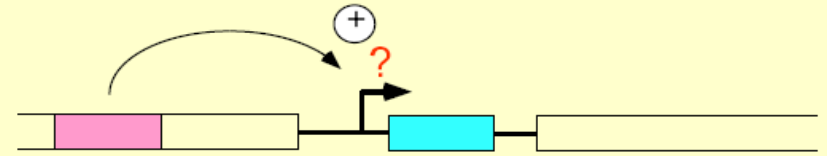
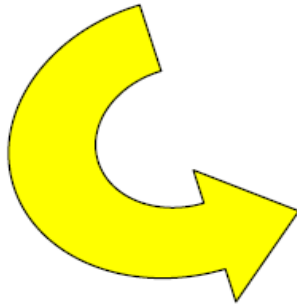
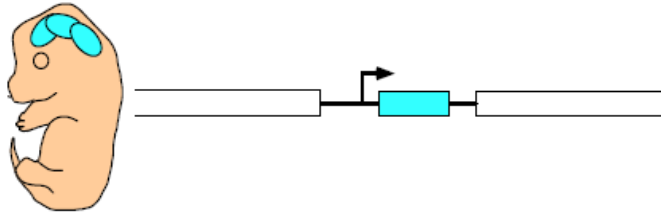
EMBRIOTRANSZFER



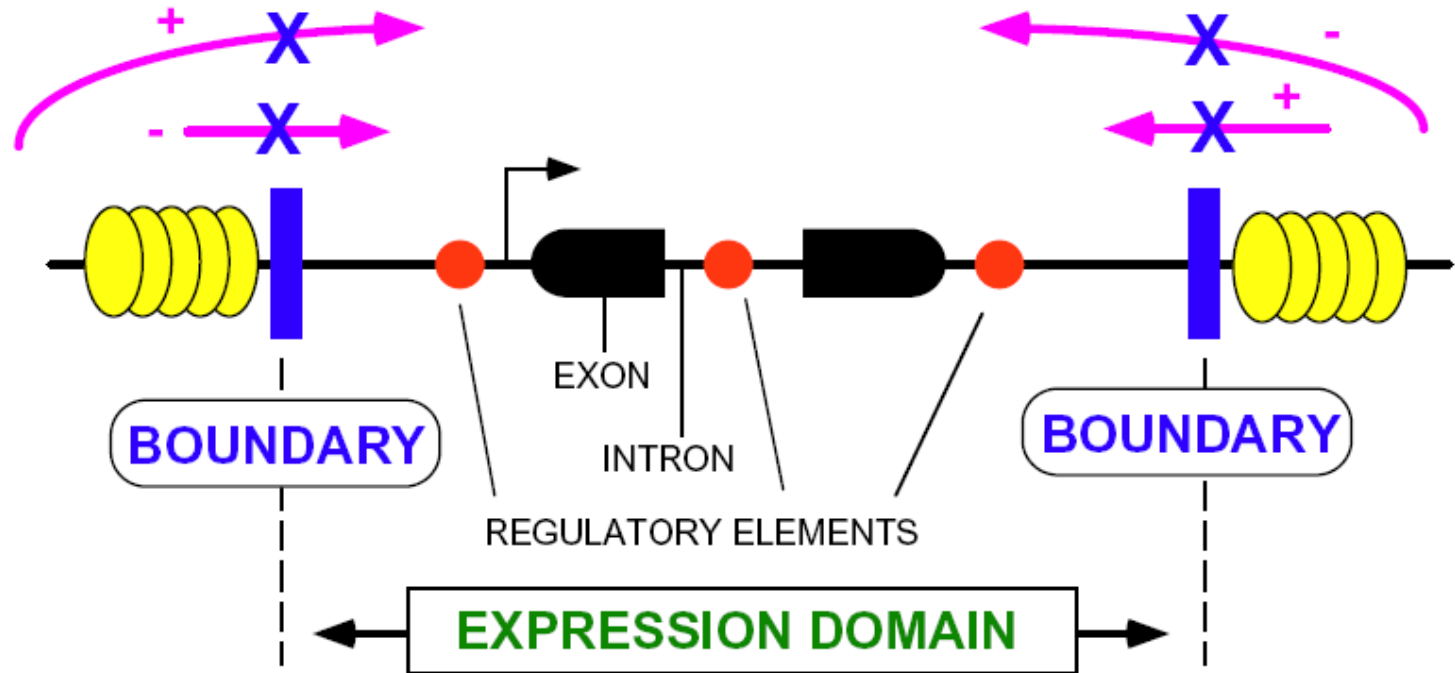
Problémák a hagyományos mikroinjektálással: a véletlenszerűen beintegrálódó transzgén kromoszómális környezete által okozott változások a transzgén kifejeződésében - pozíció effektust eredményeznek

POSITION EFFECTS

NORMAL TRANSGENE EXPRESSION

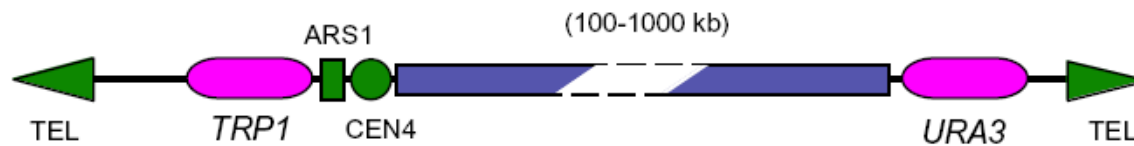


Véletlenszerűen integrálódott transzgénre ható távoli szabályozó elemek

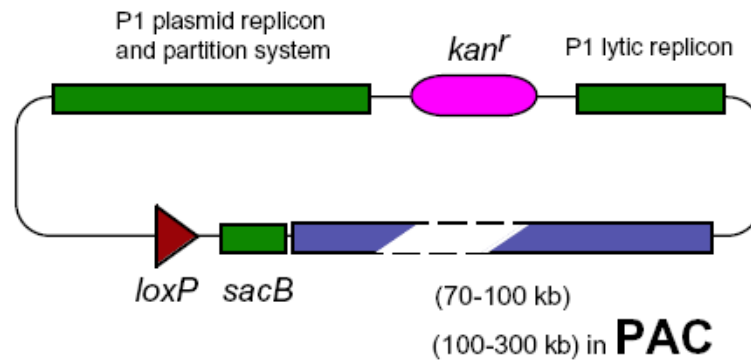


Megoldás: a pozíció hatás kivédése nagy méretű kromoszóma darabok bejuttatásával

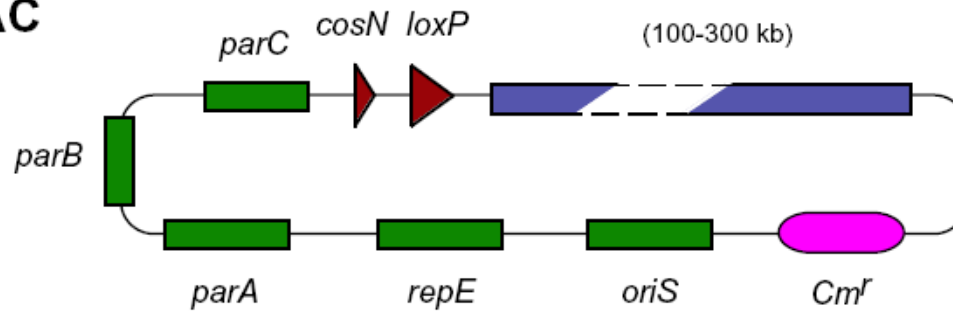
YAC



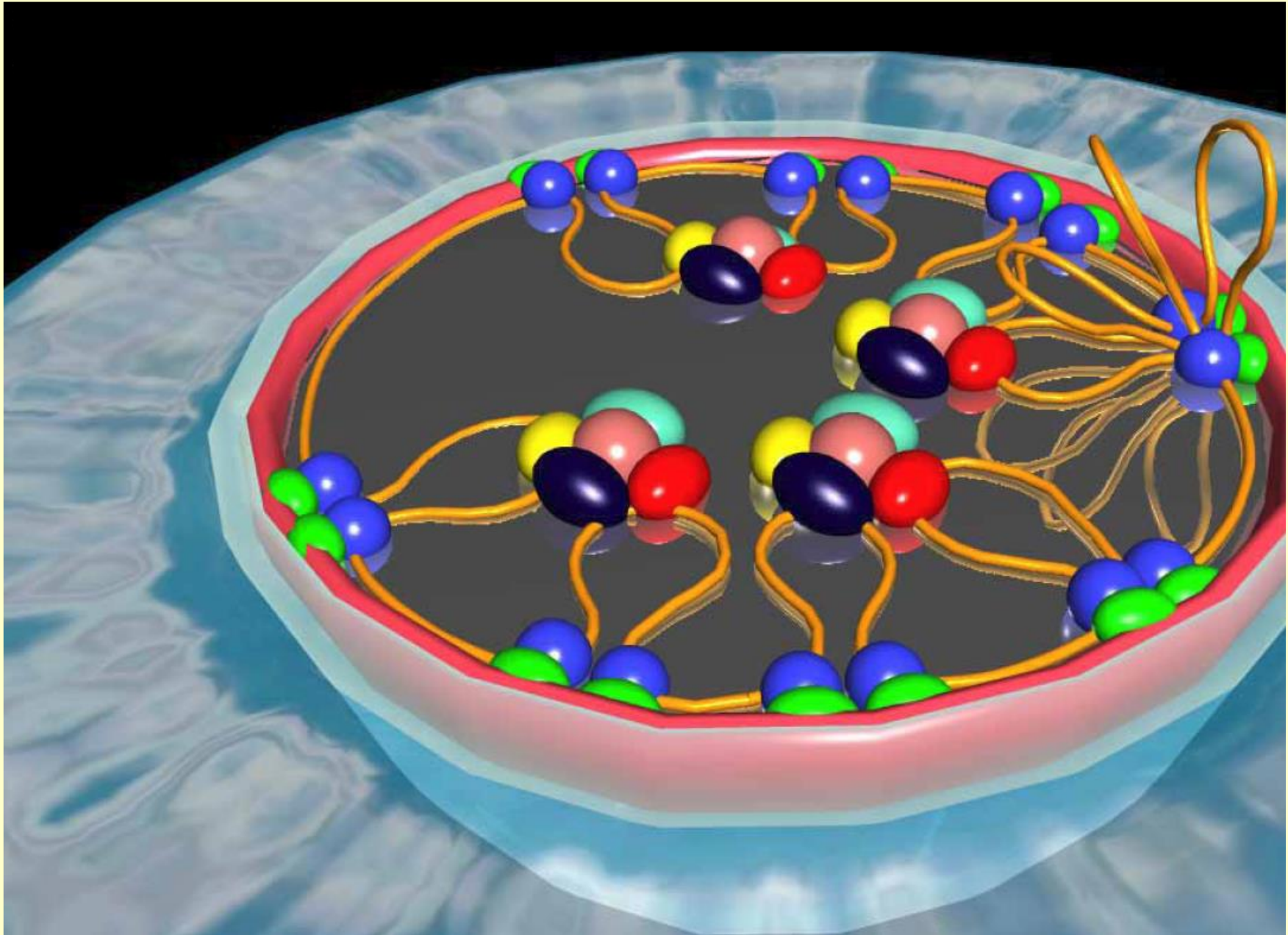
P1 clone

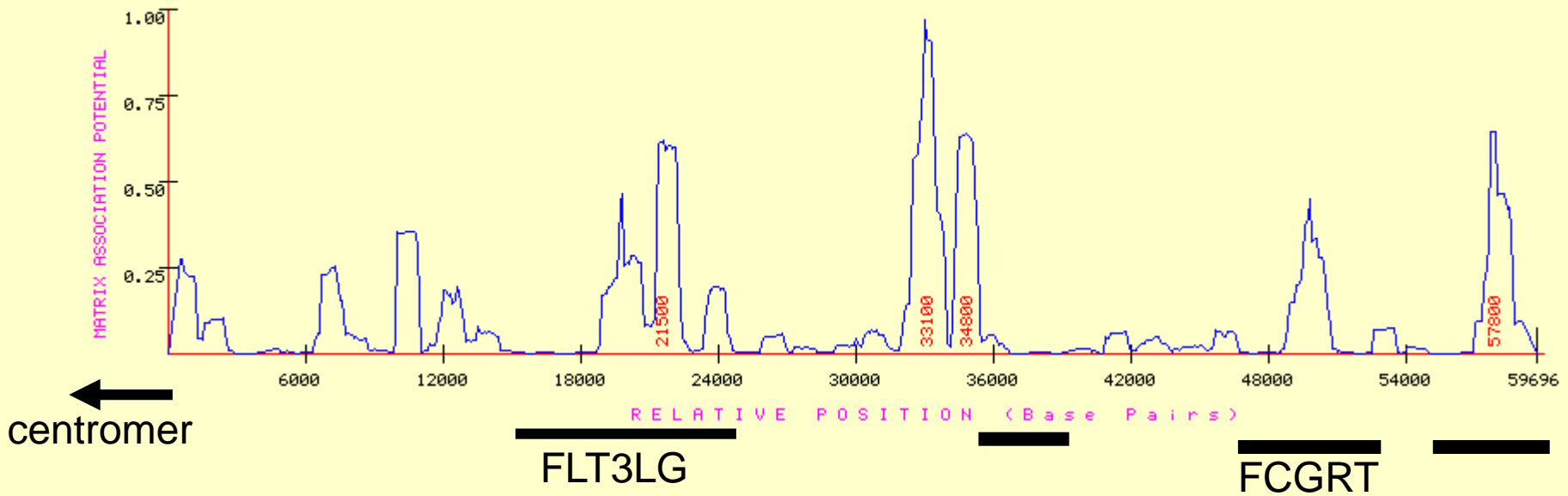


BAC

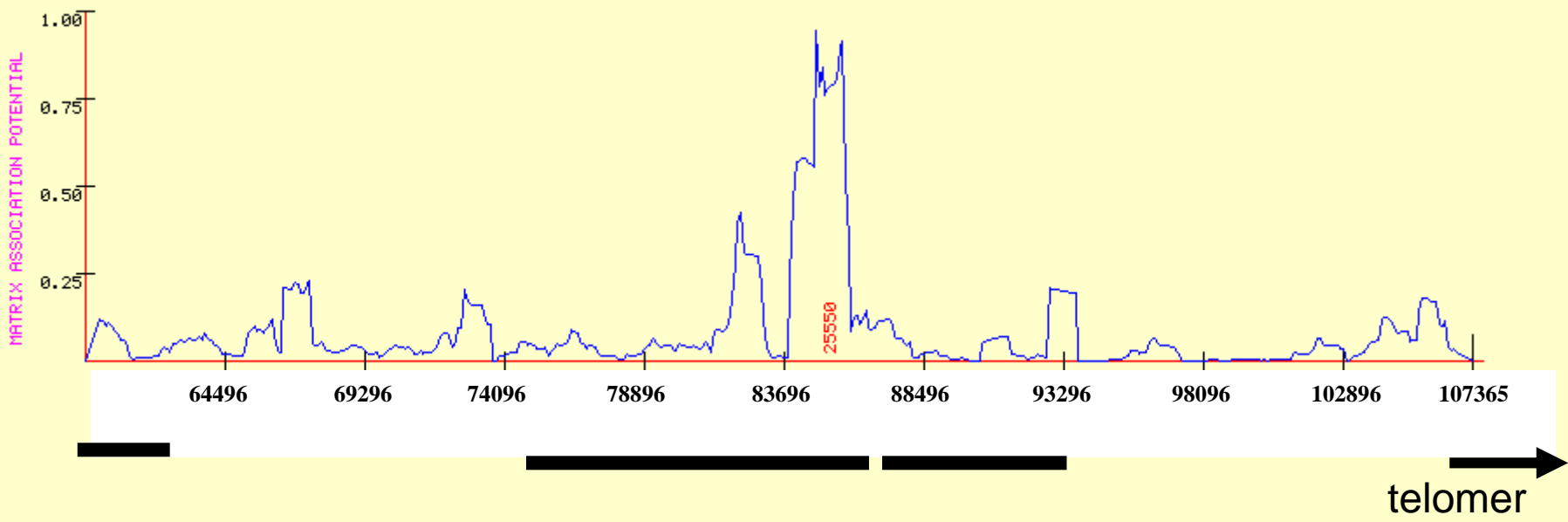


A sejtmagban a gének expressziós doménekbe szerveződnek





FcRn génje

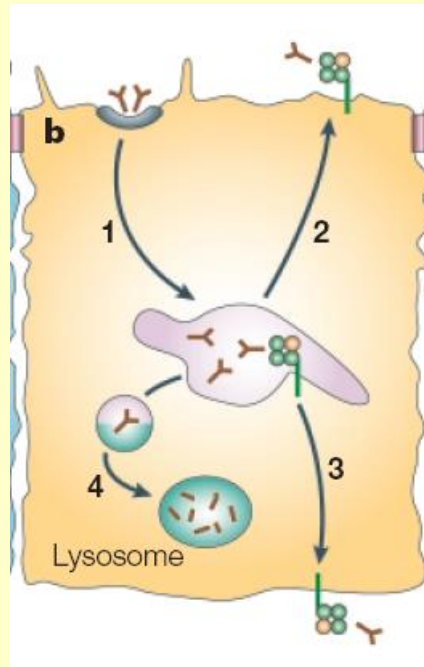


MAR helyek keresése az IgG kötő FcRn régióban <http://www.futuresoft.org/MAR-Wiz/>

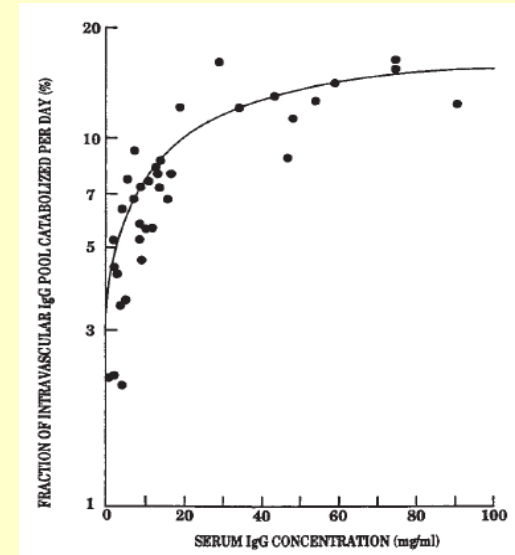
BAC TRANSZGENIKUS EGÉRMODELL LÉTREHOZÁSA

Az IgG kötő FcRn szerepe a transzcitosisban és az IgG katabolizmusában vizsgálatára

Bender és mtsai. Transgen Res. 16:613-27. 2007.



Rojas and Apodaca 2002. Nat Rev Mol Cell Biol



Ghetie and Ward. 2002. Immunol Res.

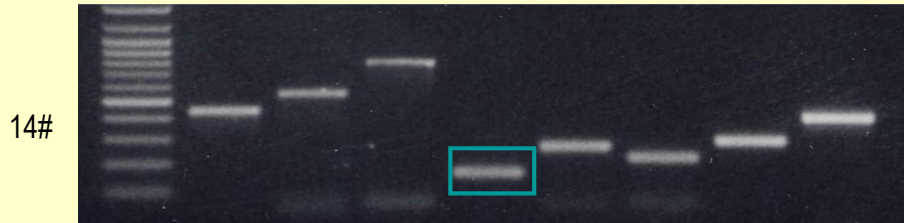
BAC transzgenezis előnyei

Integrációs helytől független, **kópiaszámfüggő** génkifejeződés.

Az **endogén génnel megegyező** szövet- és fejlődésspecifikus kifejeződés függetlenül attól, hogy milyen más emlősből származik a transzgén.

Alkalmas a géntől nagy távolságban elhelyezkedő szabályozó elemek vizsgálatára.

MM 1 2 3 4 5 6 7 8



1. BAC 128E04 5' vég

2. FLT3LG

3. LOC53916

4. FCGRT α -lánc kódoló gén

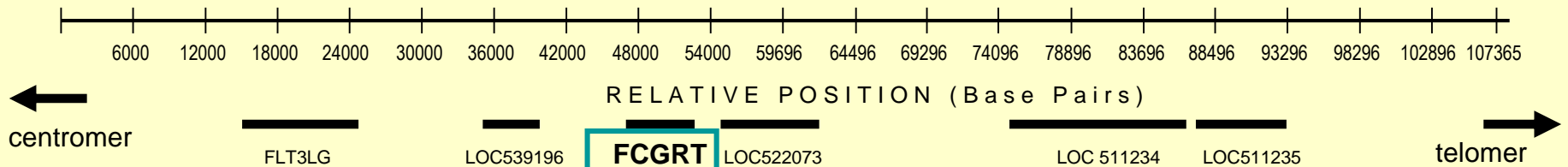
5. LOC522073

6. LOC511234

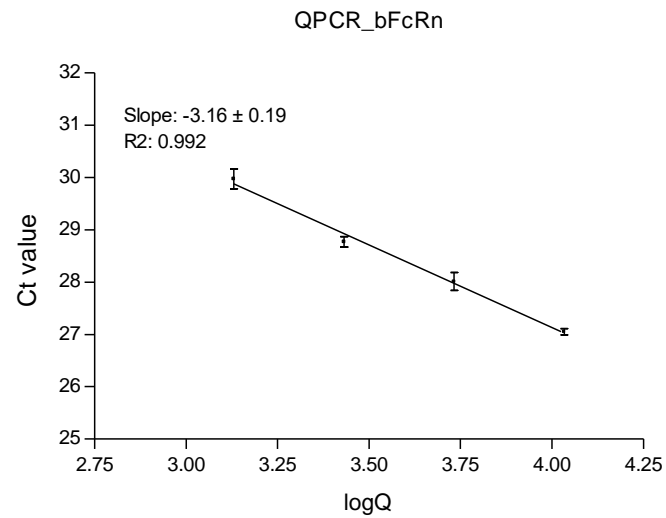
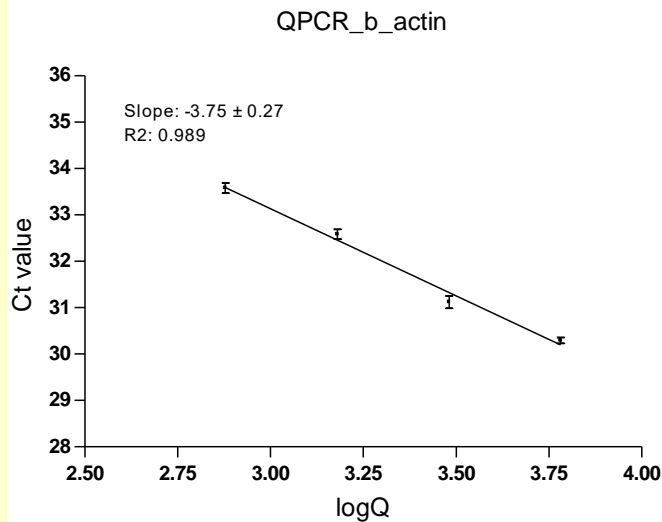
7. LOC511253

8. BAC 128E04 3' vég

← BAC128E04: 107 kb →



Kópiaszám meghatározása Real-Time PCR-rel



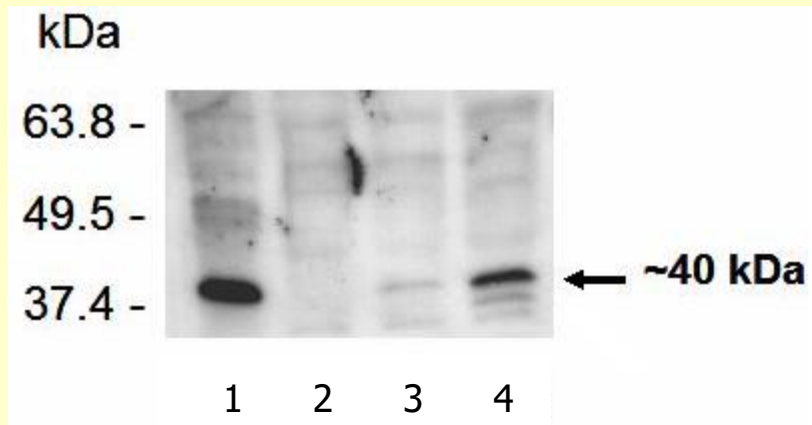
#line	gene	Ct	Absolute quantity of gene in sample (AGN)	Absolute quantity of cell number in sample (ACN)	bFcRn copy number (ACNb-FcRn/ACN)	Estimated copy number of bFcRn transgene in a diploid hemizygous animal
14	Mouse β -actin	31,01	3760,49	1880,248		
	bFcRn	28,86	3852,48		2,04	2
19	Mouse β -actin	30,89	4075,44	2037,722		
	bFcRn	27,05	10468,18		5,13	5

**14# vonal heterozigóta:
2 kópia homozigóta: 4 kópia**

**19# vonal heterozigóta:
5 kópia homozigóta: 10 kópia**

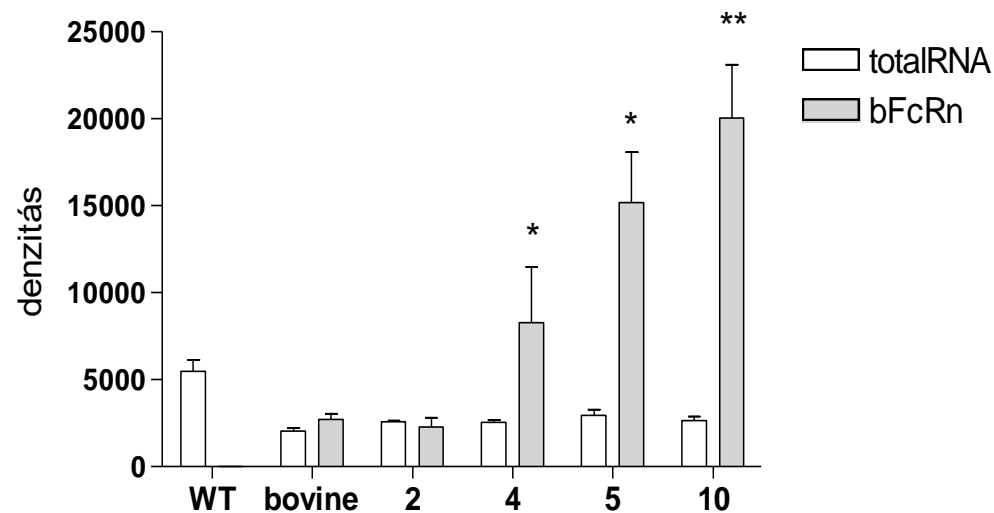
Kópiaszám függő expresszió kimutatása

Western blot (tüdő szövetből)

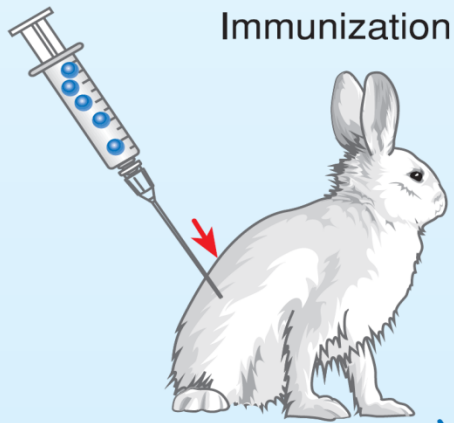


1. +K (B4 sejtvonala)
2. FVB/N egér 0 kópia
3. 14# 2 kópia
4. 19# 5 kópia

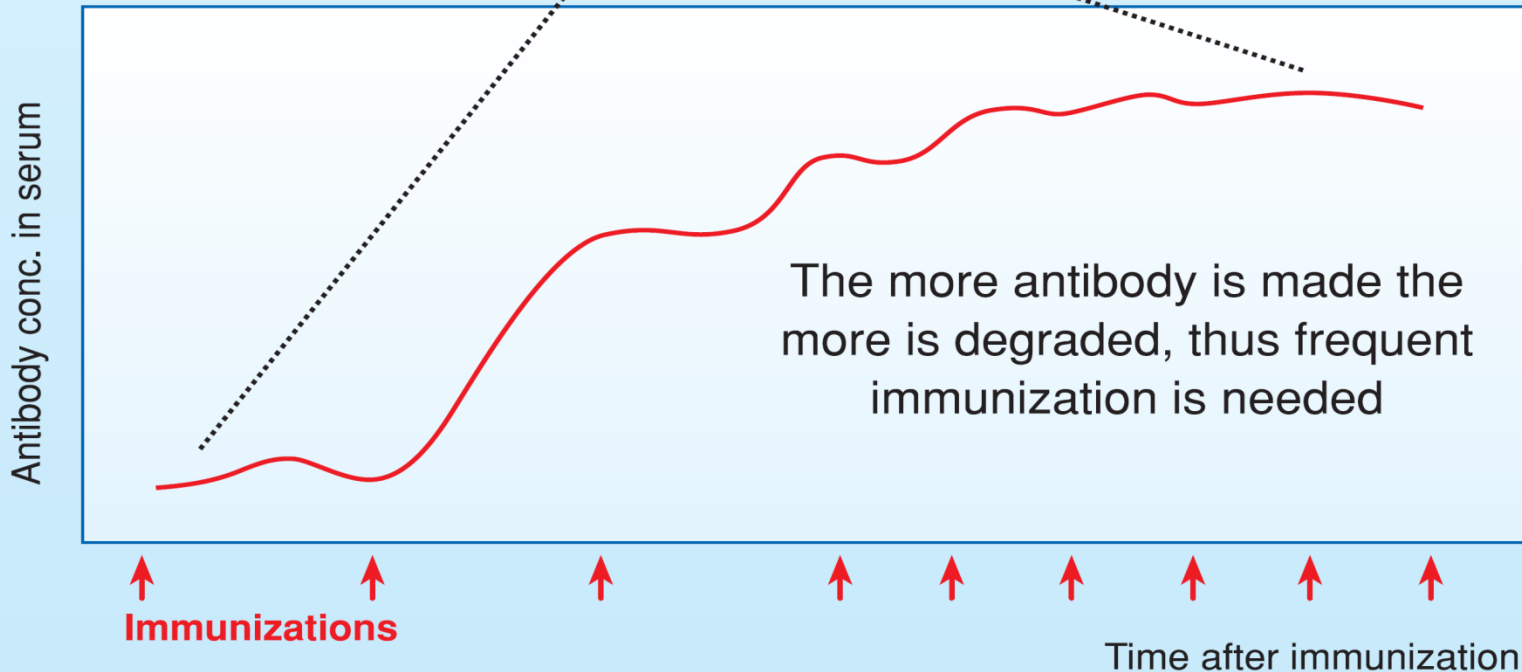
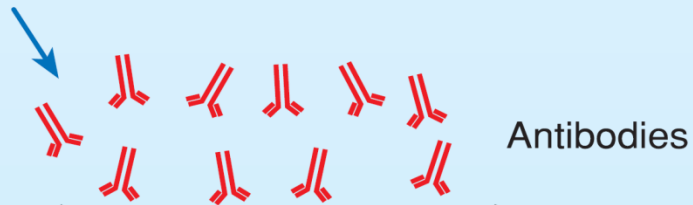
Northern blot (máj szövetből)



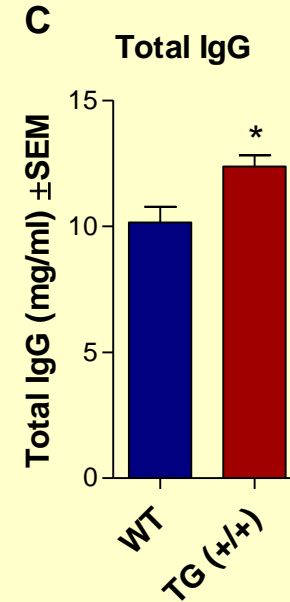
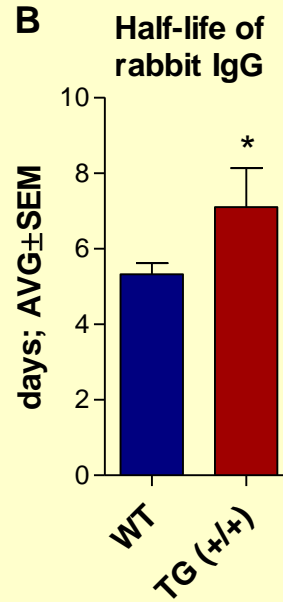
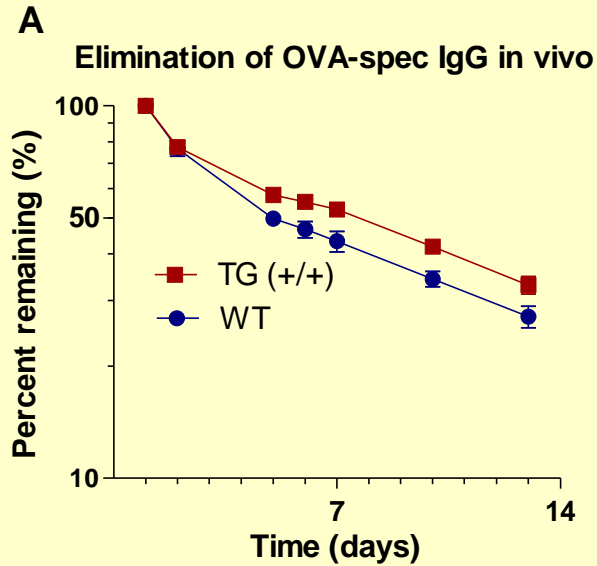
1. FVB/N egér 0 kópia
2. Szarvasmarha 2 kópia
3. 14# 2 kópia heterozigóta
4. 14# 4 kópia homozigóta
5. 19# 5 kópia heterozigóta
6. 19# 10 kópia homozigóta



A laboratóriumi nyulat poliklonális ellenanyag termelésre használják világszerte



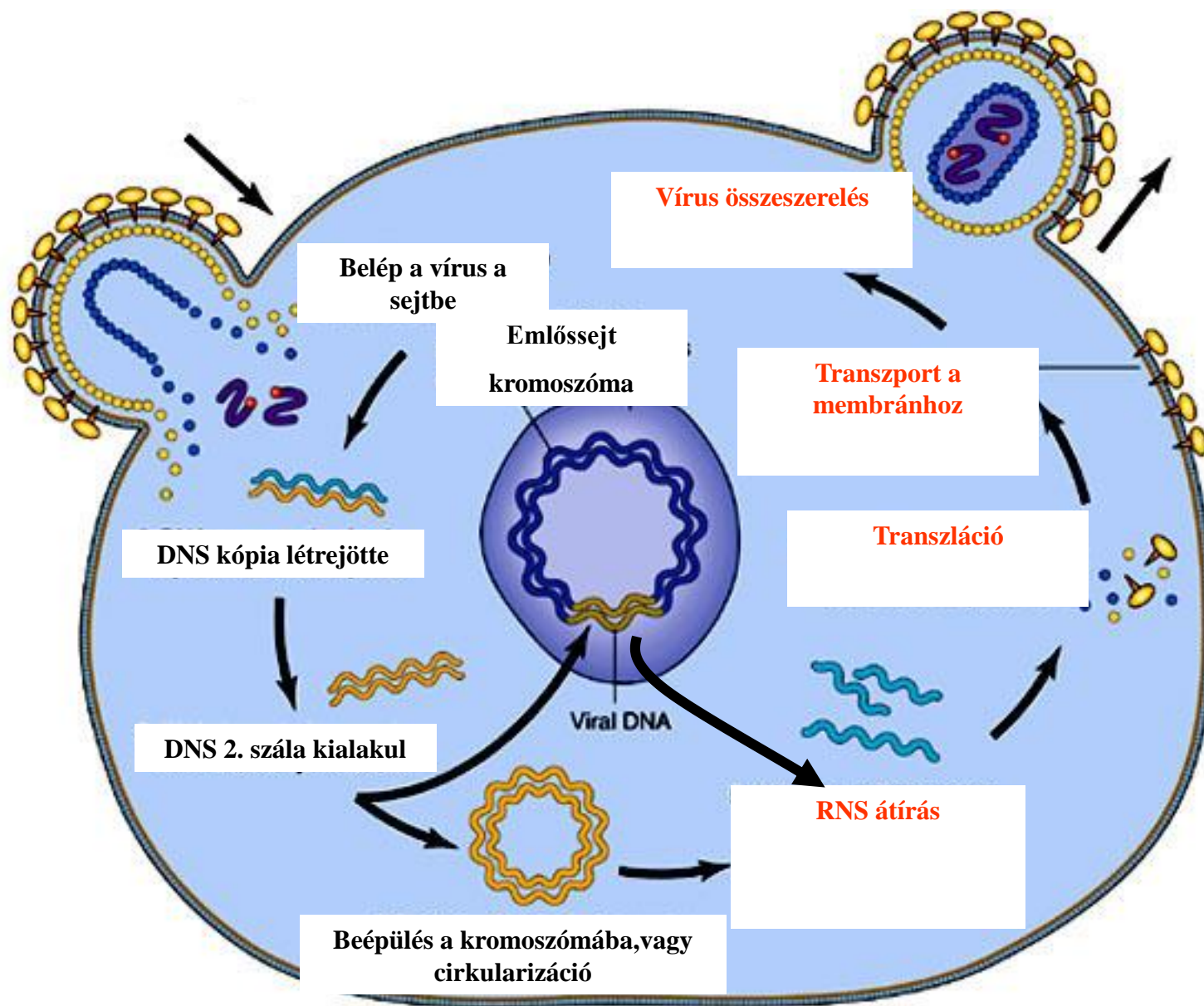
IgG védelem az FcRn transzgenikus nyúlban



LENTIVÍRUS VEKTOR MINT ALTERNATÍVA A HAGYOMÁNYOS ELŐMAG INJEKTÁLÁSNAK

- A retrovírusok családjába tartozó lentivírusok viszonylag nagy mennyiségű genetikai információt /7-8kb/ képesek bejuttatni az emlős sejtek genomjába.**
- Lentivírusok például a HIV, SIV, Caprine arthritis encephalitis virus, Equine infectious anemia virus**
- A retrovírusok között egyedülálló tulajdonságuk hogy nem osztódó sejtekben is képesek replikálódni.**
- Az utóbbi évek kutatási eredményei alapján az egyik leghatékonyabb génszállító vektorokká fejlődtek**

A lentivírus életciklusa, és ennek felhasználása a transzgenezisben



ALTERNATÍV MÓDSZER A MIKRONJEKTÁLÁSHOZ: LENTIVIRUS VEKTOROKKAL TÖRTÉNŐ TRANSZGÉN BEVITEL

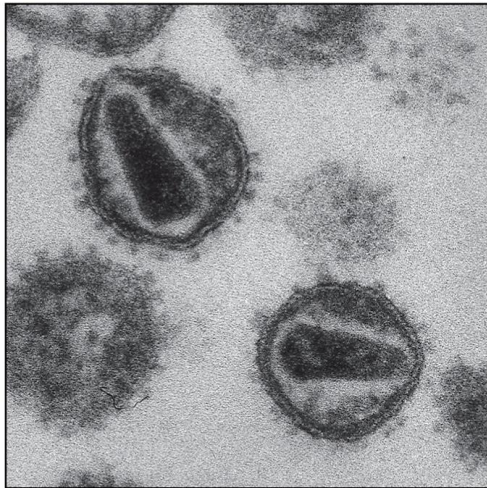
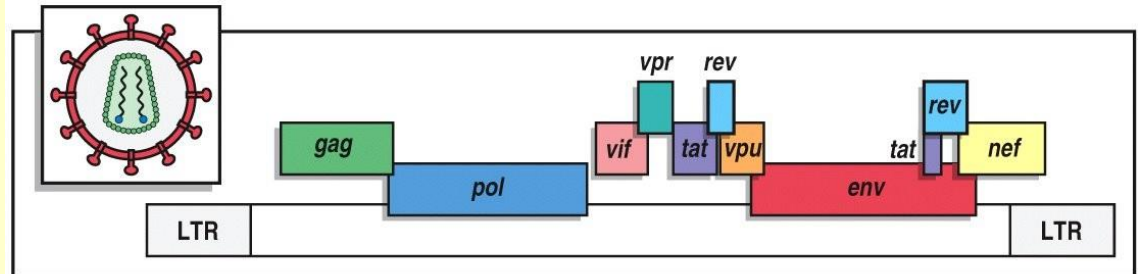
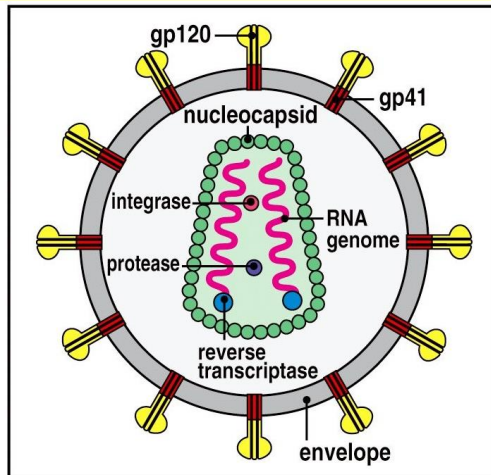
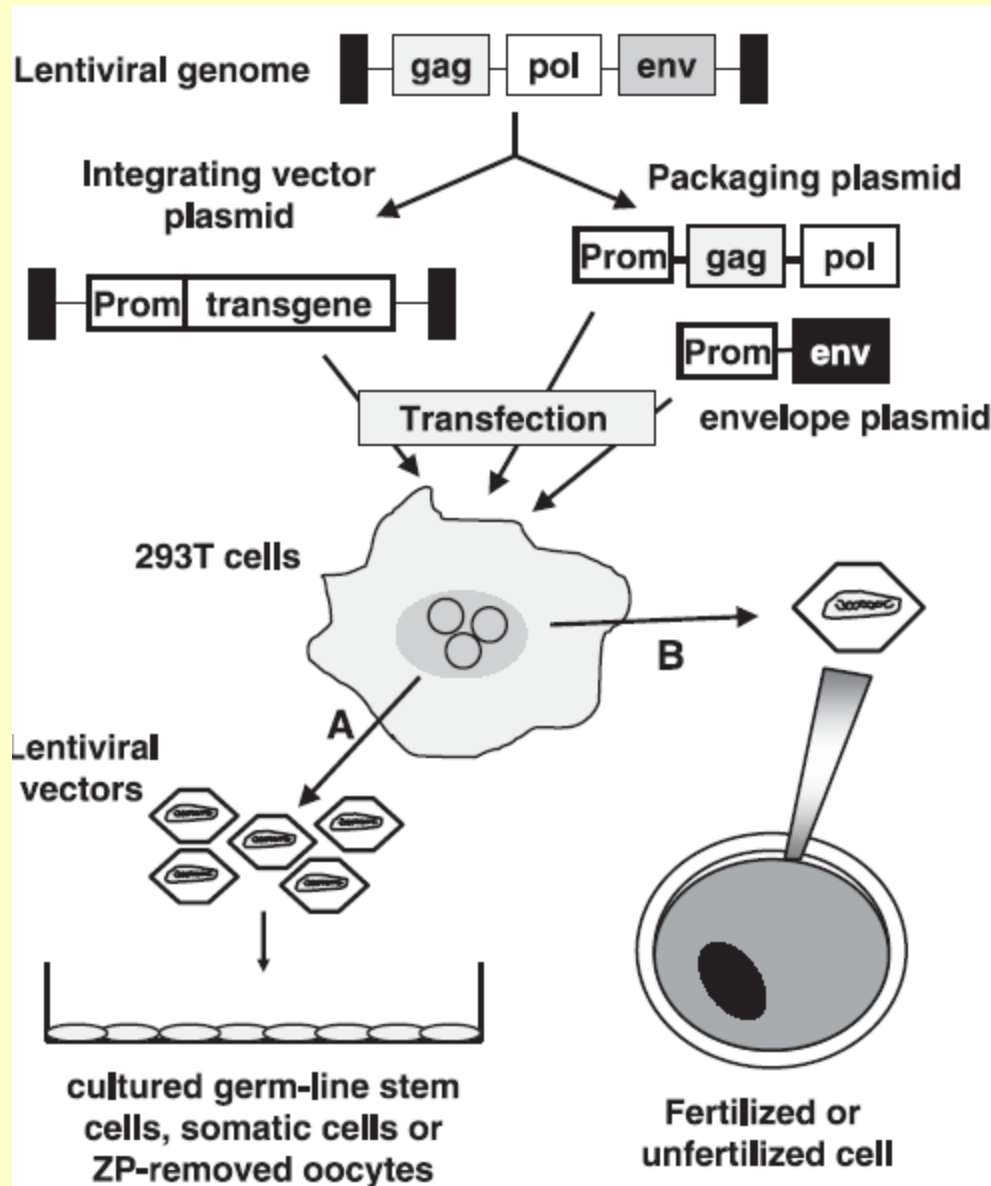


Figure 11-21 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)



Gene	Gene product/function	Gene product/function
<i>gag</i>	Group-specific antigen	Core proteins and matrix proteins
<i>pol</i>	Polymerase	Reverse transcriptase, protease, and integrase enzymes
<i>env</i>	Envelope	Transmembrane glycoproteins. gp120 binds CD4 and CCR5; gp41 is required for virus fusion and internalization
<i>tat</i>	Transactivator	Positive regulator of transcription
<i>rev</i>	Regulator of viral expression	Allows export of unspliced and partly spliced transcripts from nucleus
<i>vif</i>	Viral infectivity	Affects particle infectivity
<i>vpr</i>	Viral protein R	Transport of DNA to nucleus. Augments virion production. Cell cycle arrest
<i>vpu</i>	Viral protein U	Promotes intracellular degradation of CD4 and enhances release of virus from cell membrane
<i>nef</i>	Negative-regulation factor	Augments viral replication <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> . Decreases CD4, MHC class I and II expression

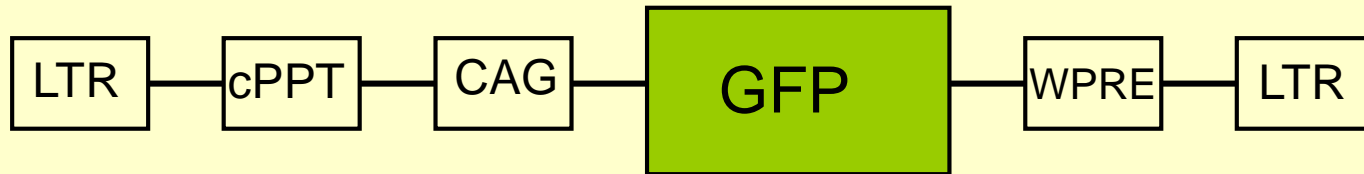
Figure 11-24 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)



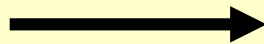
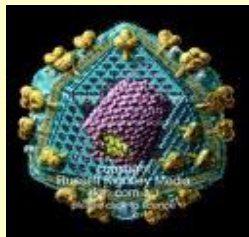
HARMADIK GENERÁCIÓS LENTIVÍRUS VEKTOROK ELŐÁLLÍTÁSA

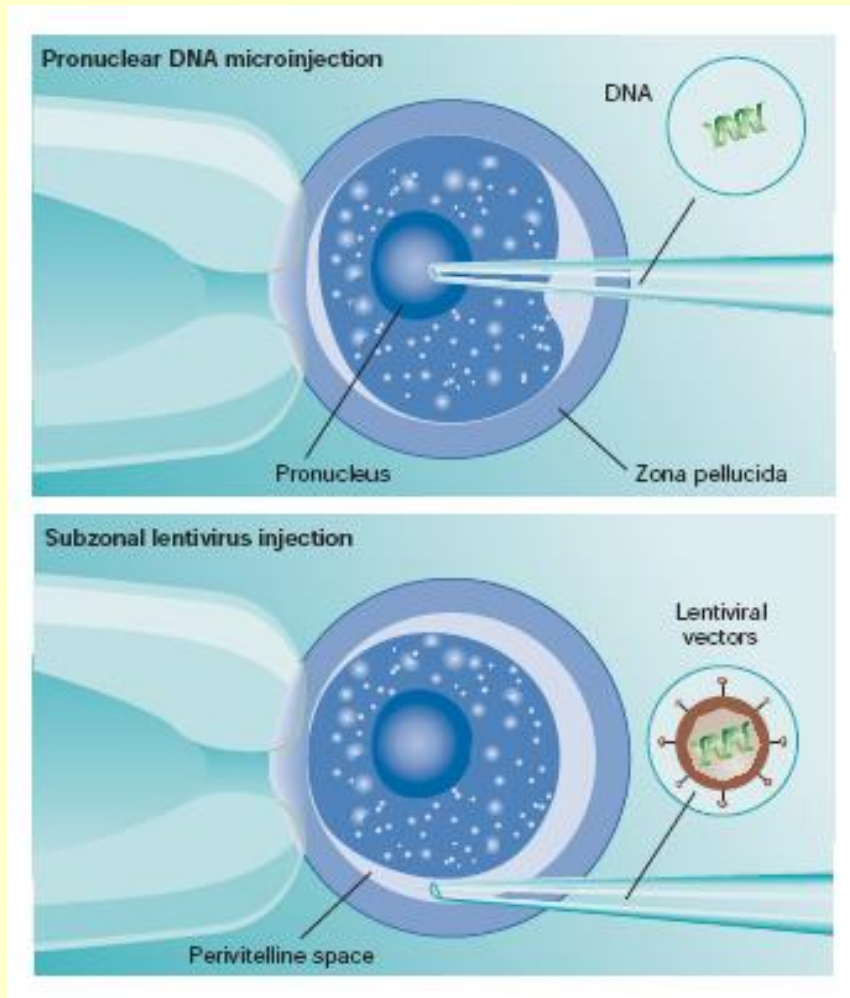
A LENTIVÍRUS VEKTOR TERMELÉSE

1. Köpenyfehérjét kódoló plazmid (vesicular stomatitis virus:VSVG)
2. Virális enzimeket kódoló plazmid (integráz, reverz transzkriptáz, polimeráz)
3. Integrálódó transzfer plazmid (itt GFP-vel), integrációt segítő ön-inaktiváló LTRs (SIN-LTR), central polypurine tract (cPPT) , erős promóter (CAG)

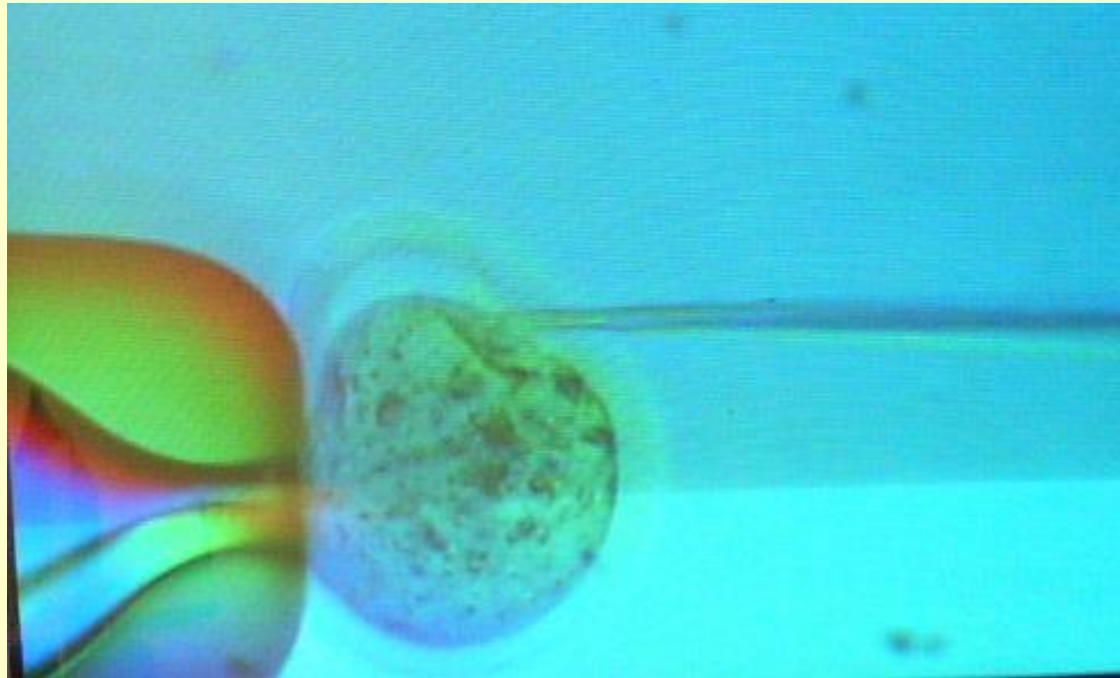
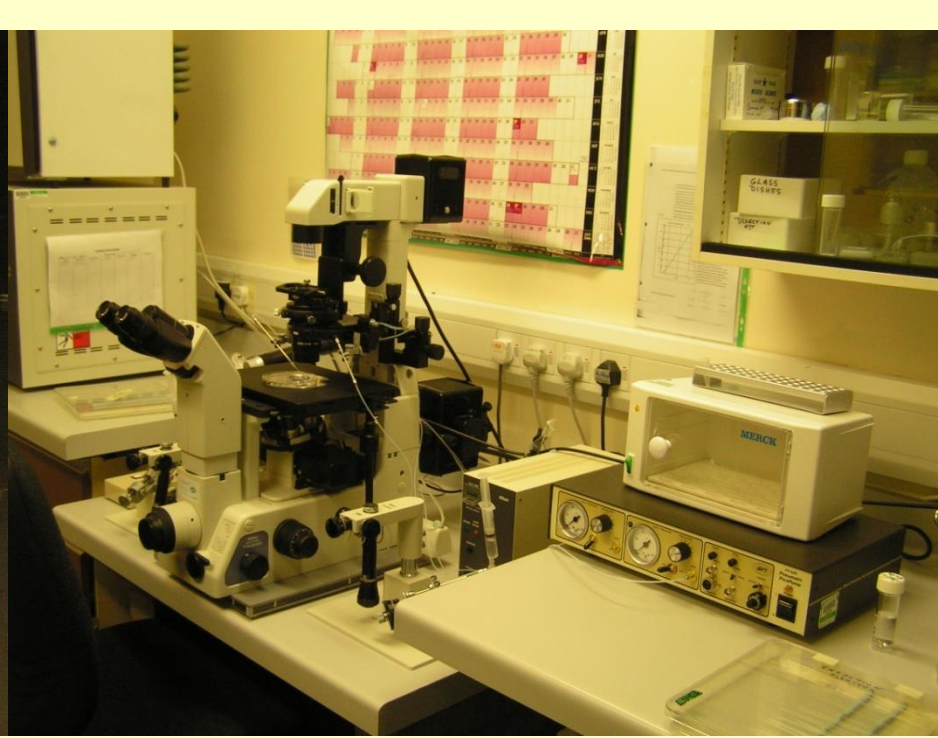
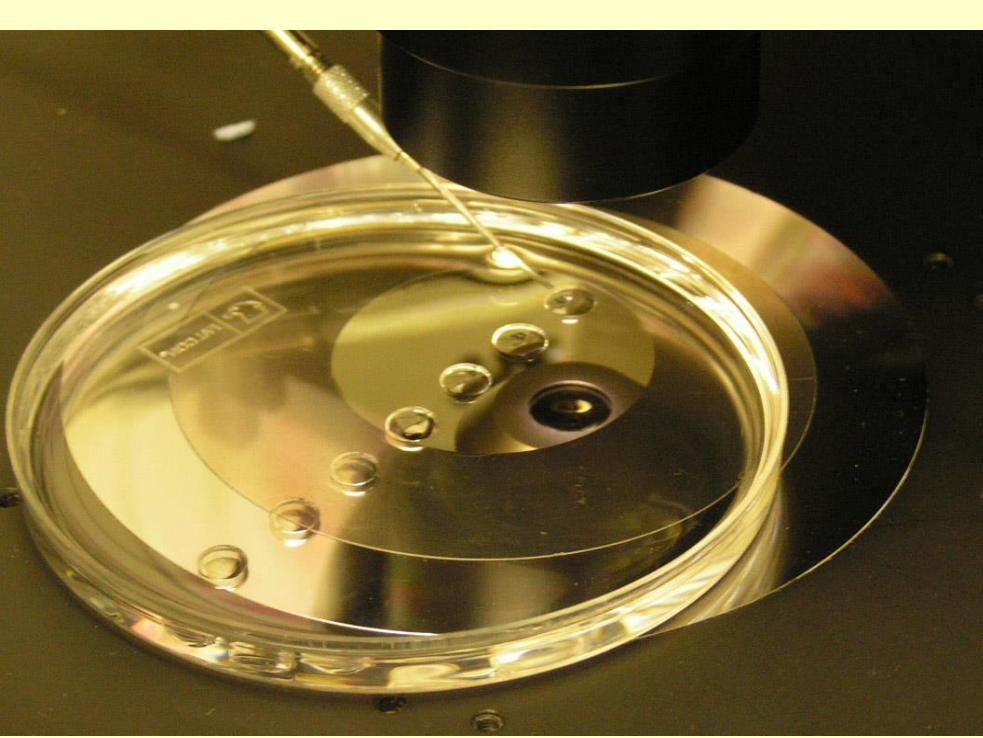


293T sejtvonala (majomvese) → Titer meghatározás → Töményítés (UC)





**A PRONUKLEUSZ MIKROINJEKTÁLÁS ÉS SZUBZONÁLIS LENTIVÍRUS TRANSZDUKCIÓ
MÓDSZER ÖSSZEHASONLÍTÁSA
(Fassler R. EMBO Reports 5. 28. 2004.)**





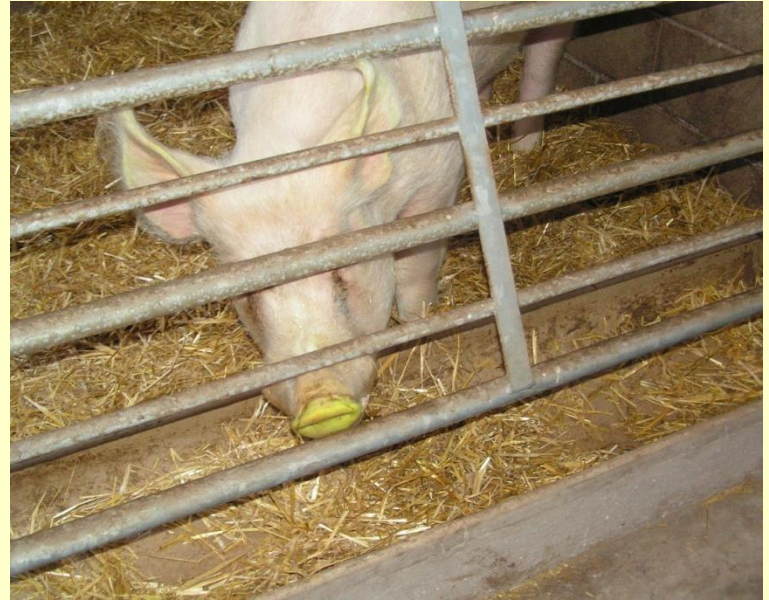
Zöld jelzőgént kifejező Balb/c egér előállítása lentivírus transzgenezissel

Bősze Zs. és munkatársai-Kvell K. (Pécsi Egyetem)

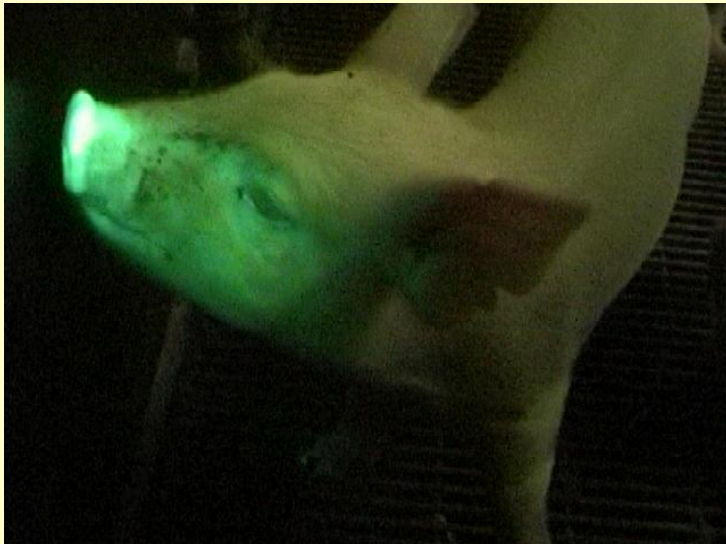
Transgen Res. 19:105-12. 2010.

Lentivírus transzgenezis más gazdasági állatokon

**Jelentőség: géncsendesítés
lentivírussal történő shRNS
bevitellel- lehetőség háziállatok mint
betegségmodellek hatékony
létrehozására**



**Háziállatfajok ahol már
sikeresen alkalmazták:
sertés, szarvasmarha, csirke**

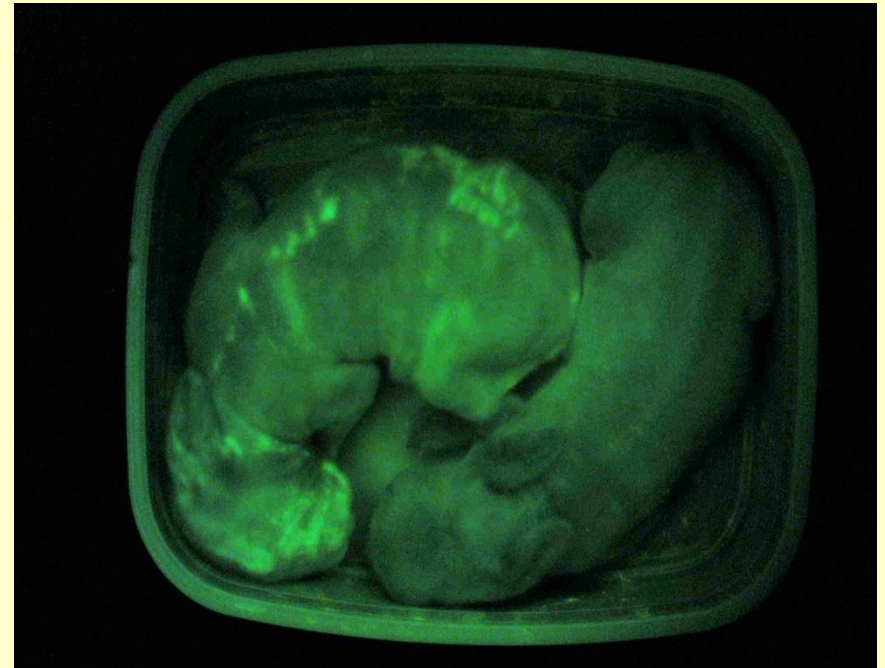


**Hoffmann et al. (2003); McGrow et al. 2004;
Whitelaw et al. 2004, Hiripi et al. 2010.**

LENTIVÍRUS TRANSZGENEZIS ÖSSZEHASONLÍTÁSA A MIKROINJEKTÁLÁSSAL

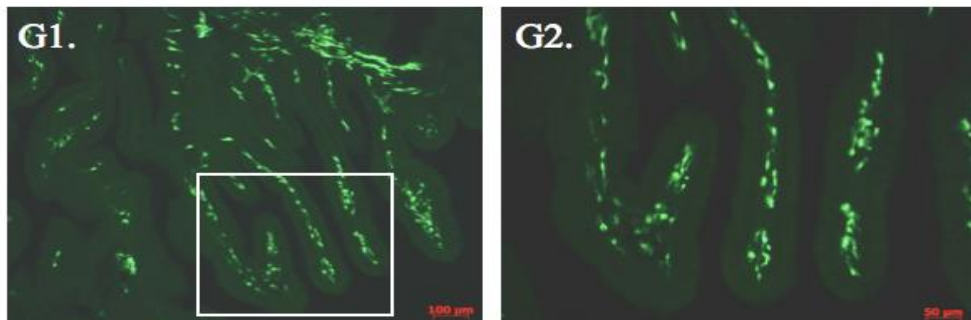
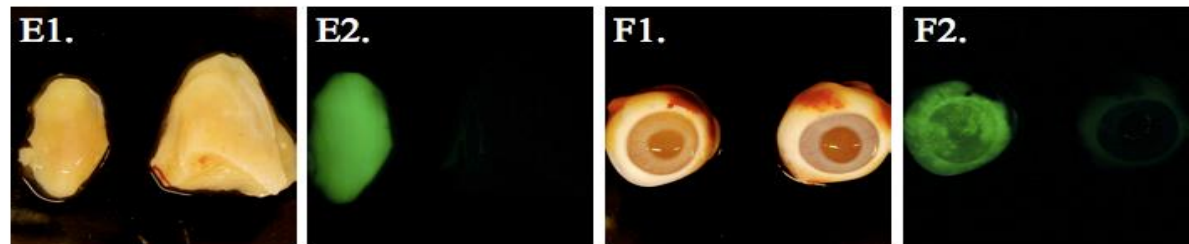
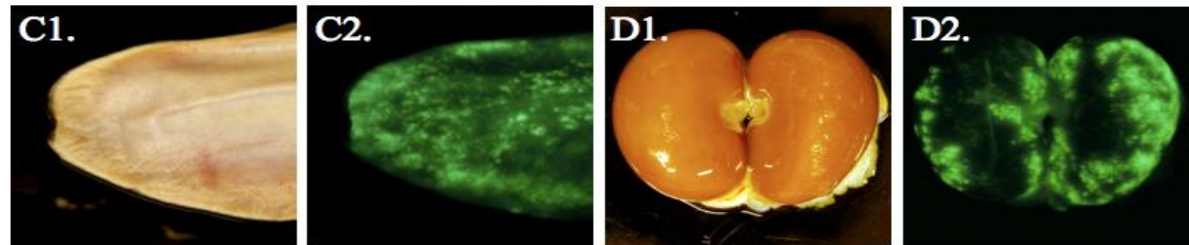
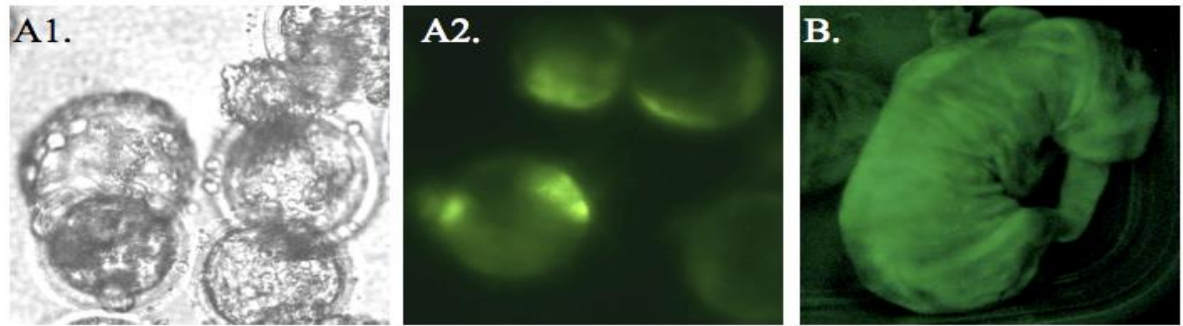
ÖSSZEHASONLÍTOTT TULAJDONSÁGOK	MIKROINJEKTÁLÁS	LENTIVÍRUS TRANSZDUKCIÓ
<i>TRANSZGÉN MÉRETHATÁR</i>	<i>≤ 50 KB (PLAZMID)</i>	<i>≤ 8 KB</i>
<i>EMBRIÓ TÚLÉLÉS</i>	<i>ALACSONY</i>	<i>MAGAS ≥ 70%</i>
<i>TRANSZGENIKUS UTÓDOK ARÁNYA</i>	<i>1-2-5 -10 % /FAJTÓL FÜGGŐEN/</i>	<i>20-100%</i>
<i>INTEGRÁLÓDOTT TRANSZGÉN KÓPIASZÁM</i>	<i>ÁTLAGOSAN 1-5 (50) KONKATAMER EGY HELYRE</i>	<i>EGY HELYRE MINDIG CSAK 1 DE TÖBB HELYRE IS BEÉPÜLHET</i>

Zöld jelzőgént kifejező transzgenikus nyúl lentivírus transzgenezissel



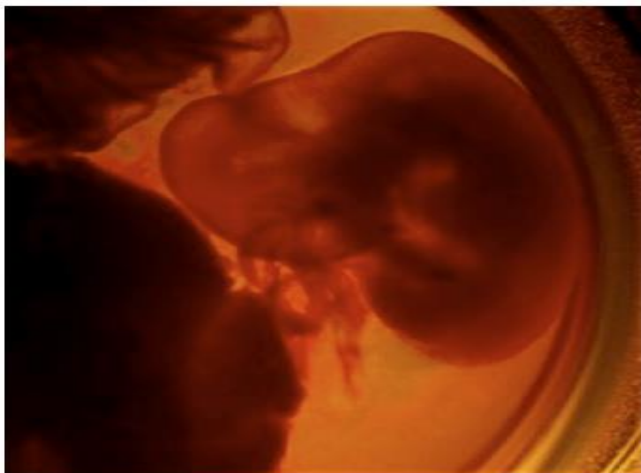
Hiripi és mtsai. Transgenic Res. 2010

**EGFP
EXPRESSZÁLLÓ
LENTVÍRUS
TRANSZGENIKUS
EMBRIÓK ÉS NYÚL**



LENTIVÍRUS TRANSZGENIKUS UTÓD
14 napos p.c. embrió
A,B: nem transzgenikus C,D: transzgenikus embrió

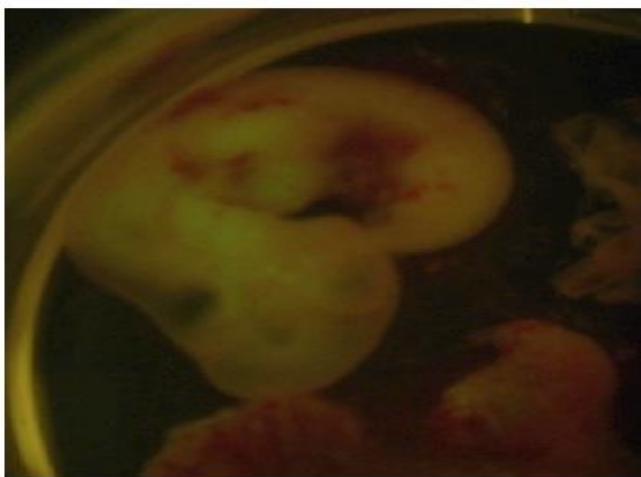
A



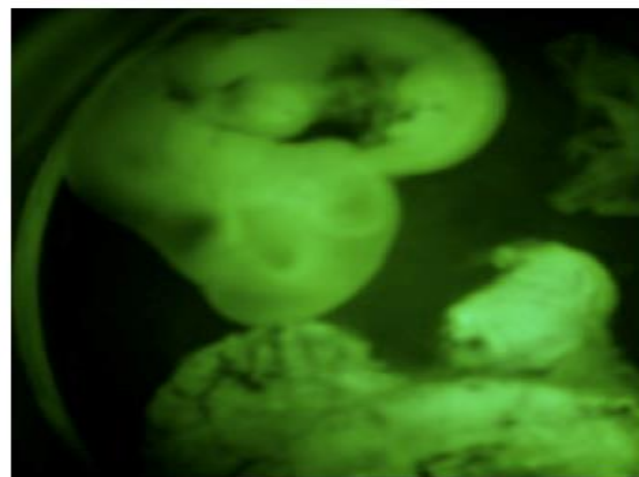
B



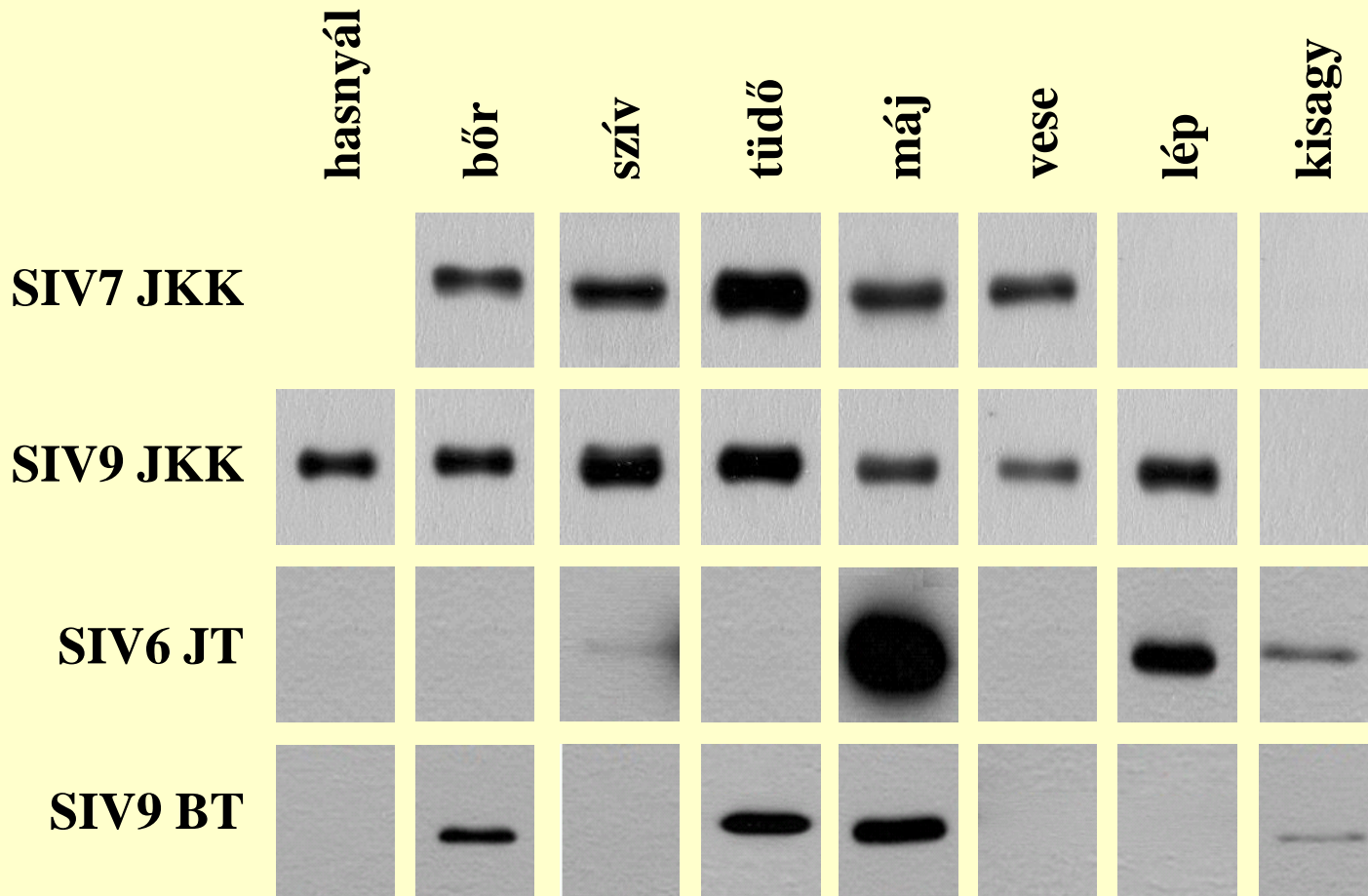
C



D



A fehérje kimutatása a különböző szövetekben Western hibridizációval –mindhárom csírvonal eredetű szövetbe képes beépülni, de véletlenszerűen



Mezoderm=máj, vese, endoderm=tüdő, hasnyálmirigy, ectoderm=bőr

Transzgénikus technikák és hatékonyságuk nyúlban

	BAC transzgenezis	Lentivírusos transzgenezis
Hatékonyság	1-6 %	20-60 %
Kapacitás	>2 Mb	<10 kb
Integráció	random	random
Integráció formája	konkatamer	egyedi
Expresszió	≈ 50 %	60-90 %
Örökítés	+++++	+

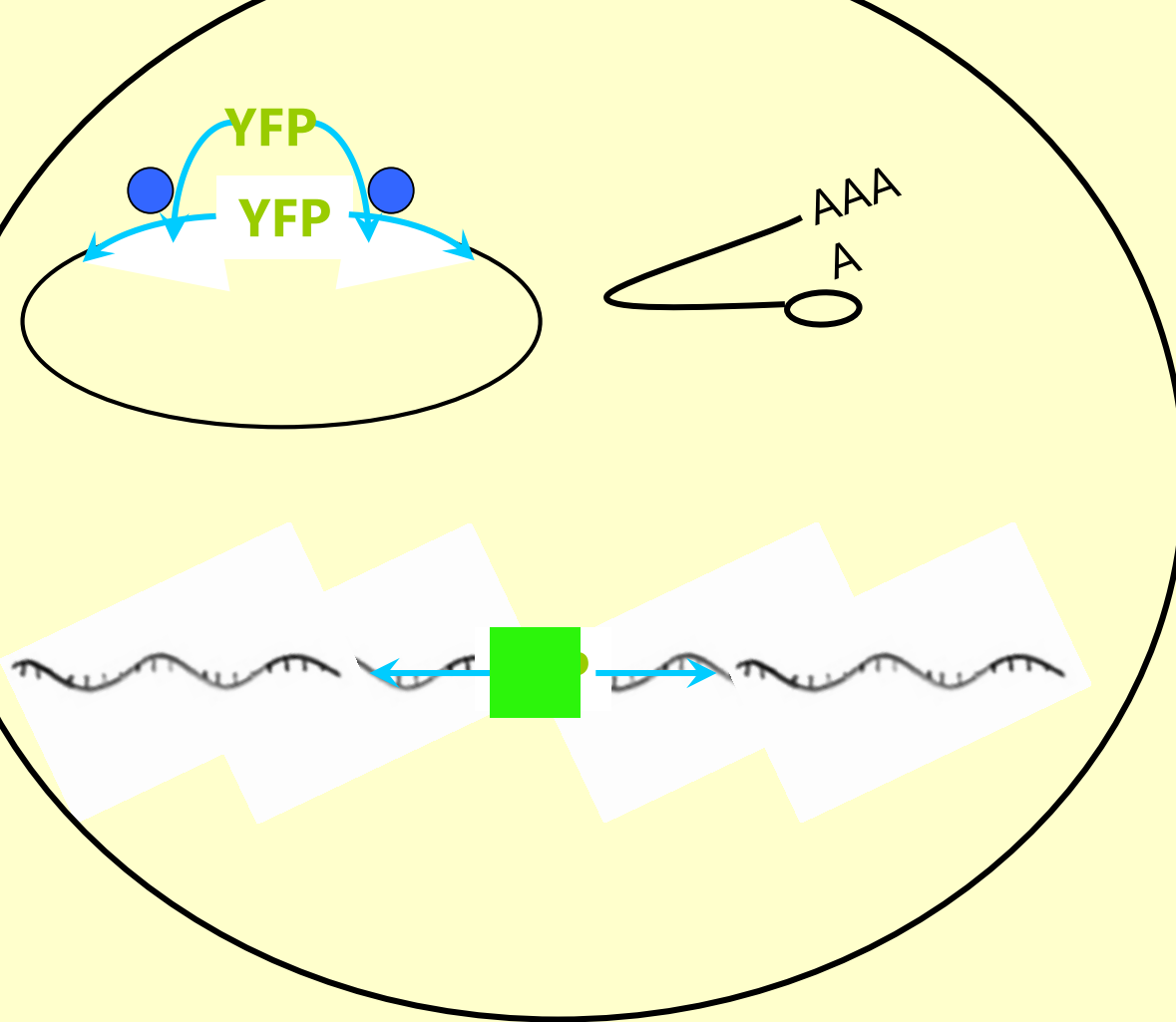
TRANSZPOZONOK MINT ALTERNATÍV LEHETŐSÉG A PLAZMID ALAPÚ MIKROINJEKTÁLÁSOS TRANSZGENEZISRE

- **Mozgó genetikai elemek; képesek áthelyeződni (transzponálódni) a genomban, megváltoztatni helyüket egy kromoszómán belül, vagy átugorni egy másik kromoszómára. Ha egy mozgó genetikai elem egy génbe épül be, akkor annak mutációját okozhatja (a spontán mutációk jelentős részét transzpozonok okozzák)**
- **Genom ~5%-a fehérjét kódoló, a többi ~95% fehérjét nem kódoló régió – korábban ezt hulladék DNS-nek nevezték, mivel azt gondolták, hogy nincs funkciója – mára már tudjuk, hogy ezek a régiók tartalmazznak -többek között:**
 - **transzpozonokat**
 - **szabályozó régiókat**


Transzpozonok általános jellemzői

- 2 csoportra osztják a transzpozonokat:
 - autonóm: kódolja a transzpozáz enzimet is
 - nem-autonóm: hiányzik a transzpozáz gén
- Nem-autonóm transzpozonokkal hozható létre stabil transzgenezis
- A transzpozáz aktivitás rövid idejű fenntartására a transzpozáz mRNS injektálását alkalmazzák

Működési mechanizmus



● - transzpozáz

 - genom

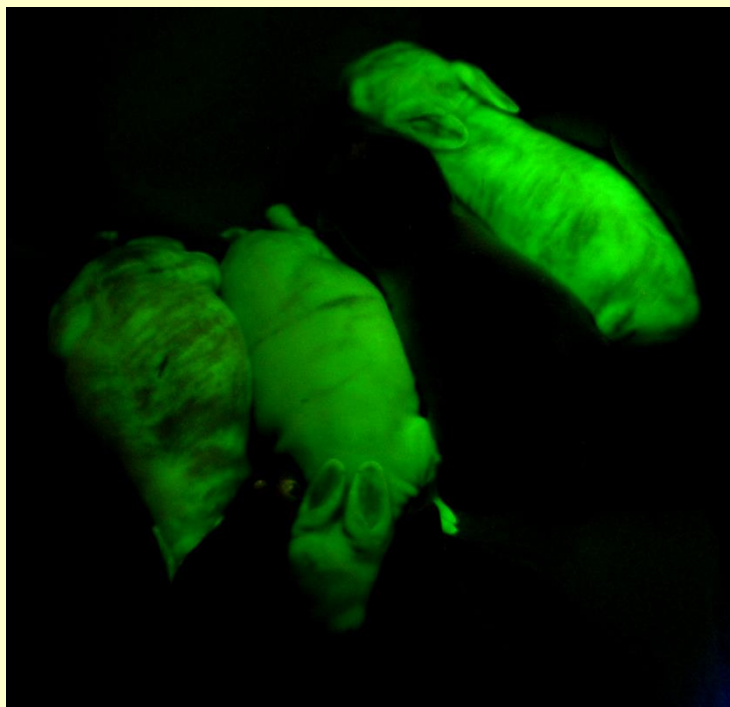
Transzgénikus blasztociszta



3,5 napos YFP-t expresszáló
blasztociszta

Kimosott embriók	Beültetett embriók	Recipiens/ellések	Transzgén utódok/ összes	Transzgénikus vonalak
644	472	25/10 40 %	7/46 15 %	4

Alapítók



F1 generációs TG utódok



AZ ALKALMAZOTT MÓDSZEREK ELŐNYEI ÉS HÁTRÁNYAI

	BAC transzgenezis	Lentivírusos transzgenezis	SB transzpozon rendszer
Hatékonyság	1-6 %	20-60 %	15 %
Kapacitás	>2 Mb	<10 kb	<6 kb
Integráció	random	random	random (TA)
Integráció formája	konkatamer	egyedi	egyedi
Expresszió	≈ 80-100 %	60-90 %	100 %
Örökítés	+++++	+	++++

ÚJGENERÁCIÓS MÓDSZEREK TRANSZGÉNIKUS NYÚL ELŐÁLLÍTÁSRA

**Mesterséges kromoszóma /BAC/ mikroinjektálással
nyúlmodell**

**Lentivírus transzdukcióval a világon először hoztunk
létre tr-nyulat**

**Transzpozon/ sleeping beauty/ mediált transzgén
beépüléssel is először hoztunk létre tr nyulat**

**Célzott génkiütéssel /CRISPR/CAS/ létrehozott tr
nyúl-Mo-on először- 2016-ban**

Bender és mtsai. Transgenic Res. 2007;16(5):613-27.

Hiripi és mtsai. Transgenic Res. 2010, 19(5):799-808

Catunda és mtsai. PlosOne 2012. 7(1):e28869.

Katter és mtsai. FASEB J. 2013 Mar;27(3):930-41.

Ivics és mtsai. Nat Protoc. 2014 Apr;9(4):794-809.

Major és mtsai. Brit J.Pharmacol 2016 Jun;173(12):2046-61.

TRANSZGENIKUS NYULAK FELHASZNÁLÁSI TERÜLETEI

BIOFARMING

- **GYÓGYHATÁSÚ FEHÉRJÉK VAGY PEPTIDEK
TERMELTETÉSE GÉNMÓDOSÍTOTT ÁLLATOK
TEJÉBEN**

HUMÁN BETEGSÉGEK MODELLÁLLATAI

- **LIPID ANYAGCSERE ÉS ÉRELMESZESEDÉS**
- **SZÍVNAGYOBODÁSSAL JÁRÓ KÓRESETEK**
- **SZÍVRITMUS ZAVAROK**

FONTOS WEB HELY

Gyógyhatású humán fehérjék melyeket transzgenikus nyúltejben termeltetnek és forgalomba kerültek

Ruconest™ /Rhucin és Myozyme®

- **Ruconest® trade név alatt rekombináns rhucin / humán C1 inhibitor/ termeltetése tr nyúl tejben**
- **Az örökletes angio ödeéma kezelésére engedélyezték, amely a test különböző pontjain duzzاناتok kialakulásával jár, így pl elzáródhatnak a légzőutak**
- **<https://www.pharming.com/ruconest-launched-in-the-netherlands>.**

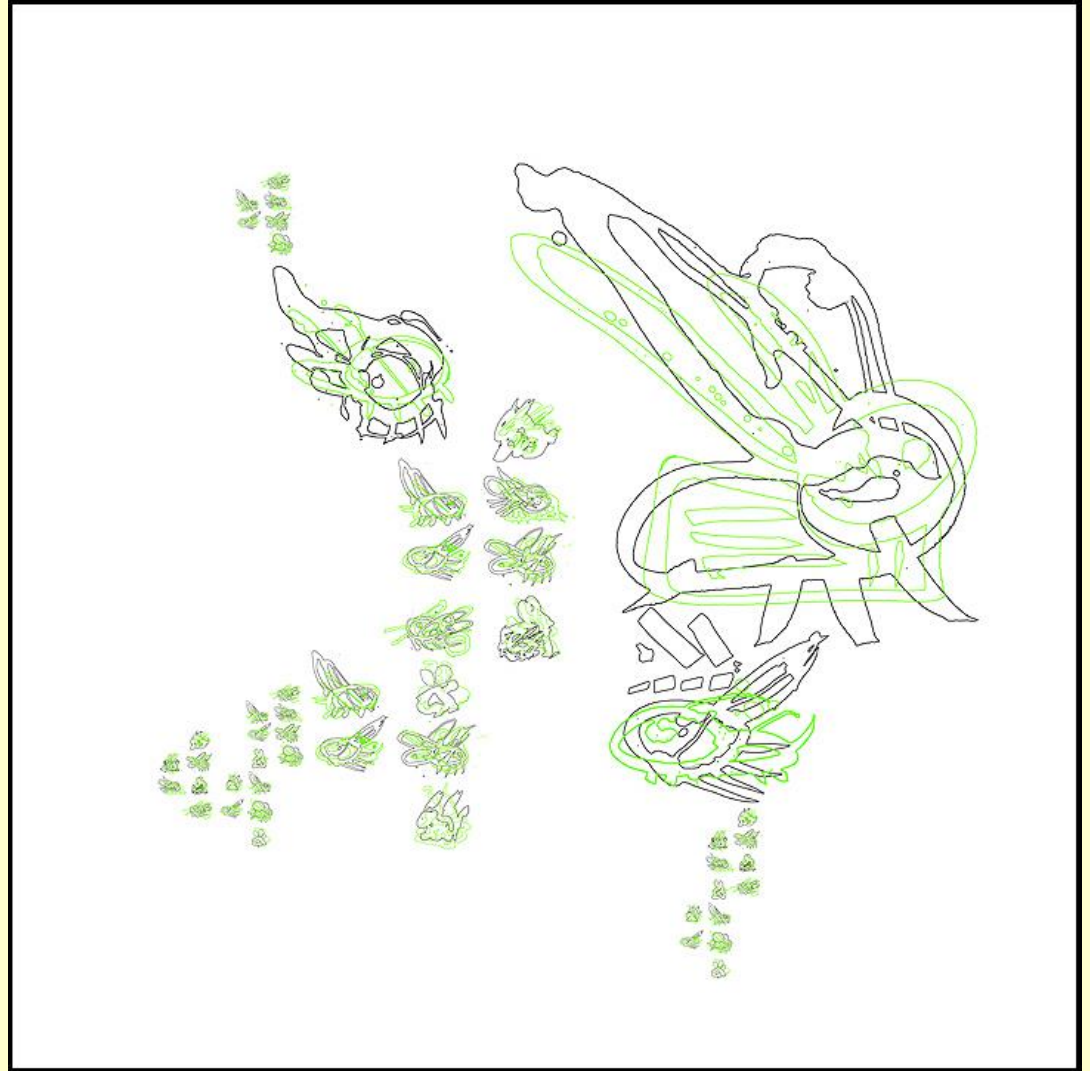


Egy transzgenikus nyúlmodell társadalmi hatása

- **A ZÖLD FLUORESZCENS FEHÉRJÉT MINDEN SEJTJÜKBEN TERMELŐ NYULAK UV FÉNNYEL MEGVILÁGÍTVA ZÖLDEK**
(Boulanger et al. 2002)
- **A GFP NYULAKAT EGYEBEK KÖZÖTT RECEHÁRTYA ÁTÜLTETÉS KÍSÉRLETEKBEN HASZNÁLJÁK**
- **A GFP NYÚL /ALBA/ MŰVÉSZI TELJESÍTMÉNYEKRE ÖSZTÖNZÖTT SZÁMOS MŰVÉSZT**
<http://www.ekac.org/gfpbunny.html#gfpbunnyanchor>
- **HATÁSÁRA SZÉLESKÖRŰ VITA BONTAKOZOTT KI FRANCIAORSZÁGBAN A GMO ÁLLATOK SZEREPÉRŐL ÉS ELFOGADOTTSÁGÁRÓL**



**2009-ben
öt lagographic
csillagközi üzentet
továbbítottak a
Lepus csillagképbe
(Orion mellett)
Cape Canaveralból,
mely 2038-ban fog
megérkezni**



<http://www.ekac.org/lepus.constellation.html>

- **The five lagoglyphic interstellar messages transmitted to the Lepus Constellation, 2009.**
- **These five lagoglyphic messages were transmitted towards the Lepus Constellation (below Orion) on March 13, 2009 from Cape Canaveral, Florida. Based upon its stellar characteristics and distance from Earth, Gamma Leporis (part of the constellation Lepus) is considered a high-priority target for NASA's Terrestrial Planet Finder mission. The transmission was accomplished through satellite broadcasting equipment and a parabolic dish antenna.**
- **Lepus Constellation [Gamma Leporis star] is 29 light-years from Earth. Kac's messages will arrive in 2038.**