

**SZENT ISTVÁN EGYETEM**

**Állattenyésztés Tudományi Doktori Iskola**

**LENTIVÍRUS ALAPÚ TRANSZGENEZIS ÉS A  
SLEEPING BEAUTY TECHNOLOGIA ALKALMAZÁSA  
TRANSZGÉNIKUS NYULAK ELŐÁLLÍTÁSÁBAN**

Doktori (PhD) értekezés

**Hoffmann Orsolya Ivett**

Gödöllő

2013

**A doktori iskola**

**megnevezése:** **Állattenyésztés Tudományi Doktori Iskola**

**tudományága:** **Állattenyésztés-tudomány**

**vezetője:** **Professzor Dr. Mézes Miklós D.Sc., akadémikus**

Tanszékvezető, egyetemi tanár

Szent István Egyetem,

Mezőgazdasági- és Környezettudományi Kar,

Állattudományi Alapok Intézet,

Takarmányozástani Tanszék

**témavezető:** **Dr. Hiripi László**

Csoportvezető, tudományos főmunkatárs,

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont,

Kérődző Genom Biológiai Csoport

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Bevezetés és célkitűzések.....</b>	<b>7</b>
<b>2. Irodalmi áttekintés .....</b>	<b>9</b>
2.1 Transzgénikus állatok.....	9
2.1.1 Mikroinjektálás .....	10
2.1.2. Transzgénikus állatok felhasználása .....	12
2.2. Lentivírusok .....	16
2.2.1. Lentivírus vektorok.....	19
2.2.2. Lentivírus vektorok alkalmazása a transzgenézisben .....	20
2.3 Transzpozonok .....	25
2.3.1. I.osztály: retrotranszpozonok.....	26
2.3.2. II.osztály: DNS-transzpozonok.....	28
2.3.2.1. Tc1/ <i>mariner</i> szupercsalád.....	28
2.3.3. Transzpozonok, transzpozíció, evolúció.....	30
2.3.4. Transzpozon alapú transzgenézis.....	33
2.3.4.1. Sleeping Beauty Transzpozon Rendszer.....	34
<b>3. Anyag és Módszer.....</b>	<b>37</b>
3.1. Plazmid vektorok.....	37
3.2. Az injektáló oldatok előállítása .....	37
3.2.1. Lentivírus .....	37
3.2.2. Sleeping Beauty .....	38
3.2.2.1. A transzpozáz mRNS előállítása.....	39
3.2.2.2. Donor plazmid előállítása .....	39
3.2.2.3. Az injektáló oldat összeállítása.....	39
3.3. Transzgénikus állatok előállítása .....	40
3.3.1. Laboratóriumi nyulak tartása .....	40
3.3.2. Szuperovuláltatás, embriókezelés .....	40
3.3.3. Mikroinjektálás .....	40
3.4. Embrióbeültetés.....	41
3.5. Transzgénikus vonal létrehozása és fenntartása.....	42
3.5.1. Alapító egyedek kiválasztása .....	42
3.5.2. Expressziós vizsgálatok .....	43
3.5.2.1. Reverz Transzkriptációs PCR.....	43
3.5.2.1. Western blot.....	44
3.5.3. Transzgén integrációjának vizsgálata .....	44

3.5.3.1. Southern blot .....	44
3.5.3.2. QPCR.....	45
3.5.3.3. Integrációs hely meghatározás.....	45
3.6. Metszetek készítése, mikroszkópos képalkotás .....	46
<b>4. Eredmények</b> .....	47
4.1. Lentivírus konstrukció .....	47
4.1.1. Transzgénikus nyulak létrehozása .....	47
4.1.2. Alapító egyedek azonosítása.....	48
4.1.3. Expresszió kimutatása .....	49
4.1.4. A transzgén beépülésének ellenőrzése.....	51
4.1.5. A transzgén öröklődése.....	51
4.2. Sleeping Beauty transzpozon rendszer .....	54
4.2.1. Az injektló oldat előállítása .....	54
4.2.2. Transzgénikus nyulak előállítása.....	54
4.2.3. Alapító egyedek azonosítása.....	55
4.2.4. Expresszió kimutatása .....	55
4.2.5. A transzgén beépülésének vizsgálata.....	57
4.2.6. Transzgénikus vonal létrehozása .....	59
<b>5. Új tudományos eredmények</b> .....	61
<b>6. Eredmények megvitatása és javaslatok</b> .....	63
<b>7. Összefoglalás</b> .....	69
<b>8. Summary</b> .....	71
<b>9. Mellékletek</b> .....	73
9.1. Anyagok.....	73
9.2. Irodalomjegyzék.....	73
<b>10. Köszönetnyilvánítás</b> .....	81

**RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

BAC	Bacterial Artificial Chromosome (bakteriális mesterséges kromoszóma)
CAG	Chicken beta-actin promoter with CMV enhancer (csirke béta-aktin promóter CMV enhancerrel)
CMV	Cytomegalovirus (citomegalovírus)
CPI	Cytoplasmic plasmid injection (citoplazmába történő mikroinjektálás)
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum (fetális borjúsavó)
GFP	Green Fluorescent Protein (zöld fluorescens fehérje)
GnRH	Gonadotrop Releasing Hormon (gonadoliberin))
hCG	Human Chorionic Gonadotropin
HIV	Human Immunodeficiency Virus (emberi immunhiány-előidéző vírus)
ICSI	Intracytoplasmic sperm injection (intercitoplazmális spermium injektálás)
LTR	Long Terminal Repeat (hosszú ismétlődő végszekvencia)
NHEJ	Non-Homologous End Joining (nem homológ végek összekapcsolása)
NLS	Nuclear Localization Signal (sejtmag lokalizációs szignál)
OPI	Overproduction Inhibition (túltermelődés-gátlás)
ORF	Open Reading Frame (nyílt leolvasási keret)
PBS	Phosphate Buffered Saline (foszfát pufferelt fiziológiás sóoldat)
PCR	Polimerase Chain Reaction (polimeráz lánreakció)
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin (vemhes kanca szérum gonadotropin)
QPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction (kvantitatív polimeráz lánreakció)
SCNT	Somatic Cell Nuclear Transfer (testi sejtes klónozás)
SIN	Self-inactivating (önmagát inaktiváló)
SIV	Simian Immunodeficiency Virus (majom immunhiány-előidéző vírus)
TIR	Terminal Inverted Repeat (fordítva ismétlődő végszekvencia)
TSD	Target Site Duplication (beépülési hely kettőződés)
UV	Ultra Violet (ultra ibolya)
WHP	Woodchuck Hepatitis Virus (mormota hepatitisz vírus)
WPRES	WHP Posttranscriptional Regulatory Element



## ***1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK***

Mikor Ereky Károly 1919-ben (Ereky 1919) könyvében elsőként használta a biotechnológia kifejezést, még nem pont azt szerteágazó tudományt értette alatta, amit napjainkban biotechnológiának hívunk. Ereky életművének fontos része a nagytétényi sertéshízlaló alapítása, ami az 1920-as években a világ legnagyobb kapacitású sertésüzeme volt. A fogalom megalkotásakor a mérnök Ereky elsősorban az élő szervezetekkel, mint munkagépekkel való termelést értette. Ugyanakkor, a biotechnológia második alappilléret abban látta, hogy minden élő szervezet hasonló sejtekből áll, amely sejtek működését a magunk hasznára fordíthatjuk, és segítségükkel nyersanyagokat termeltethetünk. Ezzel az alapelvvel már közelített a mai biotechnológia fogalma felé. Ereky fontosnak tartotta megismerni az élő szervezetek belső működési mechanizmusait, különös tekintettel a hús, tej és zsírttermelés funkcióira, ezáltal utat nyitva álma, a hatékony élelmiszer előállítás felé. Egész életét a mezőgazdasági termelés fokozásának szentelte, munkássága jó része egy nagyívű jövőkép, amely lehetővé teszi az egyre sokasodó emberiség alapellátásához szükséges javak megtermelésének tökéletesítését.

A biotechnológia Ereky szerint tehát az élő szervezetek tanulmányozása és használata modellként és termékek előállítására. A biotechnológia napjainkban nemcsak a mezőgazdasági biotechnológiát foglalja magában, kiemelkedő szerepet tölt be az alapkutatásokban és az orvostudomány elsődleges támogató résztudományává vált. Mára azon célok, amelyeket Ereky Károly munkássága elénk vetített elérhetőek a kezünkben lévő, bár az ő korában utópiának gondolt modern biotechnológiai módszerek alkalmazásával, más kérdés ezek etikai megítélése.

A XIX. század második felében már javában folytak a későbbi állatbiotechnológiát megalapozó embriológiai vizsgálatok. A modern biotechnológiát alapvetően kiszolgáló molekuláris biológia és rekombináns DNS technológia elterjedése viszont még váratott magára néhány évtizedet. Miután 1983-ban Mullis megalkotta a PCR (polimerase chain reaction) (Mullis 1986) módszerét a biotechnológia rohamos fejlődésnek indult és napjainkra egy önálló, vezető tudománnyá nőtte ki magát.

A biotechnológia résztudománya a transzgenézis, amely az élő szervezetek genomjának módosítására alkalmas módszerek halmazát öleli fel. A transzgenikus technikák kettős megítélésük ellenére napjaink jelentős tudományterületei közé tartoznak, a transzgenézis segítségével létrehozott szervezetek alkalmasak betegségek modellezésére, rekombináns fehérjék termeltetésére, gének funkcióinak vizsgálatára. Mára a transzgenikus élőlények a laboratóriumokból kikerülve a mezőgazdaságban is jelen vannak és – akarva-akaratlan –

belopóztak életünkbe. Megtalálhatjuk őket szántóföldjeiken, tányérjainkban, de még háziállataink között is.

A transzgenézis széles körű és viszonylag régóta tartó használata ellenére a transzgénikus technikák hatékonysága nagyon alacsony, ami kifejezetten munka- és időigényes eljárásokká teszi ezeket, a leginkább alap kutatásban elterjedt eljárásokat. Néhány laboratóriumi állat, mint például az egér és a patkány esetében ez a hatékonyság jónak számít, továbbá elmondható, hogy ezen állatok tartása és szaporítása kevésbé költséges és hosszadalmas, mint nagyobb társaiké. Kisebb hatékonysággal, és nyilvánvalóan drágábban, de kivitelezhető gazdasági haszonállataink transzgenézise is, a szakirodalomban megtalálható több száz publikáció bizonyítja, hogy létrehozhatunk transzgénikus sertést, szarvasmarhát, halat, baromfit, juhot és sok más transzgénikus állatfaj.

A nyúl a laboratóriumi állatok és a haszonállatok halmazainak metszetében található. Laboratóriumi modellként rendkívül hasznos humán betegségek tanulmányozásában, különböző szöveteiben pedig gyakorta termeltetünk rekombináns fehérjéket (Bösze et al. 2003). Filogenetikai és fiziológiai szempontból közelebb áll az emberhez, mint laboratóriumi modelltársai, az egér vagy a patkány. Sokat alkalmazott alany a reprodukció modellezésére, és a mikromanipulációs technikák (előmagi injektálás, embriófelezés) kipróbálására.

A nyúl genetikai módosításáról elmondható, hogy ugyan régóta létezik, viszont a hatékonyság szempontjából még gyerekcipőben járó módszerek használatosak a transzgénikus nyúlmodellek előállítására. A szakirodalomban leírt transzgénikus nyúlvonalak létrehozásának hatékonysága néhány százalék, ami nem csak időbeli és anyagi hátrányokat hordoz magában, de állatvédelmi kérdéseket is felvet.

Munkám célja az volt, hogy kidolgozzak egy könnyen alkalmazható és az eddigieknél nagyobb hatékonysággal működő transzgénikus technológiát nyúl esetében. Dolgozatomban két második generációs technológiát mutatok be, ami alkalmas a nagy hatékonyságú transzgenézisre ezen a fajon is.



## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 TRANSZGÉNIKUS ÁLLATOK

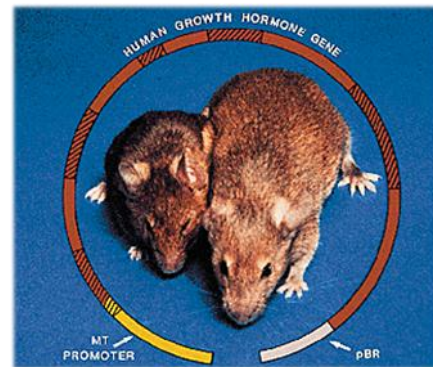
Genetikailag módosított vagy transzgénikus állatoknak nevezzük azon állatokat, amelyek genomja valamilyen szándékos, a természetben elő nem forduló változtatást tartalmaz. Szűkebb értelemben akkor tekintjük az állatot transzgénikusnak, ha az előbb említett változtatást örökíti is. A transzgenezisnek mára sok módszerét ismerjük és használjuk laboratóriumi állatokon. Ezek a beavatkozások leginkább a korai embrionális fejlődési szakaszokban történnek.

Emlősállatok transzgeneziséhez elengedhetetlen, hogy azok embrióit *in vitro* tudjuk tenyészteni, majd beültetni az állatokba. Az embriók *in vitro* tenyésztésére való kísérletek már az 1880-as években elkezdődtek. Walter Heape, az embriótranszfer úttörője, hajtotta végre az első sikeres embrió átültetést nyúlra (Heape 1891). A nyúl fontos reprodukciós modell is. Petevezetőjében és méhében más fajok embrióit tenyésztették, ami az akkor még alacsony hatékonysággal kivitelezhető *in vitro* tenyésztést helyettesítette.

A kezdeti kísérletek után hosszú időnek kellett eltelnie, hogy jól működő rendszerek alakuljanak ki az embriók *in vitro* tenyésztésének területén, amik megalapozzák és támogatják a transzgenezist. Az 1900-as évek elejétől az *in vitro* embriótenyésztés fejlődésnek indult és 1961-ben már egér embriók aggregáltatását (Tarkowski 1961) is végre tudták hajtani. A transzgenezis területén mérföldkőnek számít az 1966-ban kifejlesztett mikroinjektálás módszere (Lin 1966), amelynek segítségével transzgéneket, vagy genetikailag módosított sejteket lehet bejuttatni embriókba. A módszer elve és alapeszközei (üveg kapillárisok) azóta sem változtak.

Az embriómanipulálási eljárások és párhuzamosan a rekombináns DNS technológia (restrikciós enzimek, PCR, szekvenálás, Southern blot stb.) fejlődésével lehetővé vált a transzgenezis és a transzgen beépülésének vizsgálata. 1974-ben virális DNS-t (simian virus 40) jutattak egér zigótákba mikroinjektálás segítségével (Mintz et al. 1974). 1980-ban Gordon és munkatársai komoly áttörést értek el: létrehozták az első, nem virális eredetű DNS-t tartalmazó transzgénikus állatot (Gordon et al. 1980), amiről a későbbiekben azt is bizonyították, hogy örökíti is a transzgent (Gordon and Ruddle 1981). Ők alkották meg magát a transzgénikus kifejezést is (Murray et al. 1999), amely napjainkra gyökeres változáson ment keresztül a technikák fejlődése miatt.

Az 1980-as évektől az egér előmagba történő mikroinjektálás alkalmazásával létrehozott transzgénikus állatok használata az egész világon ismert és több laboratórium által is sikeresen alkalmazott technikává vált. Az egyik híres kísérlet 1982-ben zajlott, mikor olyan transzgénikus „szuperegeret” hoztak létre kutatók, ami a patkány növekedési hormon génjét hordozta transzgénként, egy máj specifikus promóter irányítása alatt (Palmiter et al. 1982). A növekedési hormon transzgénként való bevitelére következtében az állatok duplájukra nőttek (1. ábra). Szintén nagy sikert könyvelhettek el Simons és munkatársai, akik létrehozta egy olyan transzgénikus egeret, amely a tejében egy idegen fehérjét (birka  $\beta$ -laktoglobulin) expresszált (Simons et al. 1987). A technikát halakon is kipróbálták, – ahol a mikroinjektálás az embrió nagysága miatt könnyebben kivitelezhető – itt is jó eredménnyel zártak a kutatók, hiszen létre tudtak hozni például transzgénikus Atlanti lazacot (*Salmo salar*) (Du et al. 1992).



1. ábra: A transzgénikus egerek a növekedési hormon génje miatt duplájukra nőttek a kontroll társaikhoz képest. (Palmiter, Brinster et al. 1982)

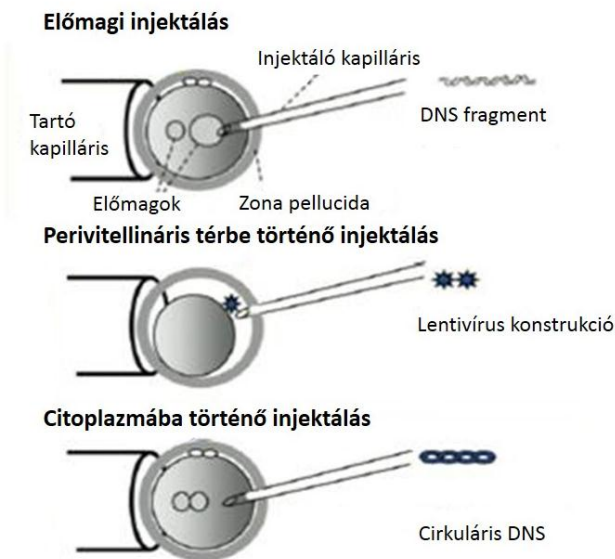
A transzgénikus technika a nyolcvanas évek után rohamos fejlődésnek indult, egyre több állatfajt bevonva a kísérletekbe. Mára rutineljárássá vált a transzgénikus laboratóriumi állatok (egér, patkány) létrehozása, de gazdasági haszonállataink közül is a legtöbbet képesek vagyunk genetikailag módosítani (kérődzők, sertés, baromfik, halak stb).

Természetesen a hagyományos mikroinjektáláson kívül különböző más technikákkal is állíthatunk elő transzgénikus állatokat. Az összejtek célzott genetikai módosításával létrehozható kiméra állatok nagyon fontos eszközei mind az alap-, mind az alkalmazott kutatásoknak. Napjainkban elterjedt eljárások a knock out állatok létrehozása ES sejtek és homológ rekombináció segítségével vagy a testi sejtes klónozás, viszont eltérő szakértelmet és eszközparkot igényelnek, mint a mikroinjektáláson alapuló technológiák. Nyúl esetében sajnos még nem áll rendelkezésre megfelelő összejt vonal, így ezeket a technológiákat még nem lehet használni ezen a fajon. Mindazonáltal a gazdasági haszonállataink célzott transzgenezise egyelőre nem elterjedt (bár hosszútávon várható) a jól működő ES sejt vonalak hiánya miatt, így esetükben a mikroinjektálás és a testi sejtes klónozás a használatos.

### 2.1.1 Mikroinjektálás

A mikroinjektálás, ami az első sikeres transzgénikus technikának tekinthető, napjaink kifinomult eszközeivel is ugyanúgy zajlik, ahogy kitalálták 40-50 éve (Lin 1966; Gordon et al. 1980). A frissen termékenyült zigóta fejlődése korai, egysejtes szakaszában két előmaggal, egy apaival és egy anyával rendelkezik. Az előmagokat egy speciális, úgynevezett differenciál

interferencia optika és inverz mikroszkóp segítségével láthatóvá lehet tenni. A mikroinjektálást ilyen, egysejtes, két előmagos állapotban kell elvégezni üveg kapillárisokkal. Az embrió rögzítése egy megfelelően kialakított tartó kapilláris segítségével történik. Egy másik, 1-2 mikrométer (baktérium méretű) átmérőjű kapillárisal az apai előmagba kell juttatni az injektáló oldat néhány pikoliternyi mennyiségét. Ez az injektáló oldat tartalmazza az alacsony koncentrációjú (1-5 ng/mikroliter) DNS oldatot. A manipulált embriók ezután embriótranszfer segítségével álvemhes nőtények petevezetőjébe kerülnek (Hiripi 2001).



2. ábra: Előmagi injektálás, perivitellinális térbe való injektálás, citoplazmába történő injektálás. (módosítva: Garrels, 2012)

A fent leírt, előmagba történő mikroinjektáláson (pronuclear injection, PNI) kívül léteznek kicsit könnyebben kivitelezhető eljárások is (2. ábra). Ilyen a citoplazmába történő mikroinjektálás (cytoplasmic plasmid injection, CPI), ezt akkor használják, amikor a génkonstrukciót plazmid formájában juttatják az embrióba. A plazmid mellett koinjektálhatók például transzpozon rendszerek, amik katalizálják az integrációt. Ezen kívül a perivitellinális térbe is lehetséges az injektálás, ekkor általában lentivírusokat alkalmaznak a DNS célba juttatására.

A különböző virális vektorokkal történő transzgenézis (Haskell and Bowen 1995) hatékonyságát tekintve utolérhetetlen, viszont használatához magas biológiai veszélyességű kockázatok társulnak (S2 biztonsági fokozatú labort igényel). Tagadhatatlan előnye, hogy bár ez is mikroinjektáláson alapuló technika, az injektálandó oldatot itt csak az embriók perivitellinális terébe kell juttatni és nem az előmagba.

Mindhárom esetben a mikroinjektálás célja a DNS bejuttatása az embrió genomjába, így ezek az eljárások megkülönböztethetőek a testi sejtes klónozástól (somatic cell nuclear transfer, SCNT), vagy a sejtinjektálástól. Utóbbi esetekben teljes genomokat juttatunk az enukleált petesejtbe és nem egy DNS konstrukciót. Létezik még olyan technológia is, amikor spermium segítségével (sperm-mediated gene transfer, SMGT) viszünk be transzgént a cél genomba, fontos különbség, hogy a donor petesejt és nem embrió. A DNS oldatban inkubált spermium termékenyíti a petesejtet, így nincs szükség konkrét mikromanipulációra. Hasonló eljárás az akár nyúl esetén alkalmazható ICSI (intracytoplasmic injection) is, amikor a spermium sejthártyáját roncsolva, az képes lesz a DNS konstrukció felvételére (Deng and Yang 2001). Ezt a

spermiumot azután mikroinjektálás segítségével a petesejtbe juttatva létrehozhatók transzgénikus állatok (Garrels et al. 2012).

A mikroinjektációs technikák sok hátránnyal terheltek, ilyen az alacsony hatékonyság, a random integráció, és az annak következtében fellépő esetleges pozícióhatás, vagy a mozaicizmus, illetve a nem befolyásolható kópiaszám. A mikroinjektálás hátrányai közé tartozik továbbá, hogy egyes fajok esetében az előmagok a citoplazmában található lipidek miatt nem láthatók jól. Ezen fajok (sertés, szarvasmarha) embrióit a mikroinjektálást megelőzően centrifugálni kell (Hammer et al. 1986). Mivel a mikroinjektált embriók recipiens nőténybe való ültetése általában korai fejlődési stádiumban zajlik, így nincs lehetőség arra, hogy kiválogassuk a transzgénikus embriókat. Ez a módszert nagyon költségessé és munkaigényessé teszi (Niemann and Kues 2003).

A hátrányok visszaszorítása érdekében a kilencvenes években a kutatók elkezdtek keresni más eljárásokat. Ekkor került kifejlesztésre a spermiumok általi transzgenézis (Gandolfi 1998), vagy az ICSI eljárás (Perry et al. 1999). Ezek a technikák sem terjedtek el széleskörűen, mert annyit nem emeltek a hatékonyságon, hogy megérné ezeket a bonyolultabb módszereket alkalmazni. Az ICSI-ről viszont elmondható, hogy a humán fertilitási központokban nagy szerephez jut, mikor a terméketlenség a férfi spermiumának mozgásképtelensége vagy éretlensége következtében áll fenn.

Összefoglalva elmondható, hogy a mikroinjektálás a transzgénikus állatok létrehozásának legelterjedtebb és egyben legegyszerűbb módja. Hátrányai ellenére még mindig a legkifizetődőbb és legtöbbször alkalmazott technológia. A határfokának növelésére kitalált lentivírus, transzpozon és szekvencia specifikus nukleáz technológiákon alapú módszerek egyre szélesebb körű elterjedése és hozzáférhetősége pedig biztosítja, hogy továbbra is a mikroinjektálás maradjon a vezető megközelítés a transzgenézisben.

### *2.1.2. Transzgénikus állatok felhasználása*

A transzgénikus állatok felhasználása igen széleskörű. A törvények és a társadalmi ellenérzés miatt elsősorban kísérleti célokra használjuk a genetikailag módosított állatokat, ugyanakkor sok, már létező transzgénikus vonalnak folyik az engedélyeztetése köztenyésztésbe vételre vagy ipari, farmakológiai hasznosításra. Hosszú könyvek és cikkek szólnak az ehhez kapcsolódó etikai kérdésekről és sok – egymásnak gyakran ellentmondó – tanulmány készül a genetikailag módosított organizmusok környezeti hatásairól. Nem tisztem megítélni ezeket, így a transzgénikus állatok felhasználásának témakörét csak történeti jelleggel, a teljesség igénye nélkül szeretném áttekinteni, főleg a mezőgazdasági oldalra kitekintve.

A tudósok eleinte az állattenyésztés termelékenységének fokozására akarták alkalmazni a transzgénikus technikát. A humán növekedési hormon génjét hordozó szuperegér példáján felbuzdulva, szerettek volna létrehozni hasonló nyulat, sertést és juhot is (Hammer et al. 1986; Pursel and Rexroad 1993). Emberi növekedési hormon génjét juttatták egy egér promóter (metallothionein I) irányítása alatt az egysejtes embriókba. A megszületetett transzgénikus egyedeket aztán továbbszaporították és vizsgálták. A létrehozott transzgénikus vonalaik azonban számos egészségügyi problémával terheltek voltak (Pursel and Rexroad 1993). Sertések esetében például ízületi- és bőrgyulladás lépett fel. Minden esetre ezek a kutatók létrehozták az első transzgénikus haszonállatokat, ami mindenképpen nagy jelentőséggel bír.

A növekedési hormon transzgénként való használatát aztán a már említett transzgénikus



3. ábra: Transzgénikus lazac (fent) és kontroll társa (fotó: AquaBounty)

lazacon is kipróbálták (Du et al. 1992). Ez a lazac egy, amúgy minden halban megtalálható növekedési hormon génjének szekvenciáját kapta transzgénként, ami egy szintén halból származó AFP (anti-freeze protein) promóter irányítása alatt áll. A kontroll egyedekhez képest a transzgénikus állatok fele annyi idő (máxfél év) alatt érik el a vágósúlyt (4-6 kg) (3. ábra). 2013-ban ezt a transzgénikus vonalat

várhatóan az USA-ban köztenyésztésbe veszik, így elsőként engedélyeznek a humán táplálkozási láncba belépő transzgénikus állatot. Jól mutatja a transzgenézis elleni társadalmi ellenérzést és az engedélyeztetési eljárás hosszú és bonyolult folyamata, és a tény, hogy 24 év telt el a transzgénikus lazac létrehozása és várható engedélyeztetése között. Kimondható, hogy a transzgénikus állatok köztenyésztésbe való felvétele nehéz és időigényes folyamat.

Szuperizmolt állatok a természetben előforduló spontán mutációk következtében is léteznek. A miosztatin gén (GDF-8) egy nagyhatású gén, ami többek között az izomtömeg szabályozásáért felel (McPherron and Lee 1997). Ennek a génnek a természetben is előforduló mutánsai a kék belga vagy a piemonti szarvasmarha fajták, amik ennek a nagyhatású génnek a különböző mutációi következtében szuperizmoltak. Transzgenézis segítségével egyelőre csak egeret hoztak létre, ami szuperizmolt (Lee and McPherron 2001). A miosztatin gén mutációjával rendelkező transzgénikus állatok, vagy azok normál genotípussal keresztezett F1 hibridjei, akár mezőgazdaságilag is jól hasznosíthatók lennének.

A növekedési erély fokozása mellett funkcionális élelmiszerek létrehozása érdekében is készültek már különböző transzgénikus állatok. Bár az emlősök nem képesek többszörösen

telítetlen zsírsavak létrehozására, mégis az emlős, így az emberi szervezetben is fontos funkciókkal bírnak ezek a zsírsavak. Ugyanakkor növények és alsóbbrendű élőlények tartalmazzák azt az enzimet, amivel lehetőség van számukra ilyen zsírsavak előállítására. A kutatók ezért a spenót egy deszaturáz génjének (FAD-2) kódoló szekvenciájával mikroinjektáltak sertés embriókat (Saeki et al. 2004). A megszületett malacok a gént expresszálták és kedvezőbb telítetlen/telített zsírsav aránnyal rendelkeztek humán táplálkozási szempontból, mint nem transzgénikus társaik (Niemann and Kues 2007). Nem mellesleg Saeki és kutatócsoportja volt az első, aki *in vivo* állatmodellben egy növényi fehérjét expresszáltatott sikerrel (Saeki et al. 2004). Ugyanezt a sémát követve hoztak létre Lai és munkatársai kedvező zsírsavaránnyal rendelkező sertéseket, azzal a különbséggel, hogy *Caenorhabditis elegans*-ból származó deszaturáz gént vittek be transzgénként a vonalba (Lai et al. 2006). További transzgénikus állatokkal folytatott kísérletek találhatóak a funkcionális élelmiszerek területén. Többféle szarvasmarha vonal létezik, melynek tejösszetételét megváltoztatták, hogy kedvezőbb legyen közvetlenül a humán táplálkozás vagy a sajt készítés szempontjából. Ilyen vonal a Brophy és munkatársai által létrehozott is, ahol a kazein fehérjék expressziós szintjét emelték meg. Az előbbiekkal ellentétben, ebben az esetben a kazein szinteket két, a szarvasmarhában amúgy is jelen levő gén segítségével növelték (Brophy et al. 2003).

De nem csak funkcionális élelmiszer kialakítása érdekében tettek a transzgénikus szakemberek lépéseket, hanem a környezetvédelem irányába mutató vonalak kialakítása is megtörtént. A mezőgazdaság egyik fontos feladata lenne, hogy úgy termelje meg a szükséges javakat az emberi táplálkozás kielégítéséhez, hogy közben a környezetet nem, vagy csak fenntartható módon rombolja. Jól tudjuk, hogy milyen messze állunk ennek megvalósításától, ezért egy nagyrészt amerikaiakból álló kutatócsoport létrehozott egy transzgénikus sertést, amivel a sertéstelepek súlyosan környezetterhelő hatását csökkenthetik. A monogasztrikus állatok, mint a sertés (és a baromfi), trágyája magas foszfor tartalmú, mivel a növényi takarmányokból származó fitát lebontására képtelenek. A tenyésztésük közben melléktermékként keletkező trágya természetbe juttatása eutrofizációs folyamatokhoz vezet, ami a sertéságazat egyik legsúlyosabb környezetterhelése. Az „enviropig” fantázianevű transzgénikus sertést 2001-ben mutatták be kanadai kutatók (Golovan et al. 2001). Ez a sertés vonal a nyálában az *E. coli*-ból származó fitáz gént termeli, ami 75%-kal csökkenti a trágya fitát tartalmát. Az „enviropig” köztenyésztésének engedélyeztetése jelenleg is folyik. Igaz, hogy az „enviropig” segítségével az ágazat környezetterhelése csökkenthető, ugyanakkor nyilvánvalóan nem ez a járható út a fenntartható mezőgazdaság irányába.

A transzgénikus állatok mezőgazdasági felhasználása tehát még csak gyerekcipőben jár, főleg ha összehasonlítjuk a gyógyszeripari alkalmazásukkal. Különböző szöveteikben

farmakológiai célokra előállított rekombináns fehérjét termelő transzgénikus állatok egész sora áll rendelkezésre. Léteznek transzgénikus szarvasmarhák, nyulak, kecskék, amelyek a tejükben, vérükben termelnek rekombináns fehérjét, például albumint, fibrinogént, kollagént. Ezen fehérjék humán gyógyászati felhasználása sok esetben már eljutott az engedélyeztetési eljárás klinikai fázisába (Niemann and Kues 2007).

Sokatmondó tény, hogy bár a fogyasztók a genetikailag módosított állatokat nem szeretik – legalábbis tudtukkal –tányérjukban látni, azért lakásaikba beengedik transzgénikus háziállatok formájában. Ilyen az Amerikából mára szinte az egész világon elterjedt transzgénikus zebrahal (Glowfish) vagy a Tajvanból származó transzgénikus medaka. Ezek a laboratóriumi tartályokból az otthoni akváriumokba emigrált halfajok különböző transzgenként bevitt riporter gént tartalmaznak, furcsán mégis elfogadhatóvá váltak a törvények és közvélemény számára.

A mezőgazdaságban vagy a farmakológiában hasznosított transzgénikus vonalaknál sokkal több hasznot hajtanak a laboratóriumi felhasználású transzgénikus állatok, igaz közvetve. A transzgénikus állatok alkalmasak betegségmodellek létrehozására, gének, szabályozó régiók, génfunkciók, fehérjék vizsgálatára és termeltetésére. Továbbá lehetséges biokémiai útvonalak modellezése hibás fehérjék termeltetésével vagy knock out állatok létrehozásával. Mivel a rágcsálók kevésbé hasonlítanak az emberhez, ezért mostanában egyre elterjedtebbek a nyúl, sertés, juh, szarvasmarha modellek, amelyek sokkal jobb közelítést adnak fiziológiai, anyagcsere és élettartam szempontjából is. Kifejlesztettek transzgénikus sertéseket az Alzheimer-kór, a cisztás fibrózis és juh modellt a Huntington-kór vizsgálatára (Garrels et al. 2012).

Gödöllői laboratóriumunkban rekombináns fehérjék termeltetésére hozunk létre transzgénikus nyúl vonalakat. Ezen fehérjék farmakológiai szempontból fontosak. A hemofília-A betegségben szenvedők nem képesek aktív VIII-as véralvadási faktor termelésére. A beteg számára csak a tisztított és koncentrált vérplazma, illetve az emberi sejt kultúrában termelt gyógyhatású fehérje jelent megoldást. Csoportunk olyan transzgénikus nyulat hozott létre, amely a tejben termeli az emberi VIII-as véralvadási faktort. A transzgénikus állat a transzgent mendeli úton örökölte és a hemizigóta utódgenerációban a fehérje aktív formáját 3-4 ng/ml koncentrációban termelte (Hiripi et al. 2003).

Az alkalikus foszfatáz egy fontos gyógyászati fehérje a Gram-negatív bakteriális liposzacharidok okozta megbetegedésekben. A szövet specifikus alkalikus foszfatázt (TNAP) nehéz megfelelően kitisztítani humán szérumból. A nyúl tejben való termeltetés egy jó alternatíva. Szintén gödöllői közreműködéssel sikerült létrehozni olyan transzgénikus nyúl vonalat, amelyben egy emlő specifikus promóter irányítása alatt a humán TNAP kódoló régiója

expresszál. A transzgén stabilan öröklődik és a transzgénikus nyulak tejében megtalálható az aktív humán szövet specifikus alkalikus foszfatáz (Bodrogi et al. 2006).

Megítélésem szerint a transzgénikus állatok használatának leginkább elfogadott és helyes módja az alap kutatásban való alkalmazásuk. A transzgenézissel megalkotható biológiai modellrendszerek segítségével eddig ismeretlen gének, szabályozó szekvenciák szerepét érthetjük meg, humán betegségek genetikai hátterét térképezhetjük fel. Ezért a transzgenézis fontos és hasznos részét képezheti a társadalmat segítő tudományoknak, amennyiben a transzgénikus állatok létrehozása *csak eszköze és nem célja* a kutatásoknak.

## 2.2. LENTIVÍRUSOK

A retrovírusok olyan burokkal rendelkező RNS vírusok, melyek saját reverz transzkriptáz enzimük segítségével képesek az RNS-ükről DNS-t írni. Ezt a DNS molekulát aztán a gazda sejt genomjába építik (provírus), ehhez a szintén saját kódolású integráz fehérjéjüket használva. A genomba beépülve a gazda transzkripciós és translációs rendszerét kihasználva, a gazdában új, fertőzőképes vírusok szerelődnek össze (Goff 2001).

A retrovírusok jellemzően testi sejtek genomjába integrálódnak, azonban léteznek olyan esetek, mikor a csíravonal sejtjeibe beépülve úgynevezett endogén retrovírusokká (ERV) alakulnak. Ezekre jellemző a vertikális transzmisszió tehát, hogy az ivarsejteken át öröklődnek az utódokba, ahol akár evolúciós távlatokon át is jelen lehetnek, nagyrésztük persze mutációkon keresztül inaktiválódnak.

A lentivírusok a retrovírusok egy génuszát alkotják. A lentivírusoknak öt szerocsoportjuk létezik, a gazdák szerint csoportosítva, általában gerinceseket támadnak, azon belül is emlősöket, így gazdasági haszonállataink jelentős fertőző ágensei. A lentivírusok különböző szervekben okozhatnak maradandó fertőzést és elváltozásokat, egyik fő jellemzőjük a hosszú inkubációs idő. (A „lenti” szó latinul lassút jelent.) A beépülés előtt ezeket a vírusokat nehéz detektálni. Képesek az osztódó és nem osztódó sejtek fertőzésére is, ami megkülönbözteti őket a retrovírusoktól. Utóbbiak leginkább mitotikusan osztódó sejtekbe képesek integrálódni (Pfeifer 2004). RNS genomjukban a gag, pol és env géneket kódolják (Goff 2001), ezek hasonló funkciójúak retrovírusokkal. De további szabályozó gének is támogatják sikerességüket (pl. tat, rev) (Desrosiers 2001), amik segítségével például irányítani tudják expressziójukat. A lentivírusok a komplex retrovírusok általános génjein kívül tartalmaznak még szabályozó fehérjéket is, amik az élelciklusukat befolyásolják.

Egy tipikus lentivírus genomja (ssRNS) körülbelül 10 kb és a gag cisztronálal kódolt struktúrféhrjékből álló kapszidban található. A kapszidban ezen kívül helyet kap a pol génről



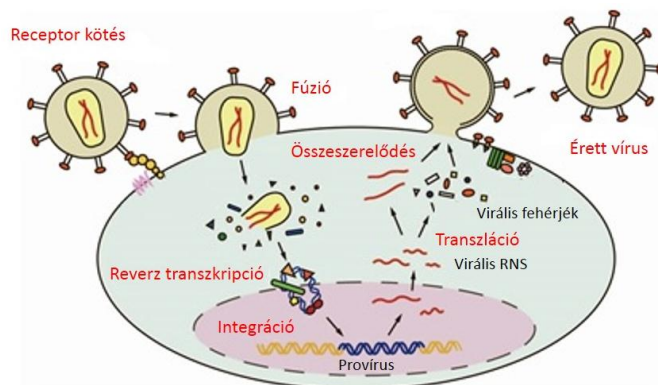
íródo vírus specifikus reverz transzkriptáz, integráz és proteáz is (Spirin et al. 2008). A reverz transzkriptáz enzim felelős a későbbiekben az egyszálú RNS genom duplaszálú DNS-re fordításáért. A kapszid ezeken kívül tartalmaz néhány szabályozó fehérjét, és tRNS-t, ami a provírus átírásában primerként kap szerepet. A kapszidot körülvevő burok a gazdasejt membránjából jön létre, de a vírus két felszíni fehérjéje is részt vesz a kialakításában. A gp41 egy transzmembrán, míg a gp120 egy külső alegységét képezi a buroknak. A burok és ezáltal a vírus specificitását ezek a sejt felszíni fehérjék adják.

A provírus génjei 5' és 3' irányban is LTR-ekkel (Long Terminal Repeat) vannak körülveve, ezekben az ismétlődő szekvenciákban kapnak helyet a szabályozó elemek (cis-acting elements). Az LTR-ek fontos elemei az att ismétlődések, amik a provírus integrációjához elengedhetetlenek, valamint egy enhancer elem és egy promóter. Az 5' LTR után található még két lényeges funkcionális egység, a PBS (primer binding site) és a  $\Psi$  szekvencia. Ez utóbbi a virális RNS dimerizációjáért és a vírus összehasonlódás indításáért felel. Az utolsó szabályozó elem egy purin-gazdag régió, amely a kiegészítő szál megírásakor játszik szerepet (Spirin et al. 2008). Az elkészült provírus tehát a saját szabályozó szekvenciái segítségével funkcionális transzkripció egységként viselkedik a gazdasejtben, és a gazdasejt transzkripció rendszerét felhasználva írónak át róla a vírus fehérjéi.

A vírus genom transz elemei közül első a gag gén, ez a gag prekursor fehérjét kódolja, amiből egy érési folyamat során a mátrix és a kapszid fehérjéi készülnek. A pol gén átfedésben van a gag-gal, együtt alkotnak egy ORF-et, amiről a gag-pol prekursor fehérje termelődik. Ennek proteolíziséből létrejönnek a vírus működéséhez szükséges integráz, proteáz és reverz transzkriptáz enzimek. A harmadik fő gén az env, ez a specifikus burok felépítéséhez szükséges információkat hordozza (gp41 és gp120). A gag és pol génekről származó fehérjék érésében a virális proteáz, míg a köpenyfehérjék érésében a gazda sejt proteáza működik közre (Spirin et al. 2008). A felsoroltakon kívül helyet kap még a lentivírus genomban a Tat és Rev, illetve a Vif, Vpu, Vpr és Nef ORF-je is. Ezen fehérjék mindegyike a virális fehérjék szintézisében vesz részt a gazda sejten belül, további szerepük van a vírusok összehasonlásában és a gazdasejtből való kilépésben (Spirin et al. 2008).

A vírus életciklusának (első lépésében a burokkészítők felismerik a majdani gazdasejt membránját és összeolvadnak azzal. Így a

kapszid a gazdasejtbe jut, ahol a mikrotubulus rendszer segítségével közlekedik (Pages et al. 2004). Ahogy a vírus bejut a sejtbe, megkezdődik a genom átírása duplaszálú DNS-re, azaz a provírus készítés. Ezt a reverz transzkriptáz végzi, aminek háromféle



aktivitása játszik szerepet: RNS-függő 4. ábra: A lentivírusok életciklusa (Schumann 2007)

DNS polimeráz, DNS-függő DNS polimeráz, és RNáz H, ez utóbbi távolítja el a DNS/RNS duplexről az RNS szálát. A létrejött provírus ezután több virális és gazdafehérje összekapcsolódásával egy úgynevezett preintegrációs komplexet alkot, ami aktív transzporttal képes bejutni az akár nem osztódó gazdasejt sejtmagjába. Ennek a komplexnek az alkotói a provírus DNS-en kívül a Vpr és a mátrix fehérjék is, továbbá az integráz, ami a NLS-t (nuclear localization signal) tartalmazza. A Vpr az aktív transzfer katalizálásában vesz részt, továbbá felelős azért, hogy a sejtmagba lépéskor a sejt G2 fázisban legyen, minthogy az 5' LTR-ben található virális promotórnak ebben a fázisban a legnagyobb az aktivitása. A sejtmagba bejutva a vírus a NHEJ (non homologous end joining) mechanizmus segítségével integrálódik. Ekkor játszanak szerepet az LTR-ekben található ismétlődések, amiknél fogva az integráz a provírust cirkularizálja, illetve ezek az ismétlődések szükségesek a NHEJ-hoz is. Az integrációs hely teljes mértékben random, nem kötött specifikus nukleotid szekvenciákhoz, igaz, a provírusok általában aktívan expresszálandó kromoszóma régiókat céloznak meg. Az integrálódott provírust a gazda genom expresszálja, a róla termelődő RNS-ek alternatív intron kivágódásait követően pedig létrejönnek a vírus fehérjéi. Az teljes mRNS képezi majd az új vírus genomot a kapszidba csomagolva. Ezek a kapszidok kilépnek a gazdasejtéből és a fertőzési ciklus előről kezdődik (Spirin et al. 2008).

Érthető módon legjobban jellemzett és fő képviselője a lentivírus génuszának a HIV (human immunodeficiency virus) vírus, annak ellenére, hogy a lentivírusok első leírt tagját (MVV) juhól izolálták. A HIV 10 kb-nyi genomja a legtöbbet tanulmányozott RNS molekulává vált a felfedezése óta eltelt 30 évben (Lever et al. 2004). Hozzá tartozik az igazsághoz, hogy a számatlan publikáció ellenére még mindig nem vagyunk tisztában a HIV mindössze 9 génjének pontos működésével.

A transzgenézisben és génterápiában általában HIV-1 vagy SIV (simian immunodeficiency virus) alapú vektorok használatosak. Ugyanakkor sok más lentivírusból is

hoztak már létre vektor konstrukciókat, például a EIAV (equine infectious anaemia virus) a FIV (feline immunodeficiency virus) és a BIV (bovine immunodeficiency virus) (Lever et al. 2004).

A lentivírusokon kívül más vírusokat is alkalmaznak a transzgenézis területén, ilyen a MLV, aminek a felhasználása hosszú múltra tekint vissza. De az adenovírusok is széles körűen elterjedtek, mert kicsi a méretük és sok szövetet tudnak fertőzni. Azonban a lentivírusokon alapuló géntranszfer tekinthető a legbiztonságosabbnak a virális vektorokkal végzett génmódosítások közül. A lentivírus vektoroknak jól manipulálható genomjuk mellett nagy előnyük, hogy akár 7-8 kB-nyi szekvenciát is be tudnak vinni osztódó és nem osztódó sejtekbe egyaránt (Lever et al. 2004).

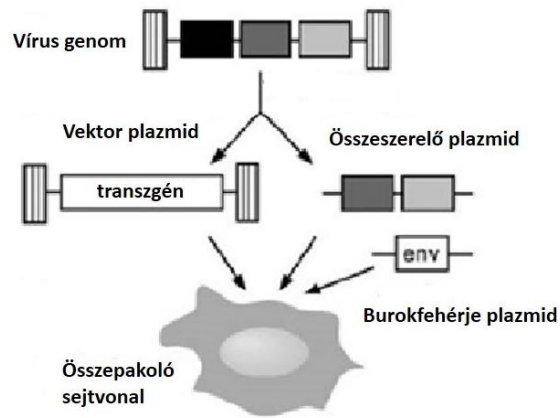
### *2.2.1. Lentivírus vektorok*

A vírusok a gazdasejtek mechanizmusait ügyesen kihasználva képesek másolódni. Ezen kívül evolúciójuk alatt hatékony fegyvereket fejlesztettek ki a sejtekbe való behatolásra, ezért hasznosak a biotechnológia számára, mint génbeviteli vektorok.

Az úgynevezett első generációs lentivírus vektorokat HIV-1 vírusból alakították ki (Naldini et al. 1996), ezek a burokfehérje génjén kívül minden virális gént tartalmaztak. A második generációs vektorokból már több gén hiányzik, a HIV vírus kilenc génjéből ezek ötöt hordoznak. Azóta persze sok fejlesztésen mentek keresztül a lentivírus vektorok a hatékonyság és a biztonság növelésének érdekében (Dull et al. 1998). A harmadik generációs, humán génterápiában is használatos, lentivírus vektorok már csak a gag, pol és rev géneket kódolják.

Az úgynevezett SIN (self-inactivating) vektorokban az LTR-ek közül hiányoznak vagy deléciókat tartalmaznak (Zufferey et al. 1998) a virális enhancer és promóter szekvenciák, így lecsökken a valószínűsége az onkogének aktivációjának a beépülés során (Pfeifer et al. 2004). Ráadásul a SIN vektorok a géncsendesítésnek sem célpontjai, hiszen nem tartalmazzák a virális promótert. Helyette általában egy konstitutív promóter szerepel, mint a humán citomegalovírus promótere (CMV) vagy a csirke béta aktin és CMV promóterekből mesterségesen létrehozott CAG promóter. Természetesen szövet specifikus vagy indukálható expresszió kialakítása is lehetséges lentivírus vektorokkal.

A lentivírus vektorok készítése az egyik nagy szaktudást igénylő területe a biotechnológiának, mivel az értekezésnek ez nem képezi tárgyát, így csak a sematikus elvét szeretném bemutatni a vírusvektorok összeállításának. Laboratóriumi körülmények között tranziens vagy stabil transzfekciós rendszerekben hozzák létre a lentivírus vektorokat (5. ábra). Az úgynevezett összepakoló sejtvonalba (ez a HEK 293(T)



5. ábra: A lentivírus vektor összepakoló rendszer és plazmidjai (Pfeifer 2004)

sejtvonál általában eleve expresszálja a rev gént) kotranszfektálnak három különböző plazmidot (Amado and Chen 1999). Egyrészt egy *vektornak* nevezett plazmidot, ami tartalmazza a vírus LTR-jei közé klónozott transzgént a megfelelő promóterrel. Másrészt az *összeszerelő* plazmidot, ebben megtalálhatók a vektor egyszeri összepakolásához szükséges fehérjék génei (gag, pol). Az összeszerelő plazmid szekvenciái közül hiányoznak azok a szignálok, amik az új vírusok létrejöttét indukálják. Szintén nem szerepel benne a burokfehérje génje, mert azt egy harmadik – *burok*– plazmidon juttatják a rendszerbe. A burokfehérje gén egy heterológ vírusból származik, általában a VSV-G (vesicular stomatitis virus) G glycoprotein *env* génje vagy a MLV burokfehérje génje. Az összepakolt vektor a HIV-től eltérő burokfehérje következtében nem csak a T-sejtek fertőzésére lesz képes. A vektorokat ezek után a sejtekből kitisztítják és titerüket dúsítással beállítják.

A három külön plazmid használata és az, hogy a plazmidok szekvenciái közötti hasonlóság nagyon csekély biztosítja a váratlan rekombinációs események alacsony gyakoriságát a vektor készítés folyamán. Az összepakoló sejtvonalon végbemenő tranziens expresszió eredményként létrejönnek olyan transzfer vektorok, amelyek képesek bejutni osztódó és nem osztódó sejtekbe egyaránt, és ott a magukkal hozott enzimek segítségével integrálják a gazda genomjába a transzgént (Naldini et al. 1996).

Lentivírusos transzgenezis esetében a vírusvektort tartalmazó injektáló oldatot nem kell az előmagba juttatni, hiszen a vektor képes a sejtmembránokon átjutni. Az egysejtes embriókat körülvevő zona pellucidán azonban nem képes átlépni, így az injektáló oldatot a zona pellucida alá kell bejuttatni mikroinjektálás segítségével (ld. 2. ábra).

### 2.2.2. Lentivírus vektorok alkalmazása a transzgenezisben

A retrovírus alapú vektorokat széleskörűen alkalmazzák mind az alap-, mind az alkalmazott kutatások támogatására a farmakológia, mezőgazdaság és a humán génterápia

területein. Ez utóbbi felhasználása a legjellemzőbb, a humán génterápiához használatos protokollok nagy része virális géntovitelre alapul (Spirin et al. 2008).

Jaenisch és munkatársainak MLV-vel (murine leukemia virus) végzett úttörő kutatásai után (Jaenisch et al. 1975; Jaenisch 1976) körülbelül 30 évet kellett várni, hogy a vírus replikációban gátolt lentivírus vektorokkal végzett első sikeres transzgenézist 2002-ben elvégezzék.

A molekuláris biológusok transzgenézis esetén a vírusok azon képességeit használják ki, hogy a sejtbe való bejutáson túl integrálni tudnak DNS szekvenciákat a genomba. Jaenisch és munkatársai 1975-ben 4-8 sejtes egér embriókat fertőztek a retrovírusok családjába tartozó MLV-el, majd blasztociszta stádiumban beültették azokat álvemhes nőstények méhében. A vírus integrálódott néhány megszületett állat különböző szöveteibe (Jaenisch et al. 1975). Egy évvel később leírták, hogy a 8 sikeresen fertőzött egyedből két vonalat is létre tudtak hozni (Jaenisch 1976). Tehát a retrovírusokkal történő embriókori fertőzés segítségével endogén retrovírusokat hoztak létre mesterséges úton, igaz expressziót a megszületett F1 generációban nem tudtak kimutatni. Ugyanakkor észrevették, hogy a beágyazódás utáni fejlettségi stádiumban lévő embriók fertőzésekor géncsendesítés nem lépett fel (Jahner et al. 1982).

Az előzőekben említett géncsendesítés amiatt következett be, hogy a retrovirális LTR szekvenciák olyan gazda fehérjéket vonzanak, amelyek epigenetikai változásokat eredményeznek a beépült vírus szekvenciákon. A legfőbb módosítás, amely a géncsendesítéshez vezet a virális promóter szekvenciák metilációja. A magas arányú géncsendesítés persze megnehezíti a retrovírusok segítségével történő transzgenézist, főleg mivel nem csak egérre jellemző.

Miután bebizonyosodott, hogy retrovírusokat endogén (csírasejtben található provírus) vírussá lehet tenni a megfelelő időben történő alkalmazással, megkezdődött a vírusok génjeinek funkcionális boncolgatása. Ekkorra már azonosították azokat a géneket, amelyek a patogenitást, replikációt és a terjedést szolgálják. A lentivírus vektorok előállításakor a cél, hogy a vírus genomot helyettesítsék egy olyan szekvenciával, ami a fertőzött sejtekben majd expresszálódik. Az így létrehozott virális vektorok már jó eszközei a transzgenézisnek, hiszen nem célpontjai a géncsendesítési folyamatoknak, nem képesek a gazda sejtben vírussá szerelődni (SIN vektor), viszont egy vírus hatékonyságával fertőznek.

Elsőként 2002-ben rukkolt elő két kutatócsoport a SIN (self-inactivating) lentivírusok vektorok segítségével létrehozott transzgenikus embriókkal és állatokkal. Pfeifer és munkatársai bebizonyították, hogy lentivírusok segítségével lehetséges egér ES sejtekbe bejuttatni transzgeneket, amelyek a differenciálódás után is stabil expressziót mutatnak embrioid testecskében (EB) és teratomákban egyaránt (Pfeifer et al. 2002). Ráadásul a transzfektált ES

sejteket blaszocisztákba injektálták. A megszületett utódok között voltak ivarsejt kimérák. A kísérleteket morula állapotú embriók injektálásával folytatták, ez esetben is bebizonyosodott, hogy az általuk használt lentivírus vektor segítségével képesek transzgénikus állatokat létrehozni. A másik kutatócsoport egysejtes egér embriókat fertőzött lentivírus vektorral, amelyben egy konstitutív promóter irányítása alatt egy GFP fehérjét termelő gén volt a transzgén (Lois et al. 2002). A transzgenezis hatékonysága ugyan nem volt kiemelkedő (8%), viszont a hordozó állatok 90%-a stabil, magas expressziós szintet mutatott, ami fontos eredmény az addig géncsendesítéssel terhelt módszer esetén.

Az eredmények ezután sorra születtek más fajokban is, létrehoztak transzgénikus patkányt, sertést és szarvasmarhát. Mindegyik kísérletben nagy hatékonyságról számoltak be a kutatók. Egér esetén 68-73%, patkányban 22-46% volt a törzstől függően. Nagyobb állatok transzgenezisére is kiválóan alkalmas a módszer, sertésnél és szarvasmarhánál 70-93%-os hatékonyságot is elértek a kutatók. Ráadásul az embriók túlélése sokkal nagyobb a hagyományos előmagos injektáláshoz képest (Park 2007).

Tehát a lentivírusos technológia használata a 2000-es években elérte csúcspontját, bebizonyosodott, hogy különféle expressziós kazettákkal nagy hatékonysággal lehet előállítani lentivírus vektorok segítségével transzgénikus állatokat. Azonban a lentivírus vektoroknak sok hátránya is van – a géncsendesítésen kívül –, amit a kutatók már ekkoriban jól láttak. Az első ilyen jelenség a mozaicizmus. Mozaikosnak tekintünk egy transzgénikus állatot akkor, ha nem minden sejtje tartalmazza a genetikai módosítást. Vannak olyan transzgénikus technikák, elsősorban a célzott génmódosításhoz kötöttek, amikben a mozaicizmus elfogadott jelenség. Azonban a korai embrionális korban, egysejtesen manipulált embriók transzgenezisénél elvárás, hogy a transzgén még az első sejtosztódást megelőzően beépüljön a genomba, és azt az utód minden sejtjében hordozza, így az ivarsejtjeiben is. A lentivírusok beépülése egy hosszabb folyamat, ami magában foglalja a sejtbe és a sejtmagba való bejutást, a provírus létrejöttét, a preintegrációs komplex felépülését, és az integrációt magát. Érthető, ha ez a sokfaktoros folyamat elhúzódik a sejtosztódásig, főleg az olyan fajok esetében, ahol az első néhány sejtosztódás nagyon korán megtörténik (nyúl). Bár a vad típusú lentivírusok esetén akár 1-2 óra is elegendő lehet ehhez a folyamathoz, a transzgenezishez eleinte kialakított lentivírus vektoroknak 12-48 órára van szükségük az integrációhoz (Park et al. 2007). Mozaicizmus kialakulhat ezen kívül akkor is, ha az integrációs folyamat nem kezdődik meg egysejtes stádiumban. 2000-ben végzett kutatások vetették fel azt a gondolatot, hogy a preintegrációs komplex a beépülés megkezdéséhez akár több sejtciklus lezajlását is igényelheti (Park et al. 2000). Az egyre fejlettebb lentivírus vektorok természetesen csökkentik a mozaicizmus

jelenségét, mindazonáltal a transzgenezis ezen módszere még mindig sok mozaikos alapítót eredményez.

A következő probléma a vektor készítés során lép fel. Az összepakoló sejtvonalból származó vektorokat nagyon alapos tisztításnak kell alávetni annak érdekében, hogy megszabaduljunk a feleslegben termelődött vírus összetevőktől (főleg a köpenyfehérjétől), mivel ezek toxikusak lehetnek az embrió számára. Így előfordulhat, hogy az egyik tisztításból származó injektáló oldatot nagy sikerességgel tudjuk használni, viszont egy másik tisztításból származó injektáló oldat az embriókat elpusztítja. Hasonló probléma merülhet fel a dúsítás során is, hiszen a túl nagy titerű injektáló oldatok károsak az embriókra nézve.

A harmadik nagy problémakör az integrálódott kópiák számának kérdése. Elsőre úgy tűnhet, hogy jó, ha több kópiában épül be egy transzgén, hiszen annál erősebb és bizonyosabb expresszióra számíthatunk. Azonban a kópiaszám befolyásolhatatlansága, illetve a növekvő kópiaszámmal egyenesen arányos inszerciós mutagenézis valószínűsége hátulütői ennek a rendszernek is. Az egy-egy kópiában a genom különböző helyeire beépült transzgének az utód generációkban hasadnak, ami nem szerencsés egy stabil transzgénikus vonal kialakításánál. Előnyként mindenképpen meg kell említeni, hogy a lentivírusos transzgenezis esetén egy integrációs esemény egy transzgén kópia beépülését eredményezi, ami nagyon fontos előrelépés a plazmid alapú, általában tandem transzgén beépülésekhez képest.

Azt is számításba kell venni, hogy a lentivírus vektorok hordozó kapacitása körülbelül 5-7 kb. Ha ennél nagyobb transzgént szeretnénk a vektorba berakni, akkor logaritmikusan fog csökkenni a vírustiter. A vektor alapja 1,6-2,2 kb, míg a maximálisan hordozható transzgén nagysága HIV-1 alapú vektor esetében körülbelül 18 kb (Kumar et al. 2004). Azonban, ha transzgénikus állatok előállításáról van szó, akkor az általánosan elfogadott maximális hordozókapacitás nem több, mint 10 kb (Park 2007).

A lentivírus vektorokkal történő transzgenezis nagyon sok állatfajon lehetséges. Gazdasági haszonállataink közül lentivírus alapú transzgenezis segítségével létrehoztak már szarvasmarhát, sertést, csirkét, juhot (Robl et al. 2007). Főleg azon fajoknál van jelentősége, ahol a hagyományos mikroinjektálás nehézkes, mert az előmagok nehezen láthatók (sertés, juh). A laboratóriumi állatokon is széleskörűen és gyakran alkalmazott technológia, létezik többféle lentivírus vektorral előállított transzgénikus egér, patkány is. Főemlősök transzgenezisében kiemelkedő szerephez jutnak a lentivírus alapú technikák, eddig csak lentivírusos transzgenezis segítségével hoztak létre transzgénikus főemlősöket (Gogvadze and Buzdin 2009).

A transzgénikus állatok előállításában, sőt a humán génterápiában betöltött hatalmas szerepük ellenére még mindig vannak aggályok a lentivírus vektorok használata körül. Az világos, hogy sokkal nagyobb biológiai kockázatot jelentenek, mint az egyszerű DNS

konstrukciók. A napjainkban használatos SIN vektorok biztonságosnak mondhatók, de ezzel együtt is kettéstípusú biosafety anyagként kezelendők. Nagyon alacsony a valószínűsége a három vagy több plazmidon található gének rekombinációjának, így ezek a vektorok sem az azt használó kutatókra, sem az állatokra nem veszélyesek a megfelelő szabályok betartása mellett.

Összefoglalásként elmondható, hogy a lentivírusos transzgenezisnek a 2000-es években hatalmas szerep jutott, úgy tartották, hogy a transzgénikus technológiákat nagyban elősegítheti. A mai napig is fontos területét képezi a biotechnológiának ez a rész tudomány, főleg a humán génterápiában való alkalmazás nagyon elterjedt, azonban a transzgenezisben betöltött szerepe csökkenőben van. Tehát a lentivírusok alkalmazása a transzgenezisben valóban mérföldkőnek számít, azonban napjainkra az egyre fejlődő és biztonságosabbnak tekintett technológiák, mint a transzpozon vagy szekvencia specifikus nukleáz rendszerű módszerek egyre jobban terjednek a vírus alapúakhoz képest.



### 2.3 TRANSZPOZONOK

Az 1940-es években az az általános nézet volt elfogadott, hogy a DNS egy nagyon stabil molekula, szerkezete alig változó, a mutációk nagyon hosszú idő alatt dúsulnak fel benne. A tudósok akkoriban úgy gondolták, hogy a gének saját lokuszaikról nem tudnak elmozdulni.

Mára ugyan már jól ismert tény, többek között Barbara McClintock úttörő munkásságának köszönhetően, hogy léteznek mozgékony genetikai elemek, azonban az 1940-es években merész gondolat volt ezt kijelenteni. McClintock hosszú időn keresztül végezte citogenetikai kísérleteit kukoricaszem színeinek vizsgálatával kapcsolatosan. Munkásságának legfontosabb mérföldköve a crossingover és a kukorica első géntérképének leírása mellett, hogy elsőként (McClintock 1948) számolt be olyan mozgékony genetikai elemek létezéséről, amelyek a kukorica genom egyes részei között változtatják helyüket. Munkássága sajnálatosan az 1960-as évekig szkepticizmusba ütközött.

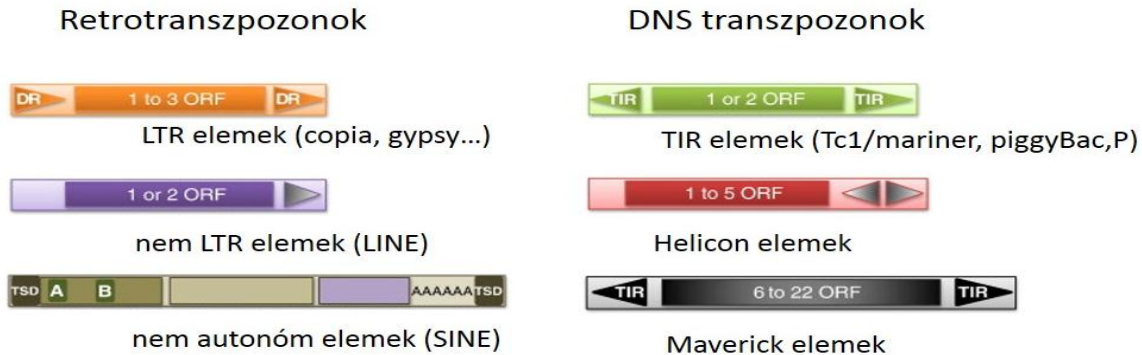
1969-ben aztán James Shapiro is leírt *E. coli*-ban (Shapiro 1969) egy olyan bakteriális eredetű DNS szekvenciát, amely képes a transzpozícióra, azaz a genomban való helyváltoztatásra. Az áttörés az 1970-es években következett be és ekkorra megszületett a mozgékony genetikai elemek egyszerű és mai napig is elfogadott definíciója, miszerint ezek olyan DNS szekvenciák, melyek helyváltoztatásra képesek a genomban. (Schaack et al. 2010). Így a hetvenes évek végére elfogadottá vált, hogy léteznek mozgékony genetikai elemek és állhatatos munkájának eredményeként Barbara McClintock 1983-ban osztatlan orvosi Nobel-díjat kapott ezek felfedezéséért.

McClintock és pályatársainak elgondolása világossá tette, hogy transzpozíció jelenségének segítségével akár hosszú DNS szakaszok képesek áthelyeződni és/vagy megduplázódni a genom egyes részei vagy akár genomok között (transzpozíció). A mozgó genetikai elemek természetesen nem csak kukoricában és *E. coli*-ban, hanem más organizmusokban, így magasabb rendű eukariótákban is léteznek, sőt gyakran döntő hányadát képezik ezeknek a genomoknak.

Barbara McClintock színes kukoricaszemeitől hosszú út vezetett napjainkig, mikor különböző mozgékony genetikai elemek segítségével transzgenikus állatokat tudunk létrehozni, vagy a transzpozíció jelenségét a humán génterápiában használni. Természetesen ezen jelenség felhasználása nem jelenti azt, hogy mindent tudunk a mozgékony genetikai elemekről, ahhoz viszont elegendő tudás van a birtokunkban, hogy segítségükkel egyre gyorsabban és hatékonyabban legyünk képesek transzgenikus állatok előállítására. Kétségtelen tény, hogy emlősállatokon a transzpozon alapú módszerek napjaink legfejlettebb és mindezidáig

legeredményesebb technikái. Használatuk mérföldkövet jelent a transzgenézis világában, ahogy McClintock felfedezése is az 1940-es években.

A transzpozonokat alapvetően két nagy családba soroljuk (6. ábra).



6. ábra: A transzpozonok fajtái. Közös jellemzőjük, hogy mindkét oldalról, változó hosszúságú, fordítottan ismétlődő szekvenciák veszik őket körül, melyeknek fontos szerep jut a transzpozíció folyamán, de gyakorlati hasznosságuk sem elhanyagolandó, hiszen genetikai markerként használhatók. Ami a két nagy csoportot megkülönbözteti, az az, hogy míg a retrotranszpozonok másolódnak és halmozódnak, addig a DNS transzpozonok leggyakrabban csak áthelyeződnek a gazda genomban. (Feschotte, Jiang et al. 2002 nyomán).

A transzpozonok első osztályába (class I) azok az elemek tartoznak, melyek RNS intermedieren keresztül halmozódnak a genomban, ezeket retroelemeknek nevezzük és az emlős genomok jelentős részét alkotják. A második (class II) osztály tagjai – a DNS transzpozonok – ezzel szemben áthelyeződnek, így sokkal kisebb a részarányuk a különböző genomokban (Gogvadze and Buzdin 2009). Mindkét transzpozon családnak vannak autonóm és nem autonóm tagjai. Az autonóm elemek tartalmaznak olyan ORF-eket (nyílt leolvasási keret), melyekben a transzpozíciójukhoz szükséges fehérjék génjei helyezkednek el. A nem autonóm elemeknek nincs jelentős méretű kódoló szekvenciájuk, csak a transzpozícióhoz elengedhetetlen szekvenciákat hordozzák (Feschotte et al. 2002), ilyen például az LTR szekvencia. Fontos jellemző még a transzpozonok csoportosításában, hogy a transzpozíciójuk során milyen célszekvenciát találnak meg.

### 2.3.1. I. osztály: retrotranszpozonok

Tehát az első család, a retrotranszpozonok jellemzője, hogy egy RNS intermedieren keresztül, reverz transzkripció használatával másolják magukat, majd az így létrejött cDNS formájában integrálódnak a gazda genomba, így kópia számuk egyre növekszik. Ez az úgynevezett copy & paste metódus, minden teljes replikációs ciklus egy új kópiát eredményez a gazda genomban, amivel annak méretét is növeli egyben. A retrotranszpozonokat további két csoportba osztjuk aszerint, hogy tartalmaznak-e Long Terminal Repeat-et (LTR) (hosszú ismétlődő végszekvenciák).

Az **LTR retrotranszpozonok** inkább a növényekben fordulnak elő, néhány száz bázispártól akár 25 kb-ig terjed méretük, integrációjuk során egy 4-6 bp-os célszekvenciát dupláznak meg. Az LTR-ek egy irányba mutatnak és méretük akár 5 kb is lehet (Wicker et al. 2007). Az autonóm LTR elemek két gént kódolnak: egyrészt a *gag* cisztront, ami a kapszid-szerű fehérjét kódolja, másrészt a *pol* gént. A *pol* gén egy olyan poliproteint kódol, aminek van proteáz, reverz transzkriptáz, RNáz H és integráz aktivitása is. A család nem autonóm elemei akár a teljes kódoló szekvenciát is nélkülözhetik (Feschotte et al. 2002).

A retrovírusok és az LTR retrotranszpozonok evolúciósan nagyon közel állnak egymáshoz. Az LTR transzpozonok képesek vírusként működni, ha megszerzik az env (envelope protein) gént és egy sor másik fehérje génjét, valamint szabályozó szekvenciákat. Ugyanígy egy retrovírus is képes retrotranszpozonná alakulni, hogyha elveszíti az extracelluláris mozgáshoz szükséges, előbb felsorolt fehérjéket. Ekkor már csak vertikális transzmisszióval, ivari úton terjedhet tovább. Az így kialakuló endogén retrovírusok beilleszthetők a retrotranszpozonok I. osztályába, azon belül is az LTR retrotranszpozonok csoportjába (Wicker et al. 2007).

Az **LTR-t nem tartalmazó** retrotranszpozonokat is tudjuk osztályozni, úgynevezett LINE (long interspersed nuclear elements) és SINE (short interspersed nuclear elements) elemekre.

A LINE elemek 5 kilobázisnál hosszabb szekvenciák, és az emlős genomokban általában  $10^4$  kópiánál többször fordulnak elő (Berg and Howe 1989). Az ide tartozó elemek 5 szupercsaládba tartoznak, reverz transzkriptázon kívül kódolhatnak különböző endonukleázokat és RNáz-H-t is (Wicker et al. 2007). A LINE elemek közül az L1 elemek ma is működő transzpozonjai a humán genomnak (Gogvadze and Buzdin 2009).

Itt kell még megemlíteni, hogy humán gének általában legalább 1-10 pszeudogénje létezik. Jellegüket tekintve ezek a gének nem tartalmaznak intronokat, promótert, van poly(A) végük és rövid direkt ismétlődések határolják őket. Feltételezhető, hogy ezek a pszeudogének, olyan cDNS-ek beépülései a gazdagenomba, amit LINE elemek reverz transzkriptáz enzime hozott létre, a gazda transzkriptumaiból (Esnault et al. 2000).

Az LTR-t nem tartalmazó retrotranszpozonok másik csoportjába sorolt SINE elemek, általában nem hosszabbak, mint 500 bp és nem autonómak, körülbelül  $10^5$  kópiában fordulnak elő genomként (Berg and Howe 1989). Autonómiájuk elvesztése nem delécio következménye, hanem valószínűleg a polimeráz III transzkriptumának véletlen retrotranszpozíciójával történt meg (Wicker et al. 2007). Saját szekvenciájukban nem kódolnak fehérjéket, így a terjedésükhöz szükséges enzimeket sem. Transzpozíciójukhoz egy olyan reverz transzkriptázt használnak, amelyet egy másik transzpozoncsalád - rendszerint az előzőekben említett LINE elemek - kódolnak (Eickbush 1992). Ezt az is bizonyítja, hogy a SINE elemek hosszú 3' vége nagy

hasonlóságot mutat az ugyanabban a gazda genomban megtalálható LINE elemek 3' végével (Feschotte et al. 2002). A humán genom 10%-át alkotó ún. Alu elemek is ennek a családnak a tagjai, amik akár 500000 kópiában is előfordulnak, így a leggyakoribb repetitív szekvenciái a humán genomnak (Gogvadze and Buzdin 2009).

A retrotranszpozonokat nem használjuk transzgénikus állatok létrehozására.

### 2.3.2. II.osztály: DNS-transzpozonok

A transzpozonok másik – és jelen vizsgálódás szempontjából fontosabb – második (class II) csoportjába a **DNS transzpozonok** tartoznak. Legfontosabb jellemzőjük, ami megkülönbözteti őket a retrotranszpozonoktól, hogy DNS intermediéren keresztül terjednek, így nincs szükségük reverz transzkripcióra, nem másolják magukat és ennek megfelelően nem is árasztják el olyan mértékben a genomot, mint a retrotranszpozonok.

A DNS transzpozonokat két nagy csoportba, alosztályba (subclass 1,2) sorolhatjuk a működési mechanizmusuk alapján. Az első alosztályba sorolható elemek duplaszálú DNS formájában vágódnak ki a gazda genomból, majd épülnek be újra. Ezen elemek mozgása a cut & paste mechanizmuson alapszik (Berg and Howe 1989).

A másik alosztályba tartoznak a *Helitronok*, amelyek a rolling-circle replikációt használják terjedésükhöz, illetve a *Maverickek*. Az utóbbi két családba tartozó elemek, DNS intermediéren keresztül szaporodnak és másolják magukat (copy & paste), ám ezeknek pontos működési mechanizmusa még nem ismert (Feschotte et al. 2007).

A DNS transzpozonokat a TIR (terminal inverted repeat) szekvenciájuk hossza alapján csoportosíthatjuk. Különböző célszekvenciákat részesítenek előnyben transzpozíciójuk során, ami meg is duplázódik (TSD- target site duplication) az integráció alatt.

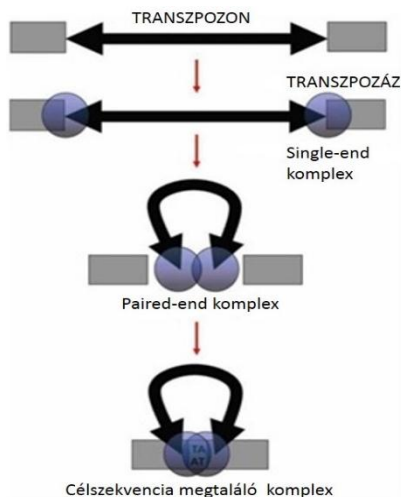
A DNS-transzpozonok is sokasodhatnak a genomban úgy, ha a kromoszóma replikáció alatt történik a transzpozíciójuk és a transzpozíció egy már replikálódott szakaszcson egy még nem replikálódott szakaszcson történik (Wicker et al. 2007). Így ezek a genetikai elemek is képesek a genomban jelentős mértékben felszaporodni (Craig et al. 2001).

#### 2.3.2.1. Tc1/mariner szupercsalád

A két leginkább kutatott tagjáról nevet kapott Tc1/marinerszupercsalád, a DNS transzpozonok első alosztályába tartozik. Amikor 1983-ban David Hirsch és Scott Emmons felfedezte a Tc1 mobilis elem repetitív szekvenciáját *C. elegans*-ban, (Emmons et al. 1983) még nem tudhatták, hogy az élővilágban legszélesebb körben előforduló szupercsoportját azonosították a transzpozonoknak. Ezen szupercsalád tagjai megtalálhatók a növényekben, baktériumokban, fellelhetjük őket az állatok legtöbb taxonjában, így a kerekesszárnyúakban, halakban és emlősökben is (García-Pérez et al. 2010). Igaz, a gerincesekben történő felfedezésük

egészen 1994-ig váratott magára (Radice et al. 1994). Elterjedtségük ellenére mindössze 10 olyan elemet ismerünk, amelyek napjainkban is aktívak és nem tartalmaznak inaktiváló mutációkat. Továbbá létezik 4 tagja (egy közülük a Sleeping Beauty) a szuper családnak, amit inaktív elemekből molekuláris módszerekkel rekonstruáltak.

A szuper család tagjai a 17-1100 bp hosszú TIR szekvenciákon belül egy darab ORF-et tartalmaznak. Ez a gén egy 282-345 aminosav nagyságú fehérjét kódol. Így ezek a transzpozázok általában 1300-2400 nukleotid hosszúak. A szuper családba tartozó transzpozozoknak három doménjük van: DNS-kötő domén (HTH), egy nukleusz lokalizációs szignál (NLS), és a katalitikus domén (García-Pérez et al. 2010). Általánosságban elmondható, hogy bár közös őssel rendelkeznek, a szuper családnak vannak egészen egyszerű tagjai, amikben a transzpozáz génje csak egy DNS-kötő doménnel rendelkező TIR-el van körülvéve. Ugyanakkor léteznek bonyolultabb felépítésű tagok, amik több kötőhelyet tartalmaznak a TIR szekvenciákban, így összetettebb a transzpozíciójuk (Plasterk et al. 1999).



7. ábra: A DNS transzpozozonok működése (García-Pérez 2010 nyomán)

A transzpozíció a nem másolódó DNS transzpozozonok esetén a következőképpen zajlik (7. ábra). A TIR szekvenciákat két transzpozáz molekula specifikusan felismeri és megköti (SEC, single end complex). Ezután mindkét transzpozáz hasítja a DNS-t és kivágja azt a genomból. A két transzpozáz molekula egymáshoz kapcsolódva egy dimert alkot (PAC, paired end complex). Az összekapcsolódott transzpozázok – a genomból származó transzpozozon szekvenciával együtt – megtalálják a célszekvenciát (TA dinukleotid). Mivel a *Tc1/mariner* szuper család esetében a célszekvencia mindössze egy TA dinukleotid, így a beépülés gyakorlatilag random helyre történik a genomban (García-Pérez 2010). A DNS szakaszt aztán a célszekvencia egyszálú hasításával és a kivágott szakasz beillesztésével áthelyezi, majd a gazda repair mechanizmusa a keletkezett rést feltölti. A transzpozícióhoz hozzá tartozik a célszekvencia kettőződése (TSD, target site duplication), ami a szintén gazda repair mechanizmus működésének következménye, ez a duplázódás a transzpozozon kivágódása után a gazda genomjában maradhat (footprint) (Claeys et al. 2013).

Mivel transzgenézishez az olyan DNS transzpozozonok használatosak, melyek a klasszikus cut & paste mechanizmussal működnek és szerencsés, ha több gazda genomban is képesek a működésre, így a *Tc1/mariner* szuper család elemei jó jelöltjei a transzgenézis katalizálásának.

### 2.3.3. *Transzpozonok, transzpozíció, evolúció*

Tehát a transzpozonok a prokariótákban és az eukariótákban egyaránt jelenlévő mozgékony genetikai elemek. Olyan (néhány száz bázispártól akár tízezer bázispárig terjedő) DNS szakaszok, melyeket ismétlődő szekvenciák határolnak, és megvan az a képességük, hogy a genom egy lókuszaról egy másikra „ugorjanak”. Erre a transzpozíciós eseményre általában az előbb látott két folyamatot használják, copy & paste metódussal általában a retrotranszpozonok, míg a cut & paste típusú transzpozícióval jellemzően a DNS-transzpozonok mozognak a genomokban.

A transzpozonok meglepően nagy részét alkotják mind a növény, mind az állati genomoknak. Talán az egyik legmegdöbbentőbb adat, hogy az árpa körülbelül 5000 Mb-snyi genomjának 98%-át teszik ki transzpozon alapú szekvenciák. A humán genom 45%-át transzpozonok és hozzájuk hasonló ismétlődő elemek képezik, igaz ezeknek csak elenyésző hányada (<0,05%) aktív (Cordaux and Batzer 2009). Az emberi genomban körülbelül 30-40 transzpozon alcsalád maradt aktívan mobilis az evolúció során. Ezek azért jelentősek, mert a mai napig okoznak 10-100 születésenként egy-egy új integrációt, ezzel hozva létre új betegségeket vagy géninterakciókat (Mills et al. 2007).

Sokáig ezeket a szekvenciákat csak "szemét" DNS-ként tartották számon, ma már tudjuk, hogy ezek a mobilis genetikai elemek fontos részét képezik a genomnak. Megváltoztatják a gének szerkezetét, hatnak azok működésére, a szekvenciák újrakeverésével ektopikus átszerveződéseket és különböző génexpressziós mintázatokat alakítanak ki (O'Donnell and Burns 2010). Képességük, hogy a genomban inverziókat, deléciókat, transzlokációkat és addíciókat idézzenek elő, bizonyítja, hogy ezen mobilis elemek jól kidolgozott genetikai mérnökei a természetnek (Craig et al. 2001). Jellegzetességeikből adódóan az evolúciós szerepük hatalmas, tevékenységükkel hozzájárulnak a gazda szervezetek stresszhez való alkalmazkodásához, ellenállóképességek megjelenését okozhatják, a genetikai diverzitást növelhetik (Chénais et al. 2012). Így a transzpozonok valószínűleg az egyik fő mozgatórugói az evolúciónak (Claeys Bouuaert et al. 2013).

Vannak olyan elképzelések, miszerint a transzpozonok mobilizációját valamiféle környezeti stressz okozza, amikor is a mobilis genetikai elemek transzpozíciója elindul. Az így létrejött új változások, fenotípusok a gazda genomjában elősegíthetik a stresszhez való alkalmazkodást és ezen keresztül a gazda és egyúttal a transzpozon fennmaradását is (Levin and Moran 2011). Léteznek olyan példák is, mikor a stresszre megváltozik a mobilis elem célszekvenciája. Az élesztőben megtalálható Ty5 retrotranszpozon azon doménje, mely a célszekvenciát meghatározza együttműködésben áll egy Sir4 elnevezésű heterokromatin

fehérjével. Ha az élesztő hóján van az aminosavaknak, vagy nitrogénszegény környezetben kerül, úgy – a stresszre adott válaszként – a Sir4 foszforilációja csökken. A foszforiláció csökkenésének következtében az addig a gén-szegény heterokromatinba történő beépüléseket előnyben részesítő transzpozon célszekvenciája megváltozik és a genom egészébe képes integrálódni, így a génekbe is. Az ez által okozott mutációk a gazdát segíthetik a stresszhez való alkalmazkodásban (Dai et al. 2007).

A másik oldalról viszont, negatív hatásokkal is rendelkeznek, hiszen terjedésükkel géneket tehetnek tönkre, vagy a gazdának hátrányokat okozhatnak a természetes szelekció során. Persze ezáltal a saját túlélésüket nehezítik meg, hiszen a gazda számára veszélyeket hozó, betegségeket okozó beépülések miatt a gazda kiszelektálódik. Ezért transzpozonok evolúciójuk során különféle célzó mechanizmusokat fejlesztettek ki, hogy integrációjuk biztonságos helyre (nem kódoló, nem szabályozó régió) történjen, ezáltal csökkentve a gazdában okozott kárt.

Úgyszintén a gazda is rendelkezik különböző védekező mechanizmusokkal, amit jól tud hasznosítani a transzpozonok káros integrációi ellen. Ilyen mechanizmus a citozin metiláció, ami az 500 Mb-nál nagyobb eukarióta genomokra jellemző. Sok adat utal arra, hogy a DNS metiláció szabályozza a transzpozíciót. Emlősöknél a legtöbb ilyen metiláció a repetitív szekvenciákra jellemző és összefüggésben áll a retrotranszpozonok transzkripciójának elnyomásával (Levin and Moran 2011). A DNS citozin-5-metiltransferáz 3-szerű gén (Dnmt3l) a nem osztódó spermatozónium őssejtek prekurzoraiban expresszálódik perinatálisan, amikor retrotranszpozonok keresztülmennek a *de novo* metiláción. Ennek a génnek a mutációja megakadályozza a retrotranszpozonok *de novo* metilációját, így azok transzkripciója magas lesz a spermatozóniumokban és spermacitákban (Bourc'his and Bestor 2004). Ez – eddig tisztázatlan módon – az ivarsejtek meiózisének károsodásához vezet (Levin and Moran 2011), így a nagyszámú transzpozíciós esemény és új beépülés nem öröklődik.

De ha látogatást teszünk a növényekhez, ott is láthatjuk a transzpozonok elleni védekezés példáit. Lúdfűben (*Arabidopsis thaliana*) végzett kutatások igazolják, hogy a különböző metilációban szerepet játszó génekben bekövetkező mutációk miatt csökkent citozin metilációt mutató genotípusokban megemelkedik a transzpozon kópiák száma (Levin and Moran 2011). A magyarázat ugyanaz, mint az előzőekben, tudniillik a repetitív szekvenciák és a transzpozonok csökkent metilációja emeli a transzpozonok transzkripciójának valószínűségét. Ebben az esetben nem csak a retrotranszpozonok esetén mutatták ki a fokozott transzpozíciót, hanem a DNS-transzpozonok közé sorolt Mutator család egy tagja (VANDAL21) is érintett volt (Tsukahara et al. 2009). A felsoroltak alapján elmondható, hogy az epigenetikai változások nagyban befolyásolják sok transzpozon mobilitását.

Az epigenetikus változtatásokon kívül poszt-transzkripció mechanizmusok is léteznek a transzpozonok gátlására. Alacsonyabb rendű élőlényekben siRNS útvonaljellemző a transzpozíciós események gátlására. A transzpozonok szekvenciáiról íródó RNS transzkriptumokból a Dicer család fehérjéi endogén siRNS-eket készítenek. Aztán ezek a 21-24 nukleotid (nt) hosszú, egyszálú kisRNS-ek beépülnek az Argonauta fehérjébe, ami az így létrejövő RNS-indukált csendesítő komplex (RISC) egyik fő alkotója. Az Argonauta fehérjében található kisRNS segítségével a RISC megcélozza a komplementer mRNS-t, kapcsolódik ahhoz, ami végső soron a transzpozon mRNS lebomlásához vezet (Levin and Moran 2011). Tehát az RNS interferencia jelensége a transzkripció után is képes a transzpozonok szabályozására.

Hasonló mechanizmus játszódhat le a piRNS-ek útvonalán is például gyümölcsleányban. A piRNS-ek (PIWI-interacting RNS) is kisRNS-ek, 24-35 nt hosszúak, a genomban kódolt klaszterekről íródnak. Ezek a klaszterek gyakran tartalmaznak olyan szensz és antiszensz szekvenciákat, amelyek transzpozonokból származnak (Aravin et al. 2007). Az ezekről a lókuszokról származó piRNS-ek érésük után egy specializált Argonautával, a PIWI fehérjével (Aub) működnek együtt. A piRNS által irányított PIWI megtalálja és megköti a komplementer, transzpozon mRNS-t, majd lebontja a megcélzott mRNS szekvenciát, ezáltal gátolva meg a transzpozon működését. Az endonukleáz aktivitás ráadásul létrehoz egy, a transzpozon mRNS-éről származó másodlagos kisRNS darabot is, ami beépül egy Argonautába (AGO3) és a piRNS prekursor mRNS-ek vágásával újabb piRNS-ek érését eredményezi (ping-pong) (Aravin et al. 2007). Indirekt bizonyíték a rendszer működőképességére, hogy a PIWI fehérjékben bekövetkező mutációk emelik a retrotranszpozonok expresszióját (Aravin, Hannon et al. 2007). A folyamatban részt vevő fő fehérjék, a PIWI (Aub) és az AGO3 elsősorban ivari szövetekben expresszál. Bár a legtöbb ehhez a témához kapcsolódó cikk gyümölcsleánnyal foglalkozik, ezen fehérjék ortológjai egérben, patkányban és emberben is megtalálhatók.

Persze többféle stratégia létezik a transzpozíciós események gyakoriságának csökkentésére. Ilyen például a *Tc1/mariner* szupercsalád esetén megfigyelt OPI (overproduction inhibition), ebben az esetben, ha túl sok transzpozáz van jelen, az csökkenti a transzpozíció valószínűségét.

Látható tehát, hogy a transzpozon és a gazda genom közötti kényes viszonyt, mind a transzpozonban magában, mind a gazda genomban kódolt információk együttesen egyensúlyozzák. Végső soron viszont a transzpozíció, mind a gazda, mind a transzpozon számára veszélyes folyamat.

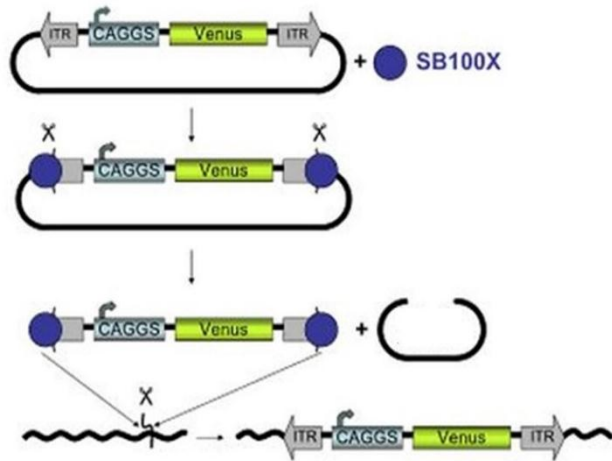


### 2.3.4. *Transzpozon alapú transzgenezis*

A mikroinjektálásról, mint a transzgenezis legáltalánosabb eszközéről és annak hátrányairól már esett szó. Két fő hátlütőjét azonban újra feleleveníteném, ezek az alacsony hatékonyság és a kópiaszám befolyásolhatatlansága. A mikroinjektálás hatékonysága egér esetében 5-10%, a megszületett utódok közt lévő transzgénikus egyedek számát tekintve. Ugyanez az arány nyúl esetében sokkal alacsonyabb, 1-6%-ra tehető. Nyilvánvaló, hogy ez az alacsony hatékonyság a transzgenezist időigényessé és költségessé teszi. Az is fontos hátrány, hogy az így létrehozott transzgénikus állatok kópiaszám tekintetében nagyon eltérőek lehetnek. Az injektált DNS méretétől és koncentrációjától függően alakuló kópiaszám alkalmasint elérheti a több ezret is, bár jellemzően inkább 5-10 alatt van (Hogan et al. 1986). A mikroinjektálás alap technikája, hogy lineáris DNS fragmentet juttat az előmagba, ami ezután passzívan épül be a kromoszómákba, egy kettős DNS törés (double strand brake, DSB) helyén. Ezek a DSB-ek különböző külső fizikai vagy kémiai mutagének hatásaként (UV sugárzás, oxigén szabadgyökök, stb.) jönnek létre, és helyük a genomban nem befolyásolható. A kettős szálú DNS törések a sejt saját javító mechanizmusát beindítják, ami véletlen hibaként az injektált transzgén DNS fragmentet is beépíti a helyreállított kromoszómába (Garrels et al. 2012). A transzgén véletlenszerű beépülési folyamatának természete még nem tisztázott (Cordaux and Batzer 2009). Ez a beépülés egy passzív természetű folyamat. Ilyenkor jöhetnek létre a konkatamer beépülések, amelyek több transzgén fragment összetapadása és beépülése következtében alakulnak ki és a transzgenezis szempontjából rendkívül hátrányosak.

Az utóbbi években a transzgén integráció folyamatának reformja folyik. Napjainkban sok aktív beépülésű rendszert hoztak létre kutatók, az egyik ilyen (a virális mellett) a transzpozonokon alapuló rendszer. A Tc1/*mariner* családból néhány transzpozont rekonstruáltak az aktív transzgenezishez való használathoz (Sleeping Beauty, Frog Prince, HSMAR1). Illetve van néhány, mai napig mozgó transzpozon (Tol2, piggyBac), amit szintén alkalmaznak a transzgenezis során (Garrels et al. 2012). Ezek mindegyike nagyban növeli a transzgenezis hatékonyságát, ami az elsődleges elvárás ezekkel a transzpozon rendszerekkel szemben.

Általánosságban az mondható el, hogy ezek a transzpozon rendszerek két komponensből állnak, egyrészt egy nem autonóm DNS transzpozonból, ami tartalmazza a transzgént, az ITR-ekkel körülvéve, másrészt a transzpozázból. A transzpozázt kétféleképpen lehet a rendszerhez adni, megjelenhet plazmidon,



8. ábra: A Sleeping Beauty transzpozon rendszer. A rendszer tartalmaz egy transzgént hordozó plazmidot és a transzpozáz (kék kör)(Garrels et al. 2012).

vagy mRNS, esetleg fehérje formájában. A rendszer úgy működik (8. ábra), hogy a sejt által létrehozott transzpozáz kiemeli a plazmidból a transzgént, az azt körülvevő ITR szekvenciáknál fogva. Majd a célszekvencia megtalálása és hasítása után a transzpozáz a transzgént a genomba illeszti. A célszekvencia változó lehet, piggyBac esetében TTAA, a Tc1/mariner család tagjainak TA, míg a Tol2 transzpozáznak nincs preferált beépülési helye. Egy ilyen integrációs esemény egy kópiát visz be, a konkatamer képzés így elkerülhető. Ráadásul a transzpozon rendszerek segítségével eddig nem is remélt hatékonyságot lehet elérni, nemcsak laboratóriumi állatokon, hanem nagyállatokon is.

A kópiaszám féken tartása és a hatékonyság növelése mellett a transzpozon rendszerek azzal az előnnyel is bírnak, hogy sok fajon alkalmazhatók. Japán kutatók 2000-ben transzgenikus zebrahalat (*Danio rerio*) hoztak létre Tol2 transzpozáz rendszer segítségével, a Tol2 transzpozont a medaka (*Oryzias latipes*) fajból azonosították, és mRNS formájában koinjektálták. Ugyanez a transzpozon transzgenikus karmosbéka (*Xenopus tropicalis*) előállítására is használható. A Sleeping Beauty transzpozon rendszernek szintén az az egyik nagy előnye, hogy sok fajban alkalmazható, így a biológiai modellállatokon is (pl. karmosbéka, zebrahal, egér, patkány).

#### 2.3.4.1. Sleeping Beauty Transzpozon Rendszer

1997-ben magyar kutatók rekonstruálták a Sleeping Beauty (SB) transzpozont a molekuláris genetika módszereivel (Ivics et al. 1997). A SB egy szintetikus mobilis elem, amit 8 lazac faj genomjában talált 12 transzpozon szekvenciákból rekonstruáltak PCR mutagenézis segítségével. Miután a SB-ről bebizonyosodott, hogy jól lehet használni különböző sejttenyészetek vagy állatok transzgenéziséhez, a kutatók szerettek volna létrehozni egy jobban működő, még nagyobb hatékonyságú transzpozázt. Ezért vizsgálták különböző Tc1 transzpozázok szekvenciáját, keresve azokat a régiókat, amik konzerváltak. A filogenetikai összehasonlítás után helyspecifikus PCR mutagenézis segítségével létrehoztak hiperaktív

transzpozázokat (Geurts et al. 2003). Közülük a legsikeresebbnek talált SB100X elnevezésű transzpozáz, az eredetnél százszor hatékonyabb (Mátés et al. 2009), amely az amúgy rosszul transzfektálható HeLa sejteken 35-50%-os hatékonysággal működik. Egér esetében a transzgenezis hatékonyságát akár 40%-osra is emelheti (Mátés et al. 2009; Carlson et al. 2011).

A SB transzpozáz kötő helyei egy körülbelül 230 bp hosszú ismétlődő szekvenciában találhatóak (IRDR) a transzpozon szekvencia mindkét végén (Izsvák et al. 2000). Ezek az IRDR szekvenciák tartalmazzák a két 32 bp hosszúságú transzpozáz kötőhelyet (Cui et al. 2002).

A Sleeping Beauty transzpozáz célszekvenciája mindössze egy TA dinukleotid, ami a transzpozíció után megkettőződik. Mikor a SB mobilizálódik egy néhány bázispár hosszú lenyomatot hagy maga után (TAC(A/T)G) (Liu et al. 2004). Ez a célszekvencia az egér genomában körülbelül 200 milliószor van jelen, így az integrációs események akár a genom 10%-ába lehetségesek (Geurts et al. 2006), azaz randomnak tekinthetők.

Ez a transzpozon alapú technológia hatékonynak bizonyult már például egér, patkány, sertés, birka esetében (Eickbush 1992; Esnault et al. 2000; Katter et al. 2013, Geurts et al. 2012). Nagyon sok kutatás folyik olyan humán sejtvonalakon (Chénais et al. 2012), amiken ezzel a technológiával végeztek valamilyen genetikai módosítást, továbbá génterápiás kísérletekben is gyakorta használt eszköz (Levin and Moran 2011). Bár a Sleeping Beauty transzpozon rendszert az állatfajok széles körén kipróbálták már, transzgénikus nyúl vonalat mindeztáig nem közöltek.

A Sleeping Beauty transzpozon az előbb felsoroltak közül kétségkívül mára az egyik legsikeresebben alkalmazott transzpozon rendszer emlősökben.



### 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

#### 3.1. PLAZMID VEKTOROK KEZELÉSE

A transzgenezishez kapott plazmidokat minden esetben felszaporítás céljából újra transzformáltuk a következőképpen: 5-6 ng plazmid DNS-t óvatosan az előzőleg jégén felolvasztott kompetens DH-5 $\alpha$  *E. coli* (Invitrogene) sejtekhez adtuk. Jégben hagytuk fél órán át, majd 45 másodpercig 42°C-os vízfürdőben hősokkoltuk. Újabb két percig jégre tettük, majd 1 ml LB tápoldatban (Sambrook 2001) 37°C-os termosztátban rázattuk. Egy óra elteltével 50-200  $\mu$ l-t antibiotikum szelektív LB táptalajra szélesztettük, ezt 37°C-on inkubáltuk egy éjszakán át. A kinőtt telepeket leoltottuk antibiotikumot is tartalmazó folyékony LB tápoldatba és overnight inkubáltuk 37°C-on. A felszaporított plazmidokat Qiagen plazmid izoláló kit (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) segítségével, a gyártó utasításainak megfelelően kitisztítottuk, majd restriktációs enzimek és gélelektroforézis segítségével ellenőriztük.

Kísérleteinkhez a fragment méretétől függően 0,5-2%-os agaróz (Sigma) gélt használtunk, etídium-bromiddal kiegészítve. Molekulamarkerként 1 kb-os DNS létrát alkalmaztunk. (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas). A gélelektroforézist 1x TAE (40 mM Tris-acetát, 1 mM EDTA) oldatban végeztük.

#### 3.2. AZ INJEKTÁLÓ OLDATOK ELŐÁLLÍTÁSA

##### 3.2.1. Lentivírus

A lentivírusos kísérletekhez használt SIV-CAG-GFP-WPRE-SIN-LTR plazmidot Didier Nègre és Francois-Loïc Cosset bocsájtotta rendelkezésünkre. A lentivírusos konstrukciók összeszerelése külön szakértelmet és felszereltséget igényel. Ezeket a konstrukciókat a Pécsi Tudományegyetem Immunológiai és Biotechnológiai Intézetében Kvell Krisztián és Czömpöly Tamás készítette el számunkra (Gogvadze and Buzdin 2009).

A transzgénikus vonal létrehozásához egy SIN konstrukciót használtunk, amit egy második generációs összehajló sejt vonal segítségével hoztunk létre (Nègre et al. 2002). A SIV alapú vektorban a mesterséges CAG promóter található, amely egy csirke béta-aktin promóterből és egy CMV enhancerből állt, továbbá a megfelelő eukarióta génexpresszióhoz szükséges elemként tartalmaz egy nyúl béta globin intront. A vektor transzgénként a GFP riportergén szekvenciáját hordozza. Helyet kapott még a vektorban egy szabályozó elem, amely a WHP (mormota hepatitisz vírus) posztranszkripció szabályozó eleme (WPRE). A WPRE egy 80 bp-os szekvencia, amely a transzkripció után kialakít egy harmadlagos szerkezetet, ezáltal segíti elő a megfelelő szintű expressziót. A vírusvektor 3' LTR-jének U3 régiójában található deléciónak

a virális enhancerek és promóter nem működik, így a beépült vektorról nem jöhetnek létre szaporodóképes vírusok (SIN). További szabályozó elem a vektor 3' nem translálódó régiójában elhelyezkedő cPPT (polypurine track) a transzkripció inicializációjához szükséges primer szekvenciaként működik. Ráadásul a virális elemek transzkripcionális inaktivációja megkönnyíti a transzgén kifejeződését, hiszen a cis-acting elemek nem aktívak (Hiroyuki et al. 1998).

A lentivírus vektorok összeszerelése úgy történik, hogy a transzgenézishez szükséges géneket (integráz, reverz transzkriptáz), a vírus sejtmagba jutásához szükséges köpenyfehérjét (vesicular stomatitis virus G glycoprotein) és a bevinni kívánt transzgént (GFP) külön plazmidokon, erős promóterek szabályozása mellett kotranszfectálnak egy, a vírus összeszerelésre alkalmas sejt vonalba (jelen esetben: HELA 293T). A GFP-t expresszáló sejtek felülűszoját ezután ultracentrifugálással elválasztották. Az elkészült lentivírus vektorokat tartalmazó fázist  $-70^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a mikroinjektálásig. A kész konstrukcióval transzformáltak egy sejt vonalat és FACS segítségével meghatározták a transzformáns sejtek számát, amelyből a vírustiterre lehet következtetni.

### 3.2.2. *Sleeping Beauty*

A Sleeping Beauty transzpozon mediálta transzgenézishez használt pC-Globin2-SB100x és pT2/Venus plazmidokat Izsvák Zsuzsanna berlini csoportjától kaptuk.

400  $\mu\text{l}$  steril desztillált vízben felvett plazmid DNS-hez 1,5 ml-es Eppendorf csőben 400  $\mu\text{l}$  fenol/kloroform oldatot (1:1, Sigma) adtunk. 15 másodperc rázatás után két percig hagytuk pihenni, majd kétszer megismételtük ezt a műveletet (a fennmaradó RNáz inaktiválása céljából). 5 percig centrifugáltuk 13000 rpm sebességgel. A centrifugálás után a felső fázist egy új csőbe pipettáztuk, majd 400  $\mu\text{l}$  kloroformot adtunk hozzá, amivel 15 másodpercig vortexeltük, majd újabb 5 perc centrifuga után a felső fázist ismét új csőbe helyeztük át. Hozzáadtunk tízed térfogat 3 M nátrium acetátot (pH 5,5) és 2,5 térfogat abszolút alkoholt (Reanal). Kicsapás után 15 percig  $4^{\circ}\text{C}$ -on centrifugáltuk, majd a felülűszozt eltávolítottuk. Ezután egy 70%-os etanolban történő mosás következett, 10 percig hagytuk hatni az alkoholt a centrifugálás előtt. Az alkoholos mosást kétszer végeztük el, hogy eltávolítsunk minden esetlegesen visszamaradt kemikáliát, amik zavarhatják a későbbiekben az *in vitro* transzkripciót vagy - donor plazmid esetén - az embriók fejlődését. A tiszta csapadékot beszárítottuk, majd steril desztillált vízben vagy injektáló pufferben (EmbryoMax, Millipore) visszaoldottuk. A koncentrációkat spektrofotométeres (NanoDrop, ND-1000) méréssel állítottuk be.

Sleeping Beauty transzpozon rendszer használatakor a transzgént tartalmazó donor plazmidot és a transzgenézist katalizáló transzpozázt koinjektáljuk az egysejtes embriók

előmagvaiba. Az injektáló oldat elkészítésénél fokozottan kell ügyelni, hogy a benne lévő transzpozáz mRNS-e ne bomoljon le. A transzpozázt kódoló plazmid felszaporítása után elő kellett állítanunk az mRNS-t.

### 3.2.2.1. A Sleeping Beauty transzpozáz mRNS előállítása

A transzpozáz kódoló szekvenciája az előzőleg felszaporított, majd kitisztított pC-Globin2-SB100X plazmidon található. A plazmidból 2 µg-ot a gyártó utasításai szerint emésztettünk ClaI restrikciós endonukleázzal (Fermentas). Az emésztés hatékonyságát 1 %-os agaróz gélen ellenőriztük. A linearizált plazmid DNS-t fenol-kloroformos extrakcióval megtisztítottuk. Az mRNS szintetizálásához mMessage mMachine T7 kitet (Ambion) használtunk a gyártó utasításait pontosan követve. Az *in vitro* transzkripció után a DNS-t a kithoz melléket TurboDNázzal elimináltuk, majd a reakció anyagaitól újabb fenol/kloroformos kicsapással szabadultunk meg, a visszamaradt Sleeping Beauty transzpozáz mRNS-t beszárítottuk és 20 µl injektáló oldatban visszaoldottuk. A transzkripció sikerességét 1 %-os agaróz gélen ellenőriztük, a gélelektroforézishez használt eszközöket előzőleg 70 %-os etanol, 0,2 N-os nátriumhidroxid oldattal és desztillált vízzel RNáz mentesítettük. A gél elkészítéséhez, illetve a futtatás puffereként itt 1x TBE-t használtunk. Az mRNS koncentrációját NanoDroppal megmértük és az oldatot beállítottuk 10 ng/µl-es koncentrációra. Az oldatot -70°C-on tároltuk.

- *1x TBE*: 108 g/l Tris-acetát, 55 g/l bór sav, 20 ml/l 0.5M EDTA, tízszeresére hígítva.

### 3.2.2.2. Donor plazmid előállítása

A pT2/Venus donor plazmidot felszaporítottuk, majd az előzőekben leírtakhoz hasonlóan fenol-kloroformos extrakció után injektáló pufferben (Millipore) feloldottuk. A donor plazmid koncentrációját 0,8 ng/µl-esre állítottuk be, az oldatot -20°C -on tároltuk.

### 3.2.2.3. Az injektáló oldat összeállítása

Az injektáló oldat 5 ng/µl SB100X mRNS-t és 0,4 ng/µl Venus riporter gént hordozó donor plazmidot tartalmaz injektáló pufferben. Így a már előállított, a végleges injektáló koncentráció kétszeresével rendelkező mRNS és donor plazmid oldatot csak egy-egy arányban kellett összekevernünk. Az elkészített injektáló oldatot 10 µl-es adagokban, -70°C-on tároljuk a felhasználásig. Ellenőrzésképpen egy adagot egy órán át 37°C-on inkubáltunk, majd 1 %-os agaróz gélen - szintén RNáz-mentes körülmények között - megfutattuk, hogy lássuk nem bomlott-e le az mRNS. Az adagokat minden esetben egyszer használtuk, nem fagyasztottuk vissza azokat.

### 3.3. TRANSZGÉNIKUS ÁLLATOK ELŐÁLLÍTÁSA

#### 3.3.1. Laboratóriumi nyulak tartása

A transzgénikus nyúl vonal előállításához a laboratóriumi gyakorlatban bevált Hycole fajtát használtuk. Az állatokat konvencionális állatházban tartottuk, egyedi ketrecekben,  $18\pm 3^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten, 12 óra megvilágítás, *ad libitum* takarmányozás mellett.

#### 3.3.2. Szuperovuláltatás, embriókezelés

A Hycole nőstény embriódonor nyulakat 3-4 hónapos korban, legalább 3,5 kg testsúly megléte mellett, 120 nemzetközi egység PMSG-vel (pregnant mare serum gonadotropin, Folligon, Intervet International B.V., Holland) oltottuk be intramuszkulárisan. 72 óra elteltével 180 nemzetközi egység hCG-vel (human chorion gonadotropin, Choragon, Ferring GmbH) intravénásan kezeltük a nőstény nyulakat. Ugyanekkor mesterségesen termékenyítettük is őket, Hycole hímek frissen vett spermájával. A megtermékenyülést követő nap reggelén a nőstények petevezetőjét eltávolítottuk. A petevezetőkől a zigótákat 20% FCS-sel (fetal calf serum, Invitrogen) kiegészített PBS médiumba mostuk ki. A mikroinjektálásig az embriókat M2 médiumban ásványi olajjal (Mineral oil, Sigma) lefedve,  $38,5^{\circ}\text{C}$ -on, 5%  $\text{CO}_2$ -dal telített környezetben tartottuk.

- M2 médium: NaCl 5,532 g/l, KCl 0,356 g/l,  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  0,251 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,162 g/l,  $\text{MgSO}_4$  0,293 g/l,  $\text{CH}_3\text{COCOONa}$  0,036 g/l, glükóz 1,0 g/l, szarvasmarha szérum albumin (V. frakció) 4,0 g/l, fenol vörös 0,01 g/l, HEPES 4,969 g/l desztillált vízben oldva. Szűrővel sterilizálva.)
- *PBS tenyésztőoldat szérum kiegészítéssel:* 16 mg KCl, 16 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8 mg  $\text{MgCl}_2$ , 640 mg NaCl, 92 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 8 mg  $\text{CaCl}_2$ , 2,4 mg penicillin, 8 mg streptomycin, 20 ml magzati borjú savó (FCS) 100 ml desztillált vízben oldva. Szűrővel sterilizálva.

#### 3.3.3. Mikroinjektálás

Kísérleteinkben a mikroinjektálás két alapvető módszerét használtuk: egyrészt a hagyományos előmag injektálást a Sleeping Beauty transzpozon rendszerrel történő transzgenézishez, másrészt a lentivírus konstrukciók perivitellinális térbe történő injektálását. A mikroinjektálás ezen két módja szerencsésen nagyjából ugyanazzal az eszközigénnyel rendelkezik.

Első lépésként előkészítettük a mikroinjektáláshoz szükséges eszközöket. A bal oldali manipulátor karba a tartó kapillárist helyeztük ( $d=100 \mu\text{m}$ , Harvard Apparatus, GC-100T-15), míg a jobb oldali karban az injektáló kapilláris kapott helyet ( $d=1-2 \mu\text{m}$ , Harvard Apparatus,



GC-100TF-15). Ezeket a vékony üvegkapillárisokat mikropipetta húzóval (Sutter Instrument Co., Model-97) készítettük el, a gép pontosan beállítható paraméterekkel (heat: 600, pull: 200, velocity:130, time: 180) dolgozva biztosítja, hogy mindig azonos karakterű üvegkapillárisokat készíthessünk. A tartó kapillárisokat vastagabb átmérőjük miatt akár kézzel, akár géppel is húzhatjuk, a végleges átmérőt és formát pedig mikrohuta segítségével alakítjuk ki, úgy hogy az embriók stabilan be tudjanak ülni a tartó kapilláris öblébe. A mikroszkóp és a manipulátor karok előkészítése után az embriókat szemrevételeztük.

A donor állatok petevezetőiből kimosott egysejtes embriókat kiválogattuk. A mikroinjektáláshoz megfelelő, jól kivehető előmaggal rendelkező embriókat mélyített tárgylemezen lévő 20 µl-es médium (20% FCS-sel kiegészített PBS) cseppbe helyeztük. Az embriókat tartalmazó médiumcseppet embrióolajjal fedtük le, elkerülve ezzel a párolgás miatti koncentráció változást. A tárgylemezt óvatosan a mikroszkóp (Olympus IMT-2) tárgyasztalára helyeztük, és a mikromanipulátor karok (Narishige) segítségével elvégeztük az injektálást. A tartó kapilláris segítségével becserkészett embriók előmaggába néhány pikoliter, vagy -lentivírus konstrukció használata esetén - a perivitellinális terébe körülbelül 100-200 pikoliter injektáló oldatot juttattunk. A már injektált embriókat a tárgylemezen elkülönítettük a nem kezeltétől. Maximálisan 25 embriót helyeztünk a médiumcseppbe, elkerülve, hogy túl sokáig legyenek erős megvilágítás és nem optimális hőmérsékleti tartományban, ami a későbbi fejlődésükre rávetheti a bélyegét. Az injektálás végeztével az embriókat áthelyeztük egy új csepp 20% FCS-sel kiegészített PBS médiumba és termosztátban inkubáltuk a beültetésig.

### 3.4. EMBRIÓBEÜLTETÉS

A fiatal, 2-3 hónapos, recipiens Hycole fehér nőtényeket az embriók beültetése előtti napon 0,2 ml GnRH analóg készítménnyel (Receptal, Intervet) kezeltük intravénásan. A műtétet laparoszkópos módszerrel végeztük, így okozva a lehető legkevesebb sérülést az állatnak (Besenfelder and Brem 1993). Az anesztéziához 0,4 ml Xilazin (CP-Xilazin 2% inj A.U.V., Cp-Pharma Handelsges. mbH) és 0,7 ml Ketamin (Cp-Pharma Handelsges mbH) oldatot használtunk. Az altatásban lévő állatok hasáról a szőrt lenyírtuk, hogy ne zavarja a műtéti eljárást. Köldöktájékon szikével apró (2-3 mm-es) bemetszést ejtettünk az állatokon, egy vékony trokár hasfalba történő bevezetésének megkönnyítésére. A trokár segítségével az állat hasüregét feltöltöttük levegővel, így a laparoszkóp bejuttatásakor elkerülhető a belső szervek megsértése. Megszámoltuk a petefészek elhelyezkedő ovulációs helyek (corpus hemorrhagicum) számát, hogy tudjuk a GnRH injekció valóban hatásos volt-e. A petefészekhez közel a hasfalon keresztül a felfújt hasüregbe szúrt vénás kanül (Introcan-Safety IV Catheter W, BBraun) tűjét a tölcseren keresztül a petevezetőbe juttattuk. A kanül tűjét egy üvegkapillárisra (Brand, 701902) cseréltük.

Ez a kapilláris tartalmazta a médiumban úszó embriókat, ezt két levegőbuborék, majd két médiumcsepp vette körül. A buborékok azt a célt szolgálják, hogy biztosan lássuk, az embriók bekerülnek a petevezetőbe. Az álvemhes nyulak jobb és bal petevezetőibe oldalanként 8-10, a mikroinjektálást túlél, egy- vagy kétsejtes embriót transzferáltunk. A laparoszkóp eltávolítását követően a vágást 7,5 mm-es sebkapoccsal (Kruuse, 151905) zártuk.

### 3.5. TRANSZGÉNIKUS VONAL LÉTREHOZÁSA ÉS FENNTARTÁSA

#### 3.5.1. Alapító egyedek kiválasztása

A transzferből született kisnyulak füléből néhány napon DNS mintát gyűjtöttünk. Az állatokat egyéni azonosító jelöléssel láttuk el. Mind a transzpozonos transzgenézis, mind a lentivírusos transzgenézis esetén egy-egy fluoreszcens riporter gént vittünk be, így élvezhettük azt a könnyebbséget, hogy a transzgenikus (és transzgént egyúttal expresszáló) állatokat UV fény segítségével megtalálhattuk. Természetesen PCR módszer segítségével is megerősítettük az alapító (hemizigóta) egyedek genotípusos státuszát.

Az alapító egyedek azonosításához a riporter gén expressziója mellett PCR módszert is használtunk. A megszületett nyulakból néhány napos korban szövetmintát veszünk, ebből egyszerű fenol/kloroformos extrakcióval (Gogvadze and Buzdin 2009) kivontuk a genomi DNS-t. A kinyert DNS-t PCR reakcióval teszteltük a transzgén jelenlétére. A reakció primereit az interneten ingyenesen hozzáférhető Primer3 programmal terveztük (<https://frodo.wi.mit.edu>). A primereket az 1. táblázat tartalmazza. A reakciók összeállításához MyTaq Red Mix DNS polimerázt használtunk a gyártó (Bioline) utasításai szerint PTC-200 Thermocycler készüléken, 12,5 µl végtérfogatban. A PCR kondíciók: 95°C 3:00 denaturáció után 30 ciklus 95°C 0:15, 60°C 0:15, 72°C 0:10 majd 72°C 3:00 perc következett. 1 %-os agaróz gélen futtattuk meg a PCR reakciókat a pozitív alapítók után kutatva.

1. táblázat: Primerszekvenciák az alapító állatok azonosításához

Primer neve	Primer szekvencia (5'-3' orientáció)	Fragment méret (bp)
<b>GFP legjobbF</b>	ctcgtgaccaccctgacctac	282
<b>GFP legjobbR</b>	catgatatagacgttggtgctgtt	
<b>VenusF</b>	ggtcctcttctcgttaggg	334
<b>VenusR</b>	tacaagaccagagccgaggt	

A kiválasztott alapító egyedeket 3-4 hónapos korukban vad típusú nyulakkal pároztattuk, az így született utódok közül szintén PCR-rel válogattuk ki a transzgénre nézve immár heterozigóta állatokat. A hemizigóta egyedek egymás közti, illetve a hemizigóta és az alapító

egyedek keresztezésével megszületett G2 generáció egyedei között vizsgáltuk, hogy a mendeli szabályoknak megfelelő szegregációt (25% homozigóta) kapunk-e. A homozigótának vélt egyedeket QPCR-rel elkülönítettük, majd vad típusú nyulakkal pároztattuk. Azon egyedeket fogadtunk el homozigótának, melyeknek minden utóda pozitív volt a transzgénre nézve.

### 3.5.2. Expressziós vizsgálatok

#### 3.5.2.1. Reverz Transzkriptciós PCR

A génextpresszió vizsgálatát szöveti szinten RT-PCR segítségével végeztük. Szövetenként 50 mg mintát gyűjtöttünk és az RNS kivonásáig folyékony nitrogénben tároljuk. A mintákat gépben homogenizáltuk (Precellys 24, Bertin) hideg RNazoI™ B (Tel-Test Inc.) feltárási pufferben. A homogenizátumot 10 percig 4°C-on, 13000 rpm centrifugáltuk, majd a felső fázist 200 µl kloroformmal tisztítjuk. A fázisokat egy újabb centrifugálás (15 perc, 13000 rpm) elválasztottuk és a felső, vizes fázisból az RNS-t egy térfogategység izopropanollal (Merck) kicsaptuk. A kicsapott RNS-t centrifugáltuk, majd 70 %-os alkohollal mostuk. A csapadékot ismételt centrifugálással a cső aljára tapasztottuk, majd beszárítottuk. A beszárított RNS-t 30-100 µl RNáz-mentes vízben (Gibco) visszavettük, DNáz (Qiagen) kezeltük, és felhasználásig -70°C-on tároltuk. Az RT-PCR reakciót a gyártó (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems) utasításait követve mértük össze, 20 µl végtérfogatba 500 µg RNS-t tettünk. A reverz transzkriptciót PCR gépben (MJ Research PTC-200) végeztük a kit ajánlását (25°C 10 perc, 37°C 120 perc, 85°C 5 perc) betartva random hexamerekkel. Az így felszaporított cDNS-ekből 1 µl-t használtunk a második, már specifikus primerekkel végzett PCR reakcióba. A reakciókba a Sleeping Beauty-s konstrukció esetén a Venus, míg a lentivírusos konstrukció esetén a GFP riporter génre tervezett primereket raktuk. Endogén kontrollként pedig a GAPDH génre tervezett primert használtunk. A PCR kondíciók: 95°C 3:00 denaturáció után 30 ciklus 95°C 0:15, 60°C 0:15, 72°C 0:10 majd 72°C 3:00 perc következett. A keletkezett termékeket 1 %-os agaróz gélen (Invitrogen) választottuk el. A primerek szekvenciáit a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat: RT-PCR-hez használt primerek

Primer neve	Primer szekvencia (5'-3' orientáció)	Fragment méret (bp)
<b>GFP próbaF</b>	caagggcgaggagctgtt	664
<b>GFP próbaR</b>	gaactccagcaggacctgt	
<b>VenusF</b>	ggtccctcttctcgtaggg	334
<b>VenusR</b>	tacaagaccagagccgaggt	
<b>GAPDHnyF</b>	caacatcaagtggggtgatg	381
<b>GAPDHnyR</b>	gaggcagggatgatgttctg	

### 3.5.2.1. Western blot

A transzgén fehérje szintű expressziójának vizsgálatát Western blot segítségével végeztük el. 7-8 térfogatnyi jéghideg PBS-ben homogenizáltuk a szöveteket. A szöveti maradványoktól centrifugálás (1 perc, 13000 rpm) után, a felülúszó megtartásával szabadultunk meg. A fehérjekivonathoz ezután  $\beta$ -merkaptó-etanolos felvivő puffert adtunk (0,5 M Tris-HCl, 10 % SDS pH 6,8, 30 % glicerin, 0,012 % brómfenol-kék, 6 %  $\beta$ -merkaptó-etanol) és denaturáltuk 95°C-on 5 percig. Denaturáló gélben 10 % poliakrilamid és SDS jelenlétében elválasztottuk a fehérjéket. A tömörítő gél 0,5 M Tris-HCl-ot, 0,4 % SDS-t (pH 6,8), míg maga a szeparáló gél 1,5 M Tris-HCl-ot, 0,4 % SDS-t tartalmazott, ez utóbbi pH-ja azonban már 8,8-as volt (Gogvadze and Buzdin 2009). Az előző este öntött gélen zsebenként 10  $\mu$ l denaturált fehérjemintát választottunk el 0,5 % SDS tartalmú Tris-glicin pufferben, 25-35 mA áramerősség mellett, Hoefer Minigel futtatókádban (Hoefel Scientific Instruments). A szeparált mintákat tartalmazó gélét kétszer 15 percig mostuk transzfer pufferben, ami 60 mM Tris-t, 40 mM CAPS-t (pH 9,6) tartalmazott, eközben a PVDF membránt (Hybond-P, Amersham) is előkészítettük a blottoláshoz, 2 percig metanolban, 5 percig desztillált vízben nedvesítettük, majd 15 percig transzfer pufferben áztattunk. Elektromos (Semi-dry) blottoló berendezéssel (Hoefel Scientific Ins.) 30 perc alatt, 100 V feszültség mellett rögzítettük a mintákat a membránon. A blottolás végeztével a membránt 5 % tejporthoz tartalmazó TBS-T (Tris puffereelt sóoldat, 0,05 % Tween 20 detergens) pufferben blokkoltuk. Az egér anti-EGFP (Living Colors<sup>TM</sup>, monoclonal, JL-8, Clontech) elsődleges ellenanyagot 1:250 hígításban ugyancsak 5 % tejporthoz tartalmazó TBS-T oldatában reagáltattuk 90 percig 4°C-on a fehérjékkel. Majd a membránt négyszer 10 percig mostuk TBS-T oldatban. A másodlagos ellenanyagot, mely anti-mouse IgG-HRP (Sigma, A6154) 1:5000 hígítási arányban 45 percen keresztül 4°C-on inkubáltuk a membránon. Ezután újabb három TBS-T-s mosás következett. A másodlagos antitestet luminol alapú kemilumineszcenciás kit (ECL-Plus Kit, Amersham) és autoradiográfia (Hyperfilm, Amersham) segítségével tettük láthatóvá.

### 3.5.3. *Transzgén integrációjának vizsgálata*

#### 3.5.3.1. Southern blot

Az alapító állatok 20 mikrogramm genomi DNS-ét BamHI restrikciós endonukleázzal hasítottuk, majd 1 %-os agaróz gélen elválasztottuk. A gélét 10 percig depurináló oldatban (20 ml/l ccHCl MQ vízben oldva), majd kétszer 20 percig denaturáló oldatban (20 g NaOH, 87,66 g NaCl 1000 ml MQ vízben oldva) rázattuk. A DNS-t ezután Hybond-XL membránra

transzferáltuk egy éjszakán át, kapilláris blottolással, denaturáló oldatban. A membránon a DNS-t 80°C-os, egy órán át tartó szárítással és UV-sugárzással rögzítettük. A próba alapjaként szolgáló fragmentet PCR segítségével amplifikáltuk a 2. táblázatban található primerekkel. A jelölést DecaLabel DNS jelölő kittel (Fermentas) végeztük a gyártó utasításai szerint. A hibridizációt 3-5 millió cpm/ml  $\alpha$ -32P-dCTP koncentráció mellett overnight végeztük PerfectHyb (Sigma) hibridizációs pufferben a gyártó utasításai szerint. A membránt a pufferhez megadott protokoll szerint többször csökkenő SDS és SSC koncentrációk mellett háromszor mostuk, majd autoradiográfiával (Hyperfilm, Amersham) láthatóvá tettük az eredményt.

### 3.5.3.2. QPCR

A genomi DNS-t fenol-kloroformos extrakcióval kinyertük és koncentrációját spektrofotométer segítségével beállítottuk 25 ng/ $\mu$ l-re. 20  $\mu$ l-es végtérfogatú TaqMan reakciókat állítottunk össze, három ismétlésben. A QPCR-t Eppendorf Mastercycler realplex<sup>4</sup> típusú készüléken futtattuk. A primerek és a próbák a Sleeping Beauty ismétlődő szakaszait ismerik fel (Kolacsek et al. 2011) (3. táblázat). A kalibrációhoz a szerzőktől származó 1,2,4,8 kópiás stabil transzfektáns vonalakat használtuk. Az eredmények kiértékeléséhez a GenEx QPCR (MultiD) szoftvert használtuk.

3. táblázat: QPCR-hez használt primerek

Primer neve	Primer szekvencia (5'-3' orientáció)	Fragment méret (bp)
VenusQF	ttcagctcgattctgttcacc	143
VenusQR	tgcaggagagaaccatcttct	

### 3.5.3.3. Integrációs hely meghatározása

Az integrációs helyet a Sleeping Beauty transzpozon rendszerrel létrehozott transzgénikus nyúlvonal esetében splinkerette PCR (Devon et al. 1995) segítségével határoztuk meg. Transzgénikus alapítók tisztított genomi DNS-ét NlaIII restrikciós endonukleázzal hasítottuk. A linker adaptereket (4. táblázat) azonos moláris koncentrációban 80°C-ra hevítettük, majd lassan szobahőre hűtve összetapasztottuk. Az adaptereket ezután overnight a megemésztett genomi DNS darabjaira ligáltuk (T4 ligáz, Fermentas) 16°C-on. A genomi DNS darabokra ligált adapterekre specifikus primerekkel PCR reakciót hajtottunk végre az eddigiekben ismertetett PCR programmal. Az első PCR termékéből egy nested PCR-t futtattunk, ennek termékeit 1 %-os agaróz gélen választottuk el. A termékeket fragment izoláló kit (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) segítségével tisztítottuk ki a gélből és pGEM-Teasy (Promega) vektorba klónoztuk a

gyártó utasításai szerint. A DNS szekvenciákat hagyományos szekvenálás segítségével határoztuk meg (Biomi Kft). A kapott adatokat a nyúl genomra (genome.ucsc.edu) illesztettük.

4. táblázat: Splinkerette PCR-hez használt primerek szekvenciái

<b>Primer neve</b>	<b>Primer szekvencia (5'-3' orientáció)</b>
<b>BfaI linker(+)</b>	gtaatacgactcactatagggctccgcttaagggac
<b>BfaI linker(-)</b>	p-tagtcccttaagcggag-amino
<b>Linker primer</b>	gtaatacgactcactatagggc
<b>Nested primer</b>	agggctccgcttaagggac
<b>Tbal rev3</b>	aaagccatgacatcatttctggaatt
<b>Tbal rev3 short</b>	catgacatcatttctggaatt

### 3.6. *METSZETEK KÉSZÍTÉSE, MIKROSKÓPOS KÉPALKOTÁS*

A mikroszkópos képekhez a szöveteket kriosztátban (Mikrom, Heidelberg) metszettük 10 mikron vastagságú szeletekre, a beágyazáshoz PolyFreeze (Sigma) használtunk, a metszeteket (Super Frost Ultra Plus, Menzel-Glaser) tárgylemezre helyeztük. A metszeteket Vectashield festékkel (Vector Lab.) kezeltük és DPX médiummal (Sigma) fedtük le. A képek elkészítéséhez fluoreszcens feltétell ellátott Olympus IMT2 mikroszkópot használtuk.

Az embriók és magzatok riporter gén expressziójának mikroszkópos (Olympus SZX9) detektálására 455-495 nm-es gerjesztő fényt (MAA-03/B, Biological Laboratory Equipment, Maintenance and Service Ltd.) használtunk, a fluoreszcencia kibocsájtást egy 500 nm-es szűrő segítségével tettük láthatóvá (GFSP-5, Biological Laboratory Equipment, Maintenance and Service Ltd.).

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. LENTIVÍRUS ALAPÚ TRANSZGENEZIS

Csoportunk a SIV alapú konstrukció előtt többféle HIV alapú lentivírus vektort és többféle promotert próbált ki nyúl transzgenézisére (nem publikált adat). A kísérleteket ráadásul nem csak egy, de négy- és nyolcsejtes embriókon is elvégeztük. HIV vektorral nem sikerült transzgénikus állatot előállítanunk, pedig a konstrukciók minden esetben egér modellen tesztelve használhatónak bizonyultak (9. ábra). Így esett választásunk egy SIV alapú vektorra, amit előzetesen szintén sikerrel teszteltünk egér modellen.



9. ábra: Lentivírus segítségével (SIV) létrehozott transzgénikus egerek

A monocisztronikus SIV transzfer vektor elkészítése egy második generációs lentivírus összepakoló rendszerben (Nègre et al. 2002) zajlott a Pécsi Tudományegyetem Biotechnológiai Intézetében. A vektorok előállítása már leírt módon (Nègre et al. 2002), HeLa 293T sejtvonalban, kalcium-foszfátos eljárással zajlott. A kotranszfektálás és összepakolás után a sejtek felülszóját ultracentrifuga segítségével ezerszeresére koncentráltuk. Az oldat titerét Jurkat sejtek és FACS (Fluorescence-activated cell sorting) berendezés használatával határoztuk meg. A titer  $1 \times 10^6$  TU/ml-nek bizonyult (transducing unit). A vírusvektorokat DMEM-ben feloldva,  $-70^\circ\text{C}$ -on tároltuk a mikroinjektálásig.

#### 4.1.1. Transzgénikus nyulak létrehozása

Az Hycote donor nyulakból szuperovuláltatás és mesterséges termékenyítés után egysejtes embriókat mostunk ki. Az embriókat M2 médiumban,  $\text{CO}_2$  termosztátban,  $37,5^\circ\text{C}$ -on tároltuk mikroinjektálásig. A lentivírus vektor körülbelül 100-200 pl-nyi oldatát az embriók perivitellinális terébe injektáltuk. A kezelt embriókat recipiens nőtényekbe ültettük laparoszkópos embriótranszfer segítségével. A mikroinjektálás, embrió beültetés és születések adatait a 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat: A lentivírusos transzgenézishez felhasznált embriók adatai

	Kimosott embriók	Mikroinjektált embriók	Beültetett embriók	Megszületett utódok
darab	<b>430</b>	<b>322</b>	<b>291</b>	<b>87</b>
az előző százalékában	-	75%	90%	30%
az összes százalékában	-	75%	68%	20%

Össességében 430 darab embriót mostunk ki 23 szuperovuláltatott Hycote donor nőtényből. A kiválogatás és mikroinjektálás után visszamaradt 291 embrió az összes embrió 90%-a volt, ezeket 11 recipiens nőténybe ültettük. A nőtények 81 %-a fiatal, az alomlétszám 3 és 15 között változott. 87 kisnyúl született, ez a beültetett embriók 30 %-a. Az utódok 53%-a (46 darab) halva született.

#### 4.1.2. Alapító egyedek azonosítása

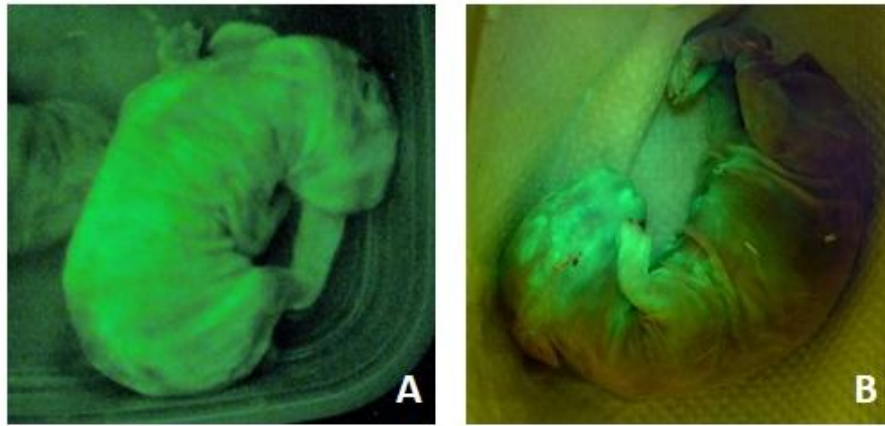
A recipiens anyák megszületett utódait UV fény segítségével és transzgen specifikus PCR-rel vizsgáltuk (nem kerül bemutatásra). A megszületett 87 kisnyúl közül 28 hordozta a transzgent (6. táblázat), így a transzgenézis hatékonysága 32 % volt.

6. táblázat: Születési arányok és transzgenikus alapítók aránya a lentivírusos transzgenézis esetén

	Született kisnyulak	Élve született kisnyulak	Transzgenikus kisnyulak	GFP+
darab	<b>87</b>	<b>42</b>	<b>28</b>	<b>18</b>
az összes százalékában	-	48%	32%	21%

A fiatal, élve született nyulak közül 18 mozaikos génexpressziót mutatott a GFP riportergénre nézve, ezek közül kettő látható a 10. ábrán.



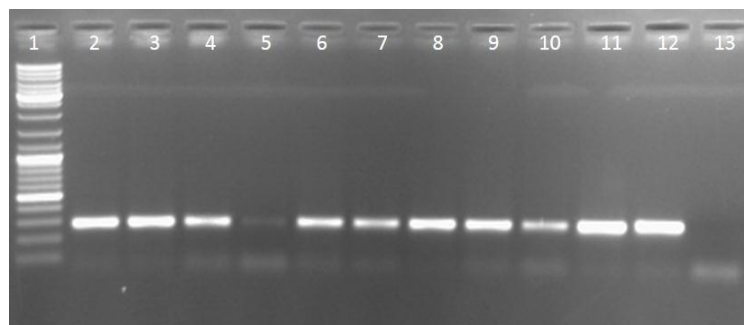


10. ábra: A és B: GFP expressziót mutató alapítók. Jól látható, hogy az alapítók a mozaikosságunk szintjében nagyon elkülönülnek.

#### 4.1.3. Expresszió kimutatása

A transzgén expresszióját háromféle módon teszteltük; RT-PCR, UV fény és western blot segítségével.

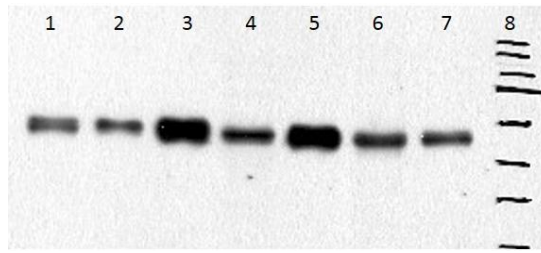
Az RT-PCR-hez egy alapító egyed szöveteiből gyűjtöttünk mintákat, ez az alapító láthatóan alacsonyabb mértékben volt mozaikos. Az RNS kivonás után elvégeztük a reverz transzkripciót, aminek az eredménye a 11. ábrán látható.



11. ábra: RT-PCR egy alapító egyed szöveteiből. 1- molekula marker, 2- bél, 3- here, 4- agy, 5- bőr, 6- tüdő, 7- máj, 8- vese, 9- hasnyálmirigy, 10- lép, 11- szív, 12- izom, 13- negatív kontroll

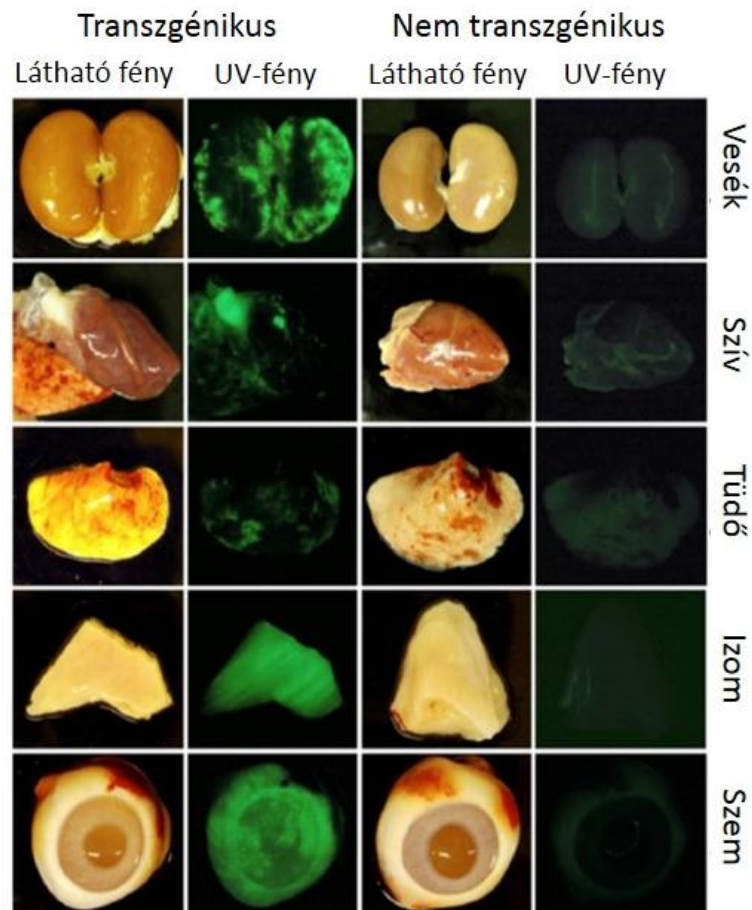
A vizsgált szövetek mindegyikében igazoltuk a GFP mRNS jelenlétét. A reakcióhoz kontrollként a biztosan jelen lévő GAPDH gén termékére tervezett primereket használtunk, ezt a fragmentet minden minta esetében megkaptuk (nem kerül bemutatásra).

Western blot segítségével is bizonyítottuk a transzgén jelenlétét. Ehhez egy egér monoklonális GFP ellenanyagot használtunk. Western blottal bebizonyítottuk, hogy a transzgén megtalálható a mindhárom csíralemezből származó szövetekben. Az egyik alapító (SIV 9 JBK hím) különböző szöveteinek Western blot képe látható a 12. ábrán. A génexpresszió az alapító egyedek szöveteiben eltérő volt, megfelelően a mozaikosságnak.



12. ábra: Egy alapító szöveinek western blotos analízise. 1- kisagy (neuroektodermális) 2-szív, 3- bőr (ektodermális), 4-máj, 5- vese (mezodermális), 6- hasnyálmirigy (endodermális), 7- pozitív kontroll, 8- molekula súlymarker.

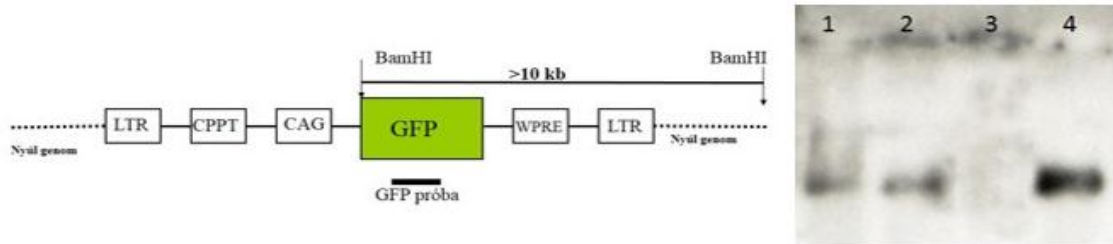
Az egyik alapító (SIV 9 JBK hím) egyed kipreparált szerveit UV fényvel gerjesztettük és a fluoreszcenciáról fotókat készítettünk. Az 13. ábrán látható, hogy a vizsgált egyed szöveiben a transzgén expresszál, ugyanakkor nagymértékű mozaikosság lépett fel a vesék, a szív és a tüdő esetében. Kontrollként egy nem transzgénikus alomtestvér szervei láthatók.



13. ábra: Egy alapító és egy kontroll egyed szöveite látható fény és UV megvilágítás mellett. A transzgénikus alapító szöveite különböző mértékű mozaikosságot mutatnak.

#### 4.1.4. A transzgén beépülésének ellenőrzése

A transzgén integrációját Southern hibridizációval vizsgáltuk. Egy 664 bp méretű rádióaktívan jelölt GFP próbát hibridizáltattunk a BamHI restrikciós enzimmel emésztett genomra (14. ábra). Az enzim egyszer hasít a genomban és egyszer a transzgénben, így a hibridizáció során kapott fragmentek száma megadja a beépült kópiák számát.

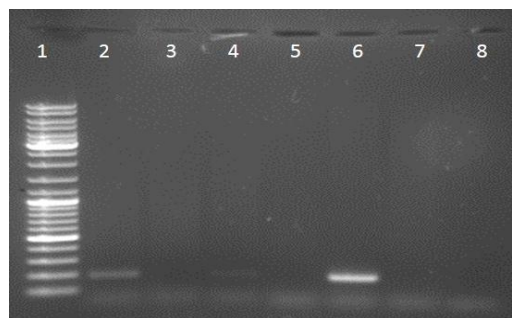


14. ábra: A lentivírus konstrukcióval létrehozott alapítók Southern blot hibridizációja. 1-2: transzgénikus alapítók (SIV 3 BT, SIV 7 JT), 3- negatív kontroll (vad típus), 4- pozitív kontroll (GFP transzgénikus egér DNS)

A hibridizációval megállapítottuk, hogy a transzgén egy kópiában épült be a vizsgált egyedek genomjába (14. ábra).

#### 4.1.5. A transzgén öröklődése

Két alapító hím spermájából izolált DNS-ből (SIV 3 BT, SIV 7 JT) ki tudtuk mutatni a transzgént az arra tervezett PCR segítségével (15. ábra). A PCR eredménye alapján azt vártuk, hogy a transzgén öröklődni fog.



15. ábra: Néhány transzgénikus alapító bak transzgén specifikus PCR képe. 1- molekula marker, 2-5 alapítók spermájából származó DNS (SIV 3 BT, SIV 3 JKK, SIV 7 JT, SIV 9 JT), 6- pozitív kontroll, 7- negatív kontroll, 8- víz kontroll

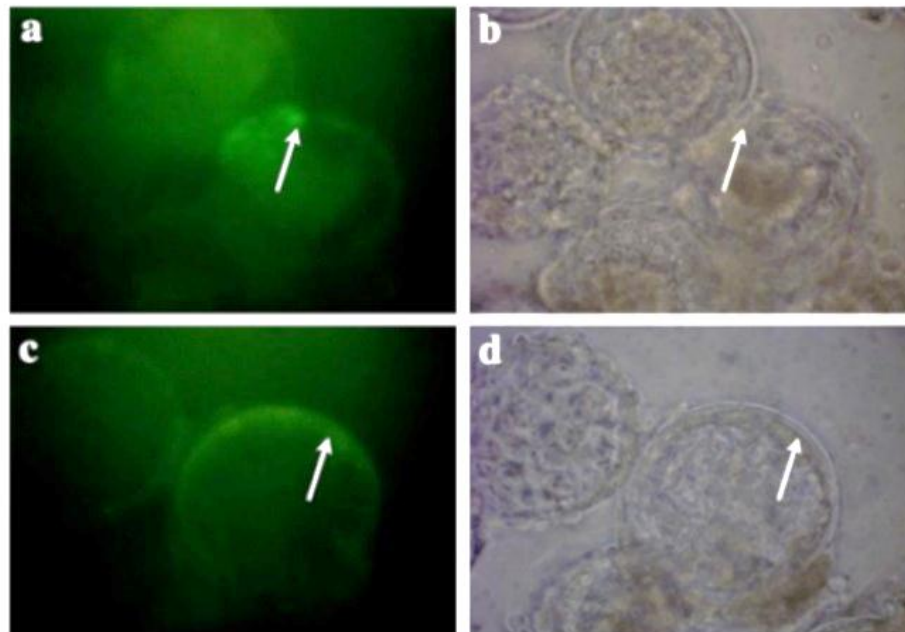
4 transzgénikus egyeddel kíséreltük meg a vonalalapítást. Ennek összegzése a 7. táblázatban látható. A megszületett F1 utódok között UV fény és PCR segítségével kerestük a transzgénikus alapítókat.

7. táblázat: Négy transzgénikus alapító F1 utódjainak összefoglaló táblázata

Alapítók	Transzgénikus utódok száma/ összes utód száma	GFP + utódok száma/ összes utód száma
SIV 3 BT hím	1/70	1/70
SIV 7 JT hím	1/85	0/85
SIV 9 JBK hím	1/23	0/23
SIV 10 JBK nőstény	0/37	0/37
Összesen	3/215	1/215

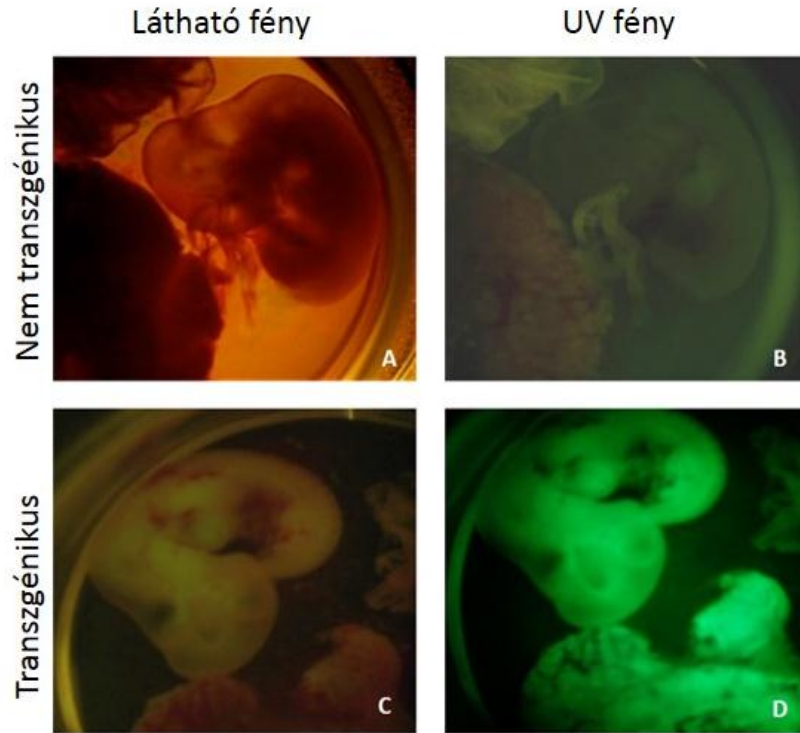
A SIV 10 JBK alapító nőstény 37 utóda közül egyik sem örökölte a transzgént. Két hím (SIV 7 JT és SIV 9 JBK) összesen 108 utódja között PCR-rel ki tudtunk mutatni ugyan egy-egy transzgénikus fiókat, de ezek GFP expressziót nem mutattak.

A megszületett transzgénikus utódok hiánya miatt elkezdtek vizsgálni, hogy az expresszió vajon embrionális korban megjelenik-e. A SIV 3 BT alapító hím spermájával termékenyített embriókat egysejtesen kimostuk és *in vitro* tenyésztettük. Megállapítottuk, hogy blasztociszta stádiumú embriókban tapasztalható a transzgén expressziója (16. ábra).



16. ábra: Mikroinjektált, majd *in vitro* tenyésztett embriók. Látható, hogy blasztociszta stádiumban a transzgén expresszál. a és c: blasztociszták UV fényvel megvilágítva, b és d: blasztociszták látható fényben. A nyilak a GFP expresszióját mutatják. (fotó: Dr. Gócza Elen)

A SIV 3 BT transzgénikus alapító spermájával termékenyített kontroll nőtényből a magzatokat 13,5 naposan eltávolítottuk és UV fény alatt vizsgáltuk. Ezek közül a magzatok közül egy transzgénikusnak bizonyult és GFP expressziót is mutatott (17. ábra). Ennek a hímnek a megszületett 70 utódja közül csak ez az egy hordozta a transzgént. Tehát a nagyszámú F1 utód ellenére nem született transzgénikus utód.



17. ábra: 13,5 napos magzatok különböző megvilágításban (fotó: Dr. Gócza Elen)

## 4.2. SLEEPING BEAUTY TRANSZPOZON RENDSZER

### 4.2.1. Az injektáló oldat előállítása

A Sleeping Beauty transzpozon rendszer alkalmazásakor az injektáló oldat a transzpozáz mRNS-éből és a transzgént hordozó donor plazmidból áll. Az ehhez szükséges plazmidokat (pC-Globin2-SB100x és pT2/Venus, 8. ábra) felszaporítottuk és tisztítottuk. A donor (pT2/Venus) plazmid koncentrációját a tisztítás után 0,8 ng/μl-esre beállítottuk. A transzpozáz szekvenciáját hordozó pC-Globin2-SB100x plazmidról *in vitro* transzkripció segítségével előállítottuk a Sleeping Beauty transzpozáz mRNS-ét, ennek koncentrációját 10 ng/μl-esre állítottuk be. A két komponenst egy-egy arányban összekeverve elkészítettük az injektáló oldatot, amiben a transzpozáz mRNS koncentrációja 5 ng/μl, a donor plazmid koncentrációja 0,4 ng/μl volt. A két oldat 5-5 μl-ét összekeverve 37°C-on egy órán át tároltuk, majd gélelektroforézissel elválasztottuk. A donor plazmid és az mRNS is láthatóvá vált az elektroforézis segítségével, ezzel bizonyítottuk, hogy az injektáló oldat használhatóságát és azt, hogy az oldatokat mindvégig RNáz-mentesen sikerült kezelniük (az ábra nem kerül bemutatásra).

### 4.2.2. Transzgénikus nyulak előállítása

A szuperovuláltatott nyulak petevezetőjéből az egysejtes embriókat kimostuk és a Sleeping Beauty transzpozáz rendszert tartalmazó injektáló oldat néhány pikoliterét az apai előmagba juttattuk. A mikroinjektált embriókat recipiens Hycole nőstényekbe ültettük laparoszkópos módszerrel. A felhasznált embriók számát a 8. táblázat mutatja.

8. táblázat: A Sleeping Beauty transzpozon rendszerrel történő transzgenézishez felhasznált embriók

	Kimosott embriók	Mikroinjektált embriók	Beültetett embriók	Megszületett utódok
darab	546	501	472	46
az előző százalékában	-	91%	94%	10%
az összes százalékában	-	91%	86%	8%

Összesen 472 mikroinjektált embriót ültettünk be 25 recipiens nősténybe, amiből 10 nyúl fialt. Ez 40%-os vemhesülési arány, az alomszám 2 és 11 között változott. A beültetett embriók 10%-a (46 darab kisnyúl) született meg, ez a kísérletben felhasznált 546 embrió 8%-a.



### 4.2.3. Alapító egyedek azonosítása

A megszületett utódokban vizuálisan (GFP) és PCR módszerrel vizsgáltuk a transzgén jelenlétét. A transzgenézis hatékonyságát a 9. táblázat mutatja.

9. táblázat: Születési arányok és transzgénikus alapítók aránya a *Sleeping Beauty* transzgenézis esetén

	Született kisnyulak	Élve született kisnyulak	Transzgénikus kisnyulak	GFP+
darab	46	40	7	7
az összes százalékában	-	87%	15%	15%

A nőstények összesen 46 utódot fiáltak, ezek közül 7 bizonyult transzgénikusnak. A transzgenézis hatékonysága 15,1 % volt. A hét alapító egyed mindegyike expresszálta a GFP transzgént.

### 4.2.4. Expresszió kimutatása

A transzgén expresszióját az UV fényel történő megvilágításon kívül ez esetben is megvizsgáltuk RT-PCR és Western blot segítségével.

UV fény segítségével vizsgáltuk a riportergén jelenlétét blasztociszta állapotú embriókban. A 18. ábrán látható, hogy már blasztociszta állapotban is kimutatható a Venus expresszió.



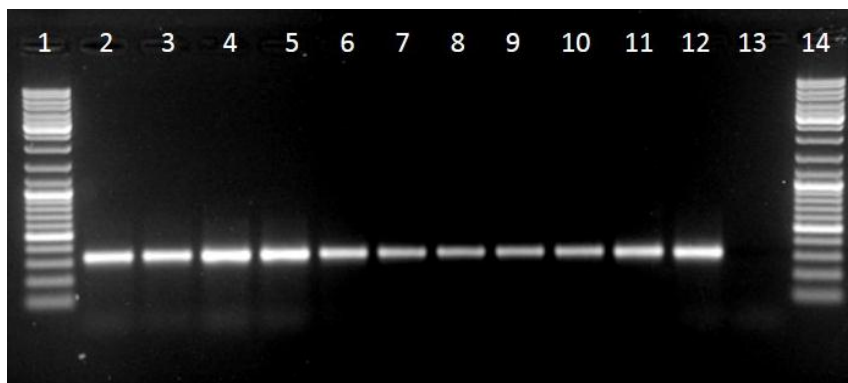
18. ábra: Blasztociszta állapotú GFP-t expresszáló embrió (fotó: Dr. Gócza Elen)

Az alapító egyedeket UV fény segítségével azonosítottuk, napos korban. A 19. ábrán 3 alapító és egy alomtestvérük UV fényel megvilágított képe látható. Két alapító egyeden jól megfigyelhető a mozaicizmus jelensége, az állatok nem egész testfelületén van riportter gén expresszió.



19. ábra: A *Sleeping Beauty* transzpozon rendszerrel létrehozott 3 alapító és egy nem transzgénikus alomtestvérük

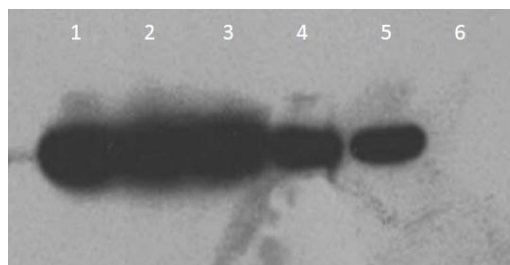
Az UV fényel megfigyelt expressziót RT-PCR segítségével is megerősítettük. A reverz transzkripciót mindhárom csíravonal szöveteiből elvégeztük egy alapítóból (SB 3 JT).



20. ábra: Az SB3JT alapító genomi PCR alapján pozitív transzgénikus utódjának szövetspecifikus RT-PCR vizsgálata *Venus* specifikus primerrel. 1. és 14. molekula marker, 2-12 szöveti minták a következő sorrendben: agy, szív, tüdő, máj, lép, vese, here, hasnyálmirigy, izom, bőr és vékonybél, 13. negatív kontroll.

A 20. ábrán látható, hogy a vizsgált szövetek mindegyikében tapasztaltuk a transzgén expresszióját mRNS szinten. Endogén kontrollként GAPDH génre tervezett primereket, negatív kontrollként reverz transzkriptáz-mentes reakció mintáit futtattunk (fotó nincs mutatva).

Fehérje szinten is kimutattuk a transzgén kifejeződést egy *Venus* felismerő poliklonális antitest segítségével.

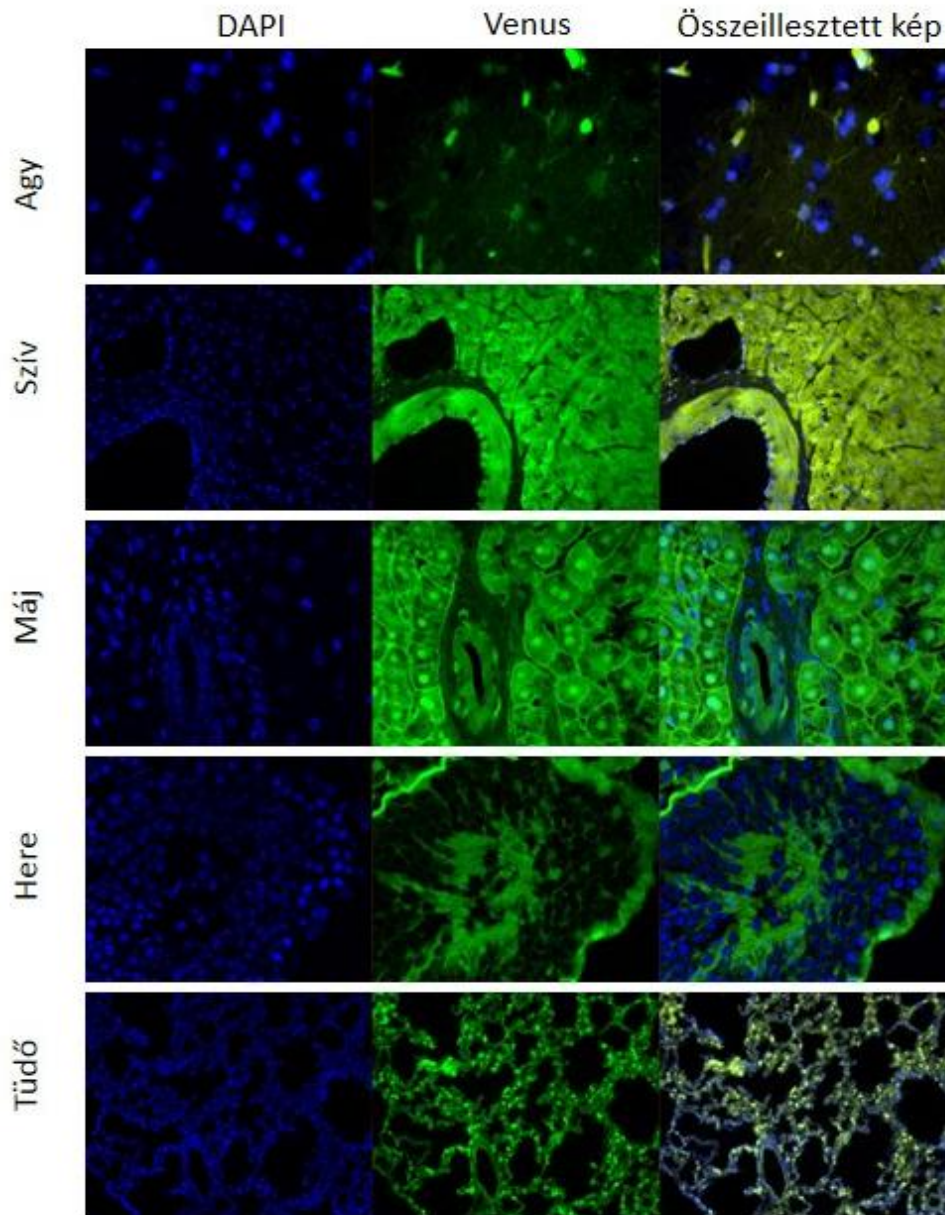


21. ábra: Az SB3JT alapító pozitív transzgénikus utódjának Western blot vizsgálata. 1-5 szöveti minták a következő sorrendben: tüdő, máj, szív, vese, bőr, 6. negatív kontroll

Az SB 3 JT alapítóból származó tüdő, máj, szív, vese, bőr szövetek western blotja látható a 21. ábrán. A körülbelül 30 kilodaltonos fehérjét a vizsgált szövetek mindegyikében ki tudtuk mutatni.



Elvégeztük néhány szövet mikroszkópos vizsgálatát is, hogy megállapítsuk a transzgén jelenlétét a különböző sejttípusokban (22. ábra) a SB 3 BT vonal esetén.



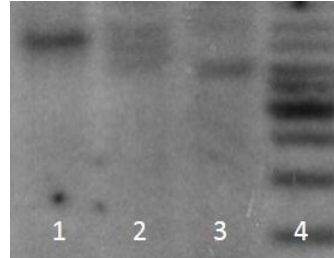
22. ábra: Egy transzgénikus F1 utód ( SB 3 BT vonal) néhány szövetének mikroszkópos metszete. A metszeteken a sejtmagokat DAPI segítségével tettük láthatóvá.

A transzgénikus F1 egyed vizsgált szöveteinek minden sejttípusában látható a Venus riporter gén erős és egyöntetű jelenléte.

### .2.5. A transzgén beépülésének vizsgálata

Southern blottal is megvizsgáltuk a transzgén beépüléseket az alapítókbá. A Venus transzgénre tervezett próbával hibridizáltattuk a NdeI restrikciós endonukleázzal emésztett alapítók DNS-ét, ez az endonukleáz egyszer hasít a transzgénben. A hibridizáció megmutatta, hogy a transzgén két esetben, egy-egy kópiában (SB 3 BT, SB 3 JTJKK) és egy esetben három

kópiában (SB 3 JT) integrálódott az állatok genomjába (23.ábra). A Southern blottal kapott eredményeket részben QPCR módszerrel is megerősítettük. Az 1,2,4,8 kópiás DNS-ek CT értékéből kalibrációs egyenest állítottunk be, ennek segítségével a SB 3 BT és SB 3 JTJKK alapítóról megállapítottuk, hogy egy kópiában tartalmazzák a transzgént. Az SB 3 JT alapító esetén QPCR-rel nem tudtuk eldönteni, hogy két vagy három kópiát tartalmaz.



23. ábra: A transzgén beépülésének vizsgálata Southern hibridizációval. 1-3 alapító egyedek DNS-e (SB 3 BT, SB 3 JT, SB 3 JTJKK), 4- molekula marker

Az integráció pontos helyének megállapítására Splinkerette PCR-t használtunk. A három alapító (SB 3 BT, SB 3 JT, SB 3 JTJKK) genomjait BfaI restriktions endonukleázzal emésztettük egy éjszakán át, majd a kapott genom darabok mindkét végére adaptereket ligáltunk. Az adapter és a transzgén szekvenciák primer templákként való felhasználásával elvégeztünk egy PCR-t, majd egy nested PCR-t. Az így kapott termékeket gélelektroforézissel elválasztottuk (fotó nincs mutatva), kitisztítottuk és szekvenáltattuk.

Két esetben sikerült meghatározni a transzgén integrációs helyét (24. ábra). A SB 3 BT alapító esetében a 19-es kromoszómán elhelyezkedő 36199348. nukleotidot követően történt meg a transzpozíció. A SB 3 JT alapító esetében a beépülés a 8-as kromoszóma 61471914. nukleotidját követi a beépült transzgén. Egyik beépülés sem érintett gént.

```

SB 3 BT
ggtattcctta gtttaggttt ctctgagaca cagttggaca gctcccagat
gacatttcct ctgagaaaca aacaatttga gtggattcct cctgtagaca
TAGGCCAGGC GGACAGAGAA ACTTTGGGGA AGGCATTCTA ATTAGGCTTG
GGGAAATTTG CTTAAATGC TGGCCTGGGC CCTCAAGATC TGGCACATTT
TCCCAAGCAG CCTGCCCTCA GGGTGGCTGA TACCTCCTTT CCCTCATGGG
CTTTGCCTGC CCTGAGCTCC ACAGAGGCC ATGTAGGTCC CCTCCATGTA
TCCCCTGTGT CCTTGCTCCT GAGCTAggtc cttttttcca gtgcctccat
cagaggtcct ctaatctggc tctctgagtc acaggaaatg tagttctgac
aggtcaggtg caggtgtgtg actgta

SB 3 JT
gtagcataat tagaagcaca ccccaaata tttaaaactg attttattag
tatttttatc tagcagttat aaagtggttc aatcattaca ctgttatatt
ATTTAACAAA AATATTTTGA TATTTTAAACA AAATATAAAA AAGAATCAAA
TTTCATAACA GACTACTAAA CCTTGAATA CCAATGAGAT TTGTTGTAAC
aaaaggaaaa agtctgaag tatgactaat actcaagaat ctaaattttt
ctcattctct tctctgttga ggtacatcaa aatccattgt gctacaatgc

```

24. ábra: A splinkerette PCR segítségével megállapított beépülési helyek szekvenciái, a nagybetűk a megszekvenált szakaszt, a kisbetűk annak genomi környezetét jelölik..

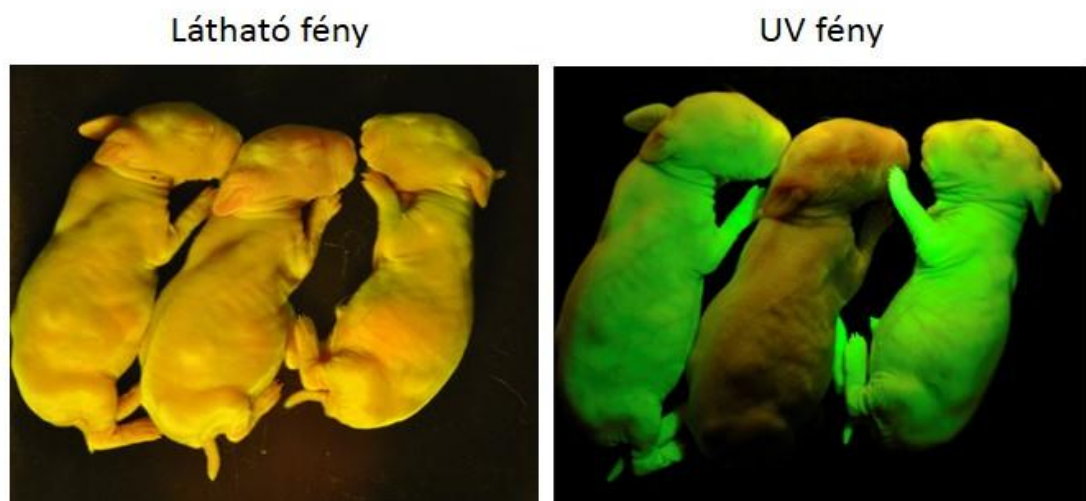
#### 4.2.6. Transzgénikus vonal létrehozása

A 7 megszületett transzgénikus egyed közül kiválasztottunk négyet (3 hím, 1 nőstény) és ezekkel vonalat alapítottunk. Az alapítókat hasonló korú kontroll egyedekkel pároztattuk. Mind a 4 esetben sikerült transzgénikus F1 utódokat létrehozni, ezek mindegyike expresszált is a transzgént. A vonal alapítások összegzése a 10. táblázatban található, a transzgén öröklődése megfelel a mendeli szabályoknak..

10. táblázat: Négytranszgénikus alapító F1 utódjainak összefoglaló táblázata

Alapítók	Transzgénikus utódok száma/ összes utód száma	GFP + utódok száma/ összes utód száma
SB 3 BT (hím)	16/38	16/38
SB 3 JT (nőstény)	9/16	9/16
SB 3 JTJJKK (hím)	4/10	4/10
SB 20 BT (hím)	6/13	6/13
Összesen	35/77	35/77

Miután Southern blot segítségével (23. ábra, 1. minta) meghatároztuk, hogy a SB 3 BT alapító genomjába egy kópiában épült be a transzgén, majd sikerült kimutatnunk, hogy ez az integrációs esemény nem érint gént. Kiválasztottuk ezt az alapítót, és beltenyésztéssel homozigóta vonalat hoztunk létre. Ezt a vonalat az állatházunkban fenntartjuk. A 23. ábrán két ebből a vonalból származó F1 utód látható egy nem transzgénikus alomtestvérükkel.



25. ábra: Transzgénikus F1 utódok és nem transzgénikus alomtestvérük.



## **5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK**

1. Transzpozon alapú transzgenézissel a világon először sikerült transzgénikus nyulat előállítanom.

2. Részt vettem a világon elsőként lentivírus alapú transzgenézis segítségével létrehozott nyulak előállításában.

3. A lentivírusos transzgenézissel létrehozott alapítók mozaikosak ugyan, viszont a transzgén mindhárom csíravonal szöveteiben expresszálódhat. Megállapítottam, hogy a transzgén öröklődése a lentivírus használata esetén nagyon alacsony hatékonyságú nyúlban.

4. A Sleeping Beauty transzpozon rendszerrel sikerült létrehoznom egy olyan riporter gént stabilan, minden szövetében expresszáló transzgénikus nyúlvonalat, amely az eddigiekben a szakirodalomból hiányzott és további kísérleteinkhez elengedhetetlen.

5. A Sleeping Beauty transzpozon rendszerrel enyhén mozaikos, de a transzgén tekintetében mendeli öröklődést mutató vonalat sikerült létrehoznom, amelyben géncsendesítést nem tapasztaltam. Megállapítottam, hogy a Sleeping Beauty transzpozon rendszerrel olyan transzgénikus alapítók hozhatók létre, amelyekben a beépülések száma alacsony és nem érint géneket.

6. Nyúlban a lentivírus és a transzpozon alapú módszerek összehasonlításával megállapítottam, hogy a Sleeping Beauty transzpozon rendszer mind hatékonyságában, mind használhatóságában felülmúlja a hasonló, eddig alkalmazott módszereket.



## 6. *EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA ÉS JAVASLATOK*

A nyúl fontos modellállat a különböző humán betegségek tanulmányozására, illetve fehérjék termeltetésére is gyakorta használják. Azonban az ilyen hasznosítású transzgenikus vonalak létrehozásának hatékonysága az eddigiekben nagyon alacsonynak bizonyult (Bósze et al. 2003). Munkám célja az volt, hogy különböző, napjainkban más fajokon már sikerrel alkalmazott, második generációs technológiák segítségével hozzak létre riporter gént expresszáló transzgenikus nyúlvonalakat. Ezek a vonalak ugyan jól használhatók különböző fejlődésbiológiai kérdések tisztázására, mégis kísérleteimnek fő célja, hogy bizonyítsa a második generációs módszerek használhatóságát és hatékonyságát nyúl esetében is.

Laboratóriumunkban is a hagyományos DNS mikroinjektálás módszerét alkalmaztuk az eddigiekben transzgenikus nyúl vonalak létrehozására. Saját kísérleteinkben a megszületett utódok körülbelül egy, de maximum 6%-a lesz transzgenikus a hagyományos DNS alapú transzgenezis esetén (nem publikált adat). Ezen módszer alternatívájaként próbáltuk ki a lentivírusos és a transzpozon alapú technológiákat.

A lentivírusos transzgenezis azért hódított teret, mert a lentivírus vektorok nem osztódó sejtek genomjába is képesek integrálódni. Ráadásul a lentivírus vektorok viszonylag nagy transzgenek bevitelére képesek.

Laboratóriumunkban az elkészített lentivírus vektort az egysejtes nyúl embriók perivitellináris terébe injektáltuk, hiszen a vírus sejtmembránon át is képes a fertőzésre. A lentivírusos technológia egyik nagy előnye, hogy ez a mikroinjektálási módszer könnyebben kivitelezhető és kevésbé romboló az embriókra, mint az előmagba történő mikroinjektálás. Ezt alátámasztják kísérleteink is, hiszen az anyák 81%-a szült és a beültetett embriók 29,8%-a megszületett. Ez az arány nagyon magas, ha összehasonlítjuk előző kísérleteinkkel (Hiripi 2001; Bodrogi et al. 2006). Az utódok 53%-a halva született, ami valószínűleg annak tudható be, hogy a recipiens anyákba túl sok életképes embrió lett beültetve (anyánként 20-30 embrió). Ezt alátámasztják a magas alomszámok is, a sok magzat nem volt képes együtt fejlődni, így már halva születtek, vagy napos korban elhullottak. Későbbi kísérleteink során az egy anyába ültetett embriók számát lecsökkentettük 15-20 embrióra.

Igaz, hogy a lentivírus konstrukciók perivitellináris térbe való mikroinjektálása kevésbé károsítja az embriókat, így több magzatot eredményez, viszont vannak hátulütői is a lentivírusos technikának. A lentivírus integrációjához szükséges idő hosszabb, mint egy lineáris DNS fragment esetén, így gyakrabban jöhetnek létre mozaikos utódok. Ráadásul a nyúl embriófejlődés sajátossága, hogy az első és második osztódás viszonylag hamar lezajlik, így a transzgen nagyobb eséllyel már csak az egyik utódsejtbe épül be.

Az egér embrió kétsejtessé osztódása a termékenyülés után 24 órával zajlik le, két és fél napon pedig morula állapotban van. Ehhez képest a nyúl embriófejlődésének 16-ik órájában már kétsejtes állapotban van, a morula állapot eléréséhez pedig mindössze 32 órára van szüksége (Yang and Kazazian 2006). Ez a gyors fejlődés könnyen mozaikos alapítók létrejöttéhez vezet.

Esetünkben az összes (28 darab) alapító különböző mértékben ugyan, de mozaicizmust mutatott, ami alátámasztja az előző felvetést. Az általunk kiválasztott négy – vizuálisan kevésbé mozaikosnak tűnő – alapítótól 215 darab F1 utód született. Ezek közül egy transzgénikus állat sem született meg. A 215 darab F1 utód közül összesen három esetben tudtuk PCR-rel kimutatni a transzgén jelenlétét. Két – halva született – utód hordozta ugyan a transzgént, de fehérjeszintű expressziót nem tapasztalunk esetükben. Ezt a csendesítést valószínűleg különböző epigenetikai módosítások okozhatják, amit már más emlősök esetében is leírtak lentivírusos transzgenezis esetében (Hofmann et al. 2006). Egy 13,5 napos magzat minden szövetében fehérje szinten is expresszálta a transzgént. Tehát a SIV lentivírus konstrukcióval bejuttatott transzgén öröklődése megtörtént.

Fontos megemlíteni, hogy a SIV alapú lentivírus konstrukció előtt több HIV alapút is kipróbáltunk és ezek egyike sem működött nyúl esetében. Ez az érdekes tény további kutatások alapját képezheti, érdemes lenne megállapítani, hogy vajon ezen a fajon miért nem működnek a HIV alapú konstrukciók.

További kísérleteket lehetne végezni azzal kapcsolatban, hogy mekkora promóter szükséges a konstrukcióba. Mivel a lentivírus hordozókapacitása közepesnek mondható, így a szabályozó szekvenciák rövidítésével teret nyernénk a transzgén szekvenciának. Ráadásul egyre rövidebb promótereket tartalmazó konstrukciók expresszióját alapító egyedek esetében is lehet vizsgálni, így nem szükséges a transzgén öröklődése.

Összességében a lentivírusos transzgenezis nyúl esetében fél sikerrel zárult, hiszen nagyszámú transzgénikus alapítót eredményezett, ugyanakkor a transzgénikus vonal alapítás nem történt meg a transzgén rossz öröklődése miatt. Elmondható, hogy a perivitellináris térbe történő mikroinjektálás az embriókat kevésbé károsítja, amit alátámasztanak a kitűnő születési ráták és magas alomszámok.

Bár ivarsejt szinten több esetben ki tudtuk mutatni a transzgén jelenlétét, az az élve született utódokban nem volt jelen. Mindezen eredmények azt mutatják, hogy a SIV lentivírus konstrukció használata a nyúl transzgeneziséhez ugyan sikeres, de nem a legmegfelelőbb módszer. Kísérleteink bizonyították, hogy a nyúl embrió fejlődésének gyorsasága és a beépült gén csendesítése miatt a transzgén öröklődése nehézkes. Ugyanakkor ezt a módszert fel tudjuk használni olyan kísérletekben, ahol nem szükséges a transzgén öröklődése.



A Sleeping Beauty transzpozon rendszer egy 1997-ben molekuláris módszerekkel és magyar kutatók közreműködésével feltámasztott transzpozonon alapul (Ivics et al. 1997). Felélesztése óta meghódította a transzgenikus laboratóriumokat és mára az egyik legígéretesebb transzgenikus technikává fejlődött. Sikerének titka nemcsak a hatékonyságában rejlik, nagy előnye még, hogy a Sleeping Beauty transzpozon rendszerrel előállított transzgenikus állatok csak töredékében tapasztalható géncsendesítés. Mára szinte minden laboratóriumi és modellállaton sikeresen tesztelték ezt a transzpozon rendszert. A Sleeping Beauty transzpozon rendszer alkalmas nagyobb gazdasági haszonállatok transzgenéziséhez is (Garrels et al. 2012), ugyanakkor a nyúlra való tesztelése mindezidáig váratott magára.

Kísérleteink során az előállított Sleeping Beauty transzpozon rendszer elemeit tartalmazó injektáló oldattal mikroinjektáltunk egysejtes nyúl embriókat. A mikroinjektálást az embriók apai előmagjába végeztük, hiszen az injektáló oldatban található transzgen egy cirkuláris plazmidon van jelen. A mikroinjektált és beültetett embriók 10 %-a, 46 kisnyúl született meg. A vemhesülési arány 40%-os volt, ami megszokottnak mondható. Az alomszámok kicsivel alacsonyabbak voltak a lentivírusos technológiához képest. Ez esetben 2 és 11 között változtak. A kisnyulak 87%-a élve született, ami bizonyítja, hogy ez esetben sikerült jól eltalálnunk a beültetendő embriók számát anyánként. Elmondható, hogy 15-20 embrió beültetése egy recipiens anyába biztonságosabb, mint a lentivírusos transzgenézis esetén alkalmazott 20-30 embrió transzfer.

A megszületett 46 kisnyúl 15%-a transzgenikusnak bizonyult. Mind a hét darab alapító expresszáta is a transzgent, géncsendesítést nem tapasztaltunk. Az alapítóknak ugyanúgy, mint a lentivírusos transzgenézis esetén, itt is megfigyelhető volt mozaikosság, azonban a négy szaporításra kiválasztott alapító mindegyike ivarsejtjeiben hordozta és örököltette a transzgent. Tehát mindkét technológia mozaicizmussal jár, azonban a SB transzgenézis esetében inkább a nyúl embrió gyors fejlődésének, mintsem a technológia sebességének tudható be a jelenség. Ezt támasztja alá az is, hogy egérben sokkal kevesebb esetben lép fel mozaikosság az SB transzpozon rendszer használatakor, mint nyúlban (Katter et al. 2012).

A SB 3 BT alapító transzgen beépülésének és riporter gen expressziójának széleskörű vizsgálata után homozigóta vonalat alapítottunk. A vonalban több generáció után sem jelentkezett géncsendesítés, az utódok egészségesek, fejlődésük és fiziológiai paramétereik nem térnek el hasonló korú társaiktól. A transzgen jelenlétét különböző szövetek metszetein is megvizsgáltuk, egyetlen sejt típus esetén sem tapasztaltunk géncsendesítést, egérben ugyanakkor leírtak ilyen esetet (Katter et al. 2012).

Elmondható, hogy a Sleeping Beauty transzpozon rendszerrel gyorsan és hatékonyan sikerült homozigóta formában fenntartható, Venus riporter gént expresszáló transzgenikus nyúl

vonalat létrehoznunk. Ez a rendszer bizonyult a leghatékonyabbnak és biztosabbnak a nyúl transzgeneziséhez.

Ennek a transzgénikus vonalnak olyan kutatásokban van jelentősége, ahol jelölt sejt vonalakra van szükség. A Venus riporter gén segítségével láthatóvá tehető sejtek sorsát egy kiméra embrión vagy állaton végig lehet követni. Nyúl őssejt vonalak alapításában is fontos segítséget nyújt ez a transzgénikus vonal. Ilyen kísérletek már folynak az MBK Állatbiotechnológiai Intézetének Alkalmazott Embriológia és Őssejt Kutató csoportjában.

A három laboratóriumunkban alkalmazott módszer összehasonlításával (11. táblázat) megállapíthatjuk, hogy a lentivírusos transzgenezis használatával dupla annyi transzgénikus utódot kaptunk, mint a Sleeping Beauty transzpozon rendszer esetén. Azonban a lentivírusos alapítók a transzgént valószínűleg mozaikosságuk és géncsendesítési folyamatok miatt nem örökítették át élő utódokba. Ezzel szemben a transzpozon alapú rendszerben még a fellépett mozaicizmus ellenére is a mendeli szabályoknak megfelelő arányú transzgénikus utódot kaptunk. A plazmid alapú transzgenezisnek messze elmarad a hatékonysága a két második generációs módszertől, viszont sokkal jobb az öröklődés hatékonysága, mint a lentivírusos transzgenezis esetében.

11. táblázat: Különböző transzgénikus technikák összehasonlítása

	Plazmid alapú transzgenezis	Lentivírus alapú transzgenezis	Sleeping Beauty transzpozon rendszer
transzgenezis hatékonysága	1-6%	32%	15%
hordozó kapacitás	>2 Mb	<10 kb	<6 kb
beépülés helye	random	random	random (TA)
beépülés formája	konkatamer	egyedi	egyedi
expresszió aránya	50%	21%	100%
öröklődés	jó hatékonysággal	rossz hatékonysággal	mendeli úton

Az általam vizsgált két módszer hasonlósága, hogy az integráció helye random, bár a Sleeping Beauty transzpozáznak TA célszekvenciája van. A hordozó kapacitást tekintve a lentivírus vektorok felülmúlják a Sleeping Beauty transzpozont, azonban utóbbinak is elég a kapacitása egy eukarióta génexpressziót biztosító kazetta beviteléhez. (Legnagyobb hordozó kapacitással természetesen a BAC transzgenezis rendelkezik, ebben az esetben akár több eukarióta gén teljes kódoló szekvenciáját is bejuttathatjuk transzgénként.) Mind három módszer esetében elmondható, hogy a bevinni kívánt transzgén hosszának növelésével a transzgenezis hatékonysága csökken.

Ahogy az ENCODE projekt révén kezdjük megismerni a génektől távolabb elhelyezkedő szabályozó szekvenciák jelentőségét, úgy egyre nagyobb igény alakul ki a hosszabb szekvenciák hatékony bevitelére. A jövőben hasznos lenne a transzpozon rendszer hordozó kapacitásának növelése, hogy akár a BAC transzgenézishez hasonló méretű transzgén szekvenciákat is képesek legyünk bevinni segítségével. Ennek a technikának a kidolgozása nyúl is lehetséges és fontos lenne.

A két utóbbi rendszer nagy előnye, hogy nem jellemző rájuk a konkatamerek beépülése, ami a BAC transzgenézis és a hagyományos DNS alapú transzgenézis sajátossága. A konkatamerek genombeli elhelyezkedésének és kópiaszámának meghatározása nagyon nehézkes, így transzgenikus vonalak előállításához az ilyen alapítók használata azért nem célszerű, mert a belőlük létrehozott vonal jellemzése akadályokba ütközhet. A lentivírusos és a transzpozon alapú transzgenézis esetében is a transzgén az esetek döntő többségében egy vagy néhány kópiában épül be a genom egy véletlenszerű helyére, konkatamerek képződése nélkül.

A transzgenézis területén a szekvencia specifikus nukleáz technológiák térhódítására lehet számítani. A TALEN vagy a ZFN (zink finger nuclease) technológiák magas hatékonyság mellett teszik lehetővé gének célzott kiütését. Gyorsaságuk és egyszerűségük (vö. knock out technológia) miatt már most is sok laboratórium alkalmazza ezeket az eljárásokat, igaz egyelőre borsos áron. Ezek a módszerek nyúl esetében is jól működnek, laboratóriumunkban tervezzük a TALEN technológia kipróbálását.

Munkám összegzéseként elmondható, hogy mind a lentivírus alapú transzgenézissel, mind a Sleeping Beauty transzpozon rendszerrel sikerült transzgenikus utódokat létrehoznunk. Találtuk a napjainkban elérhető technológiák közül egy olyat, ami nyúl esetében is hatékonyan alkalmazható. A Sleeping Beauty transzpozon rendszert fogjuk alkalmazni további kutatásaink során a nyúl transzgenéziséhez.



## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A nyúl, mint modellállat jelentősége az élettudományok területén vitathatatlan. Ez a faj gyakran alkalmazott modellje a humán betegségeknek, különösen alkalmas rekombináns fehérjék termeltetésére és reprodukciós kísérleteknek is gyakori alanya, tartása és tenyésztése viszonylag költséghatékonyan megoldható. Széleskörű alkalmazása miatt jól tanulmányozott laboratóriumi állat, bár az egéren és patkányon már hosszú ideje sikerrel és jó hatásfokkal alkalmazott technológiák nyúl esetében még nem ennyire kidolgozottak.

Ilyen technológia a nyúl transzgenézise is, amely a faj gyakori laboratóriumi használata ellenére nagyon alacsony hatékonysággal működik. Munkám célja volt azt a szakirodalmi hézagot befoltozni, ami a hatékony nyúl transzgenézishez kapcsolható és egy megfelelően alkalmazható eljárást kialakítani a transzgenikus nyúlmodellek előállításának támogatására.

Munkám során két olyan második generációs transzgenikus technikát próbáltam ki nyúl esetében, amelyek más fajok esetében már bizonyították hatékonyságukat. A lentivírusos technológia alkalmazásával sikerült hatékonyan létrehozni transzgenikus alapítókat. A transzgenézis hatékonysága 32%-os volt, ami kifejezetten magas értéknek tekinthető, ha összevetjük az általunk eddig alkalmazott hagyományos vagy DNS alapú mikroinjektálás 1-6%-os hatékonyságával. A megszületett alapítók mindegyike nagymértékű mozaicizmust mutatott. A számos megszületett és ivarérett kort megélt alapító tenyésztésével mégsem sikerült transzgenikus vonalat létrehozni, ennek magyarázata a mozaicizmus, illetve a lentivírusos transzgenézishez kapcsolható géncsendesítés lehetett. A transzgen öröklődését ugyanakkor három esetben bizonyítottuk.

A lentivírusos technológia után tovább léptünk és megpróbálkoztunk a Sleeping Beauty transzpozon rendszerrel. Ezt a transzpozon alapú módszert is tesztelték már számos laboratóriumi és haszonállaton, azonban nyúl esetében még nem. A Sleeping Beauty transzpozáz alapú technológia esetén a megszületett utódok 15%-a bizonyult transzgenikusnak. A teljes körű molekuláris jellemzés után kiválasztott négy alapító mindegyikével képesek voltunk vonalat alapítani. Egy alapító beltenyésztésével homozigóta vonalat alakítottunk ki, amelyet állatházunkban fenntartunk és más kutatási tevékenységeinkhez felhasználunk.

Elmondható, hogy ugyan mindkét technológiával sikerült transzgenézist elérnünk nyúl esetében, mégis a Sleeping Beauty transzpozon rendszer bizonyult hatékonyabbnak. A két módszerrel sokkal gyorsabban és kevesebb idő és anyagi ráfordítással tudtunk létrehozni transzgenikus egyedeket. Kísérleteim eredményeképpen laboratóriumunkba bevezettük a

Sleeping Beauty transzpozon rendszer alkalmazását, amelyet azóta több esetben is sikerrel alkalmaztunk.

Ha hozzávesszük a hagyományos DNS mikroinjektálást a két vizsgált módszerhez, akkor egy jól látható fejlődés bontakozik ki a szemünk előtt a transzgenézis területén. Az a körülbelül 30 éves tendencia, hogy egyre gyorsabban, biztosabban és költséghatékonyabban vagyunk képesek transzgénikus állatok előállítására előrevetíti ezek alap- és alkalmazott kutatásokban történő mindinkább szélesebb körű felhasználását. Ez az előrehaladás nyúl esetében is tapasztalható, igaz kisebb késleltetéssel a gyakrabban használt laboratóriumi állatokhoz (egér, patkány) képest. Ennek a fejlődésnek az előremozdításában kutatócsoportunk nagy szerepet vállalt, mind a SIV-alapú lentivírusos transzgenézissel (Hiripi et al. 2010), mind a Sleeping Beauty transzpozáz rendszer (Katter et al. 2012) elsőként történő alkalmazásával nyúlban.

Az állatvédelem nagyon fontos a laboratóriumi állatok esetében is. Az általam használt második generációs technológiák hatékonyságuk révén segítenek a kísérleti állatlétszám csökkentésében, így hozzájárulnak a 3R szabály megvalósításához.

A nyúl, ami eddig is gyakran alkalmazott modellállata volt az orvostudománynak és a rekombináns fehérjék termeltetésében is tagadhatatlan szereppel bír, egyre gyakoribb célpontja a transzgenézisnek. Munkám megalapozza a hatékony és egyszerű genetikai módosítását ennek az állatfajnak, ami mindezidáig hiányzott a szakirodalomból.

A jövőben a Sleeping Beauty transzpozon rendszerrel olyan transzgénikus nyúlvonalat szeretnék előállítani, amelyben a már ismert helyre bevitt, stabilan öröklődő és expresszáldó riporter gént rekombináns technológia segítségével egy másik, olyan génné lehet cserélni, amely alapvetési jelentőséggel bír.

## ***8. SUMMARY***

There is an indisputable significance of the rabbit as a model animal for life sciences. This species is commonly used to model human diseases, in particular for the production of recombinant proteins or reproduction studies, because the housing and breeding of rabbit is relatively cost-effective. Because of its extensive use the rabbit is a well-studied laboratory animal. Although there are plenty methods, which are refined in case of other laboratory animals such as mouse or rat, but in case of rabbit they have low efficiency.

Despite that the rabbit is a very important laboratory animal model for study of several human diseases, the transgenesis of the rabbit is inefficient. As it was absent from the literature, my aim was to develop a novel, efficient procedure to support the creation of a transgenic rabbit line.

In my work, two second-generation transgenic techniques have been used, these methods have already proven their effectiveness in other species. With the application of the lentiviral technology we could create transgenic founders. The efficiency of the transgenesis was 32%, which is considered as a very high value when compared to our previous treatment based on conventional DNA microinjection. All the founders shown highly mosaic pattern. Despite the huge number of founders and F1 generation pups, we did not manage to establish a transgenic line. One possible explanation could be the mosaicism or the gene silencing which is inherent in the lentiviral systems. However, inheritance of the transgene was demonstrated in three cases, thus the germline transgenesis was successful.

After using the lentiviral technology we applied the Sleeping Beauty transposon system. This transposon mediated method has been tested on a number of laboratory and farm animals, but not on rabbit. In case of Sleeping Beauty transposon mediated technique the transgenesis efficiency proved to be 15%. After the fully comprehensive characterisation of the founders we selected four animals. With all the four selected founders we were able to establish a transgenic line. With inbreeding we developed a homozygous line, which we maintain in our animal facility and use for other studies.

Although, with both technologies we achieved efficient transgenesis rates in case of rabbit, the Sleeping Beauty system was still more useful. With this two second-generation method we could create transgenic rabbits in a much faster and less expenditure-needed way than with conventionally transgenesis. As a result of my work we introduced the application of the Sleeping Beauty transposon system to our laboratory, which has been successfully applied in many cases ever since.

If we review the conventional and this two second-generation methods a highly visible development unfolds before our eyes in the field of transgenesis. A 30-year trend, while the transgenesis become faster, more secure and cost-effective, anticipates the growing availability of the transgenic animals in fields of fundamental and applied research. This progress can also be observed in rabbit with a slight delay, if we compare it with other frequently used laboratory animals (rats, mice). Our group played a large role in the advancement of rabbit transgenesis with the first administration of the lentiviral (Hiripi et al. 2010) and the Sleeping Beauty transposon mediated (Katter et al. 2012) transgenesis.

Animal protection is an important issue also in a case of laboratory animals. The second-generation techniques used in my experiments contribute to realise the 3R rule by their effectiveness in decreasing the number of animal subjects.

Rabbit, which is often used as an animal model of human diseases and has an undeniable role in the production of recombinant proteins, is becoming a more frequent target of the transgenesis. My work grounds a simple and efficient way of the genetic manipulation of this species, which has so far been lacked in the scientific literature.

In the future I would like to establish a rabbit line with Sleeping Beauty mediated transgenesis, which carries a single reporter gene as a transgene with recombinase mediated cassette exchange sites. Thereafter the reporter gene may be replaced to another gene, which has a fundamental research importance.



## 9. MELLÉKLETEK

### 9.2. IRODALOMJEGYZÉK

1. Amado, R. G. and I. S. Y. Chen (1999). "Lentiviral Vectors--the Promise of Gene Therapy Within Reach?" Science **285**(5428): 674-676.
2. Aravin, A. A., G. J. Hannon, et al. (2007). "The Piwi-piRNA Pathway Provides an Adaptive Defense in the Transposon Arms Race." Science **318**(5851): 761-764.
3. Berg, D. E. and M. M. Howe (1989). Mobile DNA. Washington, American Society for Microbiology.
4. Besenfelder, U. and G. Brem (1993). "Laparoscopic embryo transfer in rabbits." Journal of Reproduction and Fertility **99**(1): 53-56.
5. Bodrogi, L., R. Brands, et al. (2006). "High Level Expression of Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase in the Milk of Transgenic Rabbits." Transgenic Research **15**(5): 627-636.
6. Bourc'his, D. and T. H. Bestor (2004). "Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L." Nature **431**(7004): 96-99.
7. Bősze, Z., Hiripi, L., Carnwath, J. W., Niemann, H. (2003). "The Transgenic Rabbit as Model for Human Diseases and as a Source of Biologically Active Recombinant Proteins." Transgenic Research **12**(5): 541-553.
8. Brophy, B., Smolenski, G. , Wheeler, T. , Wells, D. , L'Huillier, P. , and Laible, G (2003). "Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of b-casein and k-casein." Nat. Biotechnol. **21**, 157–162.
9. Carlson, D., A. Geurts, et al. (2011). "Efficient mammalian germline transgenesis by cis-enhanced Sleeping Beauty transposition." Transgenic Research **20**(1): 29-45.
10. Chénais, B., A. Caruso, et al. (2012). "The impact of transposable elements on eukaryotic genomes: From genome size increase to genetic adaptation to stressful environments." Gene **509**(1): 7-15.
11. Claeys Bouuaert, C., Chalmers R (2013). "Transposition Is Sensitive to the Topology of the Transposon Donor and the Target." PLoS ONE **8**(1): e53690.
12. Cordaux, R. and M. A. Batzer (2009). "The impact of retrotransposons on human genome evolution." Nat Rev Genet **10**(10): 691-703.
13. Craig, N. L., Robert Craigie, Martin Gellert, Alan M. Lambowitz (2001). Mobile DNA II. Washington, American Society for Microbiology.
14. Cui, Z., A. M. Geurts, et al. (2002). "Structure–Function Analysis of the Inverted Terminal Repeats of the Sleeping Beauty Transposon." Journal of Molecular Biology **318**(5): 1221-1235.
15. Dai, J., W. Xie, et al. (2007). "Phosphorylation Regulates Integration of the Yeast Ty5 Retrotransposon into Heterochromatin." Molecular Cell **27**(2): 289-299.
16. Deng, M. and X. Yang (2001). "Full term development of rabbit oocytes fertilized by Intracytoplasmic sperm injection&ast." Molecular Reproduction and Development **59**(1): 38-43.
17. Desrosiers, R. (2001). "Nonhuman lentiviruses." Fields Virology pp **2095-2121**.
18. Devon, R. S., D. J. Porteous, et al. (1995). "Splinkerettes—improved vectorettes for greater efficiency in PCR walking." Nucleic Acids Research **23**(9): 1644-1645.
19. Du, S. J., Z. Gong, et al. (1992). "Growth Enhancement in Transgenic Atlantic Salmon by the Use of an [ldquo]All Fish[rdquo] Chimeric Growth Hormone Gene Construct." Nat Biotech **10**(2): 176-181.

20. Dull, T., R. Zufferey, et al. (1998). "A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System." Journal of Virology **72**(11): 8463-8471.
21. Eickbush, T. H. (1992). "Transposing without ends: the non-LTR retrotransposable elements." The New biologist **4**(5): 430-440.
22. Emmons, S. W., L. Yesner, et al. (1983). "Evidence for a transposon in *Caenorhabditis elegans*." Cell **32**(1): 55-65.
23. Ereky, K. (1919). Biotechnologie der Fleisch-, Fett-, und Milcherzeugung im landwirtschaftlichen Grossbetriebe: für naturwissenschaftlich gebildete Landwirte verfasst. Berlin, P. Parey.
24. Esnault, C., Maestre J, Heidmann T. (2000). "Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes." Nat Genet. 2000 Apr;24(4):363-7.
25. Feschotte, C., N. Jiang, et al. (2002). "Plant transposable elements: where genetics meets genomics." Nat Rev Genet **3**(5): 329-341.
26. Feschotte, C., Pritham EJ. (2007). "DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes." Annu Rev Genet. 2007;41:331-68.
27. Gandolfi, F. (1998). "REVIEW: Spermatozoa, DNA binding and transgenic animals." Transgenic Research **7**(3): 147-155.
28. García-Pérez, M. M.-L. a. J. L. (2010). "DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics." Curr Genomics. 2010 April; 11(2): 115–128.
29. Garrels, W., Z. Ivics, et al. (2012). "Precision genetic engineering in large mammals." Trends in Biotechnology **30**(7): 386-393.
30. Geurts, A., A. Wilber, et al. (2006). "Conditional gene expression in the mouse using a Sleeping Beauty gene-trap transposon." BMC Biotechnology **6**(1): 30.
31. Geurts, A. M., Y. Yang, et al. (2003). "Gene Transfer into Genomes of Human Cells by the Sleeping Beauty Transposon System." Mol Ther **8**(1): 108-117.
32. Goff, S. (2001). "Retroviridae: the retroviruses and their replication." Fields Virology pp **1871-1939**.
33. Gogvadze, E. and A. Buzdin (2009). "Retroelements and their impact on genome evolution and functioning." Cellular and Molecular Life Sciences **66**(23): 3727-3742.
34. Golovan, S. P., R. G. Meidinger, et al. (2001). "Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure." Nat Biotech **19**(8): 741-745.
35. Gordon, J. W. and F. H. Ruddle (1981). "Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei." Science (New York, N.Y.) **214**(4526): 1244-1246.
36. Gordon, J. W., G. A. Scangos, et al. (1980). "Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA." Proceedings of the National Academy of Sciences **77**(12): 7380-7384.
37. Hammer, R. E., V. G. Pursel, et al. (1986). "Genetic Engineering of Mammalian Embryos." Journal of Animal Science **63**(1): 269-278.
38. Haskell, R. E. and R. A. Bowen (1995). "Efficient production of transgenic cattle by retroviral infection of early embryos." Molecular Reproduction and Development **40**(3): 386-390.
39. Heape, W. (1891). "Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother." Proc. R. Soc. 48, 457-458.
40. Hiripi, L. (2001). A nyúl kappa-kazein gén jellemzése, és termelésének hatása transzgénikus állatokban. Doktori értekezés.

41. Hiripi, L., F. Makovics, R. Halter, M. Baranyi, D. Paul, J.W. Carnwath, Zs. Bösze, and H. NiemannL. (2003). "Expression of Active Human Blood Clotting Factor VIII in Mammary Gland of Transgenic Rabbits." DNA and Cell Biology. January 2003, Vol. 22, No. 1: 41-45.
42. Hiripi, L., D. Negre, et al. (2010). "Transgenic rabbit production with simian immunodeficiency virus-derived lentiviral vector." Transgenic Research **19**(5): 799-808.
43. Hofmann, A., Barbara Kessler, Sonja Ewerling, Andrea Kabermann, Gottfried Brem, Eckhard Wolf and Alexander Pfeifer (2006). "Epigenetic Regulation of Lentiviral Transgene Vectors in a Large Animal Model." Molecular Therapy (2006) **13**, 59–66.
44. Hogan, B., Costantini F, Lacy E, Ed. (1986). Manipulating the Mouse Embryo, Introduction of new genetic information into the developing mouse embryo. CSH, New York.
45. Ivics, Z., P. B. Hackett, et al. (1997). "Molecular Reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like Transposon from Fish, and Its Transposition in Human Cells." Cell **91**(4): 501-510.
46. Izsvák, Z., Z. Ivics, et al. (2000). "Sleeping Beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates." Journal of Molecular Biology **302**(1): 93-102.
47. Jaenisch, R. (1976). "Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus." Proceedings of the National Academy of Sciences **73**(4): 1260-1264.
48. Jaenisch, R., H. Fan, et al. (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." Proceedings of the National Academy of Sciences **72**(10): 4008-4012.
49. Jahner, D., Stuhlmann H. , Steward C.L., Harbers K. , Löhler J., Simon I. & Jaenisch R. (1982). "De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis." Nature **298**, 623 - 628 (12 August 1982); doi:10.1038/298623a0.
50. Katter, K., A. M. Geurts, et al. (2012). "Transposon-mediated transgenesis, transgenic rescue, and tissue-specific gene expression in rodents and rabbits." The FASEB Journal.
51. Kolacsek, O., V. Krizsik, et al. (2011). "Reliable transgene-independent method for determining Sleeping Beauty transposon copy numbers." Mobile DNA **2**(1): 5.
52. Kumar, M., Keller B., Makalou N., and Richard E. Sutton (2004). "Systematic Determination of the Packaging Limit of Lentiviral Vectors." Human Gene Therapy. **12**(15): 1893-1905.
53. Lai, L., J. X. Kang, et al. (2006). "Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids." Nat Biotech **24**(4): 435-436.
54. Lee, S.-J. and A. C. McPherron (2001). "Regulation of myostatin activity and muscle growth." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(16): 9306-9311.
55. Lever, A. M. L., P. M. Strappe, et al. (2004). "Lentiviral Vectors." Journal of Biomedical Science **11**(4): 439-449.
56. Levin, H. L. and J. V. Moran (2011). "Dynamic interactions between transposable elements and their hosts." Nat Rev Genet **12**(9): 615-627.
57. Lin, T. P. (1966). "Microinjection of mouse eggs." Science (New York, N.Y.) **151**(3708): 333-337.
58. Liu, G., E.L. Aronovich, Z. Cui, C.B. Whitley, P.B. Hackett and (2004). "Excision of Sleeping Beauty transposons: parameters and applications to gene therapy." J Gene Med, **6** (2004), pp. 574–583.
59. Lois, C., E. J. Hong, et al. (2002). "Germline Transmission and Tissue-Specific Expression of Transgenes Delivered by Lentiviral Vectors." Science **295**(5556): 868-872.

60. Mátés, L., M. K. L. Chuah, et al. (2009). "Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates." Nat Genet **41**(6): 753-761.
61. McClintock (1948). "Mutable loci in maize." Carnegie Inst. Wash. Year Book.
62. McPherron, A. C. and S.-J. Lee (1997). "Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(23): 12457-12461.
63. Mills, R. E., E. A. Bennett, et al. (2007). "Which transposable elements are active in the human genome?" Trends in Genetics **23**(4): 183-191.
64. Mintz, R. J. a. B. (1974). "Simian Virus 40 DNA Sequences in DNA of Healthy Adult Mice Derived from Preimplantation Blastocysts Injected with Viral DNA." PNAS 1974 71 (4) 1250-1254.
65. Mullis, K., Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol.
66. Murray, J. D., G.B. Anderson, A.M. Oberbauer and M.M McGloughlin (1999) "Transgenic Animals in Agriculture."
67. Naldini, L., Blomer U., Gally P., Ory D., Mulligan R., Gage FH., Verma IM., Trono D (1996). "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector." Science **272**(5259): 263-267.
68. Nègre, D., Cosset, F.L. (2002). "Vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIV)." Biochimie, Volume 84, Issue 11, 1 November 2002, Pages 1161–1171.
69. Niemann, H. and W. A. Kues (2003). "Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine." Animal Reproduction Science **79**(3–4): 291-317.
70. Niemann, H. and W. A. Kues (2007). "Transgenic farm animals: an update." Reproduction, Fertility and Development **19**(6): 762-770.
71. O'Donnell, K. and K. Burns (2010). "Mobilizing diversity: transposable element insertions in genetic variation and disease." Mobile DNA **1**(1): 21.
72. Pages, J. C., Bru T.J. (2004). "Toolbox for retrovectorologists." Gene Med. **6** S67-S82.
73. Palmiter, R. D., R. L. Brinster, et al. (1982). "Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes." Nature **300**(5893): 611-615.
74. Park, F. (2007). "Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis?" Physiological Genomics **31**(2): 159-173.
75. Park, F., Kazuo Ohashi, Winnie Chiu, Luigi Naldini & Mark A. Kay (2000). "Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling in vivo." nature genetics • volume 24 • january 2000, letter.
76. Perry, A. C. F., T. Wakayama, et al. (1999). "Mammalian Transgenesis by Intracytoplasmic Sperm Injection." Science **284**(5417): 1180-1183.
77. Pfeifer, A. (2004). "Lentiviral transgenesis." Transgenic Research December 2004, Volume 13, Issue 6, pp 513-522
78. Pfeifer, A., M. Ikawa, et al. (2002). "Transgenesis by lentiviral vectors: Lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos." Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(4): 2140-2145.
79. Plasterk, R. H. A., Z. Izsvák, et al. (1999). "Resident aliens: the Tc1/mariner superfamily of transposable elements." Trends in Genetics **15**(8): 326-332.
80. Pursel, V. G. and C. E. Rexroad (1993). "Recent progress in the transgenic modification of swine and sheep." Molecular Reproduction and Development **36**(2): 251-254.

81. Radice, A., B. Bugaj, et al. (1994). "Widespread occurrence of the Tc1 transposon family: Tc1-like transposons from teleost fish." Molecular and General Genetics MGG **244**(6): 606-612.
82. Robl, J. M., Z. Wang, et al. (2007). "Transgenic animal production and animal biotechnology." Theriogenology **67**(1): 127-133.
83. Saeki, K., K. Matsumoto, et al. (2004). "Functional expression of a  $\Delta 12$  fatty acid desaturase gene from spinach in transgenic pigs." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(17): 6361-6366.
84. Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." (A2.2).
85. Schaack, S., C. Gilbert, et al. (2010). "Promiscuous DNA: horizontal transfer of transposable elements and why it matters for eukaryotic evolution." Trends in Ecology & Evolution **25**(9): 537-546.
86. Schumann, G. G. (2007). "APOBEC3 proteins: major players in intracellular defence against LINE-1-mediated retrotransposition." Biochemical Society Transactions (2007) **35**, (637–642).
87. Shapiro, J. A. (1969). "Mutations caused by the Insertion of Genetic Material into the Galactose Operon of Escherichia coli." J. Mol. Biol. (1969) **40**, 93-106.
88. Simons, J. P., M. McClenaghan, et al. (1987). "Alteration of the quality of milk by expression of sheep [beta]-lactoglobulin in transgenic mice." Nature **328**(6130): 530-532.
89. Spirin, P. V., Vilgelm A. E. , and Prassolov V. S. (2008). "Lentiviral Vectors." Molecular Biology, 2008, Vol. 42, No. 5, pp. 814–825.
90. Tarkowski, A. K. (1961). "Mouse Chimæras Developed from Fused Eggs." Nature **190**, 857 - 860 (03 June 1961); doi:10.1038/190857a0.
91. Tsukahara, S., A. Kobayashi, et al. (2009). "Bursts of retrotransposition reproduced in Arabidopsis." Nature **461**(7262): 423-426.
92. Wicker, T., F. Sabot, et al. (2007). "A unified classification system for eukaryotic transposable elements." Nat Rev Genet **8**(12): 973-982.
93. Yang, N. and H. H. Kazazian (2006). "L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells." Nat Struct Mol Biol **13**(9): 763-771.
94. Zufferey, R., T. Dull, et al. (1998). "Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery." Journal of Virology **72**(12): 9873-9880.

### 9.3. PUBLIKÁCIÓS LISTA

#### 1. Impakt faktoros első szerzős cikk

*The FASEB Journal*  
vol. 27 no. 3 930-941

#### **Transposon-mediated Transgenesis, Transgenic Rescue, and Tissue-specific Gene Expression in Rodents and Rabbit**

Kettler K #, Geurts A #, **Hoffmann O** #, Mátés L., Landae V, Hiripi L, Moreno C., Lazar J, Bashir S, Zideke V, Popova E , Jerchow B, Becker K, Devaraj A, Walter I, Grzybowksi M, Corbett M, Filho RA, Hodges MR, Bader M, Ivics Z, Jacob HJ, Pravenec M, Bősze Zs, Rüllicke T and Izsvák Z # contributed equally  
IF=5,712

#### 2. Referált cikk

*PLoS One. 2012;7(1):e28869. Epub 2012 Jan 11.*

#### **Characterisation of the Rabbit Neonatal Fc Receptor (FcRn) and Analyzing the Immunophenotype of the Transgenic Rabbits That Overexpress FcRn Catunda**

Lemos AP., Cervenak J., Bender B., **Hoffmann OI.**, Baranyi M., Kerekes A., Bősze Zs., Hiripi L., Kacs Kovics I.  
IF=4,411

*Transgenic Res. 2010 Oct;19(5):799-808. Epub 2010 Jan 13.*

#### **Transgenic rabbit production with simian immunodeficiency virus-derived lentiviral vector**

Hiripi L., Negre D., Cosset FL., Kvell K., Czömpöly T., Baranyi M., Gózca E., **Hoffmann OI.**, Bender B., Bősze Zs.  
IF=2,569

#### 3. Nemzetközi konferencián tartott előadás

#### **Transzgénikus nyúl létrehozása lentivírus alapú transzgenézissel**

**Hoffmann O.I.**, Hiripi L., Ivics Z., Izsvák Zs., Mátés L., Bősze Zs.

*TUDOC-2010, Kárpát medencei doktoranduszok nemzetközi konferenciája, Gödöllő, 2010*

#### **Sleeping Beauty transgenesis in rabbit**

**Hoffmann O.I.**, Hiripi L., Ivics Z., Izsvák Zs., Mátés L., Bősze Zs.

*4th International Rabbit Biotechnology Meeting, 30th June – 1st July 2011, Hungarian Academy of Sciences, Budapest*

#### **IgG binding FcRn transgenic rabbits created through BAC transgenesis**

Bősze Zs., Hiripi L., **Hoffmann O.I.**, Kerekes A., Bender B., Kacs Kovics I.

*4th International Rabbit Biotechnology Meeting, 30th June – 1st July 2011, Hungarian Academy of Sciences, Budapest*

#### **Alternative transgenic methods in rabbit**

Hiripi L., **Hoffmann O.I.**, Bősze Zs.

*RGB-Net Meeting, 28-30 March 2012, Bologna, Italy*

## 4. Hazai konferencián tartott előadás

**Az ABCG1 transzporter túltermelésének hatása transzgénikus egér embriókban****Hoffmann O.I.**, Hiripi L., Bősze Zs.*1. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok, Gödöllő, 2008***Lentivírus alapú transzgenezis nyúlban**Hiripi L., Kvell K., Czömpöly T., **Hoffmann O.I.**, Baranyi M., Cosset F-L., Negre D., Bodrogi L., Gócza E., Bősze Zs.*MBK Napok, Gödöllő, 2009***Transzgénikus nyulak létrehozása lentivírus vektorokkal**Hiripi L., Kvell K., Gócza E., Czömpöly T., Bodrogi L., **Hoffmann O.I.**, Baranyi M., Bősze Zs.*VIII. Magyar Genetikai Kongresszus és XV. Sejt- és fejlődésbiológiai Napok, Nyíregyháza, 2009***IgG kötő Fc receptort túltermelő transzgénikus nyúlmodell előállítás**Hiripi L., **Hoffmann O.I.**, Cervenák J., Dobrosi N., Bíró T., Bender B., Kacskovics I., Bősze Zs.*MBK Napok, Gödöllő, 2009***Transzgénikus nyúl létrehozása lentivírus alapú transzgenezissel****Hoffmann O.I.**, Hiripi L., Negre D., Cosset F-L., Kvell K., Czömpöly T., Baranyi M., Gócza E., Bender B., Bősze Zs.*22. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, Kaposvár, 2010***A nyúl FcRn túltermelésének hatása az immunválaszra nyúlban**Hiripi L., Catunda A.P.C., Cervenák J., Bender B., **Hoffmann O.I.**, Baranyi M., Kerekes A., Farkas :, Bősze Zs., Kacskovics I.*MBK Napok, Gödöllő, 2011***IgG kötő Fc receptort túltermelő transzgénikus nyúlmodell előállítás****Hoffmann O.I.**, Hiripi L., Cervenák J., Dobrosi N., Bíró T., Bender B., Kacskovics I., Bősze Zs.*Szegedi Minikonferencia, Szeged, 2011***A Sleeping Beauty transzpozon rendszer alkalmazása nyúlban****Hoffmann O.I.**, Hiripi L., Ivics Z., Izsvák Zs., Mátés L., Bősze Zs.*MBK Napok, Gödöllő, 2011***Transzgénikus nyulak létrehozása Sleeping Beauty transzpozon felhasználásával****Hoffmann O.I.**, Hiripi L., Ivics Z., Izsvák Zs., Mátés L., Bősze Zs.*IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XV.I Sejt- és fejlődésbiológiai Napok, Siófok, 2011 március 25-27.***Szarvasmarha szabályozó SNP-k tesztelése in vivo egér modellben****Hoffmann O.I.**, Bartha E., Lejard V., Rocha D., Bősze Zs., Hiripi L.

*MBK Napok, Gödöllő, 2011*

5. Nemzetközi konferencián bemutatott poszter

**Adaptation of the lentiviral technology to produce transgenic rabbit**

Hiripi L., Kvell K., Czömpöly T., Baranyi M., Gócza E., Bender B., **Hoffmann O.I.**, Bősze Zs.

*Chromatin domains and insulators, Baeza, Spain, 9<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> November 2009, Baeza, Spain*

**Cloning and characterization of the rabbit neonatal Fc receptor**

Lemos Ana Paula Catunda, Judit Cervenak, **Orsolya Hoffmann**, Anita Farkas, László Hiripi, Imre Kacskovics

*ISAG 2010, June, Edinburgh UK, Poster*

**Rabbit transgenesis with Sleeping Beauty transposon system**

**Hoffmann O.I.**, Hiripi L., Kerekes A., Ivics Z., Izsvák Zs., Mátés L., Bősze Zs.

*75th anniversary of Albert Szent-Györgyi's Nobel Price award, Szeged, 22-25 March, 2012*

**Homozygous transgenic rabbit line expressing Venus reporter gene created by Sleeping Beauty transposon system**

**Hoffmann O.I.**, Hiripi L., Ivics Z., Izsvák Zs., Mátés L., Bősze Zs.

*CEELA, II.Közép- és Kelet-Európai Laborállat-tudományi Konferencia, Budapest, 2012. június 2.*

6. Hazai konferencián bemutatott poszter

**A nyúl neonatális Fc receptor génjének izolálása és jellemzése**

Lemos A.P.C., **Hoffmann O.I.**, Hiripi L., Cervenák J., Kacskovics I., Bősze Zs.

*VIII. Magyar Genetikai Kongresszus és XV. Sejt- és fejlődésbiológiai Napok, Nyíregyháza, 2009*

**A nyúl neonatális Fc receptor génjének izolálása és jellemzése**

Lemos A.P.C., **Hoffmann O.I.**, Hiripi L., Cervenák J., Kacskovics I., Bősze Zs.

*2. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok, Gödöllő, 2008*



## **10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

A dolgozatom elkészítéséhez szükséges kísérleteket a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban végeztem, így köszönettel tartozom Dr. Kiss György Botond és Dr. Burgyán József főigazgató uraknak.

Köszönöm Dr. Bősze Zsuzsannának, aki az MKB Állatbiotechnológiai Intézetének igazgatójaként tudományos és anyagi segítséget nyújtott a munkámhoz.

Hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Hiripi Lászlónak, aki megalapozta tudásomat a molekuláris biológia és az állatbiotechnológia területein. Mindvégig öröm volt mellette dolgozni és elsajátítani mindazt a szakmai tudást, amelyre a munkám során szükségem volt.

További köszönettel tartozom. Dr. Gócza Elennek a dolgozatomban szereplő embriók mirkoszkópos képeiért. Köszönöm Dr. Kvell Krisztiánnak és Czömpöly Tamásnak a lentivírus vektorok elkészítését. Szeretném megköszönni Dr. Izsvák Zsuzsannának és Dr. Ivics Zoltánnak a Sleeping Beauty transzpozon rendszer plazmidjait és a publikációk során nyújtott elengedhetetlen segítségüket.

Hálás köszönet illeti Dr. Mátés Lajost, akinek szakmai tanácsai nélkül jelen dolgozat nem készülhetett volna el.

A kísérleteimhez felhasznált állatok gondozásáért köszönettel tartozom állatgondozóinknak, Lengyel Lászlónénak, Basa Juditnak és Fülöp Lászlók, továbbá Dr. Bucsy László állatorvosnak. Külön köszönet illeti Kerekes Andreát, aki nélkülözhetetlen segítséget nyújtott a nyulak tenyésztésében. Továbbá köszönöm technikusainknak, Grófné Marikának és Galliné Györgynének a laboratóriumi eszközök gondos előkészítését.

Köszönöm az MBK és az MBK Állatbiotechnológiai Intézet összes tagjának azt a baráti hangulatot, amelyben mindvégig dolgozhattam, különösen Dr. Polgár Zsuzsannának, Iski Gergelynek és Kontra Leventének. Szeretném megköszönni Dr. Bender Balázsnak és Dr. Bodó Szilárdnak a kávé mellett nyújtott (nem csak) szakmai tanácsaikat.

Hálás köszönet illeti családom tagjait, akik támogatásukkal és biztatásukkal eljutattak idáig.

Munkámhoz anyagi hozzájárulást az OM-00118/2008 és a OTKA NK104397 pályázatok nyújtottak.