



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**REKOMBINÁNS FEHÉRJE
TERMELTETÉSE TRANSZGÉNIKUS
NYÚL TEJÉBEN**

Doktori értekezés tézisei ~~tezisei~~

Bodrogi Lilla

Gödöllő

2007

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

1.1. A munka előzményei

A szepszis, hétköznapi nevén vérmérgezés elindítója számos mikroorganizmus lehet: Gram-negatív, Gram-pozitív baktériumok, gombák, vírusok, de a mikroba jelenléte sem feltétlenül szükséges, elegendő pusztán a mikrobiális toxin is. Az elmúlt 20 évben jelentős előrelépés történt a szepszis kezelésében, ennek ellenére a halálozási aránya igen magas még a legkorszerűbb terápiás eljárások alkalmazása mellett is. A szepszis fő okozói korábban a Gram-negatív baktériumok voltak, az utóbbi években a klinikai kezelések átalakulása miatt ez egyre inkább eltolódott a Gram-pozitív baktériumok felé, de az esetek jó részében a betegséget okozó mikroorganizmus valamilyen Gram-negatív baktérium. A szepszis kialakulásáért a baktérium külső membránjának lipopoliszacharidja (LPS), annak is az ún. lipid-A régiója a felelős. Az LPS egy Toll-like receptor (TLR) által közvetített jelátviteli rendszeren keresztül gyulladáshoz vezet, és egyéb molekulák keletkezését indítja el. Ezeknek a termékeknek a felszaporodása szepszishoz vezethet. Kimutatták, hogy az alkalikus foszfátáz (AP) defoszforilálja, és ennek következtében hatástalanítja az LPS-t fiziológiai körülmények között. A szarvasmarha vékonybél alkalikus foszfátázról beigazolódtott, hogy hatékony az *Escherichia coli* által kiváltott fertőzés és a polimikrobiális másodlagos hashártyagyulladás elleni küzdelemben (Van Veen, 2005) továbbá a sertést, mint modellállatot alkalmazva is igazolták LPS semlegesítő hatását (Beumer, 2003). A humán placentális alkalikus foszfátáz alkalmazása a szepszis kezelésében jelenleg klinikai kipróbálás alatt áll. Az alkalikus foszfátázok számos szövetféleségben és szervben aktív formában jelen vannak. A szérumban megjelenő frakció legnagyobb részét az egészséges emberi szervezetben a nem szövetspecifikus AP (hTNAP) teszi ki (Harris, 1990). A fehérje élettani funkciójáról ugyan keveset tudunk, mégis valószínűnek látszik, hogy a leghatékonyabb alkalikus foszfátáz forma lehet, amely a szervezet számos pontján aktívan részt vesz a Gram-negatív baktériumok által okozott fertőzés elleni küzdelemben. A hTNAP tisztított formája nem áll jelenleg kellő mennyiségben rendelkezésre. Tisztítása humán szérumból megfelelő mennyiségben, nem könnyű feladat, ezért a transzgénikus technológia alkalmazása a TNAP emlőszövetspecifikus nagy mennyiségben történő termeltetésére ígéretes alternatívának tűnt. A tejelő nyúl által előállított tej mennyisége nem csupán kísérleti célokra elegendő, de a klinikai kipróbálások során is megfelelő mennyiség állítható elő ezzel a technológiával (Bösze, 2003).

Az integrálódott transzgén kópiaszámának meghatározására alkalmazott hagyományos módszer a dot blot vagy southern blot analízis. A kvantitatív valós idejű, azaz real time PCR (qRT-PCR), alkalmazható a génmódosított állatoknál a genomba integrálódott transzgén kópiaszámának meghatározására is. Mind génmódosított állatok (Tesson, 2002.) mind növények (Ingham 2001, Mason, 2002, Yang, 2005) esetében alkalmazták már a módszert a transzgén kópiaszámának meghatározása céljából. A technika még fejlesztés alatt áll, számos módszertani cikk jelent meg a témában (Ballester, 2004; Mitrecic, 2005). A laborunkban is több alkalommal használtuk már a qRT-PCR-t génmódosított állatoknál az integrálódott transzgén kópiaszámának meghatározására (Devinoy, 2005, Bender 2007) illetve kiméra állatoknál a különböző szövetekben a kimérismus fokának megállapítására (Bodó, 2004).

1.2. Az értekezés célkitűzései

- Olyan transzgénikus nyúl vonalak előállítása volt, melyek nagy mennyiségben termelik a humán nem szövetspecifikus AP-t a tejükben
- A génmódosított állatok jellemzése nukleinsav (RNS és DNS) szinten, az állatokon megjelenő esetleges életteni eltérések vizsgálata, valamint a tejben megjelenő rekombináns fehérje jellemzése
- Génmódosított nyúl (mutáns κ -kazein) és egér (szarvasmarha FcRn) genomjába beépült transzgén kópiaszámának vizsgálatára valós idejű (real time) PCR módszer kidolgozása.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Génkonstrukció előállítása

A transzgénikus nyulak előállításához használt génkonstrukció (mWAP-hTNAP) tartalmazza az egér savó savas fehérje (mWAP) promóter 2,4 kb hosszúságú EcoRI-KpnI fragmentjét, az RP11-63N8 BAC klónból (accession nr. AL359815 The Wellcome Trust, Sanger Institute) származó 2718 bp hosszúságú, BamHI-HpaI fragmentumot, mely magában foglalja a hTNAP gén 2. exonját, 2. intronját és részleges 3. exonját, valamint a pCR3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) plazmidből származó 1618 bp hosszúságú HpaI-EcoRI fragmentumot, mely a részleges 3. exontól kezdődően a teljes hTNAP cDNS-t tartalmazza. A konstrukciót kiegészíti még a pCR3.1 plazmidből származó 0,6 kb hosszúságú bGH-polyA (3. ábra). A mikroinjektáláshoz a 7.5 kb hosszúságú AatII-ClaI

fragmentumot használtam.

2.2. Génmódosított nyúl előállítás és a transzgén integrációjának vizsgálata

A kísérlethez szükséges nyülembriókat 17-20 hetes ivarérett Hycote hibrid nyulak szuperovuláltatásával nyertem (Charles Rivers Laboratories). A transzgénikus állatok létrehozása során a genetikai manipuláció korai embrionális korban történik. A mikroinjektálást Nomarski differenciál interferencia kontraszt egységgel és háromdimenziós mozgást biztosító mikromanipulátor karokkal (Narishige, Japán) felszerelt IMT-2 invert mikroszkópban (Olympus, Japán) végeztem. A mikroinjektálást túlélő embriókat 18-20 hetes álvemhes nőstényekbe lettek beültetve altatás alatt laparoszkópiás eljárással. A mikroinjektált embriókból született utódokból fülbiopsziát és vért vettem, és a szövetből tisztított DNS-ben (Laird, 1991) PCR módszerrel vizsgáltam a transzgén jelenlétét. A PCR-hez használt primerek humán TNAP 2. exon (5'-AAAATTAGCCGGGAGAGGTAG-3') illetve mWAP (5'-GAAGGAAGTGTGTAGCCCATC-3') specifikusak voltak.

Az integrálódott transzgén kópiaszámának meghatározásához a dot-blot eljárást alkalmaztam. A 10µg genomiális DNS-t illetve az 1, 2, 5, 8, 10, 15 és 20 kópiának megfelelő mennyiségű mWAP-hTNAP plazmid hígítási sorral kevert 10µg genomiális DNS-t tartalmazó mintákat vákuumban Hybond-N membránra (Amersham Pharmacia Biotech) transzferáltam Minifold-1 dot blot system (Schleicher and Schuell) alkalmazásával. Ezt követően Church módszerével (1984) hibridizáltam a transzgén-specifikus próbát. A jelölt blottot phosphorimage analyser scanner (STORM 840, Molecular Dynamics) segítségével hívtuk elő a storage phosphor screenről. Majd az autoradiográfiát elemeztük.

2.3. A transzgénikus állatvonalak alapítása és fenntartása

A transzgénikus vonalak alapításához az alapító nőstény egyedeket vad típusú hímekkel pároztattam. Az így előállított ún. F1 generáció transzgént hordozó egyedei heterozigóták a hTNAP-ra nézve. A heterozigóta egyedek vad típusú állatokkal történő pároztatása során vizsgáltam a transzgén szegregációját. Azok a vonalak nevezhetők valódi transzgénikus vonalnak, ahol a transzgén öröklődése a mendeli törvényeknek megfelelően zajlik.

2.4. Expresszió vizsgálata RNS szinten RT-PCR-rel és direkt szekvenálással

Totál RNS izoláláshoz a savas guanídium-izothiociánát-fenol-kloroform extrakciós eljárást alkalmaztam (RNA-Bee - RNA isolation reagent, IsoTex Diagnostics, Inc.). Az emlőszövetből a mintavétel (emlőbiopszia) a laktáció első hetében történt. Mintákat vettem továbbá a következő szervekből: izom, agy, szív, máj, tüdő, lép, vese, nyálmirigy, petefészek/here, vékonybél. A vizsgálat célja annak megállapítása volt, hogy a transzgen expressziója valóban az emlőszövetre korlátozódik-e (a cél a hTNAP emlőszövet-specifikus expressziója volt) vagy a fehérjetermelés illetve esetleg az állat egészsége szempontjából nem kívánatos szövetekben is kifejeződik a fehérje (ektópikus expresszió).

A PCR termékek direkt szekvenálását a Promega cég fmol DNA Sequencing System elnevezésű kitjével végeztük, a gyártó utasításainak megfelelően.

2.5. Expressziós vizsgálatok fehérje szinten: enzimaktivitás detektálása és kvantitatív meghatározása a laktáció során.

A tejmintákat a hemizigóta #949 nőténytől a 4 hetes laktációs periódus alatt több alkalommal gyűjtöttem. A hemizigóta #932 nőténytől a laktáció 3. és 5. napján vettem tejmintákat, ezt követően a tej elapadt, ezért további mintavételekre nem volt lehetőség. A teljes tej mintákat n-butanollal extraháltam. A vizsgálatokat a savófázison végeztem. A savófehérjék 10 % natív-PAGE gélen lettek szétválasztva. Az AP aktivitás detektálására a gél 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphate (BCIP) és nitro blue tetrazolium (NBT) (Western Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase, Promega) keverékével inkubáltam.

Az AP aktivitás kvantitatív meghatározása Cyboron és Wuthier (1981) módszere alapján egy p-nitrofenol-foszfát (PNPP) alapú eljárással történt. A transzgenikus vonalak alapító egyedeiben meghatároztam, valamint mindkét vonal hemizigóta állatában a teljes laktáció során követtem az AP aktivitásának változását.

2.6. A hTNAP specifikus peptid ellenanyag termeltetése baromfitorjásban, majd Western analízissel a hTNAP fehérje specifikus detektálása.

Kereskedelmi forgalomban nem nyúlban termeltetett humán TNAP specifikus poliklonális ellenanyag nincsen, ezért saját magunk állítottunk elő ilyen ellenanyagot baromfitorjásban. A munkához Bovans Goldline X Bovans Nera hybrid tojókat

használtunk. Az immunizáláshoz alkalmazott peptidet (DTWKSFKPRHKHSHFI; 254-269 aminosavak) hat állatfaj TNAP fehérjéinek összehasonlítása alapján választottuk ki. A tojókat négy alkalommal immunizáltuk, az ellenanyag tisztításhoz Bárdos és munkatársainak protokollját használtuk (Bárdos, 1998). Az ellenanyag titer mérésére ELISA módszert használtunk. A transzgén expressziójának vizsgálatát protein szinten Western blot analízissel végeztük. A tejsavóban oldott fehérjéket PAGE-vel választottuk szét Hybond-P extra (Amersham) membránra transzferáltuk A hTNA-ot a csirke anti-humán TNAP elsődleges ellenanyaggal detektáltuk, másodlagos ellenanyag a kecskében termeltetett hidrogén peroxid konjugált anti-csirke IgY volt (sc-2428, Santa Cruz Biotechnology). Az előhíváshoz az ECL-Plus chemiluminescent detection rendszert használtuk (Amersham AP Hungary Kft.).

2.7. Az emlőszövet hisztológiai elemzése

Az emlőszövet biopsziákat altatott állatokból vettük a laktáció különböző napjain. Az emlőszövet korai apoptózist az alom megszüntetésével indukáltuk a vad típusú állat emlőjében. A transzgenikus állatoktól a laktáció 3. illetve a 6. napján vettünk emlőszövetbiopsziát. A minták fixálása Karnovszki glutáraldehidben történt 24 órán keresztül (Sheehan, 1991). 5-7 µm-es metszeteket készítettünk. A metszetek felét haematoxin-eozinnal festettük, a másik felén pedig az ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon International)-tel jelöltük. Az apoptotikus sejtek relatív sűrűségének ([rel]p-apo) számolása a következő képlet alapján történt: $(rel)p-apo = [d\%] \times \text{átlag} \Sigma \text{apoptózis} ([d\%] = (\text{tejcsatorna apoptotikus sejtekkel} / \text{összes tejcsatorna}) \times 100 \text{ átlag} \Sigma \text{apoptózis} = \text{összes apoptotikus sejt} / \text{tejcsatornák száma})$

2.8. A transzgén kópiaszámának meghatározására alkalmazott módszer a kvantitatív valós idejű PCR

A csoportunk által előállított szarvasmarha FcRn-t (bFcRn) hordozó génmódosított egérvonalaknál (#9, #14, #19) (Bender, 2007), illetve a csökkentett fenilalanin tartalmú κ-kazeint hordozó génmódosított nyúl-vonalaknál (#63, #82) (Devinoy, 2005, Baranyi, 2007) az integrálódott transzgén kópiaszámát qRT-PCR-rel határoztuk meg. A primereket és a próbákat az Applied Biosystems primer tervező programja segítségével terveztük. A vizsgálatokhoz az ABI Prism7000 Sequence Detection Systemet (Applied Biosystems Foster City, CA) használtuk. A kísérletek során a TaqMan Universal PCR Master Mixet (Applied Biosystems) használtuk.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Az állatok létrehozása és a transzgén integrációjának vizsgálata

Előállítottam az injektáláshoz használt, WAP-hTNAP génkonstrukciót, mellyel 2 transzgénikus nyúl vonalat hoztam létre (#949 és #932). A mikroinjektálás hatékonysága, 0,71 % az irodalmi adatoknak megfelelő értékeket mutat. Az F1 nemzedékben a 932. vonalnál 45% a 949 vonalnál 44% volt a transzgénikus állatok aránya, azaz a transzgén öröklődése a mendeli szabályoknak megfelelően történt.

Az integrálódott transzgén kópiaszámának meghatározása dot blot tálatt történt, a #949-ben ~2, míg a #932-ben ~20 kópia integrálódott a transzgenből.

3.2. Expressziós vizsgálatok I. RNS szinten RT-PCR-rel

A transzgén mindkét vonal esetében expresszálódik az emlőszövetben. Az ektópikus, azaz a célzottan emlőszövet-specifikus megjelenésen kívüli fehérjeexpresszió egyetlen szövetre korlátozódott a 932-es vonal esetében. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az alkalmazott mWAP-hTNAP expressziós vektor alkalmas az emlőszövet-specifikus expresszió biztosítására. Az RT-PCR termék direkt szekvenálása 100 százalékos homológiát mutatott mindkét vonal esetében a már leközölt hTNAP szekvenciával.

3.3 Expressziós vizsgálatok fehérje szinten: enzimaktivitás detektálása és kvantitatív meghatározása a laktáció során

AP aktivitást kizárólag a transzgénikus állatok tejében detektáltunk. Az AP aktivitása a 932-es nőstény tejében sokkal kifejezettebb volt, mint a 949-es vonal nőstényének tejében. Ugyanakkor a kontroll tejben egyáltalán nem detektáltunk AP aktivitást. Ez egybevághat a kvantitatív enzimaktivitás mérés eredményeivel. Igen magas AP aktivitást (170 IU/ml) mértünk a #932 alapító tejében, ugyanakkor a #949 alapító tejében az AP aktivitás alacsonyabb volt ugyan, de szignifikáns (10.5 IU/ml), a vad típusú kontroll tejében nem volt kimutatható mennyiségben alkalikus foszfatáz. A két vonal hemizigóta nőstényeinél a teljes laktációs periódus alatt vizsgáltuk az AP aktivitásának változását. A #932 hemizigóta állat tejében a laktáció 2. illetve 5. napján 304 és 826 IU/ml AP aktivitást mértünk (11. ábra/B szürke oszlopok). A #932-es vonalnál a tejtermelés az

első hét végére megszűnt, az emlőszövet korai involúciója következtében. A #949-es hemizigóta állat tejében az AP aktivitás a 2. és 27. napok között 19,9 és 56,35 IU/ml között változott (11. ábra/B fekete oszlopok).

A tejfehérjék mennyisége a laktáció során dinamikusan változik. Ehhez hasonló jelenséget figyeltünk meg a rekombináns fehérje termelődése kapcsán is. A #949 hemizigóta nőstény esetében a tejelválasztás beindulásakor mért 26 U/ml aktivitás fokozatos emelkedést mutatott egészen a 4. hétig, amikor is a 24. napon elérte a csúcspontot 57 U/ml mennyiséggel, majd ezt követően csökkent a mennyisége, a 27. napon 45 U/ml-t mértünk.

A tejben megjelenő humán alkalikus foszfatáz mennyisége a 949-es vonalban kettő, míg a 932-es vonalban három nagyságrenddel meghaladja a normál élettani humán szérum szinteket. Fiziológias körülmények között a szérum alkalikus foszfatáz aktivitása irodalmi adatok szerint embernél 101-113 U/l (Stromme, 2004), kutyánál 23-212 U/l (Tietz, 1986) egéknél pedig 199-305 U/l (Xu, 2002) között változik.

A 932-es vonal esetében a laktáció az 5. napon leállt. Az utódok nem tudták kiszopni a tejet, az emlő mérete tapinthatóan redukálódott és az emlőszövet hisztológiai vizsgálata bizonyította a szövet korai involúcióját jelző apoptózist, illetve szerkezeti átrendeződést (16. ábra).

3.4. A hTNAP specifikus peptid ellenanyag termeltetése baromfitorjásban, majd Western analízissel a hTNAP fehérje specifikus detektálása.

Kereskedelmi forgalomban nem állt rendelkezésre nyúlból származó minta vizsgálatára alkalmas hTNAP specifikus poliklonális ellenanyag, ezért baromfitorjásban termeltettünk a kísérleti céloknak megfelelő ellenanyagot. ELISA kísérleteink alapján a torjásban megjelenő IgY ellenanyag egy állat torjásaiban volt magas titerű. A további vizsgálatokhoz, ezekből a torjásokból tisztított ellenanyagot használtuk 400-szoros hígításban.

A transzgénikus nyúl tejéből vett minták vizsgálatát elvégeztük Western blotlall. Natív PAGE gélen szétválasztott tejminták blotolását követően a membránt a hTNAP specifikus peptid antitesttel jelöltük. A hTNAP kizárólag a transzgénikus tejmintákban volt detektálható a vad típusú tejben nem. A TNAP szerkezetét és ehhez kapcsolódó működését részletesen leírták (Le Du and Millan 2002). A Western vizsgálat alapján, a hemizigóta állatok tejében egy hTNAP specifikus jel látható ~140 kD-nál. Ezt a jelet kontroll állat tejében soha nem detektáltuk.

3.5. Az emlőszövet hisztológiai elemzése

A #932 alapító nőtény és a vonalból származó G1 nőtények normális vemhességet követően egészséges utódokat hoznak világra átlagos alommérettel és súllyal. Azonban emlőszövetük a laktáció korai stádiumában visszafejlődik, ezért utódaikat nem képesek táplálni, és azok az éhezéstől elpusztulnak az ellést követő 5-7. napon. Az utódok 3 nappal az ellés után már láthatóan alultápláltak. Amennyiben a #932 transzgenikus nőtény utódait nem-transzgenikus dajkaanyákhoz társítjuk az anya felneveli őket, ugyanakkor kontroll nőténytől származó utódokat a #932 transzgenikus nőtényhez dajkásítva az utódok alultápláltság miatt elpusztulnak. Ezt a jelenséget több laktáció során és több hemizigóta egyed esetében is megfigyeltük.

Az emlőszövet működése már a laktáció igen korai fázisában rendellenességet mutat, ezért a jelenség megértéséhez további vizsgálatokat végeztünk. Az emlőszövetet hisztológiai elemzésnek vetettük alá. Az emlőszövetből a laktáció különböző napjain paraffin metszeteket készítettünk és hematoxilín-eosinnal festettük vagy az apoptózis detektálására az ApopTag Kit-tel dolgoztunk föl a mintákat (16. ábra). A tejcsatornák elágazódása és az alveolusok fejlődése közvetlenül ellés után nem mutatott eltérést a vad típushoz képest, azonban már a laktáció harmadik napján megfigyelhető volt az emlőszövet involúciójára jellemző apoptotikus sejtek megjelenése (15. ábra/D). Az emlőben zajló apoptózis mennyiségi értékelése során (16. ábra) kiderült, hogy az apoptotikus sejtek aránya a vad típushoz képest szignifikánsan nőtt ($p < 0.01$), továbbá a vad típusú nőtényeknél mesterségesen előidézett apoptózissal összevethető mértékű volt. A laktáció hatodik napjára az alveoláris struktúrák mennyisége jelentősen lecsökkent, megnőtt a zsírsejtek és a kötőszövetes elemek aránya az emlőszövetben (15. ábra/F). A fent leírt események összességében az emlőszövet visszafejlődését idézték elő a #932 nőtényeknél. Ezzel ellentétben a #949-es nőtények laktációja teljesen normális lefolyású volt, szignifikáns eltérést nem mutatott a vad típushoz képest.

3.6. A transzgen kópiaszámának meghatározására alkalmazott módszer a kvantitatív valós idejű PCR

A hTNAP gént hordozó transzgenikus vonalak esetében az integrálódott transzgen kópiaszámának meghatározására nem ezt a módszert alkalmaztuk, mert a rendelkezésre álló gyári próba sok nem specifikus fragmentet amplifikált föl. Ennek oka, hogy a humán genomi DNS-re tervezett próbák valószínűleg feltapadnak a nyúl genomi DNS-ének egyes szakaszaira. Mivel a nyúl genomja jelenleg még nincs megszekvenálva,

korlátolt az előzetes in silico vizsgálatok lehetősége: pl. primerek blasztolására a nyúl genomra. A qRT-PCR módszer, ezzel szemben alkalmas volt a csökkentett fenilalanin-tartalmú κ -kazeint kódoló gént hordozó génmódosított nyúlvonalak, valamint a szarvasmarha FcRn receptor nehéz láncának génjét hordozó transzgenikus egérvonalak esetében az integrálódott transzgén kópiaszámának meghatározására. A génmódosított egér esetében mind az endogén gén mind pedig a transzgén szekvenciája pontosan ismert, illetve az egér genomja is rendelkezésre áll, ezért itt nem okozott gondot a megfelelően specifikus próba tervezése. A csökkentett fenilalanin tartalmú kappá kazeint termelő génmódosított nyúl esetében is megoldható volt ez a probléma, mivel a csoportunk által már korábban részletesen jellemzett nyúl κ -kazeinre is tudtunk specifikus próbát tervezni.

3.6.1. Csökkentett fenilalanin tartalmú κ -kazeint kódoló gént hordozó génmódosított nyúl

A mérésekhez használt próba nem differenciál az endogén és a módosított κ -kazein génkópiák között, így a hemizigóta génmódosított állatok genomi DNS-ében mért kópiaszám érték két részből tevődik össze: két endogén κ -kazein kópia és a transzgén kópiaszáma ($2+n$). A transzgénre nézve hemizigóta állatok DNS-éből (63-as és 82-es vonal) 50 ng-ot használtunk reakciónként, az így kapott Ct értéket hasonlítottuk össze a kalibrációs egyenessel. A kalibrációs egyenest vad típusú állatból származó genomi DNS segítségével vettünk fel (50ng, 100ng 150ng, 200ng és 250ng DNS/reakció), azaz olyan genomi DNS-sel, melyben egy diploid genom 2 kópiát tartalmaz a vizsgált génből. A hemizigóta #82-es egyedből származó minta Ct értéke, 50 ng DNS-sel, 22,7 volt. Ez nyolc κ -kazein kópiának felel meg. Ebből kivonva a két endogén kópiát a transzgén kópiaszáma hat. A #63 hemizigóta egyed esetében az 50 ng DNS minta Ct értéke 23,2. Ez öt kópia κ -kazeint jelent. Tehát a 63-as vonalban a transzgén kópiaszáma három.

3.6.2. Szarvasmarha FcRn transzgenikus egérvonalak

A 14-es vonal hemizigóta egyedei 2 kópiában, míg a 19-es vonal hemizigóta egyedei 5 kópiában hordozzák a vizsgált bFcRn transzgént. Az endogén kontroll, egér β -aktinhoz egér genomi DNS-sel vettük fel a kalibrációs görbét, ezt használtuk a reakcióba bevitt diploid genom mennyiségének meghatározásához (minta abszolút sejtszáma). A bFcRn kópiaszámának meghatározásához szükséges kalibrációs görbe felvételéhez egér genomi DNS-sel kevert plazmid DNS-t használtunk, ami alapján meghatároztuk a bFcRn gén kópiáinak számát (bFcRn-AGN). A két adatból aránypárral számoltuk ki az FcRn

gén kópiaszámát a diploid hemizigóta genomban.

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A humán nem szövetspecifikus alkalikus foszfatáz (hTNAP) gént hordozó transzgénikus nyulakat hoztam létre, melynek emlőszövetben történő kifejeződését az egér savó savas fehérje promóter irányítja.
2. RNS szinten emlőszövetspecifikusan expresszáldott a hTNAP transzgén. Csupán egyetlen más szövetben (izomban) volt megfigyelhető gyenge ektópikus expresszió. Az alkalmazott génkonstrukció (egér WAP promóter és intron beépítése) tehát igen jól alkalmazható emlőszövetspecifikus expresszió céljából.
3. A génmódosított nyúl tejében lévő rekombináns fehérje aktivitása meghaladta a normál humán szérumszint százszorosát, illetve ezerszeresét.
4. A nyúl tejében nem mutatható ki endogén alkalikus foszfatáz.
5. hTNAP specifikus ellenanyagot termeltem baromfifojásban.
6. A hTNAP specifikus ellenanyaggal detektált rekombináns fehérje molekulatömege megegyezik a hTNAP-zal.
7. A magasan expresszálo vonalban a hTNAP korai involúciót okozott, de az alacsonyabban expresszáloban nem volt negatív hatása.
8. A génmódosított nyúl alkalmas hTNAP termelésére. A termelő hTNAP mennyisége alkalmas a tejből való tisztításra és biológiai aktivitásának vizsgálatára.
9. Kétféle transzgén kópiaszámának meghatározására alkalmas real time PCR módszert fejlesztettem ki és alkalmaztam génmódosított egér - illetve nyúlvonalak esetében.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Két transzgénikus vonalat hoztunk létre (#932, # 949) a hTNAP cDNS-t és a 2. intront hordozó minigén konstrukció megtermékenyített petesejt előmagjába történő mikroinjektálásával. A minigén a korábban már részletesen jellemzett egér WAP promóter (Devinoy, 2005) irányítása alatt működik. Mindkét transzgénikus vonalban stabil a transzgén öröklődése és emlőszövetspecifikus expressziója. Igen magas hTNAP aktivitást (304-826 IU/ml) mértünk a #932 hemizigóta tejében, ugyanakkor a #949 hemizigóta tejében az hTNAP aktivitás alacsonyabb volt ugyan, de szignifikáns (20-56 IU/ml). A gén expresszióját RNS szinten vizsgálva egyetlen szövetben tapasztaltunk

alacsony szintű ektópikus expressziót, a #932-es vonalnál az izomban. Ez a jelenség alátámasztja korábbi szerzők megfigyelését (Castro, 1999; Hiripi, 2003), hogy az egér WAP promóter valóban emlőszövet-specifikus expressziót biztosít a génmódosított nyulak esetében, az ektópikus expresszió mindössze egy vagy két egyéb szövetre korlátozódik. A magasabban expresszáló #932 vonal esetében a laktáció korai szakaszában kimutattuk az emlőszövet korai involúcióját.

Az alacsonyabban expresszáló 949. vonal esetében a hTNAP aktivitása két nagyságrenddel meghaladta a normál humán szérumszintet a teljes laktációs perióduson keresztül. Ennek a vonalnak a nőstényei normális laktáción esnek át. Az emlő szövettani képe sem mutat rendellenességet. A hTNAP expressziója nem befolyásolta az utódok fejlődését. A vonal laktáló nőstényeitől nyert tejmintákból folyamatban van a rekombináns hTNAP tisztítása és biológiai aktivitásának vizsgálata szeppisz egérmodellben.

A magasabban expresszáló #932 vonal esetében a laktáció korai szakaszában kimutattuk, hogy az emlőszövet szekretoros epiteliális sejtjeinek apoptózisa szignifikánsan megnőtt. Megfigyeltük továbbá, hogy az emlőszövet leépülése, involúciója az elválasztáskor lezajló strukturális változásokhoz hasonlít. Irodalmi adatok szerint néhány esetben már előfordult hasonló jelenség rekombináns fehérje magas szintű kifejeződése kapcsán. A tejben megjelenő rekombináns fehérje több esetben okozott nemkívánatos mellékhatásokat. A szarvasmarha β -kazein termelése génmódosított egér emlőjében az emlőszövet korai involúcióját okozta a rekombináns fehérje koncentrációjával korrelációban. A laktáció az 1–3. napon befejeződött abban a génmódosított egérvonalban, mely a legnagyobb mennyiségben termelte a szarvasmarha β -kazeint (Bleck, 1995). A szarvasmarha β -kazeint túltermelő génmódosított egerek emlőszövetének fejlődése normális volt, de a magas expressziós szintek megváltoztatták a tej élettani tulajdonságait, ez annyit jelent, hogy a tej viszkózusabbá vált. Ehhez hasonló jelenséget, a tej extrém viszkozitását figyeltük meg a hTNAP-ot expresszáló egyik génmódosított nyúlvonalban, ahol a funkcionális emlőszövet korai visszafejlődését figyeltük meg. Hogy a megfigyelt jelenség vajon minek a következménye még további vizsgálatokat igényel. Ugyanakkor az alacsonyabban expresszáló vonal esetében a laktáció lefolyása megegyezik a vad típussal. A tapasztalatokból azt a következtetést tudjuk levonni, hogy a megfelelő vonal szelektív nemesítésével az enzimatikusan aktív humán alkalikus foszfatáz termelése génmódosított haszonállat emlőszövetében ígéretes alternatíva lehet.

6. MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

A dolgozat alapját képező publikációk

Impakt faktoros közlemények

- **Bodrogi L**, Brands R, Raaben W, Seinen W, Baranyi M, Fiechter D, Bősze Z (2006) High level expression of tissue non-specific alkaline phosphatase in the milk of transgenic rabbits, Transgenic Research, 15. 627-636.
impakt faktor: 1,915
- Devinoy E, Montoliu L, Baranyi M, Thépot D, Hiripi L, Fontaine M-L, **Bodrogi L**, Bősze Z (2005) Analysis of the efficiency of the rabbit whey acidic protein gene 5' flanking region in controlling the expression of homologous and heterologous linked genes, J.Dairy Science 72 Spec No:113-9
impakt faktor: IF: 2,24
- Bender B, **Bodrogi L**, Mayer B, Schneider Z, Zhao Y, Hammarstrom L, Eggen A, Kacs Kovics I, Bosze Z. (2007) Position independent and copy-number-related expression of the bovine neonatal Fc receptor alpha-chain in transgenic mice carrying a 102 kb BAC genomic fragment. Transgenic Res. 2007 Oct;16(5):613-27.
Impakt faktor:1,915 (2006)

Impakt faktoros konferencia absztraktok

- **Bodrogi L**, Raaben W, Fiechter D, Bender B, Brands R, Seinen W, Bősze Z (2007) Transgenic rabbit milk as a source of recombinant human TNAP for pharmaceutical applications, FEBS Journal Suppl.
impakt faktor: 3,03 (2006)
- **Bodrogi L**, Raaben W, Fiechter D, Bender B, Brands R, Seinen W, Bősze Z (2005) Production of human LBK-type alkaline phosphatase in the milk of transgenic rabbits, FEBS Journal vol. 272. suppl. 1
impakt faktor: 3,26
- Bender B, **Bodrogi L**, Zhao YF, Kacs Kovics I, Hammarström L, Bősze Z (2004) Generation of bovine FcRn alpha chain BAC transgenic mice, Tissue Antigens vol. 64. 374-375
impakt faktor: 1,99

Egyéb konferencia absztraktok

- Baranyi M, Lemos APC, **Bodrogi L**, Bender B, Szabó L, Hiripi L, Bősze Z (2005) Expression of low-phenylalanine kappa-casein in the milk of transgenic rabbits, FEBS Journal vol. 272. suppl. 1
impakt faktor: 3,415
- **Bodrogi L**, Brands R., Raaben W., Seinen W., Baranyi M., Fiechter D., Bősze Zs. (2007) Could the transgenic rabbit milk be a source of recombinant human TNAP for Pharmaceutical applications? 5th International Alkaline Phosphatase Symposium, Huningue, Franciaország
- **Bodrogi L**, Brands R., Raaben W., Seinen W., Baranyi M., Fiechter D., Bősze Zs. (2007) Transgenic rabbit milk as a source of recombinant human TNAP, 2nd International Meeting on Rabbit Biotechnology Jouy-en-josas, Franciaország
- Hiripi L., Baranyi M., Carnwath J.W., Niemann H., **Bodrogi L**, Raaben W., Brands R., Seinen W., Lemos A.P.C., Bender B., Szabó L, Bősze Zs. (2006) Transgenic rabbit as models for producing biologically active human recombinant proteins. In: Genetika 2006. Ljubjana, Slovenia 28.09-1.10. ISBN-10 961-90534-4-3. pp 76.
- **Bodrogi L**, Brands R., Raaben W., Seinen W., Baranyi M., Fiechter D., Bősze Zs. (2006) Transgenic rabbit as bioreactor to produce enzymatically active human alkaline phosphatase. In: International conference of Immunogenomics and Immunomics Budapest, 08.10-12.08. ISBN 963 87244 2 0. pp 387.
- **Bodrogi L**, Brands R., Raaben W., Seinen W., Baranyi M., Fiechter D., Bősze Z.: Rekombináns fehérje termeltetése transzgénikus nyúl tejében, 18. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, 2006.
- **Bodrogi L**, RaabenW, Fichter D, Bender B, Brands R, Seinen W, Bősze Z (2005) Feasibility of producing human LBK alkaline phosphatase in the milk of transgenic rabbits, 13th IMP Conference and IMBA Inaugural Conference, Bécs, Ausztria
- Bősze Z, **Bodrogi L**, Raaben W, Fiechter D, Brands R, Seinen W (2005) High level expression of biologically active human tissue non-specific alkaline phosphatase in the milk of transgenic rabbits, The 1st International Conference on transgenic rabbits, Tsukuba, Japán
- **Bodrogi L**, RaabenW, Fichter D, Bender B, Brands R, Seinen W, Bősze Z (2005) Humán alkalikus foszfatáz termeltetése transzgénikus nyúl tejében, VI. Magyar Genetikai Kongresszus, Eger
- **Bodrogi L**, Hiripi L., Baranyi M., Kacs Kovics I., Németh V., Bősze Zs. (2004)

Altering milk composition by transgenesis_Hungarian Agricultural Research 1.
Szám

Egyéb publikációk

- Gócza E., Hiripi L. Bodó Sz., Révay T., Bogdan C., Kovács A., **Bodrogi L.**, Lemos A. PC., Bősze Zs. Characterisation of rabbit ES like cells and creation of rabbit germline chimeras from preimplantation embryos.-Transgenic Research 14. 523. 2005. (absztrakt) **impakt faktor: 2.54**
- Bender B, **Bodrogi L.**, Zhao YF, Mayer B, Hammarström L, Kacs Kovics I, Bősze Z (2005) Generation and initial characterisation of bovine FcRn alpha chain BAC transgenic mice, FEBS Journal vol. 272. suppl. 1 (absztrakt)
impakt faktor: 3,26
 - Bodó S, Gócza E, Révay T, Hiripi L, Carstea B, Kovács A, **Bodrogi L.**, Bősze Z (2004) Production of transgenic chimeric rabbits and transmission of the transgene through the germline, Molecular Reproduction and Development 68(4):435-40
impakt faktor: 2,331
- Bősze Z, **Bodrogi L.**, Raaben W, Fiechter D, Bender B., Brands R, Seinen W (2006) High level expression of TNAP in the milk of transgenic rabbits, EMBO Molecular Medicine Conference, Dublin, Ireland (absztrakt)
- Bender B, **Bodrogi L.**, Zhao Y, Mayer B, Hiripi L, Hammarstrom L, Kacs Kovics I, Bősze Z (2005) Generation of bovine FcRn alpha chain harboring BAC transgenic mice, Proceedings of the 5th International Conference on Transgenics. (absztrakt)
- **Bodrogi L.**, Bodó S, Gócza E, Carstea B, Hiripi L, Révay T, Kovács A, Bősze Z (2004) Ivarsejt kiméra nyulak létrehozása mikroinjektációs módszerrel, Állattenyésztés és Takarmányozás, 2004 53.2., 174-178.
- **Bodrogi L.**, Bodó S, Gócza E, Carstea B., Hiripi L., Révay T, Kovács A, Bősze Z (2004): Production of germline chimera rabbits by microinjection, Embryonic stem cells Mini-symposium, Gödöllő, Magyarország (absztrakt)
- Bodó S, Gócza E, Révay T, Hiripi L, Carstea B, Bender B, Kovács A, **Bodrogi L.**, Bősze Z (2004): Creating germ line chimeric rabbits by blastomer injection, 55th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Bled, Szlovénia (absztrakt)
- **Bodrogi L.**, Bodó S, Gócza E, Carstea B, Hiripi L, Révay T, Kovács A, Bősze Z (2003) Ivarsejt kiméra nyulak létrehozása mikroinjektációs módszerrel,

Szaporodás Biológiai Találkozó, (absztrakt)

- **Bodrogi L.** Bodó S, Gócza E, Carstea B, Hiripi L, Révay T, Kovács A, Bósze Z
(2003) Production of germline chimera rabbits by microinjection, Embryonic
Stem cells mini-symposium, Gödöllő