

Transzgénikus organizmusok

Összefoglaló - Transzgénikus állatok

Transzgénikus állatmodellek

Előállítási technológiák

- mi az eredeti biológiai alap?
- hogyan történik?
- hogyan követjük?

Előnyök/hátrányok

Alkalmazási példák

Transzgénikus modellek

GENETIKA



A mai biológiai kutatások integráló diszciplínája (a legutóbbi 10 orvosbiológiai Nobel díj közül 6-ot genetikai kutatásokért ítelték oda).

Alapvető célja:

- **az öröklődés törvényszerűségeinek feltárása**
- **gének és géntermékek biológiai funkciójának meghatározása**

Eszköztára:

- **funkció elrontása - mutagenézis**
- **szerkezet (információ) meghatározása - szekvenálás**

Funkcionális megközelítés: gének funkciójának megváltoztatása (elrontása vagy hiperaktiválása) – genetikai boncolás

I. mutáns analízis (*forward* és *reverse genetics*)

- gene knock out* (génkiütés – deléciók)
- transzpozonok
- fenotípusos elemzés (*mutant screens*)

II. RNS interferencia - géncsendesítés (*reverse genetics*) (*gene knock down*)

Klasszikus (*forward*) genetika: mutáns fenotípus  gén

Fordított (*reverse*) genetika: gén  biológiai funkció (fenotípus)

feltétele: genomi szekvenciák ismerete

Mutánsok elemzése a mutagenézis korszaka előtt – Morgan iskola

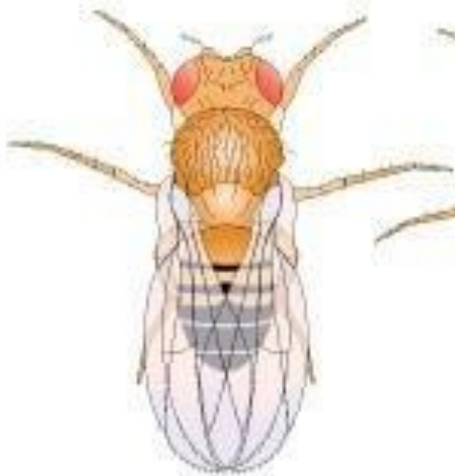
Spontán mutánsok izolálása fáradságos munkával Morgan csoportjában.



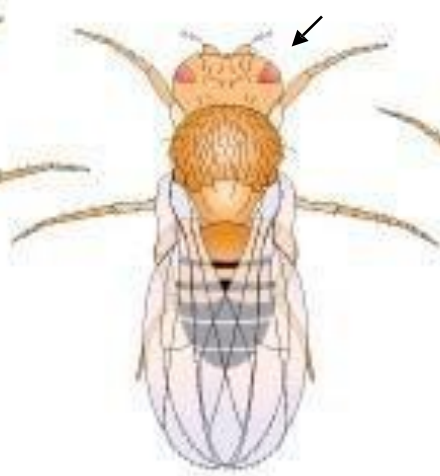
Thomas Hunt Morgan
Orvosi Nobel díj, 1933



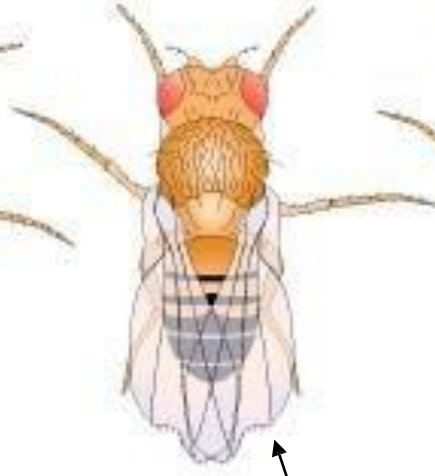
Drosophila morfológiai mutánsok



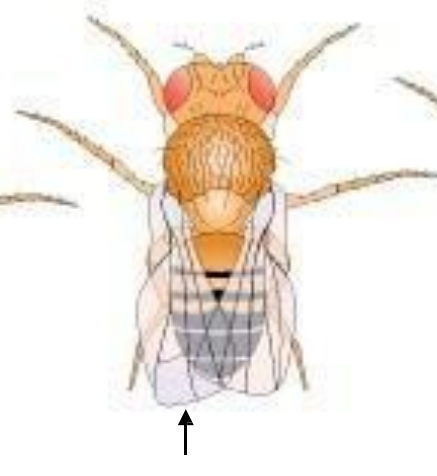
Vad típus



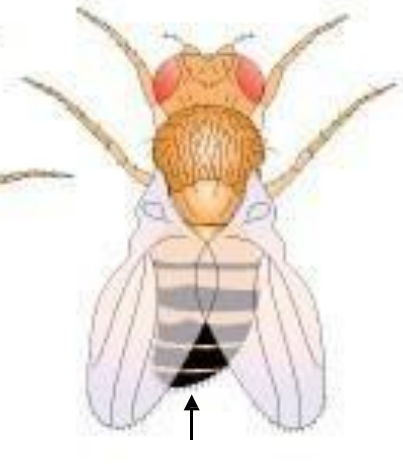
Bar eyes



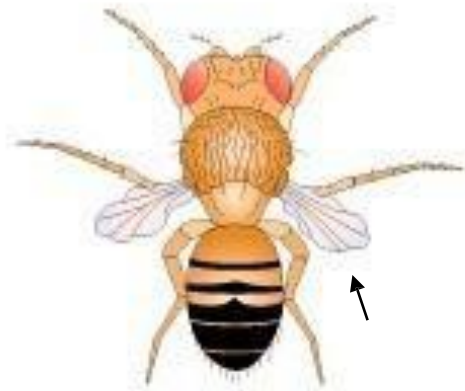
Cut wings



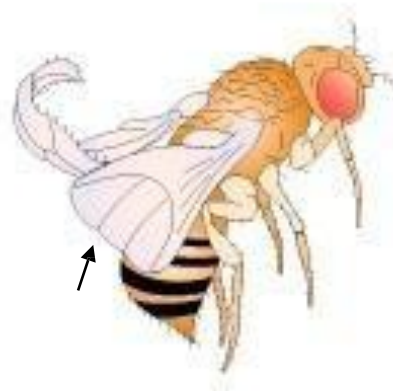
Rudimentary wings



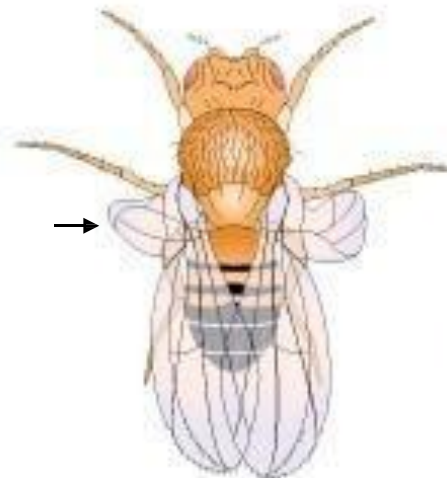
Rotated abdomen



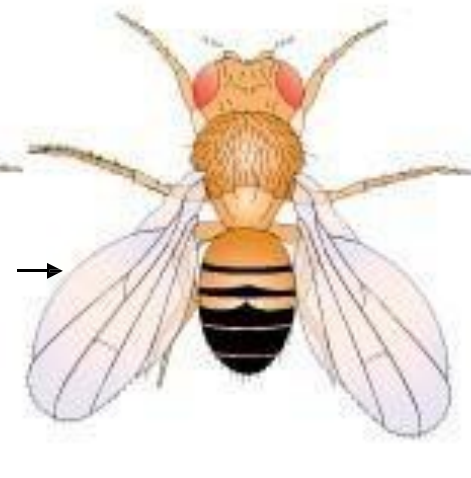
Vestigial wings



Curly wings



Bithorax



Dichaete

Mutációk típusai működés szerint

Amorf: a funkció teljes elvesztése – „*genetic null*” – deficienciával szemben nem javít (klasszikus *loss-of-function*)

Hipomorf: részleges funkcióvesztés (*reduction-of-function*)

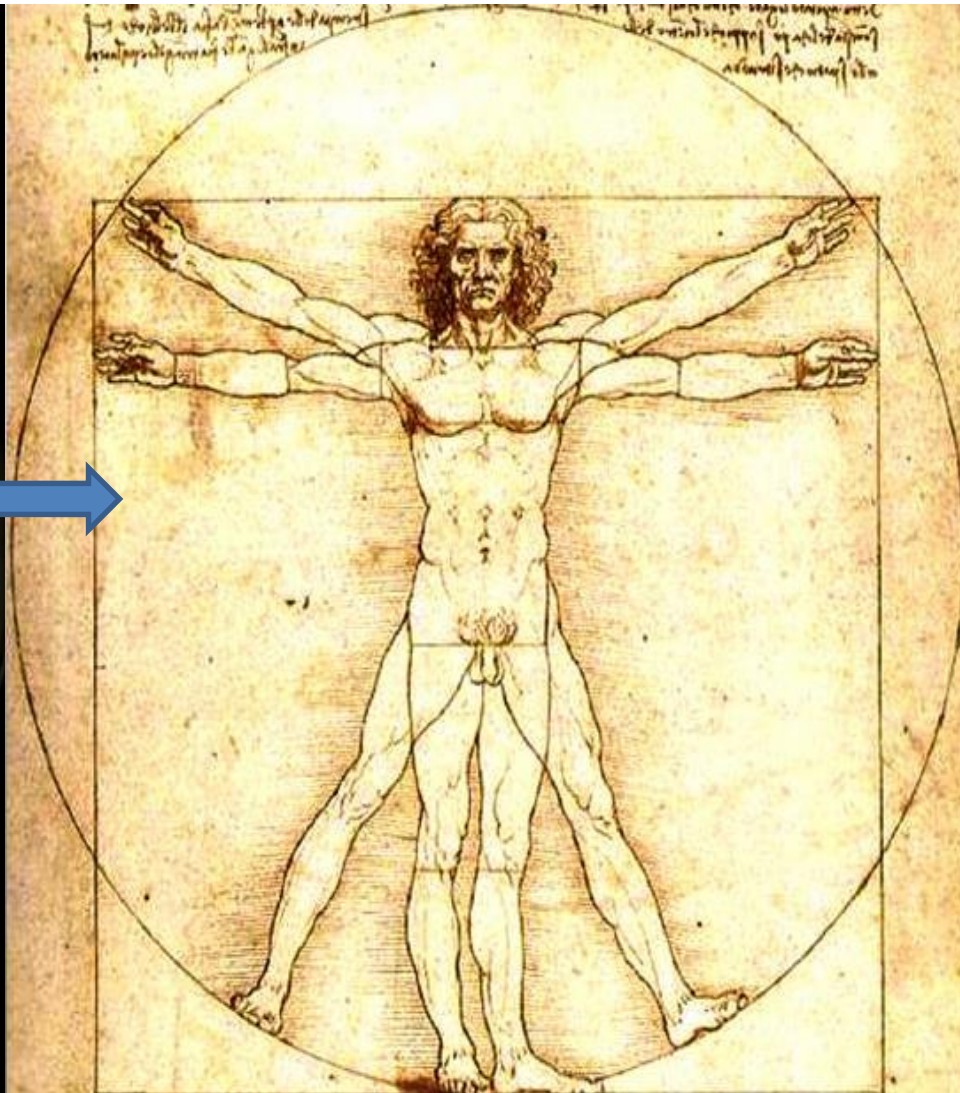
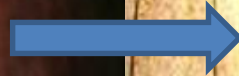
Hipermorf: funkciónyeréses mutációk (*gain-of-function*), sokszor a szabályozó régióban hiperfunkció vagy **ektopikus** expresszió (olyan sejtekben is, ahol normálisan nem expresszálódnak - sokszor domináns)

Antimorf: a mutáció ellentétesen hat a vad típusú alléllal – domináns-negatív mutációk

Neomorf: a vad típusú alléltól teljesen eltérő új funkció alakul ki

A mutagenézis célja: génjeink funkciójának megismerése

Egyedfejlődésünk feltérképezése.



Az ember, mint genetikai modell rendszer?

Nem:

- **hosszú generációs idő**
- **kicsi egyedszám (egy keresztezésből)**
- **nem mutagenizálható**
- **nem keresztezhető szabadon**
- **...**

Valójában igen:

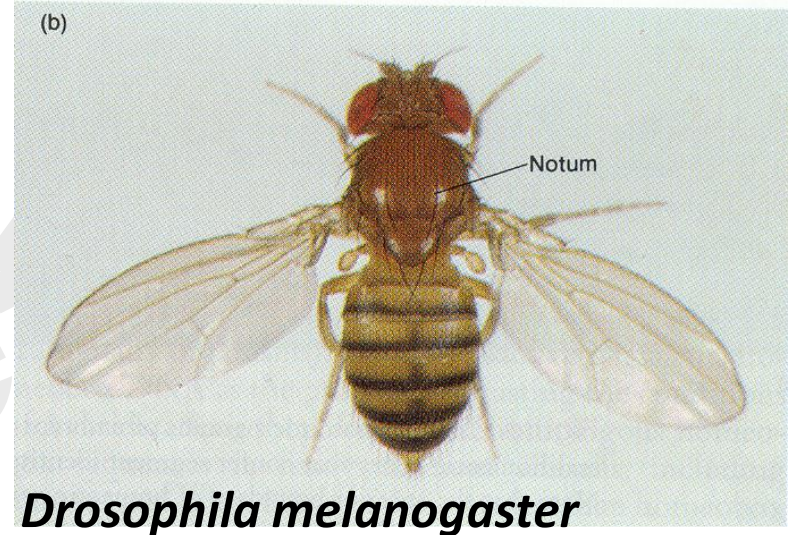
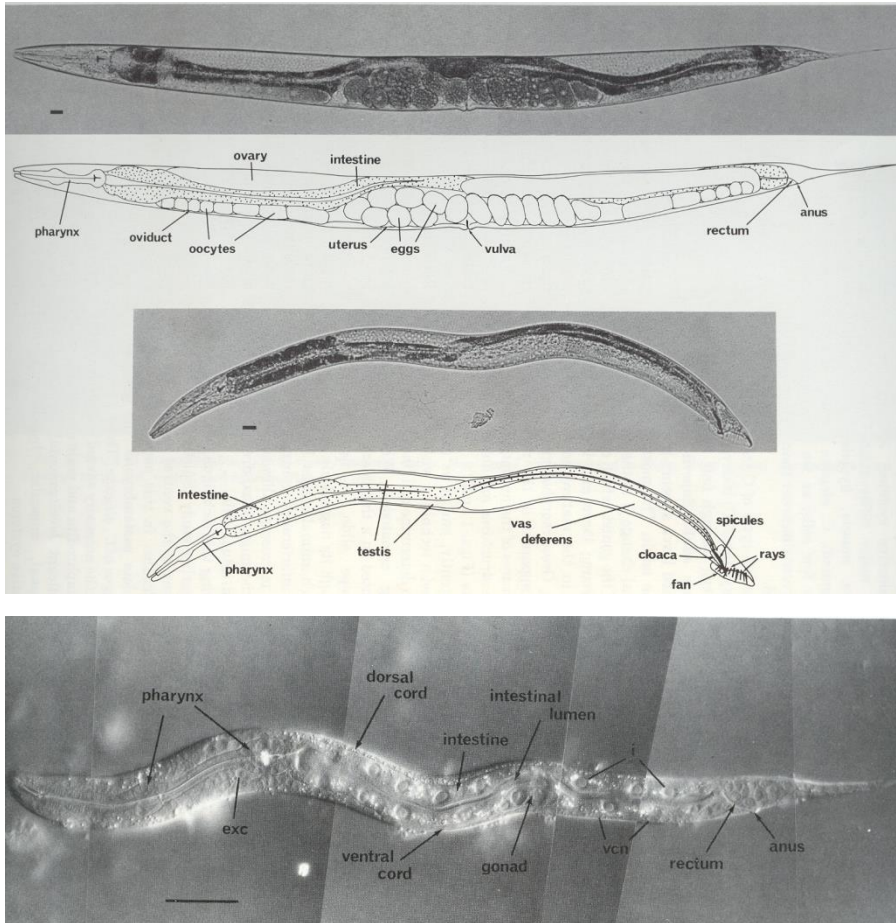
- **szekvenálási hatékonyság**
- **természetes mutagenézis (betegségek)**
- **mutáns bankok (kórházakban)**
- **családfák (CEPH családok, LOD analízis)**

Megoldás: genetikai modellszervezetek

- Baktériumok (1996-tól)
- Élesztő (egysejtű)
- *Caenorhabditis elegans* (fonalféreg)
- *Drosophila melanogaster* (rovar)
- *Danio rerio* (hal)
- *Mus musculus* (emlős)
- *Arabidopsis thaliana* (növény)

Génfunkciók és az egyedfejlődés alapvető kérdéseinek tanulmányozása genetikai modell szervezeteken

Caenorhabditis elegans

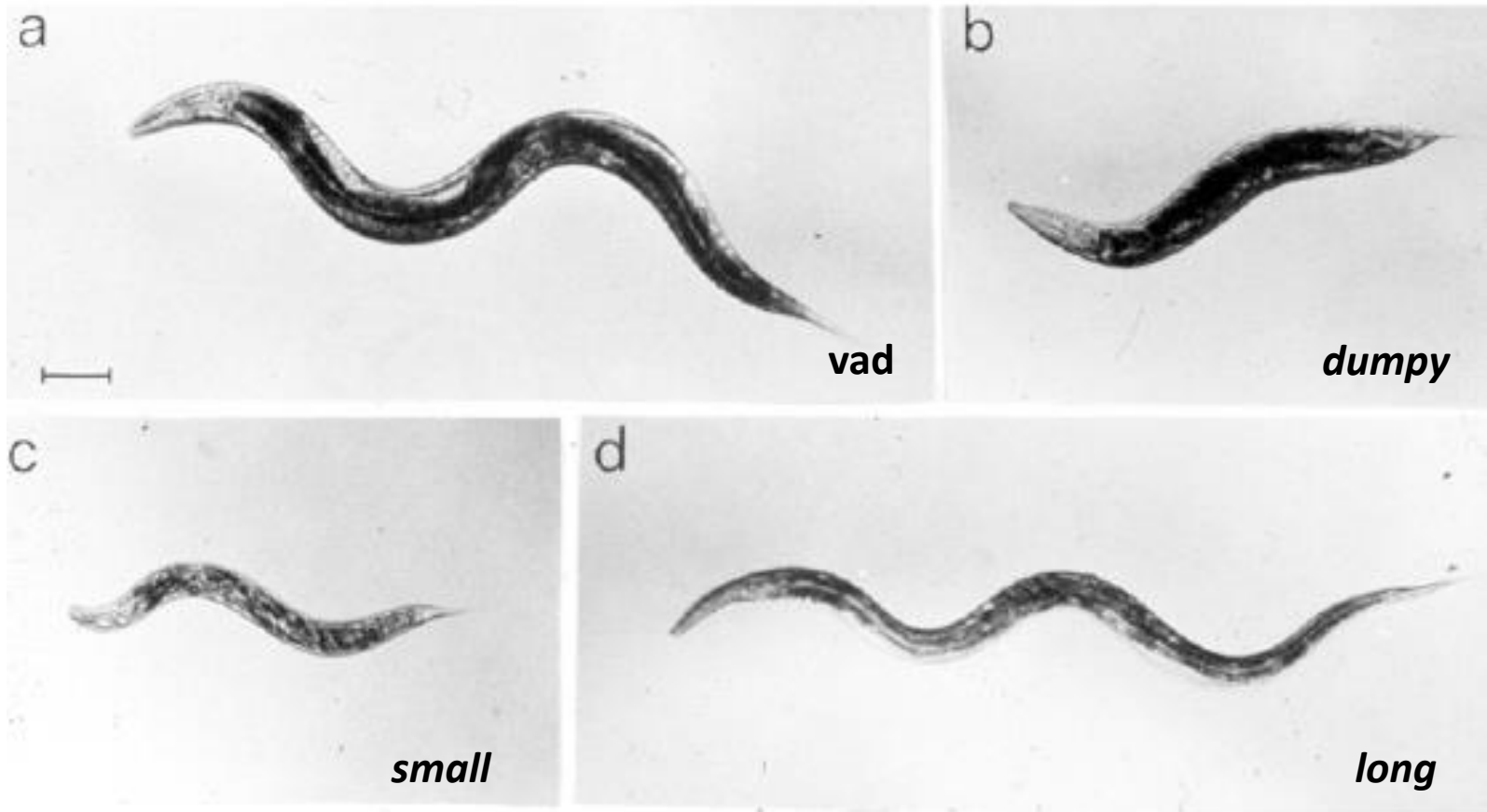


... és természetesen

Arabidopsis thaliana



Morfológiai mutáns fenotípusok



a. wild type b. Dpy c. Sma d. Lon

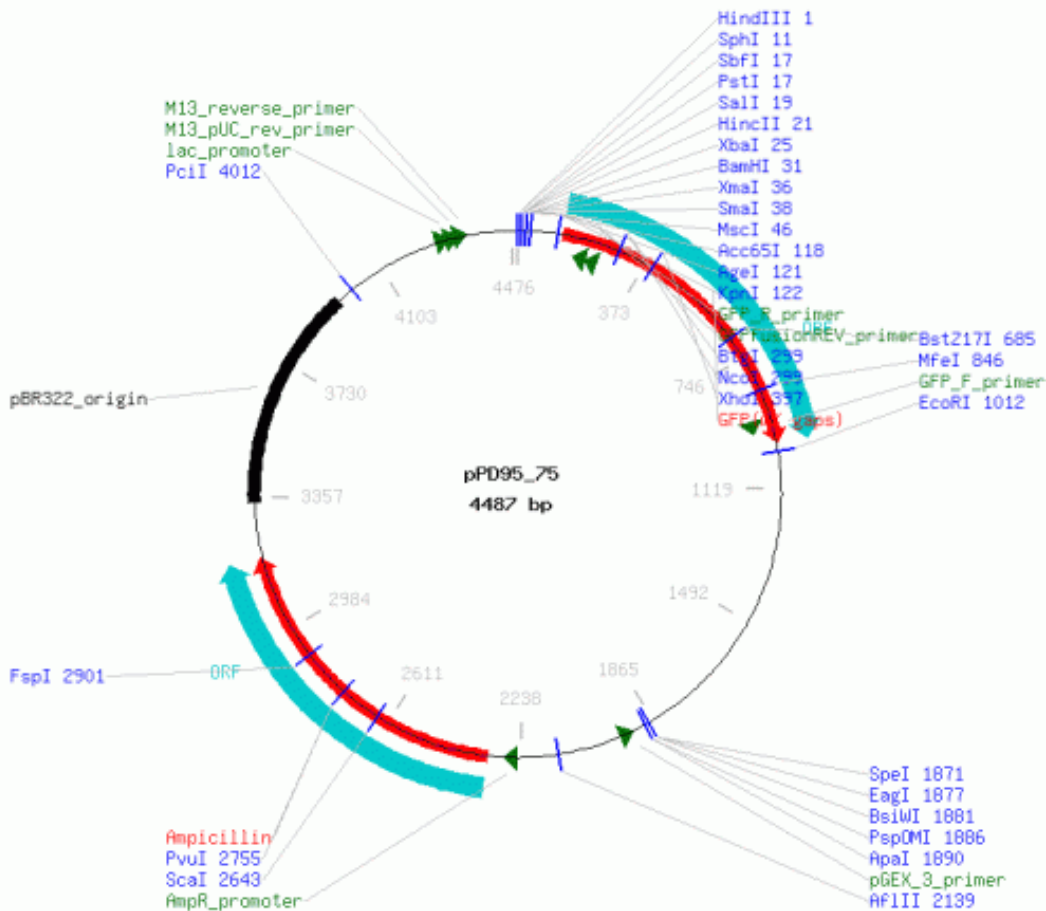
Az embrió burka (*egg shell*) átlátszó: fénymikroszkóp segítségével az egyedfejlődés nyomon követhető

Genetikai vizsgálatok egyedi sejtszinten (*at the single-cell level*)

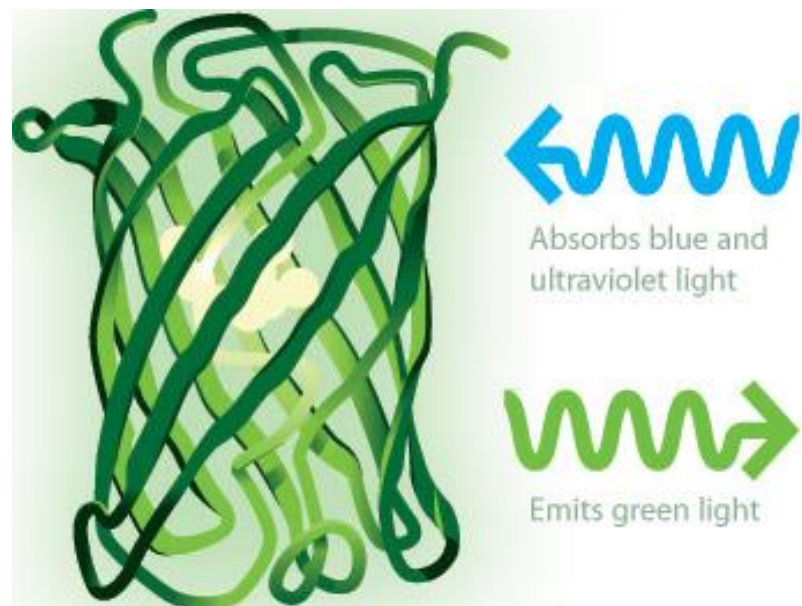


Expressziós analízis

MIKOR? (az egyedfejlődés mely stádiumában)
HOL? (mely sejtekben) fejeződik ki egy gén

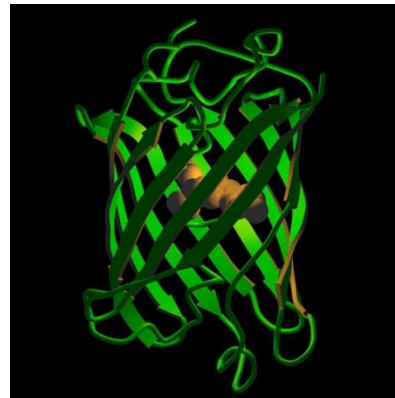


Expressziós vektor

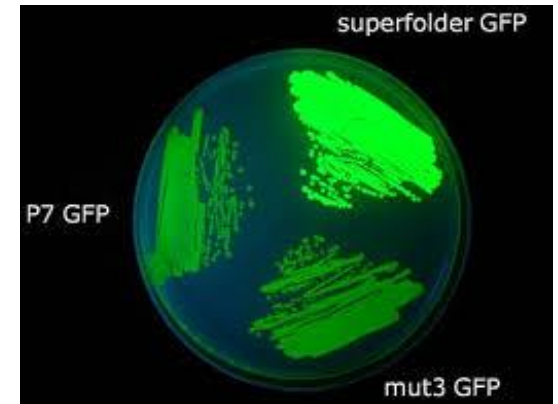


GFP: green fluorescent protein

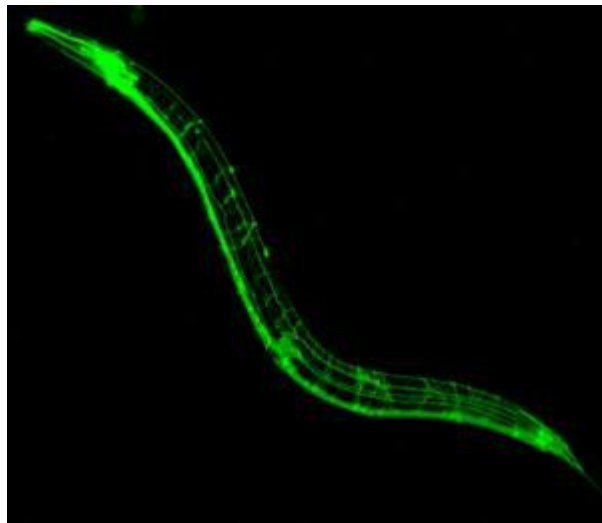
Fluoreszcens fehérjék felhasználása



GFP



Escherichia coli



Caenorhabditis elegans

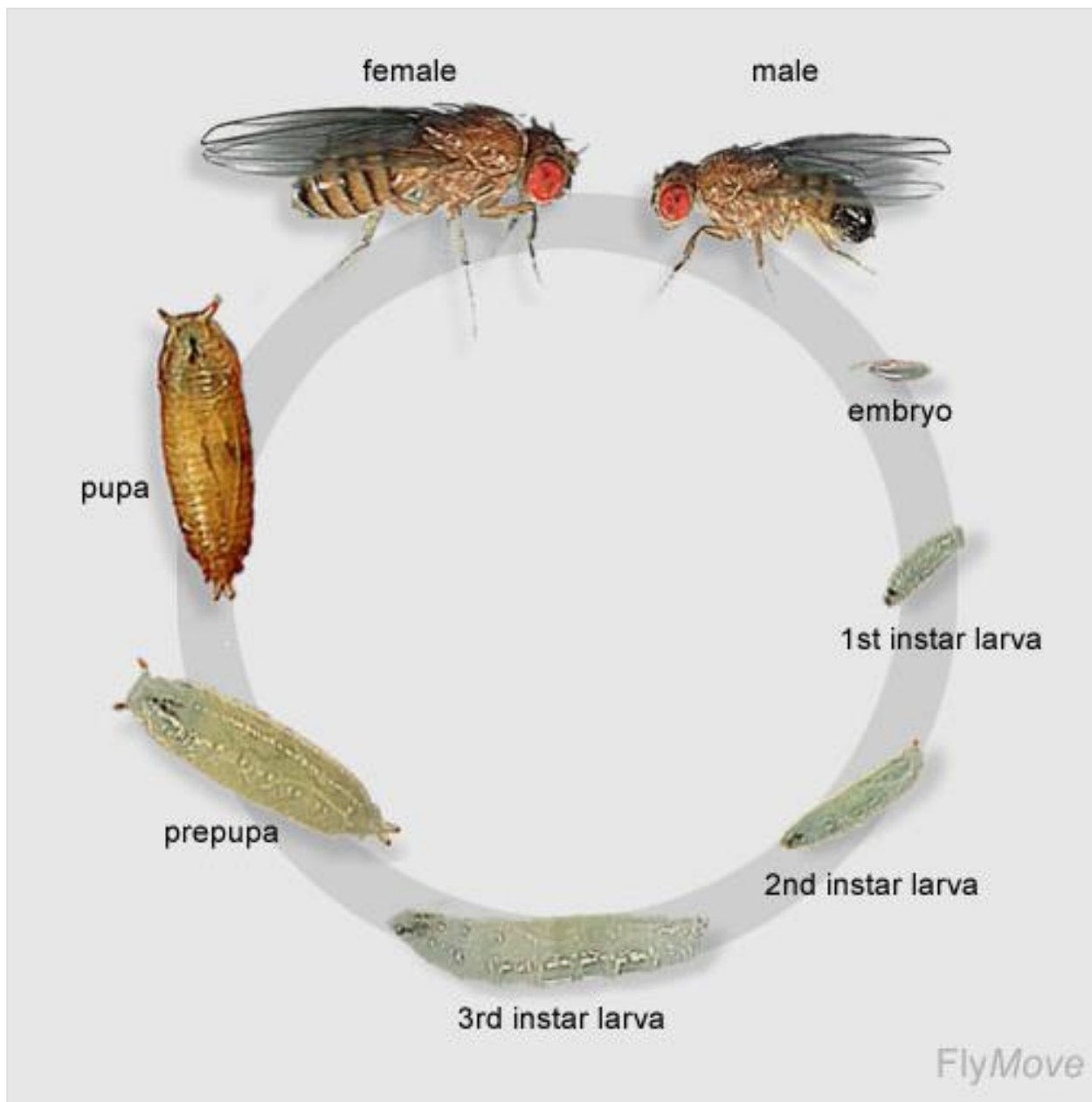


Minden más

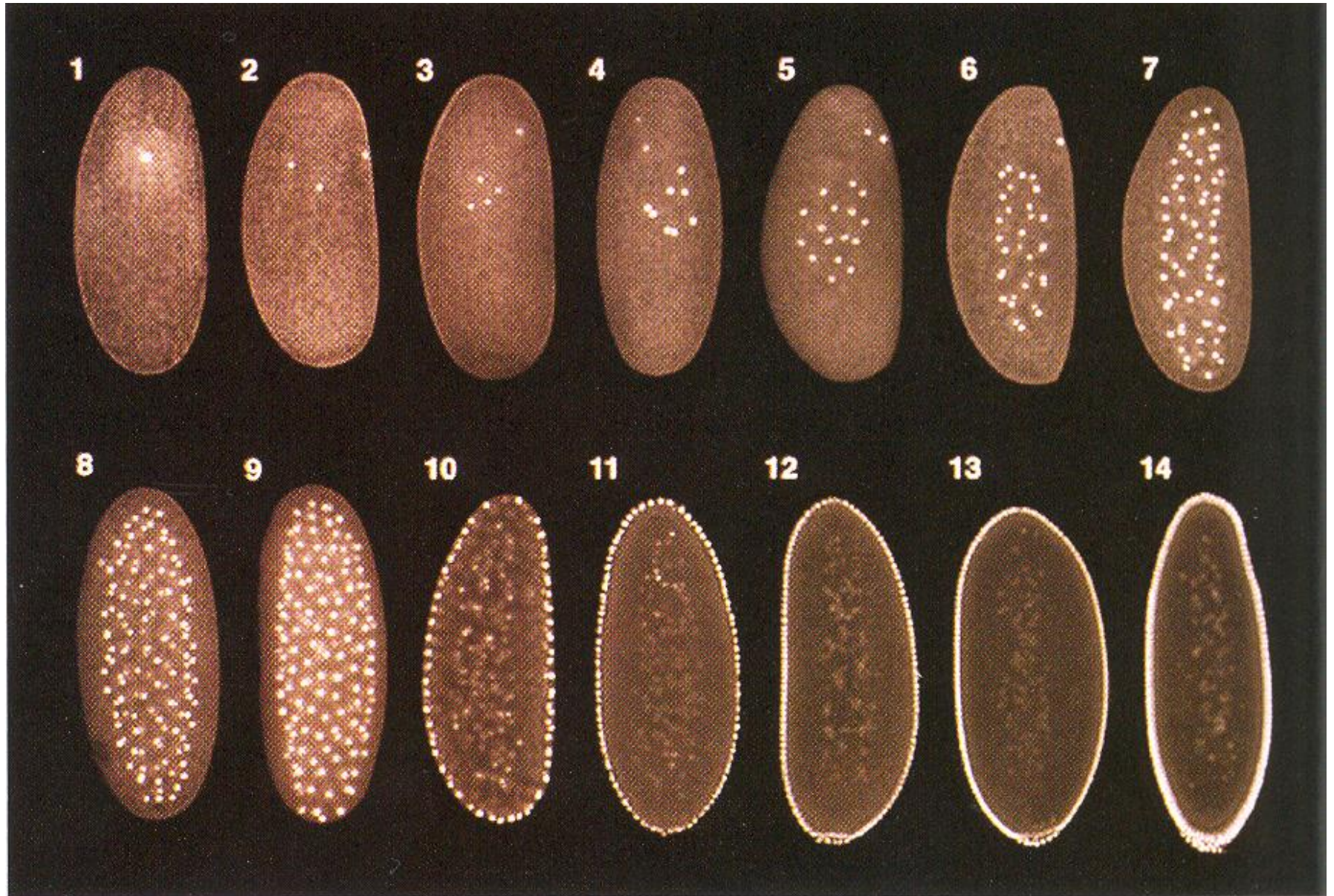
Drosophila melanogaster
(gyümölcslégy – muslica)



A *Drosophila* életciklusa

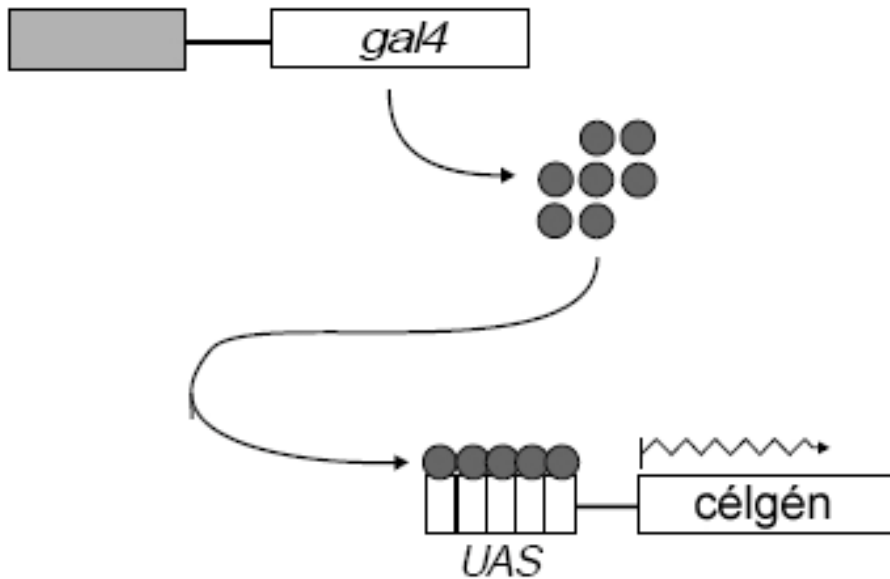


A *Drosophila* embrió korai fejlődése



UAS-Gal4 rendszer

genomikus/
klónozott
promóter



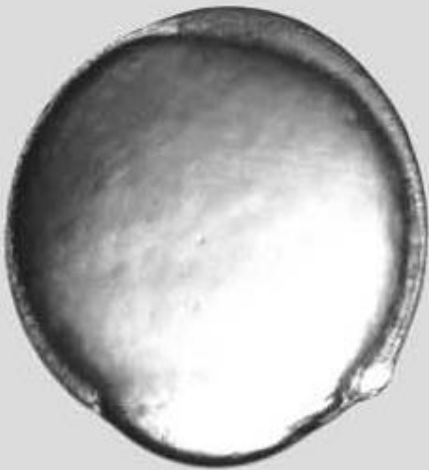
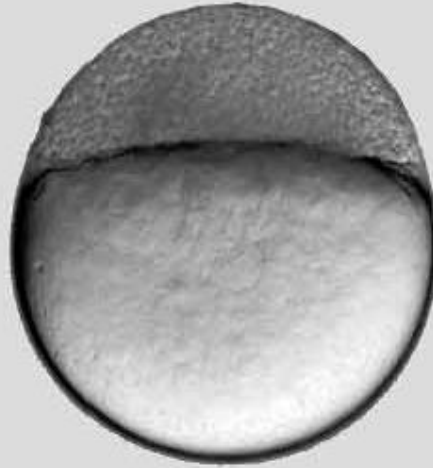
dpp-Gal4, UAS-eyeless

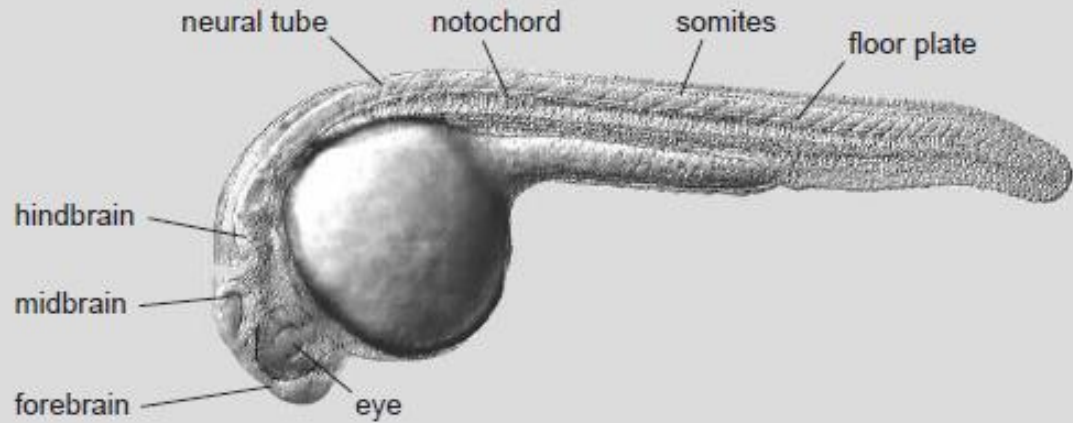
Gal4 élesztő transzkripció faktor, ami a megfelelő DNS-szekvenciához köt a célgén promóterében (UAS – *upstream activating sequence*), és elindítja a génexpressziót.

Zebrahal (*Danio rerio*)



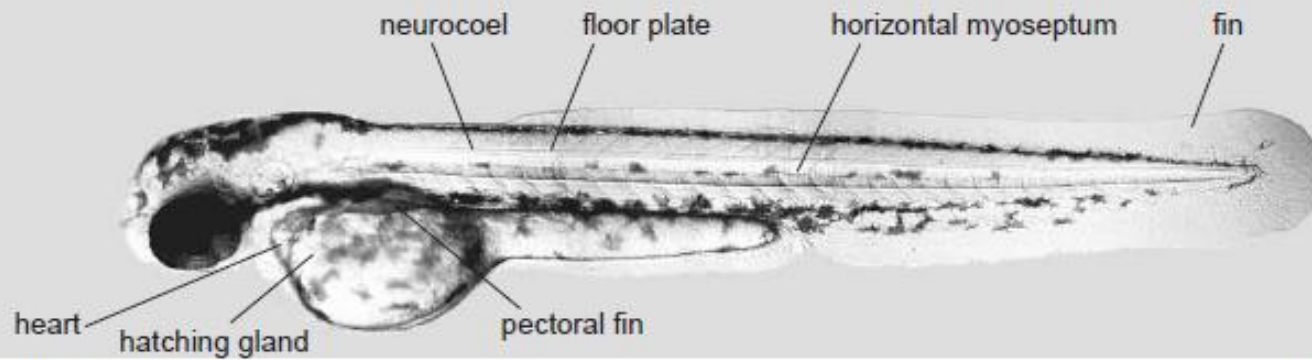
Korai egyedfejlődés





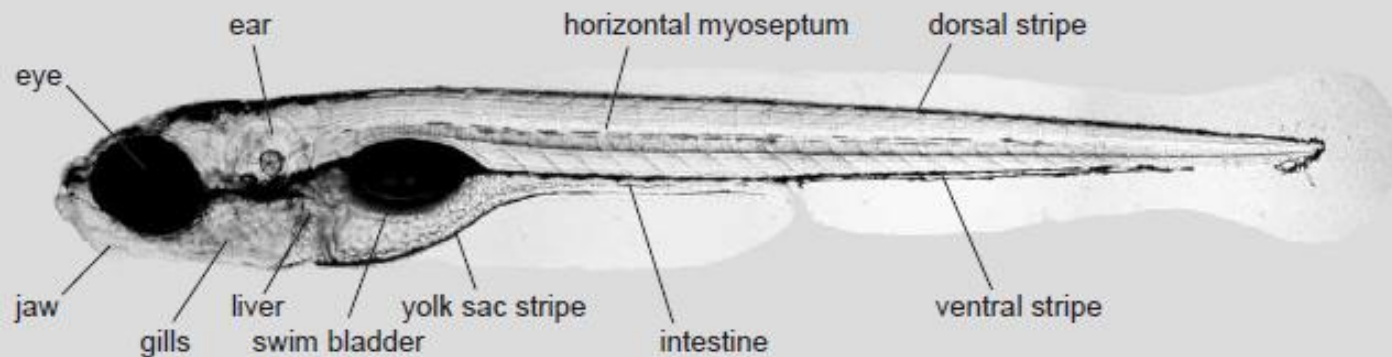
pharyngula period

29 h



hatching period

48 h



swimming larva

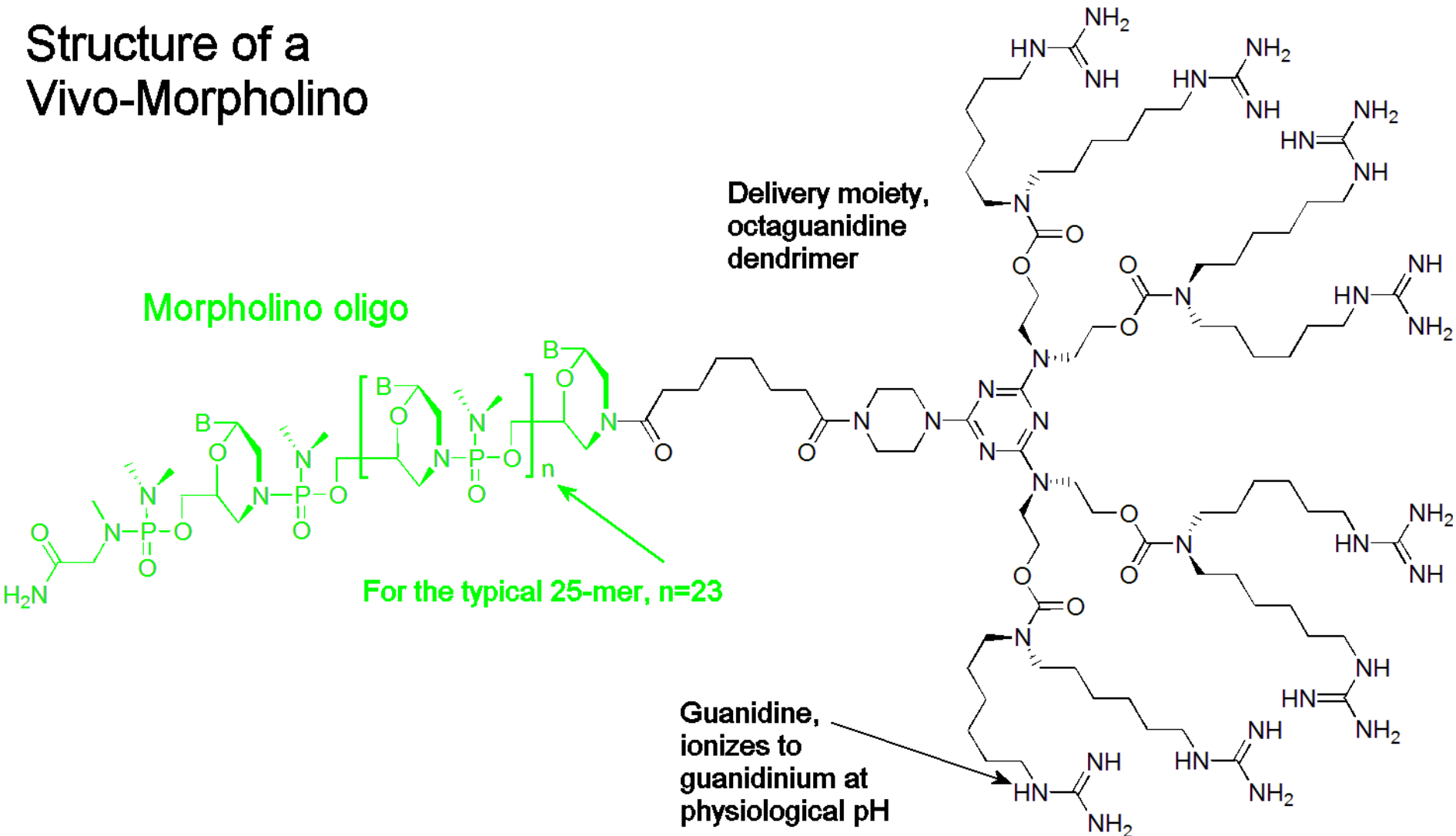
5 d

Zebrahalban siRNS csendesítés - MORPHOLINO

morpholino

Vivo morpholino

Structure of a Vivo-Morpholino



Transzgénikus állatok előállítási lehetőségei

• DNS mikroinjektálás

• Spermium közvetített génbevitel

• Retrovírus közvetített génbevitel

• Lentivírus közvetített génbevitel

• Transzpozon-transzpozász rendszer felhasználásával

• Minikromoszómák felhasználásával

• DNS injektálás spermatogóniumba

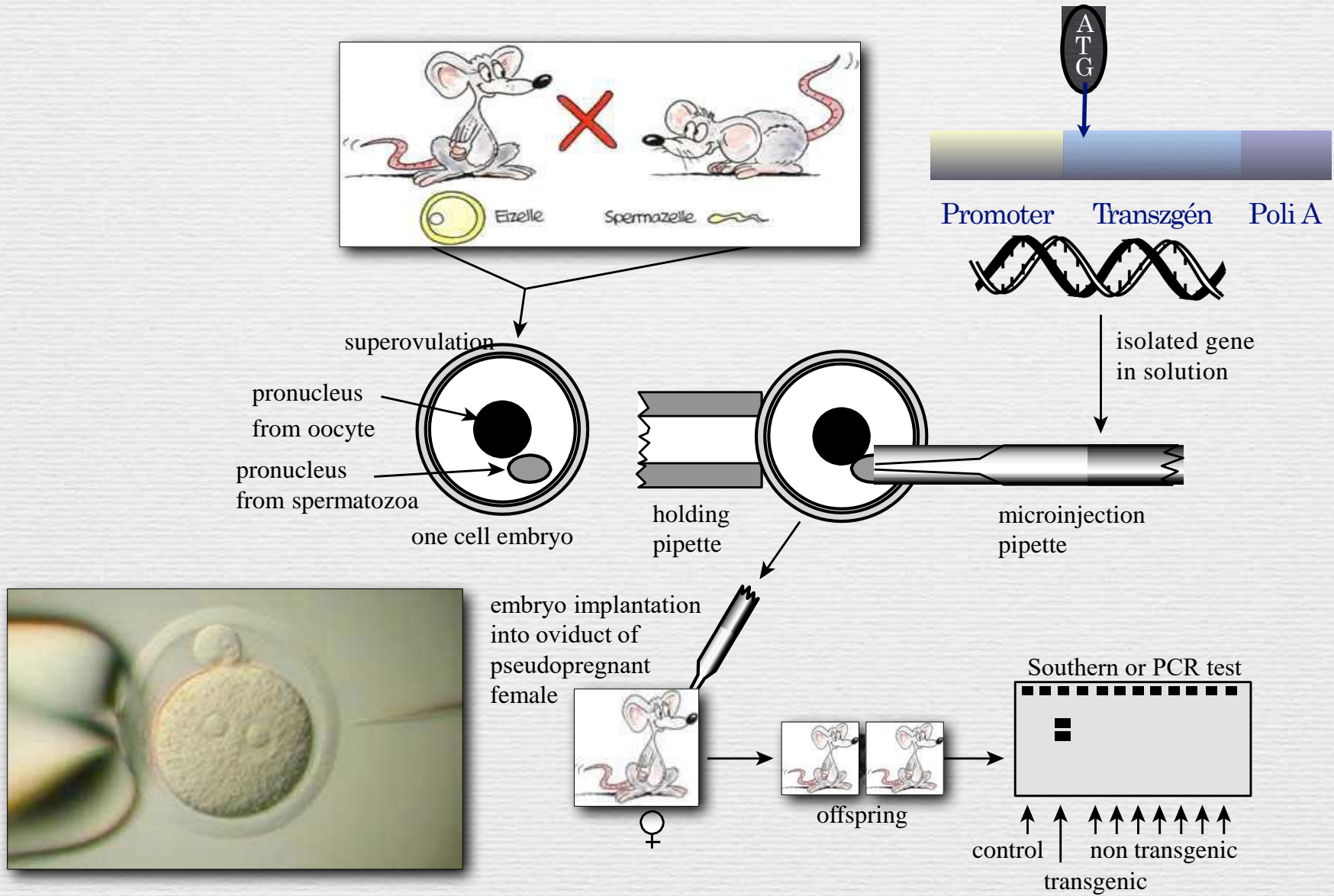
• Transzgénikus SC és ES sejtekből magátültetési klónozással

• Célzott génbevitel transzgénikus ES sejtvonalak felhasználásával

• Transzgénikus spermatogóniális őssejtek beültetésével



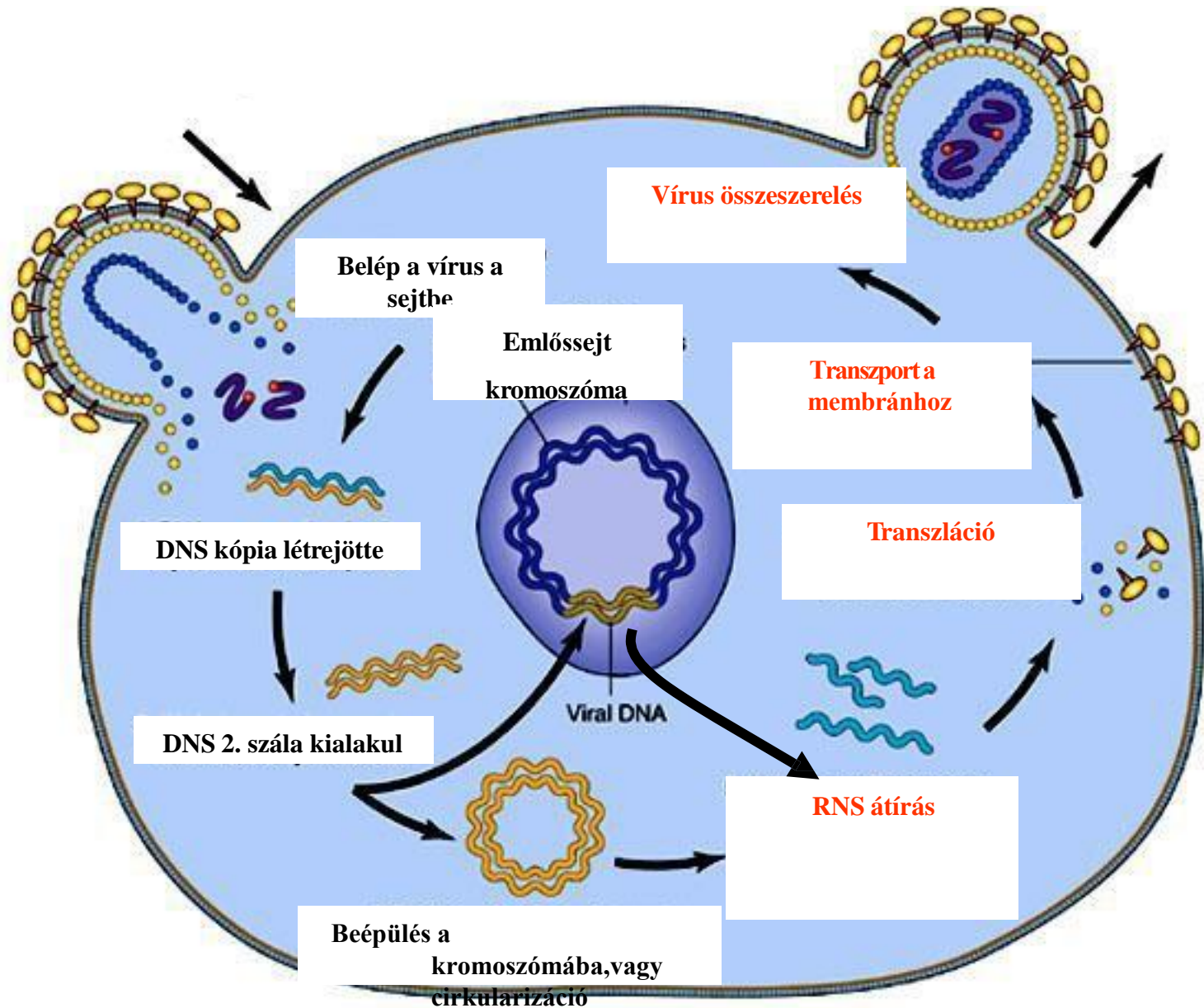
Transzgénikus egerek előállítása mikro-injektálással



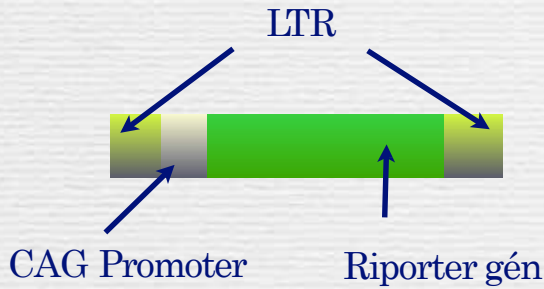
LENTIVÍRUS VEKTOR

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

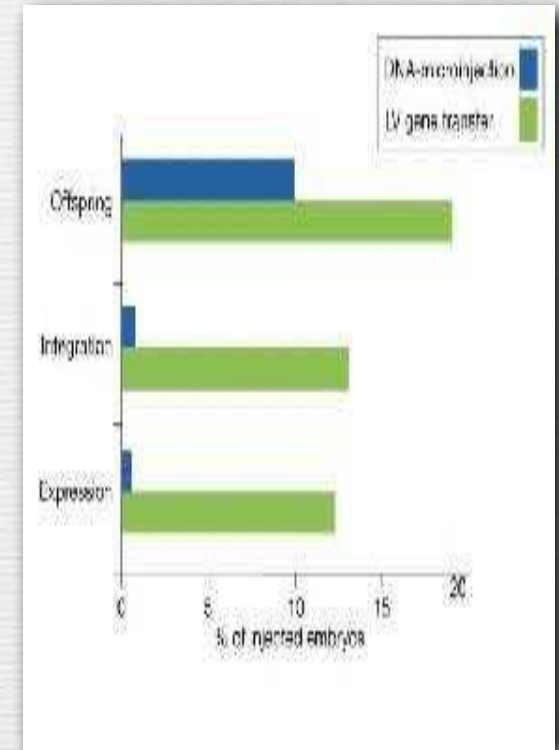
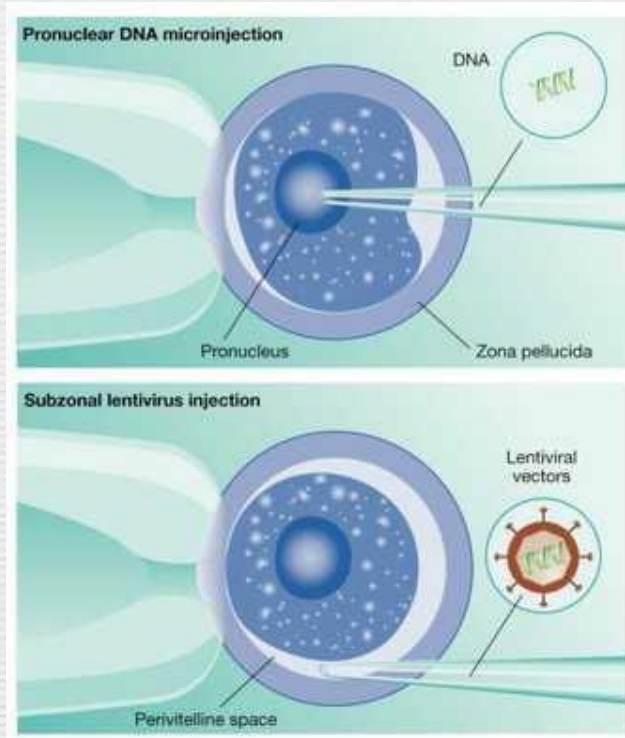
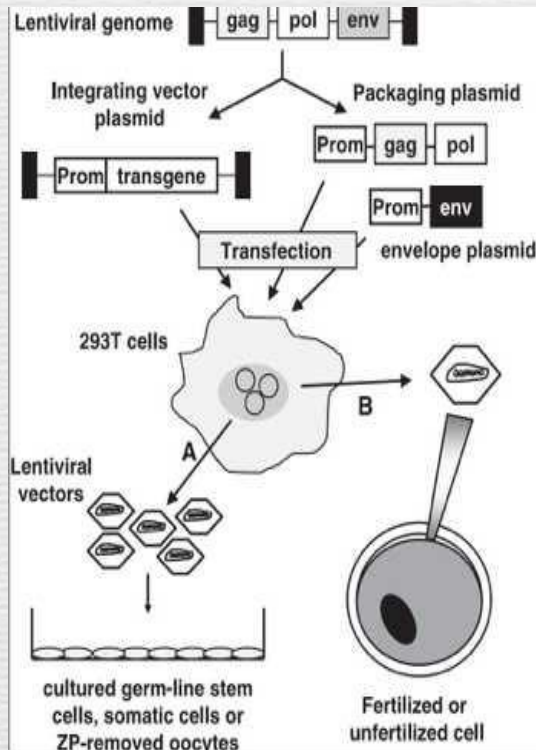
A lentivírus életciklusa, és ennek felhasználása a transzgenezisben



Transzgénikus egerek előállítása lenti vírus vektor (LV) transzdukcióval



DNS és LV injektálás
módszerének összehasonlítása



DNS és LV injektálás
hatékonyságának
összehasonlítása (sertés)

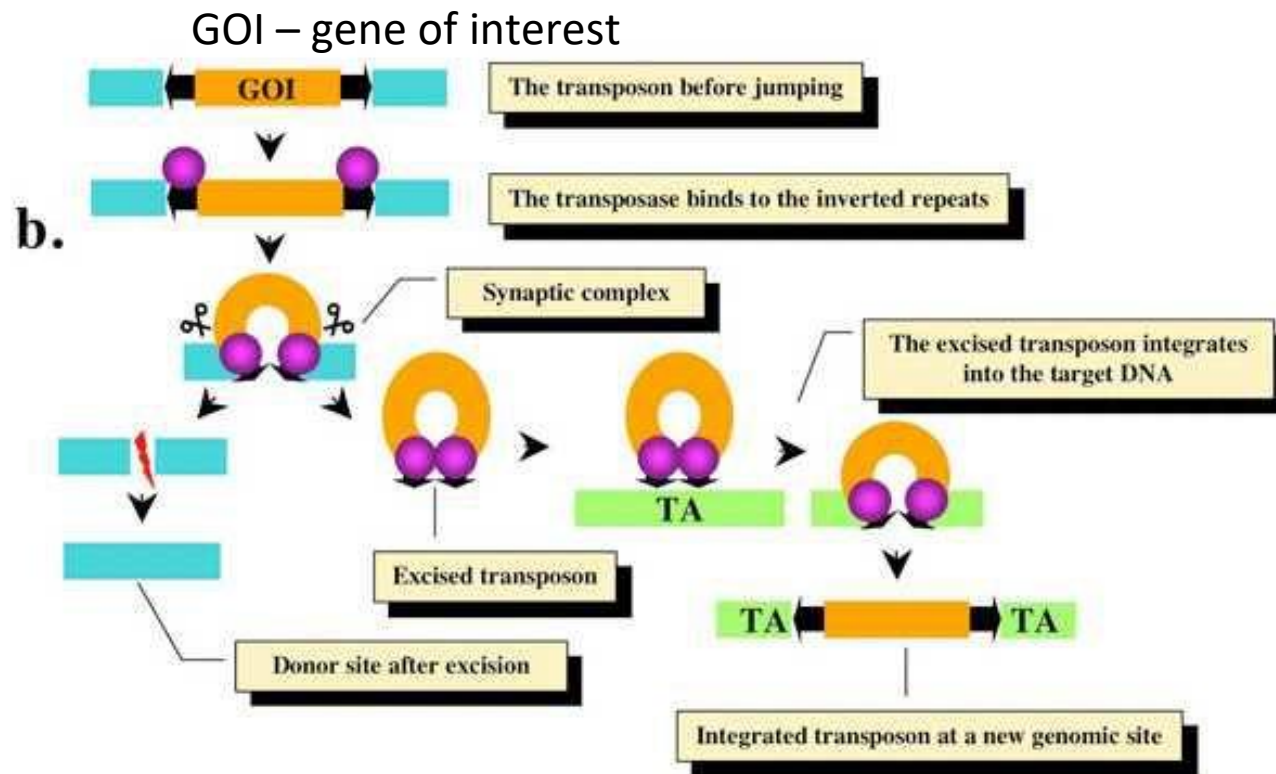
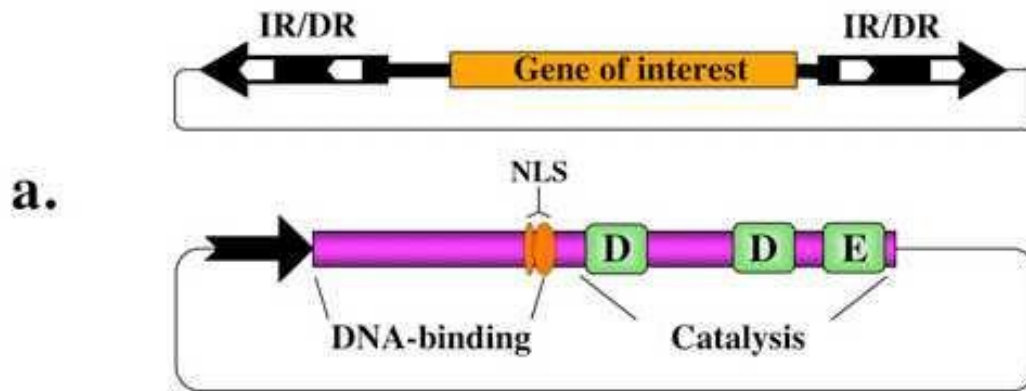
TRANSZPOZONOK

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

Transzpozonok általános jellemzői

- 2 csoportra osztják a transzpozonokat:
 - autonóm: kódolja a transzpozáz enzimet is
 - nem-autonóm: hiányzik a transzpozáz gén
- Transzpozáz aktivitással rendelkezhet RNS-molekula és fehérje is.
- Nem-autonóm transzpozonokkal hozható létre stabil transzgenezis
- Rövid idejű fenntartására transzpozáz mRNS injektálását alkalmazzák.

Transzpozon közvetített génbevitel



Transzgénikus állatok előállítási lehetőségei

DNS mikroinjektálás

Spermium közvetített génbevitel

Retrovírus közvetített génbevitel

Lentivírus közvetített génbevitel

Transzpozon-transzpozász rendszer felhasználásával

Minikromoszómák felhasználásával

DNS injektálás spermatogóniumba

Transzgénikus SC és ES sejtekből magátültetési klónozással

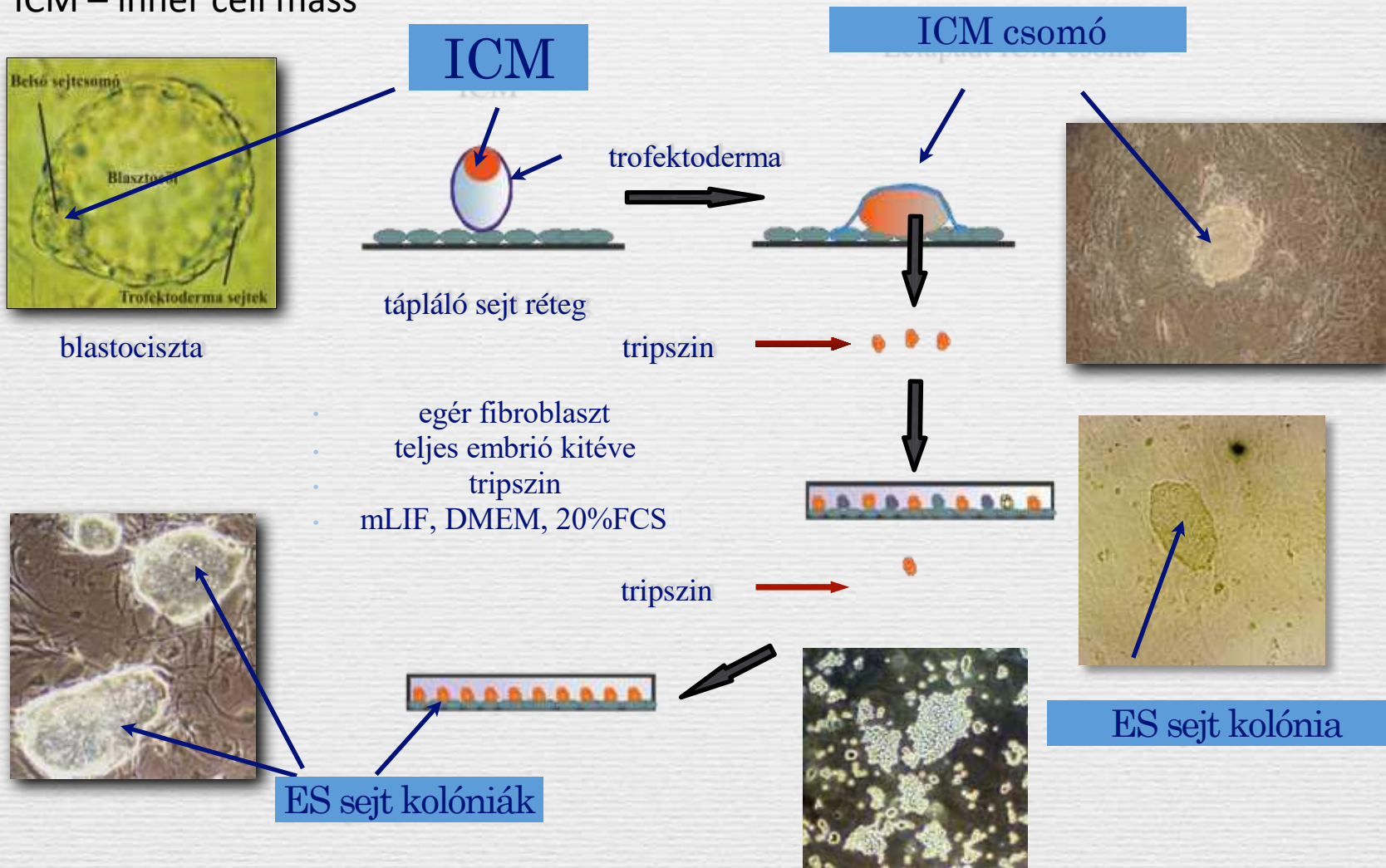
Célzott génbevitel transzgénikus ES sejtvonalak felhasználásával

Transzgénikus spermatogóniális őssejtek beültetésével

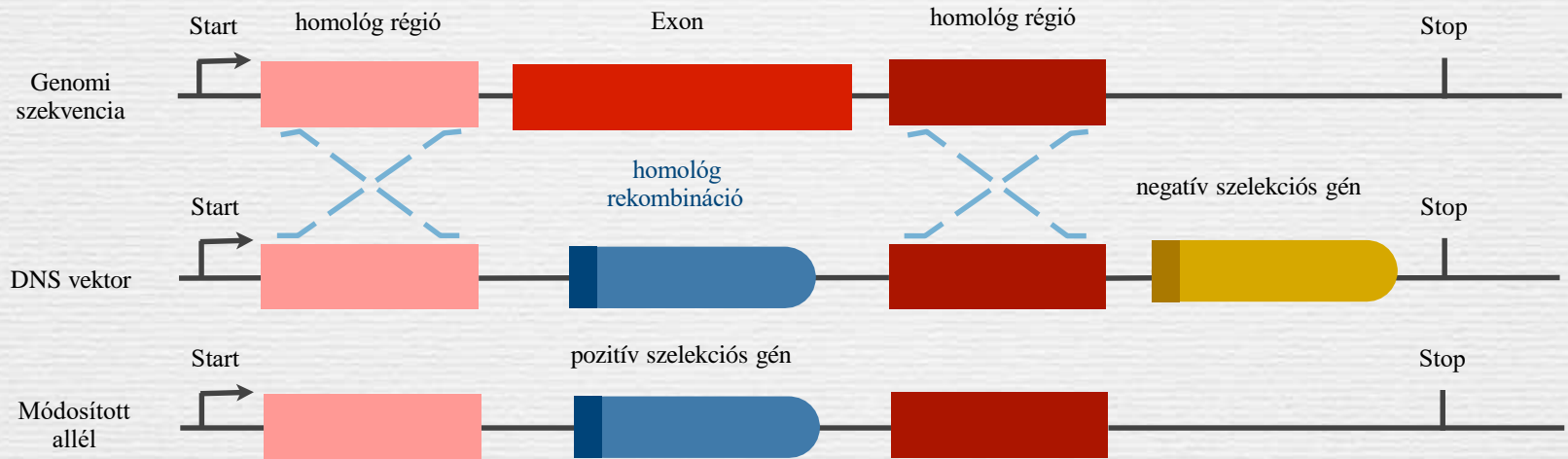


PLURIPOTENS EMBRIONÁLIS EREDETŰ ÖSSEJT- VONALAK (ES SEJTVONALAK)

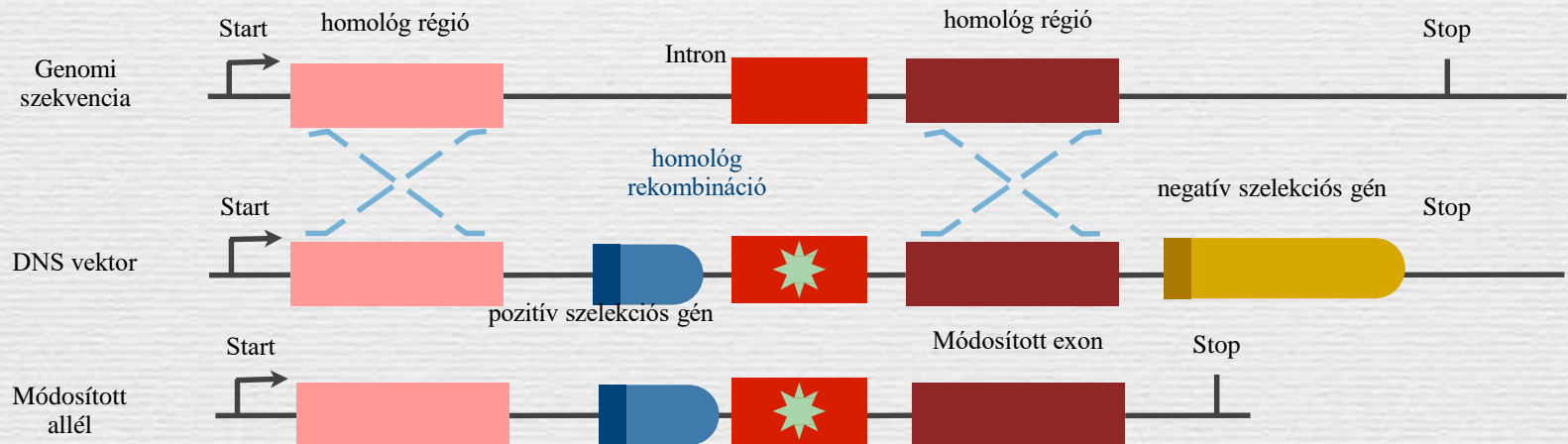
ICM – inner cell mass



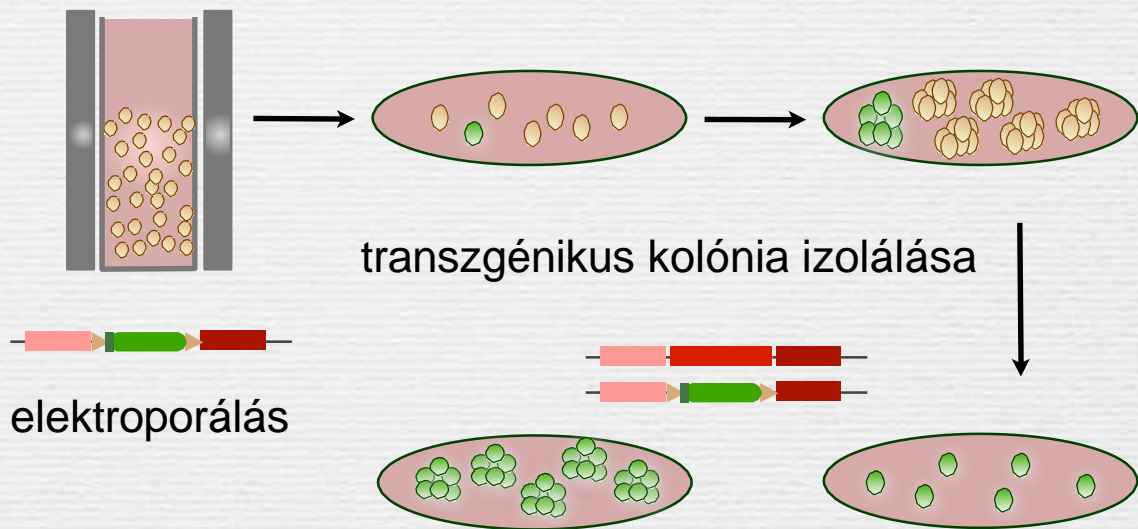
HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓ - CÉLZOTT GÉNKIÜTÉS



HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓ - CÉLZOTT GÉNMODOSÍTÁS

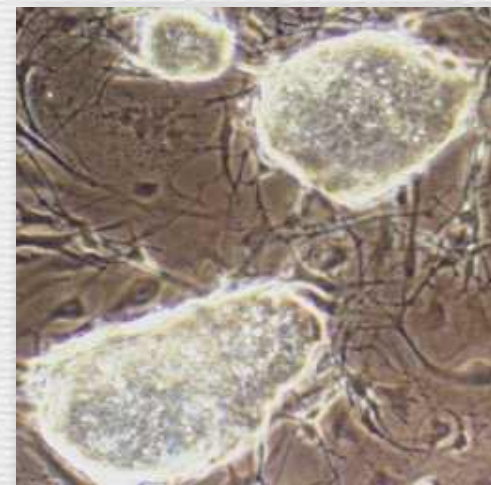
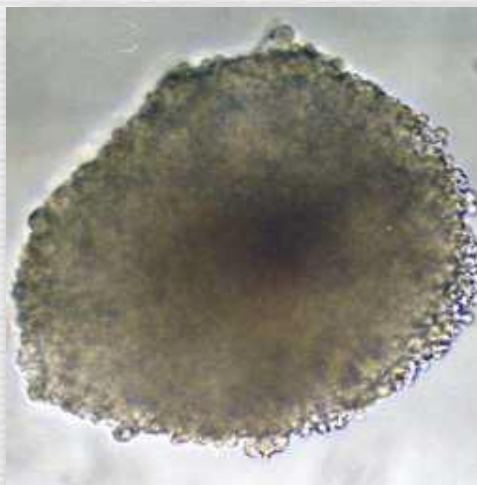
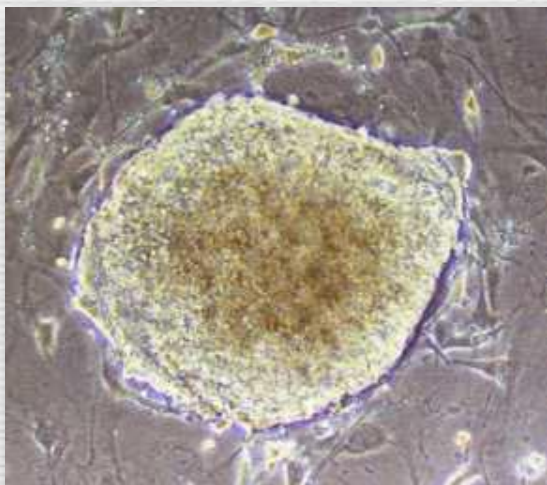


DNS elektroporálás ES sejtekbe



rezisztens kolónia

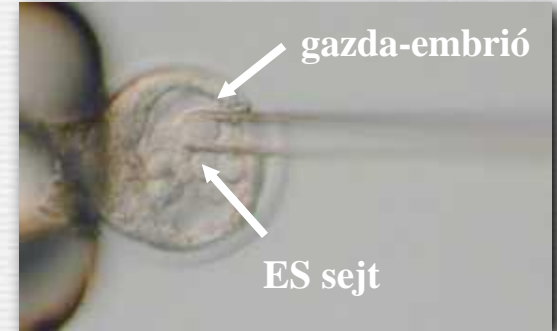
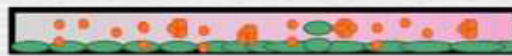
kolónia tripszinben



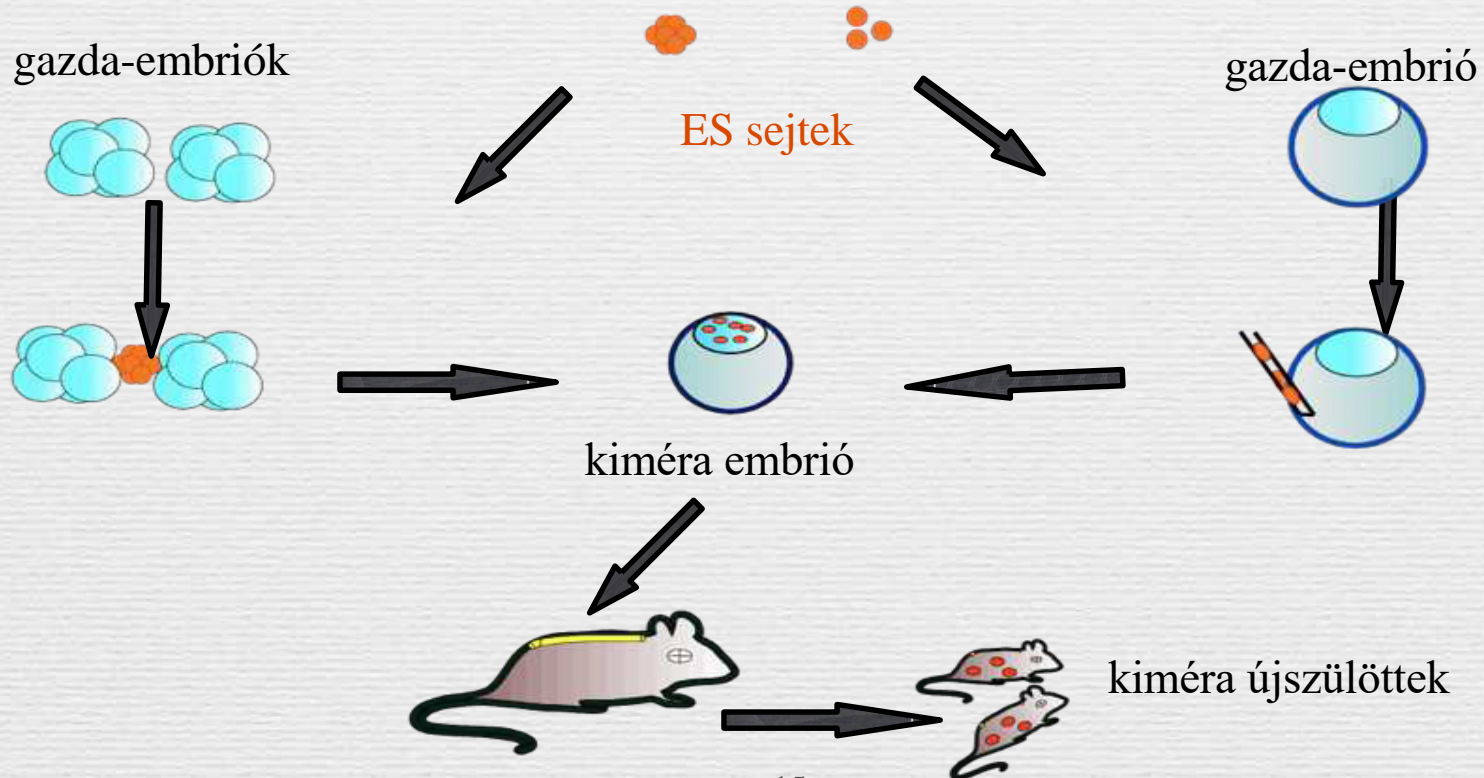
ES KIMÉRÁK LÉTREHOZÁSA



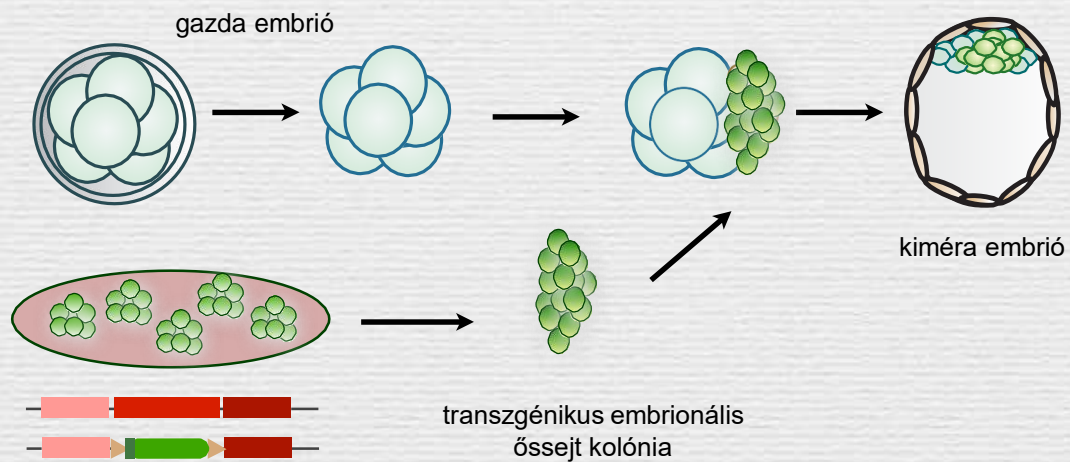
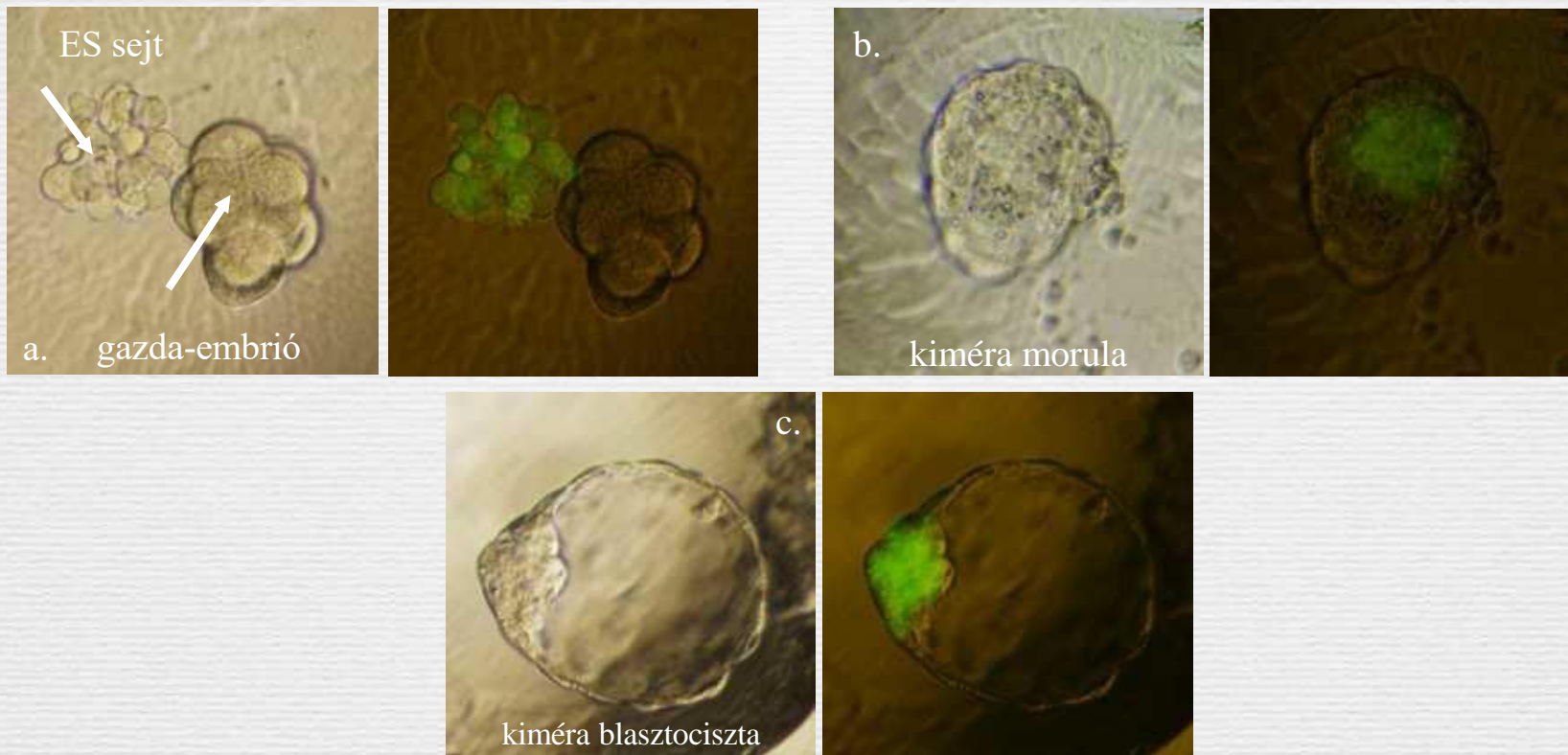
AGGREGÁCIÓ



INJEKTÁLÁS

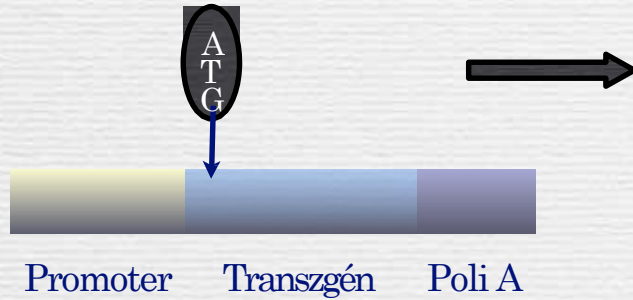


HOMOZIGÓTA TRANSZGÉNIKUS EGEREK LÉTREHOZÁSA

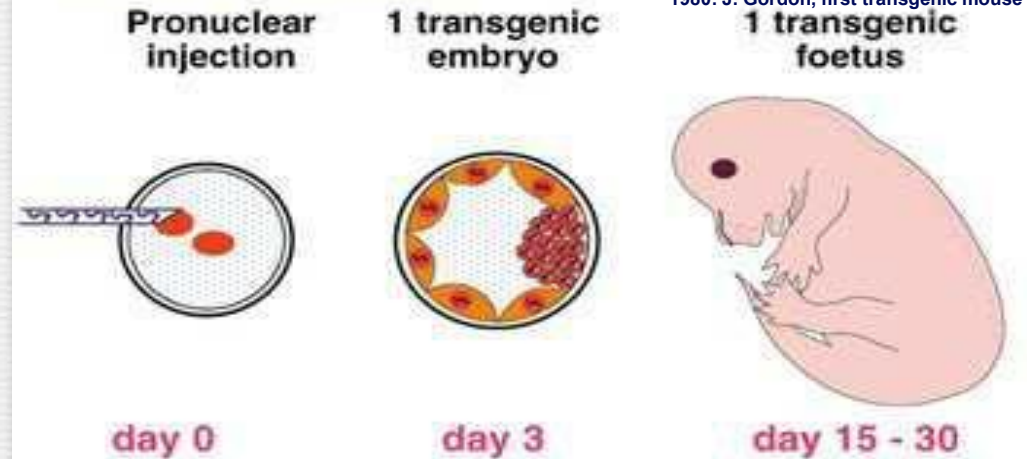


Transzgénikus egerek előállítása

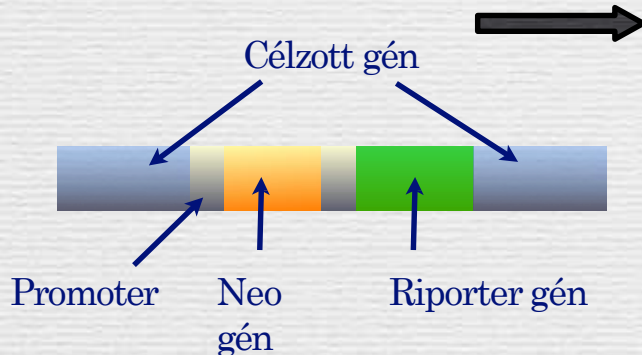
Random inszerció



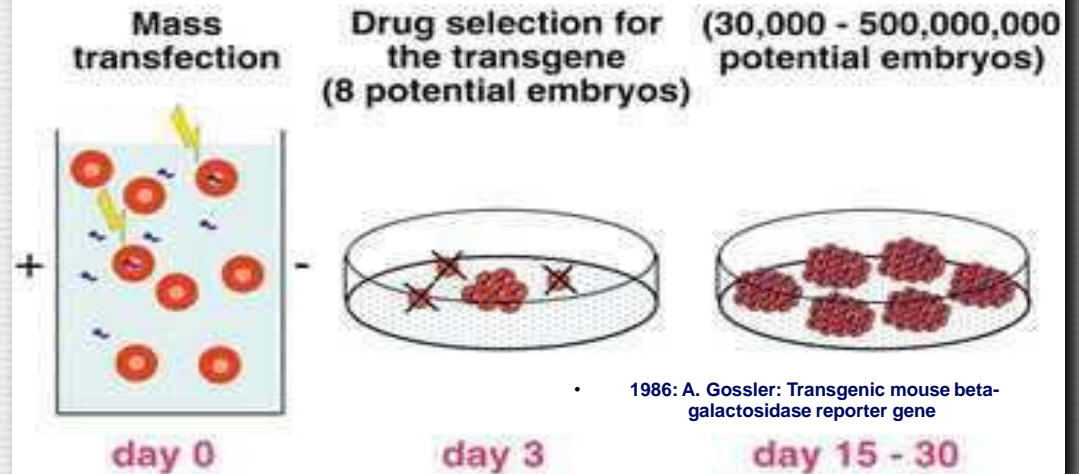
DNS mikroinjektálás



Célzott génmódosítás



ES sejtek felhasználásával



TRANSZGENIKUS NYÚL ELŐÁLLÍTÁSA MIKROINJEKTÁLÁSSAL

Hormon kezelések:

Donorok

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

Recipiensek-álvemhesség tétel

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

Embrió transzfer sebészeti vagy laparoskopos eljárással

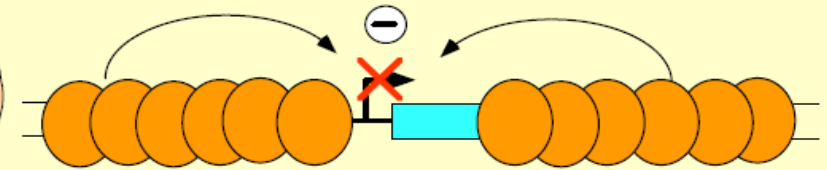
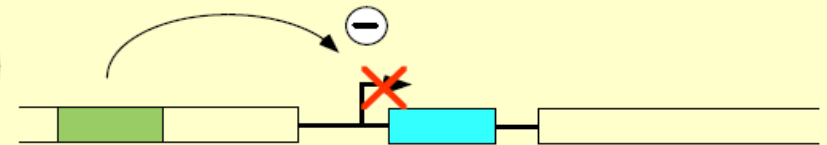
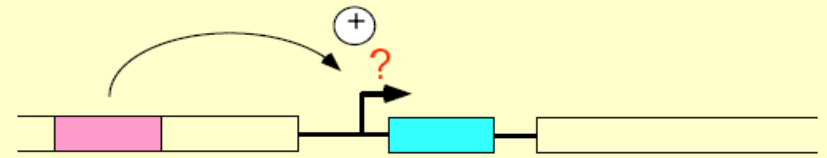
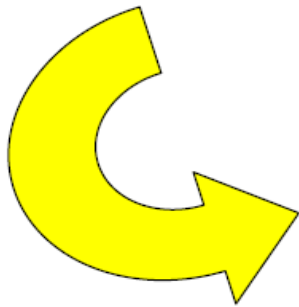
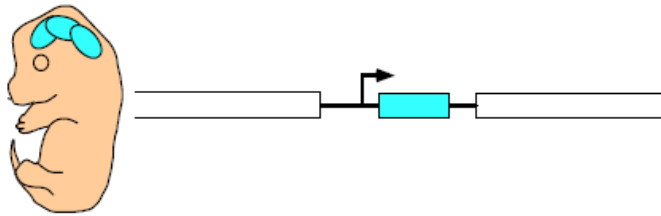
Módszer hatékonysága

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

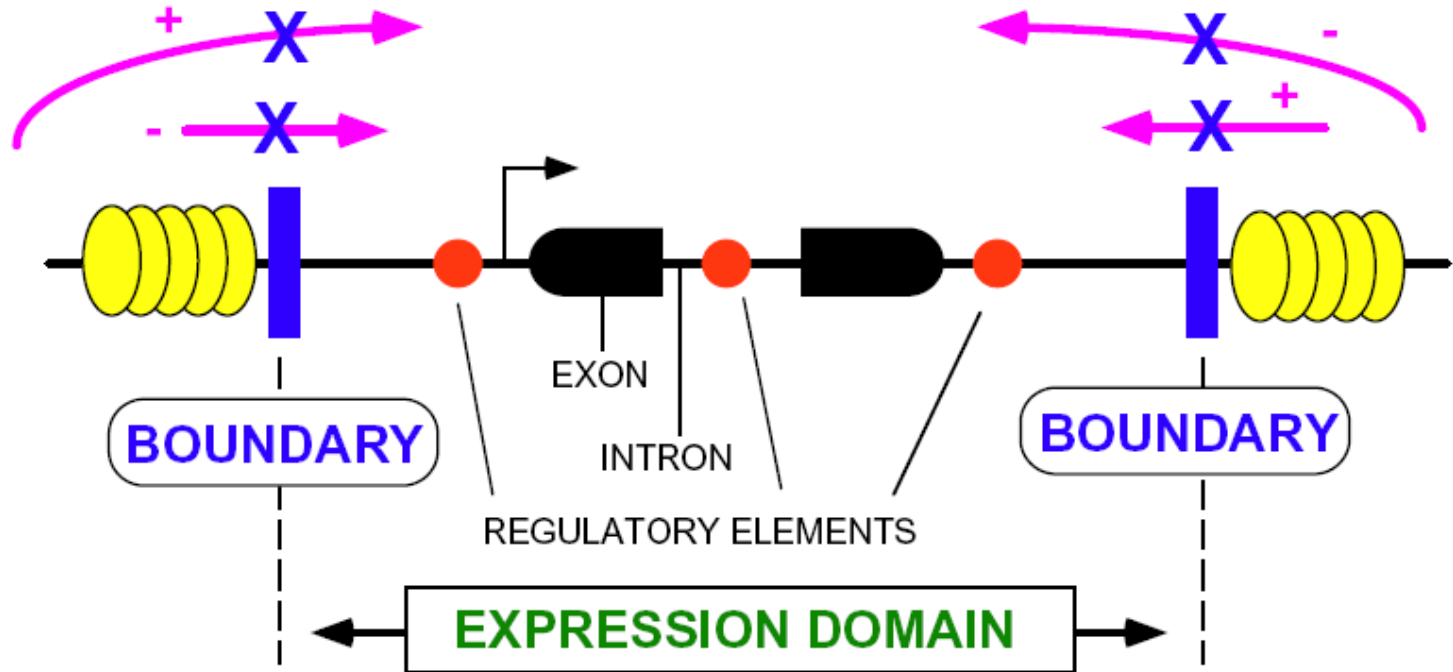
Problémák a hagyományos mikroinjektálással: a véletlenszerűen beintegrálódó transzgén kromoszómális környezete által okozott változások a transzgén kifejeződésében - pozíció effektust eredményeznek

POSITION EFFECTS

NORMAL TRANSGENE EXPRESSION



Véletlenszerűen integrálódott transzgénre ható távoli szabályozó elemek



LENTIVÍRUS TRANSZGENEZIS ÖSSZEHASONLÍTÁSA A MIKROINJEKTÁLÁSSAL

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

TRANSZGENIKUS NYULAK FELHASZNÁLÁSI TERÜLETEI

BIOFARMING

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

HUMÁN BETEGSÉGEK MODELLÁLLATAI

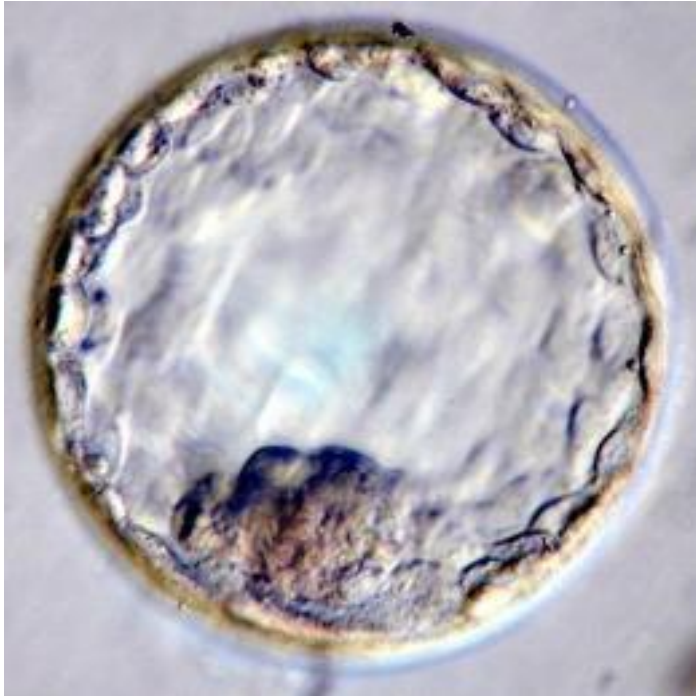
- **LIPID ANYAGCSERE ÉS ÉRELMESZESEDÉS**
- **SZÍVNAGYOBBDÁSSAL JÁRÓ KÓRESETEK**
- **SZÍVRITMUS ZAVAROK**

Új technológiák

Az eddigi hátrányok kiküszöbölésére

További, új generációs technológiák: Helyspecifikus, pontos szabás-varrás

Miért van szükség új technológiákra? A célzott transzgenézis nagyon fontos. (knock-out, knock-in, allélcseré)



Őssejtes transzgenézis

**Csak egérben működik
(patkány,
ember)**

Bonyolult

Drága

Gyenge hatékonyság



Klónozás

Sok fajban működik

Bonyolult

Drága

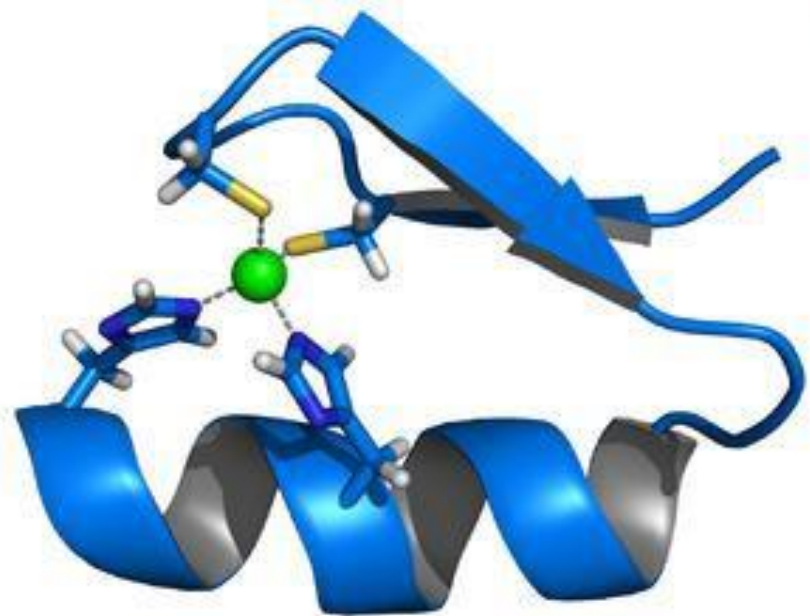
Bizonyos szempontból gyenge hatékonyság

Rengeteg mellékhatás

Cink finger nukleázok

A cink finger fehérjék kis
strukturális fehérjemotívumok, a
stabil szerkezethez cink ion(ok)
kellenek

Szerepük DNS,RNS, fehérjekötésben
interakciós félként



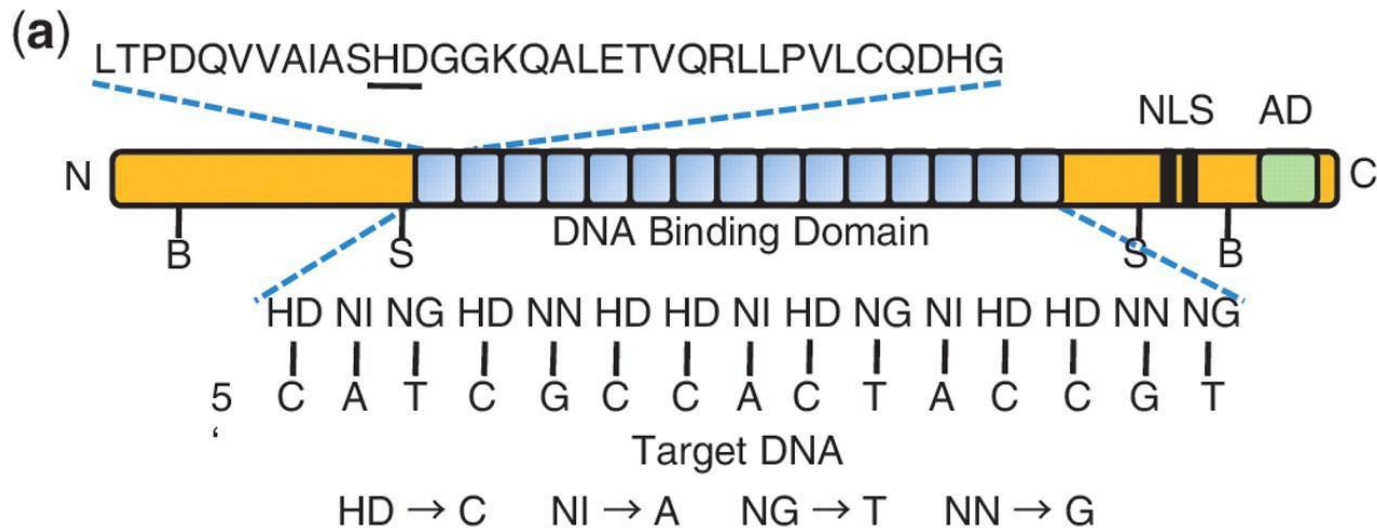
Cink finger
fehérjedomén

Cink finger nukleázok



- Mesterséges fehérjerendszer, DNS specifikus hasítására. DNS kötő cink finger domének összekötése FOKI restrikciós doménnel
- Egér Zif268 transzkripció faktorból származik a legtöbb cink finger domén
- Egy cink finger 3 bázist ismer fel
- Az összes lehetőséghez min 64 féle cink finger kell
 - Dimerként működik
 - Nagyon specifikussá tehető

A TALEN technológia: TAL effector+ FokI endonukleáz



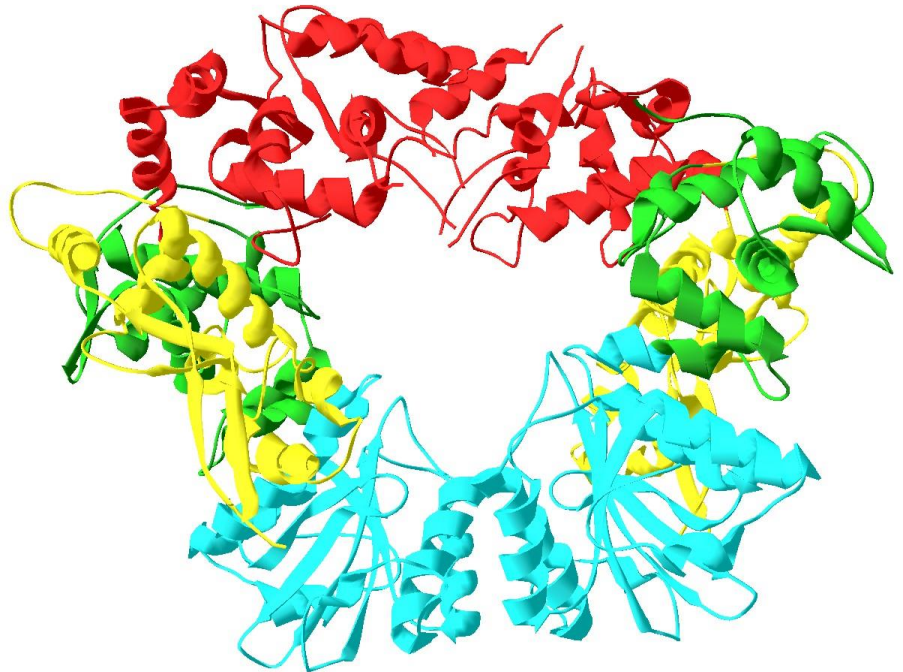
TAL effector DNS kötő domén felhasználása

Xantomonas baktérium termeli, bejut a növényi sejtmagba, és olyan géneket aktivál, mely a fertőzést elősegíti

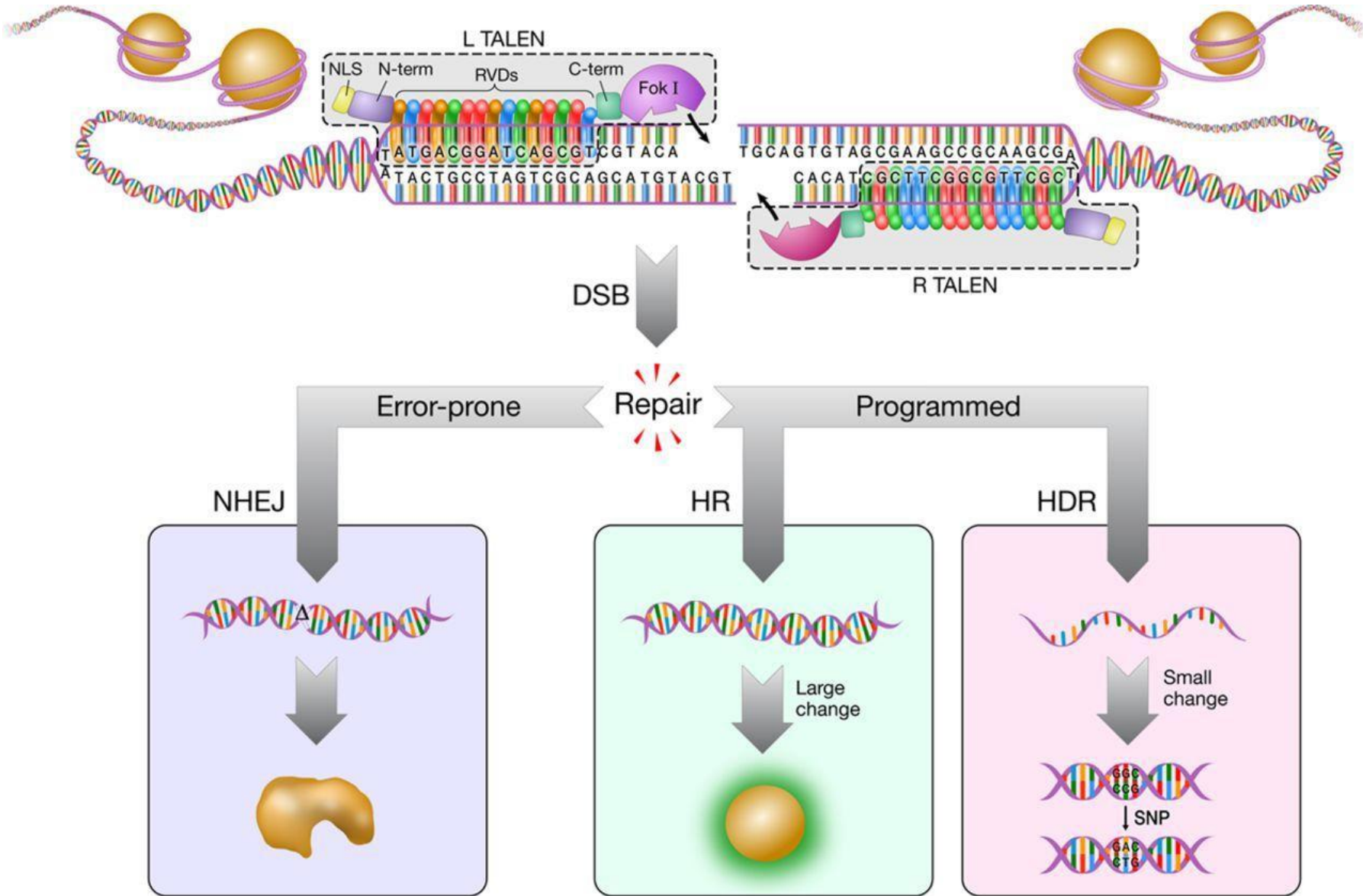
DNS kötő doménnel rendelkezik, mely egy adott helyen hipervariábilis de pontosan lehet tudni, hogy mely aminosavcserék kellenek a megfelelő bázisok felismeréséhez

TALEN

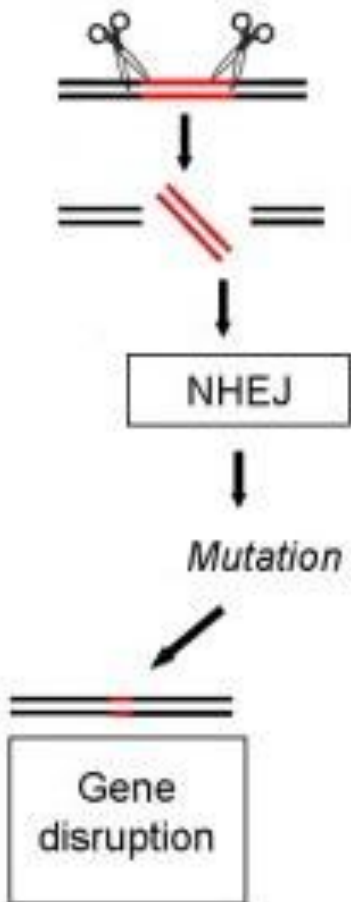
- DNS hasító rész:
 - FokI restrikciós endonukleáz
 - Nem specifikus
 - DNS hasítását végzi



A TALEN rendszer működése



Hogyan működik? Duplaszálú DNS törés-repair



Allele	Sequence
	TTCCTGCCCAGCTCCATTTTCCTTCTCCTGGAACTACCAGAACAACACTGAA
w.t., $\Delta 6$	TTCCTGCCCAGCTCCATTTTCCTT:::GAACTACCAGAACAACACTGAA
w.t., $\Delta 1$	TTCCTGCCCAGCTCCATTTTCCTTCTC:TGGAACTACCAGAACAACACTGAA
w.t., $\Delta 90$	TTCCTGCCCAGCTCCATTTTCCT:::GAACTACCAGAACAACACTGAA
w.t., $\Delta 2$	TTCCTGCCCAGCTCCATTTTCCTTC::CTGGAACTACCAGAACAACACTGAA
w.t., $\Delta 1$	TTCCTGCCCAGCTCCATTTTCCTTCT:CTGGAACTACCAGAACAACACTGAA
w.t., $\Delta 12, \Delta 4$	TTCCTGCCCAGCTCCATTTTCCT:::ACCAGAACAACACTGAA
	TTCCTGCCCAGCTCCATTTTCCT:::CTGGAACTACCAGAACAACACTGAA
w.t., $\Delta 12$	TTCCTGCCCAGCTCCATTTTCCT:::ACCAGAACAACACTGAA

Frameshift mutáció, korai STOP így nincs megfelelő fehérje

A repairt követő lehetséges mutációk

- 1) Kicsi deléció 1-20 heterozigóta
- 2) Nagyobb deléció 20 bp heterozigóta
- 3) Kisebb inszerció heterozigóta
- 4) 1)-3) bármely kombinációja – heterozigóta
- 5) Mozaikos események
- 6) Homozigóta események

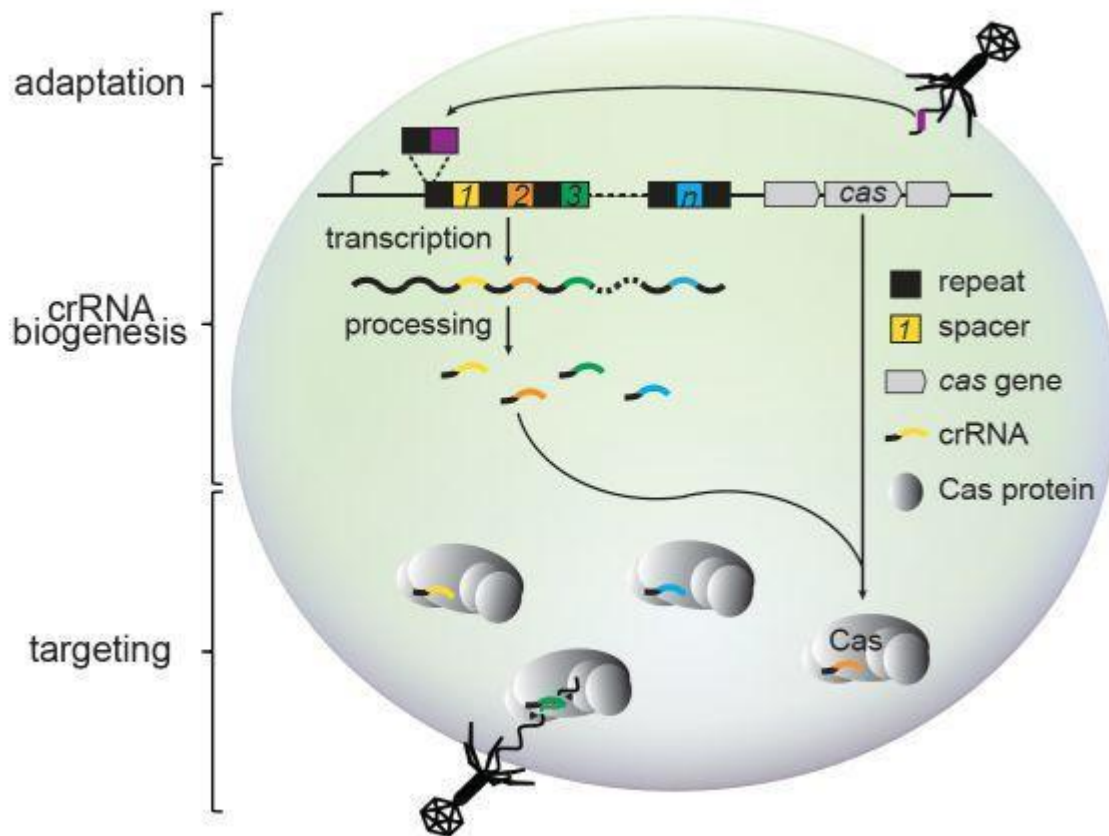


2014
Forradalmi és
nagyon új
felfedezés

CRISPR/Cas9

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

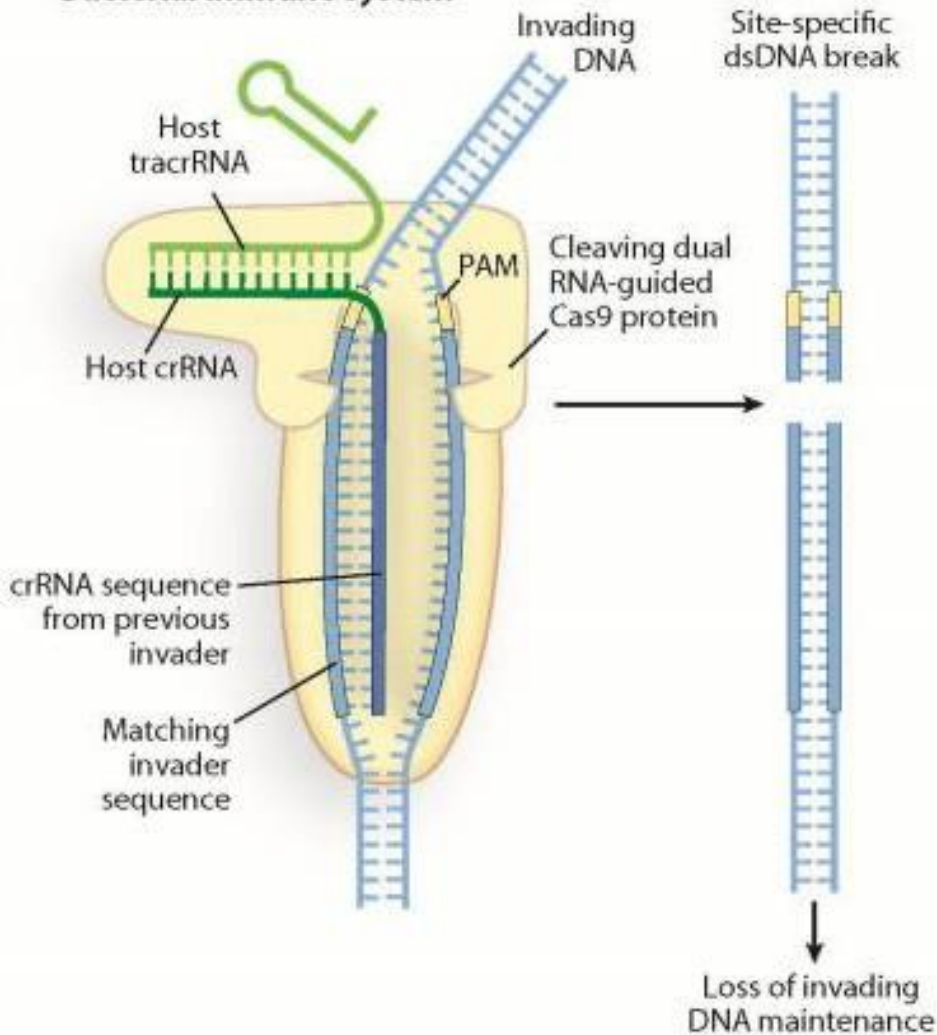
CRISPR/Cas9 rendszer



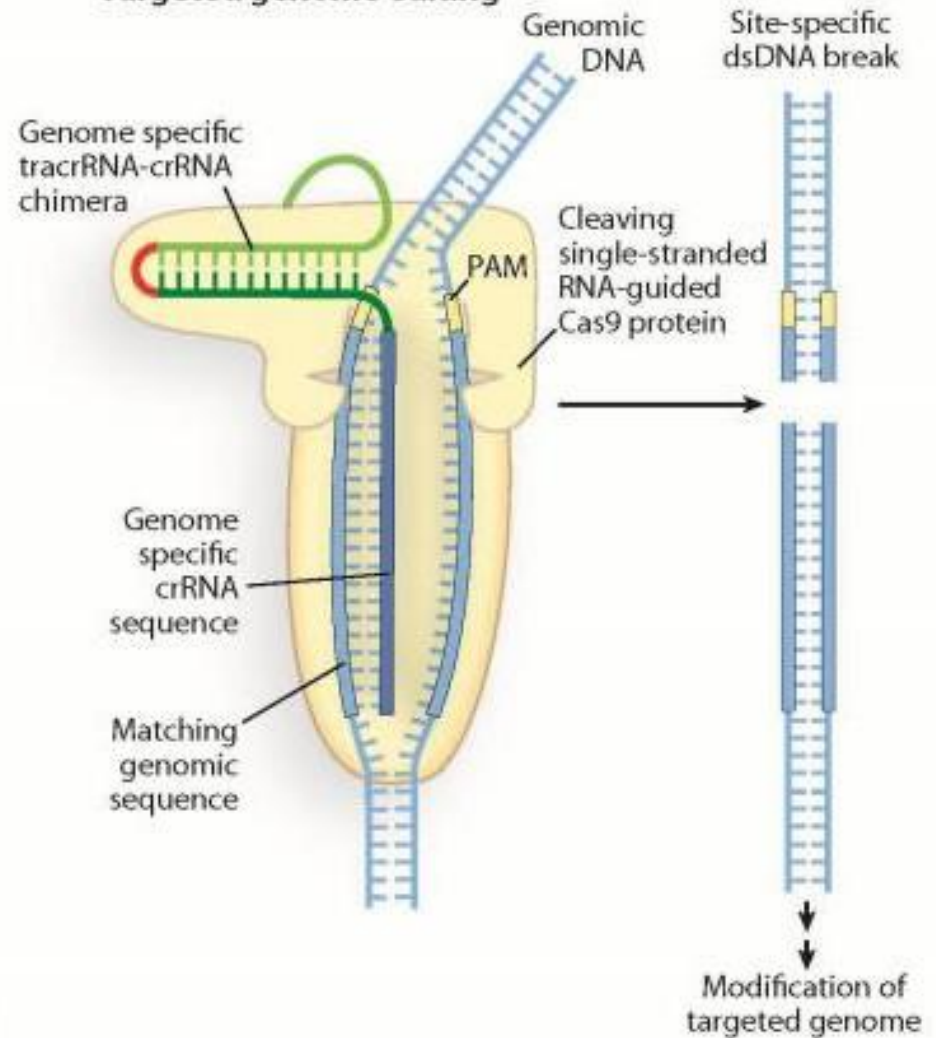
Baktériumok immunrendszere, behatoló fágok és plazmidok ellen

CRISPR/Cas9 rendszer átalakítása

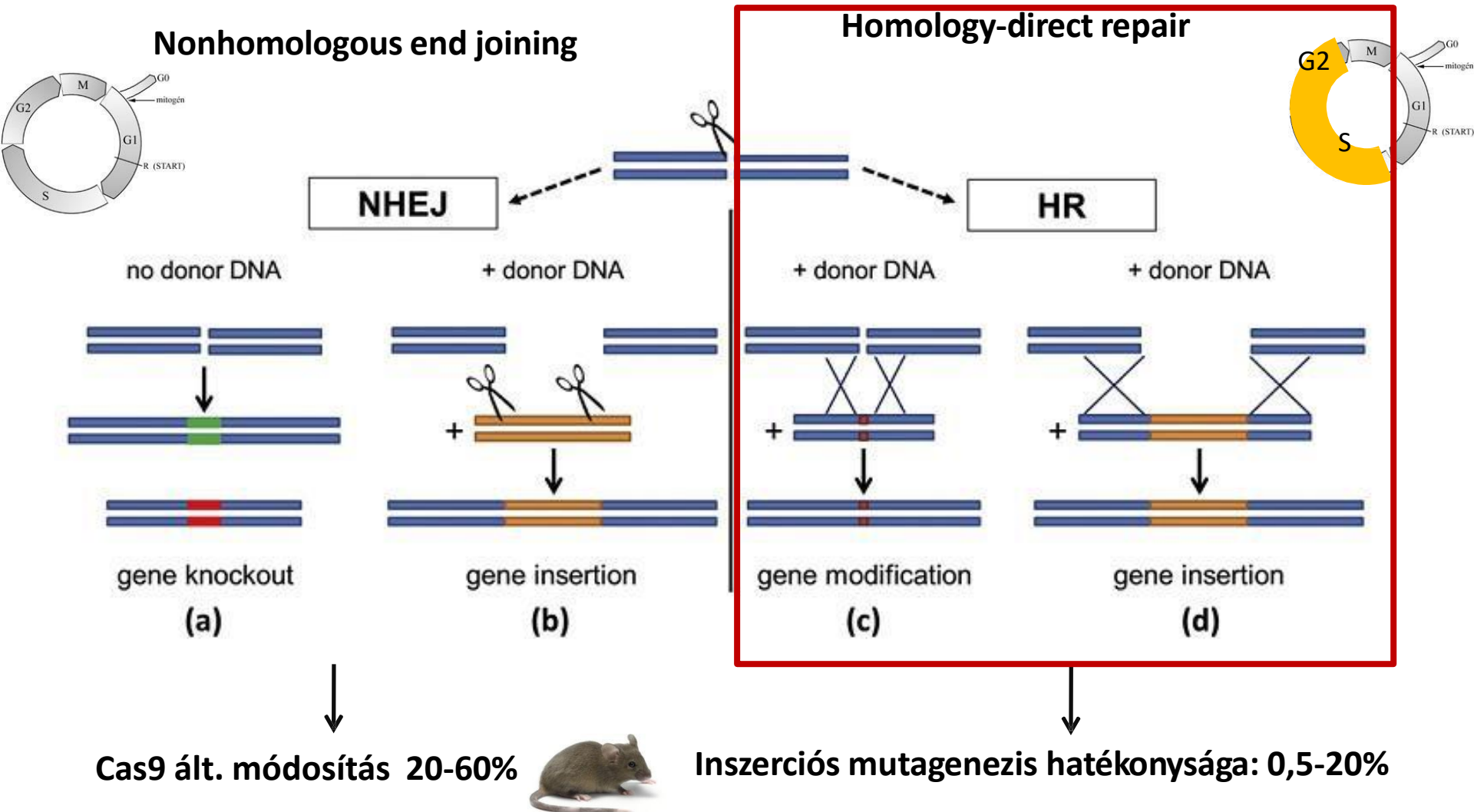
Bacterial immune system



Targeted genome editing



Lehetséges módosítások



Példák

- In vitro alkalmazás terápiás célokra

Table 3
Reported therapeutic applications of CRISPR/Cas9.

Disease	Target gene/sequence	Study type	Cell line(s)/species	Reference(s)
Sickle cell anemia	β -globin (HBB)	<i>in vitro</i>	hiPSCs	(Song et al., 2014; Xie et al., 2014)
Duchenne muscular dystrophy (DMD)	Exon 45 of dystrophin gene Exon 23 of dystrophin gene	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	hiPSCs <i>mdx</i> mice	(Li et al., 2014; Long et al., 2014)
Cystic fibrosis	CFTR	<i>in vitro</i>	SI and LI stem cells	(Schwank et al., 2013)
α 1-antitrypsin deficiency (A1ATD)	SERPINA1	<i>in vitro</i>	hiPSCs	(Smith et al., 2014)
Polycythemia vera (PV)	JAK2	<i>in vitro</i>	hiPSCs	(Smith et al., 2014)
Cataracts	Crygc	<i>in vivo</i>	Mouse	(Wu et al., 2013; Wu et al., 2015)
Barth syndrome	TAZ	<i>in vitro</i>	hiPSCs	(Yang et al., 2014)
Hereditary tyrosinemia type I (HTI)	Fah	<i>in vivo</i>	Mouse	(Yin et al., 2014b)
Human immunodeficiency virus (HIV-1) resistance	CCR5	<i>in vitro</i>	hiPSCs	(Ye et al., 2014)
Human immunodeficiency virus (HIV-1) infection and immunization	LTR loci of integrated viral genome, T10.	<i>in vitro</i>	CHME5, HeLa-TZM-bl, U1, and J-lat T-cells	(Ebina et al., 2015; Hu et al., 2014a; Zhu et al., 2015)
Hepatitis B virus (HBV)	Multiple	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Huh7, HepG2, HepAD38, HepaRG Mouse	(Dong et al., 2015; Kennedy et al., 2015; Lin et al., 2014; Liu et al., 2015; Ramanan et al., 2015; Seeger and Sohn, 2014; Zhen et al., 2015)
Epstein-Barr virus (EBV)	Multiple	<i>in vitro</i>	Raji	(Wang and Quake, 2014)
Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer	E6 and E7 oncogenes	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	SiHa and Caski Mouse	(Hu et al., 2014c; Yu et al., 2015; Zhen et al., 2014)
Osteosarcoma	CDK11	<i>in vitro</i>	KHOS and U-20S	(Feng et al., 2014)
Cardiovascular disease	Pcsk9	<i>in vivo</i>	Mouse	(Ding et al., 2014)

Bioetikai megfontolások

**A CRISPR valóban működik
Viszonylag egyszerűen elvégezhető, akár
emberi embriókon**

A héten kipattant hír:

**Egy kínai kutató azt állítja, hogy
egészséges emberi embriókon CRISPR
mutációt idézett elő, és ilyen
génmódosított csecsemők születtek**

<https://infostart.hu/tudomany/2018/11/27/genmodositott-csecsemok-tudomanyos-szenzacio-vagy-botranyn>

REAL SCIENCE. REAL NEWS.

Help us keep you informed.
Support *Science News*.

SUBSCRIBE

Search Science News...



MENU

TOPICS

BLOGS

EDITOR'S PICKS

MAGAZINE

LATEST

MOST VIEWED

NEWS

Kids born in August are diagnosed with ADHD more than kids born in September

NOVEMBER 28, 2018

NEWS

The researcher who created CRISPR twins defends his work but fails to quell controversy

NOVEMBER 28, 2018

NEWS GENETICS, SCIENCE & SOCIETY

The researcher who created CRISPR twins defends his work but fails to quell controversy

Chinese scientist Jiankui He publicly explains his research

<https://www.sciencenews.org/article/researcher-defends-creating-crispr-babies-fails-quell-controversy>

Mintakérdések az írásbeli vizsgához

Kérjük, fejtse ki részletesen:

1. Jellemezze az *Arabidopsis thaliana* modellorganizmust és a T-DNS inzerációs mutagenézis módszerét! Írja le egy konkrét esetben, hogy milyen gént vinne be, ezt mi alapján választaná ki, és hogyan ellenőrizné a gén beépülését. Hogyan magyarázná azt a jelenséget, ha a gén beépült, de semmilyen fenotípusos hatást nem tapasztalható?
2. Ismertesse a transzgénikus állatok előállítási lehetőségeit! Soroljon fel legalább öt (5) modell organizmust (pl *Mus musculus* (egér)), melyeket gyakran használnak transzgénikus alkalmazásokban és mindegyik alkalmazásával kapcsolatban nevezzen meg legalább két (2) előnyt és két (2) hátrányt.
3. Hogyan tervezne egy TALEN rendszert?

Röviden válaszolja meg az alábbi kérdéseket:

1. Mi az UAS-Gal4 rendszer és hol használják?
2. Milyen módszert használna génkiütött (knockout) növényanyagok genotipizálására? Rajzolja le sematikusán a kísérletes elrendezést és a várható eredményt, mellyel eldönthető, hogy a génkiütés sikeresen végbement-e vagy sem!
3. Mi a cas9 nukleáz és hol használják?