

# Transzgénikus állatok felhasználási területei



**Hiripi László**

**Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont**

# Állati jólét biztosítása

## 3R szabály szem előtt tartása

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

**Minden szabályozva van!!!**



# Miért jó transzgénikus állatokat előállítani?

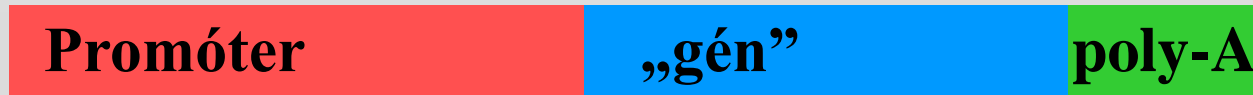
- Alap kutatás
- Mezőgazdaság
- Gyógyászat, Gyógyszeripar
- Ipar



# Mikroinjektálással létehozott transzgénikus emlősállatok felhasználása

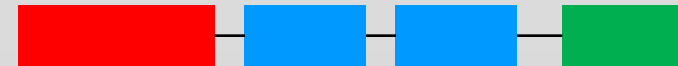


# Egyszerű génkonstrukciók



## Gén saját promóterrel

Intact gén intronokkal, exonokkal



Módosított gén „mutáns kódoló régióval”



cDNS konstrukciók- nincsenek intronok, csak a kódoló régiók

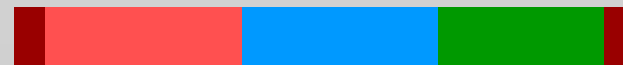
## Mini génkonstrukciók: promóter + 1 intron + cDNS



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

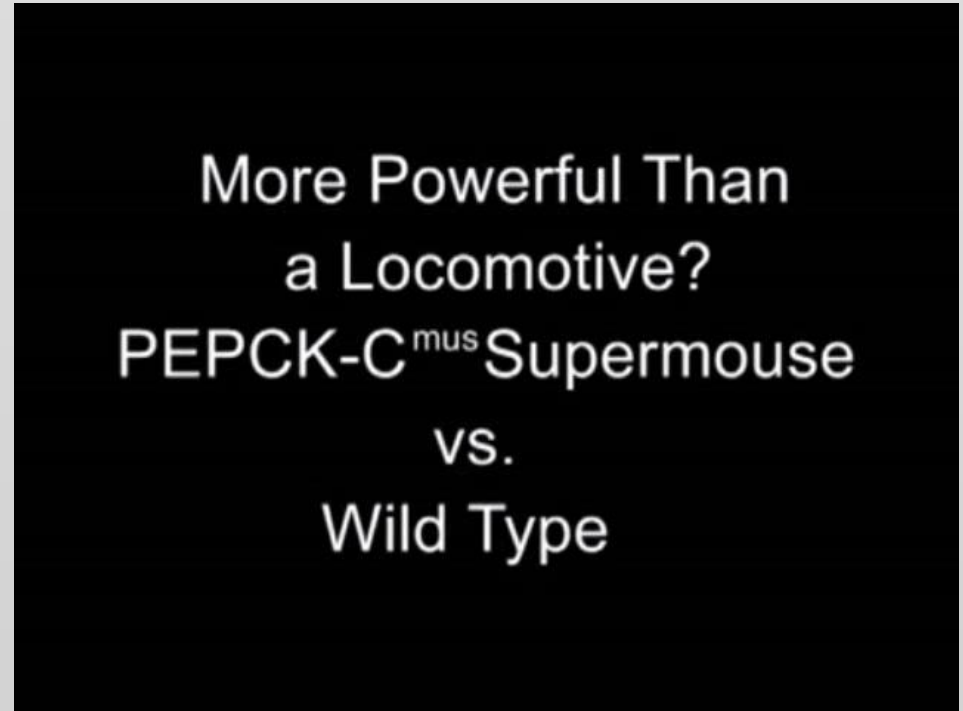


Izolátor szekvenciák beépítése (**SAR-MAR**)



# Alap kutatás: Génfunkció vizsgálata

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



## PEPCK-C transzgénikus szuperegér

Várt és nem várt funkciók pontos vizsgálatához

## Alap kutatás: okos egér



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

## A bátor egér

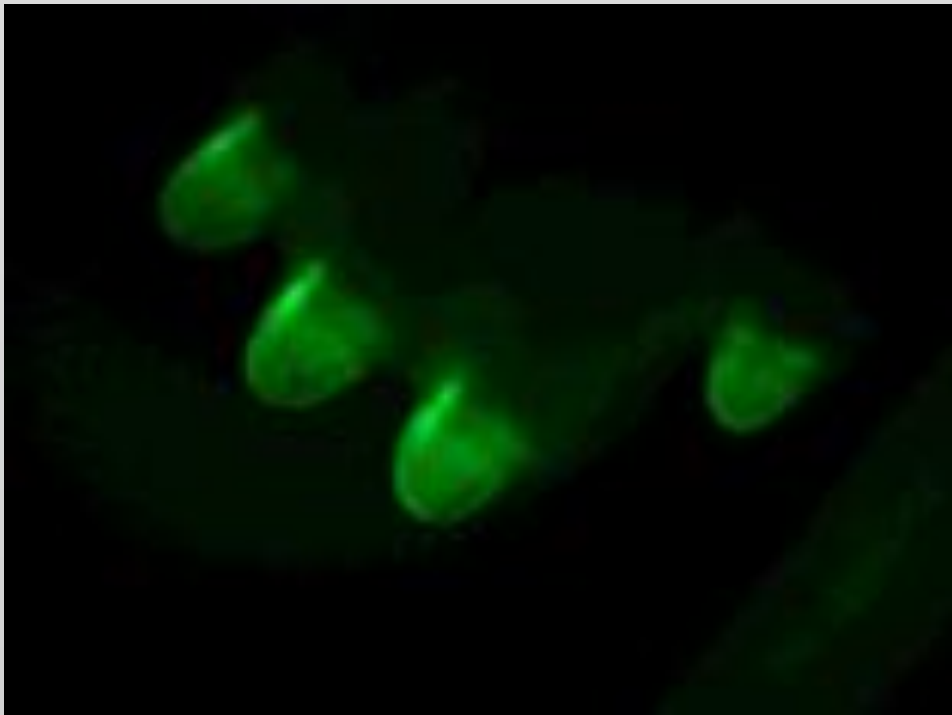
**A szaglógumó specifikus receptorsejtjeiben termeltetett diftéria-toxin gén alkalmatlanná teszi a sejteket funkciójukra. Ez az egér nem fél a ragadozók szagától**





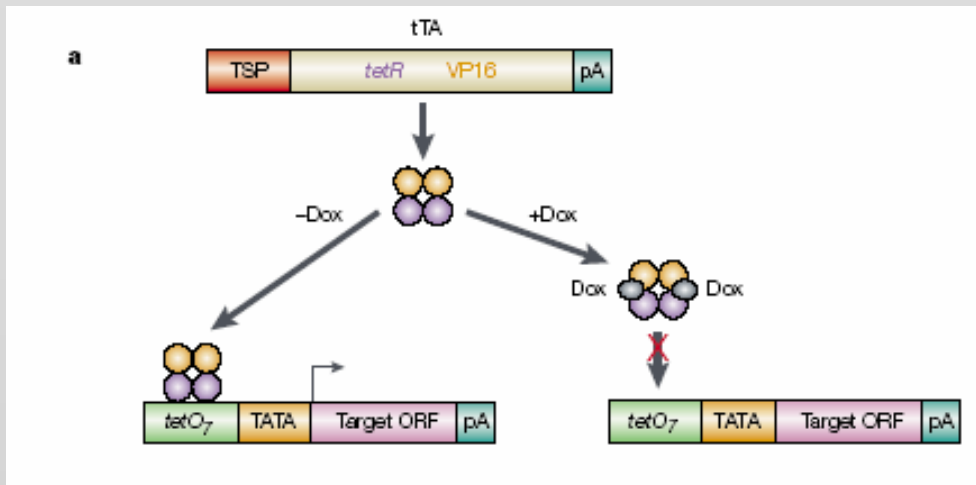
# Alap kutatás: szabályozó régiók vizsgálata

## Hoxc13-gfp transzgenikus egér



**Pontosán megtudható, hogy egy gén milyen sejtekben működik**

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

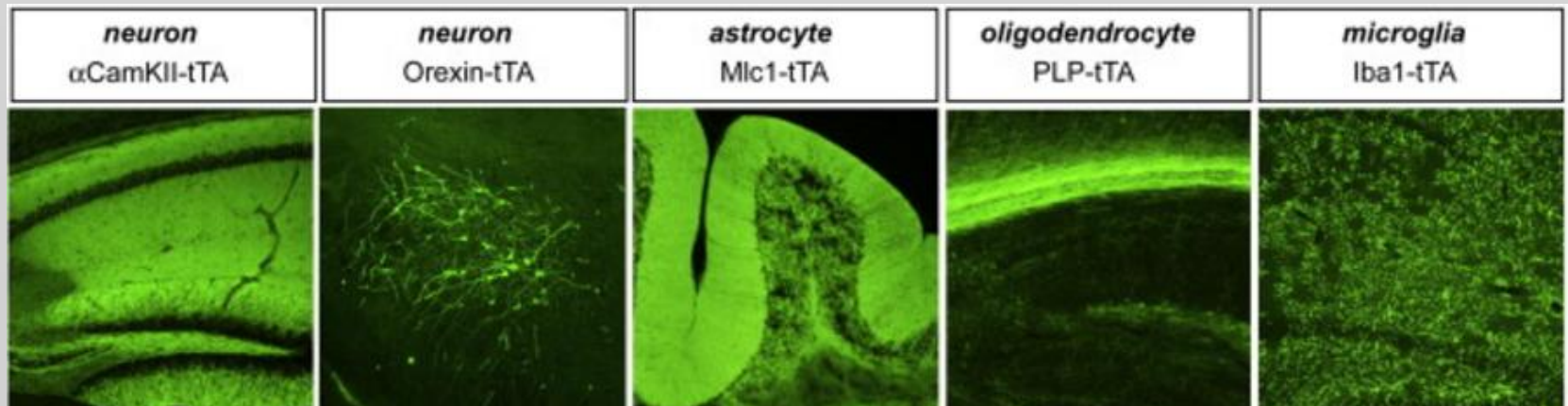


Elemei:

tTA                      tetraciklin  
érzékeny fehérje

TetO7                    tetraciklin  
érzékeny promóter elem

Dox= tetraciklin



**Kettős TG állat!!**

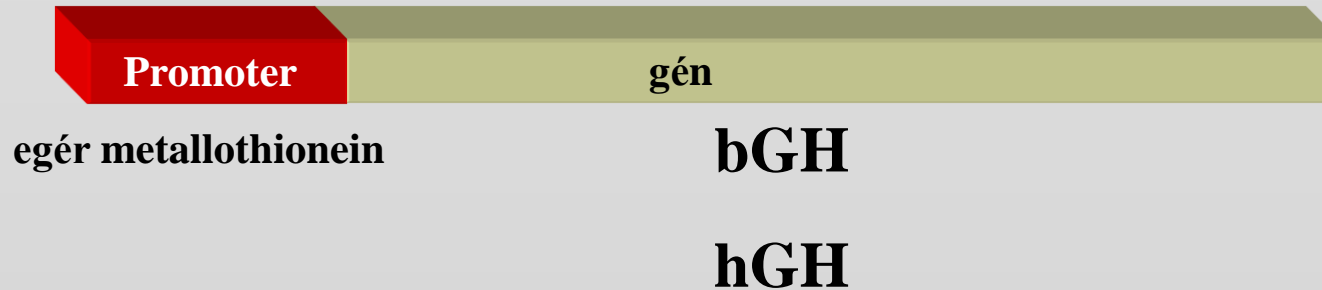
# Mezőgazdaság: Növekedési erély fokozására

## Növekedési hormont túltermelő állat



**Haszonállatokban kevésbé sikeres, nagyon sok mellékhatással.**

# Növekedési hormont túltermelő sertések



## Eredménye

### Pozitív

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

### Negatív

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

# Jobb hús

**Növekedési hormon (IGF) termeltetése izomspecifikus promóterrel**

**Nincs elváltozás, nem stresszérzékeny**

**Jobb minőségű hús**

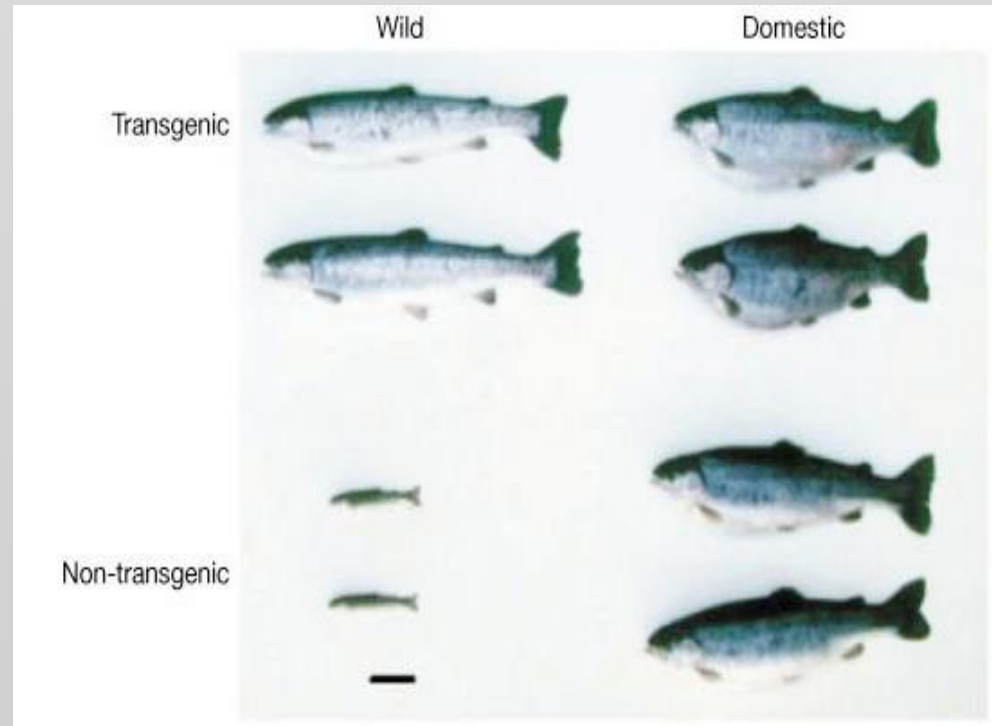


# Növekedési hormon gén lazacban



## Lazacban

**Pisztrángban csak a vad  
fajtában működött**



**Gyakori promóterek: CMV, metallothionein, antifreeze fehérje**

## *AquAdvantage*® lazac



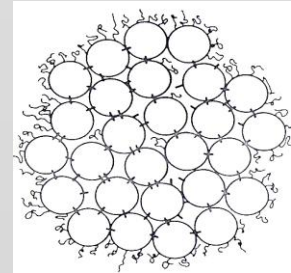
**Chinook lazacból származó növekedési hormon túltermelése.**

**Gyors növekedés, csekély kockázatok, mert triploid**

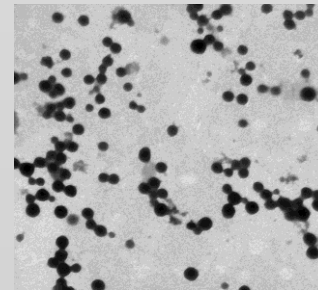
**2015 őszén FDA engedélyt kapott**

# Transzgénikus szarvasmarha

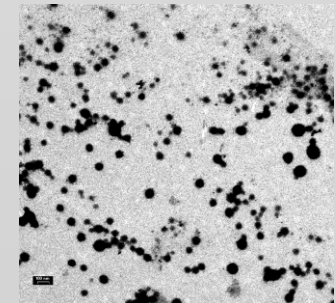
## Tejminőség javítása A $\beta$ - és $\kappa$ -kazein túltermeltetésével



tejmicella



Normál



TG

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

**Kisebb micellaméretet a TG állatokban**



# **Tejösszetétel megváltoztatása- alfa-laktalbumin túltermeltetése**

**Korai elhullás probléma a szopós malacoknál**

**Laktóz képződését segíti elő**

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

**Súlygyarapodás sokkal kedvezőbb a malacoknál**



# Tőgygyulladás megoldása transzgénikus módszerekkel

Az USA-ban az állományok harmada érintett

Kétmilliárd dollár/év költség

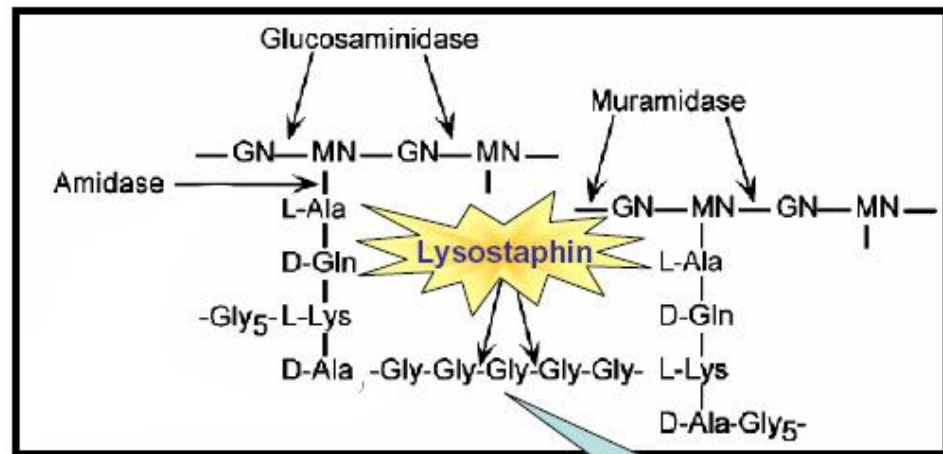
Kevesebb tej, kevesebb sajt

Vakcina nem elég hatékony, antibiotikum nem szerencsés



Staph. aureus

Esetek harmadát okozza



Peptidoglycan hydrolase

Unique S.aureus pentaglycin cross link

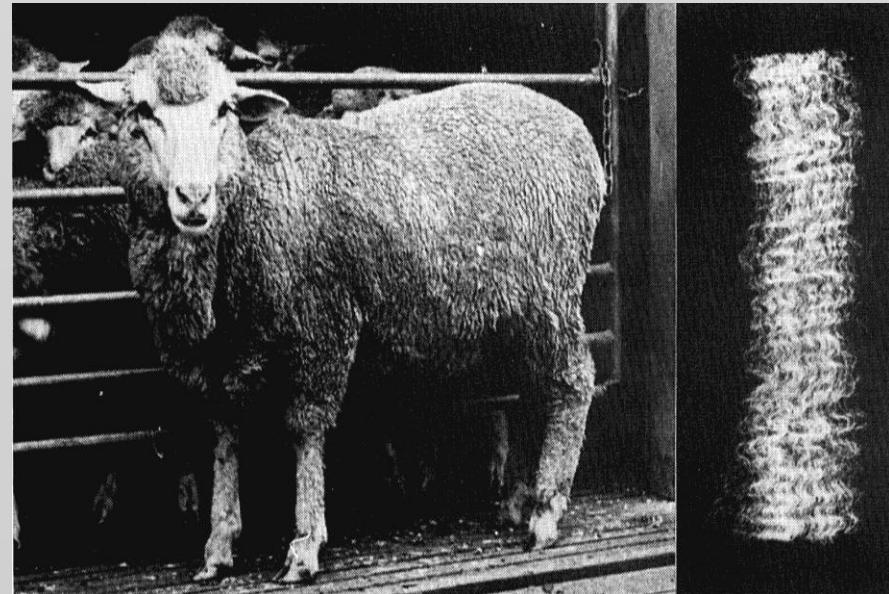
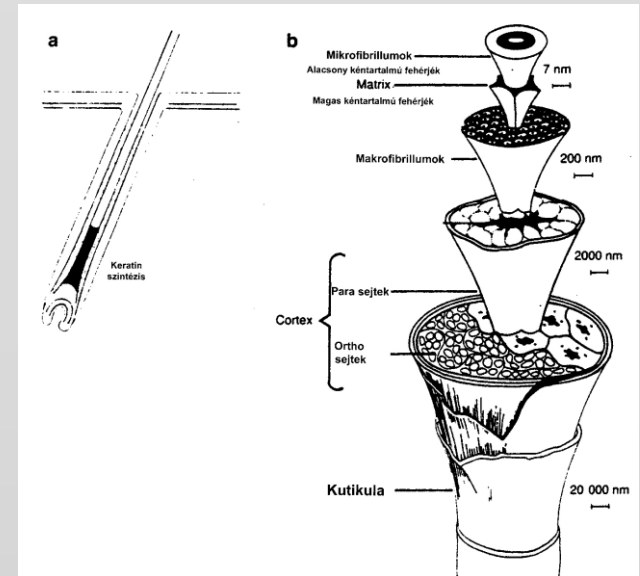
# SV-40 virális promóterrel túltermeltetett Lysostaphin transzgénikus marha



**90%-ban védettek mesterséges fertőzés után**

# TRANSZGENIKUS BIRKA –A GYAPJÚ ÖSSZETÉTEL MEGVÁLTOZTATÁSA

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



# Hidegtűrő transzgénikus halak

**Jégeképződést csökkentő fehérjék  
találhatók pl egyes lepényhalfélékben**



**Antifreeze fehérjét termelő transzgénikus aranyhal  
hidegtűrőbb**



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

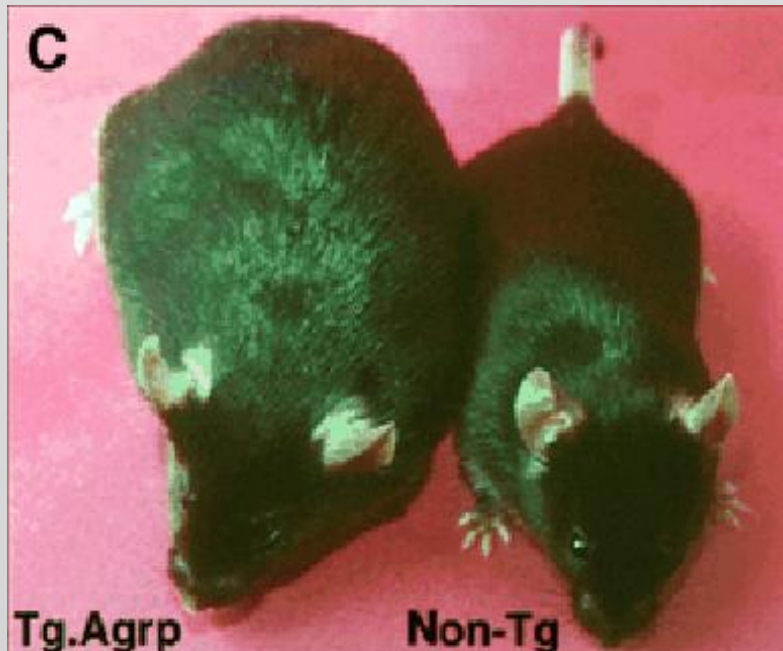


## **Túlhaladott elképzelések**

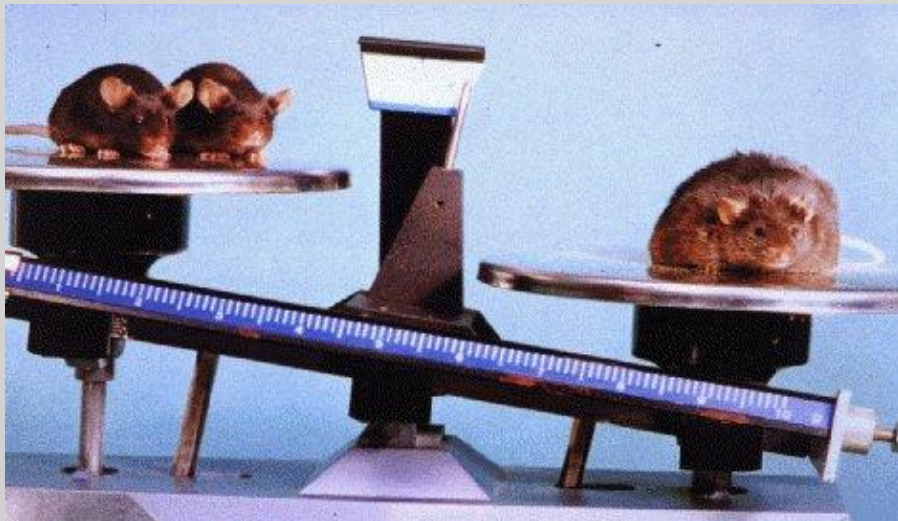
- ❖ **CSÖKKENTETT LAKTÓZ TARTALMÚ TEHÉNTÉJ**
- ❖ **ALACSONY ZSÍR TARTALMÚ TEHÉNTÉJ**
- ❖ **MÓDOSÍTOTT TEHÉNTÉJ AMELYBŐL KENHETŐBB VAJAT LEHET ELŐÁLLÍTANI**

**Transzgénikusan megoldható, de ma már olcsóbb egyéb technológiával**

# Gyógyszeripar: Betegségmodellek, gyógyszermolekulák tesztelése



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



# „Rákrezisztens egér”



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



# **Gyógyszeripar: transzgénikus bioreaktorok**

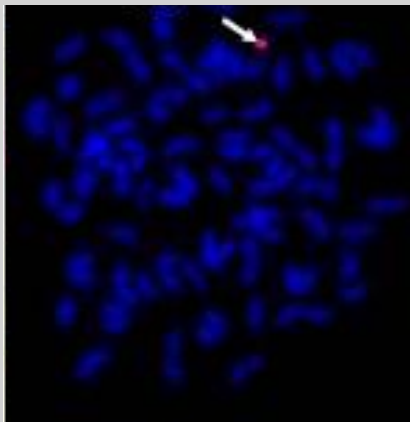
**Gyógyhatású fehérjék kiválaszthatók az emlősállatok váladékaiba. Legjobb lehetőség a tej. Ebben az esetben emlőspecifikus szabályozó régióval kell kombinálni a gyógyhatású fehérje génjét**

**Külön előadás keretében Dr. Bősze Zsuzsanna**

# Humán antitestek termelése szarvasmarhában



**Hematech- humán antitestek  
termeltetése**



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

# **TRANSZGENIKUS SERTÉS MINT SZERV DONOR**

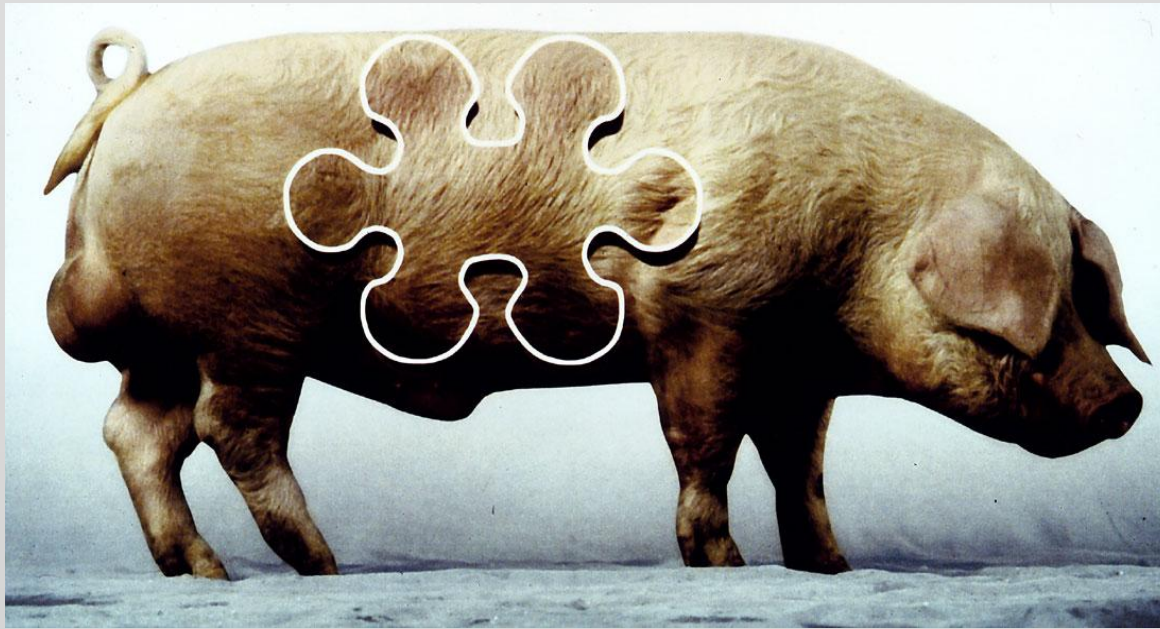
**PROBLÉMA: A FŐEMLŐSÖK ELLENANYAGAI REAGÁLNAK MÁS FAJ SEJTFELSZINI FEHÉRJÉINEK SZÉNHIDRÁT OLDALLÁNCAIVAL**

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

## **MEGOLDÁSI MÓDOK:**

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

# A SERTÉS MINT POTENCIÁLIS SZERVADONOR



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

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

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

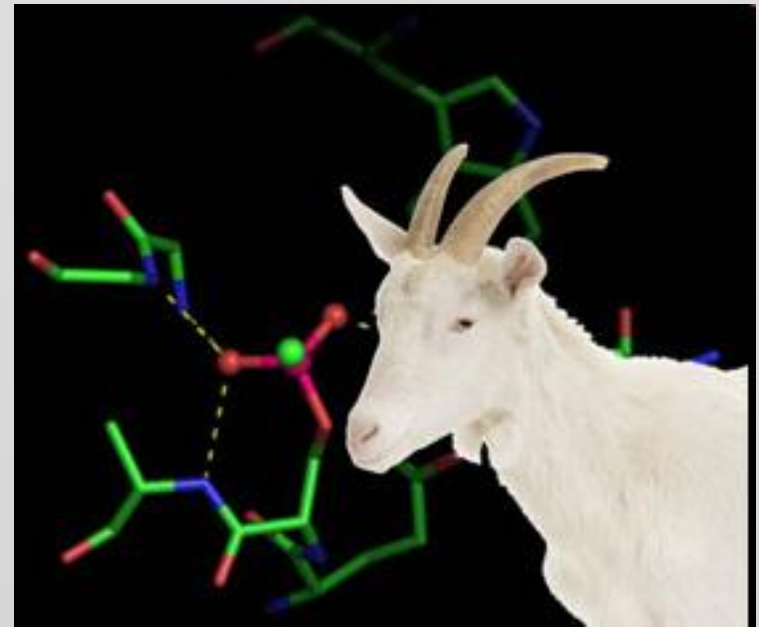
## Hármas transzgenikus sertések



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

# Élelmiszeripar: egészséges tej

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



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

# Ipari felhasználás



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



# Ipari felhasználás



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

# TG állatok mint „házi kedvencek”



**Macska mely nem tartalmazza a leginkább humán allergén Feld1 glikoproteint**



**GloFish világító halak**

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

# KÖRNYEZETVÉDELEM: TRANSZGENIKUS SERTÉS (Enviro-pig)

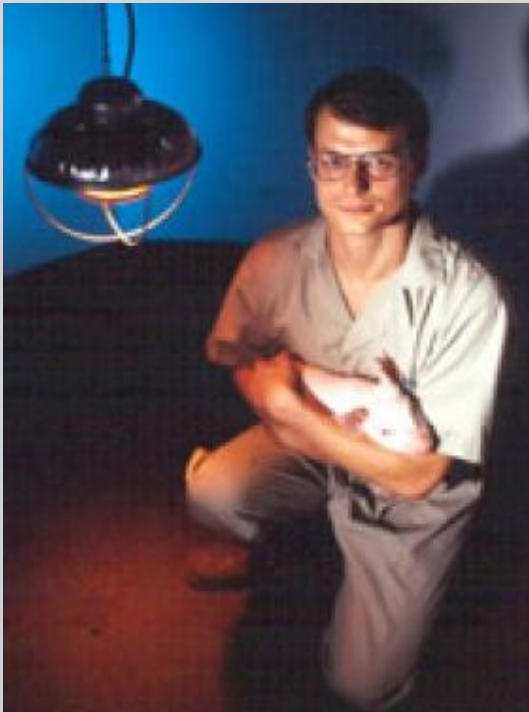
## PROBLÉMA

A EMÉSZTHETETLEN FOSZFORVEGYÜLETEK /PHYTATE/ A TÁPBAN, TRÁGYÁVAL ÜRÜLNEK

## KÖVETKEZMÉNYEK

ÉLŐVIZEK EUTROFIZÁLÓDNAK, ALGAVIRÁGZÁS, HALPUSZTULÁS STB.

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

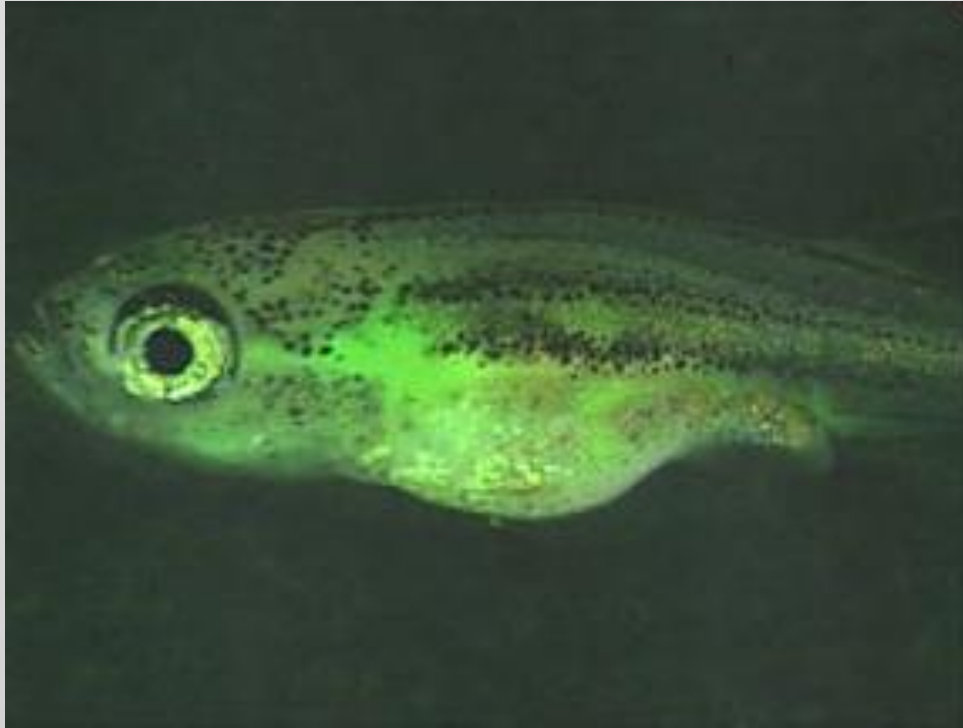


**NYÁLMIRIGYSPECIFIKUSAN TERMELI AZ ENZIMET**

**Felére csökkent foszforterhelés**

**Kutatások leálltak támogatás hiányában**

# Ökotoxikológia/környezetvédelem

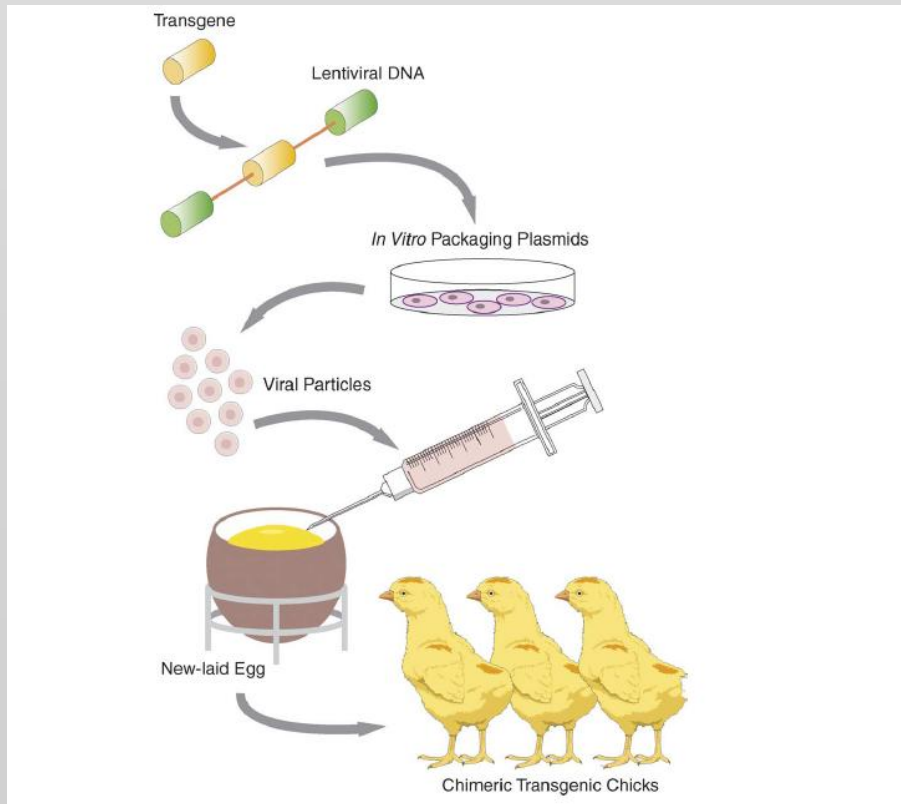


**Stresszfehérje promóter- jelzőfehérje (gfp)**

**Stressz (szennyezés hatására világít), általában zebrahal**

**Fém, aromás vegyületek módosulata is van**

# Lentivirális technológia felhasználásával készült állatok



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

# Állategészségügy

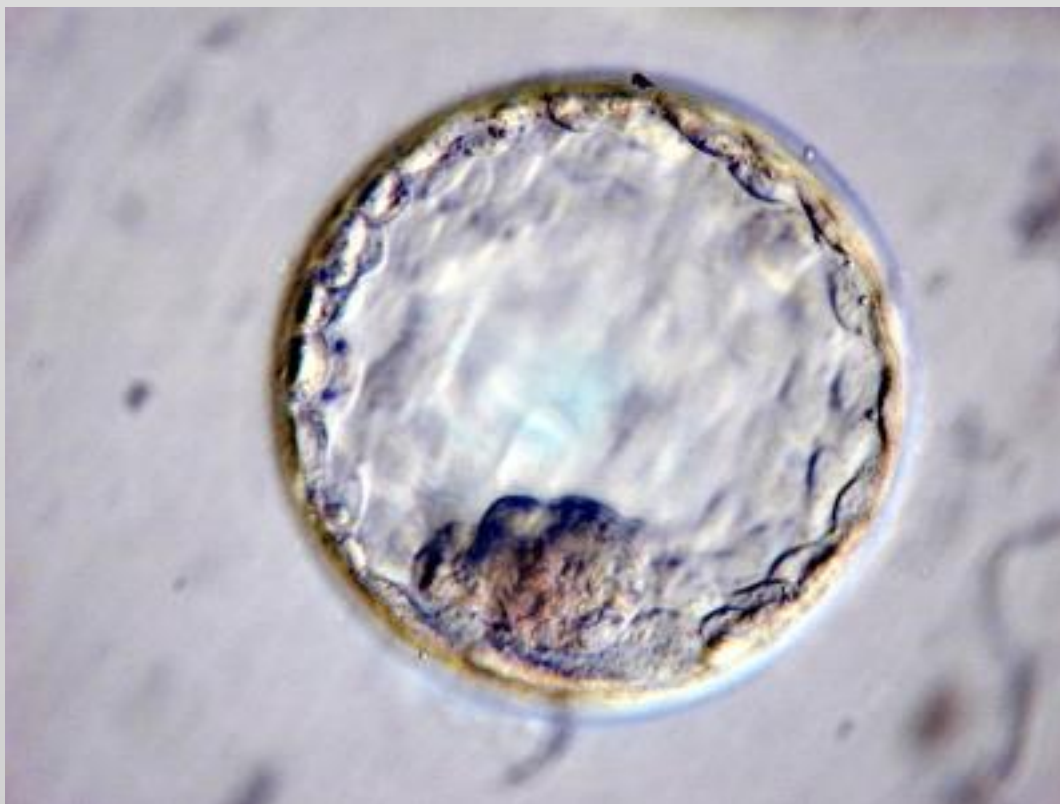
**Transzgénikus baromfi, mely nem képes a madárinfluenzát A(H5N1) továbbadni**



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

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

# Őssejtek segítségével létrehozott transzgénikus állatok felhasználása



# **A technológia felhasználása Célzott mutációk létrehozására**

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





# Génfunkció vizsgálatok: nagyhatású gének kiütése



**KO**

**Normál**

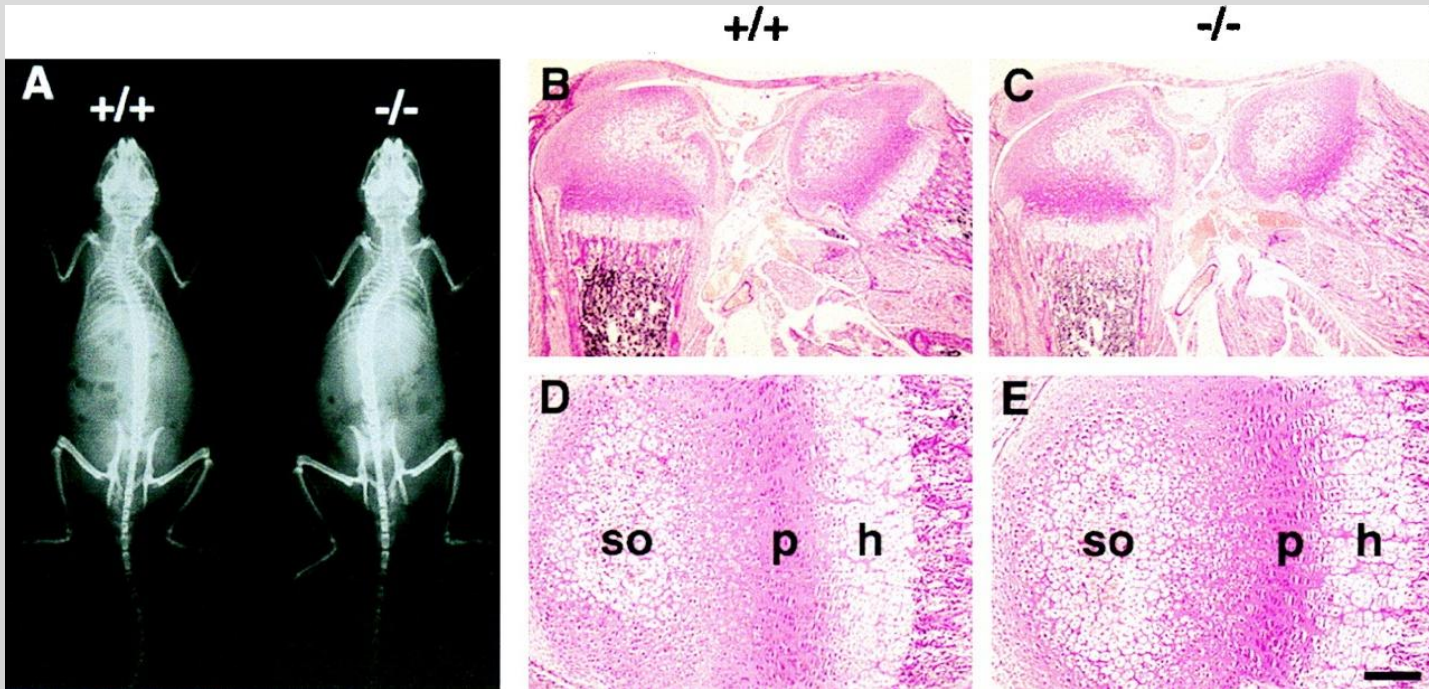
**Lim1 homeobox gén**

# Génfunkció vizsgálatok: nagyhatású gének kiütése

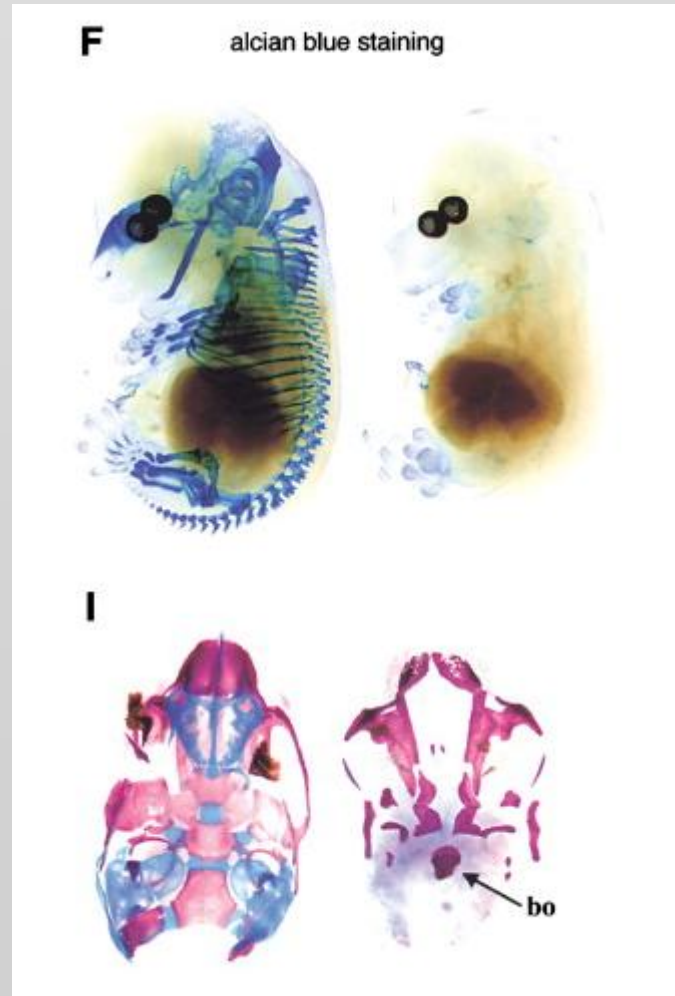


Tetranektin gén kiütése

# „Kis hatású gén” pl matrilin1



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



# Nagyhatású gén kiütése, funkciónyeréssel

## Myostatin KO egér



normál

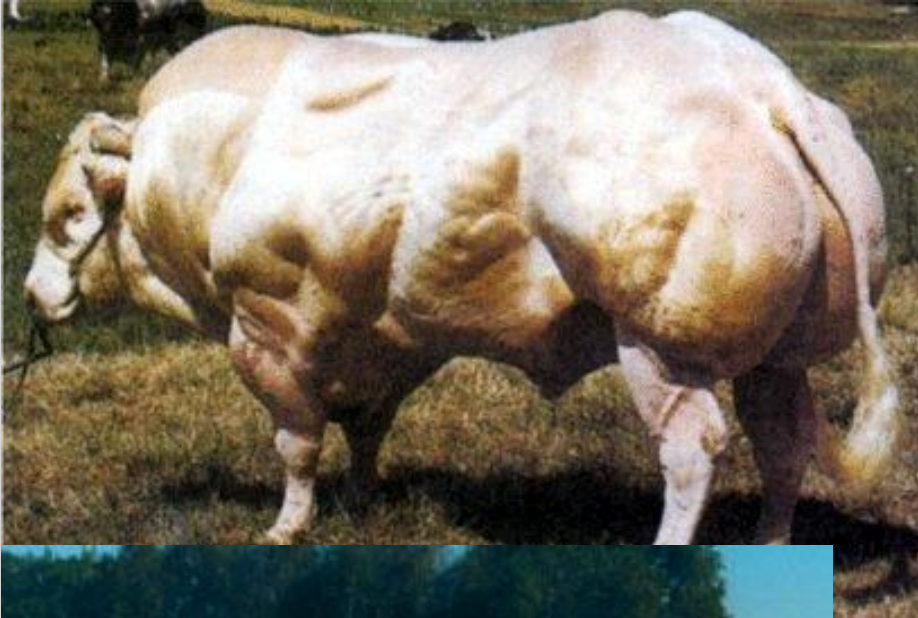


-/-

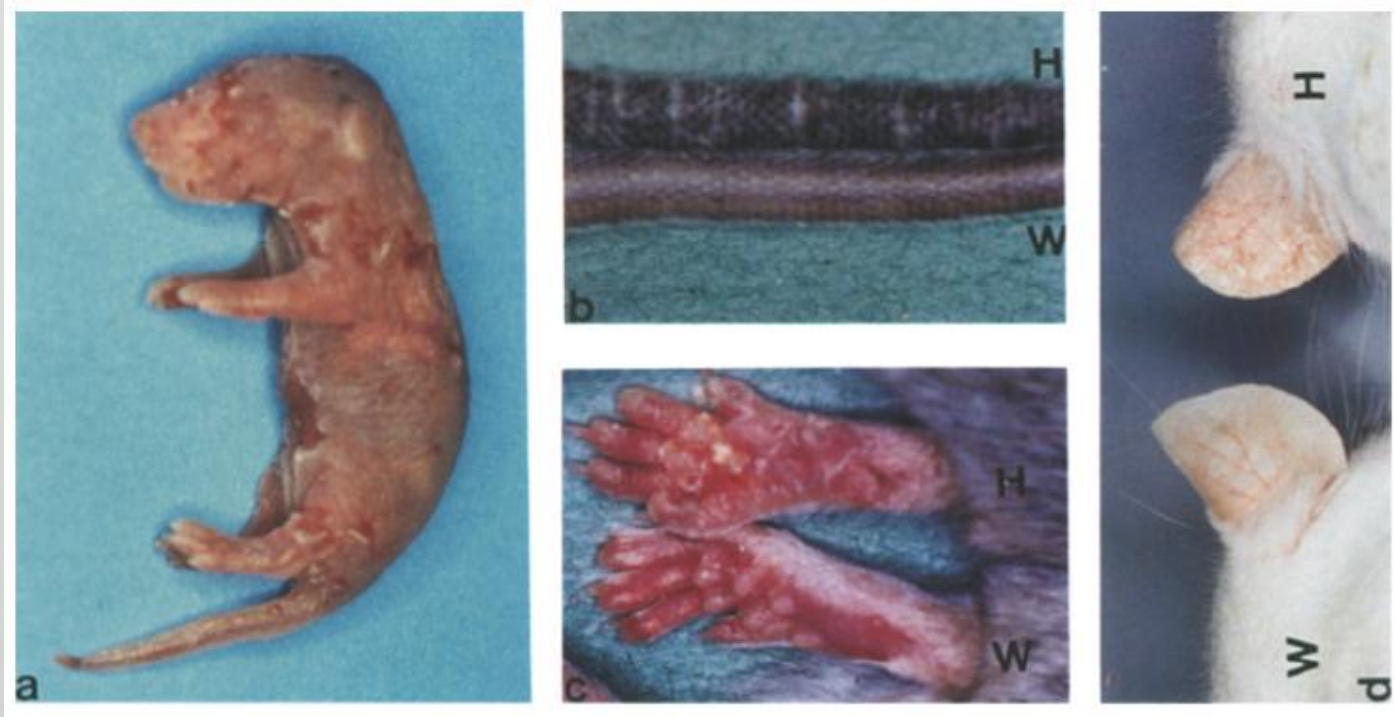


# Természetes knock out állatok (belga kék, izmos agár)

Mutációt hordoz az izomnövekedést szabályozó myostatin génben



# Géndózis vizsgálatok, citokeratin 10 gén kiütése



**-/-**

**+/- és vad**

**+/- és vad**

# Knock-in állatok felhasználása: Modell az emberi Huntington kórra



**normál**

**tg**



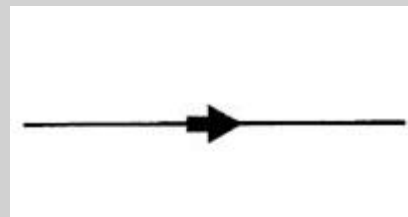
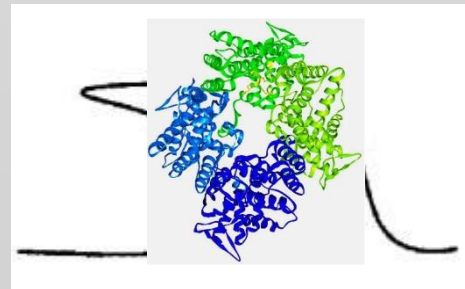
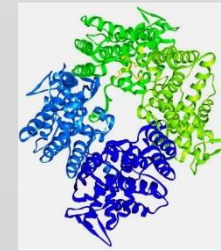
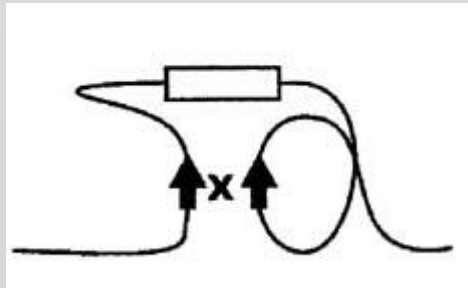
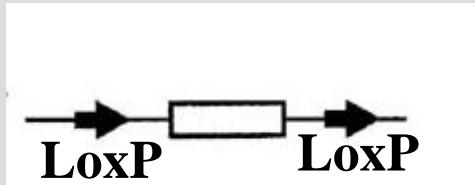


# Rodopszin-GFP transzgénikus egér a gyógyszeriparban



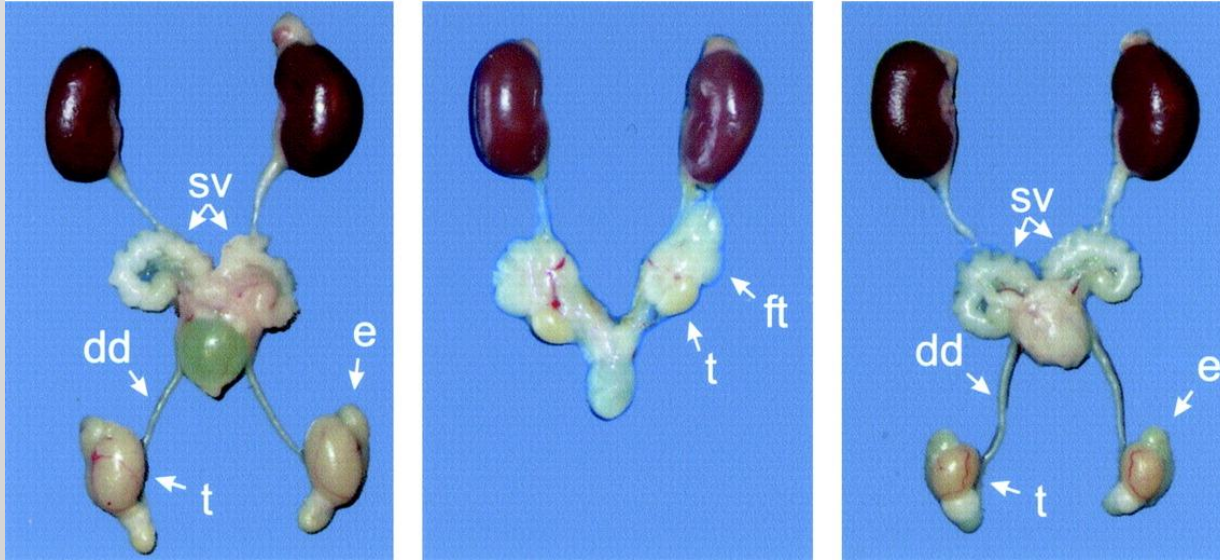
**Retinitis pigmentosa**

# Cre-LoxP rendszer–kondicionális célzott mutációk



**A Cre rekombináza működése**

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



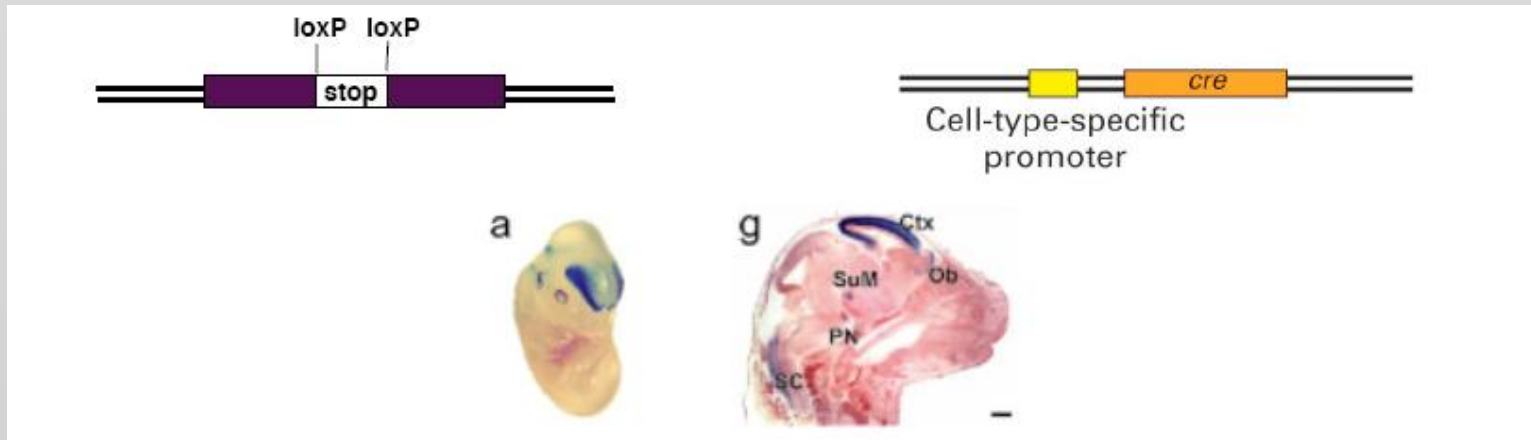
dd, herevezeték ; t, here; e, mellékhere; ft, zsírszövet



## Gyógyászat

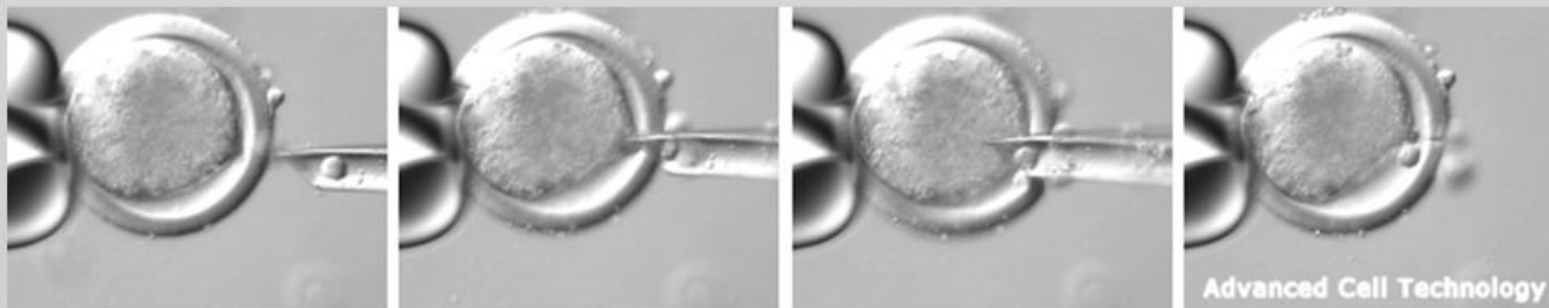
# Kondicionális KO: szabályozóelemek vizsgálata Cre segítségével

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



Elsősorban alapkutatásra

# Klónozással készített transzgénikus állatok



# **Polly az első klónozott, transzgénikus állat**



**Tejében IX. véralvadási faktort termel**

# Xenotranszplantáció

Állatból emberbe történő szervátültetés

Probléma: azonnali kilökődés

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



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

# Prionmentes biztonságos hús előállítása KO módszerekkel

- Prp (prion) mentes kecske, szarvasmarha





# **Klónozott transzgénikus macska (vörös fluoreszkáló fehérje)**



# A klónozás felhasználása: veszélyeztetett fajok



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

Afrikai vadmacska  
2005



Vastagszarvú juh  
egy alfaja 2006



Banteng 2003

szürke farkas  
2007



Junqueira fajta, 2005

**Pireneusi hegyikecske 2009**



# Klónozás fagyott sejtekből



**Mamut?**