



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

Miosztatin génkiütött házinyúl létrehozása genomeditálással

Doktori (PhD) értekezés

DOI: 10.54598/000540

Skoda Gabriella

Gödöllő

2021

A doktori iskola

megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Állattenyésztés-tudomány

vezetője: **Dr. Mézes Miklós DSc., az MTA rendes tagja**

Tanszékvezető, egyetemi tanár

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Élettani és Takarmányozástani Intézet

Takarmánybiztonsági Tanszék

témavezető: **Dr. Hiripi László PhD.**

Tudományos tanácsadó, csoportvezető

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Genetika és Biotechnológia Intézet

Állatbiotechnológia Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|---|----|
| Rövidítések jegyzéke | 6 |
| 1. Bevezetés | 9 |
| 1.1. Célkitűzések..... | 11 |
| 2. Irodalmi áttekintés | 13 |
| 2.1. Miosztatin (GDF-8, Growth Differentiation Factor 8)..... | 13 |
| 2.1.1. A miosztatin feladata..... | 14 |
| 2.1.2. A miosztatin bioszintézise..... | 16 |
| 2.1.3. A miosztatin működésének szabályozása..... | 18 |
| 2.1.4. Miosztatin indukált intracelluláris jelátvitel..... | 19 |
| 2.1.5. Miosztatin mutáns emlősállatok..... | 20 |
| 2.1.5.1. Természetes miosztatin mutáns emlősök..... | 20 |
| 2.1.5.2. Mesterségesen létrehozott miosztatin mutáns emlősök..... | 21 |
| 2.2. TALEN rendszer a biotechnológiában..... | 24 |
| 2.3. CRISPR/Cas rendszer (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)..... | 26 |
| 2.3.1. A CRISPR/Cas rendszer felfedezése..... | 27 |
| 2.3.2. CRISPR/Cas rendszer működése prokariótákban..... | 28 |
| 2.3.3. CRISPR rendszer a biotechnológiában..... | 29 |
| 2.4. Lentivírus alapú transzgenezis..... | 32 |
| 2.4.1. Lentivírusok általános bemutatása..... | 32 |
| 2.4.2. Lentivírusok a biotechnológiában..... | 33 |
| 2.4.3. Lentivírus vektorokkal történő placenta-specifikus géntranszfer..... | 35 |
| 2.5. Mikroinjektálás | 37 |
| 3. Anyag és módszer | 39 |
| 3.1. TALEN konstrukciók..... | 39 |
| 3.2. CRISPR/Cas9 konstrukció létrehozása..... | 40 |
| 3.2.1. CRISPR célszekvencia tervezése..... | 40 |
| 3.2.2. CRISPR mRNS létrehozása..... | 41 |
| 3.2.3. Az injektáló oldat összeállítása..... | 43 |
| 3.3. Lentivírus konstrukciók..... | 43 |
| 3.4. Transzgenikus nyúl előállítás..... | 44 |
| 3.4.1. Szuperovuláltatás és embriókinyerés..... | 44 |
| 3.4.2. Embrió mikroinjektálás..... | 45 |
| 3.4.3. Embriótranszfer..... | 46 |
| 3.5. A módosított szervezetek vizsgálata..... | 47 |
| 3.5.1. A TALEN és CRISPR mRNS működésének tesztelése embriókon..... | 47 |
| 3.5.2. Az alapító egyedek azonosítása..... | 48 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5.3. A génmódosított utódok fenotípusos jellemzése..... | 49 |
| 3.5.3.1. Testtömeg változás összehasonlítás..... | 49 |
| 3.5.3.2. Metszetek készítése..... | 49 |
| 3.5.3.3. CT (komputertomográfia) vizsgálatok..... | 49 |
| 3.5.4. A génmódosított utódok molekuláris jellemzése..... | 50 |
| 3.5.4.1. RNS izolálás..... | 50 |
| 3.5.4.2. RT-PCR..... | 51 |
| 3.5.4.3. qPCR..... | 51 |
| 3.5.4.4. Off-target analízis..... | 51 |
| 3.5.5. Transzgénikus nyúlvonal létrehozása és fenntartása..... | 52 |
| 3.5.6.1. Sperma fagyasztás..... | 52 |
| 3.5.6. Lentivírus alapú transzgenezis detektálása szövetekben..... | 52 |
| 3.5.6.1. Expresszió analízis RT PCR-rel..... | 53 |
| 3.5.6.2. GFP detektálás, és <i>in vivo</i> fluoreszcens képalkotás..... | 53 |
| 4. Eredmények..... | 55 |
| 4.1. Kísérletek TALEN módszerrel..... | 55 |
| 4.2. CRISPR/Cas9 rendszer mediálta genomszerkesztés nyúlban..... | 56 |
| 4.2.1. CRISPR/Cas9 tesztelés nyúl embriókon..... | 56 |
| 4.2.2. Miosztatin génkiütött alapító egyedek létrehozása, azonosítása..... | 58 |
| 4.2.3. Az előidézett miosztatin mutációk öröklődés..... | 60 |
| 4.2.4. Off-target analízis..... | 60 |
| 4.2.5. Miosztatin mRNS expresszió vizsgálata..... | 61 |
| 4.2.6. A transzgénikus utódok testtömeg változása..... | 61 |
| 4.2.7. A miosztatin génkiütött nyulak fejlődése..... | 64 |
| 4.2.8. Miosztatin hiányos állatok vizsgálata CT-vel..... | 65 |
| 4.2.9. Hisztológiai vizsgálatok..... | 66 |
| 4.2.10. A transzgénikus vonal fenntartása, génmegőrzése..... | 67 |
| 4.2.11. CRISPR/Cas9 rendszer alkalmazása további géneken házinyúlban..... | 67 |
| 4.3. A lentivírus mediált transzgenezis eredménye..... | 67 |
| 4.3.1. GFP expresszió vizsgálata <i>in vitro</i> embriókon..... | 67 |
| 4.3.2. Placenta specifikus géntranszfer eredménye nyulakban..... | 68 |
| 4.4. Új tudományos eredmények..... | 71 |
| 5. Következtetések és javaslatok..... | 73 |
| 6. Összefoglalás..... | 78 |
| 7. Summary..... | 80 |
| 8. Mellékletek..... | 82 |
| 8.1. Irodalomjegyzék..... | 82 |
| 8.2. Publikációs lista..... | 98 |
| 8.3. Anyagok..... | 102 |

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

| | |
|-------------|--|
| ACVRIIB | Activin receptor type-2B (2-es típusú aktivin receptor B) |
| AMPK | Adenosine monophosphate-activated protein kinase (adenozin-monofoszfát aktívált kináz) |
| ALK4 | Activin Receptor-Like Kinase-4 (aktivin receptor-szerű kináz-4) |
| Akt | Aktin |
| BMP | Bone Morphogenetic Protein (csont morfogenetikus fehérje) |
| bp | Bázispár |
| Cas | CRISPR associated protein (CRISPR-hez kapcsolt fehérje) |
| cDNS | Komplementer dezoxiribonukleinsav |
| CRISPR/Cas9 | Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 (halmozottan előforduló, szabályos közökkel elválasztott palindromikus ismétlődések/ CRISPR-hez kapcsolt fehérje 9) |
| crRNS | CRISPR RNS |
| Ctgf1 | Connective tissue growth factor 1 (Kötőszöveti növekedési faktor-1) |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DNS | Dezoxiribonukleinsav |
| FCS | Fetal Calf Serum (magzati borjúsavó) |
| FoxO1 | Forkhead box protein O1 (villafejű doboz fehérje O1) |
| FSH | Follicular Stimulating Hormon (follikulus stimuláló hormon) |
| FSTL3 | Follistatin like 3 (Follisztatin-szerű fehérje 3) |
| GASP-1 | GDF-associated serum protein-1 (GDF-hez kapcsolt szérum fehérje-1) |
| GDF-8 | Growth Differentiation Factor-8 (növekedési és differenciálódási faktor-8) |
| GFP | Green Fluorescent Protein (zöld fluoreszcens fehérje) |
| GLUT1 | Glucose transporter 1 (glükóz transzporter 1) |
| GnRH | Gonadotrop Releasing Hormon (gonadotropin felszabadító hormon) |
| HDR | Homology-directed repair (homológ rekombináció) |
| HPRT | Hypoxanthine phosphoribosyltransferase (hypoxantin foszforiboziltranszferáz) |

| | |
|--------|---|
| hCG | Human Chorionic Gonadotropin (humán korion gonadotropin) |
| IU | International Unit (nemzetközi egység) |
| IL-4 | Interleukin-4 |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| KO | Knock Out (génkiütött) |
| LAP | Latency Associated Peptide (lappangáshoz kapcsolt peptid) |
| LTR | Long Terminal Repeat (hosszú terminális ismétlődés) |
| NHEJ | Non-Homologous End Joining (nem homológ végek összekapcsolása) |
| NMD | Nonsense-mediated decay (mRNS minőségellenőrző folyamat) |
| NLS | Nuclear Localization Signal (sejtmagi lokalizációs szignál) |
| MuRF-1 | Muscle RING-finger protein-1 (izom gyűrűsujj fehérje-1) |
| Myog | Myogenin (miogenin) |
| MyHC | Myosin Heavy Chain 1 (miozin nehéz lánc 1) |
| ORF | Open Reading Frame (nyílt leolvasási keret) |
| Pai1 | Plasminogen activator inhibitor -1 (plazminogen aktivátor inhibitor-1) |
| PAM | Protospacer adjacent motif (protospacer melletti motívum) |
| PBS | Phosphate Buffered Saline (foszfát pufferelt fiziológiás sóoldat) |
| PCR | Polimerase Chain Reaction (polimeráz láncreakció) |
| PMSG | Pregnant Mare Serum Gonadotropin (vemhes kanca szérum gonadotropin) |
| PVA | Polivinil-alkohol |
| qPCR | Quantitative Polimerase Chain Reaction (kvantitatív polimeráz láncreakció) |
| RAG-1 | Recombination activating gene 1 (rekombináció aktiváló gén 1) |
| RNS | Ribonukleinsav |
| RT PCR | Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction (reverz transzkripció polimeráz láncreakció) |
| SNP | Single Nucleotide Polymorphisms (egy pontos nukleotid-polimorfizmus) |
| TALEN | Transcription Activator-Like Effector Nuclease (transzkripció aktivátor-szerű effektor nukleáz) |

| | |
|---------------|---|
| TGF- β | Transforming growth factor-beta (átalakító és növekedési faktor-béta) |
| TNF- α | Tumor nekrosis faktor- α |
| tracrRNS | Trans-activating CRISPR RNA (transz-aktiváló CRISPR RNS) |
| UTR | Untranslated region (nem transzlálódó régió) |
| UV | Ultra Violet (ultraibolya) |
| ZFN | Zinc-finger nuclease (cink-ujj nukleáz) |

1. BEVEZETÉS

Napjainkra a biotechnológia gyorsan fejlődő, izgalmas tudományterületté nőtte ki magát, melynek elengedhetetlen részét jelenti az állatok transzgenezise. A génmódosított állatok előállítását jelentősen megkönnyítik ez elmúlt években kifejlesztett ún. újgenerációs genomszerkesztő eljárások. A villámgyorsan terjedő „molekuláris ollók”, mint a TALEN (transcription activator-like effector nuclease), vagy a CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9) hatalmas lendületet adtak az állatbiotechnológiai kutatásoknak is. Doktori témám keretében a kísérletes munkáimat ezeket a technikákat felhasználva végeztem házinyúlban (*Oryctolagus cuniculus*) a MATE Genetika és Biotechnológia Intézetének, Állatbiotechnológiai Tanszékén.

Kutatásaim keretében a miosztatin gén állt, és e fehérje funkciójának megismerése házinyúlban. Napjainkban már számos fajban publikáltak miosztatin hiányra visszavezethető megváltozott fenotípust, melyet természetes mutáció és mesterséges módosítás egyaránt eredményezhet.

A miosztatin gén mutációja, és annak izomfejlődésre gyakorolt hatása számos területen került az érdeklődés középpontjába. Az alapkutatási szintű vizsgálatok mellett a humán medicina, az állattenyésztés és a testépítés iparága is foglalkozik a miosztatin fehérjével és annak szervezetben betöltött szerepével.

A mezőgazdaságban a legtöbb természetes inaktív miosztatin gént hordozó fajtát a húskért tenyésztett szarvasmarhák között találhatjuk, ilyen például a szembetűnő izomzattal rendelkező Fehér-kék belga, vagy a Piemonti. Haszonállataink közül a Texel juh szintén „szuperizmolt” fenotípussal rendelkezik, melyet a miosztatin gén 3' nem transzlálódó régiójában található G-A mutáció okoz. Kutyában (agár) is leírtak miosztatin mutációt, ami megnövekedett izomtömeget, és ezzel együtt nagyobb fizikai erőt, és gyorsaságot eredményezett.

Emberben is találtak természetes módon kialakuló miosztatin mutációt, mely megnövekedett izomtömeg kialakulásával járt együtt.

A miosztatin fehérje funkciójának teljeskörű feltérképezését követően az izomvesztéssel járó megbetegedések kezelésében lehet potenciális terápiás célpont. A fehérje szerepének megismerésében jelentős szerepet játszanak az állatbiotechnológiai kutatások. Már számos fajban létrehoztak miosztatin géniütött egyedeket, például egérben, kutyában, juhban, kecskében, sertésben és nyúlban is, melyek révén egyre több információt nyerhetünk a miosztatin szervezetben betöltött feladatáról.

A miosztatin fehérje az izomnövekedés negatív szabályozó faktora, amelynek köszönhetően kialakul az egyedek fajra jellemző vázizomzata. Hiányában az izomsejtek mérete (hipertrófia) és száma (hiperplázia) is megnőhet, melyek együttesen eredményezhetik az izomtömeg gyarapodását. Fajonként eltérhet, hogy a hiperplázia vagy a hipertrófia nyilvánul meg erőteljesebben miosztatin hiány esetén. A miosztatin a zsírszövet alakulására, a csontok fejlődésére is hatással van, emellett a gén működésének hiányában az izomzat összetétele is megváltozhat egyes fajokban. Idegrendszeri miosztatin expressziót is kimutattak patkányban, melynek pontos szerepe még nem tisztázott, ezért további kutatások szükségesek ennek feltárására. A miosztatin a placenta glükóz metabolizmusában is szerepet játszik, de részletes folyamata még nem ismert.

A miosztatin hiányos nyúl létrehozás mellett a csoport hosszú távú célja, hogy placenta-specifikus gén inaktiválással vizsgálhassuk a miosztatin szövetspecifikus szerepét. Mivel a placenta-specifikus géntranszfer módszere még nem volt kidolgozva nyúlban, ezért doktori témám során olyan GFP riportergénnel ellátott placenta-specifikus modell rendszer létrehozása is cél volt, mellyel könnyen lehet a későbbiekben vizsgálni a miosztatin mediált extraembrionális anyagcserét.

A jövőben amellet, hogy a létrehozott állatok az izomzat betegségeinek vizsgálatában, izomfejlődésbeli rendellenességek megismerésében játszhatnak szerepet, az idegrendszeri elváltozások és placenta anyagcsere zavarainak modellezésére is alkalmasak lehetnek.

Az állatbiotechnológia kedvelt modellállata a házinyúl, melyet a laboratóriumunkban is előszeretettel használunk a különböző transzgenikus munkák során. Jól kezelhető, gyors reprodukciós ciklussal rendelkező, sok utódot világra hozó faj, mely méretét tekintve is alkalmas humán betegségek modellezésére. Fiziológiás hasonlóságokat figyelembe véve a házinyúl rendkívül hasznos lehet a kardiovaszkuláris betegségek, a lipidanyagcsere zavarok modellezésében. Emellett az embriológiai, szaporodásbiológiai kutatások kiváló alanya. Mint modellállat, az epigenetikai újraprogramozással kapcsolatos kísérletekben, illetve elhízáshoz, terhességi diabéteszhez kapcsolt patogén mechanizmusok megismerésében nagyszerűen alkalmazható.

Munkám során a házinyúl, mint modellállat, és mint haszonállat egyaránt szerepet játszott. Az alapkutatói kérdések mellett, a hazai nyúltenyésztésben szereplő Fehér Pannon fajta miosztatin hiányos fenotípusát igyekeztem tenyésztési szempontból is vizsgálni.

1.1. Célkritizések

Célul tűztem ki a házinyúl miosztatin génjének kiütését genomeditáló technológiák alkalmazásával.

Célcritizéseim között szerepelt miosztatin mutáció létrehozása Hycóle és Pannon fehér nyúlfajtában, majd a keletkezett fenotípusok fajtánkénti összehasonlító vizsgálata. Tanulmányozni kívántam a különböző genetikai háttér adott génkiütésre gyakorolt hatását nyúlban.

Emellett célom volt GFP riportergénnel ellátott placenta-specifikus modellrendszer kidolgozása, mely a jövőben a placenta működéséhez köthető gének tanulmányozásában, a méhlepény betegségeinek vizsgálatában lehet alkalmazható.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Munkám középpontjában a házinyúlban genomszerkesztéssel előidézett miosztatin hiány következményeinek tanulmányozása állt. A házinyúl széleskörben alkalmazott modellállat többek között gének funkciójának megértésére irányuló kutatásokban, illetve humán betegségek hátterének feltárására végzett vizsgálatokban. Ezért is választottuk kutatásunk alanyának, hiszen a létrehozott miosztatin mutáns modell nemcsak a doktori munkám keretében végzett vizsgálatok, hanem számos további alap- és alkalmazott kutatás alapjául szolgálhat.

2.1. Miosztatin (*GDF-8, Growth Differentiation Factor 8*)

A miosztatint 1997-ben azonosították, mint növekedési és differenciálódási faktort (Growth Differentiation Factor-8, GDF-8), a TGF- β fehérje szupercsalád új tagját. A nyúl miosztatin génje a hetedik kromoszómán található, három exont és két intront tartalmaz. Egy leolvasási keret valósulhat meg, és 376 aminosavat tartalmazó fehérje keletkezik róla. A miosztatint kódoló szekvencia az összes TGF- β család tagjára jellemzően konzervált, ahogy az N-terminális szignál szekvencia, a proteolitikus hasító hely és a kilenc konzervált cisztein-reziduumot tartalmazó C-terminális domén (McPherron et al. 1997). A miosztatin C-terminális részének szekvenciája magas fokú homológiát mutat más TGF- β fehérjecsalád tagokéval, kiváltképp a GDF-11-el (Gamer et al. 1999). A miosztatin és a GDF-11 C-terminális régiójának aminosav sorrendje 90%-ban, N-terminális pro-doménjük 52%-ban egyezik meg. A miosztatin a halakban is megtalálható fehérje, ahol viszont 16 homológját azonosították (Rodgers and Garikipati 2008).

A TGF- β szupercsaládba közel 30 féle emlősökben megtalálható citokin tartozik, melyek a következő csoportokba sorolhatók: TGF- β -ák, csont morfogenetikus fehérjék (bone morphogenetic proteins, BMPs), aktivinek és növekedési/differenciálódási faktorok (growth and differentiation factors, GDF). A csoportosítás tovább folytatható a szekretált ligand alapján, mely a sejtben történő jelátviteli folyamatokat mediálja. Smad1/5/8 alapú jelátviteli útvonalak indukálását idézik elő a csont morfogenetikus fehérjék, és a növekedési és differenciálódási faktorok nagy része, a Smad2/Smad3 útvonalat az aktivinek, miosztatin, GDF-11, és TGF- β -ák iniciálják.

2.1.1. A miosztatin feladata

A miosztatin az embriógenézis során meghatározó szerepet játszik a fejlődési folyamatokban, expresszióját legkorábban 9 és fél napos (termékenyítés utáni) egér embriók szomitáinak egyharmadában mutatták ki. Zebradánióban is megfigyeltek miosztatin expressziót embrionális korban, de sokkal alacsonyabb mértékben, mint egér esetében (Xu et al. 2003).

Tyúk embriógenézis során legelőször a HH 15 stádiumban detektáltak miosztatin expressziót, mely változatosan alakul a szomiták fejlődése során (Amthor et al. 2002).

Megállapították, hogy a miosztatin a tyúk és egér embrionális fejlődése során az izom progenitor sejtek növekedésének és fejlődésének egyensúlyát szabályozza a terminális differenciálódáson keresztül. Ezt a komplex folyamatot *p21* (ciklin-függő kináz inhibitor 1) és *MyoD* (mioblaszt determinációs fehérje 1) gének aktivációjával valósítja meg (Manceau et al. 2008).

Egérben a magzati fejlődés során számos fejlődő izomszövetben figyelhető meg miosztatin expresszió, ami felnőtt korban tovább folytatódik a különböző izomszövet-típusokban (McPherron et al. 1997).

A miosztatin elsősorban a miotubulusokban expresszálódik és leginkább azok sejtmagjában figyelhető meg. A később bemutatásra kerülő érési folyamatot követően kijuthat a sejtből, és a véráramban szállítódik többnyire inaktív formában, majd autokrin és parakrin módon fejt ki hatását a célszövetben (Artaza et al. 2002).

Úgy tűnik, a miosztatin az izomszövet a gyors összehúzódású izomrostok fejlődésének szabályozásánál jelenik meg leginkább (McPherron et al. 1997; Artaza et al. 2002). A miotubulusok, mint sokmagvú végleg differenciálódott egységek, csak szatellit sejtekből keletkező új mioblasztok fúziójával képesek méretbeli növekedésre. A miosztatin egyik fő mechanizmusa, hogy dózis függő módon gátolja a mioblaszt sejtek proliferációját, így szabályozza az izomrostok növekedését (Thomas et al. 2000). Ez a hatás a Pax7 (paired box-7)–MyoD ko-lokalizációjának megakadályozásával valósul meg, ami a szatellit sejtek nyugalomban tartását eredményezi (McFarlane et al. 2008).

A miosztatin proliferációra kifejtett közvetlen hatása a mioblasztok fúziójának megakadályozásával is megvalósulhat. Ezt a jelenséget a MyoD aktivitás gátlásával eredményezi (Langley et al. 2002), ami a Smad jelátviteli útvonalon keresztül történő génexpresszió transzkripcionális akadályozásával valósul meg (Allen and Unterman 2007, Zhu et al. 2004).

A miosztatin a Smad útvonalaktól függetlenül is képes gének expressziójának szabályozására, a proteozómális aktivitás növelésével. Miosztatin stimulációval növekvő, aktin/FoxO1 út-

vonulhoz kapcsolt atrogin szintet figyeltek meg, ami a sejtek degradációját idézte elő, és izomsorvadáshoz vezetett (McFarlane et al. 2006). Az aktin (Akt) jelátvitel összetett mechanizmuson keresztül képes hipertrófiát indukálni izomban (Frost and Lang 2007). A miosztatin megközelítőleg 25%-al csökkenti az aktin foszforilációs szintjét, ahogy az aktinhoz downstream kapcsolódó fehérjék foszforilációs rátáját (Amirouche et al. 2009), ezáltal befolyásolja az izomnövekedésért felelős gének transzkripcióját.

A vázizomzaton kívül, ugyan alacsonyabb mennyiségben, de a szívizomzatban és a zsírszövetben is termelődik miosztatin (Allen et al. 2008; Sharma et al. 1999). A szív patológiás folyamatai során a miokardium termel, és szekretál miosztatint a véráramba, ami aztán a vázizomzat növekedésének gátlását idézheti elő. A vázizomzatra gyakorolt endokrin hatáson túl, a szívben termelődő miosztatin a kardiomiociták növekedését is gátolhatja, a szívizomzatban fibrózist és ventrikuláris-funkció változást indukálhat (Breitbart et al. 2011).

A miosztatin szerepet játszik a zsírfelhalmozás szabályozásában is. Ezt McPherron és munkatársai (2002) is igazolták miosztatin null-mutáns egerekben. Szignifikánsan alacsonyabb zsírszövet mennyiséget, és abnormális glükóz metabolizmust figyeltek meg a miosztatin hiányos állatokban, mint kontroll társaikban normál tápanyag bevitel mellett.

A miosztatin vemhesség során bizonyítottan szerepet játszik a placentán keresztül történő glükóz felvétel szabályozásában (Antony et al. 2007, Mitchell et al. 2006).

Emellett megfigyelték, hogy csökkent tápanyag ellátottságú anyában megemelkedett a placentális miosztatin expresszió, mely kisebb méretű placenta mellett segített megfelelő szinten tartani az utódok tápanyagigényének kielégítését. Így valószínűsíthető, hogy nemcsak a glükóz, hanem más tápanyag bevitel szabályozásában is részt vesz (Hassendrini et al. 2010).

A placentális miosztatin szint a gesztációs kor előrehaladtával csökken (Mitchell et al. 2006), így valószínűsíthető, hogy a vemhesség korai szakaszában van jelentős szerepe. Segíti a beágyazódás, proliferáció, szincitizáció folyamatát (Peiris and Mitchell, 2012).

Feltehetően a miosztatin ezeket a folyamatokat a citokinekkal való interakciójának következményeként (is) befolyásolja. Citokinekkal való kölcsönhatását megfigyelték egérben, miszerint miosztatin hiányában csökkent vérplazma TNF- α szintet detektáltak, rekombináns miosztatin kezeléssel pedig növekvő TNF- α koncentrációt értek el (Wilkes et al. 2009). C2C12 miotubulusokban IL-6 expresszió növekedést figyeltek meg rekombináns miosztatin kezelést követően (Zhang et al. 2011). Továbbá TNF- α mRNS és fehérje expresszió növekedést is észleltek C2C12 miotubulusokban miosztatin kezelés után (Bonetto et al. 2011, Zhang et al. 2011).

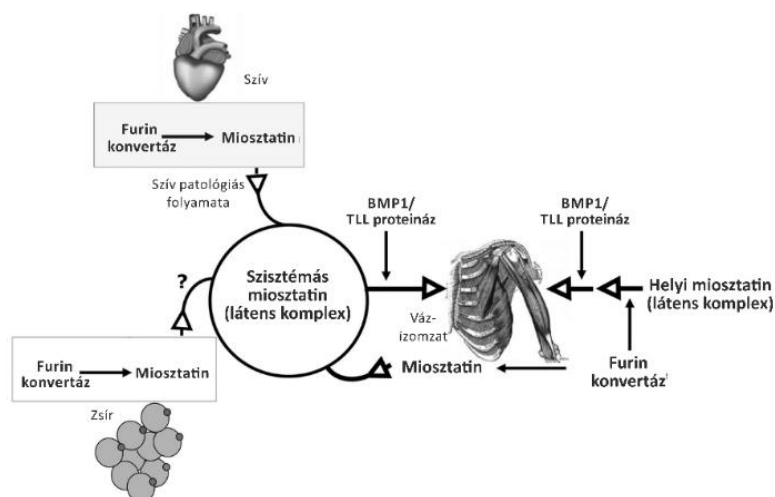
Ezen sejt-kommunikációban szerepet játszó molekulák (a TNF- α , az IL-6, és az IL-4) támogatják a citotrofoblaszt sejtek proliferációját, segítik a beágyazódás és a placentafejlődés szabályozását (Bowen et al. 2002; Normitz et al. 2001; Peiris and Mitchell, 2012).

2.1.2. A miosztatin bioszintézise

A miosztatin más TGF- β fehérjékhez hasonlóan prekursor molekulaként szintetizálódik. Ez a körülbelül 52 kDa méretű prekursor fehérje egy N terminális szekréción elősegítő szignál szekvenciából, egy pro-peptid doménből, egy C-terminális RSRR (Arg-Ser-Arg-Arg) proteolitikus hasítóhelyből és egy C-terminális egységből tevődik össze. A C terminális végen található kilenc cisztein reziduumból álló ún. cisztein-kötő hely, konzerváltnak tekinthető a TGF- β szupercsaládban (McPherron et al. 1997).

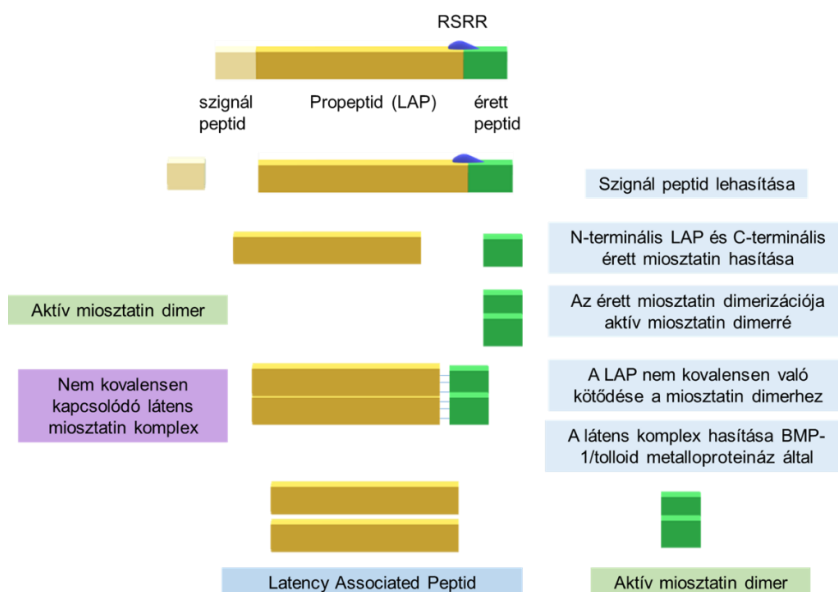
A biológiailag aktív molekula eléréséhez három proteolitikus hasításra van szükség (McPherron et al. 1997; Rodgers and Garikipati, 2008). Az endoplazmatikus retikulumba történő transzlokáció után, az első hasítás során leválik az N-terminális szignál szekvencia, mely a fehérje szekrécijához elengedhetetlen. A furin konvertázok által mediált második proteolitikus hasítás alkalmával egy ~ 42 kDa méretű N-terminális pro-peptid (LAP), és egy ~12 kDa méretű C-terminális fragment keletkezik (Dominique and Gérard 2006, Matsakas and Diel 2005). Ez utóbbi jelenti az érett miosztatin formát, melynek dimerizációjával egy kb. 28 kDa méretű aktív miosztatin forma keletkezik (Jouliá-Ekaza and Cabello 2007).

A LAP fontos szerepet játszik a miosztatin dimer aktivitásának szabályozásában, és megkönnyíti a C-terminális domén kötéseinek létrejöttét. A két monomerből álló LAP pro-peptidek nem kovalensen kötődnek a miosztatin dimerhez, ezáltal egy látens komplexet hozva létre, ami megakadályozza a dimer ACTRIIB receptorhoz való kötődését (Lee and McPherron, 2001; Lee, 2004). A vérben áramló miosztatin 70%-át ez a nem aktív, látens forma teszi ki (Hill et al. 2002; Lee, 2008). A miosztatin formák szervezetben történő előfordulása az 1. ábrán látható.



1. ábra. A myosztatin helyi és szisztémás készlete. A myosztatin látens formában kerül a véráramba a vázizomzatból, szívizomzatból, és a zsírszövetből. A látens myosztatin forma hasítását a furin konvertázok és BMP-1/Tollid proteinázok végzik, szabaddá téve az aktív myosztatin dimert (Breitbart et al. 2011 alapján)

A látens komplex felbontásánál BMP-1/Tolloid családba tartozó metalloproteinázok játszanak szerepet, melyek proteolitikusan hasítják a myosztatin pro-peptidet a 76. aszpartát aminosavnál, így téve szabaddá a myosztatin dimert (Lee, 2008; Patel and Amthor, 2005). A myosztatin bioszintézis lépéseit a 2. ábra mutatja be.



2. ábra. Myosztatin bioszintézis. A myosztatin prekursor molekula három proteolitikus hasításon megy keresztül, míg eléri az aktív formát. Először az N-terminális szignál szekvencia hasítódik le, majd a második hasítás az RSRR helyen történik, mely egy N-terminális LAP és egy aktív myosztatin domént eredményez. Az érett myosztatin dimerizálódva aktív formát alkot. A myosztatin dimer nem kovalensen kötődik LAP doménekhez, ezzel megalkotva a látens myosztatin komplexet. A BMP-1/Tolloid metalloproteináz hasítja a látens komplexet felszabadítva az aktív myosztatin dimert.

2.1.3. A miosztatin működésének szabályozása

A miosztatin működésének szabályozásában számos fehérje vesz részt. Az egyik legnagyobb befolyással bíró protein az FSTL3 (follisztatin-szerű fehérje-3), mely a follisztatin szerkezeti homológja, és nagy affinitással képes kötődni az érett miosztatin dimerhez, ezáltal gátolni a miosztatin biológiai aktivitását. Az FSTL3 abban az esetben is kötődhet a miosztatin dimerhez, ha az már a receptorhoz kapcsolódott és elindította a sejtbeli szignál folyamatokat (Hill et al. 2002). A miosztatin Smad mediált útvonalon keresztül váltja ki a negatív visszacsatolási hurkot FSTL3 közreműködésével. A Smad komplex kötődik az Fstl3 promóter Smad-kötő eleméhez, mely az Fstl3 transzkripcióját és expresszióját eredményezi, ebből következik a miosztatin negatív szabályozása (Hill et al. 2002).

A LAP és az FSTL3 mellett, a follisztatin és a GASP-1 fehérjék is befolyásolhatják a miosztatin aktivitást. A follisztatin képes a miosztatin C-terminális doménjéhez kapcsolódni, megakadályozva ezzel a miosztatin receptorhoz való kötődését. Ennek eredményeként a follisztatin megnövekedett expressziója esetén erőteljes hiperpláziát lehet megfigyelni transzgenikus egerekben (Lee and McPherron, 2001).

Az FSTL3 és a GASP-1 nagy affinitással kötődhet a vérplazmában található miosztatin C-terminális fragmentjéhez, ezáltal blokkolva annak aktivitását. A GASP-1 viszonylag nemrég felfedezett fehérje: tartalmaz follisztatin-szerű domént és a proteínáz gátlók doménjeihez hasonló részeket. A GASP-1 érett miosztatin hiányában képes a LAP-hoz is kötődni. Az FSTL3 a miosztatin aktivitásán kívül a TGF- β fehérje család más tagjainak (aktivin, BMP-2) aktivitására is hatással lehet (Hill et al. 2003).

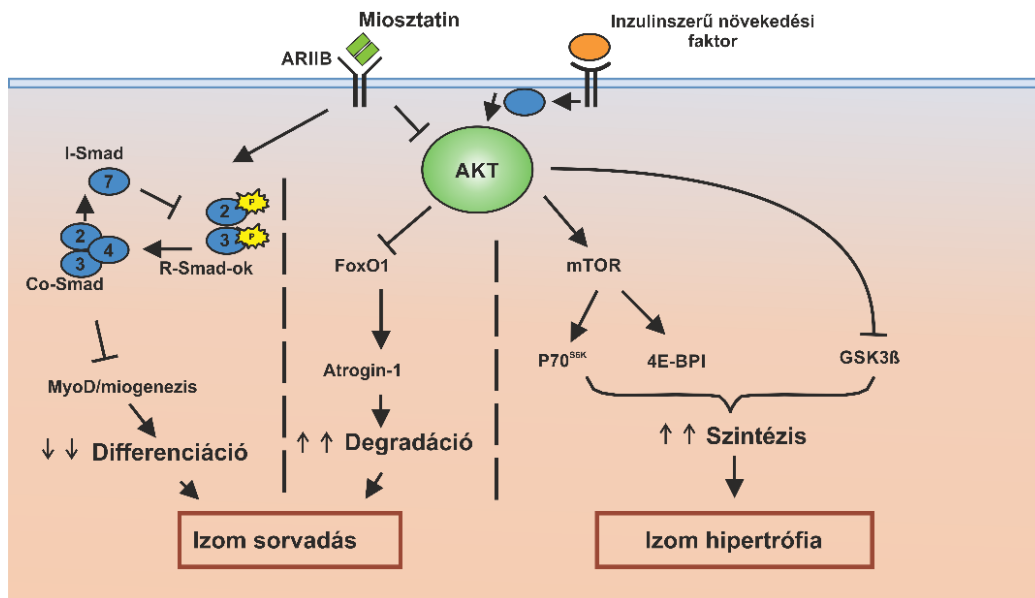
Az FSTL3 és GASP-1 együtt a LAP fehérjével háromszoros, vagy sokkal bonyolultabb komplexeket tudnak létrehozni a miosztatin dimerrel. Ebben az esetben ezeknek a fehérjéknek, mint komplexnek van szabályozó szerepük a miosztatin látens állapotának fenntartásában. A GASP-1 közvetlenül is képes kötődni a LAP-hoz és a miosztatin C-terminális dimeréhez, így létrehozva egy hármas komplexet. A GAPS-1 molekulán található számos proteínáz gátló domén jelenléte gondoskodik a pre-pro-miosztatin pro-miosztatinná történő átalakításáról (Hill et al. 2003). Ezen felül a GAPS-1 szabályozza a miosztatin hasításában is szerepet játszó metalloproteínázok aktivitását. (Lee, 2004).

Az FSTL3 és GAP-1 molekulák képesek lehetnek a miosztatin-receptor komplexhez is kötődni a receptorműködés indukálása utána, majd a receptorról leválni a miosztatinnal együtt, és komplexként a véráramba visszajutni. Így az FSTL3 és GASP-1 miosztatin komplex jelentheti a miosztatin jelátviteli útvonal végtermékét (Hill et al. 2002).

2.1.4. Miosztatin indukált intracelluláris jelátvitel

A miosztatin a GDF-11-hez és az aktivinhez hasonlóan a sejtek membránjában található aktivin receptorokhoz kötődik, az I és II-es típusú szerin-treonin kináz receptorok heterotetramer komplexéhez (Feng and Derynck 2005). Ezen receptorok egy N-terminális extracelluláris kötő doménből, egy egyszeres transzmembrán doménből, és szerin-treonin aktivitással rendelkező C-terminális intracelluláris részből állnak. A miosztatin az I-es típusú ALK4, ALK5, illetve a II-es típusú ACVR2A és ACVR2B receptorok kötődéséhez mutat magas affinitást. A miosztatin elősorban a II-es típusú receptorhoz kötődik, mely képes foszforilálni az I-es típusú receptort, ezáltal aktiválni annak receptor-kináz doménjét, ami további szignál kaszkád elindítását eredményezi.

Ez a jelátviteli útvonal Smad2 és Smad3 transzkripciós faktorok segítségével valósítja meg különböző gének expressziójának szabályozását: az I-es típusú ACVR2A receptor foszforilálja a Smad2 és Smad3 fehérjéket, melyekhez Smad4 kapcsolódva, egy hármas transzkripciós faktor komplex alakul ki. Ez a komplex képes a sejtmagba jutni, és más szekvencia-specifikus transzkripciós faktorokkal és ko-faktorokkal való interakció során gének transzkripcióját indukálni (Pai1, Ctgf1, p21, MuRF-1, Atrogin-1), illetve meggátolni (Pax7, MyoD, Myog, MyHC) izomszövetekben. Ezáltal képes fehérje degradációt, fibrózist, a sejtciklus gátlás folyamatát elősegíteni, a miogenezist gátolni, így szabályozva az izomsejtek méretének és számának fajra jellemző alakulását (3. ábra).



3. ábra. Miosztatin által kiváltott intracelluláris jelátviteli útvonalak: Az aktív miosztatin a II-es típusú aktivin receptorhoz kötődve elősegíti a különböző Smad útvonalak létrejöttét, és befolyásolja az Aktin/FoxO1/Atrogin útvonalat, ezáltal izomleépülést eredményezhet, míg hiányában az Akt/mTOR útvonalak hipertrofiát idézhetnek elő. (Elliott et al. 2012 alapján)

A miosztatin, és hozzá kapcsolódó ligandok számos egyéb intracelluláris útvonalat aktiválhatnak, mint például a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) által szabályozott reakciókat, vagy gátló hatással lehetnek a PI3K/Akt/mTOR útvonalra (3. ábra).

A miosztatin képes a mioblasztok proliferációjának gátlásával, az ubikvitin-proteasomális aktivitás növelésével és az inzulinszerű növekedési faktor-1/Aktin útvonal aktivitásának leszá-lyozásával izomsorvadást előidézni (Morissette et al. 2009).

2.1.5. Miosztatin mutáns emlősállatok

2.1.5.1. Természetes miosztatin mutáns emlősök

Számos húsmarha fajtánál leírtak miosztatin mutációt, mely ún. dupla-izmolt fenotípus megjelenésével járt együtt (Pl. Fehér-kék Belga, Dél Devon, Piemonti, Marchigiana, Angus). Ez a tulajdonság a 4. ábrán látható Fehér-kék belga esetében is szembetűnő. A miosztatin hiánnyal össze-függő fenotípus piaci szempontból jelentős előnyök-vel járhat az állattenyésztésben. Húsmarhák esetében az átlagos és szuperizmolt szarvasmarha húsminősé-gének összehasonlító vizsgálatánál a dupla-izmolt faj-ták jobb értékelést értek el. A megnövekedett izomtö-meg, lecsökkent testzsír százalék, kevesebb csonttö-meg, és a kisebb belső szervek kombinációjából adódóan ezek az állatok nagyobb arányban tar-talmazzák a drágán eladható húsféléket. Ennek egyik oka az izom-hipertrófia és hiperplázia jel-legzetes megléte. A húst csökkent zsírtartalom és magasabb többszörösen telítetlen zsírsav arány is jellemzi. A szuperizmolt szarvasmarhák húsa kevesebb kollagént tartalmazhat, így az állatok nagy hatékonysággal és nagyobb arányban tudnak sovány húst előállítani. A puhább hús és a ma-gasabb telítetlen zsírsav arány kívánatosabb a mai fogyasztói társadalom számára, így a kereslet nagy piacot teremt a szuperizmolt fajták értékesítésének (Wiener et al. 2009, Gill et al. 2009, Casas et al. 1998, Wheeler et al. 2001, Kobolák and Gócza 2002).



4. ábra. Fehér-kék belga szarvasmarha (Druet et al. 2014)

A miosztatin mutáció nemcsak előnyös tulajdonságok megjelenését eredményezi, előfor-dulhatnak nem várt „mellékhatások” is. A szuperizmolt fenotípussal rendelkező szarvasmarhák esetében a borjak nagy mérete miatt gyakran van szükség császármetszésre, ami tenyésztési és gazdasági szempontból nem kívánatos. A dupla-izmolt szarvasmarhák csökkent hőstressz tűrésí

képességgel rendelkeznek, amit a nagyobb izomtömeg által okozott megnövekedett hőtermelés idéz elő, emellett tejtermelésük is alacsonyabb hatékonyságú lehet (Bellinge et al. 2005).

A különböző szarvasmarha fajtákon kívül egyéb fajokban is leírtak miosztatin mutációt. Kutyában azonosítottak két bp deléciót a harmadik exonon, ami korai stop kodont generál. Ez a mutáció már heterozigóta formában is nagyobb izomtömeget, és a vad típushoz képest szignifikánsan gyorsabb teljesítményt eredményezett agarokban (Mosher et al. 2007).

Texel juhok populációjában is kimutattak G-A tranzíciót a 3' UTR régióban, mely a vázizomzatban erősen expresszálandó *mir1* és *mir206* mikroRNS-ek kötőhelye. Ez a mutáció transzlációs gátlást idéz elő az állatokban, és hipertrófia kialakulásához vezet (5. ábra) (Clop et al. 2006).

Emberben is detektáltak mutációt a miosztatin gén nem kódoló régiójában. A két kópiás G-A tranzíció a prekurzor miosztatin mRNS „misz-splicingját”, csonka fehérje képződését eredményezte, ami dupla-izmolt fenotípus kialakulását váltotta ki (Schuelke et al. 2004).

Varga László és munkatársai 1998-ban figyeleltek meg „túlizmolt” fenotípust laboratóriumi egértözsben. Az izomzat széleskörű növekedését hiperplázia és hipertrófia egyszerre eredményezte. Ezt a fenotípust ők „kompakt” hiperizomoltságnak nevezték el (*Cmpt*) (Szabó et al. 1998).



5. ábra. Dupla-izmolt Texel juh (Skipper, 2006)

2.1.5.2. Mesterségesen létrehozott miosztatin mutáns emlősök

A miosztatin funkciójának vizsgálatára számos mesterséges miosztatin mutánst hoztak létre a különböző fajokban.

Az első miosztatin mutáns emlőst McPherron és munkatársai (1997) hozták létre, melynek vizsgálatával bizonyították a miosztatin fehérje vázizomzatban betöltött szerepét.

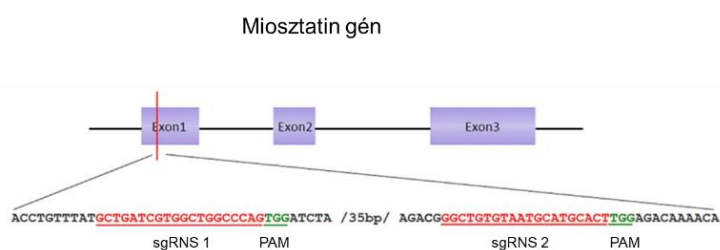
Meishan sertés miosztatin génjén indukáltak mutációt 2015-ben cink-ujj nukleáz módszerrel. Szabályos lefolyású fejlődés és növekedés mellett, nagyobb izomtömeget és csökkent zsír felhalmozást figyeltek meg a miosztatin mutáns állatokban a vad típushoz képest. A homozigóta null mutáns állatoknál dupla-izmolt fenotípust írtak le, mely a hiperplázia eredményeként 100%-kal nagyobb izomtömeget jelentett a kontroll egyedekhez viszonyítva. A miosztatin mutáns sertések 20%-ánál extra csigolya kialakulását is detektálták (Qian et al. 2015).

Ugyanebben az évben Wang és munkatársai is létrehoztak miosztatin mutáns sertést CRISPR/Cas9 technikával. Az így előállított mutáns állatoknál nyilvánvaló intermuszkuláris barázdákat és megnagyobbodott nyelvméretet írtak le, mint dupla-izmolt fenotípus jegyeket (6. ábra) (Wang et al. 2015).



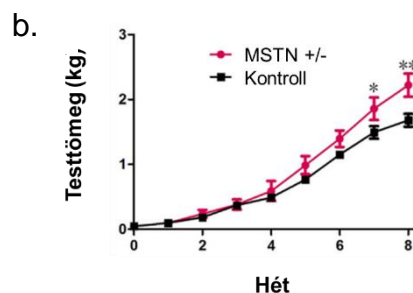
6. ábra. Miosztatin hiányos és vad típusú sertések. Az első két képen piros körrel kiemelve az intermuszkuláris barázdák, ill. alatta a megnagyobbodott nyelv szindróma jelensége látható. (Wang et al. 2015 alapján)

Miközben folytak kísérleteink, más csoportok is indukáltak mutációt a nyúl miosztatin génjén. Q. Lv és munkatársai (2016) CRISPR/Cas9 rendszerrel hoztak létre miosztatin KO Új-zélandi fehér nyulakat az első exonra egymástól 35 bp távolságra tervezett két CRISPR guide RNS



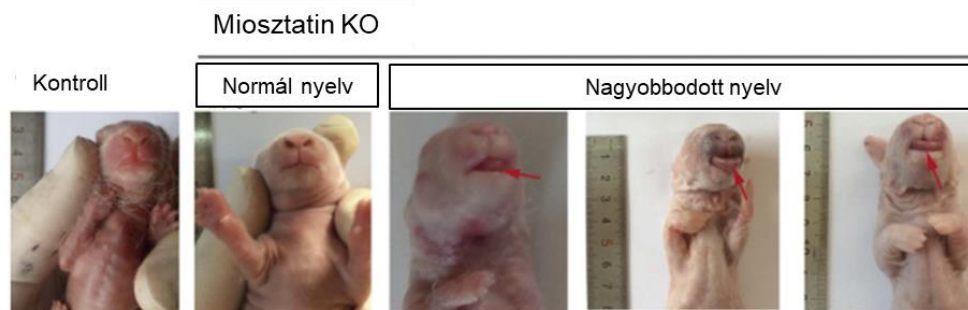
7. ábra. CRISPR guideRNS és PAM szekvenciák a nyúl miosztatin génjének első exonjára (Lv et al. 2016 alapján)

együttes alkalmazásával (7. ábra). A létrehozott állatoknál genotípustól függően (hetero- vagy homozigóta KO állat) különböző mértékű szuperizmoltságot figyeltek meg (8. ábra.a.). Emellett két hónapos korban a heterozigóta állatoknál is szignifikánsan nagyobb testtömeget tapasztaltak a kontrollhoz viszonyítva (8. ábra.b.) A miosztatin KO állatok nehézségeként „nagy utód szindrómát” detektáltak, a megszülető utódok nagy mérete ellési problémákhoz vezetett (Lv et al. 2016).



8. ábra. a. Miosztatin hiányos állatok izmoltságának összehasonlítása négy hónapos korban. b. Heterozigóta és Kontroll állatok testtömegének alakulása születéstől két hónapos korig. (Lv et al. 2016 alapján)

R. Guo és kollégái (2016) miosztatin génkiütött nyulat és kecskét is létrehoztak CRISPR/Cas9 rendszerrel. A miosztatin KO nyúl előállításához a gén első és harmadik exonjára terveztek sgRNS-eket. A sikeres embriótesztet követően a két sgRNS-t alkalmazták egyidejűleg, illetve a harmadik exonra irányulót önmagában is, melyek eredményeként 34 megszülető állatból 24 utód tartalmazott mutációt a célzott génszakaszon. A miosztatin KO nyulak szignifikánsan nagyobb születési súllyal rendelkeztek, illetve a teljes testhez viszonyítva megnövekedett kvadricepsz és bicepsz arány jellemezte őket. A megszülető utódok 41,2%-ánál miosztatin hiányhoz köthető, megnövekedett nyelv szindrómát figyeltek meg, mely a korai elhullás egyik oka lehetett (9. ábra). A miosztatin KO utódok körében meglepően magas arányban történt halva születés (20,83%) és gyenge kondícióból fakadó korai elhullás (29,17%) is a kontroll esetekhez viszonyítva.



9. ábra. Kontroll és miosztatin génkiütött nyulak nyelvméretének alakulása. A miosztatin hiányos állatoknál néhány esetben megnövekedett nyelvméretet tapasztaltak, mely a korai elhullás egyik oka lehetett. (Guo et al. 2016 alapján)

Ugyanezzel a genomszerkesztő technikával kecskék miosztatin génjét is működésképtelenné tették. Itt a fejlődés és növekedés korai szakaszában írtak le nagyobb testtömeget a miosztatin mutáns kecskében a kontroll állatokhoz viszonyítva (Guo et al. 2016).

Két évvel később Z. He és csoportja (2018) hozott létre miosztatin KO kecskét CRISPR/Cas9 mikroinjektálással. Amellett, hogy az átlagos testtömeg-növekedés szignifikánsan magasabb volt a miosztatin hiányos állatoknál, mint vad típusú társaiknál (10. ábra), a génkiütött állatok abnormális cukor, zsír, és fehérje metabolizmust mutattak.



10. ábra. Miosztatin KO kecske (balra) és vad típusú társa (jobbra). (He et al. 2018)

A tavalyi évben már ló embriókban is idéztek elő mutációt CRISPR/Cas9 és testi sejtes-klónozás alkalmazásával, mely technológia kifejlesztésével a sportban előnyös allélek előállítására, precíziós tenyésztési program is kialakításra kerülhet (Moro et al. 2020).

2.2. TALEN rendszer a biotechnológiában

Az újgenerációs genomszerkesztő technológiák egyike, a 2010-től terjedőben lévő TALEN rendszer a cink-finger nukleáz (ZFN) technika „versenyársaként” született. Specifikus helyen történő DNS hasítást képes előidézni a genomban, ezáltal az NHEJ (non-homologous end joining/nem homológ végek kapcsolódása) és HDR (homology directed repair, homológ rekombináció) folyamatain keresztül megvalósuló módosítások létrehozására alkalmas (Sander et al. 2012). Alkalmazásával könnyen generálhatunk inszerciákat és deléciákat az élőlények genomjának sepcifikus helyén, ezáltal megváltoztathatjuk a célzott gének működését.

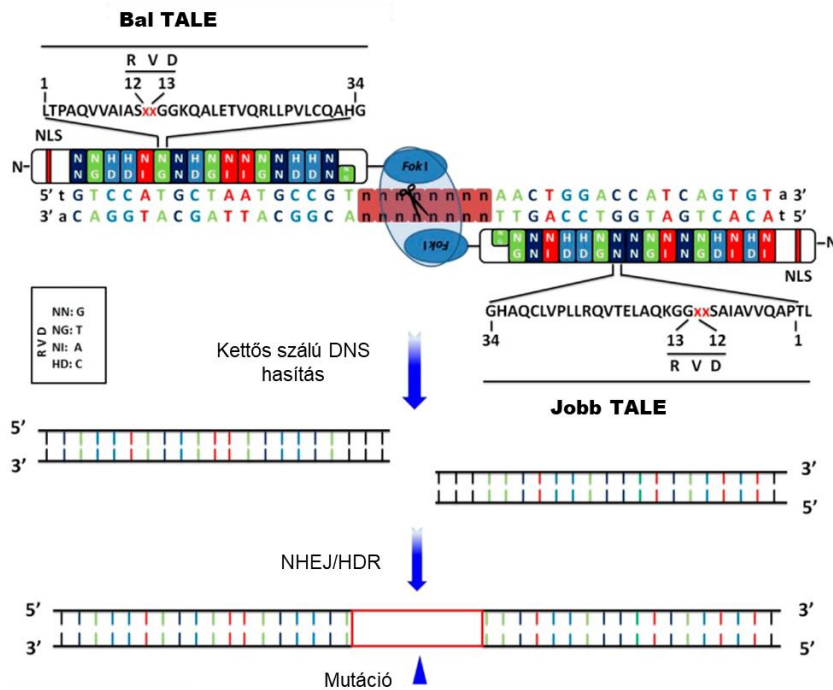
A transzkripció aktivátor-szerű effektor (TALE) egységet, mely alapvetően transzkripció faktoroként működik növénypatogén *Xanthomonas* genus tagjaiból izolálták először. A baktériumok TAL effektora a III-as típusú szekréciós rendszeren keresztül jut be a növényi sejtekbe, ahol a genomi DNS-hez kötődve megváltoztatja a sejtek transzkripcióját a patogén baktériumok kolonizációjának támogatása érdekében (Boch and Bonas 2010).

A nagyon konzervált TALE egység minden ismétlődése 33-35 aminosavból áll, melyek felismerik az egyes nukleotidokat. Az utolsó ismétlődés csonka 20 aminosavból álló ún. fél ismétlődés. A DNS felismerés specificitásáért a 12. és 13. helyen lévő aminosavak polimorfizmusa felelős, ezeket hívják RVDk-nek (repeat variable di-residues) (Boch et al. 2009).

Négy ilyen általános RVD-t különíthetünk el, melyek a különböző nukleotidokat képesek felismerni: a HD (hisztidin, aszpartámsav) a citozint ismeri fel, az NG (aszparagin, glicin) a timinhez kötődik, az NI (aszparagin, izoleucin) az adeninhez kötődhet, az NN (aszparagin, aszparagin) a guanint ismeri fel.

A TALE fehérje három fő részből tevődik össze: egy N-terminális doménből, egy TALE ismétlődéseket tartalmazó egységből és egy C terminális részből (11. ábra). Ehhez a kutatók *FokI* endonukleázt fuzionáltattak, így jött létre a TALE nukleáz (Li et al. 2011).

A *FokI* endonukleáz a DNS hasításért felelős, de csak dimerként működik. Ebből adódóan a specifikus helyre irányuló TALE nukleázokat a DNS mindkét szálára kell tervezni átlagosan 12-20 bp távolságra egymástól (Sun and Zhao 2013, Cade et al. 2012).



11. ábra. A TALEN fehérje komplex felépítése és működésének sematikus ábrája. TALEN: FokI endonukleázhoz fuzionált TALE reziduumok, ahol a FokI endonukleáz domén a DNS kettős szálú hasítását idézi elő. A sejt javító mechanizmusainak (NHEJ: nem homológ végek kapcsolódása, HDR: homológ rekombináció) köszönhetően összeillesztődik a két DNS szál, de olykor mutációk kialakulása is előfordulhat. A fehérje komplex 12-13. helyen lévő RVD-i (repeat variable di-residues) felelősek az egyes nukleotidok felismeréséért. NLS: sejtmag lokalizációs szignál (Xiong et al. 2015 alapján)

A ZFN rendszerhez képest egyszerűbb a specifikus helyre történő tervezése, mert nem igényel magasszintű fehérjemérnöki tudást, hagyományos molekuláris biológiai laborokban is tervezhető, összerakható. Ezért tűnt lehetségesnek, hogy a kutatások fő genomszerkesztő módszere ez lesz, viszont a CRISPR/Cas rendszer megjelenése gyakorlatilag megállította elterjedését.

Ennek ellenére rövid időszak alatt szép számmal születtek publikációk modell organizmusok, növények, állatok, sejt alapú modell-rendszerek előállításáról, terápiás alkalmazásokról, melyek TALEN genomszerkesztő technológiával jöttek létre (Liu et al. 2012, Wood et al. 2011, Sander et al. 2012, Lei et al. 2012, Tesson et al. 2011, Carlson et al. 2012, Townsend et al. 2019, Curtin et al. 2011, Hockemeyer et al. 2012).

A házinyúl genomjának TALEN rendszerrel történő sikeres módosításáról csak egy cikk számol be, melynek során RAG-1 és RAG-2 génkiütött állatokat hoztak létre (Song et al. 2013). A RAG gének termékei enzimeként rendkívül fontos szerepet játszanak a limfoid szövetekben. Aktiválják, vagy katalizálják a V(D)J rekombináció reakciót a korai stádiumú T és B sejtek érése során, melynek eredményeként antitestek/immunglobulinok széles repertoárja és változatos T sejt receptorok találhatók meg a B és T sejtekben egyaránt.

A TALEN rendszer ebben a kísérletben hatékonyan működött, sikeresen hoztak létre RAG-1 és RAG-2 génkiütött nyulakat, melyek értékes modelljei a gyógyszer felfedezési-, fejlesztési kísérleteknek, a transzlációs és az összejt kutatásoknak. A RAG génkiütött nyúl előállítás eredményeit az 1. táblázat szemlélteti.

1. táblázat: Összefoglalás a RAG-1 és RAG-2 KO házinyúl létrehozás eredményéről (Song et al. 2013 alapján)

| Anyák száma | Célzott gén | Beültetett embriók száma | Megszületett utódok száma (%) | Módosított embriók száma (%) | Dupla KO utódok száma (%) |
|-------------|-------------|--------------------------|-------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| 1 | RAG-1 | 14 | 10 (71%) | 9 (90%) | 4 (40%) |
| 2 | RAG-1 | 14 | 7 (50%) | 7 (100%) | 6 (86%) |
| 3 | RAG-1 | 12 | 1 (8%) | 1 (100%) | 1 (100%) |
| Összesen: | | 40 | 18 (45%) | 17 (94%) | 11 (61%) |
| 1 | RAG-2 | 12 | 4 (33%) | 4 (100%) | 4 (100%) |
| 2 | RAG-2 | 12 | 0 | 0 | 0 |
| Összesen: | | 24 | 4 (18%) | 4 (100%) | 4 (100%) |

2.3. CRISPR/Cas rendszer (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

Az CRISPR/Cas elnevezés a clustered regularly interspaced short palindromic repeats alapján képzett betűszóból (Jansen et al. 2002), és a hozzá kapcsolódó -CRISPR-associated- fehérje nevéből ered.

A rendszert archeák és baktériumok adaptív immunrendszereként írták le, mely védelmet jelent a prokariótákat támadó idegen genetikai elemekkel szemben (Barrangou et al. 2007). Az archeák 83%-ában, a baktériumok 45%-ában megtalálható ez a védekezési mechanizmus (Barrangou and Marraffini 2014).

A napjainkig felfedezett CRISPR rendszerek és hozzájuk köthető gének a legújabb rendszerezés alapján két osztályba, hat típusba és 33 altípusba sorolhatók (Makarova et al. 2020). Az első osztályba azok a rendszerek tartoznak, melyek effektor modulja összetett Cas fehérjékből áll. A második osztály tagjai, ahogy a CRISPR/Cas9 rendszer, csak egy multidoménnel rendelkező crRNS kötő fehérjét tartalmaznak. Ezek a fehérjék kombinálják a védekező rendszer működéséhez szükséges összes aktivitást, emellett néhány variánsuk szerepet játszik a pre-crRNS-ek érésében (Makarova et al. 2020).

2.3.1. A CRISPR/Cas rendszer felfedezése

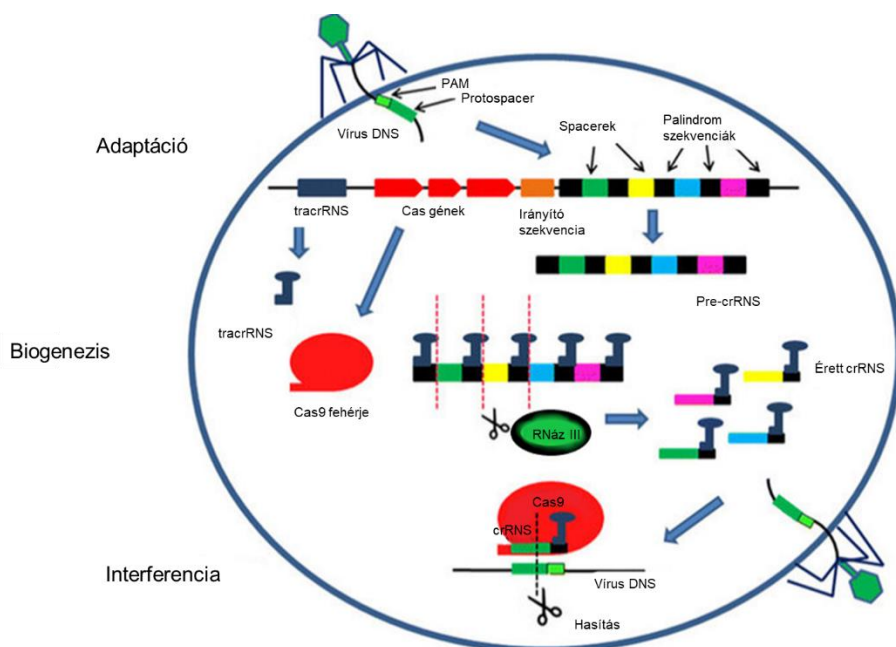
Elsőként Y. Ishino és munkatársai (1987) jegyezték le *Escherichia coli* baktérium *iap* génjében található ismétlődő palindrom szekvenciát, amelynek szerepe akkor még ismeretlen volt. Hasonló szekvencia meglétéről F. Mojica (1995) számolt be *Haloferax mediterranei* és *Haloferax volcanii* archeákban.

A 2000-es évek elején több kutatócsoport egymástól függetlenül következtetett ezen szekvenciák funkciójára, a CRISPR spacer szekvenciák és bakteriofágok, archeákat támadó vírusok és plazmidok szekvenciái között talált homológia alapján (Bolotin et al. 2005; Mojica et al. 2005; Pourcel et al. 2005). Ezzel párhuzamosan, korábban leírt hipertermofil archeák specifikus DNS-javító enzim génjét (Makarova et al. 2002) azonosították, mint CRISPR lókusszal kapcsolatban álló *cas* gént (Jansen et al. 2002). Összehasonlító genomikai vizsgálatok alapján úgy vélték, hogy a CRISPR és Cas fehérjék együttműködve a prokarióták immunrendszerének szerepét töltik be a fertőző vírusokkal és plazmidokkal szemben (Makarova et al. 2006). Az első kísérletes felhasználás 2007-ben történt, mely szerint a CRISPR/Cas mediált immunitás lítikus fágokkal szemben jelentett védelmet *Streptococcus thermophilus* tejsav baktériumban (Barrangou et al. 2007). Ez volt az egyik mérföldkő, mely az ötletet adta az ipari alkalmazásra, a baktérium kultúrákban történő fágok elleni mesterséges védekezés előidézésére (Barrangou and Horvath 2012). A CRISPR/Cas rendszer megismerése számos további apró lépésen keresztül valósult meg az évek folyamán, de a biotechnológiai alkalmazás számára az egyik legfontosabb felfedezést J. Doudna és E. Charpentier tették. Bizonyították, hogy ez a programozható crRNS és az érési folyamatához elengedhetetlen tracrRNS duplexe (Deltcheva et al. 2011) a DNS endonukleázzal egységet alkotva képes a DNS hasítására (Jinek et al. 2012). Ez olyan jelentőségű felfedezés volt, melyért J. Doudna és E. Charpentier 2020-ban kémiai Nobel díjban részesültek. A másik fontos előrelépés a biotechnológia irányába F. Zhang nevéhez fűződik, mely szerint a CRISPR/Cas rendszer alkalmas eukarióták genomjának multiplex szerkesztésére (Cong et al. 2013). Ettől a ponttól kezdve a CRISPR/Cas alapú technológia megállíthatatlanul fejlődik a komplikációktól mentes, minden igényt kielégítő genomeditálás elérésének irányába.

A manapság használatos CRISPR alapú genomeditáló módszerek a rendszerezés szerinti második osztályba tartozó mechanizmusok alapján valósulnak meg. Ide tartozik az elsőként genomeditálásra használt CRISPR/Cas9 rendszer és a szintén népszerű CRISPR/Cas12a technika.

2.3.2. CRISPR/Cas rendszer működése prokariótákban

A baktériumokat, archeákat érő fág-, illetve vírus-fertőzéskor a genomban található CRISPR lókusztól pre-CRISPR RNS-ek fejeződnek ki, melyek érési folyamatuk során, illetve után kölcsönhatásba lépnek úgynevezett *cas* (CRISPR associated) génekről átíródó fehérjékkel. A keletkező RNS-fehérje komplexek képesek a sejtbe jutó DNS fágok örökítőanyagához kapcsolódni és degradálni azokat, ezáltal megakadályozni a vírusok/fágok okozta káros folyamatokat (Marraffini and Sontheimer 2008). A vírus-támadások során az idegen örökítőanyag szakaszai a baktérium CRISPR lókusztának ún. spacer szekvenciáiba épülhetnek, melyek a következő fertőzéskor kialakuló RNS alapú védekezés kiindulópontjául szolgálhatnak (Andersson and Banfield 2008). A CRISPR/Cas9 rendszer esszenciális eleme a *tracrRNS*, mely a *crRNS* ribonukleáz III, és Cas9 általi érési folyamathoz szükséges (Deltcheva et al. 2011). A prokariótákban kialakult CRISPR rendszer működésének folyamata a 12. ábrán látható.



12. ábra. A baktériumokban, archeákban található CRISPR/Cas9 rendszer sematikus illusztrációja. A prokarióta sejtbe áramló vírus DNS feldarabolódik, majd a CRISPR lókuszt palindrom szekvenciái közé épülve a spacer szekvenciákat alkotja. A következő fertőzés alkalmával ezekről a DNS szakaszokról pre-crRNS-ek íródnak át, melyek *tracrRNS*, Cas9, RNázIII által elősegített érési folyamat után a védekezés alapjául szolgál. Az érett crRNS:Cas9 fehérje komplex képes a vírus DNS-ét felismerni, kapcsolódni hozzá, és degradálni azt, ezáltal megvédeni a sejtet a vírus okozta károsodástól. (Hryhorowicz et al. 2017 alapján)

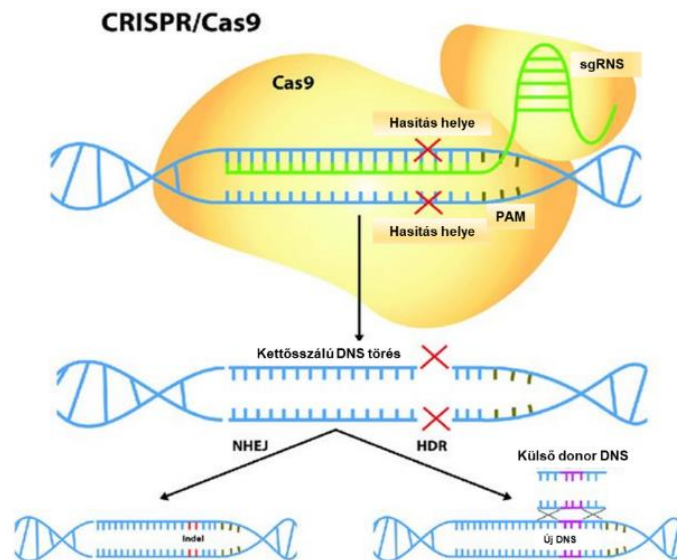
2.3.3. CRISPR/Cas rendszer a biotechnológiában

A CRISPR/Cas rendszer mára már az egyik legelterjedtebb génszerkesztő eszköz, mely lehetővé teszi prokarióták és eukarióták genomjának gyors, hatékony és helyspecifikus módosítását (Jinek et al. 2012, Cong et al. 2013).

A biotechnológia többnyire optimalizált CRISPR/Cas rendszert alkalmaz genommodosításra, mely két komponensből tevődik össze. Egy specifikus helyre tervezett, crRNS (CRISPR RNS) és tracrRNS (trans-activating RNS) fúziójából létrejövő sgRNS-ből (single guide RNS), illetve egy nem specifikus CRISPR-hez kapcsolt Cas endonukleázból. Jinek és munkatársai 2012-ben leírták, hogy a tracrRNS:crRNS kiméra RNS használatával is előidézhető DNS hasítás. Ez az RNS forma sokkal könnyebben kezelhető a genomszerkesztési eljárások során, mint a különálló RNS egységek, ezért villámgyorsan biotechnológiai alkalmazásba került.

A legelterjedtebb rendszerhez kapcsolt endonukleáz a Cas9 fehérje, de napjainkra a Cas12a-val (vagy Cpf1) működő CRISPR rendszerek is széleskörben elérhetőek (Zetsche et al. 2016).

A biotechnológiai alkalmazások körében legtöbbször alkalmazott *Streptococcus pyogenes*-ből izolált SpCas9 egy HNH és RuvC hasító doménnel rendelkező endonukleáz (Makarova et al. 2006). A multifunkcionális fehérje a DNS meghatározott, guanin gazdag ún. PAM (protospacer adjacent motif) szekvenciáját (NGG) ismeri fel. A sgRNS által irányított Cas9 endonukleáz kettőszálú DNS hasítást tesz lehetővé a crRNS-el komplementer DNS szekvencián (Jinek et al. 2012). Az előidézett hasítás a PAM szekvenciától három nukleotid távolságra, downstream irányba történik, és tompa DNS véget eredményez. Ahogy a 13. ábra is mutatja, a DNS törés NHEJ és HDR mechanizmusokon keresztül kerülhet kijavításra. A DNS két vége újra összeillesztődik, de a javító folyamatok nem mindig működnek tökéletesen, így inszerciók, deléciók alakulhatnak ki. A HDR-en keresztül zaljó editálás lehetővé teszi idegen DNS fragmentek adott helyre történő beillesztését is. Ezt úgy érhetjük el, hogyha a genomszerkesztő eszközzel egyidejűleg donor DNS-t is bejuttatunk a módosítani kívánt élőlénybe.

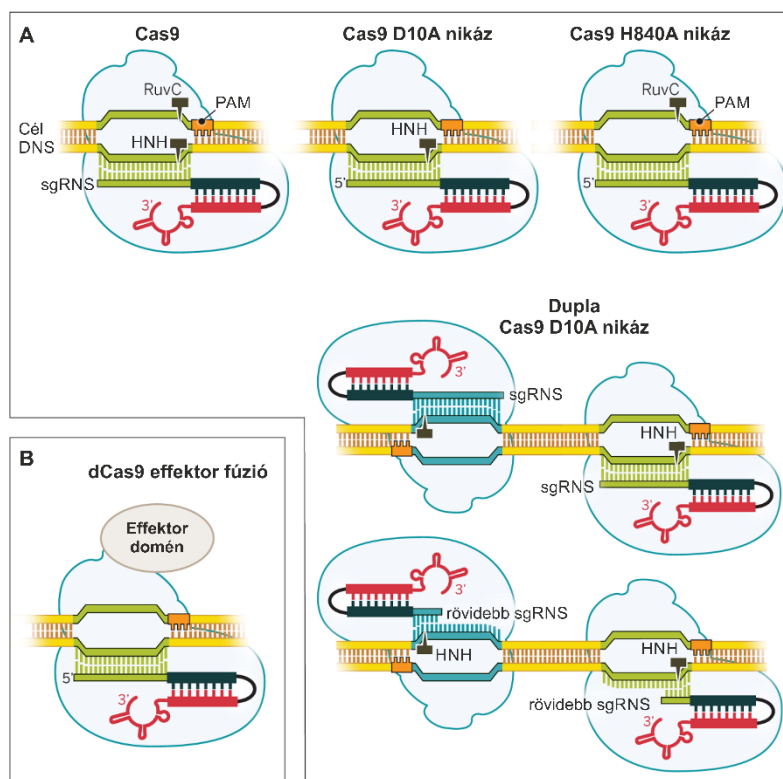


13. ábra. CRISPR/Cas9 rendszer mediált génszerkesztés folyamata. A sgRNS/Cas9 ribonukleoprotein komplex a DNS kettős szálú hasítását eredményezi a PAM szekvenciától 3 bázispárnyira. A DNS törés javítása a nem homológ végek kapcsolódásával (NHEJ) és a homológ rekombináció (HDR) alapján történhet, melyek inszerciákat és deléciókat (indel), illetve donor DNS hozzáadásával génbevitelt eredményezhetnek. (Cribbs and Perera, 2017 alapján)

Egyszerűségének és flexibilitásának köszönhetően alkalmazási területe igen széleskörű. Népszerű módszerré vált a sejtvonal modellek fejlesztésénél, betegségek mechanizmusainak feltárásánál, betegség célpontok azonosításánál, transzgenikus növények, génmódosított állatok előállításánál, transzkripció módosításoknál, specifikus genomi lókuszok jelölésénél (Doudna and Charpentier 2014). Génterápiás felhasználásban rejlő potenciálja is egyre nagyobb hangsúlyt kap (Xu and Li 2020, Li et al. 2020, Gao et al. 2020).

A módszer lehetséges felhasználási körét tovább növeli az endonukleáz aktív centrumainak módosításaival előállított, szerkesztett Cas9 alkalmazásának lehetősége. A Cas9 fehérje egyik aktív centrumának (HNH vagy RuvC) mutagenézisével nikáz aktivitású endonukleáz generálható, míg mindkét aktív centrum elrontásával pedig úgynevezett dCas9 (dead Cas9) hozható létre (Jinek et al. 2012). A csak RuvC, vagy csak HNH domén inaktív állapotú Cas9 nikáz a sgRNS-sel együtt egyszálú DNS hasítást eredményez. Ez a tulajdonság nagyobb DNS szakaszok kivágására kiválóan alkalmazható. Ezt az eredményt meghatározott távolságra irányuló mindkét DNS szálra tervezett sgRNS-ek koinjektálásával lehet megvalósítani, melynek eredményeként lépcsős véggel rendelkező DNS szálak keletkeznek bizonyos méretű DNS szakasz kiesése mellett (14. ábra). Ez a hasítási mód a DNS bevitel szempontjából is előnyös, hiszen donor DNS egyidejű bejuttatásával könnyedén előidézhetünk HDR által közvetített beépüléssel történő génbevitelt. A sgRNS-hez kapcsolt endonukleáz aktivitás nélküli dCas9 fehérjéhez

más funkcióval bíró effektor fehérjét is lehet fúzionáltatni, melynek következtében számos, specifikus helyre irányuló alkalmazási lehetőség valósulhat meg, például aktiválás, represszálas, ligandfüggő aktiválás, metilálás (Anzalone et al. 2020).



14. ábra. CRISPR/Cas rendszer nikáz aktivitású Cas9 fehérjével. a. Kizárólag a HNH (Cas9D10A nikáz) vagy RuvC (Cas9H840A nikáz) működése esetén csak egyszálú hasítás keletkezik a DNS molekulán. Így a nikáz aktivitású Cas9 két sgRNS-sel való alkalmazása esetén lépcsős végű DNS hasítás jön létre. b. Az endonukleáz funkció nélküli dCas9-hez kapcsolt effektor molekulával specifikus helyen történő gének aktivációja, leszabályozása, specifikus jelölése, epigenetikai módosítások létrehozása történhet. (Doudna and Charpentier, 2014 alapján)

A CRISPR rendszerhez kapcsolt effektor alapú kutatások témája szerteágazó, például lehetséges endogén fehérjék fluoreszcens jelölése humán pluripotens őssejtekben (Sharma et al. 2018) vagy specifikus bázis szerkesztés élesztőkben (Satomura et al. 2017). A biotechnológiai cégek is alkalmazkodtak a kutatói igényekhez, úgyhogy már kész formában is lehet vásárolni például GFP-vel ellátott Cas9-et, mely a megkönnyítheti a riportergénnel való specifikus jelölési munkákat (Lackner et al. 2015).

Ezzel a módszerrel számos cél elérhetővé vált a különböző biológiai kutatások, orvosi medicina, biotechnológia, mezőgazdaság területén, úgy mint a DNS deléció, inszerció, DNS áthelyeződés, DNS módosítás előidézése, DNS jelölés, transzkripció moduláció, RNS targetálás stb. (Doudna and Charpentier 2014).

Megannyi génmódosított állat (Wang et al. 2015; Guo et al. 2016; Song et al. 2016; He et al. 2018), növény (Miao et al. 2013, Pyott et al. 2016, Belhaj et al. 2015) létrehozása valósulhatott meg e módszer segítségével, illetve a nagy port kavaró humán embrióban történő génmódosításra is sor kerülhetett e technika alkalmazásával (Liang et al. 2015).

A CRISPR/Cas rendszer számos előnye mellett meg kell említeni, hogy - mint minden rendszernek-, akadnak felhasználást korlátozó tulajdonságai. A legvitatottabb kérdés, mint limitáló tényező a specificitás, azaz a nem célzott DNS szakaszon előidézett mutagenézis jelensége, az úgynevezett „off-target” hatás (Cho et al. 2014). Emellett PAM szekvencia igénye is meghatározza specifikus helyre történő tervezésének lehetőségeit (Shah et al. 2013).

2.4. Lentivírus alapú transzgenézis

2.4.1. Lentivírusok általános bemutatása

A lentivírusok a retrovírusok népes családjába tartozó burokkal rendelkező RNS-vírusok. Reverz transzkriptáz enzimük segítségével örökítőanyagukról (RNS) DNS-t szintetizálnak, mely képes a gazdasejt genomjába véletlenszerűen integrálódni. A beépült virális DNS befolyásolja a gazdasejt transzkripció és transzláció folyamatait, fertőzőképes vírusok előállítását idézi elő (Gil-Farina and Schmidt 2016).

A lentivírusok általános felépítése áll egy burokból, ami a gazdasejt membránjából, illetve az *env* gén által kódolt GP41 transzmembrán, és GP120 glikoproteinekből. Ezek a fehérjék felelősek a burok ill. a vírus specificitásáért. A burkon belül megtalálható a *gag* cisztron által kódolt struktúrfehérjékből felépülő kapszid, illetve a *pol* génről íródó vírus specifikus reverz transzkriptáz, integráz és proteáz fehérjék (Spirin et al. 2008). A reverz transzkriptáz enzim felelős az egy-szálú RNS genom duplaszálú DNS-re való fordításáért. A kapszid emellett tartalmaz néhány szabályozó fehérjét, és tRNS-t, ami a provírus átírásában primerként játszik szerepet. A provírus géneit 5' és 3' irányban LTR-ek (Long Terminal Repeat) határolják, melynek ismétlődő szekvenciáiban kapnak helyet a szabályozó elemek (cis-acting elements). Az LTR-ek fontos részei a provírus integrációjához elengedhetetlen ATT ismétlődések, valamint egy enhancer elem és egy promóter egység. Az 5' LTR után található még a PBS (primer binding site) és a Ψ szekvencia, mint lényeges funkcionális szakasz. A Ψ szekvencia a virális RNS dimerizációjáért és a vírus összehasonlítás kezdeti szakaszáért felel. Az utolsó szabályozó elem egy purin-gazdag régió, amely a kiegészítő szál megírásakor játszik szerepet (Spirin et al. 2008). Az összeszerelődött provírus a gazdasejtben funkcionális transzkripció egységként működik, a saját szabályozó szekvenciái segítségével a gazdasejt transzkripció rendszerét használja a vírus fehérjék termeltetésére.

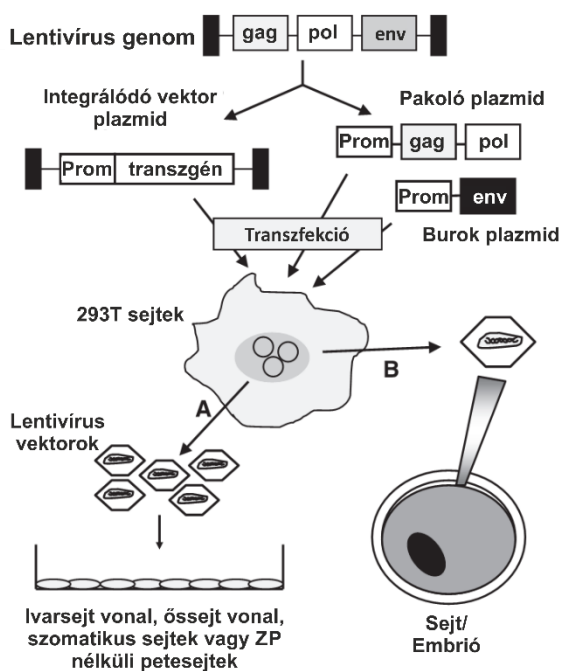
2.4.2. Lentivírusok a biotechnológiában

A lentivírusok gazdasejtbe való bejutásának, és a virális DNS gazdagenomba történő integrálásának képessége teszi lehetővé a rendszer transzgenézisben való alkalmazását, stabil transzgen expresszió létrehozását (Liu and Soper, 2009). A lentivírus vektorok használatával hatékonyan lehet a sejtek, szövetek széles spektrumába (például nem osztódó sejtekbe, őssejtekbe) (Ye et al. 2014) transzgént bejuttatni, és génmódosított sejtvonalakat, élőlényeket előállítani (Hiripi et al. 2010).

A biotechnológiában használatos lentivírus alapú génbeviteli rendszerek három vektorból tevődnek össze: egy olyan plazmidból, mely tartalmazza a vírus LTR régiói közé klónozott, megfelelő promóter mögé épített transzgént, egy összeszerelő plazmidból, mely a vektor összeépítéséhez szükséges fehérjéket kódolja (*gag*, *pol*), és egy burokfehérjét (*env*) kódoló plazmidból (Dull et al. 1998). Az összeszerelő plazmid szekvenciái közül hiányoznak azok a szignálok, amik az új vírusok kialakulását segítik elő. A burokfehérje gén pedig általában egy heterológ vírusból származik: VSV-G (vesicular stomatitis virus G) glikoprotein *env* génje, vagy az MLV (murine leukemia virus) burokfehérje génje. Ezeket a vektorokat ún. összepakoló sejtvonalba ko-transzfectálják, majd az összeállt vírust a sejtekből kitisztítják, titerüket dúsítással beállítják. Az összepakolt vektor a HIV-től eltérő burokfehérje következtében

nem csak T-sejtek, hanem egyéb sejtvonalak, embriók fertőzésére is képes. A lentivírus vektor rendszer bemutatása a 15. ábrán látható.

A transzgenikus állatok előállítása során az így elkészült lentivírusokat az embriók perivitelinális terébe injektálják. A vírus burokfehérjéje felismeri a sejtmembránt, és összeolvad vele,



15. ábra. Lentivírus alapú transzgenézis. A lentivírus génbeviteli rendszer a lentivírus genom szétválasztásával kialakított 3 plazmid vektorból épül fel: az integrálni kívánt DNS-t, szabályozó elemeit és az LTR határoló régiókat tartalmazó vektor plazmidból; a vírus összeszereléséhez szükséges géneket (*gag*, *pol*) kódoló ún. pakoló plazmidból; és a burokfehérje (*env*) genetikai kódját tartalmazó „burok” plazmidból. Sejtvonalba történő transzfectálás, és dúsítás után a kialakított vektorok alkalmasak sejtvonalakba, illetve embriókba való bejutásra. (Park, 2007 alapján)

így a kapszid a citoplazmába jut. A virális RNS a vírus reverz transzkriptáz enzimének segítségével átíródik DNS-sé. A DNS-RNS duplex szétválása után a keletkezett egyszálú DNS kétszálúvá alakul. Ezeket a folyamatokat mind a reverz transzkriptáz segíti elő RNS-függő DNS polimeráz, DNS-függő DNS polimeráz, és RNáz H aktivitása révén. A létrejött DNS szakasz a sejtmagba jut, integrálódik a genomba, majd a szabályozó elemek irányításával, az embrió enzimmézőletének felhasználásával megvalósul a transzgén expressziója.

A lentivírus vektor rendszer a hatékonyságának és biztonságának növelése érdekében sok fejlesztésen ment keresztül (Dull et al. 1998). Megkülönböztethetünk első, második és harmadik generációs lentivírus vektorokat. Az első generációs HIV-1 alapú vektorok minden virális gént tartalmaztak a burokkészlet génjén kívül (Naldini et al. 1996). A második generációs vektorokból már több gén hiányzik, a harmadik generációs lentivírus vektorok pedig már csak a *gag*, *pol* és *rev* géneket kódolják. Megkülönböztethetünk úgynevezett SIN (self-inactivating) vektorokat, ahol a virális enhancer és promóter szekvenciák hiányoznak, vagy deléciókat tartalmaznak, így csökken az onkogének aktivációjának lehetősége (Zufferey et al. 1998). Ezen konstrukciók általában egy konstitutív promótert tartalmaznak, pl. a humán citomegalovírus promótere (CMV) vagy a csirke béta aktin és CMV promóterekből mesterségesen létrehozott CAG promóter (Miyoshi et al. 1998). Lehetőség van szövetspecifikus promóterek alkalmazására is, de ezek a szabályozó elemek nem mindig tesznek lehetővé megfelelő szintű transzgén expressziót, így „erős” promóterek (pl. CAG) használata ajánlott, melyek stabil génkifejeződést biztosítanak.

A három külön plazmid alkalmazása és a plazmidok szekvenciái közötti elenyésző hasonlóság biztosítja a váratlan rekombinációs események alacsony gyakoriságát az összeállítási folyamat során. Az összepakoló sejtvonalban lejátszódó tranziens expresszió eredményként olyan transzfer vektorok jönnek létre, amelyek képesek bejutni osztódó és nem osztódó sejtekbe egyaránt, és ott a meglévő enzimmézőletük segítségével a transzgént képesek integrálni a gazdasejt genomjába (Naldini et al. 1996).

A lentivírusokkal történő transzgenézis az elmúlt évtizedekben számos mezőgazdasági, farmakológiai és humán génterápiás felhasználás során nyújtott segítséget génbeviteli feladatok elvégzéséhez (Hofmann et al. 2003, Spencer et al. 2011, Milone and O’Doherty 2018).

Ez a módszer, mint génbeviteli technika, alkalmas különböző transzgenikus állatok előállítására is. A transzgenézisben történő használatának nagy előnye, hogy a lentivírus partikulumok bejuttatása nem az embrió sejtmagjába történik, hanem a perivitellináris térbe. Ezáltal elkerülhető az embrió injektálással járó esetleges roncsolása (Hiripi et al. 2010).

A rendszer kevésbé előnyös tulajdonsága, hogy a transzgén genomba történő beépülése bizonyos számú sejtosztódás után történik meg, így nem minden sejt tartalmazza az integrálódott

szakaszt. Ennek következtében a transzgén előfordulásában, kifejeződésében egyedenként eltérő mértékű mozaikosságot lehet megfigyelni (Hofmann et al. 2006).

A lentivírus alapú transzgenézis másik hátránya lehet, hogy beépülő génről nem minden esetben expresszólódik fehérje, aminek hátterében a transzkripció, vagy epigenetikai csendesítés folyamata áll (Hino et al. 2004).

Ezen tulajdonságok figyelembevételével, a lentivírus alapú génbeviteli eljárás, még mindig egy ígéretes lehetőség génmódosított élőlények előállítására. Kísérleteink során az extraembrionális szövet-specifikus génexpresszió létrehozásának lehetősége miatt választottuk ezt a módszert placenta-specifikus nyúlmodell előállítására.

Megfigyelték, hogy a blasztociszta stádiumú embriók lentivírus vektorokkal való injektálása során a vírus részecskék csak a trofektoderma sejtekbe jutottak be, a belső sejtcsomó (ICM) sejteibe nem. A trofektoderma sejteiből alakulnak ki az extraembrionális szövetek, a belső sejtcsomóból pedig az embrió szövetei jönnek létre. A lentivírusok ICM-be való bejutását megakadályozva a trofektoderma sejtréteg hatékony barrierként működik, mely lehetővé teszi a trofoblaszt-specifikus génbevitt, a későbbi fejlődési stádiumokban az extraembrionális szövet-specifikus transzgén expressziót (Okada et al. 2007).

2.4.3. Lentivírus vektorokkal történő placenta-specifikus géntranszfer

A placenta metabolizmusában szerepet játszó fehérjéket kódoló gének könnyen vizsgálhatók lentivírus alapú géntranszfer segítségével. A szükséges módszerek számos apró lépésben kerültek kifejlesztésre az évek folyamán, melyek eredményeként a trofoblaszt-specifikus genetikai módosítások lehetősége széles skálán valósulhat meg.

Az első placenta-specifikus génmanipuláció GFP-t tartalmazó lentivírus vektor rézuszmakákó (*Macaca mulatta*) blasztocisztába történő injektálásával történt 2001-ben (Wolfgang et al. 2001). Hasonló kísérletet végeztek egérben, trofektoderma és „leszármazottainak” szelektív lentivírus-transzdukciójával (Malashicheva et al. 2007). A placenta diszfunkciójának és az embrionális letalitás részletesebb megértésére irányuló kutatás alkalmával egérben végrehajtott lentivírus vektorokkal történő trofoblaszt-specifikus géntranszferről számoltak be. Ennek során *Ets2*-, *Mapk14*- és *Mapk1*-hiányos egereket mentettek meg az embrió-letalitástól (Okada et al. 2007). Ezek mind olyan gének, melyek hiányában a placenta nem fejlődik megfelelően, és emiatt a magzat is elpusztul. Ezek a génhibák emberben is hasonló problémákat okoznak. Nemcsak overexpressziót, hanem expresszió csökkenést is sikerült placenta-specifikusan kialakítani. GFP placenta-specifikus leszármazottságát végezték el shRNS (short hairpin RNS, rövid hajtű RNS) konstrukcióval patkányban,

ahol a lentivírus mediált shRNS transzfer hatékonyan változtatta meg a GFP expressziót (Lee et al. 2009). Cre/loxP rendszer alkalmazásával előidézett placenta-specifikus gének aktivációjáról és inaktivációjáról Morioka és munkatársai publikáltak (Morioka et al. 2009). Tetraciklin által előidézett átmenetileg indukálható placenta expressziót 2012-ben írtak le (Fan et al. 2012). A placenta-specifikus génexpresszió nem invazív monitorozása is szintén megoldott speciális műszerek segítségével (Fan et al. 2011).

Az elmúlt évtizedben a nukleáz technológiák széleskörű elterjedését megelőzően, a fentebb említett technikai fejlesztések eredményeként mindennapossá vált gének funkciójának tanulmányozása rágszálókban lentivírus alapú trofoblaszt-specifikus géntranszferrel. Számos publikáció született a témában, például a trofoblaszt sejtek önmegújuló képességét befolyásoló Ets2 gén funkciójának vizsgálatáról, a terhességhez köthető preeclampsia során szerepet játszó anti-angiogén faktorok szerepének tisztázásáról, a Prion és Shadoo fehérjék feladatának tanulmányozásáról eger embrionális fejlődés során, illetve a FOS-szerű antigén-1 placentafejlődésben betöltött szerepének felderítéséről (Odiatis and Georgiades, 2010; Kumasawa et al. 2011; Passet et al. 2012; Zhou et al. 2013; Kubota et al. 2015; Zhang et al. 2015).

A különböző gének placentához köthető szerepének megértésére irányuló vizsgálatok sora szinte végtelen. Amellett, hogy az egyes gének, fehérjék feladatának tisztázásában segíthet a lentivírus alapú trofoblaszt-specifikus géntranszfer, a placenta betegségeinek, rendellenességeinek vizsgálatában is szerepet kaphat. Például a placenta beágyazódási rendellenességeinek, a HELLP (haemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count) szindróma, vagy a preeclampsia (terhességi magas vérnyomás) folyamatainak részletesebb megismerésében lehetne alkalmazni. Laboratóriumunk a placenta működésében szerepet játszó miosztatin feladatának pontosabb megértésére irányulóan kíván lépést tenni, ezért is dolgoztunk ki az extraembrionális szövet-specifikus transzgenbeviteli rendszert nyúlban.

2.5. Mikroinjektálás

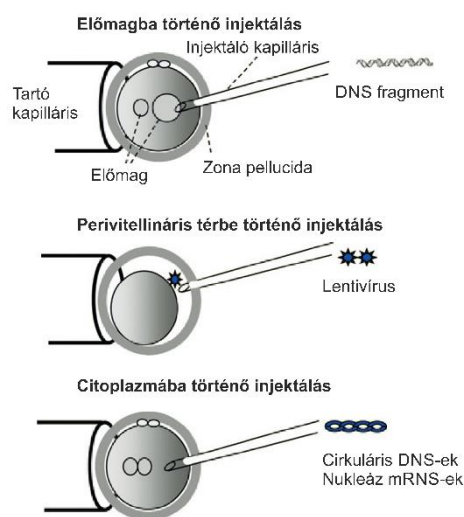
A mikroinjektálás/mikromanipulálás több mint 100 éves múltra tekint vissza. A szükséges eszközök nagy fejlődésen mentek keresztül az évek folyamán, de általánosan elmondhatjuk, hogy a mikroinjektálás elengedhetetlen kellékei a jó minőségű mikroszkóp (interferencia optikával ellátott inverz mikroszkóp), a sejtek megtartására szolgáló tartó-, illetve az injektálandó anyag bejuttatására használt szűrő kapilláris. A kapillárisokhoz kapcsolt manipulátor karok segítik a mikroszkóp alatti pontos manőverezést a sejtekkel, injektálandó oldattal (16. ábra).



16. ábra. Mikromanipuláláshoz szükséges eszközpark. (Hiripi László)

Az első mikromanipulálás M. Barber nevéhez fűződik (1904), aki üveggapilláris pipettával felszívott baktérium sejteket juttatott növényi sejtekbe és protozoonokba juttatott, így vizsgálni tudta a fertőzött szervezetekben lezajló hatásokat. A manapság használt mikromanipulációs/mikroinjektáló technikák kifejlesztése számos lépésen keresztül valósult meg, a továbbiakban csak a legfontosabb mérföldköveket említeném. Az első egér petesejt mikroinjektálása (γ -globulinnal) 1966-ban történt, az első egér blasztociszta injektálásra 1974-ben került sor (Lin 1966, Jaenisch and Mintz 1974). A transzgenézisben legjelentősebb technikák közé sorolhatjuk a pronukleáris mikroinjektálást, melynek során lineáris DNS injektálunk az egysejtes embriók előmagjába. Az első pronukleuszba történő injektálás J. W. Gordon nevéhez fűződik (1980), aki rekombináns plazmidot juttatott egér embriók előmagjába. Következő évben hozták létre az első transzgenikus egeket ezzel a technikával (Costantini and Lacy 1981, Gordon and Ruddle 1981, Brinster et al. 1981). Az első kiméra egerek létrehozása 1987-ben történt, melynek során blasztociszta stádiumú egér embrióba injektáltak pluripotens őssejteket (Thomas and Capecchi 1987). Az *in vitro* fertilizációs eljárások egyik alappilérét az intracitoplazmatikus spermium injektálást (ICSI) 1996-ban fejlesztették ki, melynek során egyetlen spermiumot injektálnak a petesejt citoplazmájába. Ezt abban az esetben alkalmazzák, amikor a spermiumok valamilyen oknál fogva nem tudják megtermékenyíteni a petesejtet (Palermo et al. 1992). A nagy port kavaró első emlős testi sejt klónozásra (SCNT) 1996-ban került sor, melynek során juh petesejtből eltávolították a sejtmagot, és szomatikus sejtet injektáltak a helyére, ennek eredményeként született meg Dolly (Wilmut et al. 1997).

Az állatok transzgenézisének egyik legfontosabb lépése a mikroinjektálás, melynek célja idegen DNS embrióba való bejuttatása. Ennek módja azonban függ az alkalmazott transzgenikus eljárástól (17. ábra). Pronukleusz mikroinjektálással (PNI) lineáris DNS szakaszt juttathatunk az embriók előmagjába, ami passzív módon épülhet be a genomba. Transzpozon alapú génbeviteli rendszer esetén is az előmagba történik a mikroinjektálás. Citoplazmatikus embrió mikroinjektálást (CPI) végzünk nukleáz technikák alkalmazása során, miszerint mRNS formában juttatjuk a genomszerkesztő rendszerek (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas) alkotóelemeit a zigóta citoplazmájába. Az mRNS-ek a riboszómákon fehérjévé transzlálódnak, majd a nukleáris lokalizációs szignál (NLS) segítségével a sejtmagba jutva elvégzik feladatukat. A CPI előnye, hogy az embrió szerkezete kevésbé roncslódik a pronukleáris injektáláshoz képest, így magasabb, mikroinjektálást károsodás nélkül túlélő zigóta arányt érhetünk el vele. A harmadik mód az injektáló oldat perivitellinális térbe történő juttatása, melyet a vírus alapú transzgenikus technikák esetén alkalmazunk. Ez az injektálási mód ronsolja legkevésbé az embriókat, itt csak a virális rendszer jelenthet némi kockázatot a transzgenézisben.



17. ábra. Előmagba történő, perivitellinális térbe történő és citoplazmatikus mikroinjektálás. (Garrels et al. 2012 alapján)

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. TALEN konstrukciók

A genomszerkesztési eljárásoknál elengedhetetlen a megcélzott kivánt szekvenciák pontos ismerete, így munkámat a vizsgálatban résztvevő állatok miosztatin génjén található SNP-k (Single Nucleotide Polymorphism) szűrésével kezdtem. A donor állatok PCR-rel felsokszorozított, megváltoztatni kívánt génszakaszát szekvencia analízissel megvizsgáltam. Szerencsére a kísérleti állataink genetikai állománya nem tartalmazott polimorfizmust a vizsgált szekvenciáknál az adatbankban található referencia genomhoz (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100125998>) képest. A polimorfizmusok ellenőrzéséhez a melléklet 1. táblázatában található primerpárokat használtam.

A kísérletek kezdetekor az akkoriban előtérbe kerülő TALEN módszert kezdtem alkalmazni génkiütött nyulak előállítására. Első megközelítésként a Collectis Bioresearch cégtől rendelt, plazmid formában érkező TALEN párokkal dolgoztam, melyek a házinyúl miosztatin génjének 18. ábrán látható szekvenciáira irányultak. A TALEN célszekvenciák 88 bp távolságra helyezkedtek el egymástól az első exonon. Szekvenciáikat a 18. ábra mutatja be.

640 és 641 jelölésű TALEN párok szekvenciája

ATGCAAAAAGTCAAATCTATGTTTATATTTACCTGTTTATGCTGATCGTGGCTGGCCCAG-TGGATCTAAATGAAAACAGTGAGCAAAAAGAAAATGTGGAAAAGACGGGCT

642 és 643 jelölésű TALEN párok szekvenciája

TGAGCAAAAAGAAAATGTGGAAAAGACGGGCTGTGTAATGCAT-GCACTTGGAGACAAAACAGTAAATATTCAAGAAATAGAACCCATAAAGATTCAAATCCTCAGTAAA

18. ábra. A TALEN konstrukciók elhelyezkedése a miosztatin gén első exonján. *kék*: bal oldali TALEN DNS kötő szekvencia, *piros*: jobb oldali TALEN DNS kötő szekvencia

A megrendelt TALEN párok külön plazmidon helyezkedtek el. Ugyanolyan vektor alapfelépítés mellett (melléklet 1. ábra) a bal egység tartalmazott egy sejtmagi lokalizációs szignált (NLS) és egy HA epitópot, míg a jobb TALEN egység rendelkezett ugyanúgy egy sejtmag lokalizációs szignállal és egy S jelöléssel az N terminális egység elején. A plazmidokat *ScaI* enzimmel hasítottam, majd fenol-kloroformos tisztítást követően mMESSAGING mMACHINE® T7 Transzkripció Készítőkészíték segítségével *in vitro* transzkriptumot készítettem az egyes TALE egységekből. Az elkészült mRNS-eket (messenger/hírvivő RNS) fenol-kloroformos módszerrel tisztítottam, majd injektáló pufferrel hígítottam a kívánt koncentrációra (~20 ng/μl).

Miután ezen gyári konstrukciók alkalmazása nem eredményezett sikeres transzgenézist az *in vivo* kísérletekben, új TALEN párokat terveztem, melyeket magam állítottam össze Golden Gate TALEN and TAL Effector Kit 2.0 (Addgene) segítségével. A konstrukciók tervezéséhez a Cornell University TALEN Targeter felületét használtam (melléklet: Web 1). Az eredményként kiadott lehetőségek közül kiválasztottam két lehetséges szekvenciát, majd Golden Gate TALEN and TAL Effector Kit alkalmazásával a gyártó utasításait (https://www.addgene.org/static/cms/filer_public/98/5a/985a6117-7490-4001-8f6a-24b2cf7b005b/golden_gate_talen_assembly_v7.pdf) követve összeállítottam az embriók mikroinjektálására alkalmas konstrukciókat (melléklet 2. ábra).

Azonban, mire kipróbálásra kerülhettek volna *in vivo* rendszerben az újabb TALEN konstrukciók, egy sokkal hatékonyabb, gyorsabb és biztosabb sikerrel kecsegtető genom szerkesztési módszert fejlesztettek ki a molekuláris biológiában, melyet alkalmam volt megismerni, és összeállítását elsajátítani Prof. Dr. Angelika E. Schnieke laboratóriumában. Ez volt a CRISPR/Cas9 technológia.

3.2. CRISPR/Cas9 konstrukció létrehozása

3.2.1. CRISPR célszekvencia tervezése

A CRISPR RNS tervezés első lépéseként a publikus adatbázisokban (<https://genome.ucsc.edu/>) található nyúl miosztatin gén megcélózni kívánt szekvenciáját a Broad Intézet által ingyenesen elérhető online tervező program (akkoriban egyetlen tervező platform: crispr.mit.edu) megfelelő felületébe illesztettem. A tervező honlap minden pontjának rendeltetészerű kitöltése után, az eredmény "Guides & offtarget" oldalán megjelenő találatok közül kiválasztottam a legkevesebb off-target hellyel rendelkező, legnagyobb GC arányú szekvenciát. A miosztatin gén mindhárom exonjára irányulóan terveztem CRISPR RNS-t, de igyekeztem a gén elejére tervezett célszekvenciákkal dolgozni, hogy minél kisebb eséllyel alakuljon ki csonka mRNS, illetve fehérje a miosztatin génről.

3.2.2. CRISPR mRNS létrehozása

A megtervezett, kiválasztott CRISPR RNS-t egyszálú DNS formában megrendeltem, közvetlenül elé *BbsI* restrikciós enzim által hasított plazmidvéggel komplementer szakaszt, és T7 promóter szekvenciát szintetizáltattam. Ennek ellentétes irányú komplementer párját is elkészítettem (19. ábra). Az oligonukleotidokat TE pufferben feloldottam 100 ng/μl-es koncentrációban, majd ezekből 1-1 μl-t tettem 100 μl TE pufferbe. A hígított, összemért oligonukleotidokat PCR gépben 100 °C-ra hevítettem, majd lassan szobahőmérsékletűre hűtöttem, így rövid, kétszálú DNS-sé tapadtak össze, kialakítva a speciális ragadós végeket.

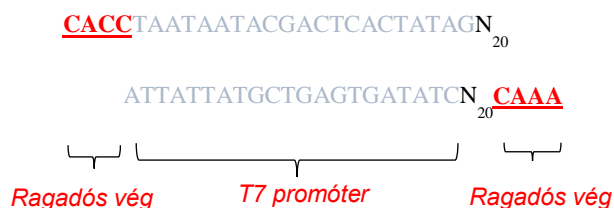
Az előkészített oligonukleotidokat Blue Script vektor alapú „Pbs-U6-chimeric RNA” plazmidba ligáltam (20. ábra), melyet Dr. Tatiana Fli-sikowska által Prof. Dr. Wolfgang Wurst

bocsátott rendelkezésemre (Jinek et al. 2012). Ötven nanogramm előzőleg *BbsI* enzimmal megvá-gott plazmidhoz adtam 4 μl összeillesztett oligonukleotidot, 1,5 μl 10x T4 DNS ligáz puffert, 1,5 μl T4 DNS ligáz enzimet (Fermentas), majd vízzel kiegészítettem 15 μl-re a reakcióelegyet. Egy éjszakán át 16 °C-on inkubáltam.

Az RNS *in vitro* előállításához mMACHINE® T7 Transzkripció Kitet alkalmaztam, ezért volt szükséges a T7 promóter illesztése az U6 promóter és a guideRNS scaffold szekvenciák közé. A vektor már tartalmazta a tracrRNS-t és a crRNS-t a spacer szekvenciák nélkül, így a spacer szekvencia beillesztése után elég volt egy *in vitro* transzkriptumot készítenem.

A szükséges T7 promótert, és a teljes guideRNS-t DNS formában tartalmazó plazmidot DH5 sejtekbe transzformáltam, majd a baktériumokat ampicillint tartalmazó táptalajon tenyész-tettem 37 °C-on overnight.

Kiválasztottam 5 db baktérium telepet, melyből QIAGEN® Plasmid Mini Kit segítségével nyertem ki a felszorosított plazmid DNS-t. A DNS minták koncentrációját NanoDrop® ND-1000 spektrofotométer segítségével megmértem, majd a mintákat megszekvenáltattam (Biomi



19. ábra. A megrendelt oligonukleotidok felépítése: N₂₀: ~20 bp hosszú crRNS szekvencia, és az ehhez kapcsolódó T7 promótert kódoló és *BbsI* restrikciós enzim ragadós véggel rendelkező DNS szakasz, melyet a plazmidba ligálásnál alkalmaztam.



20. ábra. A CRISPR RNS előállítás során létrehozott pBs vektor sematikus felépítése.

Kft.) Sanger módszerrel, a Seq_primer U6 (5'-TTCACCGAGGGCCTATTTCCCATG -3') szekvenáló primerrel. A szekvencia adatokat leellenőrizve kiválasztottam a legtöményebb mintát, ami teljes egészében tartalmazta a guide RNS-t, és a továbbiakban azzal dolgoztam.

A T7 promóter és a guideRNS szekvenciáját kétkörös, kvázi nested PCR segítségével szaporítottam fel a plazmidról. Proofreading aktivitással rendelkező DNS polimerázt (Phusion™ High-Fidelity DNS Polimeráz) használtam a PCR során, amely biztosította a hibák nélküli DNS felsokszorosítást. A PCR első köréhez a melléklet 6. táblázatban látható módon mértem össze a reakcióelegyet és végeztem a beállításokat.

A keletkező PCR terméket 1%-os agaróz gélen futtattam meg, majd a jól látható 274 bp méretű fragmentet kivágtam és QIAquick® Gel Extraction Kittel (Qiagen) tisztítottam a gyártó utasításainak megfelelően.

A kitisztított DNS fragmentet használtam templátként a nested PCR második körében. Az első kör mennyiségi adataihoz hasonlóan mértem össze a reakcióelegyet azzal a különbséggel, hogy templátból 3 µl-t - és ennek megfelelően vízből 32,5 µl-t - tettem a reakcióhoz. A PCR második körének végtermékéből 5 µl-t megfuttattam 1 %-os agaróz gélen, hogy ellenőrizzem a megfelelő méretű DNS fragment meglétét, mennyiségét.

A PCR termék maradék 45 µl-ét Proteináz K-SDS kezelésnek vettem alá (1,4 µl SDS (20%); 5,5 µl Prot. K; 3,1 µl Víz; 50 °C, 1,5 óra). Ezután steril körülmények között fenol-kloroformos precipitációt alkalmaztam a DNS tisztítására: a minta 55 µl-ét vízzel kiegészítettem 300 µl-re, majd 150 µl fenolt és ugyanennyi kloroformot tettem hozzá, alapos összekeverés után 10 percig szobahőmérsékleten hagytam állni. Ezt követően 10 percig 13 000 rpm-en centrifugáltam, a felülúszót új csőbe pipettáztam át, 5 µl nátrium-acetátot és 100 µl 100% alkoholt adtam hozzá, majd óvatos összeforgatás után 30 percig -20 °C-on helyeztem el. Az inkubálási idő letelte után maximális sebességgel 4 °C-on 5 percig centrifugáltam a mintát, hogy a kicsapódott pellet a cső aljára tapadjon. A felülúszót eltávolítottam, a pelletet beszárítottam, és végül 20 µl vízbe reszuszpendáltam a DNS-t.

A következő lépésben a gyártó utasításait követve mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription Kit (Ambion) segítségével állítottam elő a tisztított DNS mintából *in vitro* transzkriptumot. Az elkészült RNS-t tartalmazó mintát fenol-kloroformos módszerrel tisztítottam és izopropanollal precipitáltam. Az így elkészült, kitisztított RNS mintát ellenőrzés céljából 1,5%-os agaróz gélen megfuttattam, koncentrációját megmértem, és további felhasználásig -70 °C-on tároltam.

3.2.3. Az injektáló oldat összeállítása

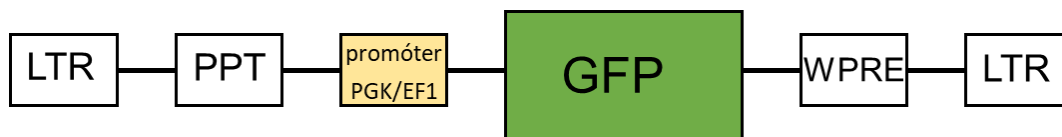
A különböző CRISPR RNS szekvenciákat gyári, sejtmagi lokalizációs szignállal ellátott Cas9 mRNS oldattal (Sigma Aldrich, CAS9MRNA-1EA) kevertem össze, és mikroinjektáló pufferral (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 0,25 mM EDTA) hígítottam a kívánt koncentrációra, melyet NanoDrop® segítségével ellenőriztem. Az egyes konstrukciókat többféle koncentrációjú összeállításban próbáltam ki, melyek összefoglalója 2. táblázatban látható.

2. táblázat: Az embriókba koinjektált sgRNS és Cas9 mRNS koncentrációk összeállítása

| sgRNS koncentráció (ng/μl) | Cas9 mRNS koncentráció (ng/μl) |
|---------------------------------------|---|
| 6-7 | 55 |
| 6-7 | 150 |
| 15 | 150 |

3.3. Lentivírus konstrukciók

Az GFP riportergén bejuttatását 3. generációs HIV alapú lentivírus transzgenézissel végeztük. A lentivírus szekvenciákat 3 plazmid konstrukció kódolta. Az ún. „burok” plazmid a vírus burokfehérjének szekvenciáját tartalmazta, mely a VSV-G (vesicular stomatitis virus G-protein) volt. A pakoló plazmid konstrukció a lentivírus vektor összeszerelődéséhez szükséges összes enzimikus és strukturális elemet kódolta. A transzfer plazmid pedig az LTR szekvenciával ellátott GFP riportergént hordozta általánosan, minden sejtben működő EF1 vagy PGK promóter mögé építve. A transzfer konstrukció tartalmazott egy központi polipurin elemet a sejtmagba irányuló transzport növelésére, és egy WPRE (Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional responsive element) egységet az mRNS féléletidejének meghosszabítására. A lentivírus vektor sematikus felépítése a 21. ábrán látható.



21. ábra. A felhasznált integrálódó vektor plazmid felépítése. Áll a két külső LTR szekvenciából, ahol szabályozó elemek helyezkednek el, egy polipurin (PPT) elemből, ami a sejtmagba történő transzportot segíti elő. Továbbá tartalmaz általános promóter (PGK v. EF1) vezérelt zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) és egy WPRE elemet a féléletidő hosszabítása érdekében.

A lentivírus plazmidok előállítása Kvell és munkatársai által leírt módon történt, a PTE ÁOK Immunológiai és Biotechnológiai Intézetében (Kvell et al. 2005). A lentivírus konstrukciók DMEM-ben történő reszuszpendálása után, a vírus partikulumok titrálása HeLa sejtek segítségével zajlott. Az ultracentrifugálással végzett dúsítás már intézetünkben történt, a vírus titer elérte a 10^8 TU/ml-t.

3.4. Transzgénikus nyúl előállítás

A transzgénikus nyúlvonalak létrehozásánál a TALEN és a CRISPR/Cas9 módszer esetében Hycote hibrid húsnyúllal, és gyors izomtömeg növekedésre szelektált Pannon fehér nyúlfajtával dolgoztam. A lentivírus alapú kísérleteket Ú-zélandi fehér nyúlfajtán végeztem. Az állatkísérletek szabályozásáról szóló 40/2013-as kormányrendelet betartása mellett a MATE Genetika és Biotechnológia Intézetének épületében található konvencionális állatházban kerültek elhelyezésre az állatok. Egyedi ketreces tartás mellett, 18 ± 3 °C hőmérsékletet, 12 óra megvilágítást, *ad libitum* takarmányozást, és folyamatos ivóvíz ellátást biztosítottunk számukra. A nyulakkal történő kísérleteket a megfelelő állatkísérleti engedélyek (Eng. szám: PEI/001/329-4/2013) birtokában végeztem el.

3.4.1. Szuperovuláltatás és embriókinyerés

A legalább 18 hetes, körülbelül 3,5 kg testtömegű embriódonor nőtény nyulak ivarzásának indukálására 120 nemzetközi egység PMSG (pregnant mare serum gonadotropin, Folligon, Intervet International B.V., Holland) injekciót alkalmaztam, melyet intramuszkulárisan juttattam az állatokba. Az ovuláció kiváltásának elősegítésére a PMSG kezelés után 72 óra elteltével 180 nemzetközi egység hCG-t (human chorion gonadotropin, Choragon, Ferring GmbH) fecskendeztem a nőtény nyulak fülvénájába. A hCG beadását követően 10 percen belül mesterségesen termékenyítettem a nőtény nyulakat Hycote és Pannon fehér hím frissen vett, hígítatlan spermájával. A szuperovuláltatási protokollnak köszönhetően megnövekedett embriószámot figyelhettem meg, egyes esetekben több mint 60 embriót sikerült egyetlen nőtény állatból kinyerni.

A termékenyítést követő napon a nőtények petevezetőjét eltávolítottam. A petevezetőt ki-preparáltam, a zigótákat 20% FCS-sel (fetal calf serum, Invitrogen) kiegészített PBS médiummal történő petevezető atmoszással nyertem ki.

Az embrió mikroinjektálásig a zigótákat PBS-FCS médiumban tartottam, és termosztátban ($38,5^\circ\text{C}$ -on, 5% CO_2) helyeztem el. A médium cseppet ásványi olajjal (Mineral oil, Sigma) fedtem le, hogy elkerüljem a párolgás következtében fellépő koncentrációváltozást.

3.4.2. Embrió mikroinjektálás

Az embrió manipuláláshoz Narishige mikromanipulátor karokkal ellátott inverz Olympus mikroszkópot használtam. A bal oldali manipulátor karhoz a tartó kapillárist (Harvard Apparatus, GC-100T-15) csatlakoztattam, a jobb oldali karral az injektáló-, vagy szűrő kapillárist (Harvard Apparatus, GC-100TF-15) tudtam irányítani. Az injektáló kapilláris elkészítéséhez Sutter Instrument Co., Model-97 típusú mikropipetta húzó berendezést használtam a következő beállítási paraméterekkel: "heat: 600, pull: 200, velocity: 130, time: 180". Ezek a beállítások lehetővé tették, hogy olyan szűrő kapillárist készítek, amely alkalmas egysejtes állapotban lévő nyúl embriók nagyobb károsítás nélküli mikroinjektálására. A tartó kapilláris előállításához az üveggapillárist gázégő lángjában melegítve a kívánt átmérőjűre és hosszúságúra húztam, majd mikrohuta (Narishige) segítségével elkészítettem a kívánt formájú kapilláris véget, ami alkalmas az embriók megtartására. Mélyített tárgylemezre cseppentett ásványi olaj alatti 30 µl PBS-FCS médiumban (PBS 20% FCS kiegészítéssel) történt az embriók manipulálása. A mikromanipulálást csak egészségesnek tűnő embriókon végeztem, az embriók állapotát szemrevételezéssel állapítottam meg.

Igyekeztem a lehető legkevesebb idő alatt elvégezni a néhány pikoliter mennyiségű CRISPR RNS és Cas9 mRNS elegy citoplazmába injektálását, hogy a zigóták ne szenvedjenek károsodást az erős megvilágítástól és a nem optimális hőmérséklettől. A mikroinjektált zigótákat az embriótranszfer idejéig PBS-FCS médiumban helyeztem vissza a termosztátba.

A CRISPR/Cas rendszer egyik nagy előnye, hogy nem igényli a sejtmagba történő mikroinjektálást, hiszen az mRNS formában bejuttatott Cas9 komponens a citoplazma és az endoplazmatikus retikulum riboszómáin transzlálódik fehérjévé, és a guideRNS-sel összekapcsolódva önállóan jut a citoplazmából a sejtmagba, mivel tartalmaz sejtmagi lokalizációs szignált. A citoplazma mikroinjektálásnak köszönhetően amellett, hogy kevesebb sejtroncsolással tudjuk a mikroinjektálást kivitelezni, nincs szükség az embrió előmagjainak jól látható elhatárolódására, így kevésbé "áttetsző" embriók esetén is végezhető mikroinjektálás (22. ábra).



22. ábra. Embrió mikroinjektálás
(Bender Balázs)

A lentivírussal történő embrió mikroinjektálás a következőkben tér el az előzőekben bemutatott rendszerhez képest. A donor nőstények szuperovuláltatását követően 44-46 órával történt a 8-16 sejtes stádiumban lévő embriók kimosása.

A lentivírus részecskék 200-500 pikoliterét ezen 8-16 sejtes embriók perivitellináris terébe injektáltuk. Az embriókat az embrió transzferig termosztátban (38,5 C° hőmérséklet, 5% CO₂ tartalom és 85% relatív páratartalom) RDH médiumban tartottuk (Jin et al. 2000).

3.4.3. Embriótranszfer

A különböző technológiákkal mikroinjektált nyúl embriókat álvemhes nőtények petevezetőjébe juttattam laparoszkópos technikával. A nukleáz módszerek esetében a recipiens nőtényeket az embriótranszfer megelőző napon injekcióval kezeltem intramuszkulárisan. Az állatokat 0,4 ml Xilazin (CP-Xilazin 2% inj A.U.V., CpPharma Handelsges. GmbH) és 0,6 ml Zoletil (Virbac) oldat segítségével bódítottam el a műtéthez. Az anesztézia állapotába került állatokból eltávolítottam a vizeletet, majd lenyírtam a szőrt a leendő műtéti területről. A műtéti alanyokat függőleges pozícióban rögzítettem, majd a szőrtelenített hasi rész fertőtlenítését követően 2-3 cm-es bemetszést ejtettem a köldök tájéktól kb. 1-2 cm-re poszterior irányban. A bőr bemetszésén át Veress-féle kanül segítségével apró nyílást ejtettem a hasfalon, amin keresztül levegőt juttattam a hasüregbe, hogy a trokár beillesztésénél elkerüljem a belső szervek sérülését. A trokár hüvelyébe helyeztem az optikát, és megszámloltam a petefészken az ovulációs helyek számát, hogy következtetni tudjak a nőtény ivarzási állapotára. A petevezető infundibulum részébe vezettem a hasfalon keresztül laterális irányból bejuttatott vénás kanült (Introcan-Safety IV Catheter W, BBraun). Miután meggyőződtem róla, hogy a kanül ténylegesen a petevezető kezdeti szakaszában helyezkedik el, a kanül tűjét embriókkal teli kapillárisra (Brand, 701902) cseréltem ki. Az embriókat PBS-FCS médiumban juttattam a petevezetőbe, buborékokkal ellenőrizve az embriók tényleges bejutását. Az álvemhes nőtények mindkét petevezetőjébe végeztem embriótranszfer, átlagosan 8-10 mikromanipulálást túlélő embrió került egy-egy oldalra. Az optikát, trokárt és a véna kanült eltávolítottam a hasüregben lévő levegővel együtt, majd végül antibiotikus injekciót követően 7,5 mm-es sebkapoccsal (Kruuse, 151905) zártam a bőrön ejtett vágást.

A lentivírus alapú kísérleteknél a recipiens nőtények hormonális kezelése 12 órával később, aszinkronban történt a donor állatokhoz képest 0,3 ml GnRH analóg (Receptal, MSD-Intervet) intramuszkuláris beadásával. Az embriótranszfer során 6-8 embrió került a recipiens nőtények egyes petevezetőibe. A vemhességnek a 14,5 napon vetettünk véget, amikor is a magzatok és az extraembrionális szövetek analízise kezdődött.

3.5. A módosított szervezetek vizsgálata

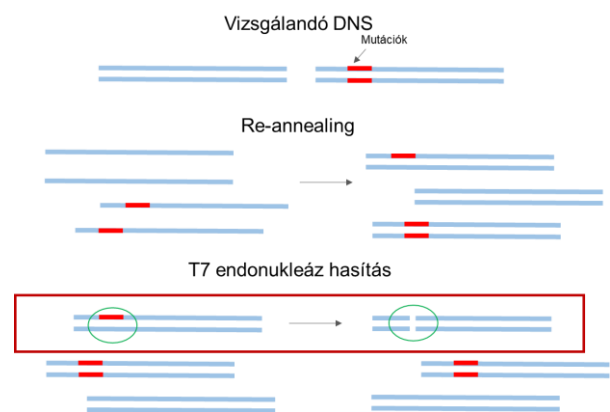
3.5.1. A TALEN és CRISPR mRNS működésének tesztelése embriókon

A TALEN technológia embriókon való tesztelését az embriótranszferrel párhuzamosan végeztem. A különböző célszekvenciákkal rendelkező CRISPR konstrukciók hatékonyságát először embriókon vizsgáltam, majd azt követően történt az embriók visszajuttatása álvemhes nőstényekbe.

A petevezetéből kimosott egysejtes embriók citoplazmájába mikroinjektáltam a különböző target helyekre irányuló konstrukciókat a 3.4.2. fejezetben leírt módon, majd RDH médiumban *in vitro* körülmények között morula/blasztociszta stádiumig tenyésztettem őket. A zona pellucidából még ki nem bújt embriókat összegyűjtöttem, majd a sikerebb DNS izolálás érdekében 26G-s tűvel a "fénylő réteget" (zona pellucida) szétroncsoltam. Az embriókból történő DNS kinyerését egyrészt NucleoSpin Tissue[®] XS (Macherey-Nagel) kit segítségével végeztem a gyártó utasításait követve, másrészt fagyasztásos-felolvasztásos módszerrel tettem a DNS-t a PCR enzimek számára könnyebben elérhetővé.

A TALEN rendszer embriókban történő vizsgálatához felhasznált PCR primerek a melléklet 1. táblázatában, a CRISPR/Cas9 módszerhez tartozó PCR oligók a melléklet 2. táblázatában találhatóak.

A PCR-rel felszaporított DNS minták közül T7 endonukleáz assay segítségével válogattam ki a módosítást tartalmazó fragmenteket. A T7 endonukleáz enzim felismeri és elhasítja a nem tökéletesen komplementer DNS szálakat. A folyamat során re-annellált minták olyan kettős szálú DNS-t tartalmaznak, melynek egyik szála normál szekvenciával rendelkezik, másik szála mutációt tartalmaz, így a két szál összeillesztése nem tökéletes. Ezt az összeillesztési „hibát” ismeri fel a T7 endonukleáz, és ott végzi a DNS hasítását (23. ábra). Heterozigóta élőlények mintáinál adott a kétféle DNS szál megléte, míg a homozigóták kiszűrésére irányuló vizsgálatoknál a mintához kontroll DNS hozzáadása szükséges.



23. ábra. A T7endonukleáz működése. A vizsgálni kívánt DNS szálaiból a re-annealing folyamán mismatchet tartalmazó kettős szálak is keletkeznek, amit a T7 enzim felismer és elhasít, így azonosíthatjuk a mutációkat tartalmazó mintákat.

A PCR termék 7,5 µl-ét felmelegítettem 95 °C-ra, hogy a DNS két szála elváljon egymástól, majd hagytam a mintákat lassan szobahőmérsékletűre hűlni. Az így re-annelált mintákhoz 1 µl NEB 2 puffert, 0,15 µl T7 endonukleáz enzimet, és 1,35 µl vizet adtam. A reakcióelegyet 1 órán keresztül 37 °C-on inkubáltam, majd 3 % agaróz gélen (TAE) futtattam meg, hogy a hasított fragmentek is jól kivethetők legyenek. Azok a minták, melyek a PCR terméken kívül a megfelelő méretű hasított DNS szakaszokat is tartalmazták, nagy valószínűséggel a CRISPR célhelyen valamilyen módosulással rendelkeztek. Ezeket a mintákat megszekvenáltattam (Biomi Kft.), hogy biztos legyenek a mutációk jelenlétében, és azonosítsam a létrejött inszerciákat, deléciókat.

3.5.2. Az alapító egyedek azonosítása

A TALEN és CRISPR/Cas9 módszerrel végzett kísérletek esetében az embriótranszfert követő 30-31 napon vártam az utódok megszületését, majd 1 hetes korban szövetmintát vettem a fülükből. A mintavételezés egyben az állatok egyedi megjelölését is szolgálja. Ebből adódik az egyes egyedek elnevezése is, mely arra utal, hogy az állat fülének mely részéből történt a mintavétel. Például JT (= jobb teteje), esetében a nyúl jobb fülének tetején vágtam le egy apró darabot, melynek hiánya később is észrevehető. További elnevezések dekódolása (a teljesség igénye nélkül): BT= bal teteje, JKK=jobb kívül közepén, BBK=bal belül közepén, JTBT= jobb teteje, bal teteje egyaránt. A kísérletekben szereplő fontos állatokat tíz hetes koruktól szám alapú tetoválással is ellátjuk, de a vizsgálataimban szereplő alapító állatok dolgozatban használt elnevezése a mintavételezésből adódó jelölés maradt fajtájukra vonatkozó kiegészítéssel (5BKK.PF: 5 bal kívül közép.Pannon fehér; 8BKK.H: 8 bal kívül közép, Hycle).

A genomi DNS izolálását fenol-kloroformos extrakcióval végeztem, a szövetmintát 600 µl lízis pufferbe helyeztem és 6 µl Proetináz K (10 mg/ml) hozzáadásával egy éjszakán át emésztettem. A megemésztett szövetmintához 300-300 µl fenolt és kloroformot adtam, majd maximális sebességen 5 percig centrifugáltam. Vágott hegyű pipetta segítségével a DNS-t tartalmazó felülúszót új csőbe helyeztem (kb. 500 µl), majd ugyanannyi térfogatú izopropanollal csaptam ki. Az 5 perces centrifugálást követően a felülúszót leöntöttem, és a pelletet 75 %-os etanollal mostam. A megszáradt pelletet a méretétől függően 50-150 µl vízben oldottam vissza. A minták DNS koncentrációjának mérését követően, a megfelelő DNS szakaszt PCR segítségével szaporítottam fel majd T7 endonukleáz assay használatával szűrtem ki a mutációt tartalmazó mintákat/egyedeket. TALEN esetében a melléklet 1. táblázatában található primerekkel dolgoztam, míg a CRISPR/Cas9 alapú kísérleteknél a melléklet 3. táblázatában látható PCR primereket használtam.

3.5.3. A génmódosított utódok fenotípusos jellemzése

3.5.3.1. Testtömeg változás összehasonlítás

A megszülető utódok testtömegváltozását az alapítók esetében 4 és 5 hetes koruktól kezdve követtem nyomon, a további tenyésztés során 1 hetes kortól mértem a testtömegüket elkerülve a korai háborgatás utódgondozásra gyakorolt káros hatását. A további méréseket kéthetente végeztem, majd az adatokat RCommander program segítségével kétmintás t-próbával hasonlítottam össze.

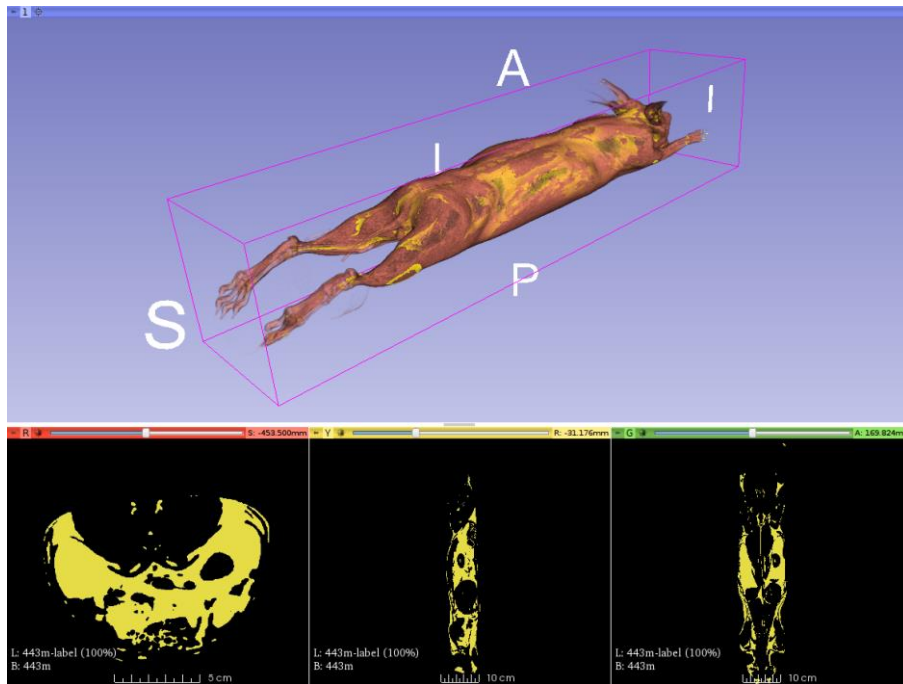
3.5.3.2. Metszetek készítése

A kísérletre kijelölt állatokból különböző izomszöveteket (combizom : *rectus femoris*, *biceps femoris*, szívizom, nyelv, rekeszizom) metszettem ki, melyeket 4%-os PFA-ba tettem. 24 óra elteltével szukrózban történő óvatos mosás után 30%-os szukróz-PBS (Fluka) oldatba helyeztem a szövetdarabokat. A legalább 24 órát 30%-os szukrózban álló szöveteket Shandon™ Cryomatrix™ gyantába ágyazva folyékony nitrogén fölé tettem.

Az így beágyazott, megfagyott mintákból kriosztát (Microm HM 500OM Cryostat Microtome) segítségével 7 µm vastagságú metszeteket készítettem, melyeket Superfrost™ Ultra Plus tárgylemezre helyeztem. A mintákat szobahőmérsékleten szárítottam, majd hematoxin-eozin (Mayer féle, Carl Roth) festéssel tettem láthatóvá az izomsejteket, sejtmagokat.

3.5.3.3. CT (komputertomográfia) vizsgálatok

A Kaposvári Egyetemmél közreműködve a miosztatin mutáns nyulakat és vad típusú alomtársaikat CT vizsgálatnak vetettük alá (Siemens Definition Flash Dual Source, Siemens Somatom Emotion 6), hogy jobb rálátást kapjunk a miosztatin mutációval rendelkező nyulak zsír-izom arányáról, izomfelépítési változásairól. Az állatokat Zoletil és Xilazin (3:2 arányú) keverékkel bódítottam el, majd a CT készülékkel kompatibilis rögzítő berendezésbe helyeztem el az állatokat. Az elbódított, rögzített állatok kerültek a CT berendezésbe, így a készülék nagy biztonsággal tudta elkészíteni a felvételeket, majd ezekből a számításokat. A következő ábrán látható a CT felvétel megjelenítési módja (24. ábra).



24. ábra. Komputertomográfia vizsgálati megjelenítése. Felső kép: A nyúl piros színnel jelölt részei az izomzatot mutatják, sárga színnel a zsírszövet jelenik meg. A betűk, az irányokat jelölik. (A: anterior, P: posterior, S: superior, I: inferior). Alsó sor: Az állat elülső, bal oldali és ventrális irányból megjelenített zsírszöveve.

3.5.4. A génmódosított utódok molekuláris jellemzése

3.5.4.1. RNS izolálás

A mutációval rendelkező és a kontroll nyulakból a miosztatin RNS szintű különbségeinek vizsgálatához először RNS-t izoláltam a különböző izomszövetekből, egyrészt RNAzol®RT segítségével a gyártó utasításait követve. Másrészt ISOLATE II RNA Mini Kit (Bioline) használatával is végeztem RNS izolálást, melyet szintén a gyártó utasításait figyelembe véve végeztem. Az RNS minták koncentrációját spektrofotométerrel határoztam meg.

3.5.4.2. RT-PCR

A vad típusú, illetve a miosztatin mutációt hordozó nyulakból izolált RNS mintákat 50 ng/μl-es koncentrációjúra hígítottam, majd Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit használatával cDNS-t (komplementer DNS) írtam ezen RNS-ekből. Az alkalmazott PCR program paramétereinek beállítása a gyártó utasításai szerint történt. Az elkészült cDNS-ek meglétét, hozzávetőleges mennyiségét, méretét 1%-os agaróz gélen megfuttatva ellenőriztem.

3.5.4.3. qPCR

Az állatok miosztatin szintjének expressziós vizsgálatát kvantitatív PCR-rel, Rotor Gene RG-3000 készülékkel végeztem. A reakcióelegyet a melléklet 7. táblázatban található módon mértem össze, melyhez 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus-t alkalmaztam. A qMSTNfor elnevezésű forward primer az első exon 3' végéhez közel, a reverz primer a CRISPR/Cas9 hasítási helytől 45 bp távolságra 5' irányban helyezkedik el a második exonon. A felhasznált cDNS-t az előző bekezdésben leírt módon állítottam elő. Endogén kontrollnak a nyúl HPRT génjét használtam. Az adatok kiértékelését a készülék saját szoftverével végeztem, a minták relatív expresszióját $\Delta\Delta CT$ összehasonlító módszerrel állapítottam meg.

3.5.4.4. Off-target analízis

A genom szerkesztés specifikusságát a prediktált off-target helyeken történő változások ellenőrzésével kívántuk alátámasztani. Amellett, hogy igyekeztünk a crRNS-ek tervezése során a crispr.mit.edu által javasolt szekvenciák közül a legkevesebb, és nem ismert génen elhelyezkedő off-target hatással rendelkezőket kiválasztani, az alapító egyedeink lehetséges off-target szekvenciáit is megvizsgáltuk mutációk jelenlétére. BLAST segítségével kiválogattuk a CRISPR2 célszekvenciájához leghasonlóbb első kilenc találatot. Primereket terveztünk az adott szakaszokra, majd PCR segítségével felsokszorosítottuk a vizsgálandó fragmenteket és megszekvenáltattunk őket. A vizsgált off-target szekvenciák a melléklet 4 táblázatában láthatók, a felhasznált primerek listája a melléklet 5. táblázatában található.

Az off-target vizsgálat idején még nem állt rendelkezésünkre a CRISPOR, illetve COSMID program (Cradick et al. 2014), mely manapság nagy segítséget jelent az off-target helyek keresésében. Ezért alkalmaztuk az nBLAST alapú predikciót.

3.5.5. Transzgenikus nyúl vonal létrehozása és fenntartása

Az alapító egyedek szaporítását 2016 márciusában kezdtem meg, melynek fő célja homozigóta egyedek létrehozása volt. A 8BKK.H füljelölésű hímtől nyert spermával mesterségesen termékenyítettem kontroll nőtényeket. Az 5BKK.PF jelöléssel ellátott nőtény alapítót a tenyésztérettség elérése után kontroll hímekkel termékenyítettem mesterségesen. A következő generációban megjelenő heterozigóta állatokat egymással pároztattam, így az F2 generációban már várhattam homozigóta állatok megjelenését. A megszülető utódok genotipizálása az alapító egyedek PCR alapú azonosításával megegyező módon történt.

3.5.5.1. Sperma fagyasztás

A miosztatin hiányos nyúl vonal fenntartásának elősegítésére, génmegőrzésére a hímeiktől spermát fagyasztottunk, melyet az alábbi protokoll alapján végeztünk: kétszeres mennyiségű M1 oldatot (10 ml Weize-Tris, 1,2 ml DMSO, 2 ml tojássárgája) tettünk a frissen nyert ondóhoz, majd 1,5 óra 4 °C-on történő inkubálás után előre lehűtött egyszeres mennyiségű (a friss sperma mennyiségéhez viszonyítva) M2 oldatot (10 ml Weize-Tris, 0,5 ml glicerol, 2 ml tojássárgája) adtunk a mintákhoz. Öt-tíz perc inkubációs időt követően a mintákat műszalmába (0,5 ml-es, francia típusú) töltöttük, majd PVA-val (polivinil-alkohol) lezártuk és 15-20 percig pihentettük 4 °C-on. Ezután a műszalmákat 10 percre folyékony nitrogén gőzbe helyeztük (4 cm magasságban), végül folyékony nitrogénbe merítettük, és folyékony nitrogén konténerben tároltuk -196 °C-on.

3.5.6. Lentivírus alapú transzgenézis detektálása szövetekben

A genomi DNS izolálás (Laird et al. 1991) után PCR (3. táblázat) segítségével ellenőriztük a transzgen beépülését. A keletkező fragment meglétét 1%-os agaróz gélen detektáltuk.

3. táblázat: A GFP embrionális- és extraembrionális szövetekben való azonosítására használt PCR program

| PCR reakcióelegy hozzávalói | | PCR program | | |
|-----------------------------|-------------------------------------|-------------|-------------------------------|------|
| megnevezés | mennyiség | hőmérséklet | időtartam | |
| DNS | 1 µl | 95 °C | 5 p | 30 x |
| RED Taq Ready Mix | 6 µl | 95 °C | 30 mp | |
| GFP1 primer (10 µM) | 0,5 µl | 60 °C | 30 mp | |
| GFP2 primer (10 µM) | 0,5 µl | 72 °C | 30 mp | |
| Víz | 5 µl | 72 °C | 5 p | |
| primerek megnevezése | primerek szekvenciája | 4 °C | végtelen | |
| GFP1 for | 5' - GTACAAAATACGTGACGTAGAAAAG - 3' | | | |
| GFP2 rev | 5' - AAAAAAGCACCGACTCGGTG - 3' | | fragment méret: 448 bp | |

3.5.6.1. Expresszió analízis RT PCR-rel

A 14 és fél napos magzat, placenta és szikzacskó mintákból RNeasyH Plus Mini Kit (Qiagen GmbH, Németország) segítségével izoláltunk totál RNS-t. High Capacity cDNA Reverz Transzkripció Kit alkalmazásával szintetizáltunk cDNA-t a gyártó utasításainak megfelelően. Az előző bekezdésben leírt PCR folyamat segítségével ellenőriztük a riportergén cDNA-ének meglétét.

3.5.6.2. GFP detektálás, és in vivo fluoreszcens képalkotás

A nedves szövetek analízise GFSP-5 fluoreszcens egység (BLS Kft., Budapest) használatával történt. Az embriók, magzatok, placenták és szikzacskók fluoreszcens képeit MAA-03/B fényforrást használó Olympus SZH Sztereo Zoom mikroszkóp (BLS Kft., Budapest) segítségével készítettük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Kísérletek TALEN módszerrel

Első megközelítésként TALEN technológiával igyekeztünk mutagenézist indukálni a házinyúl miosztatin génjén. A megtervezett TALEN párokat megrendeltük (640-641; 642-643 néven), majd 20 ng/μl-es koncentrációban nyúl zigóták sejtmagjába injektáltuk. Az embriók egy részét visszajuttattuk recipiens nőtényekbe, másik részét *in vitro* körülmények között tenyésztettük tovább blasztociszta stádiumig. Ezek eredményét az 4. táblázatban összesítettem.

4. táblázat: Összefoglaló a TALEN párokkal injektált embriók visszaültetésének eredményéről

| Recipiens neve | TALEN párok jelzése | visszaültetett embriók száma (db) | élve született utódok száma (db) | elpusztult utódok száma (db) | transzgénikus utódok száma (db) |
|-----------------|---------------------|-----------------------------------|----------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| MIO1 | 640-641 | 20 | 3 | 0 | 0 |
| MIO | 640-641 | 16 | 0 | 0 | 0 |
| MIO3 | 640-641 | 9 | 4 | 0 | 0 |
| MIO4 | 640-641; 642-643 | 10 | 0 | 2 | 0 |
| MIO5 | 640-641; 642-643 | 20 | 0 | 1 | 0 |
| MIO6 | 640-641; 642-643 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| MIO7 | 640-641; 642-643 | 16 | 0 | 2 | 0 |
| MIO8 | 640-641; 642-643 | 8 | 0 | 1 | 0 |
| MIO9 | 640-641; 642-643 | 15 | 0 | 3 | 0 |
| MIO10 | 640-641; 642-643 | 8 | 0 | 2 | 0 |
| Összesen | | 132 | 8 | 10 | 0 |
| <i>in vitro</i> | 640-641 | 5 | | | 0 |
| <i>in vitro</i> | 640-641; 642-643 | 13 | | | 0 |

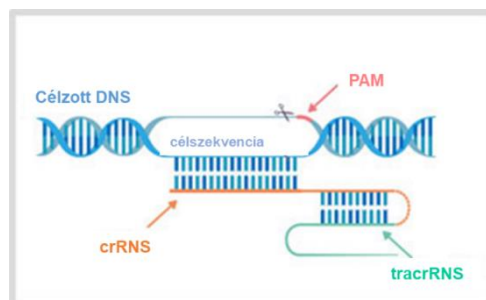
Sajnos nem sikerült transzgénikus állatot előállítani ezzel a technikával. Ennek miertjét nem tudjuk pontosan, de jól látszik a 4. táblázatban is, hogy a megszülető utódok száma jóval kevesebb volt a laboratóriumunkban megszokott embriótranszferből születő utódok számánál (6-8 utód). A megszülető 18 utódból így kisebb valószínűséggel azonosíthatnánk volna transzgénikus állatot, mint normál utódszámok esetén.

4.2 CRISPR/Cas9 rendszer mediálta genomszerkesztés nyúlban

4.2.1. CRISPR/Cas9 tesztelés nyúl embriókon

A különböző CRISPR konstrukciók hatékonyságának meghatározására embrió tesztet végeztünk, melynek során egysejtes nyúl embriókat mikroinjektáltunk az egyes konstrukciókkal. A CRISPR rendszer optimális összetételének meghatározására az injektáló oldat tesztelése embriókon különböző koncentrációkban történt. Ezt követően a blasztociszta stádiumig tenyésztett embriók örökítőanyagából PCR segítségével felszaporítottuk a vizsgálni kívánt célszekvenciát és T7 endonukleáz assay segítségével detektáltuk a mutációkat tartalmazó mintákat.

| Konstrukciók elnevezése | célszekvenciák |
|-------------------------|------------------------------|
| 1. CRISPR1.A | 5'- CTGTTTATGCTGATCGTGGC -3' |
| 2. CRISPR1.B | 3'- GTTATGCTGATCGTGGC -5' |
| 3. CRISPR1 | 5'- AAAGCTCCTCCACTCCGGGA -3' |
| 4. CRISPR2 | 5'- ATGAAAGACGGTACAAGG- 3' |
| 5. CRISPR2.A | 3'- TAGGTTTGATGAGCCTC- 5' |
| 6. CRISPR3 | 3'- TGTATCTCTTGGGCGCAAT -5' |



25. ábra. A nyúl miosztatin génjére tervezett sgRNS-ekhez tartozó célszekvenciák.

Először a 25. ábrán látható, a miosztatin gén első exonjára tervezett CRISPR1.A és CRISPR1.B konstrukciókkal dolgoztunk, melyeket következő koncentrációkban injektáltunk embriók citoplazmájába. CRISPR1.A: 55 ng/μl Cas9 - 6 ng/μl sgRNS, 150 ng/μl Cas9 - 6 ng/μl sgRNS. CRISPR1.B: 55 ng/μl Cas9 - 6 ng/μl sgRNS, 150 ng/μl Cas9 - 6 ng/μl sgRNS

Összesen 132 embriót injektáltunk ezekkel a konstrukciókkal, de egyikben sem detektáltunk mutációt T7 assay segítségével. Ellenőrzés céljából megszekvenáltattuk a minták egy részét, mellyel alátámasztottuk, hogy nem történt módosítás az adott génszakaszon.

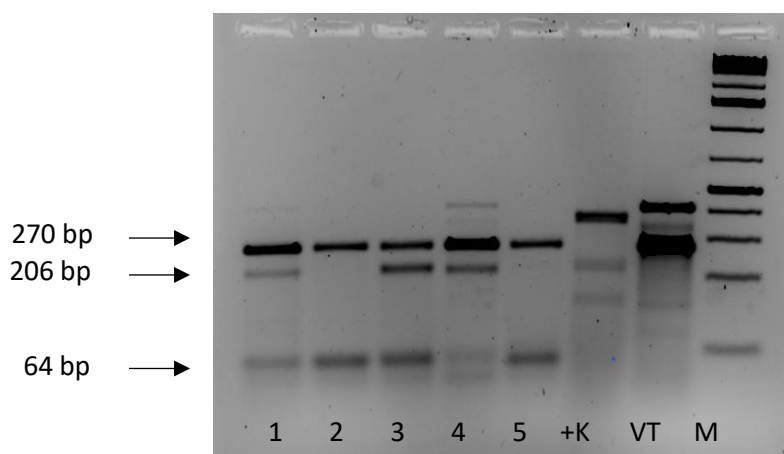
Ezután terveztünk négy újabb sgRNS szekvenciát, melyekből először hármat próbáltunk ki embriókon. Elsőként a CRISPR3 jelzésű CRISPR RNS-t teszteltük, melyet 7 ng/μl -es koncentrációban koinjektáltunk 150 ng/μl Cas9 mRNS-sel együtt 52 db embrióba. Az embriók életképességének megtartása céljából alkalmaztuk a kezdeti alacsonyabb koncentrációt, majd mikor láttuk, hogy ez az injektálóoldat koncentráció nem okoz problémát az embriók fejlődésében, és nem indukál megfelelő százalékban mutagenezist, a továbbiakban a CRISPR1 és CRISPR2 konstrukciókat 15 ng/μl-es koncentrációban kezdtük mikroinjektálni. A CRISPR1 RNS-t 42 db embrióba juttattuk be, ahol kilenc esetben indukált mutációt, míg a CRISPR2 konstrukciót 12 db embrióba

injektáltuk, ahol öt alkalommal okozott módosítást. A CRISPR2 41%-os hatékonyságát elegendőnek találtuk a további *in vivo* kísérletekhez, így ezt a konstrukciót választottuk a miosztatin génkiütött nyulak létrehozására. Az embriótesztek során összesen 106 embriót mikroinjektáltunk, melyek összefoglalása az 5. táblázatban található.

5. táblázat: A felhasznált crRNS-ek szekvenciája, koncentrációja és hatékonyságuk az embriótesztek során

| Konstrukciók neve | sgRNS szekvenciák | PAM | gRNS/Cas9 (ng/μl) | Inj. embriók száma (db) | KO embriók száma (db) (/inj. embriók %-a) |
|-------------------|----------------------------|-----|-------------------|-------------------------|---|
| CRISPR1 | 3'-TCCCGGAGTGGAGGAGCTTT-5' | GGG | 15/150 | 42 | 9 (21%) |
| CRISPR2 | 3'- CCTTGTACCGTCTTTCAT-5' | AGG | 15/150 | 12 | 5 (41%) |
| CRISPR3 | 5'-ATTGCGCCCAAGAGATACA-3' | AGG | 7/150 | 52 | 12 (23%) |
| Összesen | | | | 106 | 26 (24%) |

A CRISPR2 hatékony működését szemlélteti a 26. ábra. A CRISPR2 sgRNS-el injektált embriók mintáinál ötből három esetben eredményezett hasítást a T7 endonukleáz, a 270 bp méretű PCR fragment mellett 206 bp és 64 bp méretű szakaszok is megjelentek a gélelektroforézis során. A T7 endonukleáz általi hasítást tartalmazó mintákat ellenőrzés céljából szekvencia analízisnek vetettük alá, mely minden esetben alátámasztotta a CRISPR/Cas9 rendeltetésszerű működését.

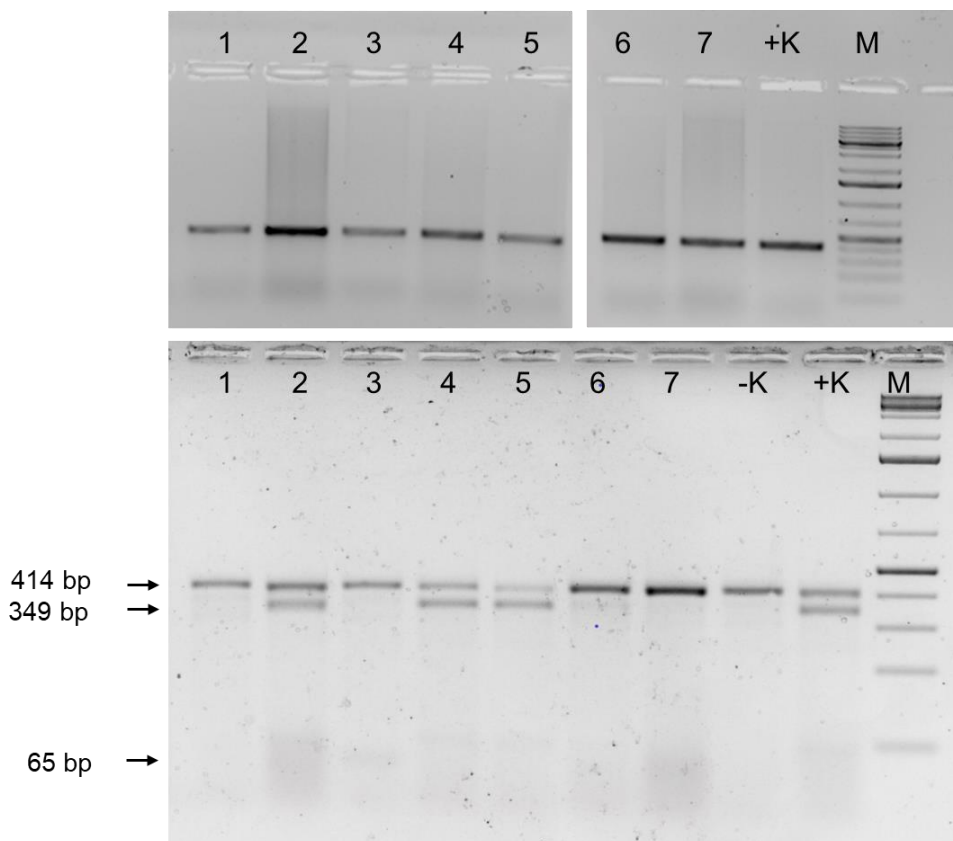


26. ábra. CRISPR2 konstrukcióval injektált embriók T7 endonukleáz emésztést követő gélelektroforézis képe. Minták 1-5 számozással, pozitív kontroll (+K: *hprt* gén), vad típus (vt), Marker (M: Generuler 1 kb Plus). Az 1,3,4 számozású minták esetében történt megfelelő méretű (206 és 64 bp) fragmentet eredményező hasítás

4.2.2. Miosztatin génkiütött alapító egyedek létrehozása, azonosítása

Az előzetes embrióteszteket követően CRISPR2 konstrukcióval mikroinjektáltunk egysejtes nyúl embriókat, melyeket álvemhes anyába ültettünk vissza laparoszkópos módszerrel.

Összesen 154 db mikroinjektált embrió juttattunk vissza hét nőstény petevezetőjébe, melyből 49 db utód született. Az utódok fül mintájából nyert DNS-ből PCR segítségével felszaporítottuk a vizsgálni kívánt szakaszt. Ezt új, hosszabb fragmentet (414 bp) eredményező primerek (meléklet. 3.táblázat) használatával végeztük, hogy T7 emésztést követően a hasított fragmentek jobban detektálhatóak legyenek gélelektroforézissel (27. ábra). A T7 endonukleáz assay elvégzését követően a mutációk meglétére pozitívnak tűnő mintákat megszekvenáltattuk, a negatív T7 vizsgálati eredményt mutató mintákkal nem foglalkoztunk.



27. ábra. A megszülető utódok közül PCR és T7 assay segítségével válogattuk ki a mutációt hordozó egyedeket. Felső ábra: a PCR termékek gélelektroforézis képe. Alsó ábra: a PCR termékek T7 endonukleázzal történő emésztése utáni fragmentek képe. Az ábrán az alapító egyedek egy részének mintái láthatók.

A T7 endonukleáz assay segítségével felderített mutációk alapján a megszületett utódok 20%-a, azaz tíz állat DNS-e tartalmazott módosítást a célzott génszakaszon. Az embriótranszfer eredményeinek összefoglalását a 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat: A CRISPR/Cas9 technikával injektált embriók transzferének összefoglalása

| Recipiens | Injektált sgRNA/Cas9 (ng/μl) | Beültetett embriók száma (db) | Megszülető utódok száma (% beültetett) | Transzgénikus utódok száma (% összes utód) |
|-----------|------------------------------|-------------------------------|--|--|
| Mstn 1 | 15/150 | 20 | 2 (10%) | 1 (50%) |
| Mstn 2 | 15/150 | 19 | 11 (57%) | 3 (27%) |
| Mstn 3 | 15/150 | 30 | 3(10%) | 1 (33%) |
| Mstn 4 | 15/150 | 31 | 16 (51%) | 1 (6%) |
| Mstn 5 | 15/150 | 14 | 6 (42%) | 1 (16%) |
| Mstn 6 | 15/150 | 16 | 11 (68%) | 3 (27%) |
| Mstn 7 | 15/150 | 24 | 0 | 0 |
| Σ | | 154 | 49 (31%) | 10 (20%) |

A CRISPR/Cas9 rendszer általi DNS hasítást követően a sejt javító mechanizmusai (NHEJ, HR) által összeillesztett DNS végeknél főleg deléció keletkezett, melyek hossza 3-14 bp közé esett. Csak az egyik utódban detektáltunk 3 bp beépülést 9 bp kiesése mellett. Az F0 generáció hét állatában előforduló mutációk alakulása a 28 ábrán látható.

| | PAM | sgRNS szekvencia | deléció (bp) | inszerció (bp) |
|------|-----|------------------|--------------|----------------|
| VT | ↓ | ↓ | | |
| 5BKK | | | 11 | - |
| 8BKK | | | 14 | - |
| 3. | | | 7 | - |
| 4. | | | 4 | - |
| 5. | | | 3 | - |
| 6. | | | 11 | - |
| 7. | | | 9 | 3 |

28. ábra. Az F0 generációban előidézett miosztatin mutációk.

Legtöbb esetben deléció jött létre (hossz: 3-14 bp), és egy állatnál történt 3 bp beépülés. Piros: sgRNS célszekvencia, zöld: PAM szekvencia, narancssárga: inszerció, VT: vad típus

A DNS szekvencia változást tartalmazó utódok közül alapító egyedeknek kiválasztottunk egy hím (8BKK.H), és egy nőt (5BKK.PF), melyeket elkezdünk tovább szaporítani. A 8BKK.H jelölésű hím állat 14 bp deléciót hordozott a miosztatin génen, míg az 5BKK.PF jelölésű ellátott nő miosztatin génjéről 11 bp hosszú szakasz esett ki.

Mindkét alapító állat heterozigóta formában hordozott mutációt a miosztatin génen, melyek minden esetben korai stop kodont előidézve megakadályozták a működőképes fehérje kifejeződését. A korai stop kodon állatokban aktiválja az NMD rendszert, így a keletkező csonka mRNS gyorsan lebomlásra kerül, és nem íródik át róla fehérje (Hwang and Maquat 2011). Az alapítók miosztatin génjének fehérje szekvenciája a melléklet 3. ábráján látható.

A 8BKK.H hím az állatházunkban is megtalálható Hycole fajta genetikai hátterével rendelkezett, míg az 5BKK.PF nőtényt pedig az Olívia Kft. által rendelkezésre bocsátott Pannon fehér fajtából állítottuk elő. A két különböző fajta miosztatin hiányra irányuló összehasonlító vizsgálatát terveztük, de sajnos a nagyobb termetű 5BKK.PF nőténytől nem tudtunk életképes utódot nyerni, és vonalat alapítani. Az öt hónapos nőtény már nagyon nehezen termékenyült és az egyszeri vemhesüléséből születő két utód is pár órában elpusztult. A nőtény egészségügyi állapota nem engedte a negyedik termékenyítést. Ennek következtében nem tudtuk elvégezni a genomszerkesztett vonalak összehasonlító vizsgálatát. Véleményünk szerint, a felmerülő vemhesülési nehézség kapcsolatba hozható az általunk előidézett génmódosítással (lásd: 4.2.7. fejezet).

4.2.3. Az előidézett miosztatin mutációk öröklődése

A 14 bázispár delécióval rendelkező heterozigóta állat (8BKK.H) és vad típusú nőtények pároztatása során 59 db utód született, melyek közül 14 hordozta az adott mutációt. Így elmondhatjuk, hogy enyhén mozaikos állatról van szó, hiszen a várt 50% helyett csak az utódok 28%-a lett génmódosított. A tenyésztés során ez nem okoz gondot, hiszen a további generációkban a mozaikosság már nem jelent problémát. Az F2 és F3 almokban is számos heterozigóta utódot azonosítottunk, azonban homozigóta egyedeket nem találtunk.

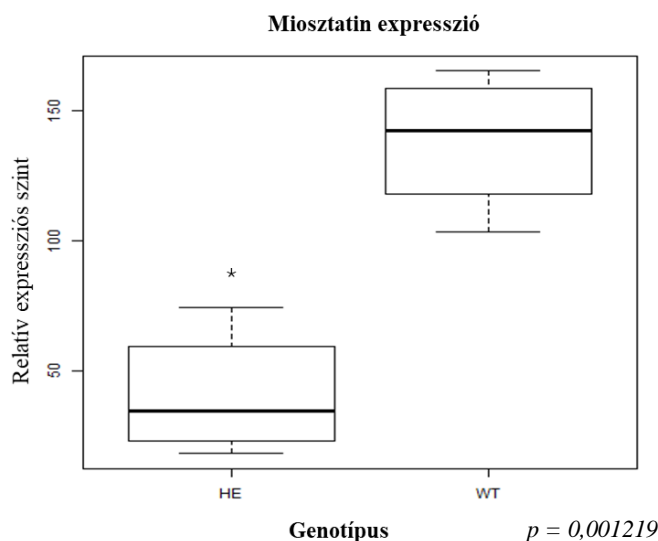
4.2.4. Off-target analízis

A CRISPR RNS-ek tervezésénél is figyelembe vettük a tervező program által prediktált lehetséges off-target helyek számát, és igyekeztünk a legkevésbé, és nem génben lévő off-target hellyel rendelkező szekvenciákat kiválasztani. Ez az előrejelzés megfigyeléseink alapján nem mindig nyújt megbízható predikciót, ezért szükség volt további elemzésre.

A lehetséges off-target helyeket nBLAST segítségével is meghatároztuk, és az első kilenc találatra primert tervezve ellenőriztük az alapító állatok genomjában a prediktált 2-6 mismatchet tartalmazó off-target szekvenciákat. Az alapító állatok vizsgált szekvenciáiban nem detektáltunk mutációkat. A lehetséges off-target helyek szekvenciái a melléklet 4. táblázatában láthatók.

4.2.5. Miosztatin expresszió vizsgálata

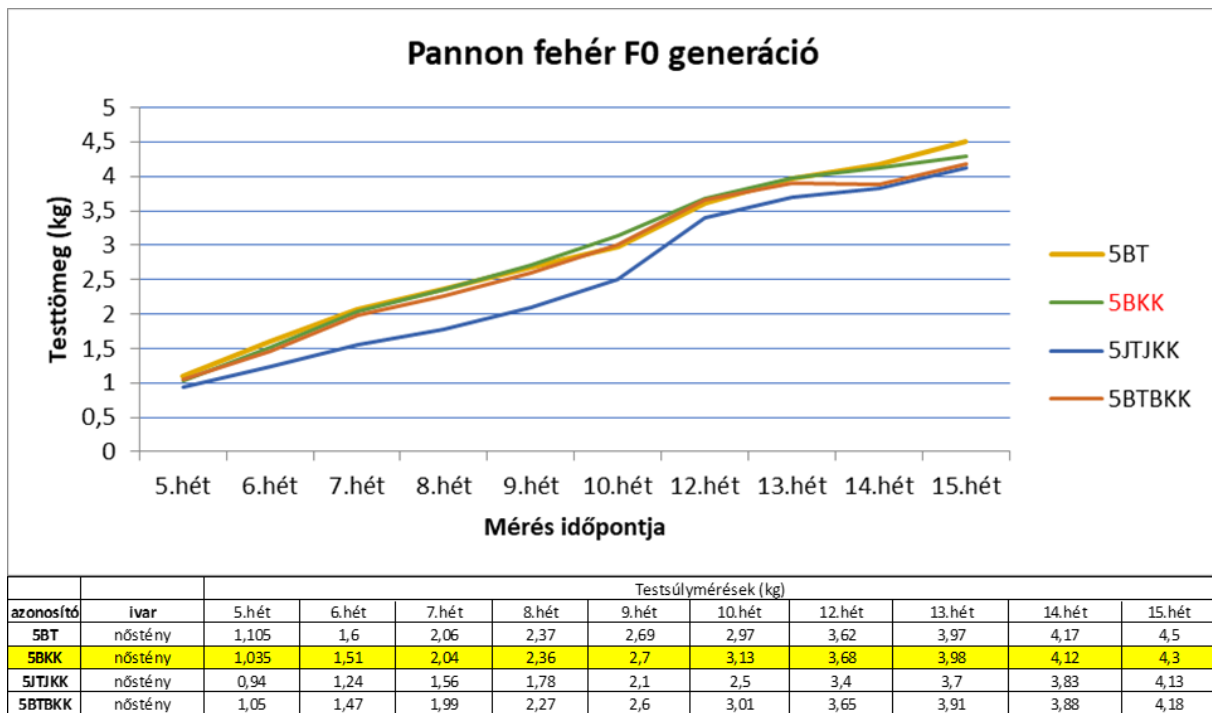
A miosztatin mRNA expressziójának tanulmányozásához három heterozigóta utód és három vad típusú alomtárs combhajlító izmából mintát vettünk, melyekből totál RNA-t izoláltunk. Ezt RT-PCR segítségével cDNA-sé írtuk át, majd kvantitatív PCR segítségével vizsgáltuk tovább. A qPCR során az adatok kiértékeléséhez $\Delta\Delta$ CT relatív összehasonlító módszert alkalmaztunk, endogén viszonyítási kontrollnak a nyúl hprt génjét használtuk. Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a heterozigóta állatokban fele mennyiségű miosztatin expresszálódik a kontroll állatokhoz viszonyítva (29. ábra). Ez azt bizonyítja, hogy az előidézett mutáció valóban megakadályozza működőképes miosztatin mRNA szintézisét. Az összehasonlítást homozigóta állatok hiányában heterozigóta és kontroll nyulakkal végeztük.



29. ábra. A miosztatin relatív expressziós szintje kontroll és heterozigóta nyulakban. A heterozigóta állatok relatív miosztatin mRNA szintje szignifikánsan alacsonyabb a kontroll csoporthoz képest.

4.2.6. A transzgenikus utódok testtömeg változása

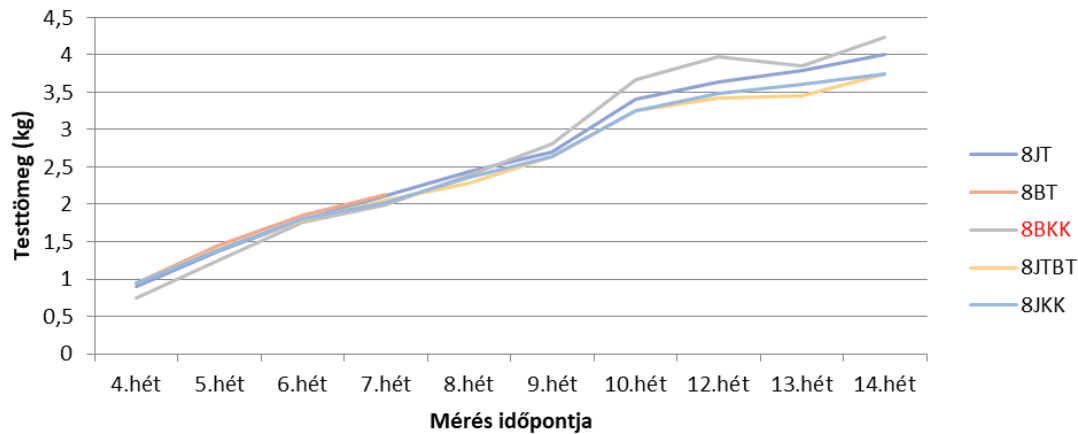
Az 5BKK.PF nőstény alomtársai között az egyetlen volt, mely rendelkezett miosztatin mutációval. Ennek az alomnak a testtömegmérését hetente végeztük öt hetes koruktól 15 hetes korukig, melyek alakulása a 30. ábrán látható, ahol a grafikonhoz csatolt táblázat segíti az adatok átláthatóságát. A miosztatin mutáns nőstény öt hetesen a legnagyobb testtömeggel rendelkezett, és az egyik legnagyobb utód volt az alomban egészen 15 hetes koráig, amikor is testtömeggyarapodása lelassult a többi állatéhoz képest. Ez a hátsó végtagi „bénulás” megjelenésének idejére tehető, ami valószínűleg megnehezítette a táplálékfelvételt.



30. ábra. Az 5BKK.PF alapító nőstény és alomtársainak testtömeggyarapodása 5-15 hetes koruk között. A grafikonon zöld vonal jelöli a transzgénikus utód testtömegének alakulását, ami a 14. hétig folyamatos, utána visszaesést mutat. A jobb átláthatóság miatt az állatok pontos testtömegadatai táblázatos formában is megtalálhatók, ahol az 5BKK.PF utódhoz tartozó méréseket a sárgával jelölt sor mutatja.

A Hycote F0 alomban ugyanolyan időközökkel végeztük a méréseket négy hetes koruktól 14 hetes korukig. A 8BKK.H alapító hím itt is egyedüli genomszerkesztett utód volt társai között. Négy hetes korban a legkisebb testtömeggel bírt, majd gyors ütemű gyarapodás után kilenc hetes korától kezdve a legnagyobb állat volt az alomban. Enyhe testtömegcsökkenést figyelhettünk meg a 13. hétben ennél az állatnál, de ezzel együtt is a legnagyobb utód maradt alomtársai között. Q. Lv és munkatársai (2016) nem tapasztaltak jelentős különbséget a heterozigóta és vad típusú állatok testtömege között hat hetes kor előtt, csak később mértek szignifikánsan nagyobb testtömeget a heterozigóta állatoknál. Az R. Guo és csoportja (2016) által publikált adatok szerint viszont már a miosztatin hiányos állatok születéskori testtömege is szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz képest. A 8BKK.H hím és alomtársainak tömeggyarapodását a 31. ábrán látható grafikon mutatja be, táblázatos kiegészítéssel.

Hycole F0 generáció



| azonosító | ivar | Testsúlymérések (kg) | | | | | | | | | |
|-----------|---------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| | | 4.hét | 5.hét | 6.hét | 7.hét | 8.hét | 9.hét | 10.hét | 12.hét | 13.hét | 14.hét |
| 8JT | nőstény | 0,9 | 1,38 | 1,79 | 2,12 | 2,44 | 2,7 | 3,4 | 3,63 | 3,79 | 4,01 |
| 8BKK | hím | 0,75 | 1,25 | 1,76 | 1,99 | 2,39 | 2,81 | 3,67 | 3,97 | 3,86 | 4,23 |
| 8JTBT | hím | 0,95 | 1,4 | 1,79 | 2,06 | 2,28 | 2,64 | 3,25 | 3,42 | 3,45 | 3,75 |
| 8JJK | hím | 0,94 | 1,39 | 1,81 | 2,03 | 2,36 | 2,64 | 3,26 | 3,48 | 3,6 | 3,75 |

31. ábra. A 8BKK.H alapító hím, és alomtársainak testtömeggyarapodása 4-14 hetes koruk között. A grafikonon lila vonal jelöli a transzgenikus utód testtömegének alakulását. A jobb átláthatóság miatt az állatok pontos adatai táblázatos formában is megtalálhatók, ahol a 8BKK.H utódhoz tartozó adatokat a sárgával jelölt sorban láthatjuk.

A 8BKK.H szaporítása során az elkövetkező almokban nem figyeltünk meg sem az alapítóhoz hasonló erős gyarapodási hajlamot, sem szignifikánsan nagyobb testtömeget a génmódosított utódoknál.

A miosztatin hiányos nyulak testtömegének alakulását 15 db heterozigóta és 16 db vad típusú állat esetében vizsgáltuk. Két miosztatin mutáns vonal összehasonlító vizsgálata ugyan megghiúsult a Pannon fehér nőstény termékenyíthetlensége miatt, de a 8BKK.H alapító hím mutációjának testtömegre gyakorolt hatását a Hycole és a Pannon fehér-Hycole hibrid genetikai háttéren össze tudtuk hasonlítani.

Az egyik csoport kizárólag Hycole, a másik csoport Pannon fehér-Hycole hibrid típusú genetikai állományt tartalmazó állatokból állt. A páros t-próba eredménye alapján szignifikáns különbséget nem tudunk kimutatni az egyes csoportok között.

Első csoport (Hycole): $t = -0.39988$, $df = 6.1377$, $p\text{-value} = 0.7028$, $n=14$.

Második csoport (hibrid): $t = -0.45283$, $df = 14.529$, $p\text{-value} = 0.6574$, $n=17$.

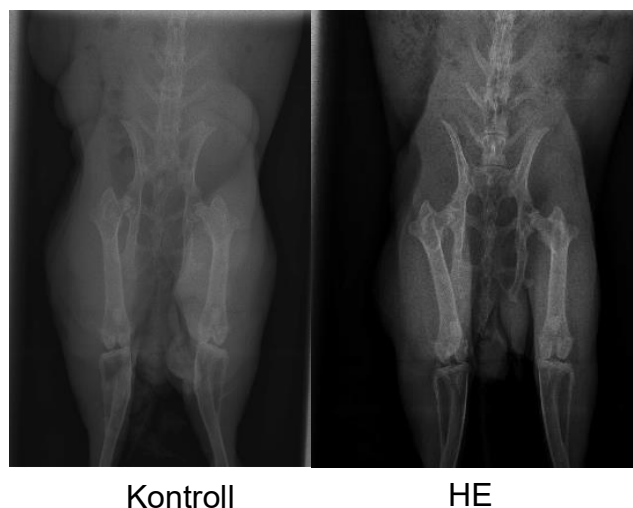
4.2.7. A miosztatin génkiütött nyulak fejlődése

A génmódosított heterozigóta állatok fiatal korban nem rendelkeztek szemmel látható fenotípusos különbséggel a vad típusú alomtársaikhoz képest. A számos miosztatin KO fajnál leírt jellegzetes dupla-izmolt fenotípus nem jelentkezett. Az elpusztult utódoknál sem detektáltunk fejlődési rendellenességeket, drasztikusan megnövekedett izomcsoportokat (pl. megnagyobbodott nyelv), mint ahogy R. Guo és munkatársai (2016) tapasztalták az általuk létrehozott miosztatin génkiütött nyulak esetében.

Azonban néhány heterozigóta állatnál megfigyeltünk három hónapos kor körül kialakuló mozgásszervi eltérést. Először az 5BKK.PF jelzéssel ellátott, nagyobb izomtömeggel rendelkező Pannon fehér alapító nőténynél tapasztaltuk, hogy a hátsó lábai járás közben kifordulnak, nem biztos az előre felé haladó mozgása, oldalra dől. Bakteriális fertőzés, mely az agyi mozgásközponttra lett volna hatással, nem állt fent. Az idő előrehaladtával romlott az állapota, a hátsó lábait csak húzni tudta. Háromszori termékenyítést követően egyszer vemhesült, melyből két utód született. A kisnyulak jól fejlett, egészségesnek tűnő állatok voltak, melyek pár órás korukban elpusztultak, valószínűleg az anyaállat sérült mozgása és a kevés mozgástér következtében. Az alapító nőtény nem várt fenotípusa megakadályozta a negyedszeri termékenyítést, ezáltal a vonalalapítást. Ugyanezt a jelenséget a 8BKK.H hím leszármazottjai között is megfigyeltük öt heterozigóta állatnál. Két állat esetében a mozgást nemcsak a hátsó lábak korlátozott működése, hanem az elülső végtagok, majd a teljes testet érintő bénultság akadályozta.

A NÉBIH (Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal) Emlős-, Vad- és Baromfibetegségek laboratóriumából származó hisztológiai vizsgálat eredménye adott magyarázatot a megjelenő problémára. A combizomzatban futó *nervus tibialis* idegrost degenerációját azonosították (Szeredi Levente).

A vázrendszer felépítésében nem tapasztaltunk eltérést a heterozigóta és vad típusú állatok között. T. Zhang és munkatársai, miosztatin génkiütött homozigóta nyulaknál figyeltek meg fogfejlődési rendellenességeket, illetve medencecsont elhajlást (2019). Az általunk létrehozott állatok nem mutattak hasonló fenotípust, fogazatuk ép volt, a hátsó végtagok, és a medence felépítésében sem észleltünk különbséget (32. ábra).



32. ábra. Kontroll és heterozigóta nyúl röntgenfelvétele hasi oldalról, melyen nem látható eltérés a csontrendszerben a medencetájékon.

4.2.8. Miosztatin hiányos állatok vizsgálata CT-vel

A miosztatin hiány ismert jellemzője, hogy befolyásolja a zsír akkumulációt (McPherron and Lee 2002). Annak vizsgálatára, hogy megállapítsuk alapító állataink zsír-izom arányát, komputertomográfias analízisnek vetettük alá őket. A hat hónapos heterozigóta nyulak mellé megfelelő ivarú és korú két-két db kontroll állatot használtunk. A vizsgálati program által közölt adatok a 7. táblázatban láthatók.

7. táblázat: A miosztatin mutáns (sárga) és kontroll állatok komputertomográfias vizsgálatának adatai

| Jelölés | Genotípus | Ivar | Testtömeg (kg) | Izomszövet mérete (cm ³) | Zsírszövet mérete (cm ³) | Teljes test méret (cm ³) | Izom arány (cm ³ /kg) | Zsír arány (cm ³ /kg) |
|---------|---------------|---------|----------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 8JTBT | VT (Hycole) | hím | 4,81 | 2299 | 801 | 4337 | 478 | 166 |
| 8JKK | VT (Hycole) | hím | 4,47 | 2303 | 503 | 3997 | 515 | 113 |
| 8BKK.H | HE (Hycole) | hím | 5,4 | 2416 | 1054 | 4888 | 447 | 195 |
| 5BT | VT (Pannon f) | nőstény | 6,05 | 2829 | 1064 | 5523 | 468 | 176 |
| 8JT | VT (Hycole) | nőstény | 4,71 | 2370 | 602 | 4221 | 503 | 128 |
| 5BKK.PF | HE (Pannon f) | nőstény | 4,4 | 2382 | 234 | 3864 | 541 | 53 |

A táblázatban összefoglalt adatok azt támasztják alá, hogy az 5BKK.PF Pannon fehér nőstény állatnál a miosztatin hiány zavart okozott a zsír felhalmozásban, melynek következtében jelentősen lecsökkent zsírszövettel rendelkezett az összes többi állathoz viszonyítva (53 cm³/kg).

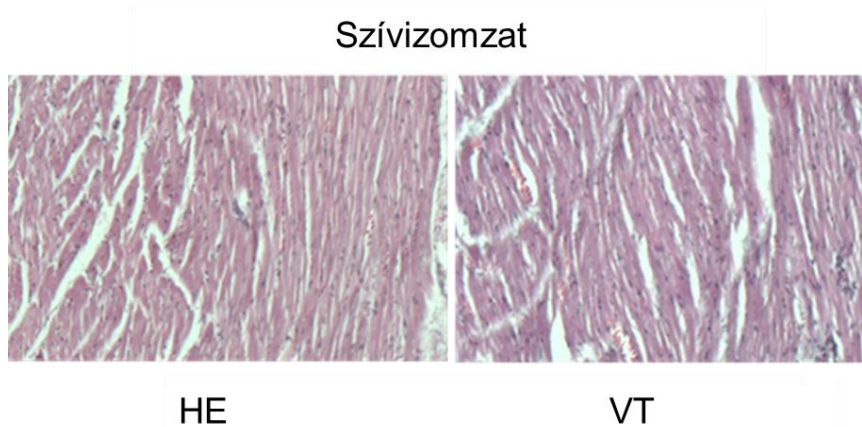
A Pannon fehér fajta egyedei nagyobb testtömeg elérésére képesek, ahogy ezt az 5BT jelölésű vad típusú nősténynél is láthattuk. Ehhez viszonyítva az 5BKK nőstény jóval alacsonyabb

össztettömeeggel bírt, melyet nemcsak jóval alacsonyabb zsírszövet aránya, hanem csökkent, a Hycole fajtával megegyező mértékű izomaránya eredményez.

A Hycole fajtából származó alapító állat (8BKK.H) a legnagyobb testtömeeggel rendelkezett a hímek között, nála nem figyeltünk meg drasztikusan megváltozott zsír-izom arányt. Izomszövetének és zsírszövetének mérete is a legnagyobb volt a többi hímhez viszonyítva. A miosztatin hiány ennél az állatnál nem okozott szembetűnő elváltozásokat a test zsír- és izomfelépítésében, mely lehetséges, hogy a fajtaválasztással van összefüggésben.

4.2.9. Hisztológiai vizsgálatok

A miosztatin hiány az izomszövetekben hipertrófia és/vagy hiperplázia előidézésével eredményez nagyobb izomtömeget (Casas et al. 1998, Grobet et al. 1997, Kobolák and Gócza 2002). Miosztatin hiányos nyulaknál megfigyeltek hipertrófiát és a hipertrófia, hiperplázia együttes megjelenését is (Lv et al. 2016). Ezen jelenségek meglétét kívántuk vizsgálni izom metszetek összehasonlításával, melynek eredményeként nem találtunk különbséget a heterozigóta és kontroll minták között sem a sejtek számában, sem méretében. Heterozigóta és vad típusú állatok szívizom szövetének összehasonlítása látható a 33. ábrán, ahol szintén nincs szignifikáns különbség az izomrostok méretében ($t = -0.39568$, $df = 6.5477$, $p\text{-value} = 0.8028$, $n=8$).



33. ábra. Heterozigóta (HE) és vad típusú (VT) állat szívének hosszmeteszete. Nincs szignifikáns különbség az izomrostok mérete között.

4.2.10. A transzgénikus vonal fenntartása, génmegőrzése

A miosztatin mutáns vonal kutatási szempontból jelentős értékkel bír, melynek fenntartása, megőrzése a további kutatások szempontjából elengedhetetlen. Ennek biztosítására a 8BKK.H vonal öt hím tagjától több alkalommal is spermát vettünk, melyeket lefagyasztottunk, és azóta is folyékony nitrogénben tárolunk. Így a vonal génmegőrzése garantált. A spermafagyasztás fontos kiegészítő technika a transzgénikus állatok tenyésztésénél, hiszen az állatházak véges kapacitása nem teszi lehetővé sok génmódosított nyúl vonal egy időben történő fenntartását.

4.2.11. CRISPR/Cas9 rendszer alkalmazása további géneken házinyúlban

Laboratóriumunkban sikeresen alkalmaztuk a CRISPR/Cas9 genomszerkesztő eljárást házinyúlban további gének kiütésére. Hatékonyan idéztünk elő mutációkat NOX4 (NADPH-oxidáz 4) és NOX5 (NADPH-oxidáz 5) fehérjéket kódoló géneken, melyek következtében csökkent fehérje kifejeződést tapasztaltunk. Az alapító állatok estében biallélikus mutációkat is megfigyelünk. Homozigóta vonalakat is sikerült létrehozni az génmódosított állatokból, melyek teljes körű jellemzése a jövő feladata, de elmontható, hogy az így előállított állatok alkalmasak az érelmeszesedés terén új terápiás célpontok vizsgálatára és gyógyszerjelöltek azonosítására (Petheő et al. 2021).

4.3. A lentivírus mediált transzgenézis eredménye

A placentális miosztatin metabolizmus majdani tanulmányozására szükség volt egy olyan rendszer kidolgozására, ahol placenta-specifikusan végezhetünk transzgénikus kísérleteket. Mivel nincsenek jól jellemzett placenta specifikus promóterek (különösen nyúlban) ezért a rendszer kidolgozása lentivírus alapú transzgenézissel történt. A munka során az injektált embriók sejtjeinek, és a 14,5 napos magzatok szöveteinek GFP expresszióját vizsgáltuk.

4.3.1. GFP expresszió vizsgálata *in vitro* embriókon

A GFP-t tartalmazó lentivírus konstrukció hatékonyságának tesztelésére, és a lehetséges promóter hatás kimutatására embriókon vizsgáltuk a lentivírus alapú géntranszfer működését.

Ezen előkísérletek során 22 db nyolc sejtes nyúl embriókat mikroinjektáltunk konstitutív EFl promóter által vezérelt GFP-t tartalmazó lentivírus vektorral. Az embriókat blasztociszta stádiumig tenyésztettük *in vitro* körülmények között, majd mikroszkóppal vizsgáltuk a riporter fehérje

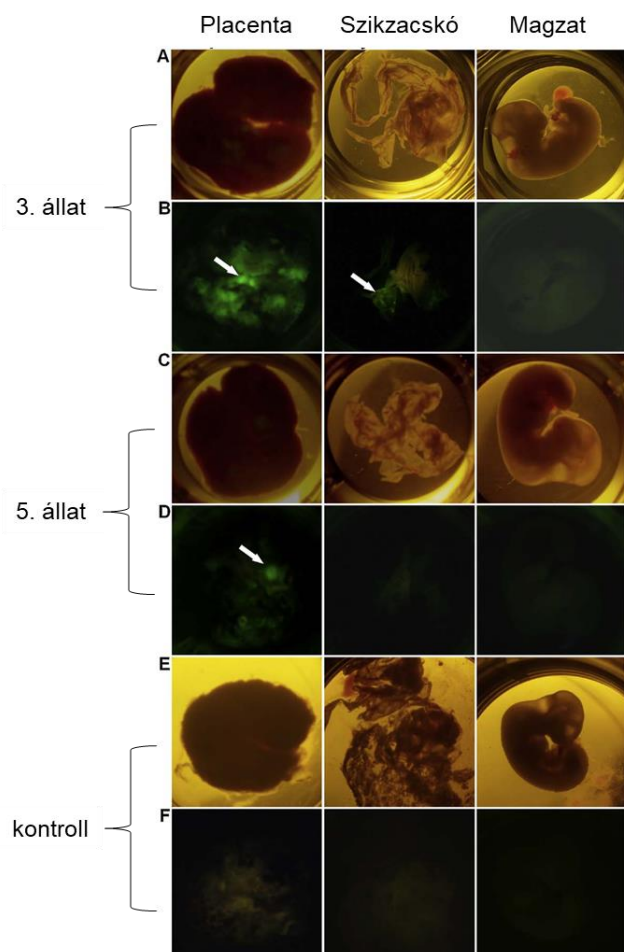
kifejeződését. Kilenc embrióban (40,9%) kizárólag a trofektoderma sejtekben történt GFP expresszió, melynek mértéke erős volt, de mozaikosságot mutatott.

A következőkben konstitutív PGK promóterrel ellátott GFP-t tartalmazó konstrukciót juttatunk 17 db nyúl embrióba, melynek eredményeként hét embrió (41,1%) expresszálta a transzgént a trofektoderma sejtekben. A két különböző promóterrel ellátott vektorok hatékonysága között nem tapasztaltunk különbséget. A továbbiakban az EF1 promótert alkalmaztuk.

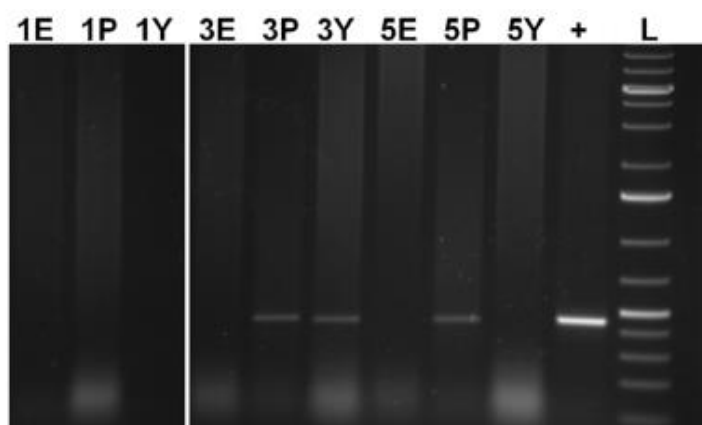
4.3.2. Placenta specifikus géntranszfer eredménye nyulakban

A transzgenikus nyúl előállítás során az embriótranszfer szempontjából előnyös a korai stádiumú embrió visszajuttatása az álvemhes nőstényekbe, ezért kíséreltük meg a 8-16 sejtes állapotban lévő, és nem a blasztociszta stádiumú embriókon a lentivírus injektálást. A lentivírus vektor embriókba történő bejuttatását követően a vizsgált utódokban kizárólag az extraembrionális szövetekben tapasztaltunk transzgen jelenlétet, annak ellenére, hogy a 8-16 sejtes embriókban még nincs jelen a lentivírus fertőzésnek gátat szabó trofektoderma sejtréteg (Okada et al. 2007). Ez azt jelenti, hogy létezik egy korábban kialakuló korlát a vírusfertőzés ellen, melynek működése még ismeretlen.

Összesen 42 db 8-16 sejtes embriót injektáltunk GFP-t tartalmazó lentivírus vektorral, melyeket három álvemhes nősténybe juttatunk vissza laparoszko-pos módszerrel. Két vemhesülésből összesen nyolc magzatot izoláltunk 14,5 napos korban (termékenyítés utáni). A transzgen detektálása GFP specifikus PCR segítségével történt. Négy placentában és két szikzacskóban azonosítottuk a GFP jelenlétét, a magzatok közül egyik sem tartalmazta a transzgént. Fluoreszcens mikroszkópiával és RT PCR-rel megállapítottuk, hogy mindegyik transzgent tartalmazó szövetben történt génkifejeződés is. Ezek eredménye a 34. és 35. ábrán látható. Az expresszió erősségében tapasztaltunk eltérést, emellett az egyes egyedek szöveteiben különböző mértékű mozaikosságot is megfigyelhettünk.



34. ábra. Extraembrionális GFP expresszió detektálása 14,5 napos nyúlmagzatokban, és a hozzájuk kapcsolódó extraembrionális szövetekben fluoreszcens mikroszkópiával. A két legintenzívebb transzgén expressziót mutató magzat, és a hozzájuk tartozó placenta és szikzacskó mikroszkópos képe normál (A, C sor) és UV (B, D sor) megvilágítás mellett, illetve kontroll szövetek az E és F sorban. A transzgén expresszióját a nyilakkal is jelölt zöld szín mutatja.



35. ábra. Nyúl magzat (E), placenta (P), és szikzacskó (Y) minták vizsgálata RT PCR segítségével. Az első magzat nem tartalmazott transzgént, a 3-as számú minta placentájában és szikzacskójában történt a legerősebb GFP expresszió, az 5-ös számú állatnál csak a placenta mutatott expressziót.

Két placentában volt megfigyelhető erős GFP expresszió. A sejtek többségében kifejeződött a transzgén, de némi mozaikosságot mutatott. A legerősebb expressziót a 3-as számú extra-embriónális szövetmintákban találtuk. Kifejezett mozaicizmus csökkent fluoreszcenciával két placenta esetében jelentkezett. Ezt az 5-ös számú minta szemlélteti a legjobban (32. ábra. E, F; 33. ábra). A szikzacskóban történő GFP expressziót szintén sikerült detektálni, melyet általánosan erős mozaikhatás kísért, de egy magzat szöveteiben sem találtunk transzgénkifejeződést (32. ábra).

A mozaikosság jelensége más transzgénikus módszer eredményeként is megjelenik (Katter et al. 2013, Hiripi et al. 2010, Park 2007). A modell további felhasználása során a mozaikos génkifejeződés nem befolyásolja a placenta specifikus folyamatok vizsgálatát.

4.4. Új tudományos eredmények

1. Sikeresen indukáltam mutációt Hycote és Pannon fehér nyúl fajták miosztatin génjén CRISPR/Cas9 módszer alkalmazásával.
2. A világon elsőként, csökkent miosztatin szinthez köthető *nervus tibialis* degenerációt detektáltam nyúlban, mely mozgásproblémák kialakulásához vezetett. Ezáltal igazoltam a miosztatin perifériás idegrendszerben betöltött szerepének fontosságát.
3. Bizonyítottam, hogy a részleges miosztatin hiányos állapot házinyúlban testzsír csökkenést, az izom-zsír arány megváltozását okozhatja nőstény állatokban, ami termékenységi problémákat is előidézhethet.
4. Először igazoltam, hogy a lentivírus alapú transzgenézis segítségével előállított, extraembriónális szövet-specifikus génexpresszió nyúlban kialakítható.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A házinyúl transzgenézise egészen az 1980-as évekre nyúlik vissza (Hammer et al. 1985), melynek módszertani fejlődése megállíthatatlanul zajlik. Napjainkban, a „specifikus genomszerkesztők korában” jelentősen leegyszerűsödött a genetikailag módosított modellállatok előállítása. Ezek a rendszerek lehetőséget teremtenek a korlátozott erőforrásokkal rendelkező laboratóriumok számára is kutatásaik megvalósítására, így egyre több kísérlet születhet, melyek segíthetnek megérteni a szervezetekben lejátszódó molekuláris folyamatokat.

A doktori munka középpontjában a miosztatin gén, illetve a működésének hiányában kialakult elváltozások vizsgálata állt. A kutatás másik célja egy lentivírus alapú szövetspecifikus modellrendszer kidolgozása volt nyúlban, mely alkalmas gének, fehérjék, extramebrionális szövet-specifikus vizsgálatára.

A genomeditálási technikák ugyan sokkal gyorsabb, hatékonyabb, specifikusabb DNS szerkesztést biztosítanak, mint az ezeket megelőző génmódosítási módszerek, de nem minden esetben váltják be a hozzájuk fűzött reményeket. Ezt tapasztaltuk első kísérleteinknél is, amikor TALEN rendszerrel igyekeztünk mutagenezist indukálni a házinyúl genomban. A miosztatin első exonjára tervezett TALEN párok kipróbálása nem hozta a várt eredményt, egy genomszerkesztett utódot sem detektáltunk a kísérletek során. A megszülető utódok száma is jóval elmaradt a laboratóriumunkban megszokott adatokhoz képest. Előfordulhat, hogy a TALEN konstrukciók nem megfelelő koncentrációban történő alkalmazása állt az alacsonyabb utódszám, ill. a mutációk hiányának a hátterében. Esetleg nem voltak optimális helyre tervezve a TALEN párok, vagy a konstrukció összerakásánál technikai hiba lépett fel. Vagy ezen apró okok összessége eredményezett szuboptimális működést, ezért nem sikerült a várt DNS szakaszon módosítást előidézni.

Eddig csak egy publikáció jelent meg TALEN módszert alkalmazó nyúl transzgenézisről, melynek során a RAG-1 és RAG-2 géneket inaktiválták (Song et al. 2013). Ez nem nyújt megfelelő háttértudást TALEN alkalmazásáról nyúlban, így nehéz biztos következtetéseket levonni munkánk sikertelenségének okáról. Az újabb konstrukciók létrehozásával párhuzamosan terjedt el a CRISPR/Cas9 genomszerkesztő eszköz, melynek alkalmazása megelőzte az új TALEN párok kipróbálását.

Az első két CRISPR/Cas9 konstrukció sem eredményezett mutagenezist embriókon, melynek lehetséges oka, hogy a Cas9 fehérje nem mindig válik el a cél-DNS szakasztól (Clarke et al. 2018). Előfordulhat, hogy esetünkben is ez okozta a meghúsult működést.

A további CRISPR/Cas9 konstrukciók 21-41%-os hatékonysággal indukáltak módosításokat az embriókban. A kiválasztott, legnagyobb hatékonyságúnak vélt sgRNS/Cas9 komplex

(CRISPR2) a megszülető utódok 20%-ában idézett elő mutációt a második exonon. Ez a hatékonyság ugyan nem éri el a már publikált miosztatin KO nyúl előállításnál tapasztalt hatásfokot (70,6% és 80%), de számunkra elegendő volt a megszülető utódok mennyisége, hiszen az állatház kapacitása amúgy sem teszi lehetővé a kísérleti állatok nagyszámú fenntartását. Q. Lv és munkatársai (2016) kísérletében összesen 20 utód született, közülük 16 állat tartalmazott mutációt, és a mutációk hat esetben biállélikus formában jelentek meg. Ezt a magas mutagenezis arányt a 40 ng/μl-es koncentrációban egyidejűleg mikroinjektált két sgRNS eredményezte. Az embriók fejlődésének védelme érdekében, mi törekedtünk az alacsony (15 ng/μl) sgRNS koncentráció alkalmazására, és egyszerre csak egy sgRNS-t alkalmaztunk. Ez a koncentráció esetünkben 20%-os hatékonyságot biztosított.

A laboratóriumunk további genomszerkesztési kísérletei során a CRISPR/Cas9 módszer magas hatékonyságának biztosítására, előnyösnek tartanám a két sgRNS egyszerre történő mikroinjektálását, mely alkalmazás bizonyítottan működik (Song et al. 2016). Így nagyobb valószínűséggel jöhet létre hosszabb deléció, ami biztosabban eredményez génkiütött élőlényt, illetve donor DNS egyidejű bejuttatásával nagyobb arányban tesz lehetővé irányított génbevitelt. Ugyanakkor ezzel a módszerrel megnövelhetjük a potenciális off-target lehetőségek számát is, ami viszont hátrányos.

A munkánk során előállított tíz miosztatin mutáns utód közül két állatból igyekeztünk vonalat alapítani és homozigóta utódot létrehozni.

A két alapító genomjának vizsgálata azt mutatta, hogy a prediktált off-target helyeken nem történt változás. Ez nem jelenti azt, hogy egyáltalán nem történt off-target módosítás, hanem azt, hogy ennek nagyon kicsi az valószínűsége (Kleinstiver et al. 2016). A kapott adatok alapján úgy gondoljuk, hogy a megváltozott tulajdonságok minden esetben a csökkent miosztatin fehérje szinttel hozhatók összefüggésbe, és nem a kis valószínűséggel létrejövő off-target mutációk miatt alakultak ki. Ezt azért állíthatjuk, mivel független vonalakban, ráadásul független fajtákban kaptunk hasonló eredményeket.

A Pannon fehér nősténynél, és a Hycote vonal egyes egyedeinél a csökkent miosztatin szinttel kapcsolatba hozható hátsó végtagi bénulással kezdődő mozgásproblémát tapasztaltunk. Feltételezésünk szerint az alacsonyabb miosztatin szint hatással van a motoneuronok mielinizációjára, ezáltal az akciós potenciál terjedése zavart szenvedhet. Ezt támasztotta alá a NÉBIH Emlős-, Vad- és Baromfibetegségek laboratóriumából származó megfigyelés is, mely szerint az ilyen fenotípussal rendelkező állatoknál a *nervus tibialis* heveny idegrostelfajulása alakult ki (eredményközlő dr. Szeredi Levente által), ugyanakkor a (comb)izomzatban kórjelző értékű elváltozást nem történt.

A korábban publikált csontrendszer elváltozások lehetséges előfordulását alapul véve (Zhang et al. 2019) megvizsgáltuk, hogy a mozgásszervi zavart vajon a vázrendszer degenerációja okozza-e. Röntgenfelvétellel bizonyítottuk, hogy a vázrendszerben nem történt módosulás, mely mozgásproblémák kialakulásához vezethetett volna. Ezek alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a csökkent miosztatin szinthez köthető korlátozott mozgás oka kizárólag idegrendszeri eredetű.

Komptertomográfias vizsgálataink azt mutatták, hogy az Pannon fehér nőtény jelentősen lecsökkent zsírszövet raktárral rendelkezett. Feltételezésünk szerint erre a jelenségre vezethető vissza alacsonyabb vemhesülési képessége. A genomszerkesztett Hycole fajtában nem figyeltünk meg ennyire drasztikus módon lecsökkent zsírszövet állományt, és nem detektáltunk szaporodással, utódgondozással kapcsolatos problémát sem. Miosztatin mutáns nyulak zsírsanyagcseréjének megváltozásáról és ennek lehetséges következményeiről nem született még publikáció.

Feltételezhetően a húsipari tenyésztés során gyors izomtömeg növekedésre szelektált, az általános anyagcserét magasabb fokon folytató Pannon fehér fajta zsír metabolizmusát a miosztatin részleges hiánya is könnyebben fel tudta borítani. Emellett az is magyarázat lehet, hogy a CT-vel szelektált húsipari állományban olyan mennyiségű lett az izomzat, mely önmagában is alacsonyabb termékenyülést okoz (valószínűleg a csökkent testzsírszázalék miatt). A megjelenő káros fenotípusok (nehezebb vemhesülési képesség, mozgásszervi problémák) alapján elmondhatjuk, hogy tenyésztési szempontból nem ideális ennek a módszernek az alkalmazása izomtömeg növekedésre szelektált fajtán.

A Pannon fehér esetében tapasztalt, fentebb leírt tulajdonságok miatt nem sikerült az alapító állat továbbtenyésztése, a génmódosított vonal létrehozása. Ezért a két fajta miosztatin mutáns vonalainak összehasonlítását nem tudtuk elvégezni.

A Hycole hím szaporodásbiológiai tulajdonságaiban nem tapasztaltunk eltérést, spermájával sikeresen termékenyítettünk mesterségesen kontroll nőtényeket. Azonban a tenyésztés során a megszülető utódok között nem azonosítottunk homozigóta egyedeket az F2, ill. az F3 generációban sem.

Embrionális korban is (egérben kilenc és fél napos kortól) detektáltak már miosztatin expressziót. A miosztatin kezdetben specifikusan a fejlődő szomiták miotóm rétegében fejeződik ki, ahol a vázizmok kialakulását, növekedését segíti elő (McPherron et al. 1997; Amthor et al. 2004). Valószínűsítjük, hogy esetünkben az előidézett mutáció olyan formában jelent meg, mely homozigótákban élettal összeegyeztethetetlen változásokat idézett elő embrionális, vagy magzati korban. Más nyúl miosztatinnal kapcsolatos kísérletekben születtek homozigóta egyedek is (Lv et al. 2016, Guo et al. 2016). Ennek magyarázata lehet, hogy ezen csoportok nem húsnyúl fajtán idéztek

elő módosításokat, hanem laboratóriumi körökben általános használatos Új-zélandi fehér fajtát használtak. A homozigóta állatok hiánya felveti a kérdést, hogy vajon mikor és miért pusztulhattak el a Mendeli öröklődés szabálya alapján várható homozigóta egyedek. Ennek feltérképezésére további vizsgálatok szükségesek, melyekkel jobban megérthetnénk a miosztatin embrionális, illetve magzati korban betöltött szerepét.

A Pannon fehér nőtény kezdeti egyedfejlődése során a legnagyobb testtömeggel bírt alomtársaihoz képest, majd a 15 hetes korától megjelenő mozgásproblémák lecsökkentették növekedési rátáját. Tehát elmondható, hogy a miosztatin hiány ennél az állatnál nagyobb testtömeget is eredményezett, egészen a nem várt fenotípus kialakulásáig. Az utódok megszületésének hányában azonban statisztikailag értékelhető szignifikáns testtömeg különbséget nem tudtunk kimutatni.

A Hycole alapú miosztatin mutáns vonalnál nem tapasztaltunk szignifikáns növekedést a heterozigóta egyedek testtömegében. Bár a CT alapján számított izom térfogat a 8BKK.H hímnél a legnagyobb volt a csoportjában, de ezt később nem tudtuk megerősíteni utódainak vizsgálataival. A miosztatin hiányra jellemző szuperizmolt fenotípust nem figyeltünk meg egyik heterozigóta állatunk esetében sem. Előfordulhat, hogy csak teljes miosztatin hiány esetén alakult volna ki jelentős izomtömeg növekedés.

R. Guo és munkatársai (2016) megfigyeltek miosztatin hiányos nyulakban szignifikánsan nagyobb testtömeget, de ezzel egyidejűleg egy káros tulajdonság megjelenését is detektálták, ami a korai elhullás egyik oka lehetett (nyelv megnagyobbodás). Ahogy szuperizmoltságot, úgy ezt a jelenséget sem tapasztaltuk kísérleteink során egyik élő, vagy elhullot utódnál sem.

Úgy tűnik, hogy a fajtaválasztás befolyásolhatja a miosztatin szint csökkenés következményeinek kialakulását. Az eleve nagyobb fejlődési potenciállal rendelkező Pannon fehér fajtában eltérő módon tudott érvényesülni a miosztatin hiányának hatása, az idegrost gyulladás már az alapító egyednél kialakult, és az adipogenezis is zavart szenvedett. Nemcsak a vázizomhoz köthető zsír raktárak felhalmozása csökkent, hanem a test számos szövetének zsírtartalma is megváltozott. Ennek következménye lehet a myelin hüvelyek nem megfelelő alakulása, és az idegrendszeri problémák megjelenése.

A Hycole vonal tenyésztése során is megjelent ez a fenotípus már az F1 generáció első alomjának egy hím állatában. Az idegrost elfajulás nem mindig járt együtt csökkent zsírszövettel, ivarfüggetlenül jelent meg, almonként legfeljebb egy állatnál. A tenyésztés során a Hycole fajta-hoz kevert Pannon fehér genetikai hátterének hatásával sem mutatott korrelációt az említett jelenség megjelenése. Jellemzően felnőtt korban alakult ki, kisnyulak esetében még nem volt megfigyelhető. Az idegrendszeri elváltozások kialakulásának háttere nem tisztázott, részletes megismerésére további kutatásokra lenne szükség.

Ezen eredményeink alátámasztják, hogy a hosszú évekig/évtizedekig tartó tenyésztési munka során kialakított izomtömeget, mint biológiai tulajdonságot nem lehet a végletekig növelni mellékhatások nélkül, ha egyáltalán lehet további pozitív hatást előidézni. Hasonló jelenség figyelhető meg transzgenikus pisztrángok esetében is, ahol a növekedési hormon túlexpresszáltatásával vad pisztrángok méretét tudták növelni, de a tenyésztett állatoknál már nem figyeltek meg jelentős méretbeli változást (Devlin et al. 2001).

A miosztatin fontos szerepet tölt be a placenta anyagcserefolyamatainak szabályozásában is (Peiris and Mitchell 2012), de heterozigóta Hycole nőstény állataink esetében nem figyeltünk meg megváltozott termékenyülési/vemhesülési képességet, utódaik a vad típusú almok jellemzőivel bírtak.

Sikeresen kidolgoztunk egy lentivírus alapú extraembrionális szövet-specifikus modellrendszert nyúlban, mely a placentális miosztatin funkciójának részletesebb tanulmányozására alkalmas lehet. Ez a rendszer bizonyítottan csak az extraembrionális szövetekben eredményez transzgen expressziót. A miosztatin extraembrionális szövet-specifikus inaktiválása mellett akár lehetőség van a riportergén miosztatinra való cseréjével, (vagy mögé építésével) szövet-specifikus miosztatin szint növelésre, mely lehetőséget teremt a placenta miosztatin mediált folyamatainak vizsgálatára.

A miosztatin KO nyulak, élelmiszeripari terméként való forgalmazását egyelőre nem javasolnám. Véleményem szerint a hosszú tenyésztési folyamatok eredményeként létrehozott húsnyúl fajták testtömeg gyarapodásánál nem nyújtott szignifikánsan többet az általunk létrehozott transzgenikus nyúl, ellenben a tenyésztés szempontjából kevésbé előnyös tulajdonságok (nehéz termékenyülés, idegrendszeri zavarok általi mozgásproblémák) is megjelentek. Ezt az 5 BBK nőstényünk kiválóan reprezentálja. Esetlegesen előnyt jelenthet a többvonalas hibrid nyulak kiváltása olyan módon, hogy a nagyon jó anyai tulajdonságokra szelektált vonalon végezzük el a miosztatin kiütését, így létrehozva olyan fajtát, mely megfelelően izmolt, és egyben jó anyai tulajdonságokkal rendelkezik. Ilyen nyúlvonalon a negatív hatások még valószínűleg nem jelennének meg. Ennek tesztelése azonban további kísérleteket igényel.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A miosztatin egy széleskörűen vizsgált fehérje, amely elsősorban a vázizomzat fejlődésének negatív szabályozó faktora, de szerepet játszik a glükóz metabolizmusban, a placentális tápanyag felvétel szabályozásában, befolyásolja az adipogenezis folyamatát, emellett a szívizomzatra is hatással van.

Célul tűztük ki a miosztatin hiány által előidézett elváltozások megismerését nyúlban, melyet újgenerációs genomszerkesztéssel létrehozott KO állatokon kívántunk elvégezni. Elsődleges feladatunk volt miosztatin génkiütött nyúlvonalak létrehozása specifikus helyen indukált mutációk előidézésével. Továbbiakban, a Pannon fehér fokozott izomnövekedésre szelektált nyúlfajtán és a laboratóriumokban előszeretettel alkalmazott Hycote fajtán kialakított miosztatin KO nyúlvonalak összehasonlító vizsgálatával terveztük feltárni a genetikai háttér hatását a génkiütéssel előidézett fenotípus megjelenésére. A másik célunk volt olyan modellrendszer kidolgozása, mellyel a placentában található miosztatinra irányuló vizsgálatok könnyen kivitelezhetők.

Először TALEN technikával igyekeztünk célzott mutációt előidézni a nyúl miosztatin génjén, majd két TALEN pár eredménytelen alkalmazása után váltottunk az akkoriban terjedőben lévő CRISPR/Cas9 módszerre. Ezzel az eljárással könnyen és gyorsan sikerült mutációt előidézni a miosztatin gén második exonján.

Az embriókban való tesztelés után, a kiválasztott CRISPR/Cas9 konstrukció a megszülető utódok 20%-ánál indukált monoallélikus mutagenezist. A vonalalapításra kiválasztott két egyedben az előidézett deléciók megakadályozták a fehérje expressziót.

Az általunk létrehozott utódok egyike sem mutatott a korábban leírt miosztatin KO állatokéhoz hasonló, megnövekedett izomtömeget, vagy megnagyobbodott nyelv méretet (Wang et al. 2015; Guo et al. 2016).

A 11 bp delécióval rendelkező alapítónak kiválasztott nőstény Pannon fehér genetikai háttérrel rendelkezett, mely a tenyésztési folyamatok eredményeként jelentős izomtömeeggel bírt. Ez az egyik oka lehet annak, hogy az előidézett miosztatin hiány már nem okozott szignifikáns növekedést az vázizomzat tömegében. A zsírszövet felhalmozásban is figyeltünk meg változást, jelentősen csökkent zsír/izom arányt detektálunk CT segítségével a kontroll egyedekhez képest. Ennél az alapító egyednél termékenyülési problémákat észleltünk, és az összesen két megszülető utóda is elpusztult a születés után pár órával. A termékenységi gondok hátterében állhat az állat fitneszét befolyásoló jelentősen csökkent zsírszövet raktára, illetve a körülbelül három és fél hónapos korban jelentkező, főleg hátsó végtagokat érintő bénulása, mely ellehetetlenítette az utódgondozást

is. Sajnos nem sikerült vonalat alapítani ebből az állatból, így a két nyúlajtán kialakított fenotípus összehasonító vizsgálatait nem tudtuk elvégezni.

A 14 bp deléciót tartalmazó hím egyed Hycole fajtából származott, ennek tovább tenyésztése sikeres volt, de homozigóta egyedeket egyik F2-F3 alomban sem azonosítottunk. Erre magyarázat lehet, a miosztatin teljes hiányának embriófejlődésre gyakorolt káros hatása, mely az embriók/magzatok anyaméhben történő elhullásához vezetett. A megszülető utódok között nem tapasztaltunk jelentős zsírszövet csökkenést, mint ahogy azt a Pannon fehér alapító esetében észleltük.

A transzgénikus vonal egyes heterozigóta egyedeinél megfigyeltünk olyan degenerációs tünetet, amelyet a másik alapító nőstényünk is mutatott. A mozgással kapcsolatos problémák minden esetben a hátsó végtagokkal kezdődtek, és az idő előre haladtával a törzs, és mellső végtagok is érintetté váltak. Ez a fenotípus a *nervus tibialis* heveny idegrostelfajulása következtében alakult ki. Feltételezésünk szerint a csökkent miosztatin szint felborította a normál zsír anyagcserét, és a mozgató neuronok mielinhüvelyei degenerálódtak, ezáltal felborítva az ingerület terjedését. Már korábban más csoportok létrehoztak miosztatin KO nyulakat (Guo et al. 2016; Lv et al. 2016), de a miosztatin hiányában fellépő idegrendszeri problémát a mi csoportunk tapasztalta először. Hayasi és munkatársai (2018) mutattak ki intenzív miosztatin expressziót patkány központi idegrendszerében, de pontos szerepe még nem tisztázott. Munkánk során bizonyítottuk, hogy már a miosztatin szint felére csökkenése esetén is az idegrendszerben súlyos elváltozások jöhetnek létre, ezáltal kutatásunk rávilágít a miosztatin idegrendszerben betöltött szerepének fontosságára.

A miosztatin pontos szerepe a placenta glükóz-metabolizmusában máig nem teljesen ismert. A nyúl, mint modellállat sok szempontból alkalmasabb a placenta betegségeinek, molekuláris folyamatainak vizsgálatára, mint az egér vagy patkány modellek. Ezért kifejlesztettünk olyan lentivírus alapú, placenta-specifikus géntranszferrel előállított nyúlmodell rendszert, mely alkalmas a placenta miosztatin-közvetített folyamatainak részletes vizsgálatára. Extraembrionális szövet-specifikus GFP expressziót tudunk indukálni, melyet nyolc darab 14,5 napos nyúl magzathoz kapcsolt placentában és szikzacskóban könnyen lehetett detektálni mikroszkóp, illetve RT-PCR segítségével. Négy placenta és két szikzacskó mutatott különböző mértékű GFP expresszót. Emellett mintánként eltérő arányú mozaikosságot figyeltünk meg. Ez a rendszer további vizsgálatok alapjául szolgálhat a placenta betegségeinek tanulmányozása során.

7. SUMMARY

Myostatin is a well investigated protein, which is the main negative regulatory factor in skeletal muscle development and growth. Myostatin also plays pivotal roles in cardiac growth and metabolism, glucose metabolism, placental nutrition uptake and adipogenesis.

Our aim was to investigate the function of myostatin in myostatin KO rabbit generated by new generation genome editing method. Our first goal was myostatin knock out rabbit line production, via inducing mutagenesis in specific target site.

Besides, we intended comparative analysis of the effect of genetic background for myostatin-null phenotype between Pannon white breed, selected for muscle growth and Hycole breed.

The myostatin mediated metabolism in placenta is not well known process, and needed further research. Therefore, development of model system for placental myostatin investigation was our other aim.

We started the myostatin KO rabbit line generation with TALEN technology, but after two failed TALEN constructs, the novel CRISPR/Cas9 system was applied in transgenesis. This method was proved successful in generation of mutation in the second exon of rabbit myostatin gene. After embryo testing, the selected CRISPR construct caused monoallelic mutation in 10% of offspring. These mutations inhibited the normal function of the gene, and protein expression was impeded.

Our myostatin mutant animals haven't showed typical double-muscled phenotype, or increased tongue muscle mass, like in other myostatin KO rabbit, or pig (Wang et al. 2015; Guo et al. 2016).

One of the founder animals possessed Pannon White genetic background with considerable muscle mass, resulted from breeding, this is why the absence of myostatin didn't caused increased muscle growth. Unfortunately, this founder animal was fertilized difficultly, and the only litter with two pups was died in couple hours age. The background of fertilization problems was presumably the decreased adipogenesis, and the „paralysis” of posterior limb. So, the transgenic line generation was not possible based on this animal, therefore the comparative analysis of phenotypes from two rabbit line was not prepared.

The other founder animal with induced 14 bp deletion originated from Hycole breed. During the breeding of this transgenic line, we have never observed homozygote myostatin KO offspring. The explanation of this phenomenon could be, that the myostatin absence caused

harmful influence for embryo development, resulting embryo perish in the uterus. Significant decreased adipose tissue haven't noticed in the offspring of this line, as in case of Pannon White founder.

We detected new phenotype in several heterozygote animal of this transgenic rabbit line, like in the other founder animal. The disorder in movement always began with posterior limb, and later the body, and anterior limb became involved. This phenotype was caused by nerve fiber (*nervus tibialis*) degeneration. Our hypothesis was, that the decreased myostatin level generated alter fat metabolism, so, the Myelin sheath was degenerated, and the excitation spreading was overturned. Although, other groups generated myostatin KO rabbits, we noticed this important altered phenotype at first (Guo et al. 2016; Lv et al. 2016). Previously, Y. Hayashi and his colleague (2018) published myostatin expression in rat central nervous system, but it's role was not elucidated.

We verified, that serious deformation can developed in the nervous system beside decreased half of myostatin level, so this study shed light the importance of myostatin in peripheral nervous system.

The role of myostatin in placental activity is not yet clear. The rabbit, as model animal, is more suitable organism to study the placental diseases, than mouse or rat models. Therefore, we developed rabbit model with placenta-specific gene transfer based on lentiviral transgenesis. In age of 14.5 day fetuses, GFP reporter protein expression could be detected lightly with microscopy and PCR analysis in extraembryonic tissues as placenta or yolk sac from eight animals. Four placenta, and two yolk sac showed GFP expression in different intensity. Some extent of mosaicism was observable in different the tissue samples. This model system easily utilizable during further research for examination of myostatin mediated glucose metabolism in placenta.

8. MELLÉKLETEK

8.1. Irodalomjegyzék

1. Allen, D.L. and Unterman, T.G. (2007) 'Regulation of Myostatin Expression and Myoblast Differentiation by FoxO and SMAD Transcription Factors'. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 292 (1), 188–199
2. Allen, D.L., Cleary, A.S., Speaker, K.J., Lindsay, S.F., Uyenishi, J., Reed, J.M., Madden, M.C., and Mehan, R.S. (2008) 'Myostatin, Activin Receptor IIb, and Follistatin-like-3 Gene Expression Are Altered in Adipose Tissue and Skeletal Muscle of Obese Mice'. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 294 (5), 918–927
3. Allen, D.L. and Unterman, T.G. (2007) 'Regulation of Myostatin Expression and Myoblast Differentiation by FoxO and SMAD Transcription Factors'. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 292 (1), 188–199
4. Amirouche, A., Durieux, A.C., Banzet, S., Koulmann, N., Bonnefoy, R., Mouret, C., Bigard, X., Peinnequin, A., and Freyssenet, D. (2009) 'Down-Regulation of Akt/Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway in Response to Myostatin Overexpression in Skeletal Muscle'. *Endocrinology* 150 (1), 286–294
5. Amthor, H., Huang, R., McKinnell, I., Christ, B., Kambadur, R., Sharma, M., and Patel, K. (2002) 'The Regulation and Action of Myostatin as a Negative Regulator of Muscle Development during Avian Embryogenesis'. *Developmental Biology* 251 (2), 241–257
6. Amthor, H., Nicholas, G., McKinnell, I., Kemp, C.F., Sharma, M., Kambadur, R., and Patel, K. (2004) 'Follistatin Complexes Myostatin and Antagonises Myostatin-Mediated Inhibition of Myogenesis'. *Developmental Biology* 270 (1), 19–30
7. Andersson, A.F. and Banfield, J.F. (2008) 'Virus Population Dynamics and Acquired Virus Resistance in Natural Microbial Communities'. *Science* 320 (5879), 1047–1050
8. Antony, N., Bass, J.J., McMahon, C.D., and Mitchell, M.D. (2007) 'Myostatin Regulates Glucose Uptake in BeWo Cells'. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 293 (5), 1296–1302
9. Anzalone, A. V., Koblan, L.W., and Liu, D.R. (2020) 'Genome Editing with CRISPR–Cas Nucleases, Base Editors, Transposases and Prime Editors'. *Nature Biotechnology* 38 (7), 824–844

10. Artaza, J.N., Bhasin, S., Mallidis, C., Taylor, W., Ma, K., and Gonzalez-Cadavid, N.F. (2002) 'Endogenous Expression and Localization of Myostatin and Its Relation to Myosin Heavy Chain Distribution in C2C12 Skeletal Muscle Cells'. *Journal of Cellular Physiology* 190 (2), 170–179
11. Barrangou, R., Fremaux, C., H el ene, D., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. a, and Horvath, P. (2007) 'CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes'. *Science* 315 (March), 1709–1712
12. Barrangou, R. and Horvath, P. (2012) 'CRISPR: New Horizons in Phage Resistance and Strain Identification'. *Annual Review of Food Science and Technology* 3 (1), 143–162
13. Barrangou, R. and Marraffini, L.A. (2014) 'CRISPR-Cas Systems: Prokaryotes Upgrade to Adaptive Immunity'. *Molecular Cell* 54 (2), 234–244
14. Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., Patron, N.J., and Nekrasov, V. (2015) 'Editing Plant Genomes with CRISPR/Cas9'. *Current Opinion in Biotechnology* 32, 76–84
15. Bellinge, R.H.S., Liberles, D.A., Iaschi, S.P.A., O'Brien, P.A., and Tay, G.K. (2005) 'Myostatin and Its Implications on Animal Breeding: A Review'. *Animal Genetics* 36 (1), 1–6
16. Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., Bonas, U., Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., and Bonas, U. (2009) 'Breaking the Code of DNS Binding Specificity of TAL-Type III Effectors'. *Science* 326 (5959), 1509–1512
17. Boch, J. and Bonas, U. (2010) 'Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function'. *Annual Review of Phytopathology* 48, 419–436
18. Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., and Dusko Ehrlich, S. (2005) 'Clustered Regularly Interspaced Short Palindrome Repeats (CRISPRs) Have Spacers of Extrachromosomal Origin'. *Microbiology* 151 (8), 2551–2561
19. Bonetto, A., Penna, F., Minero, V.G., Reffo, P., Costamagna, D., Bonelli, G., Baccino, F.M., and Costelli, P. (2011) 'Glutamine Prevents Myostatin Hyperexpression and Protein Hypercatabolism Induced in C2C12 Myotubes by Tumor Necrosis Factor- α '. *Amino Acids* 40 (2), 585–594
20. Bowen, J.M., Chamley, L., Mitchell, M.D., and Keelan, J.A. (2002) 'Cytokines of the Placenta and Extra-Placental Membranes: Biosynthesis, Secretion and Roles in Establishment of Pregnancy in Women'. *Placenta* 23 (4), 239–256

21. Breitbart, A., Auger-Messier, M., Molkenin, J.D., and Heineke, J. (2011) 'Myostatin from the Heart: Local and Systemic Actions in Cardiac Failure and Muscle Wasting'. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300, H1973–H1982
22. Brinster, R.L., Chen, H.Y., Trumbauer, M., Senechal, A.W., Warren, R., and Palmiter, R.D. (1981) 'Somatic Expression of Herpes Thymidine Kinase in Mice Following Injection of a Fusion Gene into Eggs'. *Cell* 27 (1 PART 2), 223–231
23. Cade, L., Reyon, D., Hwang, W.Y., Tsai, S.Q., Patel, S., Khayter, C., Joung, J.K., Sander, J.D., Peterson, R.T., and Yeh, J.R.J. (2012) 'Highly Efficient Generation of Heritable Zebrafish Gene Mutations Using Homo- and Heterodimeric TALENs'. *Nucleic Acids Research* 40 (16), 8001–8010
24. Carlson, D.F., Tan, W., Lillico, S.G., Stverakova, D., Proudfoot, C., Christian, M., Voytas, D.F., Long, C.R., Whitelaw, C.B.A., and Fahrenkrug, S.C. (2012) 'Efficient TALEN-Mediated Gene Knockout in Livestock'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (43), 17382–17387
25. Casas, E., Keele, J.W., Shackelford, S.D., Koohmaraie, M., Sonstegard, T.S., Smith, T.P.L., Kappes, S.M., and Stone, R.T. (1998) 'Association of the Muscle Hypertrophy Locus with Carcass Traits in Beef Cattle'. *Journal of Animal Science* 76 (2), 468–473
26. Cho, S.W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H.S., Bae, S., and Kim, J.S. (2014) 'Analysis of Off-Target Effects of CRISPR/Cas-Derived RNA-Guided Endonucleases and Nickases'. *Genome Research* 24 (1), 132–141
27. Clarke, R., Heler, R., MacDougall, M.S., Yeo, N.C., Chavez, A., Regan, M., Hanakahi, L., Church, G.M., Marraffini, L.A., and Merrill, B.J. (2018) 'Enhanced Bacterial Immunity and Mammalian Genome Editing via RNA-Polymerase-Mediated Dislodging of Cas9 from Double-Strand DNA Breaks'. *Molecular Cell* 71 (1), 42-55.e8.
28. Clop, A., Marcq, F., Takeda, H., Pirottin, D., Tordoir, X., Bibé, B., Bouix, J., Caiment, F., Elsen, J.M., Eycheenne, F., Larzul, C., Laville, E., Meish, F., Milenkovic, D., Tobin, J., Charlier, C., and Georges, M. (2006) 'A Mutation Creating a Potential Illegitimate MicroRNA Target Site in the Myostatin Gene Affects Muscularity in Sheep'. *Nature Genetics* 38 (7), 813–818
29. Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., and Zhang, F. (2013) 'Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems'. *Science* (6121), 819–824
30. Costantini, F. and Lacy, E. (1981) 'Introduction of a Rabbit Beta-Globin Gene into The Mouse Germ Line'. *Nature* 294, 92-94

31. Cradick, T.J., Qiu, P., Lee, C.M., Fine, E.J., and Bao, G. (2014) 'COSMID: A Web-Based Tool for Identifying and Validating CRISPR/Cas off-Target Sites'. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 3 (12), e214
32. Cribbs, A.P. and Perera, S.M.W. (2017) 'Science and Bioethics of CRISPR-CAS9 Gene Editing: An Analysis towards Separating Facts and Fiction'. *Yale Journal of Biology and Medicine* 90 (4), 625–634
33. Curtin, S.J., Zhang, F., Sander, J.D., Haun, W.J., Starker, C., Baltes, N.J., Reyon, D., Dahlborg, E.J., Goodwin, M.J., Coffman, A.P., Dobbs, D., Joung, J.K., Voytas, D.F., and Stupar, R.M. (2011) 'Targeted Mutagenesis of Duplicated Genes in Soybean with Zinc-Finger Nucleases'. *Plant Physiology* 156 (2), 466–473
34. Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J., and Charpentier, E. (2011) 'CRISPR RNA Maturation by Trans-Encoded Small RNA and Host Factor RNase III'. *Nature* 471 (7340), 602–607
35. Devlin, R.H., Biagi, C.A., Yesaki, T.Y., Smailus, D.E., and Byatt, J.C. (2001) 'Growth of Domesticated Transgenic Fish'. *Nature* 409 (6822), 781–782
36. Dominique, J.E. and Gérard, C. (2006) 'Myostatin Regulation of Muscle Development: Molecular Basis, Natural Mutations, Physiopathological Aspects'. *Experimental Cell Research* 312 (13), 2401–2414
37. Doudna, J.A. and Charpentier, E. (2014) 'The New Frontier of Genome Engineering with CRISPR-Cas9'. *Science* 346 (6213)
38. Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L. (1998) 'A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System'. *Journal of Virology* 72 (11), 8463–8471
39. Druet J., Ahariz N., Camisano N., Tamma N., Michaux C., Coppieters W., Charlier C., and Georges M. (2014) 'Selection in action: dissecting the molecular underpinnings of the increasing muscle mass of Belgian Blue Cattle'. *BMC Genomics* 15:796
40. Elliott, B., Renshaw, D., Getting, S., and Mackenzie, R. (2012) 'The Central Role of Myostatin in Skeletal Muscle and Whole Body Homeostasis'. *Acta Physiologica* 205 (3), 324–340
41. Fan, X., Ren, P., Dhal, S., Bejerano, G., Goodman, S.B., Druzin, M.L., Gambhir, S.S., and Nayak, N.R. (2011) 'Noninvasive Monitoring of Placenta-Specific Transgene Expression by Bioluminescence Imaging'. *PLoS ONE* 6 (1) e16348

42. Fan, X., Petitt, M., Gamboa, M., Huang, M., Dhal, S., Druzin, M.L., Wu, J.C., Chen-Tsai, Y., and Nayak, N.R. (2012) 'Transient, Inducible, Placenta-Specific Gene Expression in Mice'. *Endocrinology* 153 (11), 5637–5644
43. Feng, X.H. and Derynck, R. (2005) 'Specificity and Versatility in TGF- β Signaling through Smads'. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21, 659–693
44. Frost, R.A. and Lang, C.H. (2007) 'Protein Kinase B/Akt: A Nexus of Growth Factor and Cytokine Signaling in Determining Muscle Mass'. *Journal of Applied Physiology* 103 (1), 378–387
45. Gamer, L.W., Wolfman, N.M., Celeste, A.J., Hattersley, G., Hewick, R., and Rosen, V. (1999) 'A Novel BMP Expressed in Developing Mouse Limb, Spinal Cord, and Tail Bud Is a Potent Mesoderm Inducer in *Xenopus* Embryos'. *Developmental Biology* 208 (1), 222–232
46. Gao, J., Luo, T., Lin, N., Zhang, S., and Wang, J. (2020) 'A New Tool for CRISPR-Cas13a-Based Cancer Gene Therapy'. *Molecular Therapy - Oncolytics* 19 (December), 79–92
47. Garrels, W., Ivics, Z., and Kues, W.A. (2012) 'Precision Genetic Engineering in Large Mammals'. *Trends in Biotechnology* 30 (7), 386–393
48. Gil-Farina, I. and Schmidt, M. (2016) 'Interaction of Vectors and Parental Viruses with the Host Genome'. *Current Opinion in Virology* 21, 35–40
49. Gill, J.L., Bishop, S.C., McCorquodale, C., Williams, J.L., and Wiener, P. (2009) 'Associations between the 11-Bp Deletion in the Myostatin Gene and Carcass Quality in Angus-Sired Cattle'. *Animal Genetics* 40 (1), 97–100
50. Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., and Ruddle, F.H. (1980) 'Genetic Transformation of Mouse Embryos by Microinjection of Purified DNA.' *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (12), 7380–7384
51. Gordon, J.W. and Ruddle, F.H. (1981) 'Integration and Stable Germ Line Transmission of Genes Injected into Mouse Pronuclei'. *Science* 214 (4526), 1244–1246
52. Grobet, L., Martin, L.J.R., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., M'nisier, F., Massabanda, J., Fries, R., Hanset, R., and Georges, M. (1997) 'A Deletion in the Bovine Myostatin Gene Causes the Double-Muscléd Phenotype in Cattle'. *Nature Genetics* 17 (1), 71–74
53. Guo, R., Wan, Y., Xu, D., Cui, L., Deng, M., Zhang, G., Jia, R., Zhou, W., Wang, Z., Deng, K., Huang, M., Wang, F., and Zhang, Y. (2016) 'Generation and Evaluation of Myostatin Knock-out Rabbits and Goats Using CRISPR/Cas9 System'. *Scientific Reports* 6 (29855), 1–10

54. Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad, C.E., Wall, R.J., Bolt, D.J., Ebert, K.M., Palmiter, R.D., and Brinster, R.L. (1985) 'Production of Transgenic Rabbits, Sheep and Pigs by Microinjection'. *Nature* 315 (6021), 680–683
55. Hayashi, Y., Mikawa, S., Ogawa, C., Masumoto, K., Katou, F., and Sato, K. (2018) 'Myostatin Expression in the Adult Rat Central Nervous System'. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 94, 125–138
56. He, Z., Zhang, T., Jiang, L., Zhou, M., Wu, D., Mei, J., and Cheng, Y. (2018) 'Use of CRISPR/Cas9 Technology Efficiently Targeted Goat Myostatin through Zygotes Microinjection Resulting in Double-Muscle Phenotype in Goats'. *Bioscience Reports* 38 (6), 1–8
57. Hill, J.J., Davies, M. V., Pearson, A.A., Wang, J.H., Hewick, R.M., Wolfman, N.M., and Qiu, Y. (2002) 'The Myostatin Propeptide and the Follistatin-Related Gene Are Inhibitory Binding Proteins of Myostatin in Normal Serum'. *Journal of Biological Chemistry* 277 (43), 40735–40741
58. Hill, J.J., Qiu, Y., Hewick, R.M., and Wolfman, N.M. (2003) 'Regulation of Myostatin in Vivo by Growth and Differentiation Factor-Associated Serum Protein-1: A Novel Protein with Protease Inhibitor and Follistatin Domains'. *Molecular Endocrinology* 17 (6), 1144–1154
59. Hino, S., Fan, J., Tagawa, S., Akasaka, K., and Matsuoka, M. (2004) 'Sea Urchin Insulator Protects Lentiviral Vector from Silencing by Maintaining Active Chromatin Structure'. *Gene Therapy* 11 (10), 819–828
60. Hiripi, L., Negre, D., Cosset, F.L., Kvell, K., Czömpöly, T., Baranyi, M., Gócza, E., Hoffmann, O., Bender, B., and Bosze, Z. (2010) 'Transgenic Rabbit Production with Simian Immunodeficiency Virus-Derived Lentiviral Vector'. *Transgenic Research* 19 (5), 799–808
61. Hockemeyer, D., Wang, H., Kiani, S., Lai, C.S., Gao, Q., John, P., Cost, G.J., Zhang, L., Santiago, Y., Miller, J.C., Cheron, J.M., Meng, X., Hinkley, S.J., Rebar, E.J., Gregory, D., Urnov, F.D., and Jaenisch, R. (2012) 'Genetic Engineering of Human ES and IPS Cells Using TALE Nucleases'. *Nat Biotechnol* 29 (8), 731–734
62. Hofmann, A., Kessler, B., Ewerling, S., Weppert, M., Vogg, B., Ludwig, H., Stojkovic, M., Boelhauve, M., Brem, G., Wolf, E., and Pfeifer, A. (2003) 'Efficient Transgenesis in Farm Animals by Lentiviral Vectors'. *EMBO Reports* 4 (11), 1054–1058
63. Hofmann, A., Kessler, B., Ewerling, S., Kabermann, A., Brem, G., Wolf, E., and Pfeifer, A. (2006) 'Epigenetic Regulation of Lentiviral Transgene Vectors in a Large Animal Model'. *Molecular Therapy* 13 (1), 59–66

64. Hryhorowicz, M., Lipiński, D., Zeyland, J., and Słomski, R. (2017) 'CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering'. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 65 (3), 233–240
65. Hwang, J. and Maquat, L.E. (2011) 'Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD) in Animal Embryogenesis: To Die or Not to Die, That Is the Question'. *Bone* 23 (1), 1–7
66. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., and Nakamura, A. (1987) 'Nucleotide Sequence of the *iap* Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isoenzyme Conversion in *Escherichia Coli*, and Identification of the Gene Product'. *Journal of Bacteriology* 169 (12), 5429–5433
67. Jaenisch, R. and Mintz, B. (1974) 'Simian Virus 40 DNA Sequences in DNA of Healthy Adult Mice Derived from Preimplantation Blastocysts Injected with Viral DNA'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (4), 1250–1254
68. Jansen, R., Van Embden, J.D.A., Gaastra, W., and Schouls, L.M. (2002) 'Identification of Genes That Are Associated with DNA Repeats in Prokaryotes'. *Molecular Microbiology* 43 (6), 1565–1575
69. Jin, D.I., Kim, D.K., Im, K.S., and Choi, W.S. (2000) 'Successful Pregnancy after Transfer of Raggit Blastocysts Grown in Vitro from Single-Cell Zygotes'. *Theriogenology* (1995), 74–76
70. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012b) 'A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity'. *Science* 337 (6096), 816–821
71. Joulia-Ekaza, D. and Cabello, G. (2007) 'The Myostatin Gene: Physiology and Pharmacological Relevance'. *Current Opinion in Pharmacology* 7 (3), 310–315
72. Katter, K., Geurts, A.M., Hoffmann, O., Mátés, L., Landa, V., Hiripi, L., Moreno, C., Lazar, J., Bashir, S., Zidek, V., Popova, E., Jerchow, B., Becker, K., Devaraj, A., Walter, I., Grzybowksi, M., Corbett, M., Rangel Filho, A., Hodges, M.R., Bader, M., Ivics, Z., Jacob, H.J., Pravenec, M., Bösze, Z., Rüllicke, T., and Izsvák, Z. (2013) 'Transposon-Mediated Transgenesis, Transgenic Rescue, and Tissue-Specific Gene Expression in Rodents and Rabbits'. *FASEB Journal* 27 (3), 930–941
73. Kleinstiver, B.P., Pattanayak, V., Prew, M.S., Tsai, S.Q., Nguyen, N.T., Zheng, Z., and Joung, J.K. (2016) 'High-Fidelity CRISPR-Cas9 Nucleases with No Detectable Genome-Wide off-Target Effects'. *Nature* 529 (7587), 490–495

74. Kobolák, J. and Gócza, E. (2002) 'The Role of the Myostatin Protein in Meat Quality - A Review'. *Archives Animal Breeding* 45 (2), 159–170
75. Kubota, K., Kent, L.N., Rumi, M. K., Roby, K.F., and Soares, M.J. (2015) 'Dynamic Regulation of Ap-1 Transcriptional Complexes Directs Trophoblast Differentiation'. *Molecular and Cellular Biology* 35 (18), MCB.00118-15
76. Kumasawa, K., Ikawa, M., Kidoya, H., Hasuwa, H., Saito-Fujita, T., Morioka, Y., Takakura, N., Kimura, T., and Okabe, M. (2011) 'Pravastatin Induces Placental Growth Factor (PGF) and Ameliorates Preeclampsia in a Mouse Model'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (4), 1451–1455
77. Kvell, K., Nguyen, T.H., Salmon, P., Glauser, F., Werner-Favre, C., Barnet, M., Schneider, P., Trono, D., and Zubler, R.H. (2005) 'Transduction of CpG DNA-Stimulated Primary Human B Cells with Bicistronic Lentivectors'. *Molecular Therapy* 12 (5), 892–899
78. Lackner, D.H., Carré, A., Guzzardo, P.M., Banning, C., Mangena, R., Henley, T., Oberndorfer, S., Gapp, B. V., Nijman, S.M.B., Brummelkamp, T.R., and Bürckstümmer, T. (2015) 'A Generic Strategy for CRISPR-Cas9-Mediated Gene Tagging'. *Nature Communications* 6, 4–10
79. Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R., and Berns, A. (1991) 'Simplified Mammalian DNA Isolation Procedure'. *Nucleic Acids Research* 19 (15), 4293
80. Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S., and Kambadur, R. (2002) 'Myostatin Inhibits Myoblast Differentiation by Down-Regulating MyoD Expression'. *Journal of Biological Chemistry* 277 (51), 49831–49840
81. Lee, D.S., Rumi, M.A.K., Konno, T., and Soares, M.J. (2009) 'In Vivo Genetic Manipulation of the Rat Trophoblast Cell Lineage Using Lentiviral Vector Delivery'. *Genesis* 47 (7), 433–439
82. Lee, S.J. (2004) 'Regulation of Muscle Mass by Myostatin'. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20, 61–86
83. Lee, S.J. (2008) 'Genetic Analysis of the Role of Proteolysis in the Activation of Latent Myostatin'. *PLoS ONE* 3 (2) e1628
84. Lee, S.J. and McPherron, A.C. (2001) 'Regulation of Myostatin Activity and Muscle Growth'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (16), 9306–9311

85. Lei, Y., Guo, X., Liu, Y., Cao, Y., Deng, Y., Chen, X., Cheng, C.H.K., Dawid, I.B., Chen, Y., and Zhao, H. (2012) 'Efficient Targeted Gene Disruption in *Xenopus* Embryos Using Engineered Transcription Activator-like Effector Nucleases (TALENs)'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (43), 17484–17489
86. Li, B., Niu, Y., Ji, W., and Dong, Y. (2020) 'Strategies for the CRISPR-Based Therapeutics'. in *Trends in Pharmacological Sciences*.
87. Li, T., Huang, S., Jiang, W.Z., Wright, D., Spalding, M.H., Weeks, D.P., and Yang, B. (2011) 'TAL Nucleases (TALNs): Hybrid Proteins Composed of TAL Effectors and FokI DNA-Cleavage Domain'. *Nucleic Acids Research* 39 (1), 359–372
88. Liang, P., Xu, Y., Zhang, X., Ding, C., Huang, R., Zhang, Z., Lv, J., Xie, X., Chen, Y., Li, Y., Sun, Y., Bai, Y., Songyang, Z., Ma, W., Zhou, C., and Huang, J. (2015) 'CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing in Human Trippronuclear Zygotes'. *Protein and Cell* 6 (5), 363–372
89. Lin, T.P. (1966) 'Microinjection of Mouse Eggs'. *Science* 151 (3708), 333–337
90. Liu, J., Li, C., Yu, Z., Huang, P., Wu, H., Wei, C., Zhu, N., Shen, Y., Chen, Y., Zhang, B., Deng, W.M., and Jiao, R. (2012) 'Efficient and Specific Modifications of the *Drosophila* Genome by Means of an Easy TALEN Strategy'. *Journal of Genetics and Genomics* 39 (5), 209–215
91. Liu, Y. and Soper, C. (2009) 'The Natural History of Retroviruses: Exogenization vs Endogenization'. *Answers Research Journal* 2, 97–106
92. Lv, Q., Yuan, L., Deng, J., Chen, M., Wang, Y., Li, Z., and Lai, L. (2016a) 'Efficient Generation of Myostatin Gene Mutated Rabbit by CRISPR/Cas9'. *Scientific Reports* 6, 6–13
93. Makarova, K.S., Aravind, L., Grishin, N. V., Rogozin, I.B., and Koonin, E. V. (2002) 'A DNA Repair System Specific for Thermophilic Archaea and Bacteria Predicted by Genomic Context Analysis'. *Nucleic Acids Research* 30 (2), 482–496
94. Makarova, K.S., Grishin, N. V., Shabalina, S.A., Wolf, Y.I., and Koonin, E. V. (2006) 'A Putative RNA-Interference-Based Immune System in Prokaryotes: Computational Analysis of the Predicted Enzymatic Machinery, Functional Analogies with Eukaryotic RNAi, and Hypothetical Mechanisms of Action'. *Biology Direct* 1, 1–26
95. Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Iranzo, J., Shmakov, S.A., Alkhnbashi, O.S., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D.H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J.M., Scott, D., Shah, S.A., Siksnyš, V., Terns, M.P., Venclovas, Č., White, M.F., Yakunin, A.F., Yan, W., Zhang, F., Garrett, R.A., Backofen, R., van der Oost, J., Barrangou, R., and Koonin, E. V. (2020) 'Evolutionary Classification of CRISPR–Cas Systems: A Burst of Class 2 and Derived Variants'. *Nature Reviews Microbiology* 18 (2), 67–83

96. Malashicheva, A., Kanzler, B., Tolkunova, E., Trono, D., Tomilin, A., Kim, S.D., Zhang, J., Jongbloed, M.R.M., Rentschler, S., Moskowitz, I.P.G., Seidman, J., and Fishman, G.I. (2007) 'Lentivirus as a Tool for Lineage-Specific Gene Manipulations'. *Genesis* 45 (2), 76–82
97. Manceau, M., Gros, J., Savage, K., Thomé, V., McPherron, A., Paterson, B., and Marcelle, C. (2008) 'Myostatin Promotes the Terminal Differentiation of Embryonic Muscle Progenitors'. *Genes and Development* 22 (5), 668–681
98. Marraffini, L.A. and Sontheimer, E.J. (2008) 'CRISPR Interference Limits Horizontal Gene Transfer in Staphylococci by Targeting DNA'. *Science* 322 (5909), 1843–1845
99. Matsakas, A. and Diel, P. (2005) 'The Growth Factor Myostatin, a Key Regulator in Skeletal Muscle Growth and Homeostasis'. *International Journal of Sports Medicine* 26 (2), 83–89
100. McFarlane, C., Hennebry, A., Thomas, M., Plummer, E., Ling, N., Sharma, M., and Kambadur, R. (2008) 'Myostatin Signals through Pax7 to Regulate Satellite Cell Self-Renewal'. *Experimental Cell Research* 314 (2), 317–329
101. McFarlane, C., Plummer, P., Thomas, M., Hennebry, A., Ashby, M., Ling, N., Smith, H., Sharma, M., and Kambaduri, R. (2006) 'Myostatin Induces Cachexia by Activating the Ubiquitin Proteolytic System Through an NF-KB-Independent, FoxO1-Dependent Mechanism'. *Journal Cellular Physiology* 211(3), 736–747
102. McPherron, A.C., Lawler, A.M., and Lee, S.-J. (1997) 'Regulation of Skeletal Muscle Mass in Mice by a New TGF- β Superfamily Member'. in *Nature* 387 (6628). 83–90
103. McPherron, A.C. and Lee, S.-J. (2002) 'Suppression of Body Fat Accumulation in Myostatin-Deficient Mice'. *Journal of Clinical Investigation* 109 (5), 595–601
104. Miao, J., Guo, D., Zhang, J., Huang, Q., Qin, G., Zhang, X., Wan, J., Gu, H., and Qu, L.J. (2013) 'Targeted Mutagenesis in Rice Using CRISPR-Cas System'. *Cell Research* 23 (10), 1233–1236
105. Milone, M.C. and O'Doherty, U. (2018) 'Clinical Use of Lentiviral Vectors'. *Leukemia* 32 (7), 1529–1541
106. Mitchell, M.D., Osepchok, C.C., Leung, K.C., McMahon, C.D., and Bass, J.J. (2006) 'Myostatin Is a Human Placental Product That Regulates Glucose Uptake'. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91 (4), 1434–1437
107. Miyoshi, H., Blömer, U., Takahashi, M., Gage, F.H., and Verma, I.M. (1998) 'Development of a Self-Inactivating Lentivirus Vector'. *Journal of Virology* 72 (10), 8150–8157
108. Mojica, F.J.M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., and Soria, E. (2005) 'Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements'. *Journal of Molecular Evolution* 60 (2), 174–182

109. Mojica, F.J.M., Ferrer, C., Juez, G., and Rodríguez-Valera, F. (1995) 'Long Stretches of Short Tandem Repeats Are Present in the Largest Replicons of the Archaea *Haloferax Mediterranei* and *Haloferax Volcanii* and Could Be Involved in Replicon Partitioning'. *Molecular Microbiology* 17 (1), 85–93
110. Morioka, Y., Isotani, A., Oshima, R.G., Okabe, M., and Ikawa, M. (2009) 'Placenta-Specific Gene Activation and Inactivation Using Integrase-Defective Lentiviral Vectors with the Cre/LoxP System'. *Genesis* 47 (12), 793–798
111. Morissette, M.R., Cook, S.A., Buranasombati, C., Rosenberg, M.A., and Rosenzweig, A. (2009) 'Myostatin Inhibits IGF-I-Induced Myotube Hypertrophy through Akt'. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 297 (5), 1124–1132
112. Moro, L.N., Viale, D.L., Bastón, J.I., Arnold, V., Suvá, M., Wiedenmann, E., Olguín, M., Miriuka, S., and Vichera, G. (2020) 'Generation of Myostatin Edited Horse Embryos Using CRISPR/Cas9 Technology and Somatic Cell Nuclear Transfer'. *Scientific Reports* 10 (1), 1–10
113. Mosher, D.S., Quignon, P., Bustamante, C.D., Sutter, N.B., Mellersh, C.S., Parker, H.G., and Ostrander, E.A. (2007) 'A Mutation in the Myostatin Gene Increases Muscle Mass and Enhances Racing Performance in Heterozygote Dogs'. *PLoS Genetics* 3 (5), 779–786
114. Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., and Trono, D. (1996) 'In Vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector'. *Science* 272 (5259), 263–267
115. Normitz, E.R., D.J., S., and Fisher, J.S. (2001) 'The New England Journal of Medicine'. *The New England Journal of Medicine* 345 (19), 1400–1408
116. Odiatis, C. and Georgiades, P. (2010) 'New Insights for Ets2 Function in Trophoblast Using Lentivirus-Mediated Gene Knockdown in Trophoblast Stem Cells'. *Placenta* 31 (7), 630–640
117. Okada, Y., Ueshin, Y., Isotani, A., Saito-Fujita, T., Nakashima, H., Kimura, K., Mizoguchi, A., Oh-Hora, M., Mori, Y., Ogata, M., Oshima, R.G., Okabe, M., and Ikawa, M. (2007) 'Complementation of Placental Defects and Embryonic Lethality by Trophoblast-Specific Lentiviral Gene Transfer'. *Nature Biotechnology* 25 (2), 233–237
118. Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., and Van Steirteghem, A.C. (1992) 'Pregnancies after Intracytoplasmic Injection of Single Spermatozoon into an Oocyte'. *The Lancet* 340 (8810), 17–18
119. Park, F. (2007) 'Lentiviral Vectors : Are They the Future of Animal Transgenesis ? Lentiviral Vectors : Are They the Future of Animal Transgenesis ?' *Physiol Genomics* 31, 159–173

120. Park, F. (2007) 'Lentiviral Vectors: Are They the Future of Animal Transgenesis?' *Physiological Genomics* 31 (2), 159–173
121. Passet, B., Young, R., Makhzami, S., Vilotte, M., Jaffrezic, F., Halliez, S., Bouet, S., Marthey, S., Khalifé, M., Kanellopoulos-Langevin, C., Béringue, V., Le Provost, F., Laude, H., and Vilotte, J.L. (2012) 'Prion Protein and Shadoo Are Involved in Overlapping Embryonic Pathways and Trophoblastic Development'. *PLoS ONE* 7 (7), 1–8
122. Patel, K. and Amthor, H. (2005) 'The Function of Myostatin and Strategies of Myostatin Blockade - New Hope for Therapies Aimed at Promoting Growth of Skeletal Muscle'. *Neuromuscular Disorders* 15 (2), 117–126
123. Peiris, H.N. and Mitchell, M.D. (2012) 'The Expression and Potential Functions of Placental Myostatin'. *Placenta* 33 (11), 902–907
124. Peiris, H.N., Ponnampalam, A.P., Osepchook, C.C., Mitchell, M.D., and Green, M.P. (2010) 'Placental Expression of Myostatin and Follistatin-like-3 Protein in a Model of Developmental Programming'. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 298 (4), 854–861
125. Petheő, G.L., Kerekes, A., Mihálffy, M., Donkó, Á., Bodrogi, L., Baráth, M., Hoffmann, O.I., Szeles, Z., and Balázs, B. (2021) 'Disruption of the NADPH Oxidase 5 Gene Aggravates Atherosclerosis in Rabbits'. *CIRCRESAHA*. 120.318611. megjelenés alatt
126. Pourcel, C., Salvignol, G., and Vergnaud, G. (2005) 'CRISPR Elements in *Yersinia Pestis* Acquire New Repeats by Preferential Uptake of Bacteriophage DNA, and Provide Additional Tools for Evolutionary Studies'. *Microbiology* 151 (3), 653–663
127. Pyott, D.E., Sheehan, E., and Molnar, A. (2016) 'Engineering of CRISPR/Cas9-Mediated Potyvirus Resistance in Transgene-Free Arabidopsis Plants'. *Molecular Plant Pathology* 17 (8), 1276–1288
128. Qian, L., Tang, M., Yang, J., Wang, Q., Cai, C., Jiang, S., Li, H., Jiang, K., Gao, P., Ma, D., Chen, Y., An, X., Li, K., and Cui, W. (2015) 'Targeted Mutations in Myostatin by Zinc-Finger Nucleases Result in Double-Muscle Phenotype in Meishan Pigs'. *Scientific Reports* 5 (September), 1–13
129. Rodgers, B.D. and Garikipati, D.K. (2008) 'Clinical, Agricultural, and Evolutionary Biology of Myostatin: A Comparative Review'. *Endocrine Reviews* 29 (5), 513–534
130. Sander, J.D., Cade, L., Khayter, C., Reyon, D., Peterson, R.T., Joung, J.K., and Yeh, J.-R.J. (2012) *Targeted Gene Disruption in Somatic Zebrafish Cells Using Engineered TALENs*. 29 (8), 697–698

131. Satomura, A., Nishioka, R., Mori, H., Sato, K., Kuroda, K., and Ueda, M. (2017) 'Precise Genome-Wide Base Editing by the CRISPR Nickase System in Yeast'. *Scientific Reports* 7 (1), 1–10.
132. Schuelke, M., Wagner, K.R., Stolz, L.E., Hübner, C., Riebel, T., Kömen, W., Stolz, L.E., Wagner, K.R., Schuelke, M., Braun, T., Ph, D., Tobin, J.F., and Lee, S. (2004) 'Myostatin Mutation Associated with Gross Muscle Hypertrophy in a Child'. *The New England Journal of Medicine* 351 (350), 2682–8
133. Skipper M. (2006) 'A lean feat - microRNAs and muscle mass'. *Nature Reviews Genetics* 7 (July)
134. Shah, S.A., Erdmann, S., Mojica, F.J.M., and Garrett, R.A. (2013) 'Protospacer Recognition Motifs: Mixed Identities and Functional Diversity'. *RNA Biology* 10 (5), 891–899
135. Sharma, A., Toepfer, C.N., Ward, T., Wasson, L., Agarwal, R., Conner, D.A., Hu, J.H., and Seidman, C.E. (2018) 'CRISPR/Cas9-Mediated Fluorescent Tagging of Endogenous Proteins in Human Pluripotent Stem Cells'. *Current Protocols in Human Genetics* 96 (January), 21.11.1-21.11.20
136. Sharma, M., Kambadur, R., Matthews, K.G., Somers, W.G., Devlin, G.P., Conaglen, J. V., Fowke, P.J., and Bass, J.J. (1999) 'Myostatin, a Transforming Growth Factor- β Superfamily Member, Is Expressed in Heart Muscle and Is Upregulated in Cardiomyocytes after Infarct'. *Journal of Cellular Physiology* 180 (1), 1–9
137. Song, J., Zhong, J., Guo, X., Chen, Y., Zou, Q., Huang, J., Li, X., Zhang, Q., Jiang, Z., Tang, C., Yang, H., Liu, T., Li, P., Pei, D., and Lai, L. (2013) 'Generation of RAG 1- and 2- Deficient Rabbits by Embryo Microinjection of TALENs'. *Cell Research* 23 (8), 1059–1062
138. Song, Y., Yuan, L., Wang, Y., Chen, M., Deng, J., Lv, Q., Sui, T., Li, Z., and Lai, L. (2016) 'Efficient Dual SgRNA-Directed Large Gene Deletion in Rabbit with CRISPR/Cas9 System'. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (15), 2959–2968
139. Spencer, H.T., Denning, G., Gautney, R.E., Dropulic, B., Roy, A.J., Baranyi, L., Gangadharan, B., Parker, E.T., Lollar, P., and Doering, C.B. (2011) 'Lentiviral Vector Platform for Production of Bioengineered Recombinant Coagulation Factor VIII'. *Molecular Therapy* 19 (2), 302–309
140. Spirin, P. V., Vilgelm, A.E., and Prassolov, V.S. (2008) 'Lentiviral Vectors'. *Molecular Biology* 42 (5), 814–825
141. Sun, N. and Zhao, H. (2013) 'Transcription Activator-like Effector Nucleases (TALENs): A Highly Efficient and Versatile Tool for Genome Editing.' *Biotechnology and Bioengineering* 110 (7), 1811–1821

142. Szabó, G., Dallmann, G., Müller, G., Patthy, L., Soller, M., and Varga, L. (1998) 'A Deletion in the Myostatin Gene Causes the Compact (Cmpt) Hypermuscular Mutation in Mice'. *Mammalian Genome* 9 (8), 671–672
143. Tesson, L., Usal, C., Meqnoiret, S., Leung, E., Niles, B.J., Remy, S., Santiago, Y., Vincent, A.I., Meng, X., Zhang, L., Gregory, P.D., Anegon, I., and Cost, G.J. (2011) 'Knockout Rats Generated by Embryo Microinjection of TALENs'. *Nature Biotechnology* 29 (8), 695–696
144. Thomas, K.R. and Capecchi, M.R. (1987) 'Site-Directed Mutagenesis by Gene Targeting in Mouse Embryo-Derived Stem Cells'. *Cell* 51 (3), 503–512
145. Thomas, M., Langley, B., Berry, C., Sharma, M., Kirk, S., Bass, J., and Kambadur, R. (2000) 'Myostatin, a Negative Regulator of Muscle Growth, Functions by Inhibiting Myoblast Proliferation'. *Journal of Biological Chemistry* 275 (51), 40235–40243
146. Townsend, J.A., Wright, D.A., Winfrey, R.J., Fu, F., Maeder, M.L., Joung, J.K., and Voytas, D.F. (2019) 'High Frequency Modification of Plant Genes Using Engineered Zinc Finger Nucleases'. *Physiology & Behavior* 176 (3), 139–148
147. Wang, K., Ouyang, H., Xie, Z., Yao, C., Guo, N., Li, M., Jiao, H., and Pang, D. (2015) 'Efficient Generation of Myostatin Mutations in Pigs Using the CRISPR/Cas9 System'. *Scientific Reports* 5, 1–11
148. Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Casas, E., Cundiff, L. V., and Koohmaraie, M. (2001) 'The Effects of Piedmontese Inheritance and Myostatin Genotype on the Palatability of Longissimus Thoracis, Gluteus Medius, Semimembranosus, and Biceps Femoris'. *Journal of Animal Science* 79 (12), 3069–3074
149. Wiener, P., Woolliams, J.A., Frank-Lawale, A., Ryan, M., Richardson, R.I., Nute, G.R., Wood, J.D., Homer, D., and Williams, J.L. (2009) 'The Effects of a Mutation in the Myostatin Gene on Meat and Carcass Quality'. *Meat Science* 83 (1), 127–134.
150. Wilkes, J.J., Lloyd, D.J., and Gekakis, N. (2009) 'Loss-of-Function Mutation in Myostatin Reduces Tumor Necrosis Factor a Production and Protects Liver against Obesity-Induced Insulin Resistance'. *Diabetes* 58 (5), 1133–1143
151. Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H.S. (1997) 'Viable Offspring Derived from Fetal and Adult Mammalian Cells'. *Nature* 385, 810–813
152. Wolfgang, M.J., Eisele, S.G., Browne, M.A., Schotzko, M.L., Garthwaite, M.A., Durning, M., Ramezani, A., Hawley, R.G., Thomson, J.A., and Golos, T.G. (2001) 'Rhesus Monkey Placental Transgene Expression after Lentiviral Gene Transfer into Preimplantation Embryos'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (19), 10728–10732

153. Wood, A.J., Lo, T., Zeitler, B., Pickle, C.S., Edward, J., Lee, A.H., Amora, R., Miller, J.C., Leung, E., Zhang, L., Rebar, E.J., Gregory, P.D., Urnov, F.D., and Barbara, J. (2011) ‘Targeted Genome Editing Across Species Using ZFNs and TALENs’. *Science* 333 (6040), 3–6
154. Xiong, J.S., Ding, J., and Li, Y. (2015) ‘Genome-Editing Technologies and Their Potential Application in Horticultural Crop Breeding’. *Horticulture Research* 2 (2), 1–10
155. Xu, C., Wu, G., Zohar, Y., and Du, S.J. (2003) ‘Analysis of Myostatin Gene Structure, Expression and Function in Zebrafish’. *Journal of Experimental Biology* 206 (22), 4067–4079
156. Xu, Y. and Li, Z. (2020) ‘CRISPR-Cas Systems: Overview, Innovations and Applications in Human Disease Research and Gene Therapy’. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 18, 2401–2415.
157. Ye, Z., Yu, X., and Cheng, L. (2014) ‘Lentiviral Gene Transduction of Mouse and Human Hematopoietic Stem Cells’. *Methods in Molecular Biology* 1185 (1), 311–319
158. Zetsche, B.L., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Slaymaker, I.M., Makarova, K.S., Essletzbichler, P., Volz, S., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., Koonin, E. V., and Zhang, F. (2016) ‘Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR- Cas System’. *Physiology & Behavior* 176 (1), 100–106
159. Zhang, C., Li, Q., Ren, N., Li, C., Wang, X., Xie, M., Gao, Z., Pan, Z., Zhao, C., Ren, C., and Yang, W. (2015) ‘Placental MiR-106a~363 Cluster Is Dysregulated in Preeclamptic Placenta’. *Placenta* 36 (2), 250–252
160. Zhang, L., Rajan, V., Lin, E., Hu, Z., Han, H.Q., Zhou, X., Song, Y., Min, H., Wang, X., Du, J., and Mitch, W.E. (2011) ‘Pharmacological Inhibition of Myostatin Suppresses Systemic Inflammation and Muscle Atrophy in Mice with Chronic Kidney Disease’. *The FASEB Journal* 25 (5), 1653–1663
161. Zhang, T., Lu, Y., Song, S., Lu, R., Zhou, M., He, Z., Yuan, T., Yan, K., and Cheng, Y. (2019) “‘Double-Muscling’ and Pelvic Tilt Phenomena in Rabbits with the Cystine-Knot Motif Deficiency of Myostatin on Exon 3’. *Bioscience Reports* 39 (5), 1–13
162. Zhou, Y., Gormley, M.J., Hunkapiller, N.M., Kapidzic, M., Stolyarov, Y., Feng, V., Nishida, M., Drake, P.M., Bianco, K., Wang, F., McMaster, M.T., and Fisher, S.J. (2013) ‘Reversal of Gene Dysregulation in Cultured Cytotrophoblasts Reveals Possible Causes of Preeclampsia’. *Journal of Clinical Investigation* 123 (7), 2862–2872

163. Zhu, X., Topouzis, S., Liang, L.F., and Stotish, R.L. (2004) 'Myostatin Signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 Is Regulated by the Inhibitory Smad7 by a Negative Feedback Mechanism'. *Cytokine* 26 (6), 262–272
164. Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R.J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., and Trono, D. (1998) 'Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery'. *Journal of Virology* 72 (12), 9873–9880

8.2. Publikációs Lista

1. *Impaktfaktoros folyóiratban megjelent publikációk*

Skoda Gabriella, Kerekes Andrea, Hoffmann Orsolya Ivett, Lipták Nándor, Tatiana Flisikowska, Angelika E. Schnieke, Donkó Tamás, Meinrad Odermatt, Atkári Tamás, Bősze Zsuzsanna, Hiripi László (2021) „Investigation of a new phenotype in myostatin mutated rabbit created by CRISPR/Cas9 method.” *Gene*. Publikálásra beküldve

Petheő Gábor L., Kerekes Andrea, Mihálffy Máté, Donkó Ágnes, Bodrogi Lilla, **Skoda Gabriella**, Baráth Mónika, Hoffmann Orsolya Ivett, Szeles Zsolt, Balázs Bernadett, Sirokmány Gábor, Fábíán Júlia R., Tóth, Zsuzsanna E., Baksa Ivett, Kacs Kovics Imre, Hunyady László, Hiripi László, Bősze Zsuzsanna, Geiszt Miklós (2021) „Disruption of the NADPH Oxidase 5 Gene Aggravates Atherosclerosis in Rabbits.” *CIRCRESAHA*. (2021) 120.318611. Megjelenés alatt

Pintér Tímea, Geiszt Miklós, Petheő Gábor L., Mihálffy Máté, **Skoda Gabriella**, Lipták Nándor, Kerekes Andrea, Bősze Zsuzsanna, Hiripi László, Bodrogi Lilla (2020) „The creation of a multiallele knockout genotype in rabbit using CRISPR/Cas9 and its application in translational medicine.” *Applied Sciences-Basel*. (2020) 10. 23 Paper: 8508, 14 p.

Lipták Nándor, Hoffmann Orsolya Ivett, **Skoda Gabriella**, Gócza Elen, Kerekes Andrea, Bősze Zsuzsanna, Hiripi László (2018) „Glomerulosclerosis in transgenic rabbits with ubiquitous Venus protein expression.” *Acta Veterinaria Hungarica*. (2018) 66: 2 pp. 281-293., 13 p.

Skoda Gabriella, Hoffmann Orsolya Ivett, Gócza Elen, Bodrogi Lilla, Kerekes Andrea, Bősze Zsuzsanna, Hiripi László (2017) „Placenta-specific gene manipulation in rabbits.” *Journal of Biotechnology* (2017) 259 pp. 86-90, 5 p.

2. *Nem impaktfaktoros, referált folyóiratban megjelent publikációk*

Fábíán Renáta, **Skoda Gabriella**, Hiripi László, Hoffmann Orsolya Ivett, Daniela Ilie, Kerekes Andrea, Gócza Elen, Bodó Szilárd (2017) „Egy sejt PCR beállítása nyúlön preimplantációs genetikai diagnózis céljából.” *Állattenyésztés és takarmányozás* (2017) 66: 2 pp. 174-179., 6 p.

Kerekes Andrea, Hoffmann Orsolya Ivett, **Skoda Gabriella**, Barta Endre, Dominique Rocha, Veronique Lejard, Hiripi László, Bősze Zsuzsanna (2013) „A szarvasmarha prion fehérje szabályozó SNP vizsgálata transzgenikus egér modellben.” *Animal Welfare Etológia és Tartástechnológia/ Animal Welfare Ethology and Housing Systems* 9:3 Klnsz pp. (2013) pp. 177-182., 6 p.

Skoda Gabriella, Kerekes Andrea, Hoffmann Orsolya Ivett, Barta Endre, Dominique Rocha, Veronique L  jard, Hiripi László, B  sze Zsuzsanna (2013) „Szarvasmarha RCAN2 g  n szabályozó régiójában található SNP vizsgálata transzgénikus eg  rmodellben.” *Animal Welfare Etol  gia   s Tart  stechnol  gia/ Animal Welfare Ethology and Housing System. 9:3 Klnsz (2013) pp. 321-327., 7 p.*

Major P  ter, Kerekes Andrea, **Skoda Gabriella**, Hiripi László, B  sze Zsuzsanna (2013) „Genetically modified animals as potential genetic resources.” *Slovak Journal of Animal Sciences (2013) 46: 4 pp. 155-159., 5 p.*

3. Nemzetk  zi konferenci  n tartott el  ad  s

Lipták Nándor, Hoffmann Orsolya Ivett, **Skoda Gabriella**, G  cza Elen, Kerekes Andrea, B  sze Zsuzsanna, Hiripi László (2017) „Mild focal segmental glomerulosclerosis in Venus transgenic rabbits.” N  metország, Halle (Saale): *SALAAM Final conference 2017.09.28-2017.09.29.*

Skoda Gabriella, Kerekes Andrea, Atk  ri Tamás, Meinrad Odermatt, Tatiana Fli-sikowska, Hiripi László (2017) „Myostatin knock-out rabbit line generation using CRISPR/Cas9 system.” Magyarország, Eger. In: *Heiszler Zsuzsanna, Hohol R  bert,   les-Etele N  ra (szerk.) Hungarian Molecular Life Sciences 2017: Programme and Book of abstracts. Budapest, Magyarország: Diamond Congress Ltd., ISBN 978-615-5270-34-5*

Hiripi László, Hoffmann Orsolya Ivett, **Skoda Gabriella**, B  sze, Zsuzsanna (2014) „New generation transgenic techniques in rabbits.” In: *Bene Szabolcs (szerk.) 20th Youth Scientific Forum: University of Pannonia Georgikon Faculty Keszthely, Magyarország: Pannon Egyetem Georgikon Mez  gazdas  gtudom  nyi Kar, (2014) pp. 1-6., 6 p.*

Hoffmann Orsolya Ivett, Barta Endre, Dominique Rocha, Veronique L  jard, Kerekes Andrea, **Skoda Gabriella**, B  sze Zsuzsanna, Hiripi László (2013) „In vivo validation of candidate cattle regulatory SNPs in indicator transgenic mouse models.” Magyarország, Si  fok. In: *Hohol R  bert, Heiszler Zsuzsanna (szerk.) Hungarian Molecular Life Sciences 2013: programme & book of abstracts. Budapest, Magyarország: Diamond Congress Ltd., (2013) pp. 207-207., 1 p.*

4. Hazai konferenci  n tartott el  ad  s

Skoda Gabriella, Kerekes Andrea, Hoffmann Orsolya Ivett, B  sze Zsuzsanna, Hiripi László (2016) „Célzott genom módosítás a ny  l miosztatin g  njében.” In: *G  cza Elen; Kiss Erzs  bet; Mar  z Anna; V  rallyay   va (szerk.) Fiatal Biotechnol  gusok Országos Konferenciája, Gödöllő, Magyarország: Szent István Egyetemi Kiadó, (2016) pp. 26-26., 1 p.*

Skoda Gabriella, Kerekes Andrea, Hoffmann Orsolya Ivett, B  sze Zsuzsanna, Hiripi, László (2015) „Célzott genetikai módosítás nyúlban.” Magyarország, Gödöllő. 25. *MBK Napok 2015.11.11.*

Skoda Gabriella, Kerekes Andrea, Hoffmann Orsolya Ivett, Dominique Rocha, Veronique L ejard, Barta Endre, B sze Zsuzsanna, Hiripi L aszl o (2013) „Szarvasmarha szab lyoz o SNP-k *in vivo* vizsgálata transzgenikus egerekben.” Magyarország, Szeged *Genetikai Műhelyek Magyarorsz agon XII. Minikonferencia, 2013. szeptember 6.*

Skoda Gabriella, Kerekes Andrea, Hoffmann Orsolya Ivett, Dominique Rocha, Veronique L ejard, Barta Endre, B sze Zsuzsanna, Hiripi L aszl o (2013) „A szarvasmarha tenyésztésben potenciálisan használható PRNP  s RCAN2 g enekben található szab lyoz o polimorfizmusok jellemzése.” Magyarország, G d ll o. *MBK napok 2013*

5. Nemzetközi konferencián bemutatott poszter

Skoda Gabriella, Kerekes Andrea, Atkári Tamás, Meinrad Odermatt, Tatiana Fli-sikowska, B sze Zsuzsanna, Hiripi L aszl o (2017) „The effect of genetic background on the phenotype of myostatin KO rabbits.” N metország, Halle (Saale): *SALAAM Final conference 2017.09.28-2017.09.29.*

Hiripi L aszl o, G cza Elen, Bod  Szilárd, Hoffmann Orsolya Ivett, **Skoda Gabriella**, Kerekes Andrea, Bontovics Babett, L azar Bence, B sze Zsuzsanna (2014) „Rabbit Biotechnology in the NARIC-Agricultural Biotechnology Institute.” Horv torsz g, Z gr b, *3th RGB-Net Meeting 2014.05.06.*

Hoffmann Orsolya Ivett, Barta Endre, Dominique Rocha, Veronique Lejard, Kerekes Andrea, **Skoda Gabriella**, B sze Zsuzsanna, Hiripi L aszl o (2014) „*In vivo* examination of bovine rSNPs in transgenic mouse model.” N metország, Berlin. *CTC2014: 13th Annual Meeting of the Complex Trait Consortium.(2014) pp. 13-14., 2 p.*

Skoda Gabriella, Kerekes Andrea, Hoffmann Orsolya Ivett, Barta Endre, Dominique Rocha, Veronique Lejard, B sze Zsuzsanna, Hiripi L aszl o (2014) „Examination of a regulatory SNP of bovine RCAN2 gene in transgenic mouse models.” Egyes lt Kir lysz g, Edinburgh. In: *Transgenic Research (2014) pp 23 (5): 889-889 p*

6. Hazai konferenci n bemutatott poszter

F bi n Renáta, **Skoda Gabriella**, Hiripi L aszl o, Hoffmann Orsolya Ivett, Daniela Ilie, Kerekes Andrea, G cza Elen, Bod  Szilárd (2016) „Preimplant ci s genetikai diagnózis módszereinek fejlesztése ny lon.” 22. Szaporodásbiológiai találkozó:  sszefoglal k Herceghalom, Magyarország: * llatteny zt si és Takarmányozási Kutatóintézet*, (2016) pp. 23-23., 1 p.

Fábián Renáta, Hoffmann Orsolya Ivett, **Skoda Gabriella**, Hiripi L aszl o, Kerekes Andrea, Gócza Elen, Altb cker Vilmos, Bodó Szilárd (2016) „Development of methods for obtaining offspring of desired sex in rabbit.” In: *Gócza Elen; Kiss Erzsébet; Maráz Anna; Várallyay  va (szerk.) F fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája, G d ll o, Magyarország: Szent István Egyetemi Kiadó, (2016) pp. 22-22., 1 p.*

Kerekes Andrea, **Skoda Gabriella**, Hoffmann Orsolya Ivett, Balogh Laura, Debnár Viktória Johanna, Bősze Zsuzsanna, Hiripi László, Bodó Szilárd (2014) „Transzgénikus állatvonalak *ex situ* genetikai megőrzése.” Magyarország, Herceghalom. In: *20. Szaporodásbiológiai Találkozó (2014) pp. 25-25., 1 p.*

Skoda Gabriella, Kerekes Andrea, Hoffmann Orsolya Ivett, Iski Gergely, Barta Endre, Dominique Rocha, Veronique Lejard, Bősze Zsuzsanna, Hiripi László (2014) „Komplex módszerek kifejlesztése szarvasmarha szabályozó polimorfizmusok vizsgálatára.” Magyarország, Herceghalom. In: *20. Szaporodásbiológiai Találkozó (2014) pp. 27-27., 1 p.*

Skoda Gabriella, Kerekes Andrea, Hoffmann Orsolya Ivett, Barta Endre, Dominique, Rocha, Veronique Lėjard, Bősze Zsuzsanna, Hiripi, László (2014) „Complex biotechnology examination of regulatory SNP of bovine RCAN2 és PRNP genes.” Magyarország, Szeged. In: *Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája "FIBOK 2014": Program és összefoglalók: Barabás Zoltán Biotechnológiai Egyesület, (2014) p. 1*

Kerekes Andrea, Hoffmann Orsolya Ivett, **Skoda Gabriella**, Barta Endre, Dominique, Rocha, Veronique Lėjard, Hiripi László, Bősze Zsuzsanna (2013) „A szarvasmarha prion fehérje szabályozó SNP vizsgálata transzgénikus egér modellben.” Magyarország, Gödöllő. In: *Bényi E, Pajor F, Tőzsér J (szerk.). IV. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok: Előadások és poszterek összefoglaló kötete Gödöllő, Magyarország: Szent István Egyetem Egyetemi Kiadó, (2013) pp. 52-52., 1 p.*

8.3. Anyagok

Táblázatok:

1. táblázat: A kísérletbe vont nyulak TALEN technikával célzott DNS szakaszainak vizsgálatára irányuló primerek szekvenciái

| Primer elnevezése | Primer szekvenciája | Tm (°C) |
|-------------------|----------------------------------|---------|
| myt nyúl 1F | 5'- CAATTTTGCTTGCCATTACTGA -3' | 61 |
| myt nyúl 1R | 5'- TCAGCAGAAGCTGTTGACATACAC -3' | 63 |
| myt nyúl 2F | 5'- GGAAAAAGACGGGCTGTGTA -3' | 63 |
| myt nyúl 2R | 5'- CACTGCTGTCATCCCTCTGA -3' | 64 |

2. táblázat: A CRISPR sgRNS (embrió) teszteléséhez használt primerek szekvenciái

| Primer elnevezése | Primer szekvenciája | Tm (°C) |
|-------------------|------------------------------|---------|
| Msnt1 cr-F1 | 5'- AAAGACGGGCTGTGTAATGC -3' | 58,83 |
| Msnt1 cr-R1 | 5'- GCTGGTTGGTATGAGGCTGT- 3' | 56,4 |
| Msnt2 cr-F1 | 5'- CTGAGACCCGTGAAGACTCC- 3' | 59,47 |
| Msnt2 cr-R2 | 5'- GGTACAGGGCTACCATTGGA- 3' | 56,2 |
| Mstn3-cr-F1 | 5'- CTCCTCTGCCTCTCCTTCC- 3' | 59,3 |
| Mstn3-cr-R1 | 5'- CTGGGGTTTGCTTGGTGTAC- 3' | 58,2 |

3. táblázat: A CRISPR/Cas9 módszerrel létrehozott alapító állatok szűréséhez használt primerek szekvenciái

| Primer elnevezése | Primer szekvenciája | Tm (°C) |
|-------------------|-------------------------------|---------|
| Mstn2_F | 5'- CTGAGACCCGTGAAGACTCC -3' | 59,83 |
| Mstn2_R2 | 5'- GGTACAGGGCTACCATTGGA - 3' | 58,4 |

4. táblázat: Az alkalmazott CRISPR2 konstrukció lehetséges off-target szekvenciái, elhelyezkedésük a nyúl genomban

| Gén neve | Elhelyezkedés | PAM | célzott szekvencia | Mismatches |
|----------------|----------------------------|-----|--------------------------------------|------------|
| MSTN | Chr7: 130431724-130431744 | CCT | ATGAAAGACGGTACAAGG | 0 |
| AMPD1 | Chr13: 49510189-49510209 | AAA | ATGAAAGACGGT GTGGTT | 6 |
| CBFA2T2 | Chr4: 6052384 6052403 | ACT | GG AAAAGACGGTACA ATG | 4 |
| CXCL10 | Chr15: 74371039-74371059 | TTA | ATGAAAGACT TGT ACAA AG | 2 |
| EPHB3 | Chr14: 81102930-81102950 | TCA | AGATGG GACGGTACAAGG | 5 |
| FAM71F1 | Chr7: 15 854 479-15 854496 | ACC | AAAGA AAGACGGTACA AGT | 4 |
| HIS-LYS N-METH | pontosan nem ismert | ACC | TTG AAAGACGGT AGTCC T | 6 |
| PRR5L | Chr1: 17565125-175657226 | GGG | ATGAAAGACGGT GTTGGC | 6 |
| STAM | Chr16: 43612512-43612532 | AGA | GAAGA AAGACGGTACA ATT | 6 |
| TTN | Chr7: 118335085-118335105 | TGG | ATGAAAGACGGT AGCAAC | 4 |

5. táblázat: Az off-target analízis során felhasznált primerek szekvenciái és olvadási hőmérsékletük

| Gén neve | Primerek szekvenciáj | T _m (°C) |
|--------------|--|---------------------|
| AMPD1 | Fw 5'- CCTGCTCTGAAGAAGGGAGA -3' Rv 5'- GGCAGTGGAGTCGACAGATT -3' | 59.67 60.27 |
| CBFA2T2 | Fw 5'- TCATGTCATTGCTGCAACCT -3' Rv 5'- CATGTGTGCCTCCTTCAAGA -3' | 60.27 59.83 |
| CXCL10 | Fw 5'- TGAATGTGCAAGTCCCTGTT -3' Rv 5'- TGCCACTTTATTGCTTTTTTCA -3' | 59.14 58.48 |
| EPHB3 | Fw 5'- ACCGCACAGTCCCAGATTAC -3' Rv 5'- CAGCCAAAAGTCCGAAAGTC -3' | 60.00 59.85 |
| FAM71F1 | Fw 5'- GCCCTGGTTTAGCATGATGT -3' Rv 5'- GAGCCACCCAAGAGTACCTG -3' | 59.96 59.72 |
| LOC100339782 | Fw 5'- CTGCCGAGAAAATTGGAGAG -3' Rv 5'- AGTGGAGTGAGCCCAAAGAA -3' | 59.95 59.84 |
| PRR5L | Fw 5'- TCTTGGCTTCTTGGCAGTTT -3' Rv 5'- ACAGAGAAACGAGCGACCTC -3' | 59.99 59.60 |
| STAM | Fw 5'- AGTCTCAGCTTGATGGGAATG -3' Rv 5'- AAGCTGAAGCGTCCAACAAT -3' | 59.30 59.88 |
| TTN | Fw 5'- AAGGCTGTGCCACTGAAGTT -3' Rv 5'- AGTGGCTGTCCTTTGACCAC -3' | 59.91 60.16 |

6. táblázat: A guideRNS szekvenciájának felszaporítására használt kvázi nested PCR első körének beállítási paraméterei

| PCR I. kör reakcióelegy hozzávalói | | PCR program | | |
|------------------------------------|-------------------------------------|----------------|-----------|------|
| megnevezés | menyiség | hőmérséklet | időtartam | |
| DNS (pDNA-pbsU6_MSTN) | 1 µl | 98 °C | 30 mp | 25 x |
| dNTPs (10 mM) | 1 µl | 98 °C | 5 mp | |
| Primer T7 for (10 µM) | 1,25 µl | 59 °C | 15 mp | |
| Primer Trac rev (10 µM) | 1,25 µl | 72 °C | 15 mp | |
| 5X puffer | 10 µl | 72 °C | 5 perc | |
| DNS Polimeráz | 0,5 µl | 8 °C | végtelen | |
| Víz | 34,5 µl | | | |
| Primerek megnevezése | Primerek szekvenciája | Fragment méret | | |
| T7forward: | 5' - GTACAAAATACGTGACGTAGAAAAG - 3' | 274 bp | | |
| Trac rev: | 5' - AAAAAAAGCACCGACTCGGTG - 3' | | | |

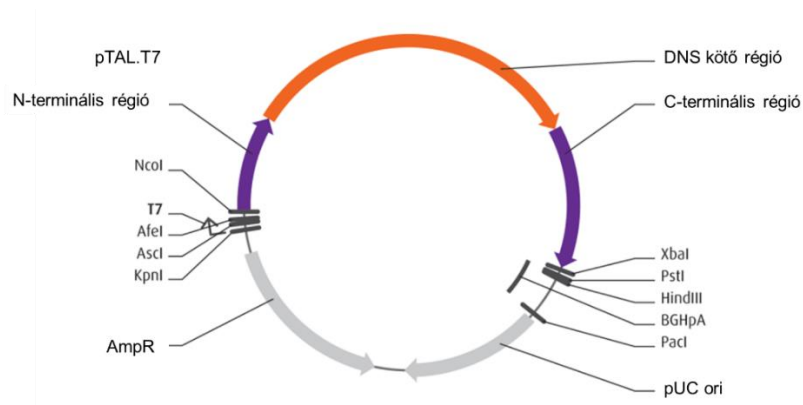
7. táblázat: A qPCR reakcióelegyének összetétele és az alkalmazott PCR program lépései, primerek szekvenciái

| A reakcióelegy összetevői | | PCR program | | |
|---|----------|---------------------------|------------------------------|------|
| megnevezés | menyiség | 95 °C | 10 perc | 1 x |
| 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus | 4 µl | 95 °C | 15 mp | 40 x |
| qMSTNfor primer | 0,3 µl | 60 °C | 60 mp | |
| qMSTNrev primer | 0,3 µl | primer szekvenciák | | |
| cDNS | 3,5 µl | qMSTNfor | 5'- CACGCTACGACGGAAACAAT- 3' | |
| Víz | 11,9 µl | qMSTNrev | 5'- GGAGTCTTCACGGGTCTCAG- 3' | |

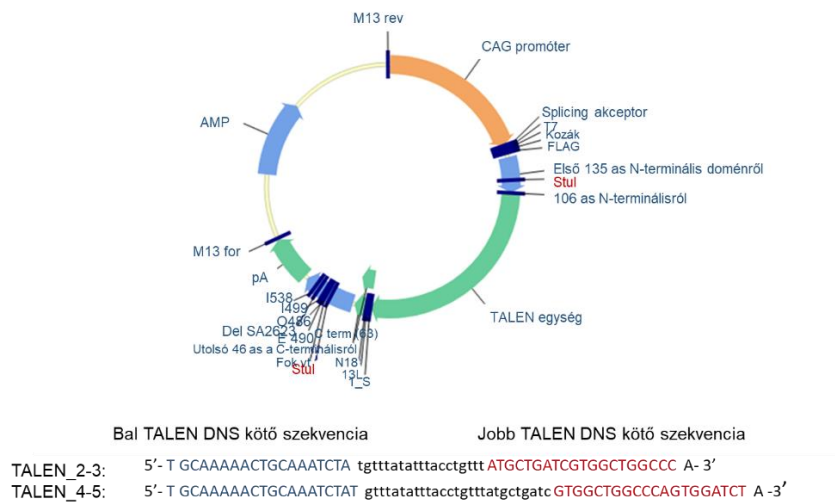
Honlap:

Web1 <https://tale-nt.cac.cornell.edu/node/add/talen>

Ábrák:



1. ábra. A megrendelt TALEN plazmidok alapfelépítése.



2. ábra. Az általam összeállított TALEN plazmidok sematikus felépítése és a tervezett TALEN egységek szekvenciái.

| | | |
|-----------|--|-----|
| vad_típus | MQKLQIYVYIYLFMLIVAGPVDLNENSEQKENVEKDGLCNACTWRQNSKYSR IEA I K I Q I | 60 |
| 8BKK | MQKLQIYVYIYLFMLIVAGPVDLNENSEQKENVEKDGLCNACTWRQNSKYSR IEA I K I Q I | 60 |
| 5BKK | MQKLQIYVYIYLFMLIVAGPVDLNENSEQKENVEKDGLCNACTWRQNSKYSR IEA I K I Q I | 60 |
| ***** | | |
| vad_típus | LSKLRLETAPNISKD AIRQLLPKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDYHATTET IIT | 120 |
| 8BKK | LSKLRLETAPNISKD AIRQLLPKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDYHATTET IIT | 120 |
| 5BKK | LSKLRLETAPNISKD AIRQLLPKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDYHATTET IIT | 120 |
| ***** | | |
| vad_típus | MPTESDFLMQVEGPKCCFFKFSSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVKTPTTVFVQILRLIKPM | 180 |
| 8BKK | MPTESDFLMQVEGPKCCFFKFSSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVKTPTTVFVQILRL-RRY | 179 |
| 5BKK | MPTESDFLMQVEGPKCCFFKFSSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVKTPTTVFVQILRLIKRY | 180 |
| ***** | | |
| vad_típus | KDGTRYTGI RSLKLDMPGTGIWQSIDVK-TVLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHDLAV | 239 |
| 8BKK | KVY-----WNPISET*HEPRHWYLAEH*CED-SVAK-----LAQ | 210 |
| 5BKK | KVY-----WNPISET*HEPRHWYLAEH*CED-SVAK-----LAQ | 211 |
| | * * * | |

3. ábra. A miosztatin génkiütött alapító állatok módosított fehérje szekvenciája, összehasonlítva a vad típusú miosztatin fehérje sorrenddel.

Oldatok:

PBS –FCS oldat (embrió kimosáshoz)

| | |
|----------|--------------------------------------|
| 800 ml | víz |
| 0,16 g | KCl |
| 0,16 g | KH ₂ PO ₄ |
| 0,17 g | MgCL ₂ x6H ₂ O |
| 6,40 g | NaCl |
| 0,92g | Na ₂ HPO ₄ |
| 0,106 g | CaCl ₂ x2H ₂ O |
| 0,0024 g | Penicillin |
| 0,0080 g | Sztreptomicin |
| 20 ml | FCS |

RDH médium (embrió tenyésztéshez)

| | |
|----------|------------|
| 3,3 ml | DMEM |
| 3,3 ml | RPMI |
| 3,3 ml | Ham's F-10 |
| 0,0063 g | Taurin |
| 0,0,3 g | BSA |

M1 oldat (spermafagyasztáshoz)

| | |
|--------|--------------|
| 10 ml | Weize–Tris |
| 1,2 ml | DMSO |
| 2 ml | tojássárgája |

M2 oldat (spermafagyasztáshoz)

| | |
|--------|--------------|
| 10 ml | Weize–Tris |
| 0,5 ml | Glicerol |
| 2 ml | tojássárgája |

Weize-Tris

| | |
|---------|--------------------|
| 100 ml | víz |
| 3,028 g | Tris (T6066 Sigma) |
| 1,676 g | Citromsav anhidrát |
| 1,250 g | D-glükóz |

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A doktori dolgozatomhoz kapcsolódó laboratóriumi munkákat a MATE Genetika és Biotechnológia Intézetében végezhettem, így szeretném megköszönni a mindenkori főigazgató Uraknak/Asszonyoknak, Dr. Burgyán Józsefnek, Dr. Bősze Zsuzsannának, Dr. Olasz Ferencnek, Dr. Posta Katalinnak, hogy erre lehetőséget teremtettek.

Szeretnék köszönetet mondani az Állatbiotechnológiai Tanszék egykori, és jelen vezetőjének Dr. Bősze Zsuzsannának, és Dr. Gócza Elennek a munkámhoz nyújtott szakmai és anyagi támogatásért.

Dr. Hiripi László témavezetőmnek hálásan köszönöm, hogy részt vehettem ebben a kutatásban, és hogy mindvégig támogatott, jó hangulatú, kiváló szakmai háttérrel biztosított.

Nagyon hálás vagyok Dr. Kerekes Andreának a munkám során kapott rengeteg szakmai és baráti segítségért, támogatásért. Dr. Hoffmann Orsolya Ivettnek szeretném megköszönni az embrió beültetésekhez elengedhetetlen szakmai segítségét. Továbbá köszönöm Dr. Lipták Nándornak a metszetek készítésénél nyújtott segítséget, Dr. Major Péternek a nyulakkal való munka során nyújtott segédkezést.

Köszönettel tartozom Dr. Tatiana Flisikowskának és Dr. Angelika E. Schniekének, hogy laboratóriumukban elsajátíthattam a CRISPR/Cas9 és TALEN genomszerkesztő rendszerek összeállítását, használatát.

Továbbá köszönöm Dr. Bender Baláznak és Dr. Bodó Szilárdnak a rengeteg szakmai tanácsot, amivel segítették munkámat.

A kísérletben szereplő állatok gondozásáért, nagyon hálás vagyok Fülöp Lászlónak, Liszkai Istvánnának, Udri Ágnesnek, illetve Dr. Bognár Gábor állatorvosunknak lelkiismeretes munkájáért. Labortechnikusainknak, Grófné Marikának, Egedi Sándornak köszönöm a számos oldatot, amit készítettek nekünk az évek folyamán, illetve laborkisegítőinknek Galli Györgynének, Gubó Editnek az eszközök gondos rendben tartását. Az Állatbiotechnológiai Főosztály minden munkatársának szeretném megköszönni a sok segítséget, illetve a jó hangulatot, kellemes légkört, ami körbevett a laboratóriumban eltöltött évek folyamán.

Külön köszönöm családomnak a folyamatos biztatást, támogatást, mely elősegítette e dolgozat létrejöttét.

A kutatás az Olívia Kft. támogatásával valósult meg, melyet hálásan köszönök. A kutatás létrejöttét elősegítette a „Fókuszban az atherosclerosis: új terápiás célpontok és gyógyszerjelöltek azonosítása- NVKP 16-1-2016-0039” pályázat, melyet külön köszönök.