



**SZENT ISTVÁN
EGYETEM**

GÖDÖLLŐ

SZENT ISTVÁN EGYETEM
Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

TRANSZPOZON ALAPÚ TRANSZGENEZISSEL LÉTREHOZOTT RIPOENTERGÉN
EXPRESSZIÓ RÉSZLETES VIZSGÁLATA NYÚLBAN

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

KEREKES ANDREA

GÖDÖLLŐ
2019.

A doktori iskola megnevezése: Állattenyésztés- Tudományi Doktori Iskola

tudományága: Állattenyésztés-tudomány

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

Tanszékvezető, egyetemi tanár

Szent István Egyetem,

Mezőgazdasági- és Környezettudományi Kar,

Állattudományi Alapok Intézet,

Takarmányozástani Tanszék

témavezető: **Bősze Zsuzsanna D.Sc.**

Tudományos tanácsadó, csoportvezető

Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ,

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet

Állatbiotechnológiai főosztály

társ témavezető: **Hiripi László PhD.**

Tudományos főmunkatárs, csoportvezető

Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ,

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet,

Állatbiotechnológiai főosztály

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

1. TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés és célkitűzés	9
2. Irodalmi áttekintés	13
2.1. Emlősállatok genetikai módosításának fejlődése	13
2.2. Additív módszerek az emlősállatok genetikai módosítására	14
2.2.1. A klasszikus mikroinjektálás módszere.....	14
2.2.2. Lentivírus alapú transzgenezis.....	15
2.2.3. Transzpozon alapú transzgenezis.....	16
2.3. Transzpozonok.....	17
2.3.1. DNS transzpozonok	18
2.3.2. Sleeping Beauty transzpozon rendszer	20
2.4. Riportergének.....	22
2.4.1. Vénusz riportergén (YFP).....	24
2.5. CAG promóter	25
2.6. Rekombináns fehérje termeltetés.....	25
2.6.1. Rekombináns fehérjék előállítása transzgénikus állatokban	27
2.6.2. Terápiás fehérjék előállítása transzgénikus nyúlban.....	28
2.7. Spermatogenezis	31
2.7.1. Stabil intercelluláris hidak	32
2.7.2. TEX 14 fehérje	34
2.8. Nyúl sperma mélyhűtés.....	34
3. Anyag és módszer	37
3.1. Kísérleti engedélyek	37
3.2. Kísérleti állatok	37
3.2.1. SB-CAG-Vénusz nyúlvonal	37
3.2.2. β -MHC-G52R-KCNE1 nyúlvonal	37
3.2.3. WAP-hTNAP nyúlvonal	37
3.2.4. Vad típusú Újzélandi fehér nyúl	38
3.2.5. SB-CAG-Vénusz egér vonalak	38
3.3. Makroszkópos vizsgálatok.....	39
3.3.1. Tej minták vizsgálata	39
3.3.2. Könny és nyál minták vizsgálata.....	40
3.3.3. A szeminális plazma vizsgálata	40
3.3.4. Vénusz fehérje koncentráció meghatározás IMAGE-J programmal.....	40
3.4. Flow Citometriai vizsgálatok a Vénusz fehérje jelenlétének bizonyítására a spermiumban	41
3.5. Vénusz mRNA detektálása RT-PCR-rel a spermiumokban.....	41

3.6. Minták előkészítése Western blot vizsgálatra	42
3.6.1. Tejminták	42
3.6.2. Ejakulátum	43
3.6.3. Könny és nyálminták.....	43
3.7. A transzgén fehérjeszintű kifejeződésének vizsgálata Western Bolt analízissel	44
3.7.1. Denzitometriás vizsgálat.....	45
3.8. A rekombináns hTNAP aktivitás vizsgálata	45
3.9. Emlőszövet hisztológiai vizsgálata	45
3.10. A Vénusz fehérje fajspecifikus kifejeződésének vizsgálata	46
3.10.1. Ivarsejtek mikroszkópos vizsgálata.....	46
3.10.2. Nyúl és egér here és mellékhere szövettani vizsgálatai	46
3.11. A Vénusz fehérje kifejeződésének vizsgálata az ivari érés folyamán	47
3.12. Intercelluláris hidak meglétének vizsgálata bak nyulak hereszöveiben Immunhisztológiával ..	47
3.13. Az ejakulált sperma minőség meghatározása	48
3.13.1. A feltételezhető termékenyítő képesség meghatározása Kovács-Foote féle festési eljárással	48
3.13.2. A mozgás képes sejtek számának meghatározása CASA rendszerrel.....	48
3.14. Mellékherei és ejakulált spermiumok minőségének összehasonlítása	49
3.15. Nyúl sperma mélyhűtési protokoll optimalizálása	49
3.15.1. A mélyhűtési módszer technikai lépéseinek vizsgálata.....	49
3.15.2. A mélyhűtési eljárás nitrogén gőzös technikai lépésének fejlesztése.....	50
3.15.3. Tej alapú hígítók alkalmazhatóságának vizsgálata	50
3.15.4. Szubjektív motilitás vizsgálatok és termékenyítési tesztek.....	50
4. Eredmények.....	53
4.1. Ondó vizsgálatok eredményei	53
4.1.1. Makroszkópos vizsgálatok	53
4.1.2. Mikroszkópos vizsgálatok eredményei: a Vénusz fehérje kifejeződésének fajspecifikus sajátosságai nyúl és egér spermiumok esetében	53
4.1.3. A sperma Flow Citometriai vizsgálatának eredménye nyúlban	54
4.1.4. Az ejakulátumban megjelenő Vénusz fehérje hatása a transzgén öröklődésére.....	55
4.1.5. A Vénusz jelzőfehérje mRNS jelenlétének vizsgálata az ivarsejtekben RT-PCR módszer alkalmazásával.....	56
4.1.6. Vénusz fehérje kifejeződésének vizsgálata Western blot analízissel	58
4.1.7. A Vénusz fehérje kifejeződésének vizsgálata az ivarérés különböző szakaszaiban, hereszövet hisztológiai vizsgálatok eredményei	59
4.1.8. Fajspecifikus kifejeződés hisztológiai vizsgálatának eredményei transzgénikus egér és nyúl szövetein.....	60
4.1.9. Immunhisztológiai vizsgálatok az intercelluláris hidak meglétének bizonyítására	63

4.1.10. Transzgenikus bak nyulak spermium minőség meghatározásának vizsgálati eredményei....	64
4.1.11. Mellékhere eredetű és ejakulált spermiumok feltételezett termékenyítő képességének meghatározása	65
4.1.12. Mélyhűtési kísérletek	66
4.1.13. Ondó vizsgálatok eredményeinek összegzése	69
4.2. Vénusz transzgen fehérje kifejeződés vizsgálatának eredményei tej és emlőszövet mintákban ..	71
4.2.1. Makroszkópos vizsgálatok eredményei.....	71
4.2.2. Vénusz fehérje kifejeződésének vizsgálata Western blot analízissel a tejben és annak különböző frakcióiban	73
4.2.3. Az emlőszövet konfokális mikroszkópos vizsgálatának eredménye	74
4.2.4. Tej vizsgálatok eredményeinek összegzése.....	75
4.3. Vénusz fehérje expressziójának vizsgálata könny és nyál mintákban.....	76
4.3.1. Könny és nyálminták makroszkópos vizsgálata.....	76
4.3.2. Könny és nyálminták vizsgálata Western blot analízissel.....	77
4.3.3. Könny- és nyálmintákkal végzett vizsgálatok eredményeinek összegzése	78
5. Új tudományos eredmények	79
6. Eredmények megvitatása és javaslatok	81
6.1. Ondó vizsgálatok eredményeinek megvitatása.....	81
6.1.1. Javaslatok	82
6.2. Tej, könny, és nyálminták vizsgálati eredményeinek megvitatása	83
6.2.1. Javaslatok	85
7. Összefoglalás	87
8. Summary.....	91
9. Mellékletek.....	93
9.1. Felhasznált irodalom	93
9.2. A disszertáció alapját képező publikációk jegyzéke	113
9.3. Megjelent publikációk listája.....	114
9.3.1. Impaktfaktoros folyóiratban megjelent publikációk	114
9.3.2. Nem impaktfaktoros, referált folyóiratban megjelent publikációk	115
9.3.3. Konferencia közlemények	115
10. Köszönetnyilvánítás.....	121

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

APS	Ammónium-perszulfát
BAC	Bakteriális mesterséges kromoszóma (Bacterial Artificial Chromosome)
CAG	Csirke béta-aktin promóter CMV enhancerrel (Chicken beta-actin promoter with CMV enhancer)
CASA	Computer asszisztált sperma vizsgálat (Computer Assisted Sperm Analysis)
DMSO	Dimetil-szulfoxid
ECL	Megnövelt kemilumineszcencia (Enhanced Chemiluminescence)
ESL	Speciális hőmérsékleti technológiával megnövelt tárolási idejű tej (Extended Shelf Life)
FDA	Food and Drug Administration
hTNAP	Nem szövetspecifikus humán alkalikus foszfatáz
LCR	Lókuszt kontroll régió (Locus Control Region)
LTR	Hosszú ismétlődő vég szekvencia (Long Terminal Repeat)
mWAP	Egér savó savas fehérje (Mouse Whey Acidic Protein)
PBS	Foszfat pufferelt fiziológiás sóoldat (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polimeráz lánreakció (Polymerase Chain Reaction)
PFA	Paraformaldehid
PTM	Poszt-transzlációs módosítások (Post-translational modifications)
QPCR	Kvantitatív polimeráz lánreakció (Quantitative Polymerase Chain Reaction)
REs	Retroelemek
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SAR-MAR	Mátrix csatolási régió (Matrix attachment region)
SB	Sleeping Beauty transzpozon
SCC	Szomatikus sejtszám (Somatic cell counts)
SDS	Nátrium Dodecil Szulfát
β-ME	β -Mercapto etanol
TALE	Transzkripció aktivátor szerű nukleázok (Transcriptional Activator-like Effector nucleases)
TBS	Tris pufferelt fiziológiás sóoldat (Tris Buffered Saline)
TBS-T	Tris pufferelt fiziológiás sóoldat Tween 20 hozzáadásával
TEMED	Tetramethylethylenediamin
UHT	Ultramagas hőmérsékleten hő kezelt tej (Ultra High Temperature Treated Technology)
YAC	Élesztő mesterséges kromoszóma (Yeast Artificial Chromosome)
ZFN	Cink ujjas nukleázok (Zinc Finger Nucleases)
TIR, IR	Terminal Inverted Repeat
GFP	Zöld fluoreszcens fehérje (Green Fluorescent Protein)
YFP	Sárga fluoreszcens fehérje (Yellow Fluorescent Protein)
EYFP	Fokozott sárga fluoreszcens fehérje (Enhanced Yellow Fluorescent Protein)

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A transzgenézis révén képesek vagyunk az élő szervezetek genomjának szándékos módosítására, így létrehozva genetikailag módosított állatokat. Az úgynevezett transzgenikus állatok révén lehetőség nyílik különböző gének funkció vizsgálatára, azok egy-egy betegséggel való kapcsolatának vizsgálatára, valamint e betegségek modellezésére, legyen szó humán vagy egyes haszonállatok megbetegedéseiről. Az így létrehozott mesterséges genetikai módosítást (GMO) hordozó állatok megítélése a köztudatban rendkívül sokféle, a legelítélőbb véleményről a maximálisan egyetértőig, mindre találhatunk példákat. Bár a GMO mellett szólva az FDA már 2009-ben engedélyezte egy genetikailag módosított kecske tejében termelődő fehérje gyógyászati célra történő alkalmazását ("ATryn (Antithrombin (Recombinant)) FDA Approval History - Drugs.com", n.d.), amit 2014-ben GMO nyúl tejéből kivont terápiás fehérje ("Ruconest (C1 esterase inhibitor (recombinant)) FDA Approval History - Drugs.com", n.d.), majd 2015-ben transzgenikus tyúk tojásában termeltetett enzim követett ("Kanuma (sebelipase alfa) FDA Approval History - Drugs.com", n.d.). 2015-ben fejeződött be a genetikailag módosított Atlanti lazac engedélyezésének folyamata is, mely esetlegesen rész megoldást nyújthat a kimerülő természeti források pótlására (Commissioner, n.d.).

A fenti példák és a One World, One Health (OWOH) kezdeményezés révén talán a genetikailag módosított állatok etikai megítélése pozitív irányba változhat. Ugyanis az OWOH egyik napirendi pontja egybe esik a humán állati kapcsolatok egy alternatív megközelítésével azaz, hogy az állatok genetikai manipulációjával csökkenthető a humán patogének gazdaszervezeteinek, vagy vektoraiknak kapacitása (Lezaun és Porter, 2015).

Ezek az elképzelések és gyakorlati alkalmazások is alátámasztják, hogy a biotechnológiára, azon belül a transzgenézisre, valamint a GMO állatokra nem csupán az alap és alkalmazott kutatásokban, de a gyakorlatban is fontos feladat hárul, mely napról-napra bővül.

A genetikailag módosított állatokban termeltetett terápiás fehérjéket, már használjuk a gyógyászatban, jó példa erre a korábban említett szer a Ruconest[®], melyet transzgenikus nyulak tejében állítanak elő az angioödéma kezelésére.

A rekombináns fehérjék előállításának jó módszere a biofarming, amin belül a transzgenikus állatok tejében történő termeltetés kisebb fiziológiai terheléssel és csökkentett stresszel jár az állatok számára, mint a vérben vagy a szeminális plazmában való rekombináns fehérje előállítás.

Gyakran használt laboratóriumi állataink egyike a nyúl, melynek tejében termeltethetünk rekombináns fehérjéket emlő szövetspecifikus promóter alkalmazásával. A transzgenikus nyulak klasszikus mikroinjektálással történő előállításának hatékonysága alacsony, viszont

felhasználásának lehetősége széles körű. A transzgenikus nyúl gyakran alkalmazott modell állat, például a metabolikus szindróma, atheroszklerózis, kardiovaszkuláris megbetegedések és szívritmus zavarok vizsgálatában (Bösze *et al.*, 2016; Duranthon *et al.*, 2012).

A gyakorlatban már alkalmazott terápiás fehérjék termeltetésén kívül az alap kutatásban is rendkívül fontos szerep jut a genetikailag módosított állatoknak. A riportergént kifejező transzgenikus állatok létrehozásával lehetőség nyílik például különböző génexpressziós vizsgálatokra, vagy a sejtek vándorlásának nyomon követésére *in vivo*, de riportergének segítségével vizsgálhatjuk a fehérjék sejten belüli mozgását is (Murakami és Kobayashi, 2012). Az egyik leggyakrabban használt nem szövetspecifikus promóter a CAG (csirke béta-aktin promóter CMV enhancerrel), mely gerincesekben stabil transzgen kifejeződést biztosít (Sakai és Miyazaki, 1997).

Munkám célja volt, a csoportunk által a - klasszikus mikroinjektálásnál nagyobb hatékonysággal működő - Sleeping Beauty (SB) transzpozon technikával létrehozott Vénusz fehérjét expresszáló transzgenikus nyúl részletes expressziós vizsgálata (Katter *et al.*, 2013).

Az alapítók létrehozásához használt konstrukciónkba a szintetikus, nem szövetspecifikus CAG promótert építettük be és a konstrukció nem tartalmazott sem emlőspecifikus szabályozó elemet, sem szekréción szignál peptidet. Korábban megjelent cikk alapján vizsgálataink fő célja a tej és frakcióinak vizsgálata volt a transzgen kifejeződés tekintetében, ugyanis német kutatók bizonyították a Vénusz transzgen fehérje megjelenését transzgenikus sertésekben, melyeket a nyulakkal azonos konstrukcióval hoztak létre (Mukherjee *et al.*, 2016). Vizsgáltuk a teljes tej mintákat valamint a különböző frakciókat makroszkóposan kék fénygerjesztés alatt, Western blot analízissel, utóbbi alapján denzitometriás vizsgálattal meghatároztuk a Vénusz fehérje koncentrációját a tejben. IMAGE-J programmal meghatároztuk a rekombináns fehérje mennyiségét a laktáció négy különböző hetében fejt tejben heterozigóta állat esetében.

További céljaink között szerepelt a különböző exokrin mirigyek által termelt biológiai folyadékok (szeminális plazma, könny, nyál) vizsgálata. Ezért vizsgáltuk a Vénusz fehérje jelenlétét makroszkopikusan kék fénytartományban is gerjesztő UV fény hatására, Western blot analízissel, valamint heterozigóta állatok esetében meghatároztuk a fluoreszcens transzgenikus fehérje hozzávetőleges koncentrációját IMAGE-J programmal különböző korú állatok könny és nyál mintáiban.

Választ kerestünk a korábban már sertéseknél leírt genotípus független egyenletes transzgen fehérje kifejeződésre, ezért heterozigóta és homozigóta állatok ondó mintáit vizsgáltuk, mikroszkóposan, Flow Citometriával, a vonal fenntartó termékenyítések időszakában figyeltük a

Vénusz fehérje öröklődését. A specifikus mRNS jelenlétét a spermiumokban RT-PCR technikával néztük. A transzgén fehérje megjelenésének és az egyenletes eloszlásának lehetséges okát hereszövet hisztológiai vizsgálatokkal határoztuk meg.

Az SB-CAG-Vénusz pozitív sertések és egerek esetében leírt ellentétes transzgén kifejeződést a spermiumokban nyulak esetében is vizsgálni kívántuk. A továbbiakban azonos módszerekkel vizsgáltuk ugyanazon SB-CAG-Vénusz konstrukcióval létrehozott három független egér vonal homozigóta egyedeinek és a csoportunk által azonos transzgénnel létrehozott nyulak hímvarsejtjeit, here és mellékhere szöveteit.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. EMLŐSÁLLATOK GENETIKAI MÓDOSÍTÁSÁNAK FEJLŐDÉSE

A genetikailag módosított állatok pontosabban a transzgénikus emlősállatok esetében, fontos jellemző, hogy a mutációt stabilan a kromoszómába épülve, minden sejtjük tartalmazza, valamint a Mendeli szabályokat követő módon örökíti. Utóbbi két feltétel nélkül nehezebb a transzgénikus vonalak létrehozása és az új tulajdonság megnyilvánulásának vizsgálata. Emlősök esetében az embrionális fejlődés lassabb folyamat, mint például a halaknál, így nincs lehetőség az információ episzómakénti (olyan genetikai elem, amely képes szabadon replikálódni a citoplazmában, vagy beépülve a kromoszómával együtt replikálódik) fennmaradására a fejlődés során, mivel a bejuttatott DNS pár nappal tovább nem marad fenn a sejtben.

Az emlősállatok genetikai anyagának megváltoztatására a hetvenes évektől tettek kísérleteket. Az igazi áttörést Gordon és munkatársai 1980-ban hozták, akik az egysejtes egér embrióba előmag injektálással juttatták az idegen gént tartalmazó konstrukciót (Gordon *et al.*, 1980). Ez azért is nagyon fontos lépcsőfok a transzgén technika fejlődésében, mert ekkor sikerült elsőként nem virális eredetű DNS-t bejuttatni az egér genomba és annak öröklődését bizonyítani (Brinster *et al.*, 1981; Gordon és Ruddle, 1981). Ugyanebben az évben hoztak létre embrionális őssejtvonalból (ES) kiméra egeret (Evans és Kaufman, 1981; Martin, 1981). Palmiter és munkatársai patkány növekedési hormon gént mikroinjektáltak egér embriók előmagjába, az egér metallothionein gén promóterének irányításával (Palmiter *et al.*, 1982). 1985-ben hasonló módon hoztak létre sikeresen transzgénikus juhot, sertést és nyulat (Hammer *et al.*, 1985). Az első transzgénikus egeret ES sejtek felhasználásával 1986-ban Robertson és munkatársai (Robertson *et al.*, 1986) alkották meg. 1987-ben újabb mérföldkő következett a transzgén technika fejlődésében, amikor is homológ rekombinációt hoztak létre (célzott génmódosítás) ES sejtekben (Thomas és Capecchi, 1987). Ugyancsak 1987-ben számoltak be transzgénikus egeréről, mely a tejében juh β -laktoglobulint termelt (Simons *et al.*, 1987). A fejlődés a kilencvenes években sem állt meg, Wilmut és munkatársai felnőtt testi sejtek sejtmagjának átültetését hajtották végre petesejtekben, melyből megszületett Dolly a bárány (Wilmut *et al.*, 1997), aki idővel felnőtt egyedé fejlődött. Ez fontos technikai áttörést hozott a transzgénikus emlősállatok létrehozásának módszerében, hiszen a testi sejtek transzformálása megoldható, ezt a klónozással kombinálva újabb lehetőséget kapunk a transzgénikus haszonállatok előállítására. Schnieke és munkatársai 1997-ben azonnal éltek is az említett lehetőséggel és klónozással transzgénikus juhot hoztak létre (Schnieke *et al.*, 1997). Napjainkra a technika már ott tart, hogy képesek vagyunk a genom célzott szerkesztésére, génkiütésre (*knock out*) vagy célzott gén bevitelre (*knock in*). 2008 januárjában számoltak be első ízben célzott gén inaktivációról zebradániókban, cink-ujjas nukleázzal (ZFN) (Meng *et al.*, 2008). A legtöbb gerincesben a genetikai manipuláció egy célzott

lókuszon, még mindig nem, vagy nehezen volt megvalósítható, erre adott új alternatív megoldást a cink-ujjas nukleázok alkalmazása, melyek révén képesek vagyunk célzott genom szerkesztésre. A ZNF egy kémiai fúzió eredménye a Cys₂His₂ cink-ujj fehérje és a FokI endonukleáz hasítási doménje között (Porteus és Carroll, 2005). A cink-ujj transzkripciós faktorok nagy specificitással kötődnek a nukleinsav tripletekhez, ez több cink-ujj egybeépítésével azt eredményezi, hogy a kötődés egyetlen génszakaszra korlátozódik a teljes genomban, ahol a kettős szálú DNS vágásért a hidrolitikus úton hasító endonukleáz, a FokI felel. A technológia hátránya, hogy a Cink-ujjak a cél szekvenciát blokkokban ismerik fel, ezért technikailag nehéz és hosszabb időt igénylő folyamat az előállításuk. A ZFN technikával egyidejűleg jelent meg a TALE (Transzkripciós aktivátor szerű nukleázok) nukleáz technológia, ahol a fúziós fehérje alapja egy a *Xanthomonas* nemzetségbe tartozó patogén növényi baktériumból izolált fehérje család (Moscou és Bogdanove, 2009). A TALE nukleáz technika előnye, hogy a ZFN-hoz képest kevesebb az off-target hatás, mivel nagymértékben konzervált középső régióval rendelkeznek, amelyekben jellemzően 33-35 aminosavból álló repeat-ek ismétlődnek (Mussolino *et al.*, 2011). Hátránya, hogy a repetitív DNS szekvenciák nehezítik a TALE fehérjék kívánt repeat-sorrendjének szintézisét. Az úgynevezett DNS ollók legújabb családtagja a CRISPR/Cas, ahol a cél szekvencia felismerését a sokkal egyszerűbben előállítható guide RNS irányítja (Belhaj *et al.*, 2013).

Ezen rendszerek elsősorban az endogén gének módosítására adnak lehetőséget, bizonyos körülmények között használhatóak additív génbevitelre is. Azonban az általam vizsgált nyúl vonalnál nem ezen rendszerek egyikét hanem a transzpozon alapú transzgenézist alkalmaztuk, így dolgozatomban nem témái, működésükre bővebben ezért nem térek ki.

2.2. ADDITÍV MÓDSZEREK AZ EMLŐSÁLLATOK GENETIKAI MÓDOSÍTÁSÁRA

2.2.1. A KLASSZIKUS MIKROINJEKTÁLÁS MÓDSZERE

Az 1980-as évek elején csupán néhány laboratórium foglalkozott transzgenikus állatok létrehozásával. Ugyan az ezt megelőző években, már próbálkoztak a különböző korú embriók vírus fertőzése révén genetikailag módosított állatok létrehozásával, a nagy áttörést mégis 1980-ban a mikroinjektálás módszere hozta (Gordon *et al.*, 1980). A klasszikus mikroinjektálásnak a megtermékenyített petesejt előmagjába történő DNS bejuttatás tekinthető, tulajdonképpen ez számos újabb transzgen technika alapja is (Godke *et al.*, 2014). A leggyakrabban használt előmag injektálásán kívül lehetőségünk van a zigóták citoplazmájába, vagy akár a perivitellinális térbe történő injektálásra. Előbbire példa a cirkuláris DNS konstrukció plazmid formában történő, vagy a transzpozon rendszerek injektálása. Utóbbit, pedig lentivírusok segítségével történő DNS

bejuttatás esetében használják. A klasszikus pronukleusz azaz előmag injektálásnál fontos, hogy az idegen DNS linearizált formában kerüljön a zigótába, ugyanis a cirkuláris DNS beépülésének hatékonysága jelentősen alacsonyabb (Brinster *et al.*, 1985). A kópiaszám a mikroinjektálás esetében kritikus kérdés, mivel a bejuttatni kívánt konstrukciót linearizált formában injektáljuk a termékenyített petesejtekbe, a linearizált molekulák az injektálást követően, de még az integráció (beépülés) előtt konkatamer formába rendeződnek (Cousens *et al.*, 1994). A transzgén több egymást követő kópiájának legtöbbször fej-farok módon történő integrációjával (előfordulhat fej-fej vagy farok-farok irányultság is). Továbbá a kromoszómákon kialakuló kettős szálú DNS töréseket javító mechanizmusoknak köszönhetően passzív formában épülnek be a genomba. A kópiaszám leggyakrabban 5-10 körüli, de ritkán elérheti a több százat vagy akár ezret is (Hogan *et al.*, 1986) a magas kópiaszám következménye lehet a silencing azaz csendesítési folyamat (Wolffe, 1997).

A technika előnye, hogy jól jellemzett, és viszonylag nagy DNS szakaszok integrálhatóak vele. Hátránya, hogy a beépülés helye véletlenszerű, függ a kromoszómális környezettől (pozíció hatás), bár ez utóbbi a nagyméretű mesterséges kromoszómák mikroinjektálásával (BAC, YAC) (Schedl *et al.*, 1992; Yang, Model és Heintz, 1997), vagy határoló szekvenciák beépítésével a transzgén konstrukcióba (SAR-MAR, LCR) (McKnight *et al.*, 1992; Pawlik és Townes, 1995) javítható.

További hátránya, hogy a megszületett alapító egyedek között gyakori a mozaikos, vagyis az állat nem minden sejtje hordozza a kívánt genetikai módosítást. Ha ez érinti az ivarsejtvonalakat, könnyen megeshet, hogy az alapító egyed, nem örökíti a transzgént. Mozaikosság rendszerint akkor fordul elő, ha a transzgén integrálódása a többsejtes embrióban játszódik le. A mozaikosságból eredő hátrányok javítása a hosszú reprodukciós idejű állatoknál több időt vesz igénybe, míg a rövid reprodukciós idejű állatoknál, mint az egér vagy nyúl a mozaikosságból eredő gyakorlati problémák gyorsan orvosolhatóak, több transzgénikus alapító egyed létrehozásával. A transzgén expresszió változatos megjelenésének problémája a konstrukció megfelelő tervezésével könnyen kiküszöbölhető. Egy riporter gént koinjektálásával, még az embriók recipiens nőtényekbe történő visszaültetése előtt kiválaszthatjuk a megfelelő transzgénikus embriókat (Thompson *et al.*, 1995).

2.2.2. LENTIVÍRUS ALAPÚ TRANSZGENEZIS

A transzgénikus haszonállat előállítás egy részében áttörést jelentett a retrovírus alapú transzgenézis. A zigóta perivitelláris terébe juttatott retrovírus vektorokba épített transzgén szekvenciák a vírus által mediált módon egy kópiában beintegrálódnak egy véletlenszerű helyre a

genomba. A transzgénikus emlősállatok létrehozására leginkább a retrovírusok egy alosztályát a lentivírusokat alkalmazzák. Nagy előnyük, hogy az osztódó sejtek mellett a nem osztódó sejtek transzdukciójára is képesek (Naldini *et al.*, 1996). 2004-ben sikeresen hoztak létre transzgénikus szarvasmarhát lentivírus vektor segítségével (Hofmann *et al.*, 2004), de korábban sikeresen alkalmazták a technikát patkányon (Pfeifer *et al.*, 2002), egéren (Lois *et al.*, 2002), csirkén (McGrew *et al.*, 2004), és sertésen is (Hofmann *et al.*, 2003). A beépülés egy kópiában történik, de az integrációs esemény többször is ismétlődhet. A virális szekvenciák jelenlétének köszönhetően a DNS metilációs folyamatok a transzgén csendesüléséhez vezethetnek (Hofmann *et al.*, 2006). A fent említett haszon- és laborállat fajokban nagy hatékonysággal (20-50%) működő módszert nyúlban először munkacsoportom tagjai alkalmazták (Hiripi *et al.*, 2010). A nyúl korai embrionális fejlődése az egérénél gyorsabb ezért a GFP jelzőgént kifejező alapító nyulak mozaikosaknak bizonyultak, és az ivarszervekbe történő beépülés alacsony mértéke miatt az örökítő képességük is csökkent (Hiripi *et al.*, 2010).

A mikroinjektálás módszere nyúl embriók esetében 1-6%, a lentivírus alapú transzgenézissel kombinálva a hatékonyság 15%-ra nőtt viszont a mozaikosság miatt a megszületett transzgénikus egyedek transzgén örökítő képessége alacsony (Hiripi *et al.*, 2010).

2.2.3. TRANSZPOZON ALAPÚ TRANSZGENEZIS

A transzpozonok alkalmazása az additív transzgenézisben jelentős hatékonyság növekedést eredményezett a laboratóriumi nyúlban is. A transzpozonok olyan mozgékony genetikai elemek, melyek a genom egyes részei között változtatják helyüket. Az aktív beépülési rendszerek közül, néhány DNS transzpozon a mai napig mozgó genetikai elem pl.: PiggyBac és a Tol2, néhányat pedig a transzgenézishez rekonstruáltak pl.: Frog Prince, HSMAR1, ezek mindegyike a DNS transzpozonok Tc1/mariner családjának tagja (Garrels *et al.*, 2012). Ezek a rendszerek leggyakrabban a kivágás-beillesztés mechanizmusával változtatják helyüket a kromoszómán. A kódolt transzpozáz kivágja a transzpozont és elősegíti a genomba való újbóli integrálódását (Plasterk, 1996). A transzgenézisben használt rendszerek általában nem autonóm transzpozonok, ezért működésükhöz két komponens szükséges. Az egyik plazmid kódolja a transzgént a transzpozonból származó ITR (Inverted Terminal Repeat) határoló szekvenciákkal körülvéve, a másik, maga a transzpozáz, mely a rendszerhez hozzá adható plazmidon, mRNS vagy fehérje formában is. A Sleeping Beauty (SB) transzpozon alkalmazása esetén a beépülés leggyakrabban a kódoló vagy szabályozó szekvenciáktól mentes genomi szakaszokon történik (Ivics *et al.*, 1997). Míg más transzpozonok például: a PiggyBac, előnyben részesíti a gén közeli helyeket, vagy a Tol2

amit előszeretettel alkalmaznak funkció veszteses vizsgálatoknál, mert előnyben részesíti a génekbe történő beépülést. Bizonyos transzpozonok rendelkeznek felismerő cél szekvenciákkal, de ezek általában rövidek, a SB esetében ez egy TA dinukleotid szekvencia, így a beépülés helye gyakorlatilag véletlenszerű (Munoz-Lopez és Garcia-Perez, 2010). Egy integrációs esemény mindig egy transzgen kópiát épít be, és a lentivírus alapú transzgenézissel ellentétben, itt általában nincs több integrációs esemény. A multiplex beépülés és a konkatamer képzés elkerülése mellett a technika nagy előnyei a hatékonyság, a transzgen eukromatikus régiókba történő integrálása és az, hogy sok fajon alkalmazhatóak, beleértve a laboratóriumi és a haszonállatokat is (Kues és Niemann, 2011).

2.3. TRANSZPOZONOK

A transzpozonok létezéséről elsőként Barbara McClintock számolt be 1940-es években. Kukoricaszem színével kapcsolatos citogenetikai vizsgálatai során megállapította, hogy a lila antocianin pigment megjelenéséhez a kukoricában bizonyos enzimek spontán mutációja szükséges. Elmélete szerint ezek a mutációk bizonyos genetikai elemek különböző kromoszómák közötti mozgásából erednek (McClintock, 1950). McClintock csak 1983-ban kapott Nobel díjat munkásságáért, ugyanis 1969-ig tulajdonképpen a tudósok nem fogadták el azt a nézetet, hogy a gének saját lokuszaikról elmozdulhatnak. Ezt egy 1969-ben megjelent tudományos munka változtatta meg, melyben beszámoltak *Escherichia coli*-ban egy olyan bakteriális eredetű DNS szekvenciáról, mely képes a genomban való helyváltoztatásra, azaz a transzpozícióra (Shapiro, 1969). A kutatások hamar bizonyították, hogy a mobilis genetikai elemek nem csak hogy léteznek és képesek a helyváltoztatásra a genomon belül, de minden élő szervezetben előfordulnak sőt, az eukarióta genom igen nagy százalékát alkotják ezek a repetitív elemek (Kidwell és Lisch, 2001). Ezekről az ismétlődő szekvenciákról sokáig gondolták, hogy úgynevezett „önző” vagy „szemét” DNS („selfish DNA”, „junk DNA”) szekvenciák. Mára már tudjuk, hogy a mobilis elem és a gazda genomi szekvencia közötti kapcsolat inkább kölcsönösségen alapuló kapcsolat, mint parazitizmus (Kidwell és Lisch, 2001). A transzpozonok az eukarióta szervezetek elengedhetetlen részei, interakcióba lépnek a genomiális környezetükkel, így segítve a szervezetfejlődési képességét, fontos szerepet betöltve ezzel a komplex genetikai hálózatok fejlődésében. A transzpozonok és a gazda genom közötti kapcsolat rendkívül változatos lehet, a génstruktúra és szabályozásának módosításától, a genomiális szerkezet megváltoztatásáig terjedhet (Miller és Capy, 2004). Példa erre a génduplikálás, ami az új gének generálásának egyik fő módja az eukarióta szervezetben. Míg az egyik duplikátum ellátja funkcióját, a másik szabadon fejlődhet és felhasználható a „természet kísérleteihez” (Makalowski, 2003). Felfedezésük óta a mobilis genetikai elemek,

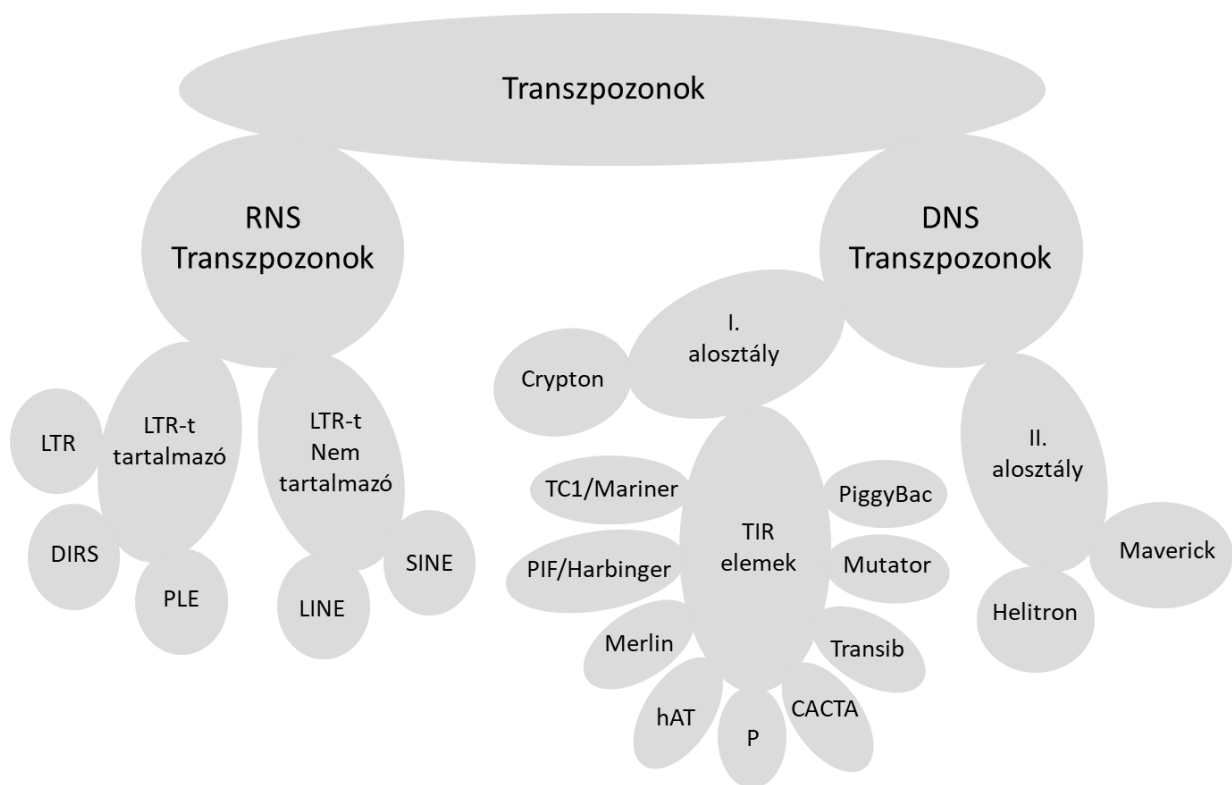
számos kutatás alapját szolgálták, bővítve ezzel a modern biológia több területét. Habár a transzpozíció minden mechanizmusa még nem ismert, a kezünkben lévő tudás lehetővé teszi a transzpozonok rutinszerű használatát a transzgenézisben, a mutagenézisben vagy a gén terápiában (Ivics, 2011). Segítségükkel, rövidíthető a transzgenikus állatok előállításához szükséges idő, hatékonyabbá válik a géncsapdázás, vagy a célzott génbevitel.

2.3.1. DNS TRANSZPOZONOK

A mozgó genetikai elemek, azaz a genomiális helyük megváltoztatására képes szekvenciák csoportosítása transzpozíciójuk alapján két fő osztályba történik (*1. ábra*). Az I. osztályba tartoznak a retrovírusok és a retrotranszpozonok melyek RNS intermedieren keresztül, azaz a másolás és beillesztés („Copy and paste”) mechanizmusával halmozódnak a genomban. Ezeket összefoglaló néven retroelemeknek (REs) nevezzük. A II: osztályba a DNS intermedieren keresztül mozgó elemek tartoznak, melyek a transzpozícióhoz a kivágódás és beillesztés („Cut and paste”) mechanizmusát alkalmazzák, ide sorolhatóak DNS transzpozonok (Gogvadze és Buzdin, 2009) (*1. ábra*).

Egy régebbi megközelítésben beszélhetünk konzervatív transzpozonokról (DNS transzpozonok), melyek kivágódva a DNS szálból egy másik helyre integrálódnak, nem növelve ezzel a kópiaszámukat, és beszélhetünk replikatív transzpozonokról (RNS transzpozonok), melyek a DNS szálról íródó RNS reverz transzkripciójával jönnek létre és integrálódnak a genomba, növelve ezzel kópiaszámukat (Derbyshire és Grindley, 1986). A két főcsoport különböző mozgási mechanizmusának ellenére feltételezik, hogy egyes RNS transzpozon elemek integráza, közös eredetű bizonyos DNS elemek transzpozázával (Capy *et al.*, 1997).

Az RNS transzpozonok további két csoportba sorolhatóak aszerint, hogy tartalmazzak-e hosszú ismétlődő végszekvenciákat (LTR) vagy sem. Az LTR-el nem rendelkező RNS transzpozonok további két kategóriára oszthatóak, a LINE és SINE elemekre (Richardson *et al.*, 2015). Mivel dolgozatom témája egy DNS transzpozonnal létrehozott markergént kifejező nyúl vonal expressziós mintázatának vizsgálata volt, így részletesebben nem térek ki a retrotranszpozonok vagy RNS transzpozonok működésére.



1. ábra: Transzpozonok csoportosítása. *Retrotranszpozonok főbb és alosztályai. A DNS transzpozonok főbb és alosztályai a családokkal együtt.*

A legtöbb DNS transzpozon működési mechanizmusának köszönhetően nem árasztja el a genomot saját kópiáik „tömegével”, habár vannak kivételek (Munoz-Lopez és Garcia-Perez, 2010). A DNS transzpozonok is növelhetik a genom méretét abban az esetben, ha a transzpozíciójuk a kromoszóma replikáció alatt történik egy már replikálódott kromoszómáról egy még nem replikálódott kromoszómára (Wicker *et al.*, 2007). Az RNS transzpozonokhoz hasonlóan a DNS transzpozonok osztályának is vannak autonóm és nem autonóm tagjai. Az autonóm elemek nyílt olvasási keretein (ORF) helyezkednek el a transzpozícióhoz szükséges fehérjék génjei, míg a nem autonóm elemek csupán csak a transzpozícióhoz elengedhetetlen szekvenciákat hordozzák (Feschotte *et al.*, 2002).

A DNS transzpozonokat további két alosztályra oszthatjuk, a transzpozíció során bekövetkező DNS szál vagy szálak hasításától függően (Wicker *et al.*, 2007). A két alosztály tovább bontható családokra. Az első alosztályba tartozó családok kettős szálú DNS törést okoznak, ide tartoznak a TIR és Crypton elemeket tartalmazó transzpozonok (Chalopin *et al.*, 2015) a Tc1/mariner, PIF/Harbinger, hAT, Mutator, Merlin, Transib, P, piggyBac, és a CACTA transzpozon családok (Munoz-Lopez és Garcia-Perez, 2010). A TIR elemeket tartalmazó transzpozonok autonóm elemek, tehát hordozzák a kivágódáshoz szükséges transzpozáz kódot, melyet két oldalról a TIR szekvenciák határolnak. A transzpozáz ezeket a határoló szekvenciákat ismeri fel, majd

megtörténik a kivágódás valamint a beépülés az új genomiális helyre. A beillesztést követően a transzpozon felismerő szekvenciája gyakran megkettőződik. A Crypton elemek transzpozíciós mechanizmusuk során egy Tirozin rekombinázt alkalmaznak, ezért feltételezhető a rekombináció a cirkuláris intermedier és a cél DNS között (Chalopin *et al.*, 2015). A másik alosztályba tartoznak a Helitronok és a Maverick transzpozon családok (Feschotte és Pritham, 2007).

2.3.2. SLEEPING BEAUTY TRANSZPOZON RENDSZER

A Sleeping Beauty transzpozon a *Tc1/mariner* szupercsalád tagja. A család repetitív szekvenciáit elsőként *C. Elegans*-ban (Emmons *et al.*, 1983) fedezték fel. A *Tc1/mariner* transzpozonok csoportjának legszélesebb körben előforduló szupercsaládja, tagjai megtalálhatóak a növényekben, baktériumokban és az állatokban egyaránt (Munoz-Lopez és Garcia-Perez, 2010), gerincesekben 1994-ben azonosították először öt különböző tagját a családnak (Radice *et al.*, 1994). Jellemzően a kivágódás- beillesztődés mechanizmusával mozognak tagjai. A transzpozáz fehérje C-terminális felén konzervált domének helyezkednek el (Ivics *et al.*, 1996), melyekből három alkotja a katalitikus domén központot (Doak *et al.*, 1994). A legtöbb eukariótában megtalálható a családhoz tartozó elem 1300-2400 bp hosszú és tartalmazza a transzpozáz kódoló gént, melyet két oldalról a TIR szekvenciák határolnak. Az elemek méretbeli különbségeit a TIR szekvenciák hossza okozza, ami 17-1100 bp hosszú lehet. A TIR szekvencia a transzpozícióhoz elengedhetetlen, mivel tartalmazza a transzpozáz kötőhelyeket, és az exterminális részen a hasítási helyeket (Benjamin *et al.*, 2007). A nem másolódó DNS transzpozonok esetében a TIR szekvenciákat két transzpozáz specifikusan ismeri fel és hasítja a DNS-t kivágva azt a genomból. A kivágódást követően a két transzpozáz molekula összetapad, egy dimert alkotva megtalálják a cél szekvenciát ami a *Tc1/mariner* család esetében egy TA dinukleotid (Munoz-Lopez és Garcia-Perez, 2010). A célhelyen egyszálú DNS hasítást követően a kivágott szekvenciát beilleszti, majd a gazda genom javító mechanizmusai a keletkezett rést feltöltik. Az integrációs folyamat következtében a TA dinukleotid az integrált transzpozon oldalán megkettőződik, ez a szupercsalád valamennyi tagjára jellemző (Tellier *et al.*, 2015). Közös jellemző továbbá a transzpozíció során létrejövő, úgynevezett „transzpozon lábnyom” a kivágódás helyén, mely a kettős szálú DNS törés következtében beinduló javító mechanizmusoknak köszönhető ez a lenyomat SB esetében TAC(A/T)G (Liu *et al.*, 2004).

Elterjedésük ellenére mindösszesen 10 olyan tagja ismert, mely napjainkban is aktív, illetve ismeretes a szuper család 4 olyan tagja, amelyet inaktíválódott elemekből rekonstruáltak. A Sleeping Beauty is egy ilyen rekonstruált szintetikus transzpozon, melyet halgenomból származó

inaktív transzpozon szekvenciák alapján készítették (Ivics et al., 1997). A hosszú evolúciós idő alatt inaktiválódott elemekből rekonstruált Sleeping Beauty az első ősi transzponálható elemekből létrehozott DNS transzpozon, mely emlősökben is hatékonyan működik (Ivics és Izsvák, 2015). Struktúráját tekintve egyszerű, a transzpozáz polipeptidet kódoló génből és a transzpozícióhoz szükséges enzimikus faktorokból áll melyeket a TIR vagy IR szekvenciák határolnak.

A *Tc1/mariner* szupercsalád tagjaihoz hasonlóan a kivágódás-beillesztődés mechanizmusával mozog, és a TA dinukleotid szekvenciát preferálja cél szekvenciaként, de egy 2013-ban megjelent kísérlet eredményei azt mutatják, hogy a TA dinukleotid nem az egyetlen cél szekvenciája a Sleeping Beauty transzpozonnak a beépülések kb. 1,6%-a nem TA helyeken történt (Li et al., 2013). Yabin Guo és munkacsoportjának köszönhetően mára már bizonyosságot nyert, hogy valóban az integrációs események 1,4%-a nem TA dinukleotid szekvenciánál történik. Habár ezek a nem TA konszenzus szekvenciák, nem mutatnak szimmetrikus eloszlást, mint a TA dinukleotid, de a cél szekvenciát követő határoló régió és az SB transzpozon végek tökéletes hasonlósága azt mutatja, hogy a transzpozáz DNS kötő doménje és a cél szekvencia között fizikai kapcsolat alakul ki. Ez arra enged következtetni, hogy ezeket a nem szokványos integrációs eseményeket a transzpozáz és a transzpozon végéhez hasonló DNS szekvenciák kölcsönhatásai vezérlik (Guo, Zhang és Hu, 2018). Az SB transzpozon DNS kötő régiója két a PAX fehérjék párosított doménjéhez hasonlóan két HTH (Helix-turn-Helix) motívumból álló aldomént (PAI+RED=PARED) tartalmaz (Izsvák et al., 2002). A specifikus szubsztrát felismerésért a transzpozáz N terminális párosított DNS kötő doménje felelős, ez a párosított domén lehetőséget ad különböző DNS szekvenciák kötődéséhez (Ivics és Izsvák, 2015). A katalitikus domén felelős a DNS hasításáért és a transzpozíciós reakciók összecsatolásáért. Ez a transzpozázok többségében beleértve a retrovirális transzpozonokat is konzervált. Ez a domén a C terminális régióban helyezkedik el, ugyancsak konzervált aminosav tripletet tartalmaz (DDE) (Doak et al., 1994; Kulkosky et al., 1992). Ezek az aminosavak esszenciális szerepet játszanak a katalízisben.

A Sleeping Beauty transzpozon sikeres alkalmazása lelkesítette a kutatókat, azonban a gazda genom esszenciális génjeinek inszerciós mutagenézisét elkerülendő védelmi mechanizmusok biológiai kiküszöbölése érdekében szükség volt egy nagyobb hatékonyságú hiperaktív transzpozáz létrehozására. A hiperaktív SB transzpozon létrehozásához különböző aminosav szubsztitúciókat hoztak létre szinte a teljes Sleeping Beauty polipeptiden (Ivics és Izsvák, 2015). Végül az első generációs SB transzpozázhoz képest 100-szoros hatékonyság növelést sikerült elérni. Az SB100X nevet viselő transzpozon 35-50 %-kal stabilabb géntranszfert tett lehetővé humán CD34 (+) hematopoietikus progenitor sejtekben, továbbá 45 %-kal hatékonyabb transzgenézist eredményezett egér embriók pronukleusz injektálása során (Mátés et al., 2009; Xue et al., 2009).

Ugyanezt a magas hatékonyságot tapasztalták mezenchimális őssejteknel, izom progenitor sejteknel és indukált pluripotens őssejteknel, valamint T sejteknel is (Belay *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2011).

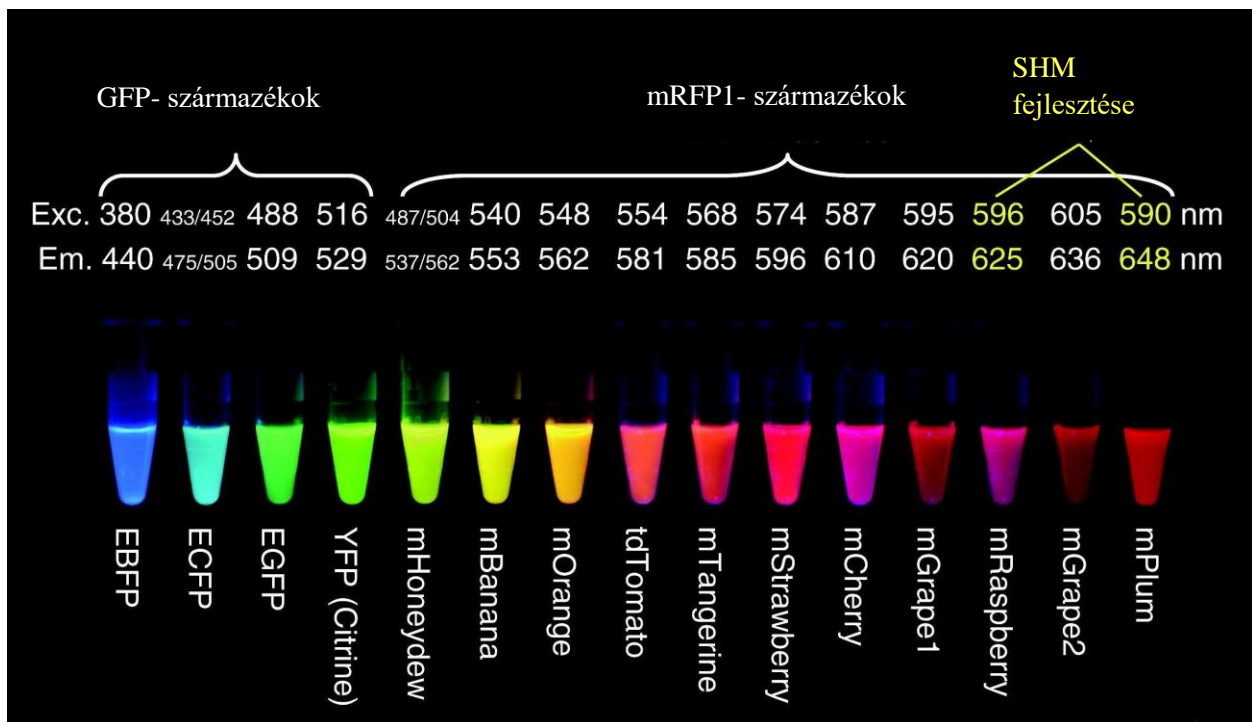
A transzpozonok közvetlenül a genomban helyezik el „genetikai rakományukat”, ezzel biztosítva a nagy hatékonyságú és stabil géntranszfert az orvosi alkalmazásban (Voigt *et al.*, 2016). A Sleeping Beauty az egyik legszélesebb körben használt transzpozon a transzgenézis, az inszerciós mutagenézis és a génterápia fontos eszköze, az egyetlen transzpozon, melyet a humán génterápiában jelenleg alkalmaznak (Carpentier *et al.*, 2014). A Sleeping Beauty transzpozon mediált transzgenézis során egyidejűleg több független transzgén integrálódását érték el *in vitro* fertilizált szarvasmarha zigótákban (Garrels *et al.*, 2016b). A SB transzpozon rendszerrel sikeresen hoztak létre transzgenikus egeret, patkányt, sertést (Garrels *et al.*, 2016a; Ivics *et al.*, 2014b; Ivics *et al.*, 2014b), és a dolgozatomban témájaként vizsgált Vénusz fehérjét expresszáló nyulat (Ivics *et al.*, 2014a).

2.4. RIPORTERGÉNEK

A molekuláris képalkotás fontos eszközei a riportergének, nevezhetnénk őket molekuláris genetikai képalkotó rendszereknek, illetve ezen rendszerek elengedhetetlen kellékének. A molekuláris képalkotás magában foglalja a proteomikus, a metabolikus, a celluláris biológiai folyamatok és a genetikai képalkotás összességét (Kang és Chung, 2008). Leggyakrabban az alábbi kétféle képalkotó módszert alkalmazzák a molekuláris genetikai képalkotáshoz, ezek a riportergének, illetve a jelöléssel ellátott antiszensz oligonukleotid próbák. Talán a legegyszerűbb és legolcsóbb képalkotási módok egyike a fluoreszcens és a biolumineszcens képalkotás, nagy előnyük, főként a biolumineszcens módszernek, hogy alacsony kifejeződési szint mellett is kimutatható. A molekuláris biológiában számos riportergént fejlesztettek, melyek segítségével lehetőség nyílik promóter aktivitás mérésére, génexpressziós szintek vizsgálatára, vagy fehérje-fehérje kölcsönhatások megfigyelésére (Blasberg és Tjuvajev, 2003). A technika könnyű megoldást nyújt a sejt vándorlás például az immunsejtek vagy az őssejtek *in vivo* eloszlásának megfigyelésére is. A biológiai folyamatok *in vitro* és *in vivo* analíziséhez általában a fluoreszcens képalkotás technikáját alkalmazzák. A technika folyamatosan fejlődik, mind a molekuláris biológia, mind pedig az orvostudomány számára, képesek vagyunk vizsgálni a májsejtek redox állapotának dinamikus változásait és az apoptózist egy redoxidáció érzékeny GFP riportergén segítségével (Ozaki, Ozawa és Yamada, 2015). A technika fejlődése ellenére gyakran nehézséget okoz kiválasztani, mely riportergént használjuk a konstrukciónkban, ennek oka, az új fluoreszcens

fehérjékre vonatkozó kísérleti adatok frissítésének hiánya (Kleeman *et al.*, 2018). Pedig az *in vivo* képalkotás már-már nélkülözhetetlen eszköze a biológiai és orvostudományoknak. A Zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) expresszáló patkányt, nyulat, és sertést már alkalmazzák az *in vivo* molekuláris genetikai képalkotásban. Ezeknek a GFP pozitív állatoknak a szervei értékes szenzorai lehetnek a sejttérápiának preklinikai körülmények között vagy a szerv transzplantációs vizsgálatokban (Murakami és Kobayashi, 2012). Az agyi neuron hallózat feltérképezésére, jól bevált módszer az úgynevezett „Brainbow” technika, mellyel az egyes neuronok egyedileg megkülönböztethetőek a zöld fluoreszcens fehérje különböző szín származékainak (piros, kék, zöld) véletlenszerű expressziójával (Dhawale és Bhalla, 2008). A „Brainbow” mintájára már képesek vagyunk a felnőtt ephiteliális szövetek regenerálódásának képességét vizsgálni zebradániók bőrfelszíni hámsejt populációiban (Chen *et al.*, 2016).

A fluoreszcens optikai képalkotáshoz szükséges egy olyan gerjesztő fényként használatos külső fényforrás, melynek hullámhossza rövidebb a fluorofor fehérje kibocsájtott fényének hullámhosszánál. A fluoreszcens riportergénről íródott fehérje emmitált fénye könnyen detektálható megfelelő szűrők használatával (Rome, Couillaud és Moonen, 2007). A leggyakrabban használt riportergén a GFP, melynek kódoló génjét 30 évvel a felfedezése után sikeresen klónozták (Prasher *et al.*, 1992). Felfedezéséért 2008-ban megosztott Nobel díjat kapott Shimomura aki elsőként publikálta (Shimomura, Johnson és Saiga, 1962), Chalfie, aki bizonyította gyakorlati alkalmazhatóságát *E. coli*-ban és *C. elegans*-ban (Chalfie *et al.*, 1994), valamint Tsien kinek nevéhez fűződik a GFP számos fluoreszcens származéka (2. ábra) (Tsien, 1998). Azóta már számos szintetikus változata is ismert, a fluoreszcencia stabilitásának és a fényerősség növelésének érdekében létrehoztak egy fokozott működésű úgynevezett eGFP-t (March, Rao és Bentley, 2003). Mára már számos más fluoreszcens fehérjét és azok származékait sikerült előállítani, (2. ábra) például a vörös fluoreszcens fehérjét is, melynek különböző változatai, világosabbak, és kevésbé toxikusak, mint az eredeti gén (Shaner, Steinbach és Tsien, 2005).



2. **ábra:** Tsien és munkacsoportja által kifejlesztett fluoreszcens fehérjék palettája 2004-ből. A rekombináns fehérje mintákat *E. coli* expressziós rendszerekből tisztították, az excitációs és emissziós , értékeket a minta csövek felett szerepelnek. **Forrás: (Tsien, 2005)**

2.4.1. VÉNUSZ RIPORTERGÉN (YFP)

A leggyakrabban alkalmazott riportergén a GFP vagy annak származékai, automatikusan állítják elő kromoforjukat és *in vivo* kimutatásuk nem igényel bonyolult technikát, vagy módszert (Chalfie *et al.*, 1994). Leggyakrabban, promóter aktivitás vizsgálatokhoz, vagy a vizsgálni kívánt fehérjék jelölésére szolgál, például, hogy lokalizálni tudják kifejeződésének helyét vagy a fehérje-fehérje kapcsolatokat vizsgálhassuk. A zöld fluoreszcens fehérje sárga emissziós eltolódottságú változatát nevezzük YFP azaz sárga fluoreszcens fehérjének, ez a GFP szekvenciához képest egy aminosav szubsztitúciót hordozó változat (Wachter *et al.*, 1998; Blaby-Haas, Page és Merchant, 2018). Az YFP elnevezést viseli még a *Vibrio Fischeri* tengeri baktériumból származó fluoreszcens fehérje is, melynek szintén sárga emissziós fénye van (Daubner *et al.*, 1987). Az YFP a zöld fluoreszcens fehérjék származékai közül a leghosszabb hullámhosszú, ami a kromofor fenolált anionja melletti aromás gyűrűhalmozódással jön létre (Tsien, 1998). A sárga fluoreszcens irányba eltolódott riportergén a második leggyakrabban használt „jelölő” génnek egyike, mind expressziós vizsgálatoknál, mind pedig a fehérje-fehérje interakciós vizsgálatok esetében (Neupert *et al.*, 2009). A GFP és annak származékaira egyaránt értendő, hogy a lassú érés nagy akadályt

jelent a kimutatásban. A sárga fluoreszcens fehérjék viszonylag sav és kloridion érzékenyek. A Vénusz egy „javított” YFP, mely stabilabban fluoreszkál és csökkent pH és klorid érzékenységgel bír (Nagai *et al.*, 2002). Ez egy olyan mutációt hordozó variáns, melyben 37°C-on meggyorsul a kromofor oxidációja, mely az érési sebességet korlátozza, ezért a Vénusz még a fokozott YFP-nél (EYFP, enhanced yellow fluorescence protein) is jobb hatékonysággal és érési sebességgel rendelkezik mutációinak köszönhetően (Kremers *et al.*, 2006).

2.5. CAG PROMÓTER

A CAG egy szintetikus előállított promóter, mely tartalmazza a Cytomegalovírus (CMV) enhancer elemét, a csirke β -aktin gén első exonját és intronját, valamint a nyúl β -globin gén fúziós elemét (splice acceptor), ez a kombináció biztosítja a hatékony expressziót az eukarióta sejtekben. A promóter megalkotása, Miyazaki és munkacsoportja nevéhez fűződik, akik nagyon erős transzgén kifejeződést figyeltek meg különböző sejt típusokban *in vitro* és szövettípusokban *in vivo* (Niwa *et al.*, 1991). Egy 2008-ban megjelent cikk pedig, beszámol az őssejtek mezoderma irányú differenciációja során tapasztalt stabil transzgén expresszióról, melyet a CAG promóter biztosított, ennek ellenkezőjét figyelték meg a CMV vagy a β -actin promóterekkel (Alexopoulou *et al.*, 2008). Egy korábbi tanulmány pedig a CAG-*cre* transzgénikus egerek egy érdekes tulajdonságáról számol be. Megfigyelték, hogy más *cre* rendszerrel létrehozott transzgénikus nőstény egerekkel szemben, a CAG által vezérelt transzgénikus egerek érett petesejtjeikben rendelkeznek elegendő *cre* aktivitással ahhoz, hogy az apai eredetű *LoxP* szekvencia törését okozzák a megtermékenyülésük után, függetlenül a *cre* átvitelétől (Sakai és Miyazaki, 1997). Széles körben használják, jó hatékonysága miatt szinte az összes eukarióta sejt típusban működik, stabil transzgén expresszióval rendelkeznek, valamint az utódokban történő transzmisszió fenntarthatja a transzgén stabilitását.

2.6. REKOMBINÁNS FEHÉRJE TERMELTETÉS

Terápiás fehérjék előállítására számos lehetőség áll a rendelkezésünkre, az egyik legkézenfekvőbb a természetes források felhasználásával történő tisztítás. Ami nehézkes és költséges, a korlátozott mennyiség miatt, pedig szükséges más alternatív megoldások alkalmazása. Ilyen a humán sejt kultúrákban és a kínai hörcsög petefészkek (CHO) sejt kultúrákban történő terápiás fehérje előállítás. Ezek fő előnye, hogy a kultúrákban szekretált fehérjék átesnek a poszt-transzlációs folyamatokon, habár nem minden esetben játszódnak le tökéletesen. A humán sejt vonalak termelékenysége igen alacsony a stabil kultúrák fenntartása viszont bonyolult, és

költséges. Az állati eredetű sejtkultúrák további hátránya, hogy a glikoziláció nem stabil és gyakran nem megbízható (Houdebine, 2009). A glikoziláció a poszt-transzlációs folyamatok közül elmaradhatatlan lépés, ugyanis befolyásolja a fehérje immunogenitását és stabilitását más paraméterek hatására (Bószé és Hiripi, 2012). Egy másik igen jelentős alternatíva rekombináns fehérjék termeltetésére a biofarming, azaz transzgénikus állatokban vagy növényekben való előállításuk. A növényi bioreaktorok előnye, hogy költséghatékonyak magas termelési hozammal, viszont hátrányuk, hogy magas a káros környezeti hatások kockázata (Kirk *et al.*, 2005). A stratégiák, melyeket az említett hátrány kiküszöbölésére dolgoztak ki, növelik a költségeket és veszélyeztetik a termelési hozamot. Az eukarióta rendszerek, mint például az élesztők, a fonalas gombák, vagy az egysejtű algák alkalmazását korlátozza, hogy gyakran duplikálják a humán fehérje termelés mintáit, ezzel olyan rekombináns fehérjéket előállítva, amelyek immunogének továbbá aktivitás hiányosak (Dyck *et al.*, 2003). A genetikailag módosított állatok számtalan lehetőséget tartogatnak például a humán betegségek mechanizmusának tanulmányozása tekintetében, vagy akár azok modellezése során, de igen fontos eszközei lehetnek a humán gyógyászatban alkalmazott terápiás fehérjék előállításának is. A rendszer nagy előnye a gyors és hatékony jó minőségű fehérje előállítás (*1. táblázat*). Hátránya lehet a humán fehérje nehézkes elválasztása az állati eredetű párjától (Houdebine, 2009).

1. Táblázat: *Transzgenikus tej termelés összehasonlítása különböző fajokban.*

Faj	Vemhességi idő (nap)	Ivarérettség ideje (hónaposan)	Tejtermelés/ laktáció (liter)	Eltelt hónapok száma a mikroinjektálást és visszaültetést követően az első fejésig
Egér	22	1	0,0015	3-6
Nyúl	30-31	5-6	1-1,5	7-8
Sertés	115	7-8	200-400	15-16
Juh	155	6-8	200-400	16-18
Kecske	155	6-8	600-800	16-18
Szarvasmarha	285	15	6000-8000	30-33

Forrás: (Wang *et al.*, 2013)

2.6.1. REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK ELŐÁLLÍTÁSA TRANSZGÉNIKUS ÁLLATOKBAN

A transzgenikus állati rendszerek rugalmasabbak, mint más rendszerek és lehetőséget biztosítanak arra, hogy a szükséges feldolgozó enzimeket a termékekkel együttesen fejezzük ki, így jutva nagyobb mennyiségű humanizált rekombináns fehérjéhez (Echelard, 1996). A transzgenikus állatokban történő fehérje előállítás igen elterjedt, mivel számos fehérje igényel átfogó poszt-transzlációs módosítást (Hennighausen, 1990), ami ebben a rendszerben megtörténik (Bősze, Baranyi és Whitelaw, 2008). A legelterjedtebb a tejben történő előállítás (*1. táblázat*), mert gazdaságosabb, könnyebben hozzáférhetőbb, begyűjthetőbb, és fiziológiailag kisebb terheléssel jár, mint például a növényekben vagy a vérben történő fehérje előállítás. A tejükben rekombináns fehérjét előállító állatok generálásában, jelentős hatékonyság javítást értek el a géntechnológia legújabb fejlesztéseivel, különösen a célzott genom szerekeztési technológiák megjelenésével. Ez lehetővé tette az állatok generálására vonatkozó új megközelítések kialakítását, beleértve a gazdaságilag fontos fajokat is, (Shepelev *et al.*, 2018).

Számos beszámolót olvashatunk a terápiás fehérjék egyéb testfolyadékban történő termeltetésére például vérben (Swanson *et al.*, 1992) vagy szeminális plazmában (Dyck *et al.*, 1999), mely könnyen begyűjthető, és a tejjel ellentétben folyamatosan a rendelkezésre áll, viszont kevesebb mennyiségű fehérje nyerhető, így a termelés költsége megnövekszik.

Olvashatunk humán növekedési hormon termeltetéséről transzgénikus egerek vizeletében (Kerr *et al.*, 1998) vagy transzgénikus selyemhernyók selyemmirigyén keresztül történő rekombináns fehérje kiválasztásról (Royer *et al.*, 2005). E rendszerek mindegyikének meg van a maga előnye és hátránya a vérben például túl instabil a rekombináns fehérje és az állatok számára nagy fiziológiás hatással lehet a fehérje vérben történő előállítás (Houdebine, 2009). Meg kell jegyezni a transzgénikus madarakat is mint lehetséges bioreaktorokat, a tojás a tejhez hasonlóan könnyen hozzáférhető terápiás fehérje forrás lehet (Wu *et al.*, 2015).

Mégis a leggyakrabban tejben történik a termeltetés főként a természetes módon történő fehérje kiválasztódásnak köszönhetően. Nagy előnyét már korán felismerték és 1995-ben változó sikerességgel alkalmazták a legfontosabb tejfehérje gének szabályozó szekvenciáit heterológ fehérje termelésre transzgénikus állatok tejében (Maga és Murray, 1995). Elsőként transzgénikus egér tejében termeltettek sikeresen rekombináns fehérjét (Gordon *et al.*, 1992). Azóta már forgalomban kapható az FDA által 2009-ben engedélyezett rekombináns humán antithrombin III, melyet transzgénikus kecskék tejében állítanak elő (*ATryn (Antithrombin (Recombinant)) FDA Approval History - Drugs.com*).

A terápiás fehérjék a szekréciós szignál peptidnek köszönhetően a tej vizes fázisában választódnak ki, ez alól két kivétel van a cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR), melyet transzgénikus egerek tejében állítanak elő (DiTullio *et al.*, 1992), illetve a humán alkalikus foszfatáz, melyet a transzgénikus nyulak tejsírájában termeltetnek (Bodrogi *et al.*, 2006), mind két esetben az előállított fehérje hidrofób és a tejsírban koncentrálnak.

A RAND Corporation vállalat prognózisa szerint a genetikailag modisított állatok emlőmirigyének bioreaktorként való felhasználása a rekombináns fehérjék előállítására a biotechnológia egyik legfontosabb területe lesz 2020-ig (Silberglitt *et al.*, 2006).

2.6.2. TERÁPIÁS FEHÉRJÉK ELŐÁLLÍTÁSA TRANZGÉNIKUS NYÚLBAN

A nyúl az egyik leggyakrabban alkalmazott laboratóriumi állatfaj egyike, orvos biológiai kutatásoktól kezdve a transzgénikus állatmodellekig széles körben használható. Az első transzgénikus nyulat 1985-ben pronukleusz injektálással hozták létre (Hammer *et al.*, 1985). A transzgénikus nyúl nem csupán mérete miatt előnyös választás a bioaktív peptidek vagy terápiás fehérjék termeltetésére hanem, mert stabil a transzgen öröklődése és kifejeződése, a poszt-transzlációs fehérje módosítások létrejönnek, és alkalmas komplex nehezen kifejezhető fehérjék termeltetésére is (Fan és Watanabe, 2003). Továbbá teje igen jól karakterizált (Baranyi *et al.*, 1995). Az emlőmirigy termeli és választja ki a kazein (α_{s1} , α_{s2} , β , κ) és savó (β -laktoglobulin, α -

laktalbumin, WAP) fehérjét a tejbe (Devinoy *et al.*, 1988; Bősze, Baranyi és Whitelaw, 2008). A transzgénikus nyulak segítségével előállított gyógyászati készítmények három fő csoportba sorolhatóak: különböző antitestek, hormon és bioaktív peptidek, illetve terápiás fehérje készítmények (Bősze *et al.*, 2003). További előnyeik, hogy laboratóriumi felhasználásra rendelkezésre állnak úgynevezett SPF (specifikus patogén mentes) nyulak, de a konvencionális nyulaknál sem ismeretesek például a prion betegségek, szemben a juhokkal, szarvasmarhával, vagy az emberrel. A laboratóriumi nyúltörzsek mentesek a nyúlról emberre terjedő súlyos betegségektől, ami a transzgénikus nyulat biztonságos humán terápiás fehérje termelő rendszerre teszi (Wang *et al.*, 2013). A Pompe betegség kezelésére szolgáló α -glükozidáz terápiás fehérjét, transzgénikus nyulak emlőmirigyében termeltetik (Van den Hout *et al.*, 2000) hatásosságát pedig, már II. fázisú klinikai vizsgálatokkal igazolták (Van den Hout *et al.*, 2001). A munkacsoport további vizsgálatai bizonyították, hogy az enzim pótló terápia biztonságos a Pompe betegség kezelése esetében is továbbá, hogy a transzgénikus nyulak alkalmasak tejükben történő jól működő terápiás fehérje előállításra (Van den Hout *et al.*, 2004). Ezt bizonyítja a 2010-ben piacra kerülő engedélyezett terápiás gyógyszert a Ruconest[®], melyet transzgénikus nyulak tejéből tisztítanak, és az örökletes angioödéma kezelésére alkalmaznak (*Ruconest (C1 esterase inhibitor (recombinant)) FDA Approval History - Drugs.com*). Számos rekombináns fehérjét termeltetnek transzgénikus nyulakban (2. táblázat).

2. Táblázat: *Transzgenikus nyulakban termeltetett fehérjék összefoglaló táblázata*

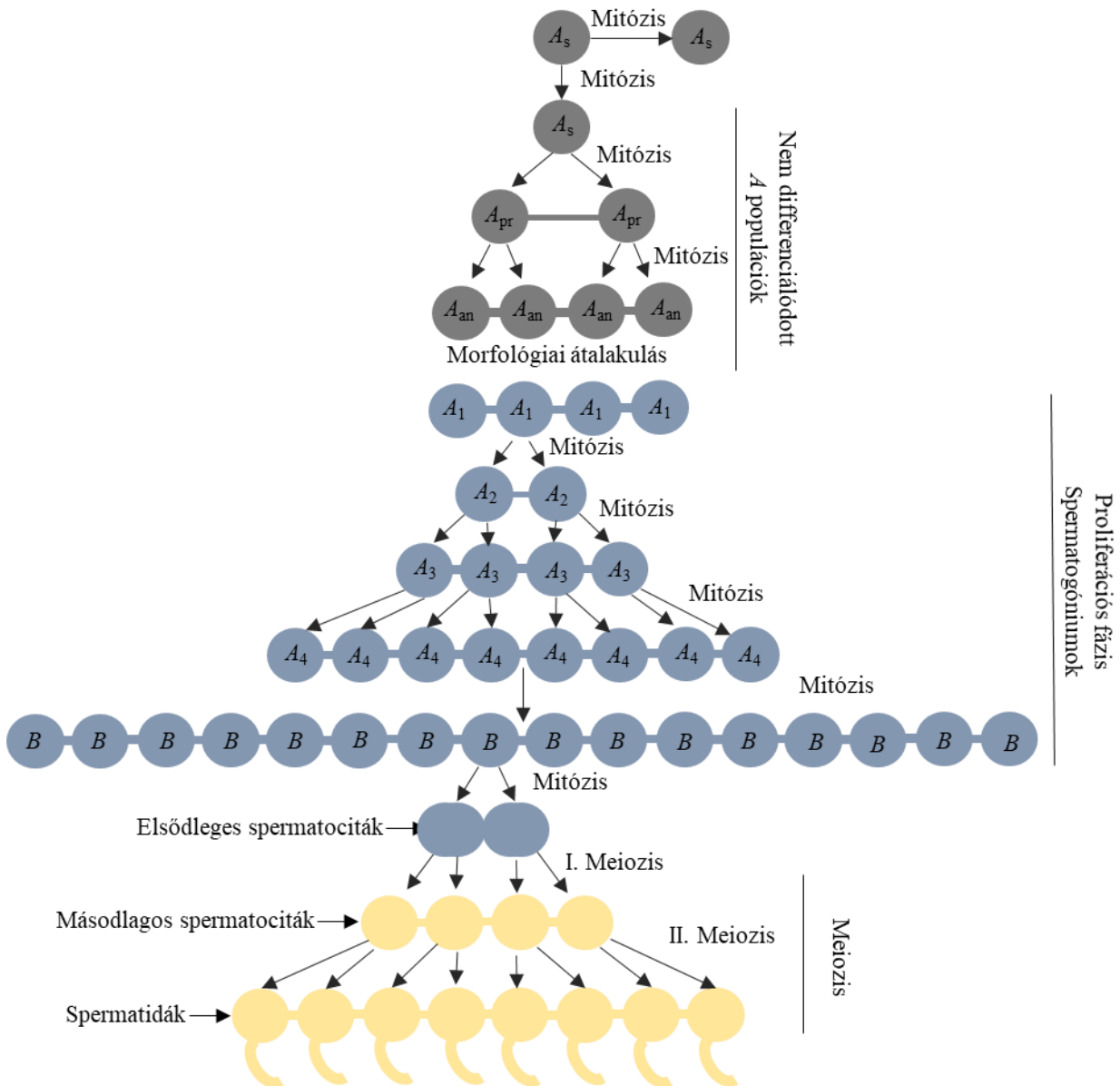
Rekombináns fehérje	Alkalmazott promóter	Rekombináns fehérje mennyisége	Referencia
Humán α 1-antitripszin	Humán α 1-antitrypsin DNS	1 g/l vérszérumban	(Massoud <i>et al.</i> , 1991)
Humán α -glükzoidáz	Szarvasmarha α 1-kazein	8 g/l	(Bijvoet <i>et al.</i> , 1999)
	N-acetil- β -glükózaminil	Nincs adat	(Jongen <i>et al.</i> , 2007)
Humán C1 inhibitor	Nincs adat	Nincs adat	(Koles <i>et al.</i> , 2004)
Humán VIII véralvadási faktor	Egér WAP	Nincs adat	(Hiripi <i>et al.</i> , 2003)
	Egér WAP	0,005-0,161 g/l	(Chrenek <i>et al.</i> , 2007)
Humán eritroprotein	Nyúl WAP	0,0000003 g/l	(Rodriguez <i>et al.</i> , 1995)
	Nyúl WAP	Nincs adat	(Massoud <i>et al.</i> , 1996)
	Szarvasmarha β -laktoglobulin	0,5 g/l	(Korhonen <i>et al.</i> , 1997)
	Nyúl WAP	Nincs adat	(Aguirre <i>et al.</i> , 1998)
	Nyúl WAP	60-178 IU/l	(Mikus <i>et al.</i> , 2004)
Humán Extracelluláris Szuperoxid dizmutáz	Egér WAP	3 g/l	(Strömqvist <i>et al.</i> , 1997)
Humán növekedési hormon	Egér WAP	0,000012 g/l	(Limonta <i>et al.</i> , 1995)
	Patkány WAP	0,5-1 g/l	(Lipiński <i>et al.</i> , 2003)
	Patkány WAP	0,010 g/l	(Lipinski <i>et al.</i> , 2012)
Humán Interleukin-2	Nyúl β -kazein	0,0005 g/l	(Bühler <i>et al.</i> , 1990)
Humán inzulinszerű növekedési faktor	Szarvasmarha α 1-kazein	1 g/l	(Brem <i>et al.</i> , 1994)
	Szarvasmarha α 1-kazein	0,3 g/l	(Wolf <i>et al.</i> , 1997)
	Szarvasmarha α 1-kazein	0,678 g/l	(Zinovieva <i>et al.</i> , 1998)
Humán idegi növekedési faktor β	Szarvasmarha α 1-kazein	0,25 g/l	(Coulibaly <i>et al.</i> , 1999)
	Adenovírus	0,346 g/l	(Xiao <i>et al.</i> , 2008)
Humán szövet plazminogén aktivátor	Szarvasmarha α 1-kazein	0,00005 g/l	(Riego <i>et al.</i> , 1993)
Szarvasmarha FSH	Szarvasmarha α 1-kazein	0,1 g/l	(Coulibaly <i>et al.</i> , 2002)
Ló koriongonadotropin	Nyúl WAP	0,022 g/l	(Galet <i>et al.</i> , 2001)
Lazac kalcitonin	Juh β -laktoglobulin	2,1 g/l	(McKee <i>et al.</i> , 1998)
Humán protein C	Egér WAP	0,0000001-0,0000003 g/l	(Dragin <i>et al.</i> , 2005)
TNAP	Egér WAP	Nincs adat	(Bodrogi <i>et al.</i> , 2006)
Humán laktoferrin	Adenovírus	2,3 g/l	(Han <i>et al.</i> , 2008)
Humán antithrombin	Adenovírus	4,8 g/l	(Yang <i>et al.</i> , 2012)
Fenilalanin szegény κ -kazein	Nyúl WAP	Nincs adat	(Baranyi <i>et al.</i> , 2007)

Forrás: (Wang *et al.*, 2013)

2.7. SPERMATOGENEZIS

A nyulak ivarérettsége viszonylag korán kialakul, ivarérettnek tekinthető az az állat, mely termékenyítésre alkalmas ivarsejtet termel. Tenyészérettnek számít, ha kifejlett kori súlyának legalább 75%-át eléri. Rodríguez és munkatársai egyértelmű korrelációt találtak a bak nyulak testtömege, a libidó, a sperma minősége és az ejakulátum mennyisége között (Rodríguez-De Lara *et al.*, 2015). Az ivarérés folyamata 60 napos kor körül kezdődik, a spermatogenezis ettől korábban indul, mikor az őssejtek bevándorolnak a mezoderális primordiumba, ezt a folyamatot prenatális folyamatnak nevezzük. A spermatogenezis posztnatális folyamatai pubertáskorban kezdődnek a here kanyarulat csatornáiban, a diploid csírasejtek a spermatogóniumok (A_s) mitózisával (3. ábra). Az egerek heréjében például hozzávetőleg 35000 ilyen spermatogónium van (Tegelenbosch és de Rooij, 1993). Az A_s spermatogónium párok egyik sejtje további osztódásnak indul ezáltal hosszú spermatogónium láncokat létrehozva. A nem differenciálódott A populációk (A_{pr} , A_{al}) mérete fokozatosan bővül, mikor elérte a maximális méretet, a mitotikus aktivitás megszűnik a sejtek további osztódás nélkül morfológiailag átalakulnak A_1 spermatogóniumokká, ezt követően az A_1 típusú sejtek szinkronikus osztódásnak indulnak (A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , In , B) ezzel megkezdve a spermatogoniális érés folyamatát (3. ábra) (Huckins, 1971). Az intermedier (In) vagy köztesállapotú spermatogóniumokból újabb mitotikus osztódás során B sejtek azokból pedig spermaticiták lesznek (Greenbaum *et al.*, 2011).

A spermaticiták melyek a meiotikus osztódásokat hajtják végre kevésbé sebezhetőek, mint a spermatogóniumok (de Rooij, 2001). A második meiotikus osztódás után jönnek létre a spermaticiták. A spermaticiták spermiumokká való differenciálódását nevezzük spermiohistogenezisnek, mely a Sertoli sejtekbe beágyazódva megy végbe. A kerek mozgásra nem alkalmas spermaticiták alakváltozásának folyamata a spermiohistogenezis. Ennek során az akroszóma kialakulása nagyon feltűnő morfológiai esemény. Az akroszóma a Golgi-vezikulumokból származik, és helyeződik a korai spermaticitákra. Mérete a spermiohistogenezis során nő (Flörke *et al.*, 1983).



3. ábra: Mitotikus és meiotikus sejt osztódások a spermatogenezis során.

2.7.1. STABIL INTERCELLULÁRIS HIDAK

A sejtek közötti kommunikáció elengedhetetlen funkció az emberi szervezetben is, szinte minden folyamat az intercelluláris kommunikációtól függ. A csírasejtek egyedülálló módszert alkalmaznak az egymás közötti kapcsolatok és információ áramoltatására a 0,5-3 μm méretű intercelluláris vagy más néven citoplazmatikus hidakat (Greenbaum *et al.*, 2011). A hidak átmérője a spermatogenezis folyamán változik a spermatogóniumok között 1 μm alatti, az intermedier sejteknél 1-1,3 μm , a spermaticiták között 1,4-1,7 μm , míg a spermaticidáknál 1,8-3 μm (Weber és Russell, 1987). Funkciójukat tekintve számos feltevés olvasható az irodalomban. Az egyik szerint a csírasejtek citokinézise során létrejövő intercelluláris hidak összekapcsolják a

testvérszöveteket egy nagyobb citoplazmás csatornán át így létrehozva a csírasejtek között az információ áramlást, szinkronizációt, és a kromoszóma dózis kompenzációját a haploid sejtekben (Greenbaum *et al.*, 2006). Egy másik megközelítés szerint, a csírasejtek igen érzékenyek a sztochasztikus gén expresszióra, a legjobb minőségű relatíve egységes normálműködésű gaméták előállításánál az ilyen fajta heterogenitást ki kell küszöbölni. A folyamathoz nem csupán néhány molekula jel intercelluláris cseréjére van szükség, hanem a protoplazma keveredésére az egymással kapcsolatban lévő sejtek között, hogy hasonló mRNS, fehérje szintre kerüljenek, aminek módja, a közös szincíciumon belüli fejlődés, vagyis az intercelluláris hidakon történő információ áramlás lehet (Guo és Zheng, 2004). Feltételezhetően a spermátidák között segítségükkel történik a Golgi eredetű haploid géntermékek megosztása (Ventelä, Toppari és Parvinen, 2003), de szükségesek lehetnek ahhoz is, hogy a haploid csírasejtek fenotípusosan diploidok maradhassanak a meiozist követően (Fawcett *et al.*, 1959). Ezt a hipotézist alátámaszthatja Braun és kutató csoportjának 1989-ben megjelent cikke, amikor is megfigyelték a protamin 1 promóter által vezérelt humán növekedési hormont (hGH) kifejező transzgénikus egereik haploid spermátidáiban az egyenletes transzgén mRNS eloszlást (Braun *et al.*, 1989). Az egyenletes géntermék eloszlásra a meiozist követően van szükség feltételezhetően, azért, hogy az autoszómális gén allélok esetleges káros hatásait a normál géntermék egyenletes eloszlása pufferelje a szomszédos vagy testvérszövetekben (Morales *et al.*, 2002).

Bár valódi funkciója még nem teljesen bizonyított, az intercelluláris hidak esszenciális szerepet töltenek be a spermatogenezis és a fertilizáció során, bizonyított, hogy szerepük elengedhetetlen a diploid csírasejt első meiotikus osztódásának befejezése előtt (Greenbaum *et al.*, 2006). Számos tanulmány vizsgálta a sejt közötti hidak és az általuk létrejövő szincíciumok morfológiáját és struktúráját, annyi bizonyos hogy utóbbi evolúciósan erősen konzervált (úgynevezett gyűrűs csatorna), mind a gerinctelen, mind pedig a gerinces fajokban, keletkezésük a mitotikus és a meiotikus osztódásokhoz köthető (Burgos és Fawcett, 1955; Fawcett *et al.*, 1959; Moens és Hugenholtz, 1975; Huckins és Oakberg, 1978). A közös szülő sejtet megosztó csírasejtek egy szincíciumban kolonizál, mivel az intercelluláris hidak a fejlődés folyamán stabilak maradnak (Dym és Fawcett, 1971). Azonban a hidak dimenziói és összekötő kapcsolatai megváltozhatnak a spermatogenezis szakaszaiban, a spermátociták és a spermatogoniumok osztódása eredményezheti a már meglévő hidak osztódását is (Weber és Russell, 1987). Az intermedier sejtek és a B típusú sejtek mitotikus osztódása során akár több ezer sejt összekapcsolódása jöhet létre (Moens és Hugenholtz, 1975; de Rooij, 2001).

2.7.2. TEX 14 FEHÉRJE

A TEX 14 (here expresszált gén, testis expressed gene 14) egy a herében kifejeződő fehérje, mely jelenléte a csírasejtek között kialakult intercelluláris hidakra korlátozódik (Greenbaum *et al.*, 2006). Hiánya mindkét nemből káros, de hímivarnál különösen hátrányosan befolyásolja a meiozist. Kölcsönhatásba lép az RBM44 fehérjével (RNS kötő fehérje, RNA binding motif protein 44), melynek lokalizációja a stabil intercelluláris hidakon a meiosis pachitén szakaszára és a másodlagos spermatocitákra korlátozódik, (Greenbaum *et al.*, 2011). A TEX 14 génkiütött egerekben azt tapasztalták, hogy nem alakulnak ki az intercelluláris hidak, azok hiányában pedig, a spermatogenezis során nem megy végbe a teljes meiosis, és a hímek infertilissé válnak (Greenbaum *et al.*, 2006). Bár fontos megjegyezni, hogy intercelluláris hidak nélkül is megindul az A_s meiozisa (Greenbaum *et al.*, 2011). A női ivarnál a TEX 14 hiányában az egyedek megőrzik fertilitásukat, de hím ivarban fontos szerepet játszik a citokinézis hiányos lefolyásában (Greenbaum *et al.*, 2006; Haglund *et al.*, 2011)

2.8. NYÚL SPERMA MÉLYHÚTÉS

Nagy értékű transzgenikus nyúl vonalaink *ex situ* gén megőrzésére az ejakulátum krioprezervációját választottuk, mely lehetővé teszi a spermiumok hosszú távú tárolását. Alap esetben az ejakulált ondó krioprezervációjáról beszélünk, de előfordul olyan eset, mikor mellékhere eredetű spermiumok mélyhűtéséről kell beszélni, például egy transzgenikus bak nem betegségéből eredő elhullása esetén.

Hoagland és csoportja munkájához fűződik, a nyúl spermiumok hőérzékenységének megfigyelése és az első folyékony nitrogénben történő tárolása (Hoagland és Pincus, 1942). Azóta sokan dolgoztak a nyúl spermium krioprezervációjának standardizált módszerének kidolgozásával, és a technika is lényeges változásokon ment keresztül. A legtöbb sperma fagyasztási módszer három lépésből áll, 1- extenderekkel történő hígítás és hűtés, 2- krioprotektív anyagok (CPA) hozzáadása, 3- fagyasztás és felolvasztás. A különböző munkacsoportok hamar felismerték, hogy ezek a munkafolyamatok számos az ivarsejtekre káros hatással járnak, mint például a hő sokk, az ozmotikus és oxidatív stressz, a mélyhűtés során keletkező jégkristályok, melyek ellen védekezni kell (Yoon *et al.*, 2015). Ebben nagy szerep jut a hígítókhoz hozzáadott krioprotektív anyagoknak. A hígítókkal vagy más néven extenderekkel szemben támasztott fő követelmények, hogy jó puffer kapacitással, ozmolaritással, és megfelelő pH értékkel rendelkezzenek valamint védjék meg a spermiumot a kriogén sérülésektől (Salamon és Maxwell, 2000). Krioprotektív anyagokból általában két félért alkalmaznak egyszerre, egy permeábilist azaz

átesztőt ilyen például a glükóz, raffinóz, laktóz, szacharóz, trehalóz, és egy áthatolót például glicerin, etilén-glicol, DMSO (Barbas és Mascarenhas, 2009). A sperma fagyasztás során alkalmazott hígítók általában, szénhidrátokat (glükóz, raffinóz, laktóz, szacharóz, trehalóz), sókat (nátrium-citrát, citromsav), tojássárgáját és antibiotikumokat tartalmaznak. Nyúl sperma krioprezerváció során leggyakrabban alkalmazott áthatoló krioprotektív anyag a glicerin, mely a membránfehérjék, és lipidek átrendeződését okozza. Ezzel növelve, a membrán fluiditását és a sejtek dehidratáltságát, ami csökkenti az intercelluláris jégkristályok képződését a spermiumokban (Barbas és Mascarenhas, 2009).

A krioprotektív anyagok használatának hátulütője, hogy bár védelmi funkciójuk elengedhetetlen a fagyasztási sérülésekkel szemben, alkalmazásuknál mégis számolni kell károsító hatásukkal is. Kiválthatnak ozmotikus stresszt és akár toxikussá is válhatnak a spermiumok számára (Yoon *et al.*, 2016). A membránon áthatolva megnövelik a spermium fej térfogatát, ami a membrán károsodásához vezet így csökkentve a spermiumok termékenyítő képességét (Watson, 2000).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. KÍSÉRLETI ENGEDÉLYEK

A laboratóriumi nyulak a Nemzeti Agrárkutatói és Innovációs központ (NAIK), Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet (MBK), Állatbiotechnológiai Főosztály állatházában a mindenkori Európai Unió szabályoknak és az 1998. évi XXVIII. Tv., *AZ ÁLLATOK VÉDELMEÉRŐL ÉS KÍMÉLETÉRŐL, a 243/1998 (XII.31.) Kormányrendelet, az állatkísérletek végzéséről, valamint a 36/1999 (IV.2.) FVM-KÖM-GM rendelet, a kísérleti állatok tenyésztésének, tartásának, szállításának stb. szabályairól*, megfelelően voltak, vannak elhelyezve és tartva. Kísérleteink elvégzésére az alábbi engedélyek alapján jogosultunk: PEI/001/32 és PEI/01/857-3/2015.

3.2. KÍSÉRLETI ÁLLATOK

3.2.1. SB-CAG-VÉNUSZ NYÚLVONAL

A csoportunk által már korábban Sleeping Beauty transzpozon technikával létrehozott CAG promoter által vezérelt Vénusz fehérjét expresszáló transzgenikus nyulak (Katter *et al.*, 2013) megszületett alapítóegyedeiből vonalat alakítottunk ki. Rokontenyéssel heterozigóta és homozigóta állományt hoztunk létre, a munkánk során ebből az állományból származó negyedik generációs heterozigóta és homozigóta egyedek (3. táblázat) riporter gén kifejeződését vizsgáltuk.

3.2.2. β -MHC-G52R-KCNE1 NYÚLVONAL

A sperma vizsgálatok alkalmával (a transzgen öröklődés megfigyelésénél és a CASA vizsgálatoknál) kontrollként használtuk a β -MHC-G52R-KCNE1 elnevezésű transzgenikus nyúl vonalunk heterozigóta bakjait (3. táblázat). Az alapító egyedeket szintén a csoportunk hozta létre pronukleusz injektálással (Major *et al.*, 2016). A szív szövet specifikus promotert tartalmazó konstrukció alkalmazása biztosítja, hogy a transzgen a herében nem fejeződik ki, így a transzgen fehérje nem jelenik meg az ejakulátumban.

3.2.3. WAP-hTNAP NYÚLVONAL

A tejjel végzett kísérleteinknél, a transzgen öröklődés megfigyelésénél és a CASA vizsgálatoknál kontrollként használt másik transzgenikus vonalunkat ugyancsak munkacsoportunk

hozta létre (Bodrogi *et al.*, 2006). A konstrukció egy egérsavó savas fehérje emlő szövetspecifikus kifejeződését biztosító promotert tartalmazott. A jól jellemzett transzgenikus nyúltörzsről tudjuk, hogy a transzgén a spermiumokban nem expresszál. A vizsgálatokhoz a transzgenikus heterozigóta és homozigóta egyedeket használtunk (3. táblázat).

3.2.4. VAD TÍPUSÚ ÚJZÉLANDI FEHÉR NYÚL

Kísérleteinkhez vad típusú kontrollként Újzélandi fehér fajtájú labornyulak hím és nőstény egyedeit használtuk, melyeket az S & K-LAP Kft.-től és az Innovó Kft.-től vásároltunk meg kettő kivételével, mely az állatházunkban született ezek a #3010 és a #0001 azonosító számú állatok.

3. Táblázat: A kísérletekhez felhasznált nyulak összefoglaló táblázata.

Azonosító	Genotípus	Nyúltörzs	Ivar	Azonosító	Genotípus	Nyúltörzs	Ivar
#0001	vad típus	Újzélandi	♂	#4025	heterozigóta	SB-CAG-Vénusz	♂
#3003	heterozigóta	WAP-hNAP	♀	#4026	heterozigóta	SB-CAG-Vénusz	♀
#3005	heterozigóta	WAP-hNAP	♂	#4027	heterozigóta	SB-CAG-Vénusz	♂
#3009	homozigóta	WAP-hNAP	♂	#4029	heterozigóta	SB-CAG-Vénusz	♂
#3010	vad típusú	Újzélandi	♀	#4031	heterozigóta	SB-CAG-Vénusz	♂
#3013	heterozigóta	WAP-hNAP	♀	#4032	heterozigóta	SB-CAG-Vénusz	♂
#3014	heterozigóta	WAP-hNAP	♀	#4033	heterozigóta	SB-CAG-Vénusz	♂
#4004	heterozigóta	SB-CAG-Vénusz	♂	#4034	heterozigóta	SB-CAG-Vénusz	♀
#4007	homozigóta	SB-CAG-Vénusz	♂	#4035	homozigóta	SB-CAG-Vénusz	♀
#4010	heterozigóta	SB-CAG-Vénusz	♀	#4036	heterozigóta	SB-CAG-Vénusz	♂
#4011	heterozigóta	SB-CAG-Vénusz	♀	#4037	heterozigóta	SB-CAG-Vénusz	♂
#4012	heterozigóta	SB-CAG-Vénusz	♀	#4039	heterozigóta	SB-CAG-Vénusz	♂
#4013	heterozigóta	SB-CAG-Vénusz	♀	#4040	heterozigóta	SB-CAG-Vénusz	♂
#4014	heterozigóta	SB-CAG-Vénusz	♀	#4045	heterozigóta	SB-CAG-Vénusz	♂
#4017	heterozigóta	SB-CAG-Vénusz	♂	#4064	heterozigóta	SB-CAG-Vénusz	♂
#4020	homozigóta	SB-CAG-Vénusz	♂	#4071	heterozigóta	SB-CAG-Vénusz	♂
#4024	heterozigóta	SB-CAG-Vénusz	♂	#5115	heterozigóta	β-MHC-G52R-KCNE1	♂
				#5117	heterozigóta	β-MHC-G52R-KCNE1	♂

3.2.5. SB-CAG-VÉNUSZ EGÉR VONALAK

A Vénusz fehérje fajspecifikus kifejeződésének vizsgálatához három független transzgenikus egérvonalba tartozó homozigóta egerek hím egyedeit használtuk fel. A transzgén konstrukció megegyezett az általunk létrehozott nyúl vonalnál használt konstrukcióval (Garrels *et al.*, 2016a). Az állatokat német partnerünk bocsájtotta a rendelkezésünkre Marienseeből az Institut für Nutztiergenetik, Friedrich-Loeffler-Institut intézetéből.

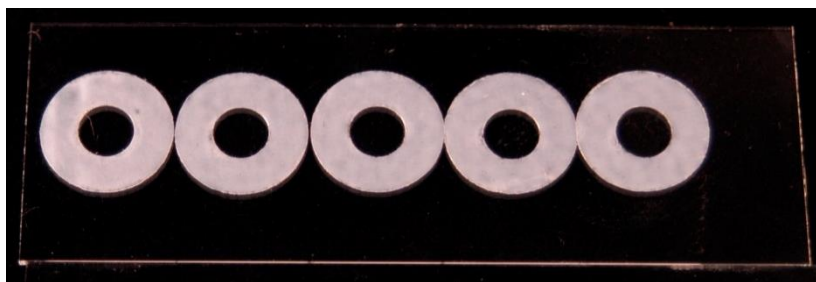
3.3. MAKROSKÓPOS VIZSGÁLATOK

3.3.1. TEJ MINTÁK VIZSGÁLATA

Laktáló SB-CAG-Vénusz transzgénikus, heterozigóta és homozigóta nőstényeket 24 órával a fejés előtt fiókáiktól különzártuk (#4035; #4032). Az elkülönített nőstényeket közvetlenül a tejgyűjtés előtt oxytocin injekcióval oltottuk intramuszkulárisan (Kela Laboratoria 150 NV, Belgium, 2 IU i.m.).

A kísérlethez kontrollként használtunk két másik transzgénikus nyúlvonalba tartozó heterozigóta nőstény tejmintáit (#3013; #3014). Ezen vonalba tartozó nőstények emlő szövetspecifikus mWAP (egér savó savas fehérje) promóter irányítása alatt humán alkalikus foszfátáz termelnek (hTNAP) (Bodrogi *et al.*, 2006). Kontrollként való alkalmazásukra azért volt szükség, mert gyakran előfordul, hogy egy rekombináns fehérje tejben történő túltermeltetése UV gerjesztés hatására úgynevezett autofluoreszcenciát okoz a tejben. Ennek kiszűrése volt célunk a Vénusz transzgénikus nyulak és a humán alkalikus foszfátáz termelő nyulak tejének összehasonlítása során. A WAP-hTNAP heterozigóta egyedekről pontosan tudjuk, hogy a rekombináns fehérje butanolos extrakciót követően a tejsavóból mutatható ki (Bodrogi *et al.*, 2006).

Továbbá vizsgálatainkhoz egy teljesen vad típusú állat tejmintáját is felhasználtuk (#3010). A kontroll állatok fejése azonos módon és időben történt az SB-CAG-Vénusz pozitív állatokéval. A kék gerjesztő fényel történő megvilágítás során fényképeket készítettünk NIKON D3300 típusú fényképező géppel. A tejmintákat frakcióira szétválasztottuk és kék gerjesztő megvilágítás mellett azokról fényképeket készítettünk.



4. ábra: Tárgylemez a ráragasztott műanyag gyűrűlapokkal

A Vénusz fluoreszcens rekombináns fehérje koncentrációjának változását is vizsgáltuk a laktáció négy hetén át. Ehhez egy SB-CAG-Vénusz heterozigóta nőstényt (#4026) és egy vad típusú nőstényt fejtünk heti rendszerességgel a fent leírt módon. Alkalmanként 2-2,5 ml tejet fejtünk. A mintákból 20 μ l-t cseppentettünk egy tárgylemezre (76x26mm, Thermo Scientific)

amire előzőleg öt műanyag gyűrűlapot (Blick, Stephens) ragasztottunk (4. ábra). Kék gerjesztő fényel történő megvilágítás során fényképeket készítettünk NIKON D3300 típusú fényképező géppel.

3.3.2. KÖNNY ÉS NYÁL MINTÁK VIZSGÁLATA

Mintát gyűjtöttünk 3 hónapos (#4071), 6 hónapos (#4064), és 24 hónapos (#4029) hím ivarú SB-CAG-Vénusz heterozigóta valamint vad típusú nyulaktól, három különböző mintavételi időpontban (reggel, a nap közepén, kora este), melyek között 4-4 óra telt el. A steril műanyagvégű vattapálcákat (COPAN Itali S.p.A.) 500 µl TBS (3M NaCl, 1M Tris, pH 7.4) pufferben mostuk 60 percen át 4°C-on, majd ezt követően a pálcákat és az oldatot 5 percig 6000 rpm sebességgel 4°C-on centrifugáltuk. A felső folyadék réteget további 15 percen keresztül 13000 rpm sebességgel újra centrifugáltuk, hogy a sejtes elemeket eltávolíthassuk. A makroszkópos vizsgálatokhoz a tejmintákhoz hasonlóan egy előkészített tárgylemezre 20 µl-t cseppentettünk mintánként, majd kék spektrumba áttolódó UV fény megvilágítás mellett fotóztuk.

3.3.3. A SZEMINÁLIS PLAZMA VIZSGÁLATA

Tenyészérett heterozigóta (#4004) és homozigóta (#4007) SB-CAG-Vénusz transzgenikus és vad típusú hímeiktől ondó mintát gyűjtöttünk. A bak nyulak ugratása élő nőtényre történt, az ejakulátum begyűjtését műhüvelyre erősített mintavételi csővel végeztük. A frissen levett mintákról a szeminális plazmát átpipettáztuk egy steril mintavételi csőbe 90 perc 3000 rpm sebességű centrifugálást követően. Az előkészített tárgylemezre ugyancsak 20 µl-t cseppentettünk mintánként, majd fotóztuk.

3.3.4. VÉNUSZ FEHÉRJE KONCENTRÁCIÓ MEGHATÁROZÁS IMAGE-J PROGRAMMAL

A Western blot analízis során végzett denzitometriás vizsgálat alapján a #4032 azonosítószámú SB-CAG-Vénusz heterozigóta nőtény tejének Vénusz fehérje koncentrációja hozzávetőleg 256 ng/µl volt. Ezt az értéket vettük alapul az IMAGE-J program használatakor. A következő képpen: 20 µl-t mértünk tárgylemezre, majd Kék fényű megvilágítás mellett megmértük a zöld fluoreszcens pixelek mennyiségét. Ezt vettük 100%-nak, majd a #4026 azonosítószámú heterozigóta nőtény laktációjának négy különböző hetében vett minták pixel számát is bemértük, és kiszámítottuk, ez hány százaléka a #4032 számú állat mintájánál mért értéknek. Majd ezek alapján kiszámítottuk, hogy a Vénusz fehérje koncentrációja a #4026 számú állat esetén hozzávetőleg 219 ng/µl az

IMAGE-J program (Schindelin *et al.*, 2012) alapján. A két állat értékei egymáshoz viszonyítva az elfogadható 15%-os hibahatáron belül vannak.

A módszert alkalmaztuk a szemínális plazma, a könny, és a nyál minták esetében is. A #4032 azonosítószámú állat tejmintájához mértük a szemínális plazma mintát és a könny mintát. A nyál mintákat a könnyhöz hasonlítottuk.

A különböző korú állatok a nap három különböző szakában vett könny és nyálmintáinak összehasonlítását ezek után végeztük el. Ebben az esetben is a kék fénytartományba is gerjesztő UV megvilágítás mellett készült képek zöld fluoreszcens pixeleink számár mértük egymáshoz. Ha az értékek min 90%-os egyezőséget mutattak akkor azonos mértékűnek vettük a fluoreszcencia mértékét. Ezt a módszert alkalmaztuk a laktáció különböző heteiben gyűjtött tejminták fluoreszcenciájának összehasonlításához is.

3.4. FLOW CITOMETRIAI VIZSGÁLATOK A VÉNUSZ FEHÉRJE JELENLÉTÉNEK BIZONYÍTÁSÁRA A SPERMIUMBAN

A frissen levett sperma mintákat 5 %-os formaldehid pufferben fixáltuk, majd 4°C-on tároltuk. Hoechst 33342 (B2261, SIGMA-Aldrich) interkalálódó festékekkel festettük, majd sötétkamrában szobahőmérsékleten két órát inkubáltuk. A hetero- (#4004) és homozigóta (#4007) bakoktól vett mintákban a Vénusz fehérje fluoreszcenciáját Becton Dickinson FACSAria^(TM) III sejt szorterrel mértük (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). A marker génről íródó fehérjét 488 nm hullámhosszon Ar-ion lézerrel gerjesztettük, és a fluoreszcenciáját pedig, egy 502 nm hullámhosszú dikroikus tükör valamint egy 530/30 nm band-pass szűrő segítségével detektáltuk. A dikroikus tükör, képes arra, hogy az alacsony hullámhosszon érkező fényt egy másik irányba reflektálja, így az általunk használt kék gerjesztő fényt az objektív irányába tükrözi, míg a mintáról emittált fénysugarakat a detektor felé szinte veszteség nélkül átengedi. A Hoechst 33342 festést 375 nm hullámhosszon gerjesztettük és 450/40 nm hullámhosszon detektáltuk band- pass szűrő segítségével. Az áramlási citometriás adatokat BD FACSDiva (BectonDickinson, Mountain View, CA, USA) és FCSExpress 4 Research Edition (DeNovo Software, Glendale, CA, USA) szoftver segítségével elemeztük. A méréseket Szalóki Gábor végezte a Debreceni Egyetem **ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetében**.

3.5. VÉNUSZ mRNS DETEKTÁLÁSA RT-PCR-REL A SPERMIUMOKBAN

Vénusz transzgenikus és vad típusú bakoktól frissen gyűjtöttünk ejakulátumot. A szomatikus sejteket 90%-os percoll gradiensen történő centrifugálással távolítottuk el. A percollt TBS oldattal

hígítottuk és az ejakulátumot a tetejére rétegeztük, szobahőmérsékleten egy órán át centrifugáltuk 3000 rpm sebességgel. A felső rétegben maradt spermiumokból, a gyártó utasításainak megfelelően RNazol reagens (MRC) alkalmazásával totál RNS-t izoláltunk. Az Applied Biosystems High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) használatával 200 ng RNS-ből cDNS-t írtunk a reakció körülményeit ez esetben is a gyártó utasításainak megfelelően állítottuk be (25°C 10 perc, 37°C 120 perc, 85°C 5 perc). PCR reakciót mértünk össze a cDNS mintákból MyTaq Red Mix (Bioline). A reakciókhoz három primerpárt alkalmaztunk. A Vénusz specifikus primer párt, és a 28S alegység specifikus primer párt utóbbit belső kontrollként. Mindkét primer párt a Primer3 programmal terveztünk ("Primer3 Input (version 0.4.0)", n.d.). Az epitél és leukocita eredetű sejtek tényleges elhagyásának ellenőrzését a nyúl FcRn receptor RNS-ére specifikus primer párral (Catunda Lemos *et al.*, 2012) összemért RT-PCR reakcióval néztük. A primer szekvenciákat a 4. táblázat tartalmazza. A reakció körülményei a következő volt: 95°C 3:00 denaturáció után 28 ciklus 95°C 0:15, 60°C 0:15, 72°C 0:10 majd 72°C 3:00 perc. A keletkezett termékeket 1 %-os agaróz gélen (Invitrogen) választottuk el.

4. Táblázat: Az RT-PCR vizsgálatokhoz használt primerek jegyzéke

Primer pár neve		Szekvencia
Vénusz specifikus primer (334bp)	Forward	5' GGTCCCTCTTCTCGTTAGGG 3'
	Reverse	5' TACAAGACCAGAGCCGAGGT 3'
Nyúl fcRn receptor specifikus primer (catunda lemos <i>et al.</i> , 2012) (353bp)	Forward	5' TTG GAT CTGGGA AAG CCA GGT G 3'
	Reverse	5' TGT TCT TCA GGT CCACGG TCT C 3'
Riboszomális 28s alegység specifikus primer (228bp)	Forward	5' GTTGTGCCATGGTAATCCTGCTCAGT 3'
	Reverse	5' TCTGACTTAGAGGCGTTCAGTCATAAT 3'

3.6. MINTÁK ELŐKÉSZÍTÉSE WESTERN BLOT VIZSGÁLATRA

3.6.1. TEJMINTÁK

A 3.3.1 fejezetben leírt állatoktól (#4035; #4032; #3013;#3014;#3010) az ott ismertetett módon fejt tejmintákat használtuk a Western blot analízis során is.

A tejsírfrakciót 4°C-on, 13000 rpm, 30 perc centrifugálás után eltávolítottuk, majd a savó és kazein frakciót 25%-os ecetsav hozzáadásával, újabb 13000 rpm, 30 perc, 4°C-on történő centrifugálást követően elválasztottuk egymástól. A különböző mintatípusokhoz négyszeresen koncentrált SDS minta felvivő puffert adtunk (0,6M Tris/HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerin,

0,05% brómfenolkék, 5% β -ME) majd 5 perc denaturálást követően, 15 perc 13000 rpm sebességgel centrifugáltuk. Az SDS-t tartalmazó denaturáló géltre 20 μ g összes fehérje mennyiség került felvitelre frakciónként és egyedenként. A fehérje koncentrációt spektrofotometriával állítottuk be NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) gépen.

Az alkalikus foszfatáz aktivitás vizsgálathoz, a tejmintákhoz 8% (v/v) n-butanolt adtunk, majd szobahőmérsékleten egy órán át rázattuk, hogy az alkalikus foszfatázt eltávolítsuk a tejszírből, majd ezt követően 13000 rpm, sebességgel 60 percen át centrifugáltuk a mintákat 4°C-on, hogy elválasszuk a savófrakciót. 8%-os nativ-PAGE gélen elválasztottuk a fehérjét. Az elektroforézist követően a gélt 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphate (BCIP) és NBT (nitro blue tetrazolium) (Western Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase, Promega) keverékével inkubáltuk.

3.6.2. EJAKULÁTUM

A mintákat 2×10^9 /ml sejtszámra állítottuk fiziológiás sóoldattal bürker kamra használatával, majd TBS pufferrel hígított percoll gradiensen 90 percig 3000 rpm sebességgel centrifugáltuk, hogy elválasszuk a motilis ivarsejteket, a többi sejtörmeléktől. A gradiens két különböző töménységű percollt tartalmazott, alul egy 90%-os töménységű, míg felül egy 47,5 %-os töménységű percoll oldatot, melynek tetejére rétegeztük az ejakulátumot. A középső fázist (47,5 % és 90 % határan lévő fázist) egy új csőbe tettük, majd ezt követően kétszer mostuk szintén TBS pufferben, azután extrakciós pufferrel (20mM HEPES pH 7.5; 420 mM NaCl; 1 mM EDTA; 25 mM DTT; 25% glicerin) tártuk fel a fehérjét. 20 μ g összes fehérje koncentráció beállítása után kerültek a minták felhasználásra.

A szemínális plazmát egyszerű centrifugálásos módszerrel szeparáltuk el az ejakulátum sejtes frakciójától (90 perc, 3000 rpm, 4°C). Az elválasztást követően a mintákhoz hozzáadtuk az SDS minta felvivő puffert és a tejmintákkal megegyező módon jártunk el. 10 μ g összes fehérje koncentráció beállítása után kerültek a minták felhasználásra. A fehérje koncentrációt ebben az esetben is spektrofotometriával állítottuk be NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) gépen.

3.6.3. KÖNNY ÉS NYÁLMI NTÁK

A mintákat, steril műanyagnyelű vattapálcával (COPAN Italia SpA.) gyűjtöttük. A mintavételt követően a pálcákat azonnal 500 μ l TBS pufferbe helyeztük és folyamatos ráztatás mellett 60 percen keresztül mostuk 4°C-on, végül a vattavégeket egy erre a célra szolgáló centrifugacsőbe helyeztük, majd 5 perc 6000 rpm sebességgel centrifugáltuk. Az SDS minta felvivő puffer

hozzáadását követően a már ismertetett módon jártunk el, annyi különbséggel, hogy a Western blot analízishez a könny mintákból 10 μ g összes fehérje mennyiség, míg a nyál mintákból 20 μ g koncentrációjú fehérje mennyiség került elválasztásra az SDS-t tartalmazó poliakrilamid gélen.

3.7. A TRANSZGÉN FEHÉRJESZINTŰ KIFEJEZŐDÉSÉNEK VIZSGÁLATA WESTERN BLOT ANALÍZISSEL

A négyszer koncentrált pufferrel hígított minták fehérje elválasztásához 4 %-os poliakrilamid denaturáló gyűjtő gélt (0,5M Tris/HCl, 0,4% SDS, APS, TEMED, pH 6.8) és 12 %-os futtató gélt (1,5M Tris/HCl, 0,4 % SDS, APS, TEMED, pH 8.8) öntöttünk, az elektroforézist megelőző napon. A gélek megszilárdulását követően légmentesen csomagolva 4°C-on, tároltuk azokat.

A fehérje elválasztást 224 V feszültség mellett, 45 mA/gél áramerősséggel 4°C-on végeztük, melyhez CVS10D Mini Trans-Blot[®] egységet használtunk.

Az elválasztott fehérje mintákat PVDF (Hybond-P, Amersham) nem specifikus fehérje kötő membránra transzferáltuk. A membránt 99,8 %-os etil-alkoholban nedvesítettük 2 percig, majd még a fehérje minta átítatása előtt további 15 percig mostuk a transzferáláshoz szükséges pufferben (25 mM Tris, 192 mM Glicerin, 20% Etil-alkohol, 0,1% w/v SDS, pH 8.3). Az SDS-PAGE gélelektroforézist követően a fehérje elválasztó gélt szintén a transzfer pufferben nedvesítjük 10 percig. A minták membránra történő átkötéséhez a Mini Trans-Blot[®] berendezés blotoló alegységét használtuk, 400 mA, 100 V feszültség mellett a fehérje egy óra elteltével a membránhoz kötődött.

Ez után 10 percig folyamatos rázatás mellett szobahőmérsékleten TBS-ben mostuk a membránt. A membrán és a fehérjéhez kötődő antitest között létrejövő nem specifikus kölcsönhatások elkerülése végett, 5% -os sovány tejporos oldatban telítettük a membránt. A telítéshez használt tejport (Turista instant tejpor, MILKQUICK) Tween 20 detergenst tartalmazó TBS (TBS-T) oldatban mágneses keverő asztalon elegyítettük. A blokkolást egy éjszakán át folyamatos rázatás mellett 4°C-on végeztük.

A Vénusz fehérje jelenlétét nyúlban termeltetett anti-EGFP poliklonális elsődleges ellenanyag reakcióval detektáltuk (Thermo Fisher Scientific CAB4011), melyet ugyancsak az 5% tejport tartalmazó TBS-T oldatban 1:2000 arányban hígítottunk. A membránt 4 órán át folyamatos rázatás mellett 4°C-on inkubáltuk az ellenanyaggal. Ezt követően kétszer öblítettük tiszta TBS-T oldatban, majd kétszer 10 percig mostuk ugyancsak TBS-T oldatban. A mosások után 1:10000 arányban hígított másodlagos ellenanyagban (ant-Rabbit IgG HRPO, Sigma A5906) 2 órán át állítottuk a mintákat folyamatos rázatás mellett 4°C-on. Az inkubációs idő elteltével a mintákat kétszer

öblítettük ez után pedig háromszor 10 percig mostuk TBS-T oldatban, majd három TBS oldattal történő mosás következett.

A vizsgálni kívánt fehérjéhez kötődő elsődleges, majd az ahhoz kötődő másodlagos ellenanyag jelölést kemilumineszcens ECL kit (ECL-Advancad, Amersham) enzimatis reakciójával és autoradiográfia (Super RX, Fuji Medical) segítségével tettük láthatóvá.

3.7.1. DENZITOMETRIÁS VIZSGÁLAT

Western blot analízist végeztünk SB-CAG-Vénusz heterozigóta és homozigóta egyedek (#4035; #4032) tejmintáinak három különböző frakciójából. Egyidejűleg egy GFP standard hígítási sor (250 ng; 125 ng; 62,5 ng; 31,2 ng) esetében is elvégeztük a Western Blot immunfestést. Az autoradiográfiát követően ChemiDoc MP Imaging System rendszerrel és az ImageLab 5.0 program ("Image Lab™ Software | Life Science Research | Bio-Rad", n.d.) segítségével, az ismert koncentrációjú GFP hígítási sor alapján bemértük a tej három frakciójában a Vénusz fehérje mennyiségét az azonos expozíciós idővel elő hívott röntgen filmekről.

3.8. A REKOMBINÁNS hTNAP AKTIVITÁS VIZSGÁLATA

A 3.3.1 alfejezetben ismertetett módon előkészített tejfrakció minták fehérje elválasztását 12%-os nem denaturáló gélben végeztük a 3.4. fejezetben leírt paraméterek alapján. Az AP aktivitás detektálására a gél 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphate (BCIP) és nitro blue tetrazolium (NBT) (Western Blue®Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase, Promega) keverékével inkubáltuk egy órán át, a reakciót MQ víz hozzáadásával állítottuk le.

3.9. EMLŐSZÖVET HISZTOLÓGIAI VIZSGÁLATA

Laktáló SB-CAG-Vénusz heterozigóta (#4026) és vad típusú nőstényeken (#3010), emlőszövet biopsziát végeztünk. A mintákat 4 %-os végkoncentrációjú PFA (paraformaldehid) oldatba helyeztük 4°C-ra. 24 óra elteltével a szövetmintákat 30% végkoncentrációjú PBS-ben elegyített szukróz oldatba helyeztük, ebben tároltuk felhasználásig.

A szöveteket beágyazó médiumba helyeztük (Cryomatrix, Thermo Fisher Scientific, USA), majd fagyasztást követően kriosztát szövetmetsző gépben (Mikrom, Heidelberg) 10 mikron vastagságú szeletekre metsztük. A tárgylemezre helyezett szövet szeleteket TO-PRO 3 Iodid (Thermo Fisher Scientific, USA, T3605) sejtmag festő festékkel festettük. A képek elkészítéséhez PMT detektorral ellátott Leica TCS SP8 konfokális mikroszkópot használtunk. A riportergén

expressziót 510-550 nm hullámhosszon a sejtmagfestés pedig 650-726 nm hullámhosszon tudtuk detektálni.

3.10. A VÉNUSZ FEHÉRJE FAJSPECIFIKUS KIFEJEZŐDÉSÉNEK VIZSGÁLATA

3.10.1. IVARSEJTEK MIKROSKÓPOS VIZSGÁLATA

A nyulakkal azonos transzgénnel létrehozott három független vonalból kiválasztott SB-CAG-Vénusz homozigóta egerek (Garrels *et al.*, 2016a) mellékheréit az ondóvezetékkel (*Ductus deferens*) együtt az állatok cervikális diszlokációját követően eltávolítottuk. A vértől és zsíroktól megtisztított ondóvezetékéből PBS (foszfát pufferelt fiziológiás sóoldat) oldatot használva kimostuk a hímvarsejteket, míg a mellékhere farki részén (*Cauda epididymidis*) bemetszéseket ejtettünk, hogy a még ott található sejtek szabadon kiáramolhassanak a szervből. A kimosást követően a spermium mintákat 3000 rpm sebességgel 5 percen át centrifugáltuk, majd a felülúszót leszívva mostuk újabb PBS oldattal. Ezt a mosást a centrifugálásokkal együtt háromszor ismételtük meg, majd a PBS oldattól megtisztított mintákat 0,5%-os formaldehid oldatban fixáltuk. Az egér mintákat SB-CAG-Vénusz transzgenikus heterozigóta és homozigóta nyulak ejakulált mintáival hasonlítottuk össze mikroszkópos vizsgálatok alkalmával, melyet fluoreszcens mikroszkóppal végeztünk. A nyúl ejakulált ondómintáját centrifugáltuk 3000 rpm sebességgel 5 percen át, a felülúszót leszívva PBS oldattal mostuk, majd 0,5%-os formaldehid oldatban fixáltuk. Vizsgálatainkat azonos érettségi állapotban lévő spermiumok esetében is elvégeztünk, ehhez ejakulált ondót gyűjtöttünk a homozigóta egerektől, melyet termékenyített nőstények méhéből mostunk ki. A mintákat tárgylemezre cseppentettük (5 µl), melyre előzőleg műanyag gyűrűlapot (Blick, Stephens) ragasztottunk.

3.10.2. NYÚL ÉS EGÉR HERE ÉS MELLÉKHERE SZÖVETTANI VIZSGÁLATAI

Tenyészérett SB-CAG-Vénusz transzgenikus homozigóta egér és nyúl egyedek heréit a mellékherékkel együtt eltávolítottuk az állatok eutanáziáját követően. Kontrollként vad típusú nyulat és vad típusú FVB/n egereket használtunk. A heréken nyúl esetében apró bemetszéseket végeztünk, majd 4 %-os PFA oldatba helyeztük 24 órára. A bemetszésekre azért volt szükség, hogy a fixáló oldat a viszonylag nagy szervet könnyebben átjárja. A fixálást követően 30 %-os szukróoldatban 4°C-on tároltuk a szerveket felhasználásig. A tenyészérett hím homozigóta egerek szövetmintáit a bak nyulak szerveivel azonos módon készítettük elő, annyi különbséggel, hogy itt nem volt szükség a heréken ejtett apró bemetszésekre. A beágyazott szervekből mindkét állatfaj

esetében 10 µm méretű metszeteket készítettünk, melyeket tárgylemezre (Super Frost Ultra Plus, Menzel-Glaser) helyeztünk. A sejtmagfestést TO-PRO 3 Iodiddal (Thermo Fisher Scientific, USA, T3605) végeztük a lemezeket FluoroSave Reagenssel (Merck Millipore) és fedőlemezzel fedtük. A lemezek értékeléséhez PMT érzékelővel ellátott Leica TCS SP8 konfokális mikroszkópot használtunk. A sejtmagfestést 650/726 nm hullámhosszon gerjesztettük és detektáltuk, a Vénusz fluoreszcenciát pedig 510/550 nm hullámhosszon.

3.11. A VÉNUSZ FEHÉRJE KIFEJEZŐDÉSÉNEK VIZSGÁLATA AZ IVARI ÉRÉS FOLYAMÁN

A különböző korú (42, 60, 120 napos) SB-CAG-Vénusz heterozigóta és vad típusú bak nyulak eutanáziáját követően eltávolítottuk a heréket. A megtisztított szerveken a 60 és 120 napos állatok esetében apróbemetszéseket végeztünk, ezzel biztosítva a fixáló oldat könnyebb átjárhatóságát. A szerveket 24 órán át 4 %-os PFA oldatban 4 °C-on fixáltuk, ezt követően pedig 30%-os szukrózoldatba helyeztük továbbra is 4 °C-on tárolva. Fagyasztva metsző berendezés segítségével 10 µm méretű metszeteket készítettünk. A sejtmagfestést TO-PRO 3 Iodiddal végeztük a lemezeket FluoroSave Reagenssel (Merck Millipore) és fedőlemezzel fedtük. A lemezek értékeléséhez PMT érzékelővel ellátott Leica TCS SP8 konfokális mikroszkópot használtunk.

3.12. INTERCELLULÁRIS HIDAK MEGLÉTÉNEK VIZSGÁLATA BAK NYULAK HERESZÖVETEIBEN IMMUNHISZTOLÓGIÁVAL

A tárgylemezre helyezett 10 µm nagyságú hereszövet metszeteket hő indukált epitóp feltárást követően 5 %-os BSA oldattal blokkoltunk 4°C-on. A mintákat egy éjszakán át inkubáltuk kecskében termeltetett anti-TEX-14 (Santa Cruz Biotechnology Inc. sc169574) poliklonális elsődleges ellenanyagban ugyancsak 4°C-on ezt követően a metszeteket TBS oldatban mostuk 2x10 percig ezután pedig egy órán át inkubáltuk anti-kecske IgG (H+L) Alexa Fluor 633 jelölt másodlagos ellenanyagban (Thermo Fisher Scientific, A-21082). A sejtmagfestést TO-PRO 3 Iodiddal 30 percen át végeztük. A lemezeket FluoroSave Reagenssel (Merck Millipore) fedtük. A Vénusz fehérje fluoreszcenciáját 510-550 nm hullámhosszon, a TO-PRO 3 Iodid festést 650-726 nm-es hullámhosszon, a TEX-14 elsődleges antitesthez kapcsolódó másodlagos ellenanyag fluoreszcenciáját pedig 640-682 nm hullámhosszon detektáltuk.

3.13. AZ EJAKULÁLT SPERMA MINŐSÉG MEGHATÁROZÁSA

3.13.1. A FELTÉTELEZHETŐ TERMÉKENYÍTŐ KÉPESSÉG MEGHATÁROZÁSA KOVÁCS-FOOTE FÉLE FESTÉSI ELJÁRÁSSAL

Ejakulátumot gyűjtöttünk egy SB-CAG-Vénsz heterozigóta (#4017) és egy homozigóta (#4020) bak nyúlól. Kontrollként egy vad típusú Újzélandi fehér nyulat, egy β -MHC-G52R-KCNE1 szívizomban kifejeződő transzgenikus heterozigóta (#5115) bak nyulat (Major *et al.*, 2016), valamint egy WAP-hNAP transzgenikus promotert tartalmazó konstrukcióval létrehozott heterozigóta (#3005) bak nyulat (Bodrogi *et al.*, 2006). Utóbbi két transzgenikus nyúl vonalba tartozó állatokról biztosan tudjuk, hogy a herében és ezáltal az ivarsejtekben nincs transzgen expresszió.

A műhüvely segítségével frissen levett ondó mintákat eredeti térfogatuk ötszörösére hígítottuk Weitze-Tris oldattal (0,25M Tris, 0,08M Citromsav, 0,07M D-(+)-Glükóz), majd Kovács-Foote féle festési eljárással festettük (Kovács és Foote, 1992). A mintákat 1:1 arányban festettük 0,2%-os Tripán kék oldattal (Sigma T 8154 0.4 % Trypan Kék oldat + 0,9 % NaCl) egy percre állni hagytuk és kenetet készítettünk. Közel függőleges helyzetben száradni hagytuk 2 órán át, majd 2 percre fixáltuk a keneteket 0,2 % Neutrál vöröset (Neutral red, SIGMA, N-2880), 86 ml 1N HCl-t, és 14 ml 37 %-os Formaldehidet tartalmazó oldatban. A lemezeket ezután kétszer öblítettük desztillált vízben, majd az akroszóma festést 7,5 %-os Giemsa (SIGMA, GS-500) oldattal végeztük. A keneteket 37 °C-on inkubáltuk 4 órán át, majd újabb desztillált vizes öblítés után 4 percre differenciáltattuk ugyancsak desztillált vízben. Száradást követően DePeX-el (Fluka 44581) és fedőlemezzel fedtük. A festés segítségével, a sejtek farok membrán integritásán kívül az akroszóma állapotáról, a sejtek életképességéről is információkat kapunk, mely tulajdonságok együttes vizsgálata a feltételezett termékenyítő képességre utal (Nagy *et al.*, 1999). A lemezek értékeléséhez Olympus IMT-2 fénymikroszkópot használtunk, az értékelés során két kategóriát különítettünk el minden esetben a feltételezhetően termékenyítő képes sejtek csoportját és az egyéb más kategóriába sorolható sejtek csoportját. A vizsgálatokat egyszer végeztük el, így ezek csak információval szolgálnak, következtetéseket nem vonhatunk le belőlük.

3.13.2. A MOZGÁS KÉPES SEJTEK SZÁMÁNAK MEGHATÁROZÁSA CASA RENDSZERREL

A CASA vizsgálathoz a frissen levett sperma mintákat Herceghalomra szállítottuk a NAIK, Állattenyésztés, Takarmányozási és Húsipari kutatóintézetébe. A 3.13.1. fejezetben ismertetett

bakoktól származó mintákat 1:2 arányban szállításra hígítottuk, majd a CASA vizsgálatot megelőzően tovább hígítottuk Weitze Tris (WT) oldattal. A végső hígítási arány 1:6 volt. A rendszer szoftvere a Sperm Vision®. A vizsgálat során, néztünk, totális motilitást (MOT), progresszív, vagyis előre haladó motilitást (PMOT), vizsgáltuk a spermium mozgásának sebességét a kiindulási és végpontjára számolva (VSL) valamint a ténylegesen megtett mozgási útvonalára számolt sebességet (VCL), és végül megfigyeltük a hímivarsejt ténylegesen megtett útvonalának az egyenestől való eltérését (LIN). A vizsgálatokat háromszori ismétlésben végeztük el. Statisztikai analízishez InStat programot használtunk (“InStat - graphpad.com”, n.d.).

3.14. MELLÉKHEREI ÉS EJAKULÁLT SPERMIMUMOK MINŐSÉGÉNEK ÖSSZEHASONLÍTÁSA

Az állatok eutanáziáját követően, sebészeti úton eltávolítottuk 3 vad típusú bak és 8 heterozigóta SB-CAG-Vénusz pozitív bak nyúl mellékheréjének farki részét (*Cauda epididymidis*) az ondóvezetékkel (*Ductus deferens*) együtt. A szerveket megtisztítottuk a zsírtól, vérerektől, és az egyéb szennyeződésektől. A megtisztított szervet Weitze-Tris (0,25M Tris, 0,08M Citromsav, 0,07M D-(+)-Glükóz) oldatba helyeztük. Steril tű segítségével eltávolítottuk a spermiumokat, az ondóvezetékéből és 4-5 bemetszést ejtettünk a mellékherén. A mintákat 3000 rpm sebességgel 15 percig centrifugáltuk, majd az alsó sejtréteget 1 ml Weitze-Tris oldattal hígítottuk. A mintákból kenetet készítettünk, amit Kovács-Foote festési eljárással festettünk, majd fénymikroszkóp segítségével értékeltünk. Ebben az esetben is két kategóriát különítettünk el a feltételezhetően termékenyítő képes sejtek csoportját és az egyéb más kategóriába sorolható sejtek csoportját. A statisztikai értékelést InStat programmal végeztük.

3.15. NYÚL SPERMA MÉLYHŰTÉSI PROTOKOLL OPTIMALIZÁLÁSA

3.15.1. A MÉLYHŰTÉSI MÓDSZER TECHNIKAI LÉPÉSEINEK VIZSGÁLATA

A mélyhűtési Urban Besenfelder szóbeli közlése alapján végeztük melyhez hat vad típusú bak frissen levett ondó mintáját összekevertük. Hígítottuk 1:2 arányban 9 v/v% DMSO-t és 15 v/v% tojássárgáját tartalmazó Weitze-Tris oldattal. Ezután 90 percig 4°C-ra helyeztük, majd hozzácsepegtettünk az eredeti térfogattal megegyező mennyiségű, 15 v/v% tojássárgáját és 4 v/v% glicerint tartalmazó Weitze-Tris oldatot, majd 5 perc elteltével 0,5 ml-es műszalmákba (005569, IMV) töltöttük a mintákat, a szalmákat PVA-val (Polyvinil-alkohol, Sigma-Aldrich) zártuk. Ezt követően 20 percig 4°C-on vízszintes helyzetben tartottuk, majd 4 cm-rel a folyékony nitrogén

szint fölé nitrogéngőzbe helyeztük 30 percre, végül a folyékony nitrogén alá merítettük a mintákat. A felolvasztást 42°C-os vízfürdőben végeztük, 1-1,5 perces alámerítéssel.

Minden technikai lépésnél kenetet készítettünk, amelyeket Kovács-Foote festési eljárás alapján festettünk, és értékeltünk az előzőekben ismertetett módon annyi változtatással, hogy a krioprotektív anyagokat tartalmazó médiummal hígított valamint a fagyasztott-felolvasztott mintákat kétszeresére hígítottuk a festési eljárás megkezdése előtt. A vizsgálatokat háromszori ismétlésben végeztük el, a statisztikai kiértékeléshez InStat programot használtunk.

3.15.2. A MÉLYHŰTÉSI ELJÁRÁS NITROGÉN GŐZÖS TECHNIKAI LÉPÉSÉNEK FEJLESZTÉSE

Hat tenyészerett vad típusú bak ejakulátumát összekevertük és kilenc egyenlő részre osztottuk. A mélyhűtést a nitrogén gőzös inkubációig az előzőektől változatlan módon végeztük. A minták nitrogén szinttől mért három különböző távolságának hatását, az inkubációs idő három különböző hosszúságának hatásával egyidejűleg vizsgáltuk. Kontrollként a 4 cm-es távolságot alkalmaztuk, 20 perces inkubációval az eredeti módszernek megfelelően. A mintákat a folyékony nitrogén szint felett 4, 8, és 12 cm-re helyeztük, 5, 10, valamint 20 percre. Az inkubációt követően 42 °C –on egy percig olvasztottuk, majd kétszeresére hígítottuk Weitze Tris oldattal. Kenet készítést követően Kovács-Foote festési eljárás alapján festettük, és értékeltük azokat. Háromszori ismétlésből származó adatok statisztikai értékelését InStat programmal végeztük.

3.15.3. TEJ ALAPÚ HÍGÍTÓK ALKALMAZHATÓSÁGÁNAK VIZSGÁLATA

A mélyhűtés során használt Weitze-Tris oldatunkhoz, tojássárgája helyett 15 v/v% ESL, UHT, tejet adtunk, illetve a tojássárgájával elegyített oldatot 3 réteg papírvattán átszűrtük, majd a fagyasztó médiumokhoz ezeket használtuk alapoldatként. A frissen levett ondó mintákat négy egyenlő részre osztottuk, majd a mélyhűtési eljárást követően felolvasztottuk, és Kovács-Foote festési eljárás alapján értékeltük. Kísérleteinkhez kontrollként a 15 v/v% tojássárgáját tartalmazó szűretlen alapoldatunkat használtuk. A vizsgálatokat ötszöri ismétlésben végeztük el. A statisztikai elemzést ebben az esetben is InStat programmal végeztük.

3.15.4. SZUBJEKTÍV MOTILITÁS VIZSGÁLATOK ÉS TERMÉKENYÍTÉSI TESZTEK

A szubjektív motilitás vizsgálatokhoz a sperma mintákból 10 µl-t cseppentettünk tárgylemezre, majd fénymikroszkóp alatt értékeltük, a látótérbe eső mozgó sejtek becsült

százalékát. A becslést minden minta esetében két különböző ember végezte, és az átlagolt eredményt vettük szubjektív motilitási százalékknak.

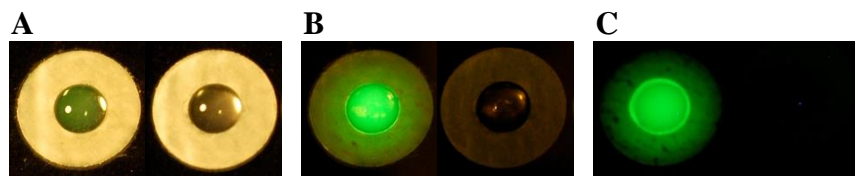
A termékenyítések előtt a nőtényeknek intramuszkulárisan 0,2 ml Receptal® (Intervet) injekciót kaptak. A felolvasztott sperma mintákat 1:2 arányban hígítottuk Weitze Tris oldattal, majd termékenyítő katéterbe (IMV Thechnologies, Ref : 006927) szívtuk. A fagyasztott minták SB-CAG-Vénusz vonalból, valamint WAP-hTNAP vonalból illetve vad típusú bak nyulaktól származtak.

4. EREDMÉNYEK

4.1. ONDÓ VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

4.1.1. MAKROSZKÓPOS VIZSGÁLATOK

A makroszkópos vizsgálatok során a friss ejakulátumban kék fény tartományba is gerjesztő UV megvilágítás hatására a Vénusz fluorofor fehérje zöld fény emissziója volt látható. A szeminális plazma és az ivarsejtek külön választását követően az ondó eme két alkotójában is tapasztaltuk a transzgén fehérje jelenlétét, a szeminális plazma mintákban már gerjesztés nélkül is látható volt a Vénusz fehérje zöld emissziója (5/A. ábra) még a heterozigóta állatok mintáiban is.



5. ábra: A Vénusz fehérje zöld emissziója a szeminális plazmában különböző megvilágítás mellett. *SB-CAG-Vénusz pozitív heterozigóta (#4017) baktól szeminális plazma minta, mellette egy vad típusú állat mintája látható (#0001)* **A:** Vénusz fluorofor fehérje emissziója UV megvilágítás nélkül normál fényenél, **B:** UV megvilágítással és normál fényenél, **C:** UV megvilágítással sötét szobában.

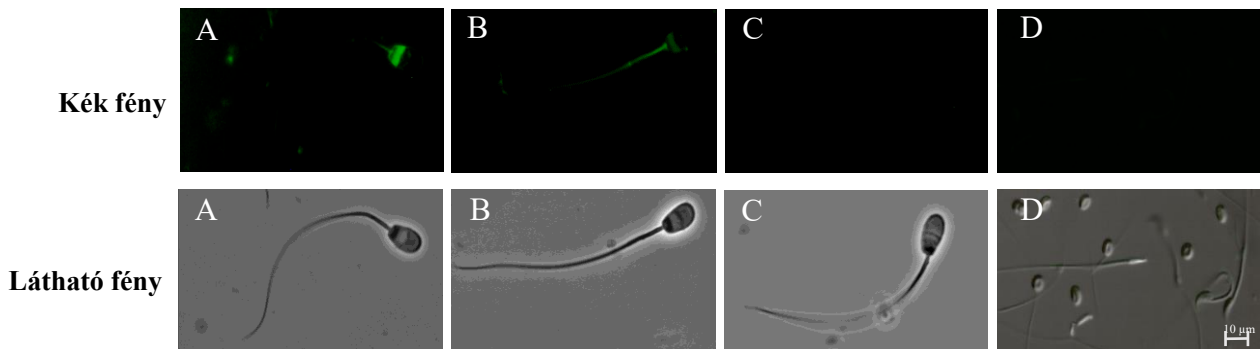
4.1.2. MIKROSZKÓPOS VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI: A VÉNUSZ FEHÉRJE KIFEJEZŐDÉSÉNEK

FAJSPECIFIKUS SAJÁTOSÁGAI NYÚL ÉS EGÉR SPERMIUMOK ESETÉBEN

Fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálva a spermiumokat, mind a heterozigóta (#4004) mind pedig a homozigóta (#4007) SB-CAG-Vénusz transzgénikus bak nyulak esetében, minden ivarsejtnél tapasztaltuk a Vénusz fluorofor fehérjéről származó jelet. A fény emisszió a spermiumok, poszt-akroszómális részén, a nyaki részen és a farkban volt látható, mindkét állat esetében (6. ábra). A különbség, a visszaverődő fény erősségében volt.

Az azonos transzgénnel létrehozott három független vonalból kiválasztott SB-CAG-Vénusz homozigóta egerek (Garrels *et al.*, 2016a) mellékhere eredetű spermium mintáin konfokális mikroszkópos vizsgálattal, egyik vonalból származó hím egér esetében sem találtunk a spermiumokban transzgén kifejeződést (6. ábra) az ábrán csupán csak a VL1 jelöléssel ellátott vonalból származó homozigóta egér mintájának konfokális mikroszkóppal készített képe látható. Ezzel szemben a nyúlhoz hasonlóan a Vénusz fehérje genotípus független kifejeződését figyelték meg az azonos konstrukcióval létrehozott sertések sperma mintáiban (Garrels *et al.*, 2011b), amely

tény felhívta a figyelmet a fajspecifikus különbségekre, okot adva ezzel, hogy megvizsgáljuk a transzgén fehérje kifejeződést a *postnatis* folyamatok során a here és mellékhere szövetekben illetve a még éretlen ivarsejtekben.



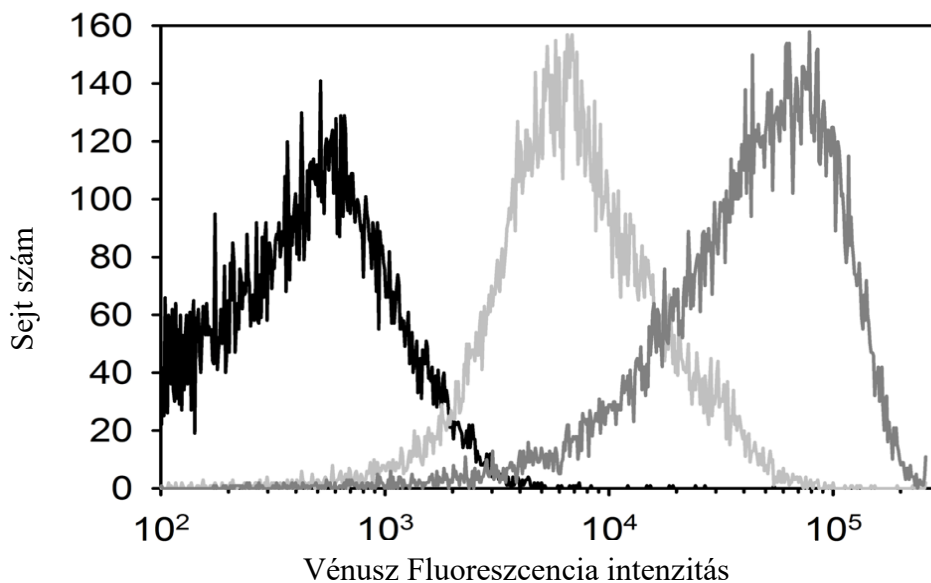
6. ábra: A Vénusz fehérje kifejeződése nyúl és egér hímivarsejtekben. **A:** *SB-CAG-Vénusz* pozitív homozigóta (#4007) bak nyúltól származó spermium, **B:** *SB-CAG-Vénusz* pozitív heterozigóta (#4004) bak nyúltól származó spermium, **C:** Vad típusú bak nyúltól származó spermium, **D:** *SB-CAG-Vénusz* pozitív homozigóta egér (VLI jelölésű vonal) mellékhere eredetű spermium (konfokális mikroszkópos felvétel).

Vizsgálatainkat azonos érettségi állapotban lévő spermiumok esetében is elvégeztünk, ehhez ejakulált ondót gyűjtöttünk a homozigóta egerektől. Ebben az esetben sem tapasztaltunk a transzgénre utaló fluoreszcens jelet az egér spermiumokban.

4.1.3. A SPERMA FLOW CITOMETRIAI VIZSGÁLATAINAK EREDMÉNYE NYÚLBAN

A flow citometriai vizsgálatra három bak nyúl sperma mintája került. A Hoechst 33342 interkalálódó festékkal festett, fixált minták különböző genotípusú állatoktól származtak, egy a 7. ábrán fekete színnel jelölt, vad típusú állattól, egy heterozigóta (#4004) világos szürke színnel jelölt állattól, illetve egy a 7. ábrán szürke színnel jelölt homozigóta (#4007) baktól.

A logaritmusos skálán megjelenített hisztogramon látható, hogy mindkét transzgénikus állat mintája rendelkezik Vénusz fluoreszcenciával. Továbbá azt is láthatjuk, hogy a heterozigóta állat minden ivarsejtje a vártakkal ellentétben Vénusz pozitívnak bizonyult. Csupán intenzitásában tért el homozigóta társától, azaz a #4007 azonosító számú homozigóta bak mintájában a fluoreszcencia intenzitása nagyobb, mint a #4004 azonosító számú heterozigóta bak mintájában mért érték. A flow citometriás vizsgálat bizonyította, hogy a heterozigóta állatok minden egyes ivarsejtjében, a homozigóta állatokkal megegyezően, Vénusz indikátor fehérje van, de annak mennyisége genotípus függő különbséget mutat.



7. ábra: A Flow Citometriai vizsgálat eredményéről készült hisztogram. A *Vénusz fehérje* expressziója SB-CAG-Vénusz pozitív heterozigóta, homozigóta és vad típusú bak nyulak ejakulált ondójában. Vad típus (**fekete**), heterozigóta (**világosszürke**), homozigóta (**szürke**).

4.1.4. AZ EJAKULÁTUMBAN MEGJELENŐ VÉNUSZ FEHÉRJE HATÁSA A TRANSZGÉN ÖRÖKLŐDÉSÉRE

A Flow citometriás vizsgálatok eredményei ellenére a transzgén öröklődése a SB-CAG-Vénusz heterozigóta állatok esetében nem tért el az összehasonlításként használt két további transzgénikus nyúl vonalunk eredményeitől (5. táblázat). Az SB transzpozon technikától eltérő módon, szövetspecifikus promotert tartalmazó konstrukciókkal, létrehozott két transzgénikus nyúl vonalak esetében a transzgén nem fejeződik ki a herében vagy mellékherében.

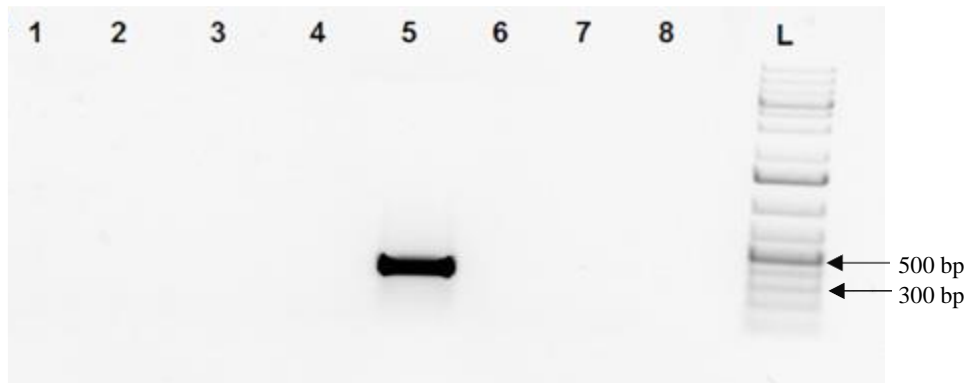
5. Táblázat: SB-CAG-Vénusz heterozigóta és homozigóta bakok transzgén öröklődésének, és alomlétszámának összehasonlító táblázata, két másik jól jellemzett az független a hereszövetekben nem expresszálódó transzgénikus nyúl vonallal.

Vonal	Bak genotípusa	Nőstény genotípusa	Termékenyítések száma	Alom létszám	Transzgénikus utódok száma
SB-CAG Vénusz	heterozigóta	vad típusú	1	7	4
	heterozigóta	heterozigóta	2	5-8	2-5
	homozigóta	vad típusú	2	5-8	5-8
	homozigóta	heterozigóta	2	5-5	5-5
WAP-hTNAP	heterozigóta	vad típusú	2	8-10	3-4
	heterozigóta	heterozigóta	1	7	5
	homozigóta	vad típusú	2	3-5	3-5
β-MHC-G52R-KCNE1	heterozigóta	vad típusú	2	4-12	1-6

Az SB-CAG-Vénusz transzgénikus állatok szaporítása során nem figyeltünk meg eltérő alomlétszámot az irodalomban az Újzélandi fajtára jellemző átlagos alomlétszámtól (5-8 fióka). Bemutatás céljából a 5. táblázatban feltüntetetek néhány termékenyítési és fialási adatot. A tenyésztés során megfigyeltük, hogy a heterozigóta állatok spermiumaiban a Vénusz fluoreszcens fehérje egyenletes eloszlásának ellenére a heterozigóta és a vad típusú állatok keresztezéséből megszületett utódok, hozzávetőleg 50 %-a hordozza ténylegesen a transzgént, míg homozigóta Vénusz transzgénikus állat esetében ez az arány 100 %-os. A transzgén örökítése a mendeli szabályoknak megfelelően öröklődik.

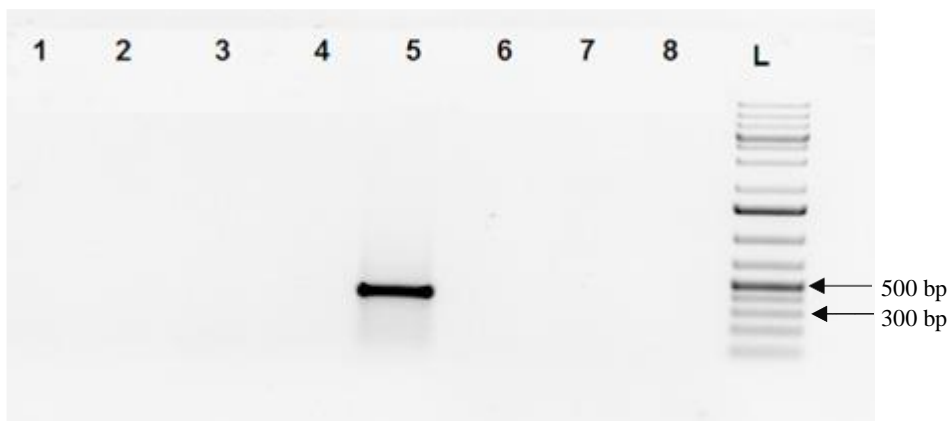
4.1.5. A VÉNUSZ JELZŐFEHÉRJE mRNS JELENLÉTÉNEK VIZSGÁLATA AZ IVARSEJTEKBEN RT-PCR MÓDSZER ALKALMAZÁSÁVAL

A Percoll gradiensen tisztított spermiumokból totál RNS-t izoláltunk, majd cDNS írást követően RT-PCR (Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction) reakciót mértünk össze. A Vénusz specifikus RT-PCR-rel nem sikerült a 334 bp méretű fragmentet a spermium mintákból felszaporítani, pozitív jelet csupán a kontrollként használt fibroblaszt sejtmintából kaptunk (8. ábra).



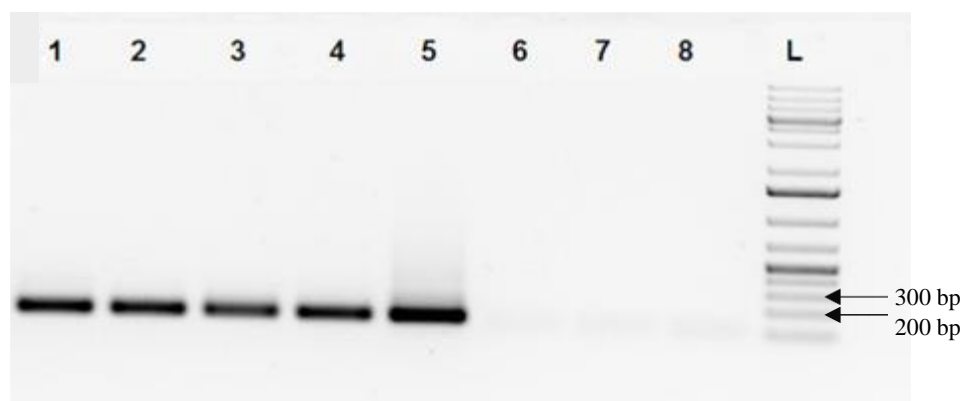
8. ábra: mRNS kimutatása a hímivarsejtekből. **1:** vad típus, **2:** #4020 SB-CAG-Vénusz homozigóta, **3:** #4017 SB-CAG-Vénusz heterozigóta, **4:** #4012 SB-CAG-Vénusz heterozigóta **5:** SB-CAG-Vénusz fibroblaszt sejt eredetű cDNS, **6:** templát nélküli RT-PCR, **7:** enzimet nem tartalmazó RT-PCR, **8:** víz kontroll, **L:** DNS létra (GeneRuler 1Kb Plus).

Összemértünk egy reakciót, ahol a cDNS mintákat újszülött kori Fc receptor specifikus primer párral szaporítottuk fel (Catunda Lemos *et al.*, 2012), hogy megbizonyosodjunk a minta epitél sejt mentességéről (9. ábra). Jelet ebben az esetben is csak a fibroblaszt sejt mintákból kellett, hogy kapjunk 353 bp méretben. Ezzel bizonyítva, hogy a totál RNS mintánk nem származhatott epitél vagy leukocita sejtekből.



9. ábra: Az epitél eredetű és a leukocita sejtek kimutatása cDNS mintákból. **1:** vad típus, **2:** #4020 SB-CAG-Vénusz homozigóta, **3:** #4017 SB-CAG-Vénusz heterozigóta, **4:** #4012 SB-CAG-Vénusz heterozigóta **5:** SB-CAG-Vénusz fibroblaszt sejt eredetű cDNS, **6:** templát nélküli RT-PCR, **7:** enzimet nem tartalmazó RT-PCR, **8:** víz kontroll, **L:** DNS létra (GeneRuler 1Kb Plus).

Miután megbizonyosodtunk arról, hogy a 90%-os percoll gradiensen végzett centrifugálással a mintáinkból valóban sikerült a nem ivari eredetű sejteket eltávolítani szükséges volt egy újabb kontroll kísérletet elvégezni, melynek során a tisztított RNS minőségét ellenőriztük. A cDNS-ből a 28S riboszomális RNS specifikus primer párral összemért reakciót készítettünk. Minden RNS mintáinkból sikerült a megfelelő fragment méretben 228 bp-nál jelet kaptunk (10. ábra) kivéve a templát nélküli, az enzimet nem tartalmazó illetve a víz kontroll mintákból.

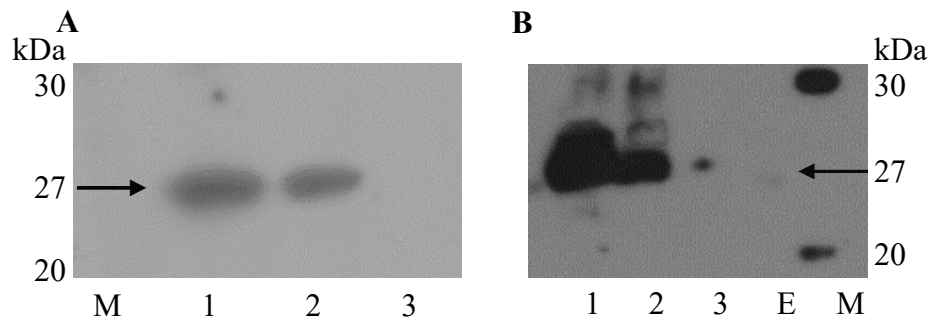


10. ábra: Az RNS minőségének ellenőrzése. **1:** vad típus, **2:** #4020 SB-CAG-Vénusz homozigóta, **3:** #4017 SB-CAG-Vénusz heterozigóta, **4:** #4012 SB-CAG-Vénusz heterozigóta **5:** SB-CAG-Vénusz fibroblaszt sejt eredetű cDNS, **6:** templát nélküli RT-PCR, **7:** enzimet nem tartalmazó RT-PCR, **8:** víz kontroll, **L:** DNS létra (GeneRuler 1Kb Plus).

4.1.6. VÉNUSZ FEHÉRJE KIFEJEZŐDÉSÉNEK VIZSGÁLATA WESTERN BLOT ANALÍZISSEL

Az epitél sejtektől megtisztított spermium mintákból egyenként 10 µg összes fehérje mennyiség került elválasztásra 12 %-os denaturáló gélben. Az azonos mennyiségben felvitt fehérje mintákból western blot vizsgálattal bizonyítottuk a Vénusz fehérje jelenlétét a hímvarsejteken, és alátámasztottuk a flow citometriai vizsgálatok eredményét, miszerint a homozigóta és a heterozigóta állatok spermium mintáiban a Vénusz fehérje kifejeződés intenzitásában különbség van (11/A ábra).

A centrifugálással a sejtes alkotóktól elválasztott szeminális plazmából készült mintákból ugyancsak 10 µg összes fehérje mennyiség került gélelektroforézisre. A Western blot vizsgálat ebben az esetben is megerősítette a makroszkópos vizsgálatok eredményét. Azaz a szeminális plazmában jelen van a Vénusz fehérje (11/B ábra).



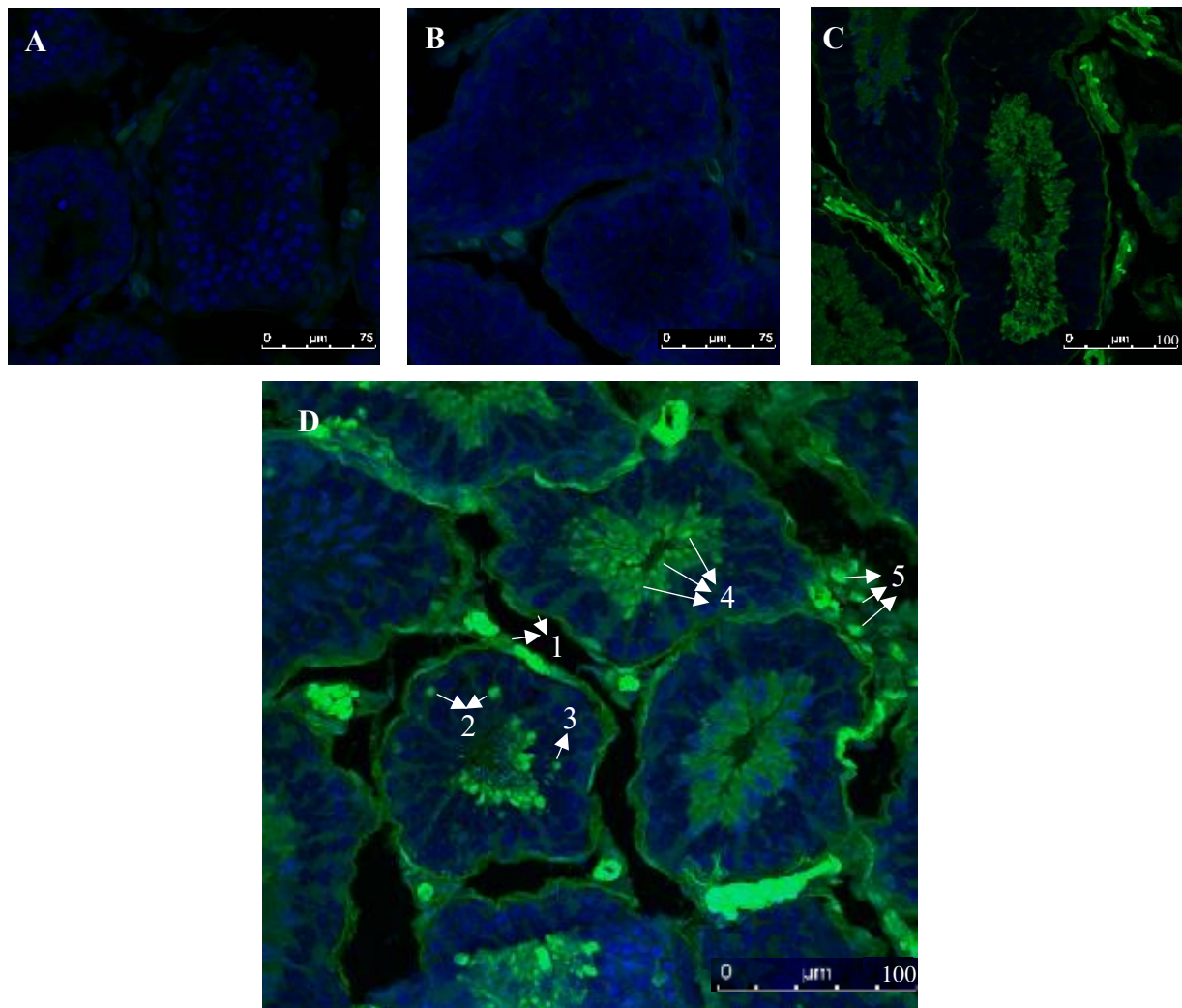
11. ábra: A transzgénikus állatok tisztított spermium mintáinak (A) és szeminális plazma mintáinak (B) Western Blot analízise. **1:** #4020 SB-CAG-Vénusz homozigóta bak mintája, **2:** #4017 SB-CAG-Vénusz heterozigóta bak mintája, **3:** vad típusú kontroll bak mintája (#0001), **M:** molekulásúly marker, **E:** üres csatorna.

Továbbá a homozigóta és heterozigóta állatok mintáiban különbözik a transzgén fehérje koncentráció. Az IMAGE-J programmal meghatározott Vénusz fehérje mennyisége, heterozigóta állat szeminális plazmájában hozzávetőleg 852 ng/μl.

4.1.7. A VÉNUSZ FEHÉRJE KIFEJEZŐDÉSÉNEK VIZSGÁLATA AZ IVARÉRÉS KÜLÖNBÖZŐ SZAKASZAIBAN, HERESZÖVET HISZTOLÓGIAI VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

A hisztológiai vizsgálatokhoz 42, 60, és 120 napos SB-CAG-Vénusz pozitív bak nyulaktól preparáltunk ivarszerv mintákat, hogy vizsgálhassuk a Vénusz fehérje kifejeződését az állatok nemi fejlődésének függvényében (12. ábra). Az ivari fejlődés korai stádiumában lévő 42 napos heterozigóta állat (#4024) szomatikus sejteiben már jól látható a Vénusz fehérje jelenléte, de a differenciálódó csírasejtekben még nem detektálható (12/A ábra). A nyulak ivari érése hozzávetőleg 60 napos kor környékén kezdődik (teljes ivarérettség kb. 90 napos korban), ebben az időszakban indul be a hímivarsejtek képződése, a spermatogenezis. A 12/B ábrán egy 60 napos heterozigóta állat (#4025) hereszövet metszeti képe látható, melyen megfigyelhető a spermatogóniumok fejlődésével a Vénusz fehérje expressziója is. Az ivari érés befejeztével megkezdődik a tenyészéretté válás folyamat az állatokban, ez 120 napos korra (fajtától függően) befejeződik. A 120 napos heterozigóta állat (#4027) szöveti metszetén a transzgén fehérje jelenléte megfigyelhető a spermatocitákban, a spermátidákban, a spermiomorfoenezis különböző szakaszaiban lévő spermátidákban, valamint a herecsatornák közötti laza kötőszövetes állományban elhelyezkedő Leydig-féle sejtekben és a simaizom sejtekben (12/C ábra). A 12/D ábrán egy

tenyésztett homozigóta hím hereszövet metszeti képe látható, melyen jelöltem a különböző sejteket a jobb beazonosítás érdekében.



12. ábra: A Vénusz fehérje kortól függő kifejeződésének hereszövet hisztológiai vizsgálata.

A: SB-CAG-Vénusz pozitív heterozigóta 42 napos hím (#4024) hereszövet metszeti képe,

B: SB-CAG-Vénusz pozitív heterozigóta 60 napos hím (#4025) hereszövet metszeti képe,

C: SB-CAG-Vénusz pozitív heterozigóta 120 napos hím (#4027) hereszövet metszeti képe,

D: SB-CAG-Vénusz pozitív homozigóta hím (#4020). (1: Sertoli sejtek, 2: Spermatogóniumok, 3: Spermatociták, 4: Spermatozoidok, 5: Leydig féle sejtek)

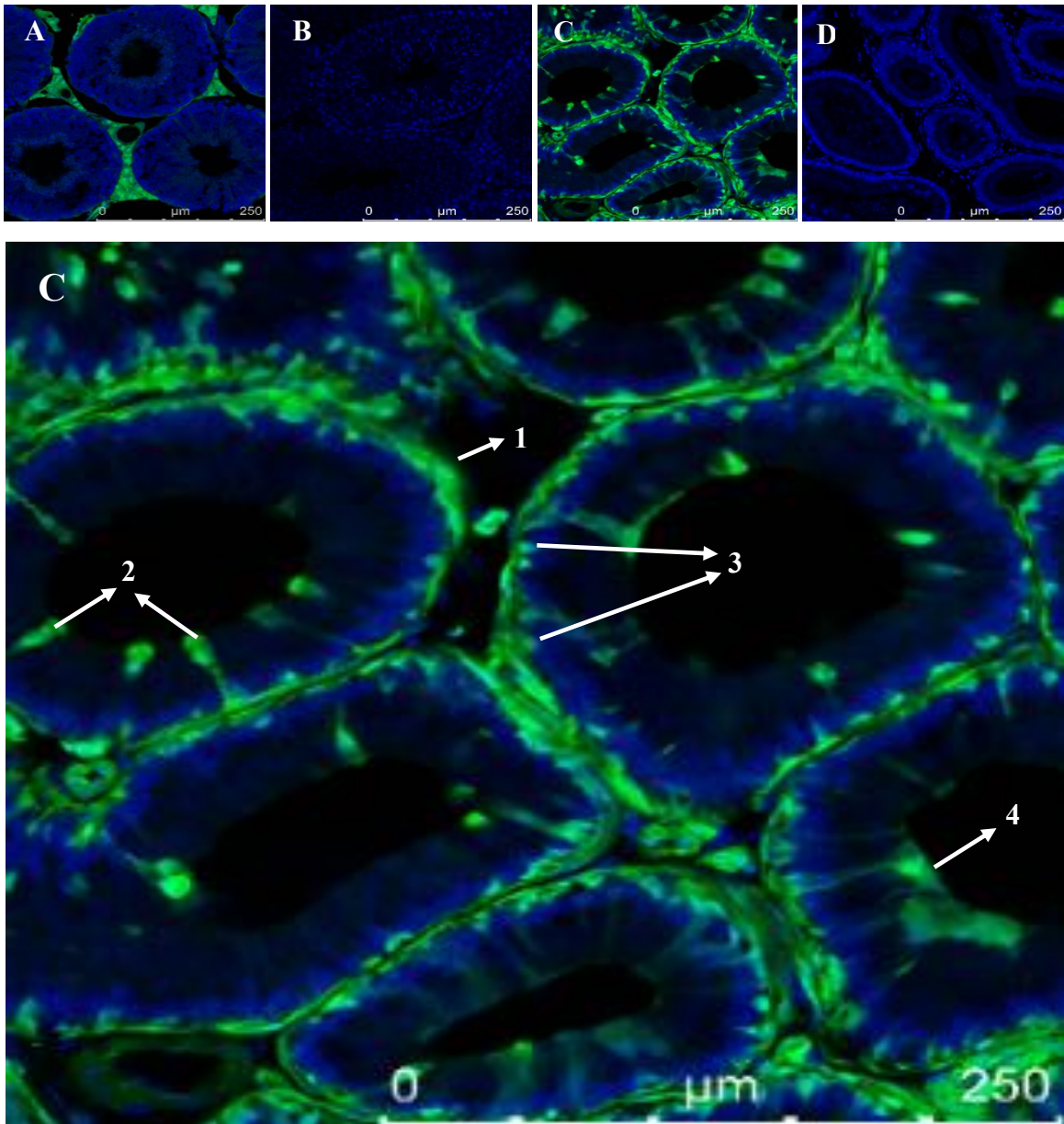
A méretskála beosztás az **A** és **B** kép esetében 75 μm a **C** és **D** kép esetében 100 μm

4.1.8. FAJSPECIFIKUS KIFEJEZŐDÉS HISZTOLÓGIAI VIZSGÁLATÁNAK EREDMÉNYEI TRANSZGÉNIKUS EGÉR ÉS NYÚL SZÖVETEIN

Három független vonalból származó tenyésztett Vénusz pozitív homozigóta egér (*Garrels et al.*, 2016a) hereszövetén is elvégeztük a hisztológiai vizsgálatot, hogy a Vénusz fluorofor fehérje

expressziójának fajspecifikus jellegét vizsgálhassuk. Ugyanazzal a konstrukcióval létrehozott transzgénikus nyúl, és egér hímvarsejtjeinél megfigyeltük a Vénusz fehérje kifejeződés fajok közötti eltérését, melyet a 6. *ábrán* bemutattam. Ezt az eltérést kívántuk hereszövet metszeteken tovább vizsgálni (*13. ábra, az ábrán csak a VLI vonalból származó állat szövetszeti képeit mutatom be*). Az egér minták esetében megfigyelhető volt a transzgén fehérje jelenléte a herecsatornák közötti laza kötőszövetes állományban, azaz a Leydig-féle sejtekben és a simaizom sejtekben (*13/A ábra*), megegyezően azzal, amit a 120 napos homo- és heterozigóta nyulak szomatikus sejtjeinél tapasztaltunk. Ezzel szemben az egér spermátidákban és a spermidákban nem találtunk a transzgén fehérjéről érkező jelet.

A mellékherében megy végbe az ivarsejtek végső érési folyamata az hímek epididimális epitéliuma legalább három fő sejttypusból áll, az SB-CAG-Vénusz egér mellékhere szövetszetein láthatjuk, hogy a transzgén kifejeződik a fő- és bazális sejtekben valamint a hengerhámsejtekben (*13/C ábra*). Nagyon erős expressziót tapasztaltunk a simaizom sejtekben és az intersticiális sejtekben, mindhárom független egér vonalban. A *13. ábrán* csupán csak az egyik SB-CAG transzgénikus egérvonal metszeti képeit tüntettem fel vad típusú egér szöveteit kontrollként használva (*13/B, D ábra*).

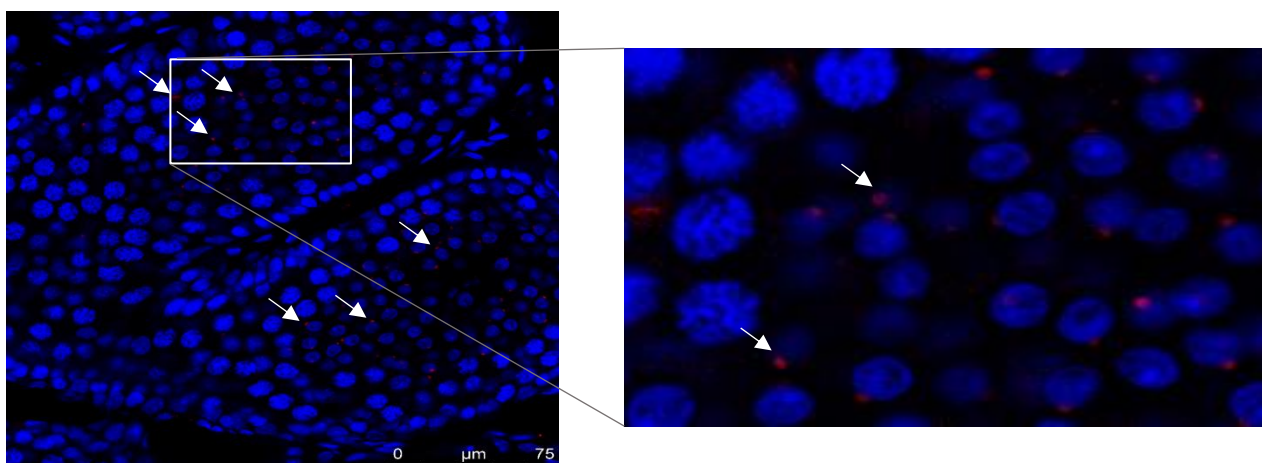


13. ábra: A Vénusz fehérje fajspecifikus kifejeződésének vizsgálata egér here szövetekben.
A: *SB-CAG-Vénusz pozitív homozigóta egér (VL1) hereszövetének metszeti képe*, **B:** *Vad típusú egér hereszövetének metszeti képe*, **C:** *SB-CAG-Vénusz pozitív homozigóta egér (VL1) mellékheréjének metszeti képe (1: simaizom sejtek, 2: fősejtek, 3: bazálissejtek, 4: hengerhámsejt)*, **D:** *Vad típusú egér mellékheréjének metszeti képe*. A méretskála beosztás: 250 μm

4.1.9. IMMUNHISZTOLÓGIAI VIZSGÁLATOK AZ INTERCELLULÁRIS HIDAK MEGLÉTÉNEK BIZONYÍTÁSÁRA

Az előző fejezetekben már ismertettem, hogy a heterozigóta állatok minden egyes ivarsejtében sikerült a transzgén fehérjéről érkező jelet detektálnunk, csakúgy, mint a homozigóta állat esetében. Előbbi csupán intenzitásában tér el az utóbbtól. Megfigyeléseink ezen nem várt eredménye (a heterozigóta állatok várhatóan az ivarsejtek 50%-ban kapunk transzgén fehérjéről jelet) arra utal, hogy az intercelluláris hidak a spermaticiták és a spermatidák között funkcionális szerepet játszanak, ami magyarázza az egyenletes Vénusz fehérje eloszlást a transzgenikus és a nem transzgenikus hímvarsejtek között. A spermaticiták és a spermatidák között az intercelluláris hidak révén kialakult kapcsolattal nyúlban elsőként egy 1959-ben megjelent tanulmányban foglalkoznak (Fawcett, Ito és Slautterback, 1959). A sejtosztódás során alakul ki két testvérsejt között, és feltételezhetően szerepe van a csírasejtek szinkronikus fejlődésében, bár valódi funkciója még ismeretlen.

Az intercelluláris hidak meglétének bizonyítására immunhisztológiai vizsgálatot végeztünk (14. ábra). A sebészeti úton eltávolított szervekből metszetet készítettünk, melyet immunfestettünk TEX-14 elsődleges és Alexa Fluor 633-al jelölt másodlagos ellenanyaggal. A sejtmagfestést TO-PRO 3 iodiddal végeztük. A 14. ábrán nyíllal jelöltem az intercelluláris hidakat jelző TEX-14 fehérjéhez kötött ellenanyagok piros jelző festését.



14. ábra: A hereszövet immunhisztológiai vizsgálatának eredménye. A *TEX 14* fehérje kimutatása immunhisztológiával az intercelluláris hidak meglétének vizsgálatára SB-CAG-Vénusz pozitív bak nyúl (#4020) hereszövetében. A méretskála beosztás 75 μ m

4.1.10. TRANSZGÉNIKUS BAK NYULAK SPERMIMUM MINŐSÉG MEGHATÁROZÁSÁNAK VIZSGÁLATI
EREDMÉNYEI

A spermiumok mozgását CASA (Computer Asszisztált Sperma Vizsgálat) rendszerrel vizsgáltuk. A vizsgálati paraméterek közül a motilitást (MOT), a progresszív vagy előrehaladó mozgást (PMOT), a sejtek útvonalának egyenestől való eltérését (LIN), és a teljes megtett útvonalra számított sebességet (VCL) vizsgáltuk.

6. Táblázat: *Sperma motilitás vizsgálat CASA (MOT, PMOT, VCL, LIN) rendszerrel, és a feltételezhetően termékenyítő képes spermiumok arányának meghatározása Kovács-Foote festés alapján. SB-CAG-Vénusz transzgenikus nyúl vonal és két szövet specifikus promóter által vezérelt az ejakulátumban nem expresszáldó transzgen vonal esetében.*

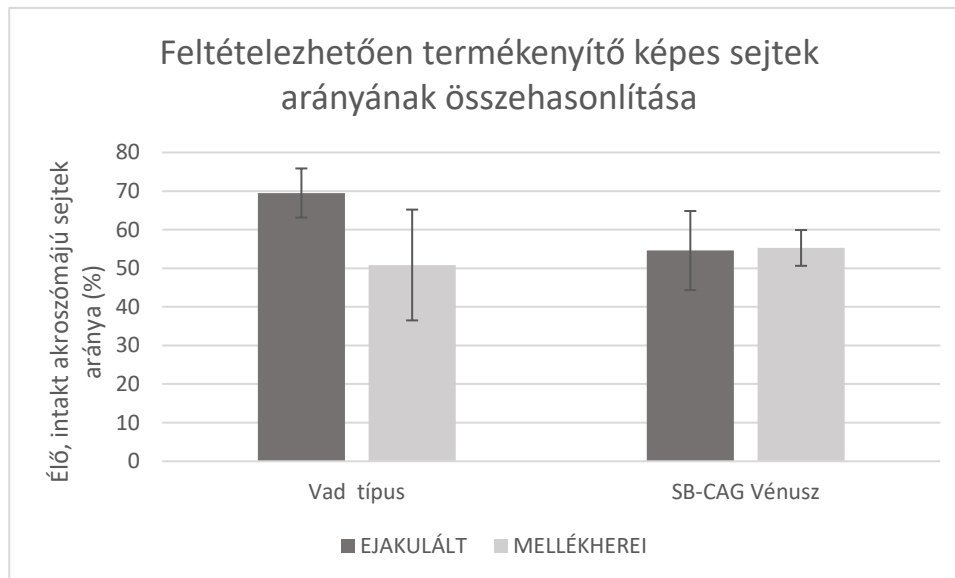
Azonosító szám	Kontroll	#4017	#4020	#5117	#3005
Genotípus	Vad típus	Heterozigóta	Homozigóta	Heterozigóta	Heterozigóta
Transzgen vonal	---	SB-CAG-Vénusz	SB-CAG-Vénusz	G52R KCNE1	WAP-hTNAP
	Átlag ± SD	Átlag ± SD	Átlag ± SD	Átlag ± SD	Átlag ± SD
MOT (%)	82.8 ± 8.6	75.6 ± 10.2	79.1 ± 9.38	86.8 ± 6.7	82.8 ± 8.6
PMOT (%)	68.7 ± 12.5	61.7 ± 16.08	64.3 ± 14.8	77.9 ± 8	70.1 ± 11.93
VCL (µm/s)	123.6 ± 13.31	132.3 ± 23.98	132.2 ± 11.32	135.3 ± 2.92	130.7 ± 14.45
LIN (%)	41 ± 0.82	41.19 ± 2.87	40.5 ± 2.52	32.3 ± 1.5*	32.5 ± 5.8*
Élő, intakt akroszóma sejt (%)	81.52	79.52	70.95	60.19	63.14

Ahhoz, hogy vizsgálni tudjuk a Vénusz fluoreszcens fehérje ektópikus kifejeződésének hatását a spermiumokra a kísérletbe bevontunk két másik transzgen vonalból származó bakot, melyeknél a transzgen kifejeződése a szívre (G52R KCNE1) és az emlőszövetre (WAP-hTNAP) korlátozódik. Nem találtunk szignifikáns eltérést a progresszíven mozgó sejtek arányában a Vénusz fehérjét expresszáldó heterozigóta (61.7 ± 16.08) és homozigóta (64.3 ± 14.8) és a vad típusú (68.7 ± 12.5) bakok mintájában a CASA rendszerrel történő motilitás vizsgálat során (6. táblázat). A feltételezhetően termékenyítő képes sejtek aránya sem mutatott statisztikailag kimutatható különbséget a fent említett három állat (kontroll, #4017, #4020) mintája között, azonban a G52R KCNE1 és, WAP-hTNAP transzgenikus bakok esetében, a Kovács-Foote festés értékelésénél az

élő, ép akroszómával rendelkező nem festődött farkú sejtek száma alacsonyabb volt a vad típusú állat mintájához képest (6. táblázat). Az SB-CAG-Vénusz homozigóta bak esetében a 2. beltenyészett generációról beszélhetünk. A WAP-hTNAP vonal esetében ezt az effektust a hosszú beltenyészetség okozhatja. A G52R KCNE1 vonalak esetében 1. beltenyészett generáció egyedeiről beszélünk, a feltételezhetően termékenyítő képes sejtek alacsonyabb számára, jelenleg még nem tudunk magyarázattal szolgálni. Ennek ellenére a transzgénikus bakokkal való termékenyítésekből született fiókák száma hasonló volt mind három vonal esetében, ezek az eredmények a 4.1.4. fejezetben a 5. táblázatban találhatóak. Ennek alapján a Vénusz fehérje jelenléte a spermiumokban nem okoz mérhető csökkenést a spermiumok mozgásában illetve termékenyítő képességében.

4.1.11. MELLÉKHERE EREDETŰ ÉS EJAKULÁLT SPERMIUMOK FELTÉTELEZETT TERMÉKENYÍTŐ KÉPESSÉGÉNEK MEGHATÁROZÁSA

Nyolc ivarérett, de még nem tenyészérett SB-CAG-Vénusz transzgénikus heterozigóta (#4031, #4032, #4033, #4036, #4037, #4039, #4040, #4045) és két azonos korú vad típusú nyúl mellékheréjéből mostunk spermiumokat és hasonlítottuk össze azt ugyanazon állatok ejakulált ondójában lévő spermiumok minőségével. A Kovács–Foote festés után értékelt mintákban nem találtunk szignifikáns különbséget ugyanazon SB-CAG-Vénusz heterozigóta állat átlagolt mellékhere eredetű spermium mintái (MH:55.28±4.63) és ejakulált mintái (EJ:54.59±10.25) között (15. ábra).



15. ábra: Mellékhere eredetű és ejakulált spermiumok termékenyítőképességének összehasonlítása. *Nyolc SB-CAG transzgénikus ivarérett (#4031, #4032, #4034, #4036, #4037, #4039, #4040, #4045) heterozigóta állat és két azonos korú vad típusú állat átlagolt értékeinek feltüntetésével.*

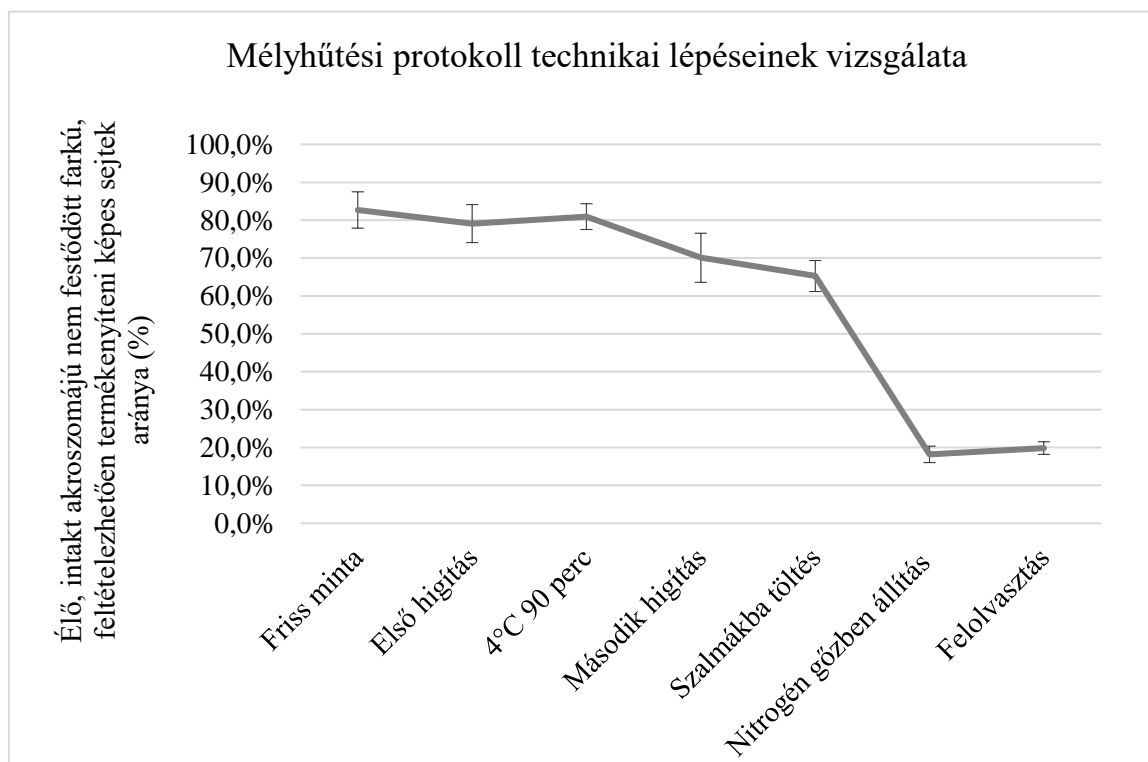
A heterozigóta SB-CAG-Vénusz pozitív állatok feltételezhetően termékenyítőképes sejtjeinek aránya nem tért el a vad típusú állatok mintáiban mértektől, (EJ:69.5±6.36; MH:50.85±14.35) sem az ejakulátumban (EJ) sem pedig a mellékhere eredetű (MH) mintákban. Azonban az ivarérett, de még nem tenyészerett állatok feltételezhetően termékenyítő képes sejtjeinek aránya (15. ábra) nem szignifikánsan ugyan, de alacsonyabb volt, mint a már tenyészerett bakok mintáiban található élő intakt akroszómájú, nem festődött farkú sejtek aránya (6. táblázat). Ennek magyarázata lehet, a bakok kora, illetve, hogy még nem kerültek tenyésztésbe, ellentétben a 6. táblázatban bemutatott bakokkal, melyektől tenyésztésbe vételt követően rendszeresen gyűjtöttünk ejakulátumot.

4.1.12. MÉLYHÜTÉSI KÍSÉRLETEK

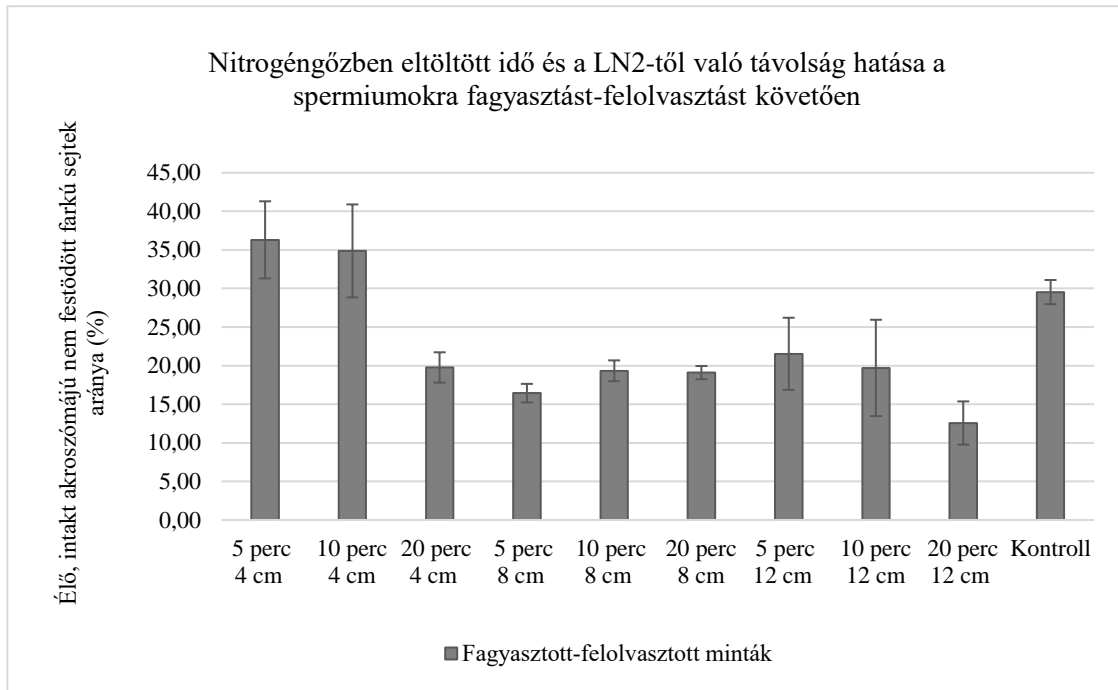
A nyúlvonalak *ex situ* génmegőrzésére a mélyhűtési protokollt standardizálni kívántuk, mely során első lépésként kiszűrtük, hogy a mélyhűtési folyamat legkritikusabb lépése a nitrogéngőzben történő inkubálás. Ennél a lépésnél az élő ép akroszómával, nem festődött farkkal rendelkező sejtek aránya 22 %-kal csökkent a friss mintákhoz képest (16. ábra). A technikai lépés fejlesztésére irányuló vizsgálataink során a mintákat a folyékony nitrogén (LN₂) szinttől három különböző

távolságra helyeztük (4 cm, 8 cm, 12 cm) továbbá, ezzel egy idejűleg változtattuk a minták nitrogén gőzben eltöltött idejét is (5 perc, 10 perc, 20 perc). Kontrollként a 4 cm-es távolságot alkalmaztuk, 30 perces inkubációval az eredeti módszernek megfelelő referenciával. A felolvasztást követően, sem a távolság tekintetében, sem az inkubációs idő hosszának tekintetében nem találtunk olyan szignifikáns különbséget, mely a feltételezhetően termékenyíteni képes sejtek számát a kontroll csoport értékeihez képest növelné.

A 4 cm-es távolságra helyezett minták, az 5 perces és a 10 perces inkubációk alkalmával nem mutattak statisztikailag kimutatható eltérést az élő, intakt akroszómájú, nem festődött farkú sejtek arányában a kontroll csoporthoz képest (17. ábra). Eredményeink alapján a további mélyhűtési munkákhoz a 10 perces inkubációt alkalmazzuk a minták a nitrogén felszíntől 4 cm-re való elhelyezésével.



16. ábra: Mélyhűtési eljárás egyes technikai lépéseinek vizsgálata, Kovács-Foote féle festési módszer alapján feltételezhetően termékenyíteni képes ivarsejtek arányának tekintetében.



17. ábra: A folyékony nitrogén felszínétől mért távolság és a nitrogén gőzben eltöltött idő spermiumokra gyakorolt hatásának vizsgálata Kovács-Foote festés alapján.

Kísérletet tettünk a tojás sárgájának a helyettesítésére kereskedelmi forgalomban kapható csíramentesített fogyasztási tejfélék (ESL, UHT tej) alkalmazásával, hogy vizsgálni tudjuk egy aszeptikus hígító hatását a fagyasztott felolvasztott spermiumok felételezett termékenyítő képességére. Vizsgálataink eredményeként azt találtuk, hogy az aszeptikus hígító használata a fagyasztás során nincs statisztikailag kimutathatóan jobb hatással a spermiumok fagyasztást-felolvasztást követő túlélésére valamint a feltételezett termékenyítő képességük megőrzésére. Mivel rosszabb eredményeket sem mutatott, így bizonyos esetekben például vonalak deriválása során, vagy speciális genomikai vizsgálatok esetében érdemes elgondolkodni, az aszeptikus hígítók használatán.

Vizsgáltuk továbbá a mélyhűtési eljárásban alkalmazott tojássárgáját tartalmazó hígítók hatását, abban az esetben, ha a protokoll szerint leírtak alapján nem szűrjük azt. Illetve ha 3 réteg papírvattán átszűrt tojássárgáját tartalmazó oldatainkkal készítjük el a fagyasztó médiumokat. A fagyasztást-felolvasztást túlélte sejtek aránya emelkedett (7. táblázat), ha a tojássárgáját tartalmazó hígítónkat a papírvattán átszűrtük. Az így fagyasztott- felolvasztott mintákkal termékenyítéseket is végeztünk. Az összesen 40 termékenyített nőstény nyúlból 19 egyed ellett átlagosan 5-6 fiókát. A nem ellett egyedek közé soroltuk a vemhessége elején elvetélt nőstényeket is (7. táblázat).

7. Táblázat: *Módosított fagyasztási protokoll alapján fagyasztott felolvasztott minták feltételezhetően termékenyítő képes sejtjeink aránya és a termékenyítési tesztek eredményei*

Összes termékenyítet nőstény száma (egyed)	40
Ellett nőstények száma (egyed)	19
Elvetélt nőstények száma (egyed)	2
Összes megszületett fiókák száma (egyed)	118
Ellési arány (%)	47,5
Szubjektív motilitás vizsgálatok átlag értéke (%)	62,67
Kovács-Foote festés alapján feltételezhetően termékenyíteni képes sejtek átlag értéke (%)	50,56

Kísérleti eredményeinket alapul véve a nyúl sperma mélyhűtésére alkalmazott eljárásunkat a kiinduláshoz képest több ponton módosítottuk, a kritikus technikai lépés kiszűrése után, a sejtek minőség romlása nélkül rövidítettük a minták nitrogén gőzben történő inkubációs idejét 20 perccel, ezzel az eljárást magát is meggyorsítva. Továbbá a fagyasztást-felolvasztást túlélő sejtek arányát növeltük, egy szűrési lépés beillesztésével a fagyasztás során használt alapoldatok esetében. Megállapítottuk a fagyasztást- felolvasztást túlélő sejtek feltételezhetően termékenyítőképes sejtjeinek arányát, melyet termékenyítési teszttel igazoltunk is.

4.1.13. ONDÓ VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEINEK ÖSSZEGZÉSE

A makroszkópos vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy az SB-CAG-Vénusz pozitív heterozigóta bak nyulak frissen levett ejakulátumában, illetve az ivarsejteket a szemínális plazmától elválasztva mind a két frakcióban gerjesztés hatására látható a Vénusz fluorofor fehérje zöld fény emissziója. Konfokális mikroszkópiával megállapítottuk, hogy a spermium sejtek poszt-akroszómális részén, nyaki részén, valamint a farkban látható a Vénusz fehérjéről visszaverődő zöld fluoreszcens jel. Mikroszkopikus vizsgálataink eredményét flow citometriai vizsgálatokkal alá is támasztottuk, mely során bizonyítást nyert, hogy a heterozigóta állatok minden egyes ivarsejtje, a homozigóta állatokkal megegyezően, Vénusz pozitív, csupán a fluoreszcencia mértékében tértek el. A szemínális plazmában és a hímivarsejtekben megerősítettük a Vénusz fehérje jelenlétét western blot analízissel, valamint meghatároztuk a fehérje mennyiségét is. A

Vénusz fehérje specifikus mRNS-t a spermiumokban az alkalmazott nagy érzékenységű módszerekkel nem tudtunk kimutatni. Immunhisztológiával kimutattuk a fejlődő hímvarsejtek között meglévő intercelluláris hidakat és feltételezzük, hogy a különböző genotípusú ivarsejtek közötti transzgen fehérje megoszlásában funkcionális szerepet tölthetnek be, ami magyarázat a spermiumok közötti egyenletes transzgen fehérje eloszlásra.

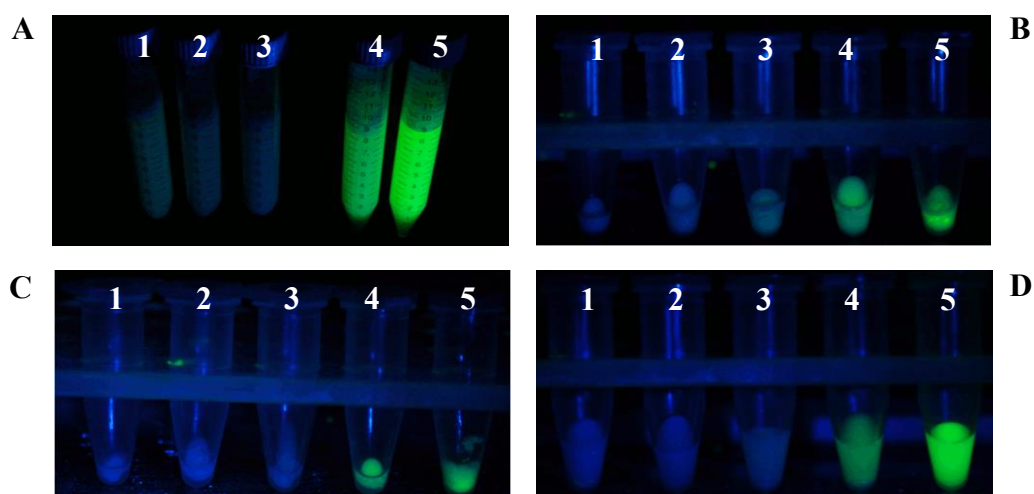
A transzgen fehérje kor szerinti eloszlásának vizsgálatához három, az ivari érésének különböző szakaszában lévő bak nyúl (42; 62; 120 napos) hereszövet metszetén végeztünk hisztológiai vizsgálatot. A 42 napos heterozigóta állat szomatikus sejtjeiben már látható jelet ad a Vénusz fehérje, de az ivari fejlődés korai szakaszában lévő állat differenciálódó csírasejtjeiben még nem. Az ivarérés kezdetén a spermatogoniumokban megfigyelhető a transzgen fehérje. A tenyésztett állat (120 nap) spermatocitáiban, spermatidáiban, és a különböző spermidákban is jól detektálható a vizsgált fehérje szintje. Az ivarsejtek mikroszkópos vizsgálata, és a hereszövettani vizsgálata során kimutattuk, a Vénusz transzgen fajspecifikus kifejeződését a spermiumokban. A VL1, VL3, VL4 független SB-CAG-Vénusz transzgenikus egér vonalba (Garrels *et al.*, 2016b) tartozó egerek hímvarsejtjeiben a transzgenikus nyúl és sertés spermiumoktól (Garrels *et al.*, 2011b) eltérően Vénusz fehérje expressziót nem tudtunk detektálni. Ugyanakkor a szomatikus sejtek esetében, mind a nyúl mind pedig, az egér here szöveti metszeteken pl. a Leydig-féle sejtekben vagy a simaizom sejtekben nagyon erős transzgen aktivitás van, viszont a spermidákban és a spermidákban egerek esetében nem tapasztaltunk Vénusz specifikus jelet.

Bíráltuk a transzgenikus bakoktól származó spermiumok motilitását és a feltételezett termékenyítő képességüket, vizsgáltuk az ivarsejtek fagyaszthatóságát, mely tulajdonságokban nem tértek el a vad típusú állatok mintáitól. A bakokat négy generáción át használtuk mesterséges termékenyítésekhez, ezen időszakban nem tapasztaltuk sem a termékenyítő képesség, sem az alom méret csökkenését.

4.2. VÉNUSZ TRANZSGÉN FEHÉRJE KIFEJEZŐDÉS VIZSGÁLATAINAK EREDMÉNYEI TEJ ÉS EMLŐSZÖVET MINTÁKBAN

4.2.1. MAKROSZKÓPOS VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

A szekréción szignált nem tartalmazó CAG promóter által vezérelt konstrukcióval létrehozott SB Vénusz transzgenikus heterozigóta és homozigóta nőstény nyulak tejében makroszkópos vizsgálataink alkalmával erős Vénusz fluoreszcenciát detektáltunk (18/A ábra). Mivel az idegen fehérje megjelenése a tejben okozhatja a fény elnyelésének és visszaverődésének módosulását, vizsgálatainknál, egy a tejében humán alkalikus foszfatázt termelő transzgenikus nyúl vonal heterozigóta nőstényétől (WAP-hTNAP, (Bodrogi *et al.*, 2006) fejt tejet is használtunk a vad típusú állat mintája mellett kontrollként.



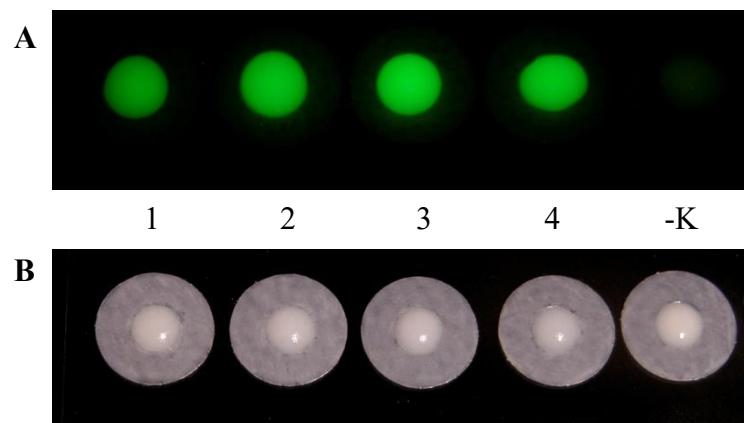
18. ábra: A Vénusz fluorofor fehérje emissziójának vizsgálata makroszkóposan kék fényű gerjesztés mellett. **A:** Vénusz fluoreszcencia a teljes tejben, **B:** A zsír frakcióban, **C:** A Kazein frakcióban, **D:** A Savó frakcióban.

1: negatív kontroll, vad típusú egyed (#3010), **2:** WAP-hTNAP heterozigóta egyed (#3013), **3:** WAP-hTNAP heterozigóta egyed (#3014), **4:** SB-CAG-Vénusz heterozigóta egyed (#4034), **5:** SB-CAG-Vénusz homozigóta egyed (#4035).

A tejet frakcióira bontva, a zsír (18/B ábra) és kazein (18/C ábra) frakciókban is látható a Vénusz fehérje expressziója, a legerősebb fluoreszcens jelet a tej savó mintáknál tapasztaltuk (18/D ábra) az SB-CAG-Vénusz homozigóta állatnál. A heterozigóta és a homozigóta egyedek között a visszaverődő fény intenzitásában erős különbséget tapasztaltunk, míg sem a vad típusú állat

mintáiban, sem pedig a WAP-hTNAP heterozigóta állat mintáiban nem tapasztaltunk a Vénusz transzgénikus állatokéhoz hasonló fluoreszcenciát.

A fluoreszcens transzgénikus fehérje kifejeződését vizsgáltuk a laktáció különböző időszakában makroszkóposan. Az SB-CAG-Vénusz heterozigóta nőstény nyúltól a laktáció első-, második-, harmadik-, és negyedik hetében tejmintát gyűjtöttünk, amiből 15 µl-t cseppentettünk tárgylemezre (19/B ábra), hogy vizsgálni tudjuk a Vénusz fehérje intenzitását kék fényspektrumban is gerjesztő UV megvilágítás mellett (19/A ábra). Kontrollként vad típusú anyanyúttól származó tejmintát használtunk.

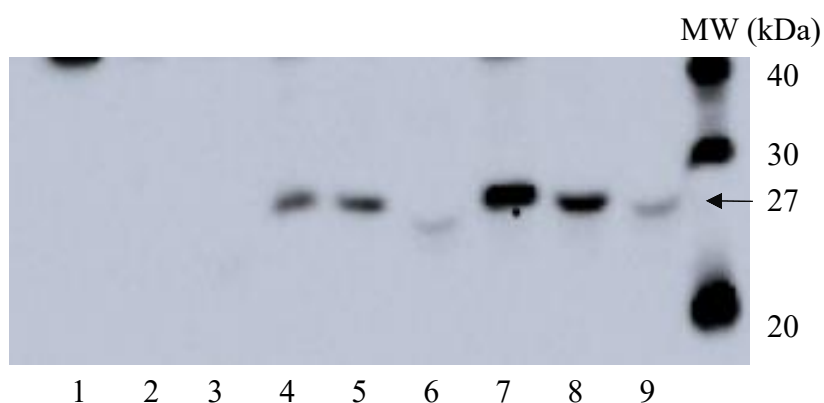


19. ábra: A Vénusz transzgén fehérje fluoreszcencia mértékének összehasonlítása a laktáció során. **A:** SB-CAG-Vénusz heterozigóta (#4026) és kontroll (#3010) nőstény tejmintája UV megvilágítás mellett, **B:** SB-CAG-Vénusz heterozigóta és kontroll nőstény tejmintája látható fény mellett. **1:** Heterozigóta nőstény laktációjának első hetében gyűjtött minta, **2:** Heterozigóta nőstény laktációjának második hetében gyűjtött minta, **3:** Heterozigóta nőstény laktációjának harmadik hetében gyűjtött minta, **4:** Heterozigóta nőstény laktációjának negyedik hetében gyűjtött minta, **-K:** Vad típusú nőstény laktációjának második hetében gyűjtött tejminta.

A gerjesztő megvilágítás mellett készült fényképről, IMAGE-J szoftver (Schindelin *et al.*, 2012) segítségével pixel intenzitást mértünk, melynek eredményeként a laktáció négy hete alatt gyűjtött tejmintákban nem találtunk szignifikáns különbséget az SB-CAG-Vénusz heterozigóta nőstény tejmintáinak fluoreszcenciája között.

4.2.2. VÉNUSZ FEHÉRJE KIFEJEZŐDÉSÉNEK VIZSGÁLATA WESTERN BLOT ANALÍZISSEL A TEJBEN ÉS ANNAK KÜLÖNBÖZŐ FRAKCIÓIBAN

Makroszkópos vizsgálataink eredményét western blot analízissel is megerősítettük (19. ábra). A laktáció második hetében fejt SB-CAG-Vénusz heterozigóta (#4034), homozigóta (#4035) és a kontrollként használt WAP-hTNAP heterozigóta (#3013) nőtényektől fejt tej különböző frakcióiból (savó, zsír, kazein) 20 µg összes fehérje mennyiségű minta került 12%-os SDS PAGE gélen történő elektroforézisre. A Western blot vizsgálat eredményeit elemezve látható, hogy azonos fehérje mennyiség mellett a homozigóta és a heterozigóta SB-CAG-Vénusz pozitív állatok mintáiban a transzgén fehérje mennyisége különbözik (20. ábra). Ezt denzitometriás méréssel kvantitáltuk is (8. táblázat).



20. ábra: Vénusz fluoreszcens fehérje kifejeződésének vizsgálata a tejkülönböző frakcióiban Western blot analízissel. **1:** WAP-hTNAP heterozigóta nőtény tejének savó frakciója, **2:** WAP-hTNAP heterozigóta nőtény tejének zsír frakciója, **3:** WAP-hTNAP heterozigóta nőtény tejének kazein frakciója, **4:** SB-CAG-Vénusz heterozigóta nőtény tejének savó frakciója, **5:** SB-CAG-Vénusz heterozigóta nőtény tejének zsír frakciója, **6:** SB-CAG-Vénusz heterozigóta nőtény tejének kazein frakciója, **7:** SB-CAG-Vénusz homozigóta nőtény tejének savó frakciója, **8:** SB-CAG-Vénusz homozigóta nőtény tejének zsír frakciója, **9:** SB-CAG-Vénusz homozigóta nőtény tejének kazein frakciója.

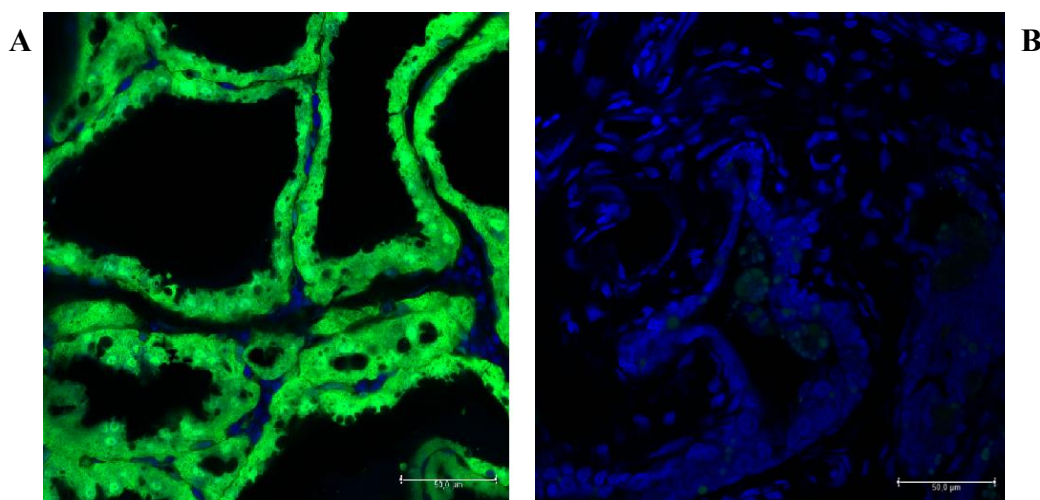
A Western blot analízis röntgenfilmes előhívásán mért intenzitás szerint, a homozigóta nőtény tejében hozzávetőleg kétszer akkora a Vénusz fehérje szint, mint a heterozigóta egyed mintájában (8. táblázat). IMAGE-J programmal (Schindelin *et al.*, 2012) megállapítottuk, hogy a tejben a Vénusz fehérje szint heterozigóta állat esetében 219 ng/µl volt. Ez az eredmény a Western blot vizsgálatnál a GFP standard hígítási sor alapján mért eredményéhez hasonló volt.

8. Táblázat: A tej különböző frakcióiban mért Vénusz fehérje mennyisége a Western blot analízis nyomán a ChemiDoc MP Imaging System rendszerrel és az ImageLab 5.0 programmal.

	#4034 sb-cag-vénusz heterozigóta			#4035 sb-cag-vénusz homozigóta		
Tejfrakció	Savó	Zsír	Kazein	Savó	Zsír	Kazein
Vénusz fehérje (ng/μl)	108,59	125,26	19,55	357,48	238,79	49,57

4.2.3. AZ EMLŐSZÖVET KONFOKÁLIS MIKROSKÓPOS VIZSGÁLATÁNAK EREDMÉNYE

Az emlőszövet vizsgálatakor a Vénusz fluorofor fehérje citoplazmatikus elhelyezkedést mutatott, a heterozigóta nőstény szövet metszeti képén (21. ábra). A transzgén fehérje expressziója az emlőszövet epitel sejtjeiben, arra mutat, hogy tejben megjelenő rekombináns fehérje a letöredező epitel sejtekből ered. Az eredményeinkhez hasonló, de nem megegyező megfigyeléseket írtak le az azonos transzgén konstrukcióval létrehozott sertések tejfrakcióiban, illetve az ugyancsak CAG promóter által szabályozott konstrukcióval létrehozott transzgénikus sertéseknél a transzgén mCherry rekombináns fehérjét detektáltak a tejben (Mukherjee *et al.*, 2016).



21. ábra: SB-CAG-Vénusz transzgénikus heterozigóta nőstény konfokális mikroszkópos emlőszövet metszeti képe. **A:** *Laktáló SB-CAG-Vénusz heterozigóta (#4026) nőstény emlőszöve*t, **B:** *laktáló vad típusú kontroll (#3010) nőstény emlőszöve*t. A sejtmagfestést TO-PRO 3 Iodid (Thermo Fisher Scientific, USA, T3605), a képeket 400X nagyítás mellett készítettük PMT detektorral ellátott Leica TCS SP8 konfokális mikroszkóppal, a méretskála beosztás 50 µm

4.2.4. TEJ VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEINEK ÖSSZEGZÉSE

Makroszkópos vizsgálatainkkal bizonyítottuk, hogy a SB-CAG-Vénusz transzgénikus heterozigóta és homozigóta laktáló nőstényektől fejt tejben megtalálható a fluoreszcens transzgén fehérje, annak ellenére, hogy a transzgénikus állatok létrehozásához használt konstrukció nem tartalmazott sem szövetspecifikus promótert, sem pedig szekréció szignál peptidet. Mivel a rekombináns fehérje termelődése leggyakrabban a tej savó frakciójában történik, a Vénusz transzgénikus tejfrakciókat is elválasztottuk. kék fény gerjesztés hatására, mind a zsír, mind a savó, és mind pedig a kazein frakcióban látható volt a fluoreszcens fehérje. Kíváncsiak voltunk, hogy a laktáció teljes időszakában azonos-e a transzgén fehérje koncentrációja a tejben. Így a laktáció első, második, harmadik, és negyedik hetében megfejtünk egy SB-CAG-Vénusz heterozigóta állatot. A makroszkópikus vizsgálatok alkalmával a Vénusz fluoreszcens fehérje egyaránt megtalálható volt a mintákban, és a laktáció előrehaladtával sem mutatott csökkenést. A legerősebb jelet a savó frakcióban detektáltuk, melyet Western blot analízissel is megerősítettünk. A fehérje szintű vizsgálataink alkalmával a heterozigóta és homozigóta Vénusz transzgénikus állatok fehérje koncentrációjában a makroszkópikusan tapasztalt eltérést is alátámasztottuk,

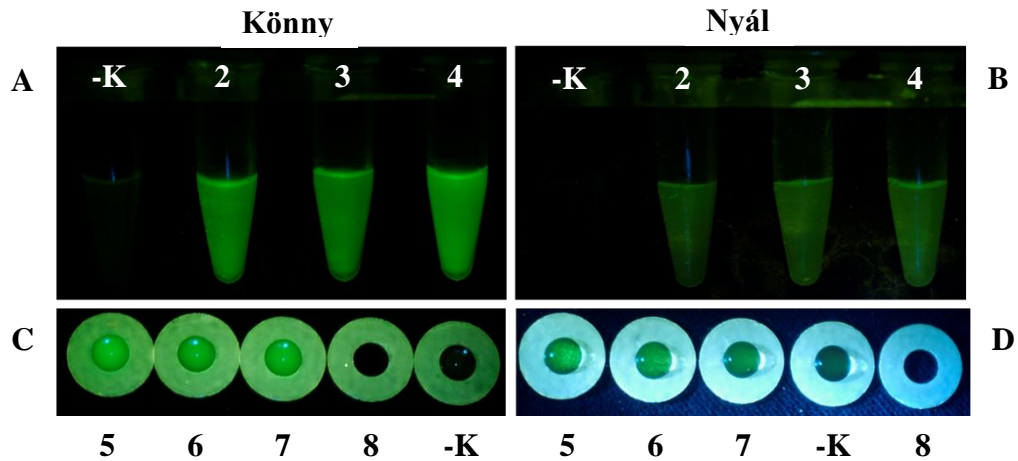
valamint denzitometriás méréssel a fehérje koncentrációt is meghatároztuk a különböző tejfrakciókban. A ChemiDoc MP Imaging System rendszerrel mért fehérje mennyiséget, összehasonlítottuk a makroszkópikus vizsgálataink során készült fényképek pixelintenzitásából számolt fehérje mennyiséggel, mely közel azonos eredményt adott.

Az emlőszövet konfokális mikroszkópos vizsgálatakor a Vénusz fehérje citoplazmatikus elhelyezkedését tapasztaltuk, ami, arra mutat, hogy a tejben megjelenő rekombináns fehérje a letöredező epitél sejtekből ered.

4.3. VÉNUSZ FEHÉRJE EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA KÖNNY ÉS NYÁL MINTÁKBAN

4.3.1. KÖNNY ÉS NYÁL MINTÁK MAKROSZKÓPOS VIZSGÁLATA

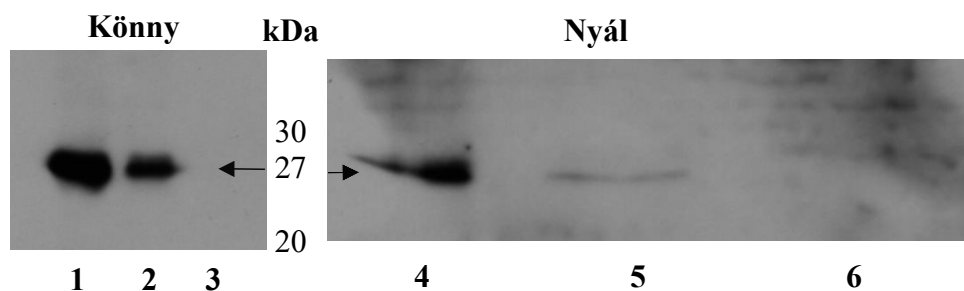
Könnny és nyál mintákat gyűjtöttünk egy 3 hónapos, egy 6 hónapos, és egy 24 hónapos heterozigóta SB-CAG-Vénusz transzgénikus bakoktól. A mintagyűjtés ugyanazon a napon három különböző időpontban történt (reggel, a nap közepén, kora este). Makroszkópos vizsgálataink során sikerült a transzgén fehérjéről visszaverődő zöld fény emissziót detektálnunk, mind a könnny, mind pedig a nyálmintákban (22. *ábra*). Pixel intenzitást mértünk a képek alapján, és nem találtunk különbséget a különböző korú állatok Vénusz fehérje kifejeződésében, sem a könnny-, sem pedig a nyálminták esetében (22/*A,B ábra*). A transzgén fehérjéről detektált jel intenzitásában ugyanazon állatok különböző idejű (reggel, nap közepe, kora este) mintagyűjtésekből származó könnny- és nyálmintáiban sem találtunk különbséget (22/*C,D ábra*).



22. ábra: Vénusz fluoreszcens fehérje kifejeződése SB-CAG-Vénusz heterozigóta állatok könny és nyálmintáiban. **A:** Különböző korú Vénusz transzgenikus heterozigóta állatok (3, 6, 24 hónap) könnymintái, **B:** különböző korú Vénusz transzgenikus heterozigóta állatok (3, 6, 24 hónap) nyálmintái, **C:** SB-CAG-Vénusz heterozigóta #4029 állat reggel, nap közepén, kora este gyűjtött könnymintája, **D:** SB-CAG-Vénusz heterozigóta #4029 állat reggel, nap közepén, kora este gyűjtött nyálmintája. **2:** #4071 három hónapos heterozigóta egyed mintája, **3:** #4064 hat hónapos heterozigóta egyed mintája, **4:** #4029 huszonnégy hónapos heterozigóta egyed mintája, **5:** reggeli órákban gyűjtött minta, **6:** nap közepén gyűjtött minta, **7:** kora esti órákban gyűjtött minta, **8:** üres mintahely, **-K:** #0001 vad típusú kontroll állat mintája.

4.3.2. KÖNNY ÉS NYÁLMIKÁK VIZSGÁLATA WESTERN BLOT ANALÍZISSEL

A könny és nyálmintákban is megerősítettük a Vénusz fehérje jelenlétét Western blot analízissel (22. ábra). A heterozigóta és a homozigóta állatok transzgen fehérje kifejeződése a könny és a nyál minták esetében is különbözik azonos összes fehérje felvitele mellett. A könnymintákban magasabb fehérje koncentrációt mértünk, ami heterozigóta állat esetében hozzávetőleg 49 ng/μl, míg a nyálmintákban, heterozigóta állat esetén csupán hozzávetőleg 12 ng/μl volt az IMAGE-J programmal mérve.



23. ábra: Western blot vizsgálat könny- és nyálmintákban. **1:** #4020 homozigóta állat könnymintája, **2:** #4017 heterozigóta állat könnymintája, **3:** #3009 vad típusú állat könnymintája, **4:** #4020 homozigóta állat nyálmintája, **5:** #4017 heterozigóta állat nyálmintája, **6:** #3009 vad típusú állat nyálmintája.

4.3.3. KÖNNY- ÉS NYÁLMI NTÁKKAL VÉ GZETT VIZSGÁLATOK EREDMÉ NYEINEK ÖSSZEGZÉ SE

Vizsgáltuk különböző korú SB-CAG-Vénusz transzgénikus heterozigóta állat könny és nyálmintáiban a transzgén fehérje kifejeződését. Az általunk végzett vizsgálati módszerekkel nem találtunk különbséget a 3 hónapos, a 6 hónapos, és a 24 hónapos heterozigóta állatok fluoreszcencia m a könny és nyálmintákban. Ugyanazon állattól a nap három különböző időszakában vett minták sem mutattak különbséget, sem a könny, sem pedig a nyál esetében. Western bolt vizsgálattal bizonyítottuk, hogy a heterozigóta és a homozigóta állatok fehérje koncentrációja a szemínális plazma-, a spermium-, és a tejmintákhoz hasonlóan eltérő.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Bizonyítottam a Vénusz transzgénikus fehérje megjelenését a heterozigóta bak nyulak minden ivarsejtjében, amely bizonyíték a sejtek közötti információ és molekula megoszlásra az intercelluláris hidak révén. Igazoltam továbbá, hogy az ektópikusan kifejeződő transzgén fehérje nem okozza a spermiumok lényeges minőségi változását.
2. Igazoltam, hogy a Vénusz fluoreszcens fehérje megjelenésében fajspecifikus különbségek vannak a spermatogenezis során az ivarsejtekben.
3. Elsőként igazoltam nyúlban, hogy nem szövetspecifikus promóter alkalmazásával a rekombináns fehérje a tej mellett a transzgénikus állatok szeminális plazmájában, könny- és nyálmintáibanban is megjelenik.
4. Bizonyítást nyert, hogy egy CAG promóter által vezérelt szekréciós szignál peptid útvonalat nem tartalmazó konstrukcióval létrehozott transzgénikus nyúl képes a rekombináns fehérje termelésére exokrin mirigyek által, és kiválasztja azt különféle biológiai folyadékokba, vagyis alkalmas rendszert biztosít rekombináns fehérjék új típusú citoplazmatikus termeltetésére transzgénikus nyulakban.

6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA ÉS JAVASLATOK

6.1. ONDÓ VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEINEK MEGVITATÁSA

A transzpozon alapú transzgenezis az additív génbevitel egyik leghatásosabb módja, Sleeping Beauty transzpozon technikával sikeresen hoztak létre transzgénikus egeret, patkányt és sertést, melyek azonos CAG-Vénusz transzgén konstrukciót hordoznak (Garrels *et al.*, 2011a; Ivics *et al.*, 2014b; Ivics *et al.*, 2014a; Ivics *et al.*, 2014c; Katter *et al.*, 2013). Az azonos konstrukcióval létrehozott SB-CAG-Vénusz transzgénikus egereknél, patkányoknál, nyulaknál, sertéseknél nagyon hasonló transzgén expressziós mintázatot találtak a szomatikus sejtekben, és nem volt megfigyelhető a változó expresszió, vagy a pozíció hatás, de többségük a CAG promóterre jellemző riportergén kifejeződési mintázatot mutatott (Garrels *et al.*, 2016b).

Az SB-CAG-Vénusz transzgénikus sertésekben megfigyelték a fluoreszcens transzgénikus fehérje genotípus független kifejeződését az érett spermiumokban (Garrels *et al.*, 2011b). Ezen tanulmány alapján vizsgáltuk az azonos SB-CAG-Vénusz konstrukcióval létrehozott transzgénikus bak nyulak spermium mintáit. Vizsgálataink bizonyították, hogy az SB-CAG-Vénusz heterozigóta bak nyulak minden haploid spermatidája Vénusz fluoreszcens jelet ad.

Meglepő módon ezek az eredmények nem vágtak egybe az egereknél tapasztaltakkal, ahol a spermiumokban nem figyelték meg a Vénusz expresszióját. Ezek az egymástól független megfigyelések arra utalnak, hogy a terminálisan differenciált spermiumok kivételt jelenthetnek az SB transzgénikus fajok szomatikus szöveteiben megfigyelt hasonló Vénusz riportergén expressziós mintázattól. Azonos módszerekkel megvizsgáltuk az SB-CAG-Vénusz konstrukcióval létrehozott transzgénikus bak nyulak és három független ugyan ezzel a konstrukcióval létrehozott transzgénikus egerek hímvarsejtjeit, és hereszövet metszeteit. A szövettani vizsgálatok eredményeként az SB transzpozon alapú transzgenezissel létrehozott CAG Vénusz transzgénikus nyulak spermatocitáiban, spermatidáiban, és az érett spermiumokban egyaránt detektálható volt a fluorofor fehérje jelenléte. Míg az általunk vizsgált három független transzgénikus vonalba (VL1, VL3, VL4) tartozó egerek hereszövet mintáiban, csupán a here csatornácskák laza kötőszövetes állományában és a simaizomban tudtuk kimutatni a fluoreszcens fehérjét, a mellékhere eredetű spermiumaiban sem a metszeteken látható spermatocitákban, spermatidákban nem találtunk Vénusz specifikus jelet. A spermium fejlődése valamint érése során tapasztalt expressziós különbség az egerek és a nyulak között, feltételezhetően a CAG promóternek köszönhető, amelyet a különböző fajok esetében más és más transz irányba ható faktorok irányítanak és tükrözi a spermatogenezis faji sajátosságait is.

Az SB-CAG-Vénusz heterozigóta bak nyúl spermiumai között tapasztalt egyenletes Vénusz fehérje eloszlás, azt sugallja, hogy vagy a transzgén mRNS vagy pedig a transzgén fehérje a testvér vagy szomszédos sejtek között az intercelluláris hidakon mozog. Az intercelluláris hidak meglétét hímvivarban nyúlón már közölték 1959-ben (Fawcett, Ito és Slautterback, 1959), funkcionalitását tekintve még nem születtek közlések ezen a fajon. Egérben kimutatták, hogy az intercelluláris hidak kialakulásához elengedhetetlen fehérje a TEX 14, melynek hiányában nem alakulnak ki a sejt közötti hidak, ami a spermatogenezis nem megfelelő végbemeneteléhez vezet (Greenbaum *et al.*, 2006).

A spermatidák genotípus független transzgénikus genotípusát elsőként a spermium specifikus protamin 1 promoter által vezérelt transzgén konstrukcióval létrehozott heterozigóta egereknél figyelték meg, ahol a here különböző szekrécióiban kimutatták a transzgén mRNS és fehérje egyenletes eloszlását (Braun *et al.*, 1989). Ugyanezt a genotípus független Vénusz fehérje átvitelt írták le spermiumokban heterozigóta SB-CAG-Vénusz transzgénikus sertésekben (Garrels *et al.*, 2011a). E két példán kívül emlősökben más közleményt nem tettek közzé.

Munkánk során bizonyítottuk a TEX 14 fehérje jelenlétét a transzgénikus bak nyulak heréjében. Az, hogy a spermium mintákban RT-PCR-rel nem tudtuk kimutatni a Vénusz specifikus mRNS jelenlétét bizonyítja, hogy a transzgénikus fehérje nem aktív transzkripció eredménye. Ez az eredmény illetve a heterozigóta állatok spermiumaiban tapasztalt egyenletes transzgén fehérje eloszlás a spermatociták és a spermatidák között kialakuló intercelluláris hidak aktív szerepét feltételezi. Ami az intercelluláris hidak funkciójának első bizonyítékát jelenti nyúl fajban.

Sperma vizsgálataink során kimutattuk, hogy az ektópikus fehérje kifejeződés nincs hatással a spermiumok termékenyítő képességére. A heterozigóta állatok utódainak 50%-ka hordozza a Vénusz transzgént, míg homozigóta állatok esetében ez az arány 100 %-os. Tehát a transzgén örökítésére nincs káros hatással az ivarsejtekben detektált Vénusz fehérje, az a mendeli szabályoknak megfelelően öröklődik.

Továbbá megállapítható, hogy az epitél sejtek líziséből származó transzgén fehérje nem befolyásolja a spermiumok fagyaszthatóságát és a fagyasztást-felolvasztást követő feltételezett termékenyítő képességét.

6.1.1. JAVASLATOK

Érdemes lenne további kutatásokat folytatni a spermatogenezis részletes elemzésére nyúlón, mely a humán fertilitási problémák megértésében is segítséget nyújthatna.

Az SB-CAG-Vénusz transzgénikus nőstények petesejtjei közötti transzgen fehérje eloszlás megfigyelése elősegítené az intercelluláris hidak funkciójával kapcsolatos hipotézisek megerősítését vagy cáfolását. Valamint érdekes lehet, a Vénusz fehérje kifejeződésének vizsgálata, mértékének összehasonlítása, a hím és nőstény állatok ivari fejlődése során.

Az SB-CAG-Vénusz homozigóta bak nyulak spermatogoniális őssejt transzplantációjával Vénusz fehérjét nem kifejező hímek hereszöveibe jól megfigyelhető lehetne a herében kialakuló sejt közötti hidak kialakulása, a sejtek közötti kapcsolatok és akár az intercelluláris hidak funkciója.

6.2. TEJ, KÖNNY, ÉS NYÁLMINTÁK VIZSGÁLATI EREDMÉNYEINEK MEGVITATÁSA

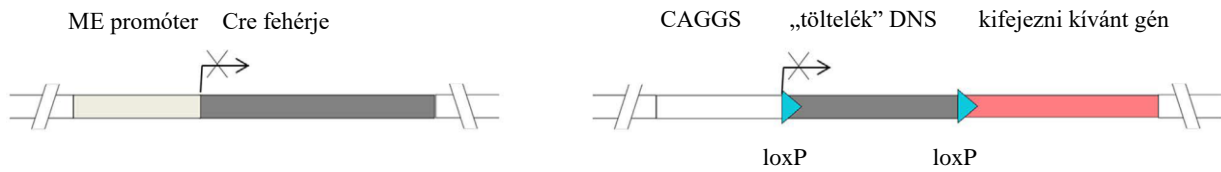
Az SB-CAG-Vénusz transzgénikus nyulak tejének mindhárom frakciójából (savó, zsír, kazein) kimutattuk a transzgénikus fehérje jelenlétét. Eredményeinket alátámasztják az azonos konstrukcióval létrehozott sertéseknél leírtakat (Garrels *et al.*, 2011b), viszont sertéseknél a zsírfrakció csak csökkentett mennyiségű Vénusz fehérjét tartalmazott, mCherry SB-CAG konstrukcióval létrehozott, sertéseknél ugyancsak hasonló eredményeket kaptak a tejet vizsgálva (Mukherjee *et al.*, 2016). Eredményeinkre valamint Mukherjee és munkatársai eredményeire támaszkodva elmondható, hogy a szekréciós szignál peptidet nem tartalmazó CAG promóter szabályozta konstrukciókkal létrehozott transzgénikus állatok expressziós mintázata a tejben fajspecifikus különbségeket mutat, melynek oka lehet a tejben előforduló különböző szomatikus sejtszám, és sejtípus eloszlás (Boutinaud és Jammes, 2002). Szarvasmarhában az SCC szám $0,075 \times 10^6$ sejt/ml melyhez nagyon alacsony hámsejtszám és hozzávetőleg 61% makrofág párosul (Boutinaud és Jammes, 2002). Nyúlban a teljes szomatikus sejtszám $0,5-1 \times 10^6$ sejt/ml, hasonlóan a sertéshez (1×10^6 sejt/ml), amiből az epitél eredetű sejtek aránya 60-90% (Le Jan, 1996).

Az SB-CAG-Vénusz transzgénikus állatok külső elválasztású apokrin és merokrin mirigyei által termelt biológiai folyadékaiban megjelenő rekombináns Vénusz fehérje egy új lehetőségét vetíti előre a terápiás fehérje termelésnek transzgénikus állatokban. A Vénusz riporter fehérje expressziója a citoplazmára korlátozódik ezért a transzgénikus fehérje nem megy át a poszt-transzlációs módosításokon, továbbá a fehérje a megszokott szekréciós útvonalon sem megy át, mivel a konstrukció nem tartalmazott szekréciós szignál peptidet sem. Ez akár a termelődő rekombináns fehérje előnye is lehet. A szövetspecifikus promóter irányítása alatt termelődő rekombináns fehérje a transzgénikus állati rendszerben normál esetben átmegegy a poszt-transzlációs módosításokon, de vannak esetek, mikor ezek a módosítások, nem tökéletesen mennek végbe. Például transzgénikus sertésekben a rekombináns humán C (rhPC) fehérje és a rekombináns

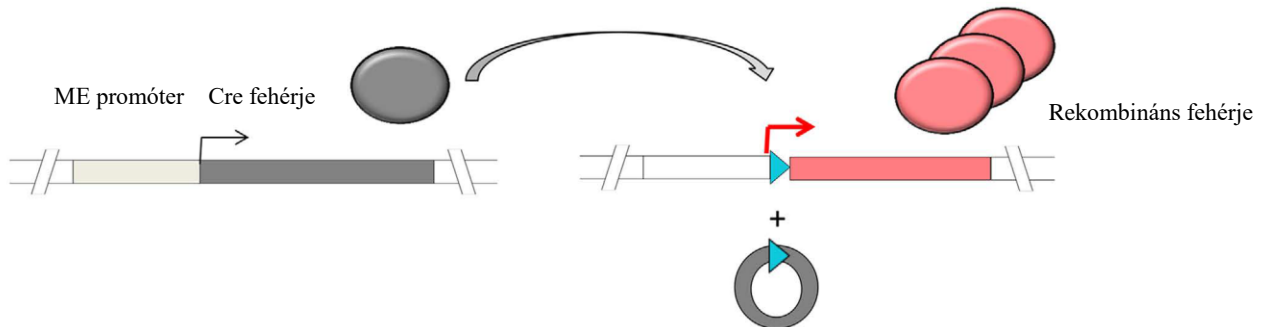
humán IX véralvadási faktor (rhFIX), melyek esszenciális γ -karboxilációja, a savó savas fehérje gén promóter vezérelte konstrukció hatására különbözőképpen ment végbe (Van Cott *et al.*, 1999). β -Kazein promóter irányította konstrukcióval létrehozott humán antithrombint termelő transzgénikus kecskéknél is megfigyelték a glikozilációs folyamat heterogenitását (Zhou *et al.*, 2005). A nem tökéletesen lezajló poszt-transzlációs módosítások károsíthatják, a rekombináns fehérje aktivitását, és csökkenthetik annak minőségét, immunogenitását.

A rendszer finomítható egy Cre rekombináns rendszerrel kombinálva, ez fontos lehetőség azokban az esetekben, ha a rekombináns fehérje kifejeződése csak specifikusan kívánatos. Az emlő specifikus promóterrel irányított konstrukcióba beépített Cre rekombináns és a másik CAGGS promóterrel vezérelt konstrukcióba épített loxP kazetta teszi lehetővé a specifikus gén kifejeződést, a magas transzgén aktivitásért pedig a CAGGS promóter felel (24. ábra). Az új rendszer akár egy kazettára is kombinálható, vagy akár bináris megközelítésben is használható (Mukherjee *et al.*, 2016).

Nem emlő eredetű epitél sejt



Emlő epitél sejt



24. ábra: A rekombináns fehérjék magas szintű specifikus kifejeződése Cre, LoxP rekombináns bináris rendszerben, CAGGS promóter irányítása alatt. **Forrás:** (Mukherjee *et al.*, 2016)

Western blot analízissel megerősítettük különböző korú SB-CAG-Vénusz heterozigóta és homozigóta állatok könnyében és nyálában a fluoreszcens riporter fehérje jelenlétét. Az általunk alkalmazott módszerekkel kapott eredményeink alapján eredményeink bizonyítják, hogy a heterozigóta és homozigóta állatok mintájában eltér a transzgenikus fehérje koncentrációja, de független az, az állatok korától valamint a mintavétel idejétől.

A könny és nyál mintákban kifejeződő rekombináns fehérje jelenléte, CAG promóter irányítása alatt, azért nagy jelentőségű, mert igen nehéz jól működő specifikus promótereket találni. Ezen eredményeink alapján ez egy igen jó rendszer lehet, ha például könnyben szeretnék fehérjét termeltetni, hiszen a rekombináns fehérje a CAG általános promóter irányította konstrukcióval is jól szekretálódik.

6.2.1. JAVASLATOK

SB-CAG-Vénusz transzgenikus állatok expressziós mintázatának jellemzését szeretnénk folytatni a vér és a vizelet vizsgálatával.

Érdemes lenne, más általános promóterrel létrehozott transzgénikus nyúlvonalon vizsgálni a rekombináns fehérje jelenlétét a különböző biológiai folyadékokban, továbbá a rendszert valóbban átültetni a gyakorlatba, például azon terápiás fehérjék esetében, melyeknél a poszt-transzlációs módosítások végbe menetele nem kívánatos.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A nyúl a gyakran használt laboratóriumi állataink egyike, tejében termeltethetünk rekombináns fehérjéket is. A szövetspecifikus promóterek alkalmazásának köszönhetően ezek a rekombináns fehérjék átesnek a poszt-transzlációs módosításokon, bár bizonyos esetekben ezek nem tökéletesen játszódnak le, ezzel gyengítve a terápiás fehérje hatékonyságát és minőségét.

Munkám célja volt a csoportunk által már korábban létrehozott SB-CAG-Vénusz transzgénikus nyúl vonal részletes expressziós vizsgálata. A riporterként kifejező transzgénikus állatok létrehozásával lehetőség nyílik többek között, a fehérjék nyomon követésére is (Murakami és Kobayashi, 2012). A leggyakrabban használt általános promóter a CAG, mely egy szintetikusan előállított magas expressziót biztosító promóter.

Az additív transzgenezis hatékony módja a transzpozonok alkalmazása, a Sleeping Beauty transzpozon a *Tc1/mariner* szuperfamilia egy inaktiválódott elemekből rekonstruált tagja (Ivics *et al.*, 1997). Az általam vizsgált SB transzpozon technikával létrehozott Vénusz fluoreszcens fehérjét kifejező nyúl vonal heterozigóta hím egyedeknek ondó mintájában, már a makroszkópos vizsgálatok alkalmával tapasztalható volt a zöld fluoreszcens fehérje jelenléte. Flow cytometriás vizsgálataink alkalmával bizonyítottuk, hogy a heterozigóta egyedek minden egyes spermiuma a homozigóta egyedekével megegyező módon hordozza a Vénusz riporter fehérjét, csupán intenzitásukban különböznek egymástól. Konfokális mikroszkópiával megállapítottuk, hogy a spermiumok poszt-akroszómális részén, nyaki részén, valamint a farki részen detektálható a Vénusz fluorofor fehérje. Western blot analízissel megerősítettük a transzgénikus fehérje jelenlétét a spermiumsejtekben, és a szemínális plazmában. Vénusz transzgen specifikus mRNS jelet a spermiumokban nem tudtuk kimutatni. Immunhisztológiával a fejlődő hímivarsejtek között, TEX14 fehérje jelenlétét detektáltuk, mely az intercelluláris hidak marker fehérjéje. Vizsgálataink során az SB-CAG-Vénusz heterozigóta állatok spermium sejtjei között tapasztalt genotípus független egyenletes Vénusz fehérje eloszlás bizonyította a sejtek közötti hidak funkciójára nyúl fajban.

Azonos módszerekkel vizsgáltuk ugyanazon SB-CAG-Vénusz konstrukcióval létrehozott transzgénikus bak nyulak és három független vonalhoz tartozó egerek spermium és hereszövet mintáit. Az egerek mellékhere eredetű spermium mintáiban nem detektáltunk specifikus Vénusz fehérje expressziót, ellentétben a nyulaknál tapasztaltakkal. Amely megegyezett az irodalomban leírt, ugyanezzel az SB-CAG-Vénusz konstrukcióval létrehozott, sertés spermiumnál megfigyelt egyenletes transzgénikus fehérje eloszlással (Garrels *et al.*, 2016a).

Az egér szövetmetszeti képeken a spermatidákban és a spermidákban nem tapasztaltunk Vénusz specifikus jelet, míg a szomatikus sejtek esetében, a nyúl és az egér szöveti metszeteken nagyon erős transzgen aktivitás van pl. a Leydig- féle sejtekben vagy a simaizom sejtekben. Az egerektől eltérően a nyulaknál a spermatogenezis teljes folyamatában egyenletes a Vénusz fehérje szintje az ivarsejtekben.

A szomatikus sejtekben előforduló azonos transzgen expressziós mintázatot, már korábban megfigyelték SB-CAG-Vénusz konstrukcióval létrehozott egereknél, patkányoknál, nyulaknál, sertéseknél, többségük CAG promóter függő riportergén kifejeződési mintázatot mutatott (Garrels *et al.*, 2016b). A spermiumoknál és a here, mellékhere szövetmetszeti képeken tapasztalt fajok közötti különbségek arra utalnak, hogy a terminálisan differenciált spermiumok kivételt jelenthetnek az SB transzgenikus fajok szomatikus szöveteiben megfigyelt hasonló Vénusz riportergén expressziós mintázattól. Ez következhet a CAG promóter szabályozta konstrukcióból, amit fajonként különböző transzaktivációs faktorok vezérelnek illetve a spermatogenezis faji sajátosságaiából.

Vizsgáltuk a Vénusz fehérje ektópikus kifejeződésének hatását a nyúl spermiumokra illetve azok termékenyítő képességére. Bíraltuk az SB-CAG-Vénusz heterozigóta és homozigóta bakok ivarsejtjeinek motilitását valamint a feltételezett termékenyítő képességüket, néztük továbbá a fagyaszthatóságot, mely tulajdonságokban nem tértek el a vad típusú állatok mintáitól. A bakokat négy generáción át használtuk mesterséges termékenyítésekhez, nem tapasztaltuk sem a termékenyítő képesség, sem az alom méret csökkenését.

Megállapítottuk, hogy a Vénusz riportergént kifejező nyúl létrehozásánál használt, CAG promóter által irányított szekréciós szignál peptidet nem tartalmazó konstrukció, a rekombináns fehérje megjelenését okozza a tejben. Makroszkópos vizsgálatokkal, és Western blot analízissel bizonyítottuk, hogy az SB-CAG-Vénusz heterozigóta, és homozigóta nőstény nyulak tejének mindhárom frakciójában (savó, zsír, kazein) jelen van a transzgenikus fehérje. Az azonos konstrukcióval létrehozott sertések tejében is kimutatták a Vénusz fehérjét, habár a sertés tejsírfrakcióban kisebb mennyiségű rekombináns fehérje volt kimutatható, mint a nyulak esetében (Garrels *et al.*, 2011b), az mCherry riportergént kifejezős Sleeping Beauty transzpozon technikával, és CAG promótert tartalmazó konstrukcióval létrehozott, sertések tejét vizsgálva ugyancsak hasonló eredményeket kaptak (Mukherjee *et al.*, 2016). Ezek alapján megállapítható, hogy a CAG promóter által irányított konstrukció riportergén kifejeződési mintázata a tejben fajspecifikus különbségeket mutat.

Az emlőszövet vizsgálati eredményeiből kiderült, hogy a Vénusz fehérje citoplazmatikus elhelyezkedést mutat, azaz a tejben megjelenő rekombináns reporter fehérje az epitél sejtekből

ered. Azaz a tejben megjelenő Vénusz fehérje fajspecifikus különbségei akár erre is visszavezethetőek, vagyis a fajok közötti eltérő szomatikus sejtszám (SCC), és sejttípus eloszlás következménye is lehet.

További biológiai folyadékokban is vizsgáltuk a Vénusz fehérje kifejeződését. Bizonyítottuk, hogy a könny és nyálmintákban valóban jelen van a fluoreszcens Vénusz fehérje, továbbá, koncentrációja eltér a heterozigóta és homozigóta állatokban, de független az állat korától valamint a mintavétel idejétől.

8. SUMMARY

Rabbit is a frequently used laboratory animal model and it is possible to produce recombinant proteins in their milk. Due to the use of tissue-specific promoters, these recombinant proteins pass through post-translational modifications, although in some cases incomplete modifications cause low quality/quantity of the therapeutic proteins.

The objective of my work was studying the detailed expression analysis of the SB-CAG Venus transgenic rabbit line that had already been created in our laboratory (Katter *et al.*, 2013). Reporter gene expressing transgenic animals are useful to track different proteins (Murakami and Kobayashi, 2012). The most frequently used general promoter is CAG, which is a synthetic promoter providing high level of expression.

An effective way of additive transgenesis is the use of transposons like Sleeping Beauty which is a member of the *Tc1/mariner* superfamily reconstructed from inactivated elements (Ivics *et al.*, 1997).

The presence of the green fluorescent protein was detected in the semen samples taken from SB-CAG Venus heterozygous males. The flow cytometric studies proved that each spermatozoon of heterozygous individuals carries the Venus reporter protein similarly to homozygous cells, only differing in terms of their intensity. Venus fluorophore protein can be detected in the post-acrosoma part of the sperms, in the neck and in the tail parts by Confocal microscopy. Western blot analysis confirmed the presence of the fluorescent protein in the sperm cells and in the seminal plasma. Venus specific mRNA signal was not detected in the spermatozoa.

We have shown that the developing sperms produce TEX14 protein. TEXT14 is a marker protein of the intercellular bridges. We have verified genotype-independent, uniform distribution of the SB-CAG Venus protein amongst the sperm cells of heterozygous animals supporting the functional presence of intercellular bridges in rabbits. spermatogenesis.

We have tested the sperm- and testicular expression of SB-CAG Venus in three independent lines of transgenic mice created with the same transgene and technique. We have not detected specific Venus protein expression in the epididymic sperm-samples contrary to rabbit's and pig's semen samples which showed uniform distribution of the fluorescent protein. (Garrels *et al.*, 2016a). Venus-protein is consistently present in the gametes of rabbits throughout the entire process of spermatogenesis. Contrary to this Venus-specific signal was not found in the spermatids and spermiids, of transgenic mice whereas somatic cells showed very strong transgenic activity e.g. in the Leydig- or smooth muscle cells.

Similar expression pattern of the Venus reporter was found in somatic tissues of transgenic mice, rats, rabbits and swine created with the SB-CAG Venus construct. Although most of them indicated a CAG promoter-dependent reporter gene expression pattern (Garrels *et al.*, 2016b). We have analyzed the interspecies expression differences in sperm cells, testicular, and epididymal tissues of transgenic animals. CAG promoter, which is regulated differently by the trans-acting factors in different species reflects species-specific aspects of spermatogenesis.

The effects of the expression of the Venus-protein on rabbit sperm cells and their fertility were examined. The motility of the sperm cells of heterozygous and homozygous bucks, together with their supposed ability of fertility and freezability were also assessed. These characteristics did not deviate from the patterns provided by wild type animals. The bucks were used for artificial insemination for four generations, and no decrease in fertility or litter size were detected.

It has been found that the Venus protein, without a secretory signal peptide was expressed in the rabbit milk. Macroscopic examinations and Western blot analysis demonstrated that the SB-CAG Venus transgenic protein is present in all three fractions (whey, fat, casein) of the milk of both heterozygous and homozygous female rabbits. The Venus protein was also found in the milk of pigs created with the same construct, although less recombinant protein could be detected in the milk fat fraction of the pig milk than in the case of rabbits (Garrels *et al.*, 2011a). Examination of the milk of pigs created with the Sleeping Beauty transposon system expressing the mCherry reporter gene and the construct containing the CAG promoter has also shown similar results (Mukherjee *et al.*, 2016). It can be concluded that the reporter gene expression pattern of the CAG promoter-directed construct shows species-specific differences in the milk.

We have observed the cytoplasmic localisation of the Venus protein in the mammary gland. It means that the recombinant protein in the milk originated from the epithel cells. The species-specific differences of the Venus protein in the milk maybe the result of the different somatic cells count and cell type distribution of the different species.

The expression of the Venus protein was also studied in further biological fluids. It was demonstrated that the fluorescent Venus protein is really present in the tear and saliva samples, and its concentration differs in heterozygous and homozygous animals, but it is independent of the age of the animals and did not show diurnal changes.

9. MELLÉKLETEK

9.1. FELHASZNÁLT IRODALOM

- Aguirre, A., Castro-Palomino, N., De la Fuente, J. and Ovidio Castro, F.O. (1998), “Expression of human erythropoietin transgenes and of the endogenous WAP gene in the mammary gland of transgenic rabbits during gestation and lactation.”, *Transgenic Research*, Vol. 7 No. 4, pp. 311–7.
- Alexopoulou, A.N., Couchman, J.R. and Whiteford, J.R. (2008), “The CMV early enhancer/chicken β actin (CAG) promoter can be used to drive transgene expression during the differentiation of murine embryonic stem cells into vascular progenitors”, *BMC Cell Biology*, Vol. 9, pp. 1–11.
- “Atryn (Antithrombin (Recombinant)) FDA Approval History - Drugs.com”. (n.d.). , available at: <https://www.drugs.com/history/atryn.html> (accessed 6 August 2018).
- Baranyi, M., Brignon, G., Anglade, P. and Ribadeau-Dumas, B. (1995), “New data on the proteins of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) milk.”, *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, Vol. 111 No. 3, pp. 407–15.
- Baranyi, M., Hiripi, L., Szabó, L., Catunda, A.P., Harsányi, I., Komáromy, P. and Bosze, Z. (2007), “Isolation and some effects of functional, low-phenylalanine kappa-casein expressed in the milk of transgenic rabbits.”, *Journal of Biotechnology*, Vol. 128 No. 2, pp. 383–92.
- Barbas, J.P. and Mascarenhas, R.D. (2009), “Cryopreservation of domestic animal sperm cells”, *Cell and Tissue Banking*, Vol. 10 No. 1, pp. 49–62.
- Belay, E., Mátrai, J., Acosta-Sanchez, A., Ma, L., Quattrocelli, M., Mátés, L., Sancho-Bru, P., et al. (2010), “Novel hyperactive transposons for genetic modification of induced pluripotent and adult stem cells: a nonviral paradigm for coaxed differentiation.”, *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, Vol. 28 No. 10, pp. 1760–71.
- Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S. and Nekrasov, V. (2013), “Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system.”, *Plant Methods*, Vol. 9 No. 1, p. 39.
- Benjamin, B., Yves, B., Corinne, A.-G., Yves, B., Augé-Gouillou, C. and Corinne, A.-G. (2007), “Assembly of the Tc1 and mariner transposition initiation complexes depends on the origins

of their transposase DNA binding domains”, *Genetica*, Vol. 130 No. 2, pp. 105–120.

Bijvoet, A.G., Van Hirtum, H., Kroos, M.A., Van de Kamp, E.H., Schoneveld, O., Visser, P., Brakenhoff, J.P., et al. (1999), “Human acid alpha-glucosidase from rabbit milk has therapeutic effect in mice with glycogen storage disease type II.”, *Human Molecular Genetics*, Vol. 8 No. 12, pp. 2145–53.

Blaby-Haas, C.E., Page, M.D. and Merchant, S.S. (2018), “Using YFP as a Reporter of Gene Expression in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*”, *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, Vol. 1755, pp. 135–148.

Blasberg, R.G. and Tjuvajev, J.G. (2003), “Molecular-genetic imaging: current and future perspectives”, *Journal of Clinical Investigation*, Vol. 111 No. 11, pp. 1620–1629.

Bodrogi, L., Brands, R., Raaben, W., Seinen, W., Baranyi, M., Fiechter, D. and Bősze, Z. (2006), “High Level Expression of Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase in the Milk of Transgenic Rabbits”, *Transgenic Research*, Vol. 15 No. 5, pp. 627–636.

Bősze, Z., Baranyi, M. and Whitelaw, C.B.A. (2008), “Producing recombinant human milk proteins in the milk of livestock species.”, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 606, pp. 357–93.

Bősze, Z. and Hiripi, L. (2012), “Recombinant Protein Expression in Milk of Livestock Species”, *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, Vol. 824, pp. 629–641.

Bősze, Z., Hiripi, L., Carnwath, J.W. and Niemann, H. (2003), “The transgenic rabbit as model for human diseases and as a source of biologically active recombinant proteins.”, *Transgenic Research*, Vol. 12 No. 5, pp. 541–53.

Bősze, Z., Major, P., Baczkó, I., Odening, K.E., Bodrogi, L., Hiripi, L. and Varró, A. (2016), “The potential impact of new generation transgenic methods on creating rabbit models of cardiac diseases”, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, Vol. 121 No. 2, pp. 123–130.

Boutinaud, M. and Jammes, H. (2002), “Potential uses of milk epithelial cells: a review.”, *Reproduction, Nutrition, Development*, Vol. 42 No. 2, pp. 133–47.

Braun, R.E., Behringer, R.R., Peschon, J.J., Brinster, R.L. and Palmiter, R.D. (1989), “Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid”, *Nature*, Vol. 337 No. 6205, pp. 373–376.

Brem, G., Hartl, P., Besenfelder, U., Wolf, E., Zinovieva, N. and Pfaller, R. (1994), “Expression

- of synthetic cDNA sequences encoding human insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the mammary gland of transgenic rabbits.”, *Gene*, Vol. 149 No. 2, pp. 351–5.
- 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*, Vol. 27 No. 1 Pt 2, pp. 223–31.
- Brinster, R.L., Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Yagle, M.K. and Palmiter, R.D. (1985), “Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 82 No. 13, pp. 4438–42.
- Bühler, T.A., Bruyère, T., Went, D.F., Stranzinger, G. and Bürki, K. (1990), “Rabbit beta-casein promoter directs secretion of human interleukin-2 into the milk of transgenic rabbits.”, *Bio/Technology (Nature Publishing Company)*, Vol. 8 No. 2, pp. 140–3.
- Burgos, M.H. and Fawcett, D.W. (1955), “Studies on the fine structure of the mammalian testis. I. Differentiation of the spermatids in the cat (*Felis domestica*).”, *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, Vol. 1 No. 4, pp. 287–300.
- Capy, P., Langin, T., Higuier, D., Maurer, P. and Bazin, C. (1997), “Do the integrases of LTR-retrotransposons and class II element transposases have a common ancestor?”, *Genetica*, Vol. 100 No. 1–3, pp. 63–72.
- Carpentier, C.E., Schreifels, J.M., Aronovich, E.L., Carlson, D.F., Hackett, P.B. and Nesmelova, I. V. (2014), “NMR structural analysis of Sleeping Beauty transposase binding to DNA.”, *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, Vol. 23 No. 1, pp. 23–33.
- Catunda Lemos, A.P., Cervenak, J., Bender, B., Hoffmann, O.I., Baranyi, M., Kerekes, A., Farkas, A., et al. (2012), “Characterization of the rabbit neonatal Fc receptor (FcRn) and analyzing the immunophenotype of the transgenic rabbits that overexpresses FcRn.”, edited by Boudinot, P. *PLoS One*, Vol. 7 No. 1, p. e28869.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. and Prasher, D.C. (1994), “Green fluorescent protein as a marker for gene expression.”, *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 263 No. 5148, pp. 802–5.
- Chalopin, D., Naville, M., Plard, F., Galiana, D. and Volff, J.N. (2015), “Comparative analysis of transposable elements highlights mobilome diversity and evolution in vertebrates”, *Genome Biology and Evolution*, available at: <https://doi.org/10.1093/gbe/evv005>.

- Chen, C.-H., Puliafito, A., Cox, B.D., Primo, L., Fang, Y., Di Talia, S. and Poss, K.D. (2016), “Multicolor Cell Barcoding Technology for Long-Term Surveillance of Epithelial Regeneration in Zebrafish”, *Developmental Cell*, Vol. 36 No. 6, pp. 668–680.
- Chrenek, P., Ryban, L., Vetr, H., Makarevich, A. V, Uhrin, P., Paleyanda, R.K. and Binder, B.R. (2007), “Expression of recombinant human factor VIII in milk of several generations of transgenic rabbits.”, *Transgenic Research*, Vol. 16 No. 3, pp. 353–61.
- Commissioner, O. of the. (n.d.). “For Consumers - FDA Has Determined That the AquAdvantage Salmon is as Safe to Eat as Non-GE Salmon”,
<https://www.fda.gov/ForConsumers/ucm472487.htm>, available at:
<https://www.fda.gov/ForConsumers/ucm472487.htm>.
- Van Cott, K.E., Butler, S.P., Russell, C.G., Subramanian, A., Lubon, H., Gwazdauskas, F.C., Knight, J., et al. (1999), “Transgenic pigs as bioreactors: a comparison of gamma-carboxylation of glutamic acid in recombinant human protein C and factor IX by the mammary gland.”, *Genetic Analysis : Biomolecular Engineering*, Vol. 15 No. 3–5, pp. 155–60.
- Coulibaly, S., Besenfelder, U., Fleischmann, M., Zinovieva, N., Grossmann, A., Wozny, M., Bartke, I., et al. (1999), “Human nerve growth factor beta (hNGF-beta): mammary gland specific expression and production in transgenic rabbits.”, *FEBS Letters*, Vol. 444 No. 1, pp. 111–6.
- Coulibaly, S., Besenfelder, U., Miller, I., Zinovieva, N., Lassnig, C., Kotler, T., Jameson, J.L., et al. (2002), “Expression and characterization of functional recombinant bovine follicle-stimulating hormone (boFSHalpha/beta) produced in the milk of transgenic rabbits.”, *Molecular Reproduction and Development*, Vol. 63 No. 3, pp. 300–8.
- Cousens, C., Carver, A.S., Wilmut, I., Colman, A., Garner, I. and O’Neill, G.T. (1994), “Use of PCR-based methods for selection of integrated transgenes in preimplantation embryos.”, *Molecular Reproduction and Development*, Vol. 39 No. 4, pp. 384–91.
- Daubner, S.C., Astorga, A.M., Leisman, G.B. and Baldwin, T.O. (1987), “Yellow light emission of *Vibrio fischeri* strain Y-1: purification and characterization of the energy-accepting yellow fluorescent protein.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 84 No. 24, pp. 8912–6.
- Derbyshire, K.M. and Grindley, N.D. (1986), “Replicative and conservative transposition in bacteria.”, *Cell*, Vol. 47 No. 3, pp. 325–7.

- Devinoy, E., Hubert, C., Jolivet, G., Thepot, D., Clergue, N., Desaleux, M., Dion, M., et al. (1988), "Recent data on the structure of rabbit milk protein genes and on the mechanism of the hormonal control of their expression.", *Reproduction, Nutrition, Developpement*, Vol. 28 No. 4B, pp. 1145–64.
- Dhawale, A. and Bhalla, U.S. (2008), "The network and the synapse: 100 years after Cajal.", *HFSP Journal*, HFSP Publishing., Vol. 2 No. 1, pp. 12–6.
- DiTullio, P., Cheng, S.H., Marshall, J., Gregory, R.J., Ebert, K.M., Meade, H.M. and Smith, A.E. (1992), "Production of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the milk of transgenic mice.", *Bio/Technology (Nature Publishing Company)*, Vol. 10 No. 1, pp. 74–7.
- Doak, T.G., Doerder, F.P., Jahn, C.L. and Herrick, G. (1994), "A proposed superfamily of transposase genes: transposon-like elements in ciliated protozoa and a common "D35E" motif.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 91 No. 3, pp. 942–6.
- Dragin, S., Chrastinova, L., Makarevich, A. and Chrenek, P. (2005), "Production of recombinant human protein C in the milk of transgenic rabbits from the F3 generation.", *Folia Biologica*, Vol. 53 No. 3–4, pp. 129–32.
- Duranthon, V., Beaujean, N., Brunner, M., Odening, K.E., Santos, A.N., Kacs Kovics, I., Hiripi, L., et al. (2012), "On the emerging role of rabbit as human disease model and the instrumental role of novel transgenic tools", *Transgenic Research*, Vol. 21 No. 4, pp. 699–713.
- Dyck, M.K., Gagné, D., Ouellet, M., Sénéchal, J.-F., Bélanger, E., Lacroix, D., Sirard, M.-A., et al. (1999), "Seminal vesicle production and secretion of growth hormone into seminal fluid", *Nature Biotechnology*, Vol. 17 No. 11, pp. 1087–1090.
- Dyck, M.K., Lacroix, D., Pothier, F. and Sirard, M.-A. (2003), "Making recombinant proteins in animals--different systems, different applications.", *Trends in Biotechnology*, Vol. 21 No. 9, pp. 394–9.
- Dym, M. and Fawcett, D.W. (1971), "Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis.", *Biology of Reproduction*, Vol. 4 No. 2, pp. 195–215.
- Echelard, Y. (1996), "Recombinant protein production in transgenic animals.", *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 7 No. 5, pp. 536–40.

- Emmons, S.W., Yesner, L., Ruan, K.S. and Katzenberg, D. (1983), “Evidence for a transposon in *Caenorhabditis elegans*.”, *Cell*, Vol. 32 No. 1, pp. 55–65.
- Evans, M.J. and Kaufman, M.H. (1981), “Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.”, *Nature*, Vol. 292 No. 5819, pp. 154–6.
- Fan, J. and Watanabe, T. (2003), “Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models.”, *Pharmacology & Therapeutics*, Vol. 99 No. 3, pp. 261–82.
- Fawcett, D.W., Ito, S. and Slautterback, D. (1959), “The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation.”, *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, Vol. 5 No. 3, pp. 453–60.
- Feschotte, C., Jiang, N. and Wessler, S.R. (2002), “Plant transposable elements: where genetics meets genomics.”, *Nature Reviews. Genetics*, Vol. 3 No. 5, pp. 329–41.
- Feschotte, C. and Pritham, E.J. (2007), “DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes”, *Annual Review of Genetics*, Vol. 41 No. 1, pp. 331–368.
- Flörke, S., Phi-van, L., Müller-Esterl, W., Scheuber, H.P. and Engel, W. (1983), “Acrosin in the spermiogenesis of mammals.”, *Differentiation; Research in Biological Diversity*, Vol. 24 No. 3, pp. 250–6.
- Galet, C., Le Bourhis, C.M., Chopineau, M., Le Griec, G., Perrin, A., Magallon, T., Attal, J., et al. (2001), “Expression of a single betaalpha chain protein of equine LH/CG in milk of transgenic rabbits and its biological activity.”, *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol. 174 No. 1–2, pp. 31–40.
- Garrels, W., Holler, S., Taylor, U., Herrmann, D., Struckmann, C., Klein, S., Barg-Kues, B., et al. (2011a), “Genotype-independent transmission of transgenic fluorophore protein by boar spermatozoa.”, edited by Mueller, F. *PloS One*, Vol. 6 No. 11, p. e27563.
- Garrels, W., Ivics, Z. and Kues, W.A. (2012), “Precision genetic engineering in large mammals”, *Trends in Biotechnology*, Vol. 30 No. 7, pp. 386–393.
- Garrels, W., Mátés, L., Holler, S., Dalda, A., Taylor, U., Petersen, B., Niemann, H., et al. (2011b), “Germline transgenic pigs by Sleeping Beauty transposition in porcine zygotes and targeted integration in the pig genome.”, edited by Wutz, A. *PloS One*, Vol. 6 No. 8, p. e23573.
- Garrels, W., Talluri, T.R., Apfelbaum, R., Carratalá, Y.P., Bosch, P., Pötzsch, K., Grueso, E., et al. (2016b), “One-step multiplex transgenesis via sleeping beauty transposition in cattle”,

- Scientific Reports*, Nature Publishing Group, Vol. 6 No. February, pp. 1–6.
- Garrels, W., Talluri, T.R., Ziegler, M., Most, I., Forcato, D.O., Schmeer, M., Schleef, M., et al. (2016a), “Cytoplasmic injection of murine zygotes with Sleeping Beauty transposon plasmids and minicircles results in the efficient generation of germline transgenic mice”, *Biotechnology Journal*, Vol. 11 No. 1, pp. 178–184.
- Godke, R.A., Sansinena, M. and Youngs, C.R. (2014), *Assisted Reproductive Technologies and Embryo Culture Methods for Farm Animals, Transgenic Animal Technology*, available at:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410490-7.00022-0>.
- Gogvadze, E. and Buzdin, A. (2009), “Retroelements and their impact on genome evolution and functioning”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 66 No. 23, pp. 3727–3742.
- Gordon, J.W. and Ruddle, F.H. (1981), “Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei.”, *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 214 No. 4526, pp. 1244–6.
- 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.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 77 No. 12, pp. 7380–4.
- Gordon, K., Lee, E., Vitale, J.A., Smith, A.E., Westphal, H. and Hennighausen, L. (1992), “Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. 1987.”, *Biotechnology (Reading, Mass.)*, Vol. 24, pp. 425–8.
- Greenbaum, M.P., Iwamori, T., Buchold, G.M. and Matzuk, M.M. (2011), “Germ cell intercellular bridges.”, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol. 3 No. 8, p. a005850.
- Greenbaum, M.P., Yan, W., Wu, M.-H., Lin, Y.-N., Agno, J.E., Sharma, M., Braun, R.E., et al. (2006), “TEX14 is essential for intercellular bridges and fertility in male mice”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 103 No. 13, pp. 4982–4987.
- Guo, G.-Q.G.-Q. and Zheng, G.-C.G.-C. (2004), “Hypotheses for the functions of intercellular bridges in male germ cell development and its cellular mechanisms.”, *Journal of Theoretical Biology*, Vol. 229 No. 1, pp. 139–46.
- Guo, Y., Zhang, Y. and Hu, K. (2018), “Sleeping Beauty transposon integrates into non-TA dinucleotides.”, *Mobile DNA*, Vol. 9 No. 1, p. 8.
- Haglund, K., Nezis, I.P. and Stenmark, H. (2011), “Structure and functions of stable intercellular bridges formed by incomplete cytokinesis during development.”, *Communicative &*

Integrative Biology, Vol. 4 No. 1, pp. 1–9.

- Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad, C.E., Wall, R.J., Bolt, D.J., Ebert, K.M., Palmiter, R.D., et al. (1985), “Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection”, *Nature*, Vol. 315 No. 6021, pp. 680–683.
- Han, Z.-S., Li, Q.-W., Zhang, Z.-Y., Yu, Y.-S., Xiao, B., Wu, S.-Y., Jiang, Z.-L., et al. (2008), “Adenoviral vector mediates high expression levels of human lactoferrin in the milk of rabbits.”, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 18 No. 1, pp. 153–9.
- Hennighausen, L. (1990), “The mammary gland as a bioreactor: production of foreign proteins in milk.”, *Protein Expression and Purification*, Vol. 1 No. 1, pp. 3–8.
- Hiripi, L., Makovics, F., Halter, R., Baranyi, M., Paul, D., Carnwath, J.W., Bösze, Z., et al. (2003), “Expression of Active Human Blood Clotting Factor VIII in Mammary Gland of Transgenic Rabbits”, *DNA and Cell Biology*, Vol. 22 No. 1, pp. 41–45.
- Hiripi, L., Negre, D., Cosset, F.-L., Kvell, K., Czömpöly, T., Baranyi, M., Gócza, E., et al. (2010), “Transgenic rabbit production with simian immunodeficiency virus-derived lentiviral vector”, *Transgenic Research*, Vol. 19 No. 5, pp. 799–808.
- Hoagland, H. and Pincus, G. (1942), “Revival of mammalian sperm after immersion in liquid nitrogen”, *The Journal of General Physiology*, Vol. 25 No. 3, pp. 337–44.
- 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 : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, Vol. 13 No. 1, pp. 59–66.
- Hofmann, A., Kessler, B., Ewerling, S., Weppert, M., Vogg, B., Ludwig, H., Stojkovic, M., et al. (2003), “Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors”, *EMBO Reports*, Vol. 4 No. 11, pp. 1054–1058.
- Hofmann, A., Zakhartchenko, V., Weppert, M., Sebald, H., Wenigerkind, H., Brem, G., Wolf, E., et al. (2004), “Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes.”, *Biology of Reproduction*, Vol. 71 No. 2, pp. 405–9.
- Hogan B., Costantini F. & Lacy E., (1986), “Introduction of new genetic information into the developing mouse embryo”, *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 152–203.
- Houdebine, L.-M. (2009), “Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals”,

- Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Vol. 32 No. 2, pp. 107–121.
- Van den Hout, H., Reuser, A.J., Vulto, A.G., Loonen, M.C., Cromme-Dijkhuis, A. and Van der Ploeg, A.T. (2000), “Recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk in Pompe patients.”, *Lancet (London, England)*, Vol. 356 No. 9227, pp. 397–8.
- Van den Hout, J.M., Reuser, A.J., de Klerk, J.B., Arts, W.F., Smeitink, J.A. and Van der Ploeg, A.T. (2001), “Enzyme therapy for pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk.”, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, Vol. 24 No. 2, pp. 266–74.
- Van den Hout, J.M.P., Kamphoven, J.H.J., Winkel, L.P.F., Arts, W.F.M., De Klerk, J.B.C., Loonen, M.C.B., Vulto, A.G., et al. (2004), “Long-term intravenous treatment of Pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from milk.”, *Pediatrics*, American Academy of Pediatrics, Vol. 113 No. 5, pp. e448-57.
- Huckins, C. (1971), “The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation.”, *The Anatomical Record*, Vol. 169 No. 3, pp. 533–57.
- Huckins, C. and Oakberg, E.F. (1978), “Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubules, I. The normal testes.”, *The Anatomical Record*, Vol. 192 No. 4, pp. 519–28.
- “Image Lab™ Software | Life Science Research | Bio-Rad”. (n.d.). , available at: <http://www.bio-rad.com/en-hu/product/image-lab-software?ID=KRE6P5E8Z> (accessed 15 October 2018).
- “InStat - graphpad.com”. (n.d.). , available at: <https://www.graphpad.com/scientific-software/instat/> (accessed 31 December 2018).
- Ivics, Z. (2011), “Relics from the Past: Molecular Biology and Genetic Applications of Resurrected DNA Transposons in Vertebrates”, *MTA Akadémiai Doktori Értekezés*, available at: <http://real-d.mtak.hu/407/> (accessed 5 March 2018).
- Ivics, Z., Garrels, W., Mátés, L., Yau, T.Y., Bashir, S., Zidek, V., Landa, V., et al. (2014), “Germline transgenesis in pigs by cytoplasmic microinjection of Sleeping Beauty transposons.”, *Nature Protocols*, Vol. 9 No. 4, pp. 810–27.
- Ivics, Z., Hackett, P.B., Plasterk, R.H. and Izsvák, Z. (1997), “Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells.”, *Cell*, Vol. 91 No. 4, pp. 501–10.

- Ivics, Z., Hiripi, L., Hoffmann, O.I., Mátés, L., Yau, T.Y., Bashir, S., Zidek, V., et al. (2014a), “Germline transgenesis in rabbits by pronuclear microinjection of Sleeping Beauty transposons”, *Nature Protocols*, Vol. 9 No. 4, pp. 794–809.
- Ivics, Z., Hiripi, L., Hoffmann, O.I., Mátés, L., Yau, T.Y., Bashir, S., Zidek, V., et al. (2014b), “Germline transgenesis in rabbits by pronuclear microinjection of Sleeping Beauty transposons”, *Nature Protocols*, Vol. 9 No. 4, pp. 794–809.
- Ivics, Z. and Izsvák, Z. (2015), “Sleeping Beauty Transposition”, *Microbiology Spectrum*, Vol. 3 No. 2, pp. MDNA3-0042-2014.
- Ivics, Z., Izsvák, Z., Minter, A. and Hackett, P.B. (1996), “Identification of functional domains and evolution of Tcl-like transposable elements”, *Genetics*, Vol. 93, pp. 5008–5013.
- Ivics, Z., Mátés, L., Yau, T.Y., Landa, V., Zidek, V., Bashir, S., Hoffmann, O.I., et al. (2014), “Germline transgenesis in rodents by pronuclear microinjection of Sleeping Beauty transposons”, *Nature Protocols*, Vol. 9 No. 4, pp. 773–793.
- Izsvák, Z., Khare, D., Behlke, J., Heinemann, U., Plasterk, R.H. and Ivics, Z. (2002), “Involvement of a bifunctional, paired-like DNA-binding domain and a transpositional enhancer in Sleeping Beauty transposition.”, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 277 No. 37, pp. 34581–8.
- Le Jan, C. (1996), “Cellular components of mammary secretions and neonatal immunity: a review.”, *Veterinary Research*, Vol. 27 No. 4–5, pp. 403–17.
- Jin, Z., Maiti, S., Huls, H., Singh, H., Olivares, S., Mátés, L., Izsvák, Z., et al. (2011), “The hyperactive Sleeping Beauty transposase SB100X improves the genetic modification of T cells to express a chimeric antigen receptor.”, *Gene Therapy*, Vol. 18 No. 9, pp. 849–56.
- Jongen, S.P., Gerwig, G.J., Leeﬂang, B.R., Koles, K., Mannesse, M.L.M., van Berkel, P.H.C., Pieper, F.R., et al. (2007), “N-glycans of recombinant human acid alpha-glucosidase expressed in the milk of transgenic rabbits.”, *Glycobiology*, Vol. 17 No. 6, pp. 600–19.
- Kang, J.H. and Chung, J.-K. (2008), “Molecular-Genetic Imaging Based on Reporter Gene Expression”, *Journal of Nuclear Medicine*, Vol. 49 No. Suppl_2, p. 164S–179S.
- “Kanuma (sebelipase alfa) FDA Approval History - Drugs.com”. (n.d.). , available at: <https://www.drugs.com/history/kanuma.html> (accessed 6 August 2018).
- Katter, K., Geurts, A.M., Hoffmann, O., Mátés, L., Landa, V., Hiripi, L., Moreno, C., et al. (2013), “Transposon-mediated transgenesis, transgenic rescue, and tissue-specific gene

- expression in rodents and rabbits.”, *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, The Federation of American Societies for Experimental Biology, Vol. 27 No. 3, pp. 930–41.
- Kerr, D.E., Liang, F., Bondioli, K.R., Zhao, H., Kreibich, G., Wall, R.J. and Sun, T.T. (1998), “The bladder as a bioreactor: urothelium production and secretion of growth hormone into urine.”, *Nature Biotechnology*, Vol. 16 No. 1, pp. 75–9.
- Kidwell, M.G. and Lisch, D.R. (2001), “Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution.”, *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, Vol. 55 No. 1, pp. 1–24.
- Kirk, D.D., McIntosh, K., Walmsley, A.M. and Peterson, R.K.D. (2005), “Risk analysis for plant-made vaccines.”, *Transgenic Research*, Vol. 14 No. 4, pp. 449–62.
- Kleeman, B., Olsson, A., Newkold, T., Kofron, M., DeLay, M., Hildeman, D. and Grimes, H.L. (2018), “A guide to choosing fluorescent protein combinations for flow cytometric analysis based on spectral overlap”, *Cytometry Part A*, Vol. 93 No. 5, pp. 556–562.
- Koles, K., van Berkel, P.H.C., Pieper, F.R., Nuijens, J.H., Mannesse, M.L.M., Vliegthart, J.F.G. and Kamerling, J.P. (2004), “N- and O-glycans of recombinant human C1 inhibitor expressed in the milk of transgenic rabbits.”, *Glycobiology*, Vol. 14 No. 1, pp. 51–64.
- Korhonen, V.P., Tolvanen, M., Hyttinen, J.M., Uusi-Oukari, M., Sinervirta, R., Alhonen, L., Jauhiainen, M., et al. (1997), “Expression of bovine beta-lactoglobulin/human erythropoietin fusion protein in the milk of transgenic mice and rabbits.”, *European Journal of Biochemistry*, Vol. 245 No. 2, pp. 482–9.
- Kovács, A. and Foote, R.H. (1992), “Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa.”, *Biotechnic & Histochemistry : Official Publication of the Biological Stain Commission*, Vol. 67 No. 3, pp. 119–24.
- Kremers, G.-J., Goedhart, J., van Munster, E.B. and Gadella, T.W.J. (2006), “Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Förster radius.”, *Biochemistry*, Vol. 45 No. 21, pp. 6570–80.
- Kues, W.A. and Niemann, H. (2011), “Advances in farm animal transgenesis”, *Preventive Veterinary Medicine*, Vol. 102 No. 2, pp. 146–156.
- Kulkosky, J., Jones, K.S., Katz, R.A., Mack, J.P. and Skalka, A.M. (1992), “Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among

retroviral/retrotransposon integrases and bacterial insertion sequence transposases.”, *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 12 No. 5, pp. 2331–8.

Lezaun, J. and Porter, N. (2015), “Containment and competition: Transgenic animals in the One Health agenda”, *Social Science and Medicine*, Elsevier Ltd, Vol. 129, pp. 96–105.

Li, X., Ewis, H., Hice, R.H., Malani, N., Parker, N., Zhou, L., Feschotte, C., et al. (2013), “A resurrected mammalian hAT transposable element and a closely related insect element are highly active in human cell culture.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 110 No. 6, pp. E478-87.

Limonta, J.M., Castro, F.O., Martínez, R., Puentes, P., Ramos, B., Aguilar, A., Lleonart, R.L., et al. (1995), “Transgenic rabbits as bioreactors for the production of human growth hormone.”, *Journal of Biotechnology*, Vol. 40 No. 1, pp. 49–58.

Lipiński, D., Jura, J., Kalak, R., Pławski, A., Kala, M., Szalata, M., Jarmuz, M., et al. (2003), “Transgenic rabbit producing human growth hormone in milk.”, *Journal of Applied Genetics*, Vol. 44 No. 2, pp. 165–74.

Lipinski, D., Zeyland, J., Szalata, M., Plawski, A., Jarmuz, M., Jura, J., Korcz, A., et al. (2012), “Expression of human growth hormone in the milk of transgenic rabbits with transgene mapped to the telomere region of chromosome 7q.”, *Journal of Applied Genetics*, Vol. 53 No. 4, pp. 435–42.

Liu, G., Aronovich, E.L., Cui, Z., Whitley, C.B. and Hackett, P.B. (2004), “Excision of Sleeping Beauty transposons: parameters and applications to gene therapy.”, *The Journal of Gene Medicine*, Vol. 6 No. 5, pp. 574–83.

Lois, C., Hong, E.J., Pease, S., Brown, E.J. and Baltimore, D. (2002), “Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors.”, *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 295 No. 5556, pp. 868–72.

Maga, E.A. and Murray, J.D. (1995), “Mammary gland expression of transgenes and the potential for altering the properties of milk.”, *Bio/Technology (Nature Publishing Company)*, Vol. 13 No. 13, pp. 1452–7.

Major, P., Baczkó, I., Hiripi, L., Odening, K.E., Juhász, V., Kohajda, Z., Horváth, A., et al. (2016), “A novel transgenic rabbit model with reduced repolarization reserve: long QT syndrome caused by a dominant-negative mutation of the KCNE1 gene”, *British Journal of Pharmacology*, Vol. 173 No. 12, pp. 2046–2061.

- Makalowski, W. (2003), "GENOMICS: Not Junk After All", *Science*, Vol. 300 No. 5623, pp. 1246–1247.
- March, J.C., Rao, G. and Bentley, W.E. (2003), "Biotechnological applications of green fluorescent protein", *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 62 No. 4, pp. 303–315.
- Martin, G.R. (1981), "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 78 No. 12, pp. 7634–8.
- Massoud, M., Attal, J., Thépot, D., Pointu, H., Stinnakre, M.G., Théron, M.C., Lopez, C., et al. (1996), "The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits.", *Reproduction, Nutrition, Development*, Vol. 36 No. 5, pp. 555–63.
- Massoud, M., Bischoff, R., Dalemans, W., Pointu, H., Attal, J., Schultz, H., Clesse, D., et al. (1991), "Expression of active recombinant human alpha 1-antitrypsin in transgenic rabbits.", *Journal of Biotechnology*, Vol. 18 No. 3, pp. 193–203.
- Mátés, L., Chuah, M.K.L., Belay, E., Jerchow, B., Manoj, N., Acosta-Sanchez, A., Grzela, D.P., et al. (2009), "Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates", *Nature Genetics*, Vol. 41 No. 6, pp. 753–761.
- McCLINTOCK, B. (1950), "The origin and behavior of mutable loci in maize.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, National Academy of Sciences, Vol. 36 No. 6, pp. 344–55.
- McGrew, M.J., Sherman, A., Ellard, F.M., Lillico, S.G., Gilhooley, H.J., Kingsman, A.J., Mitrophanous, K.A., et al. (2004), "Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors", *EMBO Reports*, Vol. 5 No. 7, pp. 728–733.
- McKee, C., Gibson, A., Dalrymple, M., Emslie, L., Garner, I. and Cottingham, I. (1998), "Production of biologically active salmon calcitonin in the milk of transgenic rabbits.", *Nature Biotechnology*, Vol. 16 No. 7, pp. 647–51.
- McKnight, R.A., Shamay, A., Sankaran, L., Wall, R.J. and Hennighausen, L. (1992), "Matrix-attachment regions can impart position-independent regulation of a tissue-specific gene in transgenic mice.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 89 No. 15, pp. 6943–7.

- Meng, X., Noyes, M.B., Zhu, L.J., Lawson, N.D. and Wolfe, S.A. (2008), “Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases”, *Nature Biotechnology*, Vol. 26 No. 6, pp. 695–701.
- Mikus, T., Poplstein, M., Sedláková, J., Landa, V., Jeníkova, G., Trefil, P., Lidický, J., et al. (2004), “Generation and phenotypic analysis of a transgenic line of rabbits secreting active recombinant human erythropoietin in the milk.”, *Transgenic Research*, Vol. 13 No. 5, pp. 487–98.
- Miller, W.J. and Capy, P. (2004), “Mobile Genetic Elements as Natural Tools for Genome Evolution”, *Mobile Genetic Elements*, Vol. 260, Humana Press, New Jersey, pp. 001-020.
- Moens, P.B. and Hugenholtz, A.D. (1975), “The arrangement of germ cells in the rat seminiferous tubule: an electron-microscope study.”, *Journal of Cell Science*, Vol. 19 No. 3, pp. 487–507.
- Morales, C.R., Lefrancois, S., Chennathukuzhi, V., El-Alfy, M., Wu, X., Yang, J., Gerton, G.L., et al. (2002), “A TB-RBP and Ter ATPase complex accompanies specific mRNAs from nuclei through the nuclear pores and into intercellular bridges in mouse male germ cells.”, *Developmental Biology*, Vol. 246 No. 2, pp. 480–94.
- Moscou, M.J. and Bogdanove, A.J. (2009), “A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors.”, *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 326 No. 5959, p. 1501.
- Mukherjee, A., Garrels, W., Talluri, T.R., Tiedemann, D., Bosze, Z., Ivics, Z. and Kues, W.A. (2016), “Expression of Active Fluorophore Proteins in the Milk of Transgenic Pigs Bypassing the Secretory Pathway”, *Scientific Reports*, Vol. 6 No. 1, p. 24464.
- Munoz-Lopez, M. and Garcia-Perez, J. (2010), “DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics”, *Current Genomics*, Vol. 11 No. 2, pp. 115–128.
- Murakami, T. and Kobayashi, E. (2012), “GFP-Transgenic Animals for In Vivo Imaging: Rats, Rabbits, and Pigs”, *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, Vol. 872, pp. 177–189.
- Mussolino, C., Morbitzer, R., Lütge, F., Dannemann, N., Lahaye, T. and Cathomen, T. (2011), “A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity”, *Nucleic Acids Research*, Vol. 39 No. 21, pp. 9283–9293.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K. and Miyawaki, A. (2002), “A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications.”, *Nature Biotechnology*, Vol. 20 No. 1, pp. 87–90.

- Nagy, S., Házás, G., Papp, A.B., Iváncsics, J., Szász, F., Szász, F., Kovács, A., et al. (1999), “Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy.”, *Theriogenology*, Vol. 52 No. 7, pp. 1153–9.
- Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., et al. (1996), “In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector.”, *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 272 No. 5259, pp. 263–7.
- Neupert, J., Karcher, D. and Bock, R. (2009), “Generation of *Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear transgenes”, *The Plant Journal*, Vol. 57 No. 6, pp. 1140–1150.
- Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J. (1991), “Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector.”, *Gene*, Vol. 108 No. 2, pp. 193–9.
- Ozaki, M., Ozawa, T. and Yamada, Y. (2015), *Development of a New In Vivo Optical Probe for Biological Diagnosis and Therapy, Innovative Medicine: Basic Research and Development*, available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29787177> (accessed 26 July 2018).
- Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Hammer, R.E., Trumbauer, M.E., Rosenfeld, M.G., Birnberg, N.C. and Evans, R.M. (1982), “Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes.”, *Nature*, Vol. 300 No. 5893, pp. 611–5.
- Pawlik, K.M. and Townes, T.M. (1995), “Autonomous, erythroid-specific DNase I hypersensitive site formed by human beta-globin locus control region (LCR) 5’ HS 2 in transgenic mice.”, *Developmental Biology*, Vol. 169 No. 2, pp. 728–32.
- Pfeifer, A., Ikawa, M., Dayn, Y. and Verma, I.M. (2002), “Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 99 No. 4, pp. 2140–5.
- Plasterk, R.H. (1996), “The Tc1/mariner transposon family.”, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Vol. 204, pp. 125–43.
- Porteus, M.H. and Carroll, D. (2005), “Gene targeting using zinc finger nucleases”, *Nature Biotechnology*, Vol. 23 No. 8, pp. 967–973.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. and Cormier, M.J. (1992), “Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein.”, *Gene*, Vol. 111 No. 2, pp. 229–33.

- “Primer3 Input (version 0.4.0)”. (n.d.). , available at: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> (accessed 31 December 2018).
- Radice, A.D., Bugaj, B., Fitch, D.H. and Emmons, S.W. (1994), “Widespread occurrence of the Tc1 transposon family: Tc1-like transposons from teleost fish.”, *Molecular & General Genetics : MGG*, Vol. 244 No. 6, pp. 606–12.
- Richardson, S.R., Doucet, A.J., Kopera, H.C., Moldovan, J.B., Garcia-Perez, J.L. and Moran, J. V. (2015), “The Influence of LINE-1 and SINE Retrotransposons on Mammalian Genomes.”, *Microbiology Spectrum*, NIH Public Access, Vol. 3 No. 2, pp. MDNA3-0061-2014.
- Riego, E., Limonta, J., Aguilar, A., Pérez, A., de Armas, R., Solano, R., Ramos, B., et al. (1993), “Production of transgenic mice and rabbits that carry and express the human tissue plasminogen activator cDNA under the control of a bovine alpha S1 casein promoter.”, *Theriogenology*, Vol. 39 No. 5, pp. 1173–85.
- Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M. and Evans, M. (1986), “Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector.”, *Nature*, Vol. 323 No. 6087, pp. 445–8.
- Rodríguez-De Lara, R., Fallas-López, M., García-Muñiz, J.G., Martínez-Hernández, P.A., Rangel-Santos, R., Maldonado-Siman, E. and Cadena-Meneses, J.A. (2015), “Sexual behavior and seminal characteristics of fertile mature New Zealand White male rabbits of different body weights”, *Animal Reproduction Science*, Vol. 152, pp. 90–98.
- Rodriguez, A., Castro, F.O., Aguilar, A., Ramos, B., Del Barco, D.G., Lleonart, R. and De la Fuente, J. (1995), “Expression of active human erythropoietin in the mammary gland of lactating transgenic mice and rabbits.”, *Biological Research*, Vol. 28 No. 2, pp. 141–53.
- Rome, C., Couillaud, F. and Moonen, C.T.W. (2007), “Gene expression and gene therapy imaging”, *European Radiology*, Vol. 17 No. 2, pp. 305–319.
- de Rooij, D. (2001), “Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells”, *Reproduction*, Vol. 121 No. 3, pp. 347–354.
- Royer, C., Jalabert, A., Da Rocha, M., Grenier, A.-M., Mauchamp, B., Couble, P. and Chavancy, G. (2005), “Biosynthesis and cocoon-export of a recombinant globular protein in transgenic silkworms.”, *Transgenic Research*, Vol. 14 No. 4, pp. 463–72.
- “Ruconest (C1 esterase inhibitor (recombinant)) FDA Approval History - Drugs.com”. (n.d.). ,

- available at: <https://www.drugs.com/history/ruconest.html> (accessed 6 August 2018).
- Sakai, K. and Miyazaki, J. i. (1997), “A transgenic mouse line that retains Cre recombinase activity in mature oocytes irrespective of the cre transgene transmission.”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 237 No. 2, pp. 318–24.
- Salamon, S. and Maxwell, W.M. (2000), “Storage of ram semen.”, *Animal Reproduction Science*, Vol. 62 No. 1–3, pp. 77–111.
- Schedl, A., Beermann, F., Thies, E., Montoliu, L., Kelsey, G. and Schütz, G. (1992), “Transgenic mice generated by pronuclear injection of a yeast artificial chromosome.”, *Nucleic Acids Research*, Vol. 20 No. 12, pp. 3073–7.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., et al. (2012), “Fiji: an open-source platform for biological-image analysis.”, *Nature Methods*, Vol. 9 No. 7, pp. 676–82.
- Schnieke, A.E., Kind, A.J., Ritchie, W.A., Mycock, K., Scott, A.R., Ritchie, M., Wilmut, I., et al. (1997), “Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts.”, *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 278 No. 5346, pp. 2130–3.
- Shaner, N.C., Steinbach, P.A. and Tsien, R.Y. (2005), “A guide to choosing fluorescent proteins”, *Nature Methods*, Vol. 2 No. 12, pp. 905–909.
- Shapiro, J.A. (1969), “Mutations caused by the insertion of genetic material into the galactose operon of Escherichia coli.”, *Journal of Molecular Biology*, Vol. 40 No. 1, pp. 93–105.
- Shepelev, M. V, Kalinichenko, S. V, Deykin, A. V and Korobko, I. V. (2018), “Production of Recombinant Proteins in the Milk of Transgenic Animals: Current State and Prospects.”, *Acta Naturae*, Park Media, Vol. 10 No. 3, pp. 40–47.
- Shimomura, O., Johnson, F.H. and Saiga, Y. (1962), “Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea.”, *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, Vol. 59, pp. 223–39.
- Silberglitt, R., Anton, P., Howell, D., Wong, A., Gassman, N., Jackson, B., Landree, E., et al. (2006), *The Global Technology Revolution 2020, In-Depth Analyses: Bio/Nano/Materials/Information Trends, Drivers, Barriers, and Social Implications*, RAND Corporation, available at:<https://doi.org/10.7249/TR303>.
- Simons, J.P., McClenaghan, M. and Clark, A.J. (1987), “Alteration of the quality of milk by expression of sheep beta-lactoglobulin in transgenic mice.”, *Nature*, Vol. 328 No. 6130, pp.

- Strömquist, M., Houdebine, M., Andersson, J.O., Edlund, A., Johansson, T., Viglietta, C., Puissant, C., et al. (1997), “Recombinant human extracellular superoxide dismutase produced in milk of transgenic rabbits.”, *Transgenic Research*, Vol. 6 No. 4, pp. 271–8.
- Swanson, M.E., Martin, M.J., O’Donnell, J.K., Hoover, K., Lago, W., Huntress, V., Parsons, C.T., et al. (1992), “Production of functional human hemoglobin in transgenic swine.”, *Bio/Technology (Nature Publishing Company)*, Vol. 10 No. 5, pp. 557–9.
- Tegelenbosch, R.A. and de Rooij, D.G. (1993), “A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse.”, *Mutation Research*, Vol. 290 No. 2, pp. 193–200.
- Tellier, M., Bouuaert, C.C. and Chalmers, R. (2015), “Mariner and the ITm Superfamily of Transposons.”, *Microbiology Spectrum*, Vol. 3 No. 2, p. MDNA3–0033–2014.
- Thomas, K.R. and Capecchi, M.R. (1987), “Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells.”, *Cell*, Vol. 51 No. 3, pp. 503–12.
- Thompson, E.M., Adenot, P., Tsuji, F.I. and Renard, J.P. (1995), “Real time imaging of transcriptional activity in live mouse preimplantation embryos using a secreted luciferase.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 92 No. 5, pp. 1317–21.
- Tsien, R.Y. (1998), “THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN”, *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 67 No. 1, pp. 509–544.
- Tsien, R.Y. (2005), “Building and breeding molecules to spy on cells and tumors”, *FEBS Letters*, No longer published by Elsevier, Vol. 579 No. 4, pp. 927–932.
- Ventelä, S., Toppari, J. and Parvinen, M. (2003), “Intercellular organelle traffic through cytoplasmic bridges in early spermatids of the rat: mechanisms of haploid gene product sharing.”, *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 14 No. 7, pp. 2768–80.
- Voigt, F., Wiedemann, L., Zuliani, C., Querques, I., Sebe, A., Mátés, L., Izsvák, Z., et al. (2016), “Sleeping Beauty transposase structure allows rational design of hyperactive variants for genetic engineering”, *Nature Communications*, Vol. 7 No. May 2015, pp. 1–8.
- Wachter, R.M., Elsliger, M.A., Kallio, K., Hanson, G.T. and Remington, S.J. (1998), “Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein.”, *Structure (London, England : 1993)*, Vol. 6 No. 10, pp. 1267–77.

- Wang, Y., Zhao, S., Bai, L., Fan, J. and Liu, E. (2013), “Expression Systems and Species Used for Transgenic Animal Bioreactors”, *BioMed Research International*, Vol. 2013, pp. 1–9.
- Watson, P.F. (2000), “The causes of reduced fertility with cryopreserved semen.”, *Animal Reproduction Science*, Vol. 60–61, pp. 481–92.
- Weber, J.E. and Russell, L.D. (1987), “A study of intercellular bridges during spermatogenesis in the rat”, *American Journal of Anatomy*, Vol. 180 No. 1, pp. 1–24.
- Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J.L., Capy, P., Chalhoub, B., Flavell, A., et al. (2007), “A unified classification system for eukaryotic transposable elements”, *Nature Reviews Genetics*, Vol. 8 No. 12, pp. 973–982.
- 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*, Vol. 385 No. 6619, pp. 810–813.
- Wolf, E., Jehle, P.M., Weber, M.M., Sauerwein, H., Daxenberger, A., Breier, B.H., Besenfelder, U., et al. (1997), “Human insulin-like growth factor I (IGF-I) produced in the mammary glands of transgenic rabbits: yield, receptor binding, mitogenic activity, and effects on IGF-binding proteins.”, *Endocrinology*, Vol. 138 No. 1, pp. 307–13.
- Wolffe, A.P. (1997), “Transcription control: repressed repeats express themselves.”, *Current Biology : CB*, Vol. 7 No. 12, pp. R796-8.
- Wu, H., Cao, D., Liu, T., Zhao, J., Hu, X. and Li, N. (2015), “Purification and Characterization of Recombinant Human Lysozyme from Eggs of Transgenic Chickens.”, *PloS One*, Vol. 10 No. 12, p. e0146032.
- Xiao, B., Li, Q.W., Feng, B., Han, Z.S., Gao, D.W., Li, J., Li, K., et al. (2008), “High-level expression of recombinant human nerve growth factor beta in milk of nontransgenic rabbits.”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 105 No. 4, pp. 327–34.
- Xue, X., Huang, X., Nodland, S.E., Mátés, L., Ma, L., Izsvák, Z., Ivics, Z., et al. (2009), “Stable gene transfer and expression in cord blood-derived CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells by a hyperactive Sleeping Beauty transposon system.”, *Blood*, Vol. 114 No. 7, pp. 1319–30.
- Yang, H., Li, Q., Han, Z. and Hu, J. (2012), “High level expression of recombinant human antithrombin in the mammary gland of rabbits by adenoviral vectors infection.”, *Animal Biotechnology*, Vol. 23 No. 2, pp. 89–100.

- Yang, X.W., Model, P. and Heintz, N. (1997), “Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome.”, *Nature Biotechnology*, Vol. 15 No. 9, pp. 859–65.
- Yoon, S.-J., Kwon, W.-S., Rahman, M.S., Lee, J.-S. and Pang, M.-G. (2015), “A novel approach to identifying physical markers of cryo-damage in bull spermatozoa.”, edited by Yan, W. *PloS One*, Vol. 10 No. 5, p. e0126232.
- Yoon, S.-J., Rahman, M.S., Kwon, W.-S., Park, Y.-J. and Pang, M.-G. (2016), “Addition of Cryoprotectant Significantly Alters the Epididymal Sperm Proteome.”, edited by Guo, X. *PloS One*, Vol. 11 No. 3, p. e0152690.
- Zhou, Q., Kyazike, J., Echelard, Y., Meade, H.M., Higgins, E., Cole, E.S. and Edmunds, T. (2005), “Effect of genetic background on glycosylation heterogeneity in human antithrombin produced in the mammary gland of transgenic goats”, *Journal of Biotechnology*, Elsevier, Vol. 117 No. 1, pp. 57–72.
- Zinovieva, N., Lassnig, C., Schams, D., Besenfelder, U., Wolf, E., Müller, S., Frenyo, L., et al. (1998), “Stable production of human insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in the milk of hemi- and homozygous transgenic rabbits over several generations.”, *Transgenic Research*, Vol. 7 No. 6, pp. 437–47.

9.2. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

- Kerekes A**, Hoffmann OI, Iski G, Liptak N, Gocza E, Kues WA, Bosze Z, Hiripi L (2017) „Secretion of a recombinant protein without a signal peptide by the exocrine glands of transgenic rabbits.” *Plos one* 12:(10) p. e0187214.
- Hoffmann OI, **Kerekes A**, Liptak N, Hiripi L, Bodo S, Szaloki G, Klein S, Ivics Z, Kues WA, Bosze Z (2016) „Transposon-Based Reporter Marking Provides Functional Evidence for Intercellular Bridges in the Male Germline of Rabbits” *Plos one* 11:(5) p. E0154489.
- Kerekes A**, Bodó Sz, Hoffmann O I, Hiripi L, Kulikova B, Chrenek P, Bősze Zs (2015) „Géntechnológiai módosítás hatása a nyúlsperma minőségére” 21. *Szaporodásbiológiai Találkozó*. 37 p. Konferencia helye, ideje: Visegrád, Magyarország, 2015.09.21-2015.09.22.p. 25.
- Kerekes A**, Skoda G, Hoffmann O I, Balogh L, Debnár V J, Bősze Zs, Hiripi L, Bodó Sz (2014) „Transzgenikus állatvonalak ex situ genetikai megőrzése” 20. *Szaporodásbiológiai Találkozó*. Konferencia helye, ideje: Herceghalom, Magyarország, 2014.11.07-2014.11.08.p. 25.
- Balogh L, **Kerekes A**, Debnár V J, Ray K, Bodó Sz (2013) „Tej alapú hígítók alkalmazásának lehetősége nyúl sperma mélyhűtésénél” *Animal welfare ethology and housing systems* 9:(3) pp. 69-72. (2013) IV. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok. Gödöllő, Magyarország: 2013.10.25 -2013.10.26.
- Bodó Sz, **Kerekes A**, Kriczky N, Balogh L, Bősze Zs (2012) „Nyúlsperma mélyhűtési eljárás optimalizálása.” A magyar mezőgazdaság - lehetőségek, források, új gondolatok. 34. *Óvári Tudományos Nap*. 777 p. Konferencia helye, ideje: Mosonmagyaróvár, Magyarország, 2012.10.05 Mosonmagyaróvár: Nyugat-magyarországi Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, 2012. Pp. 225-229.
- Kerekes A**, Kriczky N, Kása E, Bősze Zs, Bodó Sz (2012) „Nyúlsperma mélyhűtési protokollok vizsgálata” 24. *Nyúltenyésztési Tudományos Nap*. 120 p. Konferencia helye, ideje: Kaposvár, Magyarország, 2012.05.30 Kaposvár: Kaposvári Egyetem Állattudományi Kar, 2012. Pp. 47-52. (ISBN:978 963 9821 51 4)

9.3. MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

9.3.1. IMPAKTFAKTOROS FOLYÓIRATBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

Liptak N, Hoffmann OI, Skoda G, Gocza E, **Kerekes A**, Bosze Z, Hiripi L (2018) „Glomerulosclerosis in transgenic rabbits with ubiquitous Venus protein expression.” *Acta veterinaria hungarica* 66:(2) pp. 281-293.

Kerekes A, Hoffmann OI, Iski G, Liptak N, Gocza E, Kues WA, Bosze Z, Hiripi L (2017) „Secretion of a recombinant protein without a signal peptide by the exocrine glands of transgenic rabbits.” *Plos one* 12:(10) p. e0187214.

Liptak N, Hoffmann OI, **Kerekes A**, Iski G, Ernszt D, Kvell K, Hiripi L, Bosze Z (2017) „Monitoring of Venus transgenic cell migration during pregnancy in non-transgenic rabbits.” *Transgenic research* 26:(2) pp. 291-299.

Skoda G, Hoffmann OI, Gocza E, Bodrogi L, **Kerekes A**, Bosze Z, Hiripi L (2017) „Placenta-specific gene manipulation in rabbits.” *Journal of biotechnology* 259: pp. 86-90.

Hoffmann OI, **Kerekes A**, Liptak N, Hiripi L, Bodo S, Szaloki G, Klein S, Ivics Z, Kues WA, Bosze Z (2016) „Transposon-Based Reporter Marking Provides Functional Evidence for Intercellular Bridges in the Male Germline of Rabbits.” *Plos one* 11:(5) p. e0154489.

Bender B, Baranyi M, **Kerekes A**, Bodrogi L, Brands R, Uhrin P, Bösze Z (2015) „Recombinant human tissue non-specific alkaline phosphatase successfully counteracts lipopolysaccharide induced sepsis in mice.” *Physiological research* 64:(5) pp. 731-738.

Catunda Lemos AP, Cervenak J, Bender B, Hoffmann OI, Baranyi M, **Kerekes A**, Farkas A, Bösze Z, Hiripi L, Kacs Kovics I (2012) „Characterization of the rabbit neonatal Fc receptor (FcRn) and analyzing the immunophenotype of the transgenic rabbits that overexpresses FcRn.” *Plos one* 7:(1) p. e28869.

Lichner Z, Pall E, **Kerekes A**, Pallinger E, Maraghechi P, Bosze Z, Gocza E (2011) „The miR-290-295 cluster promotes pluripotency maintenance by regulating cell cycle phase distribution in mouse embryonic stem cells.” *Differentiation* 81:(1) pp. 11-24.

9.3.2. NEM IMPAKTFAKTOROS, REFERÁLT FOLYÓIRATBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

Fábián 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* 66:(2) pp. 174-179.

Balogh L, **Kerekes A**, Debnár V J, Ray K, Bodó Sz (2013) „Tej alapú higítók alkalmazásának lehetősége nyúl sperma mélyhűtésénél.” *Animal welfare ethology and housing systems* 9:(3) pp. 69-72.

Kerekes Andrea, Hoffmann Orsolya Ivett, Skoda Gabriella, Barta Endre, Rocha Dominique, Lejard Véronique, Hiripi László, Bősze Zsuzsanna (2013) „A szarvasmarha prion fehérje szabályozó SNP vizsgálata transzgenikus egér modellben.” *Animal welfare ethology and housing systems* 9:(3 Klnsz) pp. 177-182.

Skoda Gabriella, **Kerekes Andrea**, Hoffmann Orsolya Ivett, Barta Endre, Rocha Dominique, Lejard Véronique, Hiripi László, Bősze Zsuzsanna (2013) „Szarvasmarha RCAN2 gén szabályozó régiójában található SNP vizsgálata transzgenikus egérmodellben.” *Animal welfare ethology and housing systems* 9:(Klnsz) pp. 321-327.

Kerekes Andrea, Baranyi Mária, Nagy Sándor, Kovács Péter, Bősze Zsuzsanna (2008) „Betalaktoglobulin genetikai polimorfizmus vizsgálatok hazai awassi és racka juhokban.” *Animal welfare ethology and housing systems* 4:(2) pp. 437-444.

9.3.3. KONFERENCIA KÖZLEMÉNYEK

Antal Anita, Bender Balázs, Hiripi László, Bősze Zsuzsanna, Bodó Szilárd, **Kerekes Andrea**: A házinyúl ejakulált ondó és a mellékhere eredetű spermiumok feltételezett termékenyítő képességének összehasonlítása. 6th Scientific Day of Animal Breeding in Gödöllő - International Conference; VI. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Nap - Nemzetközi Konferencia: Book of abstracts of presentations and posters; Előadások és poszterek összefoglaló kötete. 71 p. Konferencia helye, ideje: Gödöllő, Magyarország, 2017.11.24 Gödöllő: Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, 2017. p. 35. 1 p. (ISBN:978-963-269-689-8)

Kerekes Andrea, Hoffmann Orsolya Ivett, Lipták Nándor, Hiripi László, Kues Willfried, Bősze Zsuzsanna: A transzpozon alapú transzgenézis, mint új lehetőség a rekombináns fehérje tejben történő termeltetésére. 6th Scientific Day of Animal Breeding in Gödöllő - International

Conference; VI. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Nap - Nemzetközi Konferencia: Book of abstracts of presentations and posters; Előadások és posztterek összefoglaló kötete. 71 p. Konferencia helye, ideje: Gödöllő, Magyarország, 2017.11.24 Gödöllő: Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, 2017. p. 37. 1 p. (ISBN:978-963-269-689-8)

Nándor Lipták, Osolya Ivett Hoffmann, **Andrea Kerekes**, Gergely Iski, Dávid Ernszt, Krisztián Kvell, László Hiripi, Zsuzsanna Bősze: The assessment of Venus transgenic cell migration during pregnancy in non-transgenic rabbits. Konferencia helye, ideje: Eger, Magyarország, 2017.03.31-2017.04.02. Eger:2017. 1 p.

Nándor Lipták, Orsolya Ivett Hoffmann, Gabriella Skoda, Elen Gócza, **Andrea Kerekes**, Zsuzsanna Bősze, László Hiripi: Mild focal segmental glomerulosclerosis in Venus transgenic rabbits. Konferencia helye, ideje: Halle (Saale), Németország, 2017.09.28-2017.09.29. Halle (Saale):2017. 1 p.

Tokár Alexandra, Stéger Viktor, Heltai Botond, Szepesi Kinga, Debnár Viktória Johanna, **Kerekes Andrea**, Antal Anita, Bodó Szilárd: Előkísérletek házi méh (*Apis Mellifera*) genotipizálására és spermium mélyhűtésére. 6th Scientific Day of Animal Breeding in Gödöllő - International Conference; VI. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Nap - Nemzetközi Konferencia: Book of abstracts of presentations and posters; Előadások és posztterek összefoglaló kötete. 71 p. Konferencia helye, ideje: Gödöllő, Magyarország, 2017.11.24 Gödöllő: Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, 2017. p. 40. 1 p. (ISBN:978-963-269-689-8)

Fábián Renáta, Hoffmann Orsolya Ivett, Skoda Gabriella, Hiripi László, **Kerekes Andrea**, Gócza Elen, Altbäcker Vilmos, Bodó Szilárd: Development of methods for obtaining offspring of the desired sex in rabbit. Fialat Biotechnológusok Országos Konferenciája. 109 p. Konferencia helye, ideje: Gödöllő, Magyarország, 2016.03.21-2016.03.22. Gödöllő: Szent István Egyetemi Kiadó, 2016. p. 22. 1 p. (ISBN:978-963-269-536-5)

Kerekes Andrea, Hoffmann Orsolya Ivett, Lipták Nándor, Hiripi László, Wilfried Kues, Bősze Zsuzsan: New opportunity for the recombinant protein production in milk. Fialat Biotechnológusok Országos Konferenciája. 109 p. Konferencia helye, ideje: Gödöllő, Magyarország, 2016.03.21-2016.03.22. Gödöllő: Szent István Egyetemi Kiadó, 2016. p. 55. 1 p. (ISBN:978-963-269-536-5)

Skoda Gabriella, **Kerekes Andrea**, Hoffmann Orsolya Ivett, Bősze Zsuzsanna, Hiripi László: Célzott genom módosítás a nyúl miosztatin génjében. Fialat Biotechnológusok Országos Konferenciája. 109 p. Konferencia helye, ideje: Gödöllő, Magyarország, 2016.03.21-

- 2016.03.22. Gödöllő: Szent István Egyetemi Kiadó, 2016. p. 26. 1 p. (ISBN:978-963-269-536-5)
- Debnár Viktória Johanna, **Kerekes Andrea**, Torda Orsolya, Altbäcker Vilmos, Bodó Szilárd: Spermavétel és mélyhűtés üregi nyúlön. Vad- és egzotikus állatok szaporodásbiológiája, állatkerti tenyésztésköprogramok – fiatal- és növendék állatok betegségei [Reproductive Biology of Wild and Zoo Animals, Conservation Breeding Programs; Diseases of Young and Growing Animals]. Konferencia helye, ideje: Budapest, Magyarország, 2015.03.27-2015.03.29. Budapest: Magyar Vad- és Állatkerti Állatorvosok Társasága; Fővárosi Állat- és Növénykert, 2015. pp. 64-65. (ISBN:978-615-5392-06-1)
- Kerekes A**, Bodó Sz, Hoffmann O I, Hiripi L, Kulikova B, Chrenek P, Bösze Zs: Géntechnológiai módosítás hatása a nyúlsperma minőségére. 21. Szaporodásbiológiai Találkozó. 37 p. Konferencia helye, ideje: Visegrád, Magyarország, 2015.09.21-2015.09.22.p. 25.
- Orsolya Ivett Hoffmann, **Andrea Kerekes**, Nóra Dobrosi, Elen Góczca, Szilárd Bodó, László Hiripi, Zsuzsanna Bösze: Analysis of the transmission of transposon-transgenic fluorofore protein in rabbit. Hungarian Molecular Life Sciences 2015: Programme & Book of Abstracts. 304 p. Konferencia helye, ideje: Eger, Magyarország, 2015.03.27-2015.03.29. Budapest: Diamond Congress Ltd., 2015. pp. 126-127. (ISBN:978-615-5270-15-4)
- Baczkó I, Juhász V, Major P, Kovács M, Hornyik T, **Kerekes A**, Hiripi L, Bösze Zs, Papp JGy, Varró A: LQT5 transgenic rabbits are characterized by increased repolarization instability and arrhythmia susceptibility. Cardiovascular research 103:(Suppl.1) p. S50. (2014)
- Debnár Viktória Johanna, **Kerekes Andrea**, Altbäcker Vilmos, Torda Orsolya, Bodó Szilárd: az üregi nyúlsperma hosszú távú tárolásának lehetősége In: 20. Szaporodásbiológiai Találkozó. Konferencia helye, ideje: Herceghalom, Magyarország, 2014.11.07-2014.11.08.p. 23. 1 p.
- Hoffmann Orsolya Ivett, Barta Endre, Dominique Rocha, Veronique Lejard, **Kerekes Andrea**, Skoda Gabriella, Bösze Zsuzsanna, Hiripi László: In vivo examination of bovine rSNPs in transgenic mouse model. In: CTC2014: 13th Annual Meeting of the Complex Trait Consortium. Konferencia helye, ideje: Berlin, Németország, 2014.05.19-2014.05.22. Berlin: pp. 13-14.
- Juhász V, Major P, Kovács M, Hornyik T, **Kerekes A**, Hiripi L, Bösze Zs, Varró A, Baczkó I :Egy új, LQT5 transzgenikus nyúl proaritmia model jellemzése. (Characterization of a novel LQT5 transgenic rabbit proarrhythmia model.) Cardiologia hungarica 44:(Suppl.E) pp. E28-E29. (2014)
- Kerekes A**, Skoda G, Hoffmann O I, Balogh L, Debnár V J, Bösze Zs, Hiripi L, Bodó Sz: Transzgenikus állatvonalak ex situ genetikai megőrzése. In: 20. Szaporodásbiológiai

Találkozó. Konferencia helye, ideje: Herceghalom, Magyarország, 2014.11.07-2014.11.08.p. 25.

Skoda G, **Kerekes A**, Hoffmann OI, Barta E, Rocha D, Lejard V, Bosze Zs, Hiripi L: Examination of a regulatory SNP of bovine RCAN2 gene in transgenic mouse models. In: Transgenic Research. Konferencia helye, ideje: Edinburgh, Egyesült Királyság / Skócia, 2014.10.06-2014.10.08.Paper Volume: 23 Issue: 5 Pages: 889-889.

Skoda G, **Kerekes A**, Hoffmann O I, Iski G, Barta E, Dominique R, Véronique L, Bősze Zs, Hiripi L: Komplex módszerek kifejlesztése szarvasmarha szabályozó polimorfizmusok vizsgálatára. In: 20. Szaporodásbiológiai Találkozó. Konferencia helye, ideje: Herceghalom, Magyarország, 2014.11.07-2014.11.08.p. 27.

Kerekes Andrea, Hoffmann Orsolya Ivett, Skoda Gabriella, Barta Endre, Dominique Rocha, Véronique Lejard, Hiripi László, Bősze Zsuzsanna: a szarvasmarha prion fehérje szabályozó snp vizsgálata transzgenikus egér modellben. IV. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok: Előadások és poszterek összefoglaló kötete. Konferencia helye, ideje: Gödöllő, Magyarország, 2013.10.24-2013.10.26. Gödöllő: Szent István Egyetem Egyetemi Kiadó, 2013. p. 52.

Major P, Hoffmann O, Bontovics B, **Kerekes A**, Hiripi L, Góczy E, Bősze Zs: A laboratóriumi nyúl mint betegség modellállat – tények és lehetőségek. 25. Nyúltenyésztési Tudományos Nap. Konferencia helye, ideje: Kaposvár, Magyarország, 2013.04.25 Kaposvár: Kaposvári Egyetem Állattudományi Kar, 2013. pp. 95-106. (ISBN:9789639821606)

Orsolya Ivett Hoffmann, Endre Barta, Dominique Rocha, Veronique Lejard, **Andrea Kerekes**, Gabriella Skoda, Zsuzsanna Bősze, László Hiripi: In vivo validation of candidate cattle regulatory SNPs in indicator transgenic mouse models. Hungarian Molecular Life Sciences 2013: programme & book of abstracts. 287 p. Konferencia helye, ideje: Siófok, Magyarország, 2013.04.05-2013.04.07. Budapest: Diamond Congress Ltd., 2013. p. 207. (ISBN:978-615-5270-02-4)

Skoda Gabriella, **Kerekes Andrea**, Hoffmann Orsolya Ivett, Barta Endre, Dominique Rocha, Véronique Lejard, Hiripi László, Bősze Zsuzsanna: szarvasmarha rcan2 gén szabályozó régiójában található snp vizsgálata transzgenikus egérmodellben. IV. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok: Előadások és poszterek összefoglaló kötete. Konferencia helye, ideje: Gödöllő, Magyarország, 2013.10.24-2013.10.26. Gödöllő: Szent István Egyetem Egyetemi Kiadó, 2013. p. 61. (ISBN:978-963-269-385-9)

Skoda Gabriella, **Kerekes Andrea**, Hoffmann Orsolya Ivett, Dominique Rocha, Veronique Lájard, Barta Endre, Bősze Zsuzsanna, Hiripi László: A szarvasmarha tenyésztésében

- potenciálisan használható PRNP és RCAN2 génekben található szabályozó polimorfizmusok jellemzése. In: MBK napok 2013. Konferencia helye, ideje: Gödöllő, Magyarország, 2013.11.21-2013.11.22. Paper 5.
- Bodó Sz, **Kerekes A**, Kriczky N, Balogh L, Bősze Zs: Nyúlsperma mélyhűtési eljárás optimalizálása. A magyar mezőgazdaság - lehetőségek, források, új gondolatok. 34. Óvári Tudományos Nap. 777 p. Konferencia helye, ideje: Mosonmagyaróvár, Magyarország, 2012.10.05 Mosonmagyaróvár: Nyugat-magyarországi Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, 2012. pp. 225-229. (ISBN:978 963 9883 93 2)
- Kerekes A**, Kriczky N, Kása E, Bősze Zs, Bodó Sz: Nyúlsperma mélyhűtési protokollok vizsgálata. 24. Nyúltenyésztési Tudományos Nap. 120 p. Konferencia helye, ideje: Kaposvár, Magyarország, 2012.05.30 Kaposvár: Kaposvári Egyetem Állattudományi Kar, 2012. pp. 47-52. (ISBN:978 963 9821 51 4)
- Bősze Zs, Hiripi L, Hoffmann O I, **Kerekes A**, Bender B, Kacs Kovics I: IgG binding FcRn transgenic rabbits created through BAC transgenesis. In: 4th International Rabbit Biotechnology Meeting, abstract, lecture, Worl Rabbit Sci. Konferencia helye, ideje: Budapest, Magyarország, 2011.06.30-2011.07.01.p. 13.
- Gocza E, Maraghechi P, Bontovics B, Hiripi L, Hoffmann O I, **Kerekes A**, Bosze Zs: Expression pattern of stem cell specific markers and microRNAs during rabbit embryonic development and in embryonic stem cells. In: Regenerative Medicine, 6/Suppl.2. World Conference on Regenerative Medicine, abstract, poster. Konferencia helye, ideje: Leipzig, Németország, 2011.11.02-2011.11.04. Future Medicine Ltd., p. 205.
- Kerekes A**, Szikra D, Nagy Sz, Pribenszky Cs, Bősze Zs: Magas nyomású előkezelés hatása a fagyasztott nyúlsperma túlélőképességére. 23. Nyúltenyésztési Tudományos Nap. 109 p. Konferencia helye, ideje: Kaposvár, Magyarország, 2011.05.25 Kaposvár: Kaposvári Egyetem Állattudományi Kar, 2011. pp. 89-94. (ISBN:978-963-9821-30-9)
- Kerekes A**, Kriczky N, Kása E, Bősze Zs, Bodó Sz: Nyúlsperma mélyhűtési eljárások technikai lépéseinek vizsgálata fénymikroszkópos festéssel. In: 17. Szaporodásbiológiai Találkozó: Az állattenyésztés és szaporodásbiológia helye és szerepe a magyar agrárstratégiában. Konferencia helye, ideje: Herceghalom, Magyarország, 2011.10.28-2011.10.29.p. 26.
- Maraghechi P, Bontovics B, Hiripi L, **Kerekes A**, Hoffmann O I, Bősze Zs, Gócza E: Az embrionális fejlődés kezdeti szakaszára jellemző markerek expressziós mintázatának vizsgálata nyúl embriókban. 23. Nyúltenyésztési Tudományos Nap. 109 p. Konferencia helye,

ideje: Kaposvár, Magyarország, 2011.05.25 Kaposvár: Kaposvári Egyetem Állattudományi Kar, 2011. pp. 99-104.(ISBN:978-963-9821-30-9)

Kerekes Andrea, Baranyi Mária, Bősze Zsuzsanna: a béta-laktoglobulin tejfehérje polimorfizmus vizsgálata hazai awassi és racka juhokban. In: Akadémiai beszámolók. Konferencia helye, ideje: Budapest, Magyarország, 2010.01.27p. 10. 1 p.

Mária Baranyi, **Andrea Kerekes**, László Hiripi, Zsuzsanna Bősze: Preliminary data on beta-lactoglobulin genetic polymorphisms in Hungarian Awassi and Racka sheep. In: DAGENE Annual Meeting. Konferencia helye, ideje: Brazi, Románia, 2010.04.15-2010.04.17.pp. 1-5.

Kerekes Andrea, Baranyi Mária, Bősze Zsuzsanna: Béta-laktoglobulin genetikai polimorfizmus vizsgálatok két hazai juh populációban. In: Magyar Genetikusok Egyesülete VIII. Magyar Genetikai Kongresszus; XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok. Konferencia helye, ideje: Nyíregyháza, Magyarország, 2009.04.17-2009.04.19. Magyar Genetikusok Egyesülete, p. 122. 1 p.

Kerekes Andrea, Baranyi Mária, Bősze Zsuzsanna: Béta-laktoglobulin genetikai polimorfizmus vizsgálatok hazai awassi és gyimesi racka juhokban. In: MBK Napok, előadás, absztrakt. Konferencia helye, ideje: Gödöllő, Magyarország, 2008.11.17-2008.11.18.p. 18.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Az értekezés elkészítéséhez szükséges kísérleteket a Nemzeti Agrárkutatói és Innovációs Központ, Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézetének, Állatbiotechnológiai Főosztályán végeztem a Nyúl Genom Biológiai és Biomodell csoportban.

Szeretnék köszönetet mondani a NAIK és az MBK főigazgatóinak, Dr. Gyuricza Csabának, és Dr. Olasz Ferencnek, akik lehetővé tették számomra, hogy munkámat így a dolgozat elkészítését az MBK-ban végezhessem.

Hálás köszönet illeti témavezetőimet Dr. Bősze Zsuzsannát, aki lehetőséget látott bennem, és Dr. Hiripi Lászlót, aki folyamatos és nélkülözhetetlen segítséget nyújtott számomra. Örömmel tölt el, hogy tudásomat, szakmai vezetésük alatt csiszolhattam, irányításuk alatt együtt dolgozhattunk.

Dr. Baranyi Máriának külön köszönöm, hogy a tejjel és a fehérjékkel kapcsolatos tudását átadta, illetve, hogy a munkák minden fortélyát megtanította nekem.

További köszönettel tartozom munkatársaimnak, Dr. Gócza Elennek, Dr. Hoffmann Orsolyának, Dr. Bodrogi Lillának, Dr. Bender Balázsnak, Dr. Lipták Nándornak, Dr. Bodó Szilárdnak, Iski Gergelynek, akik az értekezésem elkészítéséhez elengedhetetlen segítséggel járultak hozzá.

Köszönet illeti Galli Györgynét, a laboratóriumi eszközök gondos előkészítéséért, továbbá Egedi Sándort az oldatok elkészítésénél, valamint a vegyszerrendeléseknél nyújtott segítségéért. Köszönöm az állatház gondozóinak, Udri Ágnesnek, Liszkai Istvánnénak, Fülöp Lászlónak, az állatok gondozását, és köszönöm Dr. Bognár Gábornak, állatorvosunknak az állatok egészségének megóvását.

Hálás vagyok barátaimnak, Skoda Gabriellának, Szabó Rubina Tündének, Major Péternek és Bontovics Babettnak, hogy bármely időpontban készek voltak a munkával kapcsolatos érzéseimet meghallgatni, legyen az jó vagy rossz, tanáccsal ellátni, és kitartásomhoz támaszt nyújtani.

Külön köszönet illeti szüleimet, akik támogatásukkal és biztatásukkal, eljuttattak idáig, nélkülük nem lett volna elég erőm a nehéz pillanatokon túllendülni.

Munkám anyagi fedezetét a 2017-1.3.1-VKE-2017-00026, NVKP_16-1-2016-0039., OTKA NN 108921, OTKA PD 120870, OTKA NN 113162 pályázatok támogatták.