



**SZENT ISTVÁN
EGYETEM**

GÖDÖLLŐ

SZENT ISTVÁN EGYETEM
Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

TRANSZPOZON ALAPÚ TRANSZGENEZISSEL LÉTREHOZOTT
RIPORTERGÉN EXPRESSZIÓ RÉSZLETES VIZSGÁLATA NYÚLBAN

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 A MUNKA ELŐZMÉNYEI, KITŰZÖTT CÉLOK

1.1. AZ ÉRTEKEZÉS ELŐZMÉNYEI

Transzgénikus 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 hordozó állatok megítélése a köztudatban rendkívül sokféle. Az FDA 2009-ben engedélyezte egy transzgénikus 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 transzgénikus tyúk tojásában termeltetett enzim követett ("Kanuma (sebelipase alfa) FDA Approval History - Drugs.com", n.d.). A genetikailag módosított Atlanti lazac engedélyezésének folyamata 2015-ben fejeződött be, mely esetlegesen részmegoldást nyújthat a kimerülő természeti források pótlására (Commissioner, n.d.).

Ezek az elképzelések és gyakorlati alkalmazások is alátámasztják, hogy a biotechnológiára, azon belül a transzgenezisre, 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 transzgénikus nyulak tejében állítanak elő az angioödéma kezelésére.

A rekombináns fehérjék előállításának jó módszere a biofarming, amin belül a transzgénikus 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 transzgénikus nyulak klasszikus mikroinjektálással történő előállításának hatékonysága alacsony, viszont felhasználásának lehetősége széles körű. A transzgénikus nyúl gyakran alkalmazott modell állat, például a metabolikus szindróma, atheroszklerózis, kardiovaszkuláris megbetegedések és szívritmus zavarok vizsgálatában (Bószé 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 transzgénikus 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 transzgén kifejeződést biztosít (Sakai és Miyazaki, 1997).

1.2. CÉLKITŰZÉSEK

1. A klasszikus mikroinjektálásnál nagyobb hatékonysággal működő - Sleeping Beauty (SB) transzpozon technikával létrehozott Vénusz fehérjét expresszáló transzgénikus nyúl (Katter et al., 2013) részletes expressziós vizsgálata.
2. A transzgén konstrukciónkba a szintetikus, nem szövetspecifikus CAG promótert építettük be. A konstrukció nem tartalmazott sem emlőspecifikus szabályozó elemet, sem szekréciós szignál peptidet. Korábban megjelent cikk (Mukherjee et al., 2016) alapján vizsgálataink fő célja a tej és frakcióinak vizsgálata volt a transzgén kifejeződés tekintetében.

- 2.1. Vizsgáltuk a teljes tej mintákat valamint a különböző frakciókat makroszkóposan UV fény gerjesztés alatt.
- 2.2. Western blot analízissel, melynek alapján denzitometriás vizsgálattal meghatároztuk a Vénusz fehérje koncentrációját a tejben.
- 2.3. IMAGE-J programmal vizsgáltuk, hogy van-e különbség a laktáció folyamán a tejben megjelenő Vénusz fehérje mennyiségében.
- 2.4. A transzgén fehérje kifejeződés helyének meghatározására az emlőszövetben hisztológiai vizsgálatot végeztünk.
3. További célunk volt a fluoreszcens fehérje jelenlétének kimutatása különböző exokrin mirigyek által termelt biológiai folyadékokban (szeminális plazma, könny, nyál).
4. Választ kerestünk a korábban már sertéseknél leírt genotípus független egyenletes transzgén fehérje kifejeződésre. SB-CAG-Vénusz heterozigóta és homozigóta állatok ondó mintáit vizsgáltuk:
 - 4.1. Flow citometriával.
 - 4.2. A vonal fenntartó termékenyítések időszakában figyeltük a Vénusz fehérje öröklődését.
 - 4.3. RT-PCR technikával meghatároztuk a specifikus Vénusz mRNS jelenlétét.
 - 4.4. Immunhisztológiát végeztünk az intercelluláris hidak meglétének vizsgálatára.
5. Az SB-CAG-Vénusz pozitív sertések és egerek ivarsejtjeiben leírt ellentétes transzgén megjelenés nyulak esetében is vizsgálni kívántuk. Azonos módszerekkel vizsgáltuk ugyanazon SB-CAG-Vénusz konstrukcióval létrehozott három független egér vonal homozigóta egyedeké és az azonos transzgénnel létrehozott nyulak hímvarsejtjeit, here és mellékhere szöveteit.

2 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. KÍSÉRLETI ENGEDÉLYEK ÉS ÁLLATOK

A laboratóriumi nyulak a Nemzeti Agrárkutatási 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.

Munkánk során az SB-CAG-Vénusz transzgenikus nyúl vonalba tartozó heterozigóta és homozigóta egyedek Vénusz riporter gént kifejeződését vizsgáltuk. Az Állatokat Sleeping Beauty transzpozon technikával hozta létre csoportunk 2013-ban (Katter et al., 2013).

Vizsgálatainkhoz kontrollként másik két szintén a csoportunk által létrehozott transzgenikus vonalak heterozigóta egyedeit használtuk. A β -MHC-G52R-KCNE1 vonal transzgen konstrukciója szív szövet specifikus promotert tartalmaz (Major et al., 2016). A WAP-hTNAP vonalba tartozó transzgenikus állatok, emlőszövet specifikus promóter irányította konstrukció a transzgen kifejeződését a tejre korlátozza (Bodrogi et al., 2006). Mind két konstrukcióról elmondható, hogy a transzgen a herében nem fejeződik ki, így a transzgen fehérje az ivarsejtekben nincs jelen.

Abszolút kontrollként Újzélandi fehér fajtájú laboratóriumi célokra tenyésztett nyulakat használtunk.

A Vénusz fehérje fajspecifikus kifejeződésének vizsgálatához három független transzgenikus egérvonalba tartozó homozigóta egerek hím egyedeit használtuk fel (Garrels et al., 2016).

2.2. MINTAVÉTELEZÉSEK ÉS WESTERN BLOT VIZSGÁLATOK

2.2.1. TEJMINTA GYŰJTÉSE

Laktáló SB-CAG-Vénusz transzgénikus, heterozigóta és homozigóta nőstényeket megfejünk. A kísérlethez kontrollként használtunk két a WAP-hTNAP transzgénikus nyúlvonalba tartozó heterozigóta nőstény tejmintáit (#3013; #3014). Erről a vonalról 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 tej három frakcióját elválasztottuk egymástól. Az SDS gélelektroforézis során 20 µg összes fehérje mennyiség került felvitelre frakciónként és egyedenként.

2.2.2. KÖNNY ÉS NYÁL MINTA GYŰJTÉS

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. A Western blot analízishez a könny mintákból 10µg összes fehérje mennyiség, míg a nyál mintákból 20 µg koncentrációjú fehérje mennyiség került elválasztásra az SDS-t tartalmazó poliakrilamid gélen.

2.2.3. EJAKULÁTUM GYŰJTÉSE

Tenyészérett heterozigóta (#4004) és homozigóta (#4007) SB-CAG-Vénusz transzgénikus és vad típusú hímeiktől ondó mintát gyűjtöttünk. A bak nyulak ugratása élő nőstényre történt. Az ivarsejteket és a szeminális plazmát elválasztottuk. 20 µg összes fehérje koncentráció beállítása után kerültek a minták

felhasználásra spermium esetében és 10 µg összes fehérje szeminális plazma esetében.

2.2.4. WESTERN BLOT VIZSGÁLATOK

A különböző mintatípusokhoz négyszeresen koncentrált SDS minta felvivő puffert adtunk. A fehérje elválasztáshoz 4 %-os poliakrilamid denaturáló gyűjtő gélt és 12 %-os futtató gélt öntöttünk. A fehérje elválasztáshoz CVS10D Mini Trans-Blot[®] egységet használtunk.

A membránok telítését 5%-os sovány tejporos oldatban végeztük.

A Vénusz fehérje jelenlétét 1:2000 arányban hígított nyúlban termeltetett anti-EGFP poliklonális elsődleges ellenanyag (Thermo Fisher Scientific CAB4011) és 1:10000 arányban hígított másodlagos ellenanyag (ant-Rabbit IgG HRPO, Sigma A5906) reakcióval detektáltuk.

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

2.3. HISZTOLÓGIAI VIZSGÁLATOK

2.3.1. EMLŐSZÖVET

Laktáló SB-CAG-Vénusz heterozigóta (#4026) és vad típusú nőstényeken (#3010), emlőszövet biopsziát végeztünk. A fixált szöveteket fagyasztást követően kriosztát szövetmetsző gépben (Mikrom, Heidelberg) 10 mikron vastagságú szeletekre metszettük. A tárgylemezre helyezett szövet szeleteket TO-PRO 3 Iodid (Thermo Fisher Scientific, USA, T3605) sejtmag festő festékkel festettük.

2.3.2. NYÚL ÉS EGÉR HERE ÉS MELLÉKHERE

Tenyészérett SB-CAG-Vénusz transzgénikus homozigóta egér és nyúl egyedek heréit a mellékherékkel együtt eltávolítottuk az állatok eutanáziáját követően.

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.

2.3.3. NYÚL HERESZÖVET IMMUNHISZTOLÓGIA

A tárgylemezre helyezett 10 µm nagyságú hereszövet metszeteket kecskében termeltetett anti-TEX-14 (Santa Cruz Biotechnology Inc. sc169574) poliklonális elsődleges ellenanyagban ezt követően anti-kecske IgG (H+L) Alexa Fluor 633 jelölt másodlagos ellenanyagban (Thermo Fisher Scientific, A-21082) inkubáltuk. A sejtmagfestést TO-PRO 3 Iodiddal végeztük. 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 EREDMÉNYEK

3.1. EGYENLETES VÉNUSZ FEHÉRJE KIFEJEZŐDÉS VIZSGÁLATA NYÚL SPERMIUMOKBAN

3.1.1. MIKROSKÓPOS VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

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 spermiumok, poszt-akroszómális, a nyaki és a farok részén. A különbség, a visszaverődő fény erősségében volt.

3.1.2. FLOW CITOMETRIA

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.

3.1.3. VÉNUSZ TRANZSGÉN ÖRÖKLŐDÉSE

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 nyúlvonalunk eredményeitől. Az állatok szaporítása során nem figyeltünk meg eltérő alomlétszámot az irodalomban az Újzélandi fajtára jellemző átlagos alomlétszámtól. 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 állat esetében ez az arány 100 %-os.

3.2. AZ INTERCELLULÁRIS HIDAK SZEREPÉNEK BIZONYÍTÁSA AZ EGYENLETES TRANSZGÉN ELOSZLÁSBAN

3.2.1. VÉNUSZ SPECIFIKUS MRNS KIMUTATÁSA A SPERMIUMOKBAN

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.

3.2.2. IMMUNHISZTOLÓGIAI VIZSGÁLAT EREDMÉNYE

Az intercelluláris hidak meglétének bizonyítására immunhisztológiai vizsgálatot végeztünk. Az intercelluláris hidakat jelző TEX-14 fehérjéhez kötött ellenanyagok piros jelző festését 640-682 nm hullámhosszon sikerült detektáltuk.

3.3. A VÉNUSZ FEHÉRJE FAJSPECIFIKUS KIFEJEZŐDÉS VIZSGÁLATÁNAK EREDMÉNYEI

3.3.1. MIKROSKÓPOS VIZSGÁLAT EREDMÉNYEI

Fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálva a spermiumokat, SB-CAG-Vénusz transzgénikus bak nyulak esetében, a Vénusz fluorofor fehérjéről származó jelet a spermiumok, poszt-akroszómális, a nyaki és a farok részén észleltük.

Az azonos transzgénnel létrehozott három független vonalból kiválasztott SB-CAG-Vénusz homozigóta egerek (Garrels *et al.*, 2016a) ivarsejtjeit vizsgálva nem találtunk Vénusz specifikus transzgén kifejeződést sem a mellékhere eredetű, sem pedig az ejakulált ivarsejtek között.

Ezzel szemben az azonos konstrukcióval létrehozott sertések sperma mintáiban csak úgy, mint nyulaknál, a Vénusz fehérje genotípus független kifejeződését figyelték meg (Garrels *et al.*, 2011b).

3.3.2. HISZTOLÓGIAI VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

Az ivari fejlődés korai stádiumában lévő 42 napos heterozigóta nyúl estében (#4024) a szomatikus sejtjeiben már jól látható a Vénusz fehérje jelenléte. A 60 napos heterozigóta állat (#4025) hereszövet metszeti képén megfigyelhető a spermatogóniumok fejlődésével a Vénusz fehérje expressziója is. A 120 napos heterozigóta állat (#4027) szöveti metszetén a transzgén fehérje jelenléte megfigyelhető a spermatocitákban, a spermatidákban, a spermiomorfogenezis különböző szakaszaiban lévő spermidákban, valamint a herecsatornák közötti laza kötőszövetes állományban elhelyezkedő Leydig-féle sejtekben és a simaizom sejtekben.

Az egér hereszövet metszeteken a transzgén fehérje jelenléte a herecsatornák közötti laza kötőszövetes állományban, azaz a Leydig-féle sejtekben és a simaizom sejtekben volt látható. Az egér spermatidákban és a spermidákban nem találtunk a transzgén fehérjéről érkező specifikus jelet. Az SB-CAG-Vénusz egér mellékhere szövetmetszetein láthatjuk, hogy a transzgén kifejeződik a fő- és bazális sejtekben valamint a hengerhámsejtekben. Nagyon erős expressziót tapasztaltunk a simaizom sejtekben és az intersticiális sejtekben, mindhárom független egér vonalban.

3.4. VÉNUSZ TRANZGÉN FEHÉRJE KIFEJEZŐDÉS VIZSGÁLATÁNAK EREDMÉNYEI TEJ ÉS EMLŐSZÖVET MINTÁKBAN

3.4.1. TEJVIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

A szekréciós szignált nem tartalmazó CAG promóter által vezérelt konstrukcióval létrehozott SB Vénusz transzgénikus heterozigóta és homozigóta nőtény nyulak tejében makroszkópos vizsgálataink alkalmával erős Vénusz fluoreszcenciát detektáltunk. A tejet frakcióira bontva, a zsír és kazein frakciókban is látható a Vénusz fehérje expressziója, a legerősebb fluoreszcens jelet a tej savó mintáknál tapasztaltuk. A Vénusz fehérje fluoreszcencia

mértékében a laktáció négy hete alatt nem találtunk szignifikáns különbséget heterozigóta állat esetében.

A Vénusz specifikus fehérje jelenlétét a tejben és annak különböző frakcióiban Western blot analízissel megerősítettük. Azonos fehérje mennyiség mellett a homozigóta és a heterozigóta SB-CAG-Vénusz pozitív állatok mintáiban a transzgén fehérje mennyisége különbözik. Ezt denzitometriás méréssel kvantitáltuk is.

3.4.2. EMLŐSZÖVET HISZTOLÓGIAI VIZSGÁLAT EREDMÉNYEI

Az emlőszövet vizsgálatakor a Vénusz fluorofor fehérje citoplazmatikus elhelyezkedést mutatott, a heterozigóta nőstény szövet metszeti képén. A transzgén fehérje expressziója az emlőszövet epitél sejtjeiben, arra mutat, hogy tejben megjelenő rekombináns fehérje a letöredező epitél 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 is ki tudták mutatni a tejben (Mukherjee et al., 2016).

3.5. VÉNUSZ FEHÉRJE KIFEJEZŐDÉSÉNEK VIZSGÁLATA EXOKRIN MIRIGYEK ÁLTAL TERMEL BIOLÓGIAI FOLYADÉKOKBAN

Szeminális plazmában, könny, és nyálmintákban makroszkopikusan UV fény gerjesztés hatására erős Vénusz fehérje fluoreszcens jelet tapasztaltunk.

A transzgén fluoreszcencia intenzitása a könny és nyálmintákban IMAGE-J programmal mérve független az állatok korától és a mintagyűjtés idejétől.

Western blot vizsgálattal megerősítettük a Vénusz fehérje kifejeződését a szeminális plazmában, a könnyben és a nyálban. Mindhárom minta esetében tapasztaltuk a transzgén fehérje koncentráció különbségét heterozigóta és homozigóta állat esetében azonos összes fehérje koncentráció mellett.

4 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Bizonyítottam a Vénusz transzgénikus fehérje a heterozigóta bak nyulak minden ivarsejtjében való megjelenését, 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, nyúl esetében, hogy nem szövetspecifikus promóter alkalmazásával a rekombináns fehérje megjelenik a tejben és emellett a transzgénikus állatok szeminális plazmájában, a könnyben és a nyálban.
4. Bizonyítást nyert, hogy egy CAG promóter által vezérelt szekrécións 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.

5 KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1. 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 nyúlon 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 spermiumok érése során bekövetkező 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 az örökítésére nincs káros hatással az ivarsejtekben kimutatott Vénusz fehérje, a gén a mendeli szabályoknak megfelelően öröklődik.

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

5.1.1. JAVASLATOK

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

Az SB-CAG-Vénusz transzgénikus nőstények petesejtjei közötti transzgén fehérje eloszlás megfigyelése elősegítené az intercelluláris hidak funkciójával kapcsolatos hipotézisek megerősítését vagy cáfolását.

Az SB-CAG-Vénusz homozigóta bak nyulak spermatogoniális őssejt transzplantációjával Vénusz fehérjét nem kifejező hímek hereszöveteibe jól

megfigyelhető lehetne a herében kialakuló sejt közötti hidak kialakulása, a sejtek közötti kapcsolatok és akár az intercelluláris hidak funkciója.

5.2. 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, eredményeiket megerősítették az mCherry SB-CAG konstrukcióval létrehozott sertések tejében (Mukherjee *et al.*, 2016). Eredményeinkre, valamint Mukherjee és munkatársai eredményeire (Mukherjee *et al.*, 2016) támaszkodva elmondható, hogy a szekréción szignál peptidet nem tartalmazó CAG promóter szabályozta konstrukciókkal létrehozott transzgénikus állatok expressziós mintázata a vizsgált egér, nyúl és sertés tejben fajspecifikus különbségeket mutat, melynek oka lehet a tejben előforduló különböző szomatikus sejtszám, és sejttípus eloszlás (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 epitel 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 szekréción útvonalon sem megy át, mivel a konstrukció nem tartalmazott szekréción szignál peptidet sem. Ez akár a termelődő rekombináns fehérje előnye is lehet. A szövetspecifikus promóter irányítása alatt termelődő rekombináns fehérje a transzgénikus állati rendszerben átmegy 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 konstrukcióval kifejeztetve különbözőképpen ment végbe (Van Cott et al., 1999). A β -Kazein promóter irányította konstrukcióval létrehozott humán antithrombint termelő transzgénikus kecskénél is megfigyelték a glikozilációs folyamat heterogenitását (Zhou et al., 2005). A nem tökéletesen lezajló poszt-transzlációs módosítások károsíthatják, a rekombináns fehérje aktivitását, megváltoztatják immunogenitását.

Az általam vizsgált transzgén kifejeződés 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 CAG promóterrel vezérelt konstrukcióba épített loxP kazetta teszi lehetővé a specifikus gén kifejeződést, a magas transzgén aktivitásért pedig a CAG promóter felel. Az új rendszer akár egy kazettára is kombinálható, vagy bináris megközelítésben is használható (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 transzgénikus 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.

5.2.1. JAVASLATOK

SB-CAG-Vénusz transzgénikus 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.

6 FELHASZNÁLT IRODALOM

- “ATryn (Antithrombin (Recombinant)) FDA Approval History - Drugs.com”.
(n.d.), available at: <https://www.drugs.com/history/atryn.html> (accessed 6 August 2018).
- 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., 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Garrels, W., Holler, S., Taylor, U., Herrmann, D., Struckmann, C., Klein, S., Barg-Kues, B., et al. (2011), “Genotype-independent transmission of transgenic fluorophore protein by boar spermatozoa.”, edited by Mueller, F. *PloS One*, Vol. 6 No. 11, p. e27563.
- Garrels, W., Mátés, L., Holler, S., Dalda, A., Taylor, U., Petersen, B., Niemann, H., et al. (2011), “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., Ziegler, M., Most, I., Forcato, D.O., Schmeer, M., Schleaf, M., et al. (2016), “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.
- 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.
- 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., Hiripi, L., Hoffmann, O.I., Mátés, L., Yau, T.Y., Bashir, S., Zidek, V., et

- al. (2014), “Germline transgenesis in rabbits by pronuclear microinjection of Sleeping Beauty transposons”, *Nature Protocols*, Vol. 9 No. 4, pp. 794–809.
- 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.
- Le Jan, C. (1996), “Cellular components of mammary secretions and neonatal immunity: a review.”, *Veterinary Research*, Vol. 27 No. 4–5, pp. 403–17.
- “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.
- 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.
- 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.
- 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.

“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.

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.

7 MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

7.1. 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. **IF.: 1,042**
- 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. **IF.: 2,766**
- 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. **IF.: 2,197**
- 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. **IF.: 2,533**
- 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. **IF.: 2,806**
- 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. **IF.: 1,646**
- 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. **IF.: 3,730**
- 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. **IF.: 2,807**

Összes **IF.: 19,527**

7.2. 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 higitók 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) „Bétalaktoglobulin genetikai polimorfizmus vizsgálatok hazai awassi és racka juhokban.” *Animal welfare ethology and housing systems* 4:(2) pp. 437-444.

7.3. 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 poszterek 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, Orsolya 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 poszterek 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. *Fiatál 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. *Fiatál 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. *Fiatál 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 tenyésztési programok – 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, Bősze Zs: Géntechnológiai módosítás hatása a nyúl sperma 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 Gózca, Szilárd Bodó, László Hiripi, Zsuzsanna Bősze: 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, Bősze 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 nyúl sperma 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, Bősze 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, Bősze 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, Bősze 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, Bősze 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 LÉjard, 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

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.