

Ph. D. értekezés

Katona Róbert

Anti-HIVgag-ribozim transzgénikus egér

Kezdeti lépések szatellit DNS alapú mesterséges kromoszómákat hordozó transzgénikus egér előállítására

Témavezető: Dr. Hadlaczký Gyula

MTA Szegedi Biológiai Központ, Genetikai Intézete

1998

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3.
1.1. Célkitűzések	3.
1.2. A transzgénikus egér előállításának módjai	4.
1.3. Antiszensz RNS-ek, katalitikus RNS-ek, mint terápiás eszközök	6.
1.4. Génterápia	10.
2. Anyagok és módszerek	27.
2.1. Anyagok	27.
2.2. Módszerek	28.
2.2.1. Citológiai <i>in situ</i> hibridizáció	28.
2.2.2. Transzgénikus egér előállítása DNS oldat egér zigóták hím pronukleuszaiba történt mikroinjektálásával	31.
3. Eredmények	52.
3.1. Az anti-HIVgag-ribozim transzgénikus egér előállítása a pCePur132 plazmid DNS-t tartalmazó oldat egér zigóták pronukleuszaiba történt mikroinjekciójával	52.
3.2. Expresszió vizsgálatok	60.
4. Eredmények megvitatása	65.
5. Összefoglalás	69.
6. Summary	69.
7. Köszönetnyilvánítás	70.
8. Irodalomjegyzék	71.
8.1 Saját közlemények	71.
8.2 Az értekezés témaköréhez kapcsolódó egyéb közlemények	71.

1. Bevezetés

1.1 Célkitűzések

A Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézete Kromoszóma Csoportjának fő kutatási témája az itt kifejlesztett mesterséges kromoszómák (1, 3, 29, 70) szerkezetének vizsgálata és génterápiái, illetve biotechnológiai célokra történő lehetséges felhasználásának tanulmányozása. E kísérletek során vizsgáljuk a mesterséges kromoszómák stabilitását, emlőssejtekbe történő átvitelének módjait, valamint mesterséges kromoszómát minden sejtjében hordozó, illetve utódjaikba átörökítő transzgénikus állatok előállításának lehetőségeit. A csoport munkája során sikerült olyan mesterséges kromoszómákat előállítani, amelyek csaknem teljes egészében egér pericentromerikus szatellit DNS szekvenciákból állnak, kivéve az alapvető szerkezeti elemeket (telomer, centromer, replikációs kezdőpontok), valamint a kromoszómákba transzformációval bejuttatott „idegen” DNS szekvenciákat. Az „idegen” DNS szekvenciák között található egy katalitikus RNS molekula (ribozim), amely képes az AIDS vírus RNS genomját a *gag* fehérjét kódoló régióban elhasítani (anti-HIVgag-ribozim) (12, 80). Mivel a *gag* fehérje a vírus egyik alapvető burokfehérjéje, így ennek hiánya megakadályozza a vírus összeszerelődését, a fertőzött sejtől való kijutását és végső soron a fertőzés átterjedését más sejtekre.

Feladatom, munkám célja olyan transzgénikus egér előállítása volt, amely genomjába integrálódva hordozza, és utódjaiba örökíti a pCePur132 plazmid konstrukciót. A pCePur132 plazmid tartalmaz két emlős szelekciós jelzőgént (puromicin, hygromicin rezisztencia gének), illetve az anti-HIVgag-ribozim „gén”-jét. Egy ilyen transzgénikus egér tanulmányozása hasznos információkkal szolgálhat a mesterséges kromoszómát hordozó egér előállításához, ugyanis ha a kifejeződött anti-HIVgag-ribozim az egér életfunkciói szempontjából fontos mRNS-ek között hasítható célszekvenciát talál, akkor az egér ki sem fejlődik, vagy károsodott lesz, vagy elpusztul. Ez félrevezető lehet a mesterséges kromoszómát hordozó transzgénikus

egér előállításánál. Ezen túl, a pCePur132 vektort hordozó egérben az anti-HIVgag-ribozim kifejeződése, illetve *in vivo* működőképessége tanulmányozható. Továbbá a vektorban található két domináns szelektálható gén olyan tápláló fibroblaszt sejtek izolálását is lehetővé teheti, amelyek mindkét szelektálható gént hordozzák, és azok ki is fejeződnek. Ezek a tápláló fibroblaszt sejtek felhasználhatók az embrionális őssejteken (ES sejtek) alapuló transzgénikus egér előállítási technológiában.

1.2 A transzgénikus egér előállításának módjai

A molekuláris biológia és az emlős embriológiai kutatások fejlődése lehetővé tette, hogy mintegy 15 évvel ezelőtt a két tudományterület közös útra lépjen, és a transzgénikus technológia bevonuljon az új módszerek tárházába. Az emlős transzgénikus munkák „háziállata” a házi egér (*Mus musculus*). Könnyű kezelhetősége, viszonylag rövid reprodukciós ciklusa és magas utódszáma miatt vált a transzgénikus munka ideális laborállatává. *A transzgénikus egerek olyan állatok, amelyek genomjukban kísérleti úton bejuttatott, idegen DNS molekulá(ka)t hordoznak.* Az idegen DNS bevitelének több módja is lehetséges.

Az első transzgénikus egeret SV40 virális DNS molekulák korai embriók blasztocöl üregébe történő mikroinjektálásával állították elő (44). Később egér embriókat retrovírusokkal fertőztek, és transzgénikus utódokat kaptak (43). Mások, totipotens teratokarcinóma sejteket DNS-el transzfektáltak, és a transzfekciót követő szelektációs lépés során kiválogatott sejteket injektálták egér blasztocisztákba (58). Ennek a megközelítésnek egy másik formája volt az, hogy a szelektált sejtekből származó sejtmagot egy olyan megtermékenyített petesejtbe ültették, amelyből előzőleg a pronukleuszokat eltávolították (54).

Jelenleg a legelterjedtebb és a legsikeresebben használt módszer az „idegen” DNS közvetlen mikroinjektálása megtermékenyített egér petesejtek pronukleuszaiba (25). Az

idegen DNS stabil kromoszómális beépülése folytán az injektálási kísérletből született egerek 10-40%-a tartalmazza a bejuttatott transzgént (7). A legtöbb esetben a beépülés az egysejtes embrionális állapotban történik, így a transzgénikus állat minden sejtje, beleértve az elsődleges ivarsejteket is, tartalmazza a bevitt idegen DNS-t. Az egerek kb. 20-30%-ánál azonban az integráció egy későbbi embrionális állapotban történik, így ezek az állatok mozaikosak lesznek az idegen DNS jelenlétét tekintve, vagyis csak bizonyos sejtek, szövetek tartalmazzák a transzgént (89). A beépült idegen DNS molekulák száma lehet 1, de akár több száz is. Ha több kópia épült be, akkor azok rendszerint egyetlen kromoszóma egy pontján található, de ritkán előfordulhatnak elkülönült integrációs helyek két különböző vagy ugyanazon a kromoszómán is. Az idegen DNS molekulák kópiái rendszerint fej-farok elrendeződésben helyezkednek el az integrációs helyeken.

Az eddig említett módszerek mellett a transzgén bejuttatása embrionális őssejteken (ES sejtek) keresztül is történhet. Az ES sejtekbe elektroporációval, retrovírus fertőzéssel (74) vagy lipofekcióval (84) juttathatnak idegen géneket. Ezt követően stabilan módosított ES sejtklónok izolálhatók, amelyet a megfelelő klónból származó 10-15 ES sejt blasztociszta állapotú egér embrióba történő injektálása követ. A megszületett transzgénikus utódok rendszerint erősen mozaikosak, de szerencsés esetben ivarsejtjeik hordozhatják a transzgént, amit utódjaikba örökíthetnek. A transzgén továbbörökítését mindkét jelenleg használatos technika esetében ellenőrző keresztezésekkel lehet megállapítani. Az ES sejtek használata akkor a legfontosabb, amikor ritkán bekövetkező integrációs eseményeket kell szelektálni (pl. homológ rekombináció). Néha azonban előfordul, hogy mozaikos (nem minden sejtjében, szövetében transzgénikus) állatra van szükség (pl. a transzgén domináns letális, így csak mozaikos állatban vizsgálható és tartható fenn), és ilyenkor célszerű ezt a módszert választani a kísérletekhez. A többi esetben a pronukleusz mikroinjektálásával hamarabb lehet eredményhez jutni, így többnyire ezt a módszert alkalmazzák transzgénikus egér vonalak előállítására.

Az ES sejt technológiának egy injektálást nem igénylő módját is leírták, az ún. aggregációs eljárást (90). Ebben az esetben az ES sejteket morula stádiumú embriókkal tenyésztik együtt egy éjszakán át. Másnap nevelő anyába ültetik az így kapott embriókat. A tenyésztés során az eleinte csak kívülről a morulára tapadt ES sejtek internalizálódnak, és maguk is részt vesznek az embrió (és később az egér) fejlődésében. Az aggregációs módszerrel közel azonos számú olyan egeret kaptak, amelyek az ivarsejtjeikben is hordozták a transzgéneket, és így örökíteni tudták azt utódjaikba, mint a blasztociszta injektálással. A módszer egy továbbfejlesztett változata, amikor az ES sejteket két tetraploid, morula stádiumú embrió közé helyezik („aggregációs tetraploid szendvics”), majd egy éjszakán át történő tenyésztés után nevelő anyába ültetik az ES sejt-morula aggregátumot. Az ezzel a módszerrel születő egerek 100 %-ban az ES sejtekből fejlődnek, mert a tetraploid sejtek az embrió fejlődése során elpusztulnak. Így a született egerek minden sejtjükben hordozzák a transzgént. Ez az eljárás azonban csak a szerzők által izolált R1 elnevezésű ES sejt vonal sejtjeit használva működik (66).

Az aggregációs módszer egyszerűbb mint az injektációs módszer, kisebb költséggel hajtható végre, kisebb kezűgyességet és kevesebb időt igényel. Ráadásul az „aggregációs tetraploid szendvics” technika 100 %-ban transzgenikus egerek előállítását teszi lehetővé, egy lépésben (66).

1.3 Antiszensz RNS-ek, katalitikus RNS-ek, mint terápiás eszközök

Két évtizeddel ezelőtt fedezték fel mikroorganizmusokban, hogy a genetikai információáramlás szabályozása komplementer RNS-RNS párosodás útján, vagyis ún. „antiszensz” módon is történhet. A mikrobákban megfigyelt antiszensz szabályozás létezése alapján feltételezték, hogy bármely gén működése megakadályozható antiszensz gátlással. Az első eredményes kísérletekben mesterségesen előállított antiszensz DNS molekulákat

alkalmaztak transláció gátlására *in vitro* (33, 67). Ezzel egy időben hasonló, de *in vivo* kísérletekben sikerült a Rous szarkóma vírus replikációját gátolni sejt kultúrákban (91). Mesterségesen előállított antiszensz RNS molekulákról először akkor mutatták ki, hogy gének expresszióját funkcionálisan képesek gátolni, amikor injektálással béka oocitákba juttatták őket (42, 55). Ezeket a tanulmányokat olyan kísérletek követték, amelyekben adott génre specifikus antiszensz RNS molekulákat sejten belül fejeztettek ki, és több különböző kísérleti rendszerben is képesek voltak specifikus gátlást előidézni velük (45, 49, 53). Az antiszensz technika legújabb módszerei közé tartozik a sejtek, szövetek kezelése olyan dezoxiribonukleotidokkal, amelyek különböző kémiai módosításokat tartalmaznak cukorfoszfát láncukban. Ezek a módosítások hatékonyabbá teszik az antiszensz DNS molekulákat az élő sejtekben. Egy másik új módszer a katalitikus aktivitású antiszensz RNS molekulák, vagyis ribozimok alkalmazása. Ezek nemcsak hozzákötődnek a komplementer RNS célmolekulákhoz, hanem egy meghatározott helyen el is hasítják azokat. Egy ribozim molekula több célmolekulát is elhasíthat és elvileg különböző eredetű (virális, bakteriális, parazita) betegségek leküzdésére is használható feltéve, hogy a cél-RNS molekula szekvenciája ismert.

Az első katalitikus tulajdonságú RNS molekulát a *Tetrahymena* preriboszómális-RNS-ének I-es típusú intronjában fedezték fel (50). Az intron bonyolult másodlagos szerkezete, valamint szekvenciája erősen konzervált (56). *In vitro* képes az önkivágódásra (41, 93), *in vivo* azonban ez csak fehérje faktorok közreműködésével játszódik le hatékonyan (51). Az intron másodlagos szerkezetének kialakulásához kétértékű kationok jelenléte is szükséges (főleg Mg^{2+} és Mn^{2+})(27).

Nem sokkal később azonosították *Escherichia coli*-ban az RNáz-P elnevezésű enzimet, amely a tRNS molekulák érési folyamatában játszik szerepet (28). Később kiderült, hogy az enzim minden élőlényben megtalálható. Feladata az, hogy a tRNS molekuláról helyspecifikus módon lehasítja az 5' vezető szekvenciát, és így alkalmassá teszi a tRNS-t az aminosav

megkötésére illetve, hogy részt vegyen a translációban (73). Az I-es típusú intronokhoz hasonlóan itt is fontos a kétértékű kationok (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}) jelenléte, amelyek valószínűleg a katalízis folyamatában, illetve az aktív szerkezet fenntartásában játszanak szerepet (46, 81). A különböző élőlényekből származó RNáz P enzimek az *E. coli*tól egészen az emberig egy RNS és egy fehérje alkotórészből állnak (16). Mivel az enzim RNS alkotórésze önmagában is képes az 5' vezető szekvencia lehasítására, így ez egy valódi ribozim, bár a fehérje alkotórész jelenléte fokozza az enzim hatékonyságát (22, 28).

Az utóbbi időben azonosították a ribozimok két újabb csoportját a viroidokat és a vírusoidokat. A viroidok olyan kis (~300 nukleotid) cirkuláris RNS molekulák, amelyek növényi fajokat fertőznek és betegítenek meg (17, 71). Nemcsak az RNS (72), hanem a cDNS is fertőző (15). Nem kódolnak ismert fehérjéket. A vírusoidok ~350 nukleotid hosszúságú cirkuláris RNS molekulák, amelyek a növényi szatellit RNS-ek egyik alosztályába tartoznak (76) és viroidszerű tulajdonságokat mutatnak. A legfontosabb különbség a vírusoidok és a viroidok között, hogy az előzőnek segítő („helper”) vírus jelenlétére van szüksége replikációjához. A viroidok és a vírusoidok, a korábban már említett I-es csoportba tartozó intronokhoz hasonlóan önhasító aktivitásúak. Feltételezések szerint, a vírusoidok és több viroid önhasító régiója, egy filogenetikailag konzervált ún. kalapácsfej („hammerhead”) szerkezetté hajtogatódhat, amely tartalmazza a hasítóhelyet is (20, 40). Később mágneses magrezonancia vizsgálatokkal igazolták a kalapácsfej-struktúra létezését (35, 68). Ez a másodlagos szerkezet különösen azért figyelemre méltó, mert ez a legkisebb ismert ribozim motívum. Három bázispárosodott ún. szárból („stem”), az azok végén elhelyezkedő hurkokból („loop”), illetve a szárat egymással összekötő egyszálú szakaszokból épül fel. Az egyszálú régió összesen 11 bázisból áll, amelyek közül 10 nukleotid erősen konzervált. A hasítóhely egyetlen, nem-bázispárosodott nukleotidnál helyezkedik el, amely két szár-hurok szerkezetet köt egymással össze, és szintén erősen konzervált. A hasítóhelyet megelőző két nukleotid is konzervált, és Watson-Crick féle bázispárosodásban vesz részt az egyik szárban. A három

hurokra a funkció szempontjából nincs szükség és működőképes kalapácsfej-ribozim állítható elő *in vitro* kettő- (32, 87), vagy háromféle (48) oligoribonukleotidból. Ezekben az esetekben az oligoribonukleotidok nem tartalmazták a hasítóhelyet, hanem szubsztrát RNS molekulákat voltak képesek hasítani, vagyis ön(cisz)hasítás helyett transz-hasítást tudtak velük elérni. Általában bármely RNS molekula, amely tartalmaz egy 5'-XUN-3' szakaszt (ahol X= A, C, G vagy U és N= A, C vagy U) elhasítható egy transz-aktivitású ribozimmal. A ribozimnak azonban tartalmaznia kell a cél-RNS molekulával a hasítóhely környékén homológ szakaszt, amely biztosítja a hasítás specifikusságát. A kalapácsfej ribozimhoz hasonló működésű, de eltérő másodlagos szerkezetű a dohány gyűrűs foltosodását okozó vírusoid. Ez a molekula nem kalapácsfej, hanem ún. hajtű szerkezetet képez (30).

Az eddig ismertett ribozimokon kívül azonosították még a hepatitisz delta vírus genomjából az ún. fejszefej ribozimot, a *Neurospora* mitokondriumából egy mitokondriális DNS plazmid által kódolt ribozimot, a *Tetrahymena*-ból egy olyan ribozimot, amely a riboszómális RNS molekulákérésében játszik szerepet, valamint élesztőben megfigyelték tRNS^{Phe} ólom-függő önhasító aktivitását (10).

Az említett ribozimok szerkezetének és tulajdonságainak vizsgálata olyan transz-aktivitású szintetikus ribozimok tervezéséhez és előállításához vezetett, amelyek hatékonyan és specifikusan képesek adott mRNS molekulákat inaktiválni *in vivo*. Ez egy új, nukleinsav bejuttatásán alapuló kezelési módot jelenthet a különféle betegségek megelőzésére és gyógyítására. A kezelés célpontjai lehetnek virális, bakteriális, parazita mRNS-ek, onkogének mRNS-ei, valamint hibásan működő gének mRNS-ei.

Jelenleg a legmegfelelőbb ribozim, amelyet ilyen célra fel lehet használni, a "kalapácsfej" ribozim, mivel mérete kicsi és mind szekvencia, mind pedig szerkezeti szempontból jól jellemzett (10). Adott mRNS molekulára specifikus "kalapácsfej" ribozim szintetikus úton előállítható, ha ismerjük a cél-RNS molekula szekvenciáját, és találunk benne olyan hasítóhelyet, amelyet a ribozim felismer és elhasít (32, 48, 87). A szintetikus

ribozimnak tartalmaznia kell a katalitikus aktivitásért és a megfelelő másodlagos szerkezet kialakulásáért felelős régiókat, valamint a ribozim molekula mindkét végén kb. 6-8 bp hosszúságú, a cél-RNS molekulával a hasítóhely környékén homológ szekvenciákat. Ez a homológia elegendő a specifikus hasításhoz. Több nem kell, mert az RNS komplexitása két nagyságrenddel kisebb a DNS-énél, így a nagyobb homológia akadályozná a ribozim disszociációját a cél-RNS-ről, márpedig a cél az, hogy egy ribozim molekula több cél-RNS molekulát is inaktiváljon (10). Az RNS molekulák hajtogatódásának szabályai ma még nem ismertek. A ribozim molekulák tervezésénél számítógépes programokat használnak és ezek segítségével próbálják megállapítani, hogy az RNS enzim képes lesz-e a célmolekulát elhasítani. Biztosat azonban csak akkor lehet mondani, ha a már szintetikusán előállított ribozimokat *in vitro*, illetve *in vivo* rendszerekben kipróbálták, és ott működtek.

1.4 Génterápia

Meghatározás:

Az utóbbi években a biológiai tudományok számos területén, de különösen a molekuláris biológiában, illetve a transzplantációs technológiák kidolgozásában és alkalmazásában tapasztalt fejlődés automatikusan maga után vonta egy új terápiai felfogás, a génterápia kifejlődését. Számos emberi betegség okát sikerült genetikai és molekuláris szinten is megérteni. Nemzetközi együttműködés keretében folyik az emberi genom térképezése, valamint szekvenciájának meghatározása (78), amely egyre több emberi betegség genetikai, biokémiai és molekuláris hátterét tárja fel.

Tágabb értelemben a génterápia az élőlények genetikai állományának, a betegségek alapvető genetikai okának javítását jelenti molekuláris biológiai, sejtbiológiai, biokémiai és/vagy immunológiai módszerekkel. Ez a definíció nemcsak az öröklődő betegségek gyógyítását foglalja magába, hanem a vírusos fertőzések által okozott megbetegedések (pl. AIDS), vagy a szomatikus mutációk hatására létrejött rákos megbetegedések megelőzését,

kezelését és gyógyítását is. Tágabb értelemben azonban ennek a meghatározásnak gazdasági vetülete is van, hiszen a haszonállatok genetikai anyagának javítása is ebbe a fogalomkörbe tartozik.

Története:

Az 1960-as években hozták létre az első genetikailag jelölt emlőssejt vonalakat, valamint ekkor dolgozták ki az első módszereket funkcionális DNS makromolekulák sejtekbe juttatására. Nem sokkal később felfedezték a transzformáló vagy „tumor” vírusok több osztályát, amelyek stabilan a megfertőzött gazdasejt genomjába építették saját genetikai anyagukat. A genetikai betegségek korrekciója a vírusok forгатókönyvéhez nagyon hasonló módon, a „javító” genetikai anyag megfelelő helyre történő beépítésével már egy újfajta terápiai módszer, a génterápia kezdeteit jelenti. Ekkor azonban még rengeteg technikai gát szabott határt a szárnyaló képzeletnek. A rekombináns DNS technológia megjelenése 1972-ben, azonban új utakat nyitott meg a gyakorlat számára. Az első klinikai génátviteli kísérlet végrehajtói azonban nem várták meg a rekombináns vektorok vagy más hatékony génátviteli módszerek megjelenését. Korai és téves járványtani adatokra támaszkodva, miszerint a Shope papilloma vírus egy argináz gént hordoz, Rogers és munkatársai (75) vad típusú Shope vírust injektáltak argináz hiányos betegségben szenvedő gyermekekbe. A kísérlet klinikailag sikertelennek bizonyult és az esetleges génátvitelre vonatkozó adatok hiányában, értékelhetetlen.

Rekombináns expressziós vektor első génterápiai alkalmazása Cline és munkatársai nevéhez fűződik (13). A β -globin gén nem virális, bakteriális plazmid vektorral történő bevitelét kísérelték meg néhány β -talasszémiában szenvedő beteg csontvelő sejtjeibe. Számos adminisztratív és technikai ok miatt ez a kísérlet is kudarc maradt mind orvosi, mind technikai szempontból.

Az első valóban sikeres génterápiai kezelés nem a rekombináns DNS vagy a molekuláris biológiai módszerek felhasználásával, hanem a ma rutinszerűen alkalmazott szövetátültetés módszerének kiterjesztésével történt. Thomas és munkatársai (86) 1986-ban bebizonyították, hogy lehetséges a talasszémiát tartós gyógyítása a csontvelő normális hematopoetikus őssejtekkel történő „újraterápiával”.

Az első engedélyezett emberi génszabványi kísérletet 1989-ben az Egyesült Államokban végezték, amely jelzőgénnel ellátott immunsejtek (NeoR/TIL - tumor infiltrating lymphocytes) bevitelével volt, előrehaladott stádiumú rákos betegekbe (77). A protokollnak két elsődleges célja volt:

1. Annak igazolása, hogy „külső” gén biztonságosan bevihető betegekbe.
2. A bevitt gén kimutatható-e a betegekből származó sejtekből.

Ezt egy évvel később, szintén az Egyesült Államokban, követte az első engedélyezett klinikai génterápiai kísérlet. Célja az adenzin-deamináz (ADA) enzim hiányának kezelése volt (6). A klinikai kísérlet, az ADA gén bevitelével „kijavított” saját T-limfociták intravénás infúziójával történt, de a már korábban is alkalmazott hetenkénti PEG-ADA kezelést sem hagyták abba. A „megjavított” T-limfocitákat rekombináns, az ADA gént hordozó retrovírussal történt fertőzéssel hozták létre. A protokoll adatai alapján a terápia sikeresnek bizonyult (4)

Azóta számos klinikai protokollt fogadtak el, és több megvalósítása folyamatban van (1996-ban 1000 beteget kezeltek.). Mielőtt azonban a génterápia az orvosi gyakorlat eszköztárába vonulna, még számos technikai és etikai kérdés vár megoldásra. Ezek közül a legfontosabbaknak Mulligen (64) a következőket tartja:

1. Génbeviteli módszerek fejlesztése.
2. Génterápiai klinikai előkísérletek kidolgozása.

Génbeviteli rendszerek, vektorok:

Több génbeviteli technológia is számításba jöhet a genetikai anyag emberi sejtekbe juttatása szempontjából. Ezeket a módszereket két nagy csoportra oszthatjuk fel. Virális és nem virális beviteli rendszerekre.

Virális beviteli rendszerek:

Retrovírus vektorok: A legjobban jellemzett virális génbeviteli technológia a retrovírusokból kialakított vektorokon alapul. A retrovírusok csak osztódó sejteket képesek fertőzni, sejt kultúrában csaknem 100%-os hatékonysággal. A vírus-DNS stabilan beépül a gazdasejt genomjába anélkül, hogy abban jelentős átrendeződéseket okozna. A vírusfertőzés maximális titere $\sim 10^6$ fertőző egység milliliterenként, ami korlátozza a fertőzhető sejtek számát, különösen *in vivo*. (59) A vírus által befogadható és „szállítható” maximális DNS mérete kb. 7000 bázispár (61). A retrovírus eredetű vektorok nem expresszálják virális fehérjéiket a gazdasejtben (36).

Hátrányai:

- csak osztódó sejteket fertőz
- alacsony titer
- a véletlenszerű beépülés elronthat hasznos géneket, vagy malignus transzformációt indíthat el
- fertőző vírus jöhet létre rekombináció útján a gazdasejtben
- a rekombináns retrovírusok szerkezetileg nem stabilak
- kicsi inzertméret
- a szérum komplement által gyors *in vivo* inaktiváció következhet be, így főleg *ex vivo* alkalmazható

- a vírus hosszú, ismétlődő végszekvenciáját (Long Terminal Repeat = LTR) használva promoterként a terápiás gén kifejeztetésére, az expresszió inaktiválása következhet be metiláció révén (37)

Adenovírus vektorok: Az adenovírusok nagy méretű (35 kb) dupla-szálú DNS vírusok, amelyek receptor-segített endocitózis révén jutnak be a sejtekbe. Ezt az endoszómák feloldása követi, majd a vírus genom a sejtmagba vándorol (61). Nem osztódó, posztmitotikus sejtek transzformálására alkalmasak. A rekombináns adenovírusok stabilak, és magas titer érhető el velük ($\sim 10^9$ - 10^{11} tarfolt képző egység milliliterenként). Nem épülnek be a gazdasejt genomjába, hanem episzómálisan maradnak fenn. Ezért csak ideiglenes expressziót tudnak biztosítani a terápiás géneknek. A vad típusú 4-es és 7-es adenovírusok biztonságosak, mivel semmiféle mellékhatást nem tapasztaltak olyan amerikai katonákon, akiket ezekkel a vírusokkal vakcináltak. Az elérhető legnagyobb inzertméret ~ 7 -8 kb. Az *in vivo* bevétel lehetséges.(36).

Hátrányai:

- kicsi inzertméret
- átmeneti (tranzien) expresszió
- onkogenitás veszélye
- replikáció kompetens, fertőzőképes vírus létrejöttének veszélye
- a permisszív gazdasejteket lizálja
- virális fehérjéit expresszálja a gazdasejtben (36)

Adeno-asszociált vírus (AAV) vektorok: Nagyon kicsi, egyszerű, nem-autonóm vírusok, melyek genetikai anyaga lineáris egyszálú DNS. Nem autonóm, mivel adenovírusokkal, vagy bizonyos egyéb vírusokkal (segítő vagy „helper” vírusok) történt együttes fertőzés esetén

képesek csak replikálódni. Az emberi populációban rendkívül elterjedt, de nem okoz semmilyen ismert betegséget. A vad típusú AAV képes beépülni a gazdasejt genomjába, „segítő” vírus jelenléte nélkül. A legtöbb esetben a 19-es emberi kromoszóma egy adott régiójába épül be. Hosszú távú expressziót képesek biztosítani, valószínűleg a beépülés miatt. Inzertméret ~4.5 kb. Nem osztódó sejtekbe juttatható *in vivo*. (36, 82)

Hátrányai:

- kicsi inzertméret
- az integráció helye veszélyes, mert a 19-es kromoszóma ezen régiója kapcsolatba hozható a krónikus B-sejt leukémiákban megfigyelt specifikus transzkációkkal
- a használható „helper” vírusok patogének, és szennyezhetik az AAV vírus preparátumot
- onkogenitás veszélye
- virális fehérjéit expresszálja a gazdasejtben (36)

Herpesz vírus vektorok: a központi idegrendszer nem osztódó sejtjeibe történő génbevétel céljára fejlesztették ki (21) a *Herpes simplex* vírus 1-es típusából, de képesek más sejteket is fertőzni, *in vivo* is (24, 36, 59). Az adenovírusokhoz hasonlóan episzómálisan maradnak fenn a sejtmagban, így az általuk biztosított expresszió tranziens. Inzertméret: >20 kb (36). Nem replikálódik a gazdasejtben (21).

Hátrányai:

- tranziens expresszió
- replikáció kompetens vírus kialakulásának veszélye
- virális fehérjéit expresszálja a gazdasejtben (36)

Retrotranszpozon vektorok: Polimeráz láncreakcióval (PCR = Polymerase Chain Reaction) történt génamplifikáció útján egér genomikus templátról állították elő az első ilyen vektort (Egér VL30 retrotranszpozonból)(11, 36). A módszer segítségével eltávolították az onkogén enhanszereket, a metilációs „sziget”-eket és a homológ rekombinációra lehetőséget adó szakaszokat, melyek replikációra képes retrovírus kialakulását segíthetnék elő. A vektorba neomicin markergént építettek, majd transzdukcióval egérsejtekbe juttatták, ahol az beépült a sejtek genomikus DNS-ébe, a retrotranszpozonnak megfelelő helyspecifikus módon (nem-véletlenszerű beépülés). Mivel metilációs szigetek nem maradtak a promoter funkciót ellátó LTR szekvenciában, így jelentős, metiláció által nem inaktiválható kifejeződést kaptak. A retrotranszpozon vektorokba építhető inzertméret nagyobb, mint a retrovírus vektoroknál (~9-10 kb), és viszonylag „biztonságos” vektor.

Hátránya:

- kicsi inzertméret

Baculovírus vektorok: Az *Autographa californica* baculovírust széles körben használják vektorként idegen gének kifejeztetésére rovarsejtekben, mivel a vírus gazdaspecifikus a rovarokra. Hofmann és munkatársai azonban kimutatták, hogy az emberi és a nyúl májsejtek is képesek specifikusan felvenni a vírust endocitotikus úton, *in vitro*. Más humán és rágcsáló sejtvonalak nem, vagy csak minimális felvételt, illetve expressziót mutattak (humán limfociták, humán és rágcsáló karcinóma sejtvonalak, egér fibroblasztok). Kísérleteikből az is kiderült, hogy a vírus promoter nem működik emlőssejtben. A bejuttatandó gének csak emlőssejtben működő promoter beépítésével fejeztethetők ki. A gének kifejeződése átmeneti, mert a vírus nem épül be a gazdasejt genomjába. A vírus nem replikálódik emlőssejtben és nem jelennek meg a virális fehérjék. Veszélytelenebb, mint más alkalmazott virális vektorok (38).

Emberi mesterséges episzómális kromoszómák (HAEC = Human Artificial Episomal Chromosomes)(85): A HAEC rendszer alapjául az Eppstein-Barr vírus szolgál, amely a legnagyobb méretű emberi vírusok közé tartozik. A látens, 172 kb méretű EBV genom dupla szálú, cirkuláris DNS molekulaként stabilan fennmarad a humán B-limfociták sejtmagjában. Az EBV látens replikációs kezdőpontja, az oriP, és ennek virális transzaktivátora, az EBNA-1, 5-45 kb méretű plazmidok episzómális replikációját tette lehetővé különféle emberi sejtekben (47, 92). A HAEC vektor csak az oriP-t tartalmazza, valamint marker géneket. A transzaktivátor EBNA-1-et az emberi sejt szolgáltatja. A HAEC vektor klónozó helyére nagy méretű emberi genomikus DNS darabok építhetők *in vitro*. A random genomikus DNS darabok mérete 60-650 kb között lehet (88). A genomikus inzertet tartalmazó vektor EBNA-1-et biztosító humán sejtbe transzformálható. A transzformáció hatékonysága 1-2 nagyságrenddel kisebb annál, amit a baktériumoknál és az élesztőnél megfigyeltek. A bejutott vektor a sejtmagban stabil, replikálódó episzómaként marad fenn, amely sejtosztódáskor az utódsejtekbe is átjut. A megoszlást valószínűleg az oriP szekvencia, illetve az EBNA-1 szabályozza. Ezen kívül az EBNA-1-nek van egy sejtmagi visszatartó funkciója is, amely az oriP-t tartalmazó plazmidokat a sejtmagban tartja. Az oriP szekvenciában azonosítottak egy mátrix kapcsolódási régiót is. A szegregációt valószínűleg a vektor nagy mérete is elősegíti. A HAEC plazmidok 50-100 kópiában fordulnak elő egy sejtben. Az egyes transzformáns sejtek átlagosan két féle HAEC plazmidot tartalmaznak. Jobb transzformációs módszerekkel valószínűleg ez sejtenként egy féle plazmidra csökkenthető. A rendszer alkalmas lehet nagy méretű genomikus DNS darabok klónozására, fenntartására és visszanyerésére. Funkcionális vizsgálatok is elvégezhetők a klónozott DNS darabok segítségével, illetve a genom térképezésben is alkalmas eszköz lehet a HAEC vektor rendszer. Nagy méretű DNS darabokat hordozó genomikus könyvtárak előállítására is alkalmas. Úgyszintén a mesterséges emlőskromoszóma funkcionális szekvencia elemeinek klónozására is felhasználható lehet (centromer, replikációs kezdőpontok). Ráadásul a funkció azonnal vizsgálható, mert a vektor emlőssejtben tartható fenn. Átrendeződések nélkül, akár 60 generáción keresztül is

fennmaradnak episzómaként. Lehetőségként felmerülhet génterápiai vektorként való felhasználásuk is.

Hátrányai:

- még nem eléggé kidolgozott rendszer, mivel két féle HAEC plazmid is lehet egy sejten belül
- a kópiaszám véletlenszerű, így szabályozott, stabil expressziót nem biztosíthat

Más vírusok génterápiai vektorként való alkalmazása is fejlesztés alatt áll, ilyenek például a papovavírusok (pl. SV40 vírus), vagy a vakcína vírus (61). A fent említett vírusok vektorként való felhasználása azonban jobban elterjedt.

Nem virális beviteli rendszerek:

A nem virális génátviteli módszerek különösen az *in vivo* DNS bevitel szempontjából fontosak. A „nem virális” génbeviteli rendszerek többsége az emlőssejtek természetes sajátosságára épül, vagyis a makromolekulák felvételének és sejten belüli szállításának képességére. A legfőbb előnyük a virális rendszerekkel szemben, hogy viszonylag biztonságosak (19).

A *receptor-függő génbevitel* a legígéretesebb módszer ezen eljárások közül. A módszer lényege, hogy a célsejt felszínén található specifikus receptor ligandját kovalensen polikationhoz (pl. polilizin) kötik, majd ezt a bejuttatandó DNS-hez kapcsolják elektrosztatikus kölcsönhatások révén, és a kapott komplex a receptor-ligand kölcsönhatást követően a természetes endocitózis segítségével a célsejtbe jut. Ez meghatározott sejtekbe, sejttypusokba történő célzott bevitelt tesz lehetővé. A probléma az, hogy rendszerint endocitotikus vezikulumok képződnek, amelyeket a sejt a lizoszómákba szállít, és ott az endoszómák tartalma degradálódik. Adenovírus fertőzéssel a bevitel hatékonyságát növelni

lehet, mivel az adenovírusok bejutásukkor képesek „feltörni” az endoszómákat. A bejutott gének kifejeződése átmeneti. A gazdasejt genomjába épülés azonban bekövetkezhet, amely az expresszió időtartamát jelentősen növelheti. (59). Az inzertméret elvileg korlátlan és nem képződhet replikálódó vírus. A virális fehérjék nem fejeződnek ki és nyugvó (nem osztódó) állapotban lévő sejtekbe is bevihető, *in vivo* is. E génbeviteli rendszer hátránya, hogy a biztonságos „célbajuttatás” még megoldatlan.

Liposzómák: A liposzómákat először 25 évvel ezelőtt javasolták és tesztelték terápiás anyagok beviteli rendszereként. Azóta a módszer jelentős fejlődésen ment keresztül, köszönhetően annak, hogy komponensei ártalmatlanok a sejtekre nézve, mivel nem toxikus és nem immunogén lipidekből állnak, valamint nagyfokú szerkezeti változatosság jellemzi őket, amely magában hordozza a széleskörű felhasználás lehetőségét. Főként ez utóbbi tulajdonság teszi lehetővé olyan liposzómák előállítását, amelyek alkalmasak a legkülönbözőbb terápiás anyagok *in vivo* bevitelére.

A hatékony célsejtekhez juttatáshoz három tényező szükséges (26):

1. A terápiás anyag liposzómában tartása a célhoz jutásig.
2. A liposzómák célba jutás előtti eltávolításának megakadályozása.
3. A terápiás anyag célsejtekbe való bejuttatása = specifikus „kézbesítés”.

1-2. Az egyik probléma az, hogy a plazmában található nagy sűrűségű lipoproteinek képesek kioldani a liposzómákból a foszfolipideket, ami a liposzómák széteséséhez vezet. Több koleszterol membránba építésével, illetve hidrofil tulajdonságú polioxoetilén polimerek felszínhez kötésével (kovalens kötés) megnövelhető a liposzómák élettartama a plazmában. A kisebb méret is növelheti a stabilitást. Egy másik probléma az, hogy a retikuloendoteliális rendszer (RES = Retikulo-Endothelial System) makrofágjai preferenciálisan felveszik a liposzómákat, így más célsejtekhez való eljuttatásuk nehézkes. Ennek elkerülésére, illetve késleltetésére dolgozták ki az ún. „stealth” vagy „lopakodó” liposzómákat, amelyek membránja galaktóz tartalmú glikolipideket és/vagy polietilén-glikolt tartalmaz, így a nettó

felszíni töltésük negatív. Minél tovább tud keringeni a liposzóma a vérplazmában, annál nagyobb a valószínűsége, hogy a célsejtekhez jut, és azok felveszik. A RES elkerülése bizonyos esetekben lehetséges, ha a megcélzott szövet anatómiailag elkülönült a szervezetben. Például közvetlenül juttathatók a liposzómák a húgyhólyagba karcinóma kezelésére, vagy a tüdőbe a cisztikus fibrózis kezelésére (57).

3. A célsejtek felismerése sejtspecifikus ligandok felszínhez kötésével érhető el:

receptorok ligandjai (pl. növekedési faktorok, hormonok) (83)

ellenanyagok (60)

vírus burokfehérjék (62)

A következő lépés, hogy a liposzóma ne csak a sejt felszínéhez jusson el, hanem képes legyen bekerülni a sejtekbe is. Erre alkalmas például a Sendai vírus F-fehérjéje, amely a sejtmembránnal történő fúziót segíti elő (5).

Mikor a liposzóma bejut a sejtbe, akkor a legtöbb esetben a liposzómákba kerül, és ott lebomlik. Ennek elkerülése végett állították elő a pH-érzékeny liposzómákat, amelyek a liposzómák belsejében tapasztalható savas közeg hatására fuzionálnak a liposzómák membránjával, és tartalmukat a citoplazmába ürítik (14). Egy másik megoldást kínálnak a kereskedelmi forgalomban is kapható „kationos” liposzómák (pl. Lipofectin), amelyek nettó felszíni töltése pozitív. Ezek könnyen fuzionálnak a sejtmembránnal, és így rögtön a citoplazmába ürítik tartalmukat. Így ugyan elkerülik a liposzómákat, de gyakorlatilag minden sejt membránjával képesek fuzionálni, ezért nem eléggé specifikusak. Jelenleg a liposzómákkal történő génbevitel csak átmeneti, nem szabályozott expressziót tesz lehetővé.

Fizikai módszerek:

Ex vivo módszerek:

- bejuttatás kalcium-foszfát-DNS „csapadék” segítségével
- elektroporáció

- sejtmagba lövés ún. „gén-puska” segítségével (integrációs mutagenézis, onkogének aktivációja lehetséges)

In vivo módszer:

- a bejuttatandó gének direkt injekciója (pl.: izomsorvadás kezelése)(csak ideiglenes expresszió)

Az eddigiek alapján megfogalmazhatók az ideális génterápiai vektor ismérvei:

- nagy befogadóképesség
- ne épüljön be a gazdasejt genomjába, vagy ha beépül, akkor irányítottan (pl. vagy homolog rekombináció révén, vagy funkcionális szempontból semleges genomiális régióba épüljön be)
- ne alakulhasson ki replikációra képes vírus
- ne indukálhasson rákos elváltozásokat a gazdasejtekben
- a virális fehérjék ne fejeződjenek ki
- a bejuttatott gének tartós és szabályozott (szövet, idő, fejlődési stádium specifikus) expresszióját biztosítsa
- *in vivo* bejuttatható legyen
- lehetőség legyen a célzott bejuttatásra (csak a megfelelő sejtek kapják) (Ez nem kritikus feltétel, mert ha a génexpresszió megfelelőképpen szabályozott, akkor a nem célzott sejtekben nem fognak kifejeződni a bejuttatott gének.)
- nem osztódó sejtekbe is bevihető legyen

Ezen feltételeknek leginkább a természet által már kifejlesztett genetikai anyag hordozók, a kromoszómák felelnek meg. Egy a sejtműködés szempontjából semleges, szerkezetileg alakítható, replikálódó, szegregálódó és stabil emlős mesterséges kromoszóma (Mammalian Artificial Chromosome = MAC) kielégítheti az ideális génterápiai vektorral szemben támasztott igényeket.

Mesterséges kromoszómák

Az első mesterséges kromoszómákat élesztőben állították elő szokványos rekombináns DNS technikák alkalmazásával, a kromoszómák működéséhez elengedhetetlenül szükséges alkotóelemekből, melyek a következők: az autonóm replikációt biztosító szekvenciák, centromer szekvenciák, telomerikus szekvenciák, illetve szelektálható „jelző” gének (65). A mesterséges élesztőkromoszómák (YAC $\hat{=}$ Yeast Artificial Chromosome) előállítására tett kísérleteket siker koronázta, mivel a természetes élesztő kromoszómák kis méretűek és minden alkotóelem, amely a kromoszómák funkcionális működéséhez szükséges, rendelkezésre állt. Ez azonban nem mondható el az emlős kromoszómákról. Sem a centromer funkció ellátásához szükséges DNS szekvencia, sem az autonóm replikációt biztosító szekvenciák nem ismertek. Egyedül a kromoszómák végét lezáró, azok stabilitását biztosító ún. telomer szekvenciája jól jellemzett (63). Emellett a legkisebb emlős kromoszóma is nagyobb annál, hogy a szokványos rekombináns DNS technológiával alkotóelemeiből össze lehessen építeni.

Több megoldást is javasoltak, amelyek segítségével emlős mesterséges kromoszóma elvileg előállítható (8).

Az egyik módszer lényege, hogy *Saccharomyces cerevisiae*-ben homológ rekombináció segítségével építik össze az emlős mesterséges kromoszómát YAC vektorokba klónozott, feltételezeten a megfelelő funkcióval rendelkező szekvenciákból. Ennek a módszernek megvan az az előnye, hogy klónozott szekvenciákat használ. A hátránya viszont az, hogy sikertelen kísérlet esetén nem lehet tudni, hogy melyik alkotóelem hibája miatt nem működik az így összeállított kromoszóma („bottom-up” = „lentől-felfelé” eljárás) (88).

Egy másik módszer a kromoszómák méretének csökkentése olyan vektor konstrukciókkal, amelyek linearizált formában egyik végükön emlős telomer szekvenciákat, másik végükön pedig centromer környéki szekvenciákkal homológ szekvenciákat, valamint e két szekvencia elem között szelekciós markergént hordoznak („top-down” = „fentről-lefelé”)

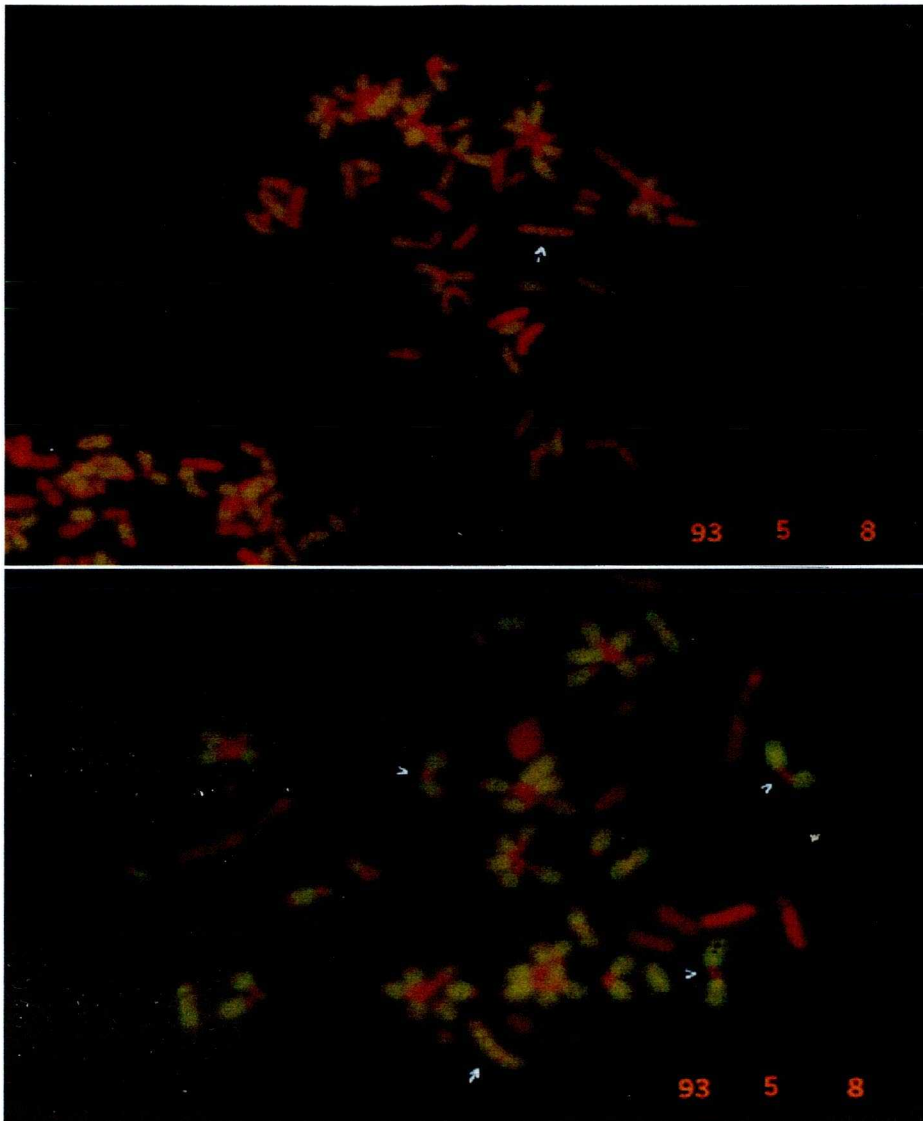
eljárás (87). A vektor és a célzott kromoszóma között lejátszódó homológ rekombináció az adott kromoszóma egy darabjának eltávolításával jár, míg az eltávolított régió helyére a vektor lép. A szelekciós markergén a vektort hordozó sejtklónok kiválogatására alkalmas. A megfelelő klónok azok, ahol az adott kromoszóma homológ rekombináció révén megrövidült. Ilyen esetekben a kromoszómák végét lezáró telomer szekvenciát a vektor biztosítja. Elvileg több kromoszóma-rövidítési ciklus után előállítható megfelelően kis méretű emlős kromoszóma, vagyis minikromoszóma, amely mindkét karjának végén a kromoszóma rövidítéséhez használt vektor szekvenciáit hordozza (18, 34). Az előállított minikromoszómák információt szolgáltatnak arról, hogy mi az a legkisebb méret, ami egy kromoszóma működéséhez feltétlenül szükséges, illetve, hogy a funkcionális kromoszóma milyen szekvenciákból építhető fel.

A következő lépés az, hogy a minikromoszómát átviszik egy olyan sejtbe, ahol homológ rekombinációval hatékonyan manipulálható. Ilyen sejt vonal például a DT40 B-sejt vonal, amelyet csirkéből izoláltak (9). Elvileg ezen a szinten a manipulációk révén megállapítható, hogy milyen szekvenciákra van szükség a centromer funkció ellátásához, vagy hogy milyen szekvenciákból épülnek fel a replikációs kezdőpontok. Ugyanakkor homológ rekombinációval nagyméretű DNS darabok is építhetők a minikromoszómákba, melyek aztán átvihetők más emlőssejt vonalakba, és így a minikromoszómák vektorként használhatók.

Egy harmadik lehetőséget vetettek fel Harrington és munkatársai mesterséges emlős kromoszómák előállítására (31). Azt találták, hogy ha humán α -szatellit DNS-t (amely az emberi kromoszómák centromer környéki heterokromatinjának felépítésében játszik szerepet), humán telomerrel és „hordozó” emberi genomikus DNS-el vegyítve emberi HT1080 sejtekbe transzfektálnak, akkor valamely eddig még meg nem határozott rekombinációs események eredményeképpen *de novo* minikromoszómák képződhetnek, amelyek rendelkeznek működőképes centromerrel. A kísérletből nem derül ki, hogy milyen szekvenciák felelősek az új centromer képződéséért, mivel funkcionális centromer, illetve minikromoszóma kialakulást

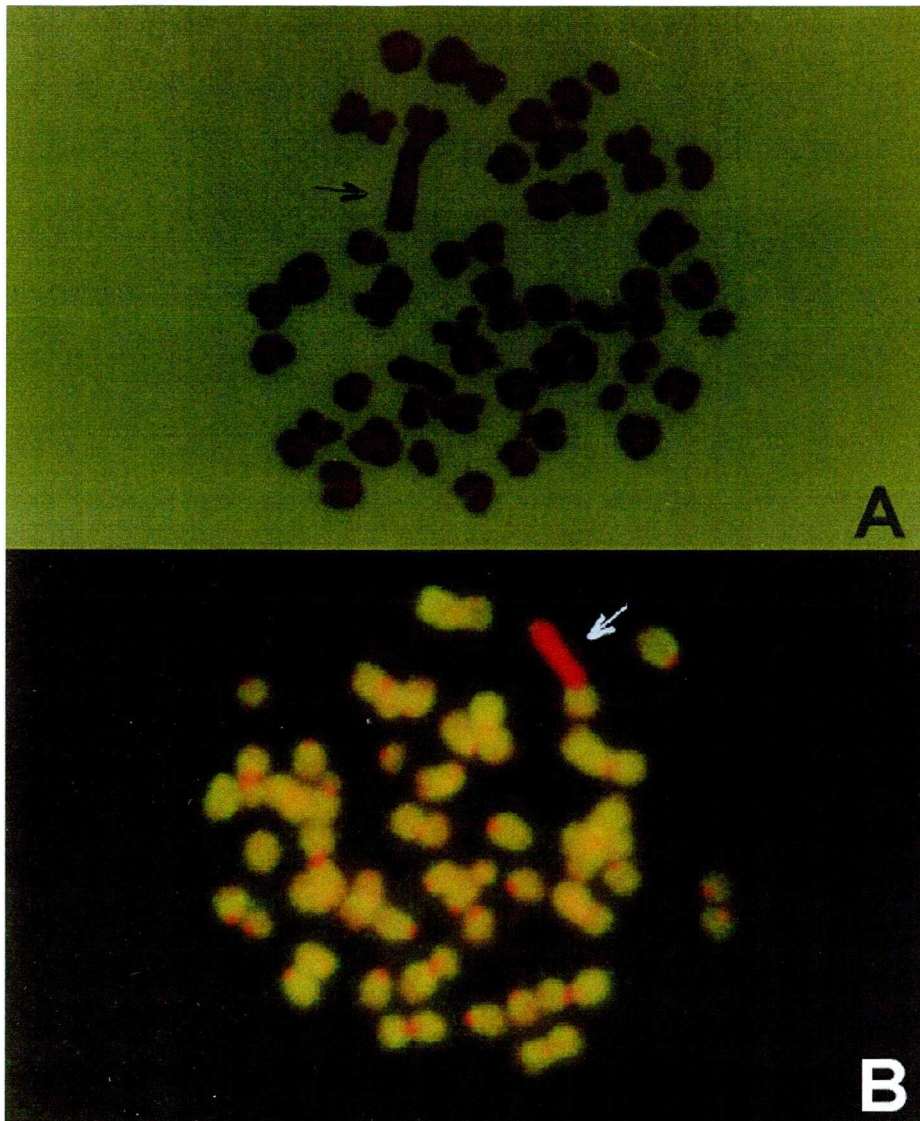
kizárólag a nem jellemzett genomikus DNS-t is tartalmazó „keverék” bevitele esetén tapasztaltak.

Csoportunkban az eddigiektől eltérő *de novo* kromoszóma képződési folyamatot tudunk előidézni emlőssejtekben (29, 70). Kísérleteink során kiderült, hogy a kromoszómák nagy léptékű amplifikációs folyamat során képződtek. Az amplifikációt az általunk használt sejtvonalakba transzfektált idegen DNS-nak, a kromoszómák centromerje közelébe történt beépülése váltotta ki. Ez az integráció valószínűleg egy magasabb rendű replikációs kezdőpont közelében történt, amely az egész centromerikus régió replikációját irányítja („megareplikátor”). Az eredmények arra engednek következtetni, hogy a nagyléptékű amplifikáció hátterében egy replikáció által irányított mechanizmus áll, amely magyarázatot adhat a megfigyelt *de novo* centromer képződésekre, illetve *de novo* kromoszómális szegmentek, valamint kromoszómák képződésére (1, 3). Az újonnan képződött kromoszómák stabilan fennmaradnak nem szelektív körülmények között is. A kromoszómák kialakulásának két formáját figyeltük meg (3), az eukromatikus illetve a heterokromatikus úton lejátszódott kromoszóma képződéseket. A különbség az, hogy az eukromatikus kromoszómák kialakulása esetén az amplifikációval nagy méretű (20-30 megabázis) eukromatikus szegmentek jöttek létre, így a képződött kromoszómák csaknem teljes egészében eukromatikus DNS-ből épülnek fel. Az eukromatikus amplikonokat egér pericentrikus szatellit DNS-ből álló keskeny sávok választják el egymástól (λ neo kromoszóma) (70). A heterokromatikus kromoszómák képződése esetén ennek a fordítottja történt. Az újonnan képződött kromoszómák heterokromatikus amplikonokból állnak, és az amplifikációs egységek határán helyezkedik el az ugyancsak amplifikálódott idegen DNS. Az így képződött kromoszómák csaknem teljes egészében egér pericentrikus szatellit DNS-ből épülnek fel. A *de novo* kromoszómaképződés e két formája jól elkülöníthető az általam előállított egér „genom-festő” próba segítségével (2). Fluoreszcens *in situ* hibridizációban próbaként használva, az egér kromoszómák eukromatin-



1. ábra KE1-2/4 metafázisos egér-hörcsög hibrid sejtek kromoszómáinak *in situ* hibridizációja biotinilált egér „genom-festő” próbával. A kép a fluoreszcens-izotiocianátot (FITC) gerjesztő fényt használva készült. A nyilak a *de novo* kromoszómaképződés eukromatinus útján létrejött λ neo kromoszómát, a nyílhegyek pedig az egér kromoszómák nem festődő pericentrikus régióit mutatják. A próbával egyáltalán nem festődő (piros) kromoszómák, hörcsög kromoszómák.

jára specifikus festést ad, még közeli fajok (pl. hörcsög-egér) hibrid sejtjeinek metafázisos kromoszóma preparátumain is (**1. ábra**). A próbára jellemző az is, hogy az egér kromoszómák pericentrikus heterokromatinját nem festi. Így az eukromatinus úton, illetve a heterokromatinus úton *de novo* képződött kromoszómák jellegzetes festési különbséget mutatnak egér „genom-festő” próbával hibridizálva. Az előző forma sávozottan festődik, mert



2. ábra. Egy, a heterokromatikus úton *de novo* képződött kromoszómát tartalmazó metafázisos egér sejt kromoszómáinak képe. **A,** A kromoszómák karbol-fuxinos festése. **B,** Hibridizáció biotinizált egér „genom-festő” próbával. A fluoreszcens-izotiocianátot (FITC) gerjesztő fényvel készült kép. A nyilak a heterokromatikus úton *de novo* képződött kromoszómakart mutatják. A fluoreszcens képen látható, hogy a kromoszóma csak az egyik kromoszómavégen festődik (sárga festődés).

az amplifikációval képződött nagy méretű eukromatikus blokkok festődnek, míg a blokkok határán található szatellit DNS-ből álló ugyancsak amplifikálódott szegmentek nem (**1. ábra**).

A heterokromatikus kromoszómák azonban nem, vagy csak a némi eukromatint tartalmazó telomerikus régiókban festhetők, mivel csaknem egészében pericentrikus heterokromatinból épülnek fel (**2. ábra**).

A szatellit DNS alapú mesterséges kromoszómák teljesen semlegesek a sejtműködés szempontjából, azt nem zavarják, és a szatellit DNS blokkok határán elhelyezkedő beépített gének kifejeződnek. Így a már korábban említett feltételek alapján alkalmasak lehetnek génterápiai vektornak.

2. Anyagok és módszerek

2.1 Anyagok

A, A DNS munkához szükséges anyagok és oldatok

A klónozások során felhasznált baktérium törzsek:

1. DH5 α
2. Esherichia coli SURE

Az injektáláshoz használt plazmid DNS molekula

Injektálási kísérleteinkben a csoportunkban előállított pCEPUR132 plazmid konstrukciót használtuk. Az injektálás előtt Nru I restrikciós endonukleázzal linearizáltuk.

Oldatok és táptalajok

A használt oldatok és táptalajok a 79. referencia alapján készültek.

A kísérletekhez használt restrikciós endonukleázok

Minden alkalmazott endonukleáz az Amersham, Fermentas illetve a New England Biolabs cégek terméke. Munkánk során az általuk javasolt puffereket és kísérleti körülményeket használtuk.

B, A transzgénikus munkához használt anyagok és oldatok

A transzgénikus munkához felhasznált anyagok, illetve oldatok a 38. hivatkozás alapján készültek.

2.2 Módszerek

2.2.1 Citológiai *in situ* hibridizáció (69)

1. Sejt

Bármilyen sejtet használhatunk. A sejteket 5µg/ml végkoncentrációjú kolhicinnel 4-6 órán át blokkoljuk. Ezek után a tenyésztő csésze aljától elvált metafázisos sejteket centrifugálással összegyűjtjük. A szokásos 75 mM-os KCl oldatban végzett hipotonizálás után, a sejteket metanol:ecetsav 3:1 arányú oldatával fixáljuk. (Ha előtte más fixálás volt, pl. immunológia miatt csak metanol vagy acetone, akkor célszerű óvatosan újra fixálni.)

2. Próba jelölés

A próba jelölését Amersham Nick-Translation Kit-el (ANTK) (N-5500, Amersham), a mellékelt leírás alapján végezzük. SIGMA bio-11-dUTP-t építettünk a próbába. (Törzsoldat: B 5770 SIGMA, 500µg-ot feloldunk 300µl steril desztillált vízben. -20 °C-on tároljuk. Ebből 0.8-1 µg-ot mérünk a reakcióba.). 2 óra 16°C-on végzett inkubáció után a reakciót 0.2 M végkoncentrációjú EDTA hozzáadásával leállítjuk és 1ml-es térfogatú SEPHADEX G-50 (Pharmacia) oszlopon szeparáljuk a próbát a beépületlen nukleotidoktól, a gyártó által javasolt módon. A szeparált próbát 1/10 térfogat 5M ammónium-acetát és 2-3x-os térfogat -20°C-os 95%-os etanol hozzáadásával -20°C-on kicsapjuk. A kicsapódott DNS-t mikrocentrifugálással (14000rpm, 5 perc) gyűjtjük, majd ismét etanolt adunk hozzá (mosás). Újabb centrifugálás után a csapadékot vákuum szárítóban megszáritjuk, majd TE pufferben oldjuk fel (0.5µg-ot 50µl-ben, 1µg-ot 100µl-ben).

3. Preparátum

Minden mintához egy jó minőségű tárgylemezt 100ml etanolt és 1ml 37%-os sósavat tartalmazó oldatba áztatunk, majd tiszta vászonnal szárazra töröljük. Azonnal egy csepp fixált sejtszuspenziót cseppentünk rá 10-15 cm-ről. A lemezt hideg fixálóval leöblítjük és levegőn megszáritjuk.

4. Hibridizáció

RNáz-A kezelés: DNáz mentes RNáz-A előállítás: 10mg RNáz-A-t (SIGMA) feloldunk 1ml 2xSSC-ben, majd 5 percen át forraljuk. A lemezeket 37°C-on, 60 percen át kezeljük 100ml 2xSSC-t és az előzőek alapján elkészített 100µg/ml koncentrációjú RNáz-A-t tartalmazó festőküvetében. Ezt követi a dehidráció 70-90-100%-os etanolban 5-5 percen át. Végül vákuumban szárítjuk a lemezeket.

Denaturálás: 70% Formamide (BDH AnalaR) + 30% 2xSSC hozzáadásával 2percen át, 70-75°C-on. Dehidráció mint fent, de a 70%-s alkoholt előtte jégbe hűtjük. Szárítás vákuumban.

Proteináz-K kezelés: Nem feltétlenül szükséges, de használata esetén tisztább hibridizációt kaphatunk. 60ng/ml (6-600ng/ml is lehet) koncentrációjú Proteináz-K-val kezeljük a lemezeket 4-7 percig 37°C-on, a következő pufferben: 20mM Tris pH:7.5, 2mM CaCl₂. Dehidráció, szárítás a fentiek alapján.

Egy lemezre a következő módon elkészített próbát mérjük:

20µl DF

8µl SB

0.8µl tR

2.5µl Biotinilált próba DNS

8.7µl Desztillált víz (steril)

Rövidítések jelentése:

DF=100% Formamid-ban 20% Dextran sulphate

SB=10XSSCB: 1.5M NaCl(8.76g), 0.15M tri-Na-citrát(4.4g), 0.25M

TRIS-HCl pH:7.4(3.02g), 0.5mM EDTA(16mg) 100ml-re.

tR= tRNS 25µg/µl SIGMA vagy Calbiochem, kifenolozni, -20°C-on tárolni.

Próba DNS = egy példányban jelenlévő gén detektálásnál 11.2µl-t is lehet használni a desztillált víz rovására, ha még ez sem elég akkor az 1µg jelölt DNS-t nem 100µl-ben hanem csak

50 vagy akár 10 μ l-ben kell feloldani, így 2-10x-es próbamennyiségekkel lehet dolgozni. Végző soron 25 μ g/ml próbakonzentrációt is el lehet érni, a szokásos 0.2-2 μ g/ml helyett.

A megkevert hibridizáló elegyet Vortex-el jól összekeverjük és lezárt Eppendorf csőben 72°C-on denaturáljuk 5 percen át. Azonnal jégre tesszük a felhasználásig, hogy elkerüljük a renaturálást. A lemezre mérés után 24x32mm-es fedőlemezzel óvatosan lefedjük, majd a fedőlemezt gumiragasztóval körberagasztjuk. Amikor megszáradt a ragasztó a denaturáló formamidos oldattal nedves kamrát készítünk (pl. 18cm-es Petri csészében szűrőpapírral), majd a kamrát szigetelőszalaggal lezárjuk, és 37°C-on inkubáljuk 4-16 órán át.

5. Immunodetektálás

Hegyes csipesszel eltávolítjuk a ragasztót és a fedőlemezt. Ezt követően 4x3percig mossuk a lemezeket 50% formamidot és 50% 2xSSC-t tartalmazó oldatban. Majd 5 perc mosással kiöblítjük őket 4xSSC-t és 0.05% Triton X-100-at (4xSSC/Tx) tartalmazó oldatban, szobahőmérsékleten. Ezalatt megkeverjük a FAV oldatot (FITC-avidin (VECTOR): 1/500-ra hígítani 4xSSC/Tx pufferrel) és a BaA oldatot (Biotinilált anti-avidin (VECTOR): 1/100-ra hígítani 4xSSC/Tx). Lemezenként 40 μ l-t kell adni. Óvatos lefedés után 4xSSC/Tx-el nedvesített kamrában 37°C-on inkubáljuk őket 30-45 percig. Az inkubáció után lerázzuk a fedőlemezt, majd 3x2 perc mosás következik 4xSSC/Tx oldatban 42°C-on. A lemezekre 40-40 μ l BaA oldatot mérünk, majd lefedjük őket fedőlemezzel és nedves kamrában inkubáljuk 30-45 percig 37°C-on. A fedőlemezt újra eltávolítjuk, majd ismét 3x2 perc mosás következik 4xSSC/Tx oldatban, 42°C-on. A lemezekre 40-40 μ l FAV oldatot pipettázunk, majd ismét lefedés és inkubálás következik nedves kamrában 37°C-on, 30-45 percig. A fedőlemezt eltávolítjuk, majd a tárgylemezeket 3x2 percig mossuk 4xSSC/Tx oldatban 42°C-on.

6. DNS festés-lefedés

10mg para-fenilén-diamin-t 1ml PBS-ben feloldunk, majd ebből 100 μ l-t egy új Eppendorf csőbe rakunk és hozzámérünk 900 μ l desztillált vizet és 3 μ l propidium jodidot (1mg/ml-es

törzsoldat, sötét üvegben, 4°C-on tárolható). Ebből lemezenként 100µl-t kell használni szobahőmérsékleten, 10perc inkubációs időt használva. A propidium-jodidos festést 2-3 perces öblítés követi szobahőmérsékleten, PBS oldatban. Ezalatt meg lehet keverni az „anti-fading” lefedő oldatot, ami 100µl para-fenilén-diaminból és 900µl glicerolból áll. Ebből 2-3 cseppet teszünk lemezenként, majd buborékmentesen lefedjük őket fedőlemezzel, és a felesleges folyadékot szűrőpapír enyhe rányomásával távolítjuk el. Ezután a fedőlemezeket körömlakkal körbezárjuk. (Így a lemezek hetekig tárolhatók -20 °C-on.).

7. Mikroszkópia

Olympus fluoreszcens mikroszkóppal, kis nagyításnál a propidium jodid szűrőjénél kell megkeresni a sejteket, amelyek aztán immerziós objektívvel, a FITC (fluoreszcens izotiocianát) szűrőjével vizsgálhatók.

8. Fényképezés

A fényképezés Fujicolor HG 400-1600, vagy Kodacolor 400-1600-as színes negatívra (napfényes) történt. Egyes képek elkészítéséhez a Vysis cég CCD kamera rendszerét használtuk.

2.2.2 Transzgénikus egér előállítása DNS oldat egér zigóták hím pronukleuszaiba történt mikroinjektálásával

Ebben a fejezetben törekedtem a módszer részletekbe menő és saját tapasztalataimat is magába foglaló leírására. Mindezt azért tettem, mivel nem találtam részletes magyar nyelvű irodalmat a témakörben és úgy gondoltam, hogy így talán segíthetek másoknak, akik szintén ezzel a módszerrel szeretnének transzgénikus egereket előállítani.

A, Az egerek kezelése

Az állatok tartása, illetve az élő állatokon végzett kísérletes munka során törekednünk kell arra, hogy az állatoknak csak a szükséges minimális stresszt és fájdalmat kelljen elviselniük.

Megközelítés és biztos fogás

Az egyik kéz hüvelyk- és mutatóujja segítségével az egeret a farkánál fogva kiemeljük a tenyésztő dobozból. Az egér a doboz rácsozatára helyezve megpróbál a farkával ellentétes irányba menekülni, így finoman hátrafelé húzhatjuk. Ebben a helyzetben a másik kéz hüvelyk- és mutatóujjával a nyakánál a bőrt megragadhatjuk. A fül mögött a bőrt felfelé húzva, olyan szoros fogásra kell törekedni, hogy az egér a fejét ne tudja forgatni és így harapni se legyen lehetősége. A fogás utolsó lépéseként ugyanezen kéz negyedik és ötödik ujja közé helyezzük az egér farkát. Így az állat a tenyérben hanyatt fekszik és a hasán a bőr megfeszül.

Az egerek azonosítása

Több módszer is elfogadott az egerek jelölésére, hogy a későbbi munka során azonosíthatók legyenek. Az egyik, hogy egy kis fémtáblácskát csippentünk az állat fülébe, amelyen az azonosító jele található. A másik módszer, hogy a születése után nem sokkal, vagy egész fiatal korban a füléből csippentünk ki egy-egy darabot a megfelelő helyen, vagy a lábujjait csippentjük le egy alkalmas számozási rendszer alapján, illetve nagyszámú egér esetén mindkettőt alkalmazhatjuk.

Intraperitoneális injekció

A gyógyszerkészítmények szabályozott adagolásának legáltalánosabb módja a intraperitoneális injekció. A korábban leírtak alapján kézbe fogott állat alhasi részén, a combtól a köldök felé kb. 2-3 mm-re található hasi mélyedésnél célszerű az injekciós tűt a

hadúrbe vezetni. Az injekcióhoz általában 25-27-es méretű tűt és 1 ml-es fecskendőt használunk. Biztonságosan 0,01-0,02 ml térfogatú gyógyszeroldat injektálható a hadúrbe testsúlygrammonként.

Anesztézia

Többféle anesztéziás protokoll látott napvilágot az irodalomban. A legfontosabb követelmény a sebészeti érzéstelenítéssel szemben, hogy a beültetett embriókat ne károsítsa. Több éves tapasztalatszerzés után végül is az AVERTIN-t (tribromoetanol) választották ki, mint olyan anesztetikumot, amely a legnagyobb arányú túlélést teszi lehetővé embrió-beültetéskor. A sikeres műtéti altatáshoz kb. 0,015 ml 2.5 %-os AVERTIN-t szükséges a hasúrbe injektálni testsúlygrammonként. (Ez nagyjából 0,3 ml-t jelent egy 20 g-os nőstény vagy 0,4 ml-t egy 25 g-os hím esetében.) Ilyen körülmények között a műtéti beavatkozás elvégzésére minimum 25 perc áll rendelkezésre. Az időtartam azonban függ az egértörzstől, az egerek korától, nemétől, testsúlyától, a táplálék minőségétől. Az altatószer dóziséát mindenképpen be kell állítani ezen paraméterek alapján, hogy az altatás miatt bekövetkező halálozás minimális mértékű legyen.

Eutanázia

Az egereket az altatással kombinált cervikális diszlokációval lehet legkevésbé fájdalommentesen megölni, a következő módon : az elaltatott állatot az egyik kéz hüvelyk- és mutató ujjával a koponyája tövénél a tenyésztő doboz rácsozatára nyomjuk, majd a farkát erőteljesen hátra illetve egyidejűleg felfelé húzzuk.

B, A transzgénikus egér előállításához szükséges egércsoportok

Donor nőstények

Az első döntés, amelyet szükséges meghozni, amikor transzgénikus egér előállítása a cél, hogy melyik legyen az az egértörzs, amelynek nőstényeiből a mikroinjektáláshoz

elengedhetetlen megtermékenyített petesejtek származnak. Ha a genetikai háttér nem lényeges, akkor leggyakrabban F_2 hibrid zigótákat használunk injektálásra, amelyeket F_1 hibrid hím és nőtény egerek párosításával állítunk elő (például: [C57BL/6J x CBA/J] F_1 nőtény x [C57BL/6J x CBA/J] F_1 hím). Általánosságban kijelenthető, hogy a beltenyésztett egerek gyenge reprodukív teljesítménye miatt, a megtermékenyített petesejtek kinyeréséhez és a transzgénikus egerek előállításához valamint későbbi tenyésztéséhez az F_2 zigóták, illetve azok mikroinjektálása sokkal hatékonyabb (7). A donor nőténynek 4-6 hetesnek kell lennie, és rendszerint hormonkezeléssel szuperovuláltatjuk (C, alfejezet) őket, mivel egy természetesen ovuláló nőtény állat csak 6-10, míg a szuperovuláltatott 20-30 petesejtet ovulál. Így kevesebb donor nőtényre van szükség ugyanannyi zigóta kinyeréséhez.

Fertilis hímek

F_1 hibrid hímeket (például: [C57BL/6J x CBA/J] F_1 hímek) használunk erre a célra. Legalább 8 hetesnek kell lenniük, mivel a hímek ekkor érik el ivarérettségüket. Külön tenyésztő dobozban, egyesével ajánlatos tartani őket, hogy harc közben ne okozzanak egymásnak sérüléseket. Ha mégis csoportosan tartjuk a hímeket, akkor az első pároztatás előtt legalább egy héttel külön kell választani őket, mivel a domináns hím csökkenti a többiek tesztoszteron szintjét és így azok nemigen párzanak. A hímek körülbelül 1 évig használhatók.

Steril hímek

A steril hímek az álvemhes, recipiens nőtények előállításához szükségesek. Mindkét oldali ondóvezetékükből műtétilag eltávolítunk egy körülbelül 1 cm nagyságú darabot (vazektomizáció; C, alfejezet). A műtét a hímivarsejtek ürítését akadályozza meg. A vazektomizáció sikerességét tesztelő keresztezéssel ellenőrizzük. A vazektomizáláshoz használt hímek legalább 2 hónaposak legyenek. Egy-egy hím körülbelül 2 évig használható. Érdemes más szőrszínű hímeket választani erre a célra, mint amilyen a recipiens nőtény

szórszíne, mivel ha a hímre jellemző szórszín megjelenik az utódokban, akkor a vazektomizáció nem volt eredményes.

Recipiens nőtény („nevelő” anya)

Általában a már korábban említett F_1 nőtényeket (például: [C57BL/6J x CBA/J] F_1 nőtény) használjuk erre a célra. Vazektomizált hímmel való pároztatás után hormonálisan mutatják a vemhesség jeleit (álvemhesség), de nem termékenyültek meg. Ebben az állapotban alkalmasak az injektált zigóták petevezetőbe ültetésére, majd pedig kihordásukra, illetve a született utódok felnevelésére („nevelő” anyák). Recipiensnek a legalább 6 hetes nőtények használhatók.

C, Embriók termelése és kezelése

Természetes párosodás

Megfelelő fény-sötét ciklust alkalmazva a nőtény egerek 4-5 naponta ovulálnak és ekkor alkalmasak a megtermékenyítésre. A vagina mérete, színe és nedvessége alapján megállapítható, hogy éppen milyen stádiumban található a nőtény, mikor lesz ovuláció. A mindennapi gyakorlatban azonban egy-egy ivarérett hím és 1-3 ivarérett nőtényt rakunk össze egy tenyésztődobozba. Ha párosodtak, akkor az másnap ellenőrizhető, mivel a nőtény vagináját egy ún. „párási dugó” (kopulációs plug) zárja el, amely a hím magfolyadékából koagulálódott fehérjéből áll. A nem párosodott nőtényeket a hím mellett hagyhatjuk, mivel 4 nap alatt minden nőtény ovulál egyszer, így folyamatosan lehet párosodott nőtényeket „termelni” a munkához.

Szuperovuláció

A DNS mikroinjektáláshoz nagy mennyiségű megtermékenyített petesejtre van szükség. Ennek érdekében a donor nőtényeket megfelelő hormonkezeléssel szuperovuláltatjuk. A szuperovuláció indukálására legalkalmasabbak a 3-6 hetes, 12.5-14 g súlyú F_1 nőtények (például: [C57BL/6J x CBA/J] F_1 nőtény). A szuperovuláció több tényezőtől is függ, úgymint

az egerek korától, súlyától, a használt egértörzstől és a gonadotropinok injektálásának időpontjától. Ha a fényciklus reggel 7 órától este 7 óráig tart, akkor a már említett F₁ nőtények esetén, a következő időtáblázat alapján lehet sikeres szuperovulációt elérni:

Első hormoninjekció: 5 IU PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin):

Első nap, délután 3 és 5 óra között.

Második hormoninjekció: 5 IU HCG (Human Chorionic Gonadotropin):

Harmadik nap, délután 1 és 2 óra között.

Párosítás fertilis hímmel:

Harmadik nap, délután 5 és 6 óra között.

„Párási dugó” megfigyelése:

Negyedik nap, reggel 8 és 9 óra között.

A hormonokat intraperitoneális injekcióval juttatjuk az egerekbe. Ha a szuperovuláció sikeres volt, akkor a nőtények 80-100 %-a párosodik, és mindegyikből kb. 20 megtermékenyített petesejt vehető ki. A fenti protokoll alapján kapott megtermékenyített petesejtek a „párási dugó” detektálásának napján délután 1 és 6 óra között alkalmasak mikroinjektálásra. A használt gonadotropin hormonok közül a PMSG szerepe, hogy a tüszőérést serkentő hormon hatását idézze elő, míg a HCG a luteinizáló hormont helyettesíti.

Mikropipetták készítése

Embriógyűjtő és transzfer pipetták készítése

Az embriógyűjtő és transzfer pipettákat kemény üvegből készült kapillárisokból állítjuk elő (például: Corning, borosilicate glass; Cat. No. 70995-50).

1. A két végénél kézben tartott pipettát közép tájon gáz mikroégő lángjába tartjuk, amíg az üveg képlékennyé nem válik. Ekkor a kapilláris végeit ellenkező irányba húzzuk, és a kapillárist a lángból kivesszük. A kapilláris akkor jó, ha a középső részén elhelyezkedő vékony szakaszon a belső átmérő nagyobb, mint egy zigóta átmérője, de kisebb mint kettőé. Ebben az esetben a kapillárist közepén kettétörjük.

2. A megfelelő belső átmérőjű kapilláris végét gyémántceruzával egyenesre vágjuk úgy, hogy a kapillárist ott, ahol el akarjuk vágni a mutatóujjunk ujjbegyére fektetjük, majd forgatás közben finoman körbekarcoljuk a gyémántceruza hegyével. Ezután a kapillárist az egyik kezünkben tartva a másik kezünk mutatóujjának ujjbegyével a végét óvatosan hajlítsuk meg. Megfelelő erőhatásnál a kapilláris a gyémántceruzával körbekarcolt helyen, szerencsés esetben gyűrű alakban törik el. Célszerű úgy törni a kapillárist, hogy kb. 2-3 cm hosszúságú maradjon a vékony szakasz. Az így kapott pipettavég Microforge segítségével tovább finomítható. A pipettát érdemes a végétől 2-3 mm távolságban kb. 15°-os szögben meghajlítani.

Embrió tartó ("holding") pipetta

Mikroinjektáláskor az embriónak mozdulatlanak kell lennie, hogy az injektálókapillárist be lehessen vezetni a zigóta pronukleuszába. A mozdulatlanságot úgy érjük el, hogy az embriót a "tartó" pipetta végéhez rögzítjük szívóerő segítségével. "Tartó" pipettát 1 mm külső és 0.75-0.8 mm belső átmérőjű boroszilikát üvegből készítünk (például: Leitz; Cat. No. 520119). A "tartó" kapilláris a gyűjtő kapillárishoz hasonló módon készül. A különbség az, hogy a "tartó" kapilláris végén a belső átmérőt Microforge segítségével kb. 5-10 μm átmérőjűre szűkítjük, hogy a zigóták ne tudjanak a kapillárisba jutni a rájuk gyakorolt szívóerő hatására, hanem csak a kapilláris végéhez tapadjanak. Érdemes a "tartó" kapillárist is a végétől 2-3 mm-re kb. 15°-os szögben meghajlítani.

Mikroinjektálókapilláris

A mikroinjektálókapillárist vékony falú, belső filamentet tartalmazó kapillárisból készítjük, amelynek külső átmérője 1 mm, belső átmérője pedig 0.78 mm (pl.: Clark kapilláris; Cat. No. GC100TF-15). A mikroinjektálókapillárist mechanikus kapilláris húzó berendezés segítségével készíthetjük el. A paramétereket (fűtőszál hőmérséklete, húzóerő,

fűtés és húzás időtartama, húzás késleltetése) úgy kell a berendezésen beállítani, hogy a kapilláris a hegyénél a céljainknak megfelelő belső átmérőjű legyen a húzás után (általában 0.5-1 μm belső átmérő a jó). A kapillárisban található belső filament az injektálandó DNS oldat kapillárisba töltését egyszerűsíti mégpedig úgy, hogy ha a kapillárist a hegyével ellentétes végén a DNS oldatba mártjuk, akkor a belső filamentben az oldat a kapillaritás elve alapján egészen a hegyéig felszívódik, és így módon az oldat feltöltődik.

Pronukleusz állapotú embriók gyűjtése

A szuperovuláltatott, megtermékenyített donor nőstényeket cervikális diszlokációval (2.2.1. A, alfejezet) megöljük. Az egeret a hátára fektetjük és alhasi tájékon a bőrt kb. 5 mm-es szakaszon átvágjuk. A bőrt a metszésnél az egyik kéz mutató- és hüvelykujjával megfogjuk, míg a másik kézzel az állat két hátsó lábát rögzítjük. Az állat bőrét a metszéstől a feje fölé húzzuk. Így a belső szervek a hasfal felvágása után hozzáférhetőek. A hasfal felnyitása után a méh és a petefészek között elhelyezkedő mindkét oldali petevezetőt kivágjuk. A pete-

vezető tágulata, az ún. ampulla tartalmazza a megtermékenyített petesejteket. A kivágott petevezetőket M2 tápoldatban gyűjtjük. A petevezetőkből a zigótákat 300 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú hialuronidáz tartalmú M2 tápoldatba szabadítjuk ki úgy, hogy egy finom hegyű csipesszel az ampullához közel, a petevezetőt megfogjuk és a Petri-csésze aljához nyomjuk. Ezután az ampullát egy injekciós tűvel felhasítjuk. A megtermékenyített petesejtek és az őket körülvevő ún. kumulusz sejtek spontán kiáramlanak az ampullából. Egy hialuronidáz cseppben több petevezetőből is kivehetjük a zigótákat. Az üres petevezetőket el kell távolítani a cseppből. Néhány perccel később a hialuronidáz hatására a zigóták kiszabadulnak a kumulusz sejtek közül, és a csésze aljára ülnek. Ekkor gyűjtőkapillárisba szedhetők. Az összegyűjtött zigótákat enzim mentes M2 cseppekben mossuk azért, hogy a

hialuronidázt és az esetleges szennyeződések (pl.: vér) eltávolítsuk. Végül a kimosott zigótákat mikrocsepp kultúrába helyezzük és inkubátorban tároljuk a mikroinjektálásig.

Mikrocsepp kultúrák készítése

Mikropipettával M16 tápoldatból 20-40 µl-es cseppeket rakunk egy 35 mm-es steril szövettenyésztő csésze aljára. A mikrocseppeket paraffin olajjal fedjük be. Az így készült mikrocsepp kultúrát 37 °C-os inkubátorba helyezzük, amelynek légterében 5 % CO₂ és 95 % levegő található. A kimosott embriókat a mikrocsepp kultúra cseppjeiben tároljuk mikroinjektálásig, illetve mikroinjektálás után az injektált zigóták visszaültetéséig.

Vazektomizáció és az álvemhes nőtények előállítása

Az álvemhes nőtények előállításához olyan hímekre van szükség, amelyek nem képesek a nőtény petesejtjeit megtermékenyíteni. Ezt az ún. vazektomizációval lehet a legkönnyebben elérni.

Vazektomizáció:

1. A műtétre legalkalmasabbak a kb. hat hetes hímek, mivel ezeknél a zsírfelhalmozódás még csak kismértékű, és nem akadályozza az ondóvezeték lokalizációját. Jól „tenyésző” törzset érdemes választani (pl.: Swiss albínó). A kiválasztott állatot Avertinnel altatjuk (lásd: 2.2.1 A, alfejezet).

2. A hátára fektetett hím hasüregéből a heréket a herezacskóba nyomjuk, és a heréi felett a bőrt 70 %-os alkohollal mossuk. A hasra nehezéket teszünk (pl.: olló), hogy a herék ne vándoroljanak vissza.

3. A herezacskón a két here között hosszanti irányban vágást ejtünk.

4. A metszést az egyik here fölé húzzuk, és a herét borító kötőszöveti burkon is hosszanti vágást ejtünk.

5. A here kihúzását elkerülve, csipesszel megragadjuk az ondóvezetékét, és egy kb. 1 cm hosszúságú darabot kivágunk belőle.

6. A 4-5 pontokat a másik ondóvezetéken is elvégezzük.

7. A sebet sebkapoccsal zárjuk le.

8. Egy hét múlva a műtét sikeressége pároztatással ellenőrizhető.

Ha a műtét sikerült, akkor a hím nem képes spermát juttatni a nőténybe párosodáskor. Amikor egy nőtény egeret egy ilyen vazektomizált hímmel párosítunk, akkor a párosodást követő napon a „párási dugó” ugyanúgy látható, mint természetes párosodáskor, de a nőtény csak hormonálisan vemhes.

Embrióbeültetés álvemhes nőtény petevezetőjébe

1. Az állatok altatása a korábban már leírt módon történik. A nőtényt hassal lefelé egy mozgatható tárgyra (pl.: Petri-csésze teteje) helyezük, hogy könnyedén a sztereómikroszkóp alá lehessen tenni.

2. Amíg az állat el nem alszik, addig a beültetendő zigótákat petevezető transzferkapillárisba töltjük (10-30 zigóta/petevezető, a gyakorlattól függően; általában a beültetett zigótáknak csak 30 %-ából lesz utód). Ennek első lépése, hogy a mikrocsepp kultúrából a zigótákat M2 cseppekbe rakjuk és a paraffin olajtól megtisztítjuk. A transzferkapillárisba töltéskor először egy kis térfogat M2 tápoldatot szívunk fel, majd egy levegőbuborékot, utána újra M2 tápoldatot, majd egy újabb levegőbuborékot, ezután jönnek a zigóták minél sűrűbben egymás után, azokat követően pedig egyetlen levegőbuborék és újra egy kis térfogat M2 tápoldat.

3. Az elaltatott és a Petri-csészére helyezett állat hátát alkohollal megmossuk. A hátbőrön a gerincoszlop felett egy körülbelül 2 cm hosszúságú metszést ejtünk, majd a sebet egy alkohollal nedvesített papírtörölközővel áttöröljük, hogy a belekerült szőrszálakat eltávolítsuk.

4. A sebet az egyik oldalra húzva a hasüregben megkeressük a petefészek felett elhelyezkedő zsírcsomót. Horgas végű csipesszel megragadjuk a kötőszövetet a zsírcsomó felett, és ollóval egy kis metszést ejtünk rajta.

5. Egy tompa végű csipesszel megfogjuk a zsírcsomót, és kihúzzuk a petefészekkel, petevezetővel és a méh egy részével együtt a testüregből. A zsírcsomóra ezek után egy ún. szerafin csipeszt rögzítünk, és az egészet az egér hátára fektetjük úgy, hogy a petevezető felül legyen, és jól látsszon. Óvatosan emelve a Petri-csészét az egérrel együtt a sztereómikroszkóp tárgyasztalára helyezzük.

6. A sztereómikroszkóp segítségével megkeressük az ampullát a petevezetőn. Lehetséges, hogy a szerafin csipesszel a farok irányába kell fordítani a petefészket, hogy az ampulla láthatóvá váljon. Ha az ampulla nem fedezhető fel, akkor a nőtény nem ovulált. Az olyan párzás, amely ovuláció hiányában történt, nem ad sikeres álvemhességet, így az ilyen nőtények nem használhatók.

7. Ha az ampullát sikeresen megtaláltuk, akkor megkeressük a petevezetőnek azt a szakaszát, amelyik az ampulla és a petefészek között helyezkedik el (ampulla feletti szakasz). Ez a régió fakóbb színű, kisebb átmérőjű és erősebb kontrakcióban van, mint a petevezető ampulla és méh közötti szakasza. Az ampulla feletti szakaszt úgy forgatjuk, hogy a későbbiekben a transzferkapilláris jól hozzáférhető legyen. Egy vagy két csavarulattal az ampulla felett csipesszel megfogjuk a petevezetőt. A következő művelet viszonylag nagy gyakorlatot igényel és a másik kéz szerepe itt nagyon fontos. Ezen kéz hüvelyk- és mutatóujj közé egy hegyes kapillárist, vagy egy injekciós tűt (25-27-es méretűt), míg a mutatóujj és középső ujj közé a mikroinjektált zigótákkal töltött transzferkapillárist fogunk. Az utóbbi kapilláris egy gumicsövecske révén a szájhoz kapcsolt, hogy belőle a zigótákat ki lehessen fűjni. A hegyes kapilláris vagy az injekciós tű felhasználásával a csipesz felett közvetlenül a transzferkapilláris átmérőjénél egy kicsit nagyobb lyukat ejtünk a petevezetőn. Ekkor a szúrásra használt pipettát/injekciós tűt az asztalra ejtjük és a helyébe a transzferkapilláris

kerül, miközben egyfolytában a sebzés helyét figyeljük a mikroszkópon keresztül. A fentiek alapján készült lyukon bevezetjük a transzferkapilláris végét a petevezetőbe, és ha biztosan benne van, akkor egy megfelelő erejű fújással a zigótákat a petevezetőbe juttatjuk. Mivel a petevezető ezen szakasza erősen összehúzódott, így a kapillárisban lévő M2 médium a zigótákkal és levegőbuborékokkal együtt rögtön megjelenik az ampullában. Ha a transzferkapilláris betöltésekor felszívott mindhárom levegőbuborék látható az ampullában, akkor biztos, hogy minden zigóta belekerült. Túl nagy erővel nem érdemes a kapillárisba fújni, mivel akkor túl sok levegőbuborék kerül az ampullába. Ha nem sikerült a transzferkapillárist a petevezetőbe juttatni, akkor a csipesszel vegyünk fel új fogást az ampullához közelebb, ejtsünk új lyukat, és próbáljuk meg ott a zigótákat bejuttatni. Ezért minden eshetőségre számítva, érdemes két csavarulattal az ampulla felett elkezdni a fenti műveletet.

8. A sikeres beültetés után eltávolítjuk a szerafin csipeszt a petefészek feletti zsírcsomóról, és hagyjuk, hogy a kihúzott szervek maguktól visszacsússzanak a testüregbe.

9. A 4-8. műveleteket a másik oldalon is elvégzzük. (A kihordás valószínűségét növeli, ha mindkét oldali petevezetőbe ültetünk megtermékenyített petesejteket.)

10. Az egér hátán ejtett sebet sebkapoccsal zárjuk össze.

D, Transzgénikus egér előállítása DNS oldat egér zigóták hím pronukleuszaiba történt mikroinjekciójával

A mikroinjektáló berendezés

A mikroinjektáló berendezés mikroszkópból, mikromanipulátorból, a mikromanipulátorba illeszthető kapilláris adapterekből valamint fecskendőkből áll. Laboratóriumunkban Nikon inverted mikroszkópot használunk Nomarski optikával, amellyel olyan finom felbontás érhető el, hogy a pronukleusz membránja jól látható. Leitz mikromanipulátort és kapilláris adaptert használunk.

A tartópipetta működtetését szabályozó fecskendő

A tartópipetta adapteréhez egy műanyag csövön keresztül finoman szabályozható fecskendőt vagy olajpumpát csatlakoztatunk. Légmentesen feltöltjük az egész rendszert paraffinolajjal, majd az adapterbe erősítjük a tartókapillárist és azt is feltöltjük paraffinolajjal. A paraffinolaj oszlop és a finoman szabályozható fecskendő segítségével a zigóták könnyedén és óvatosan mozgathatók, ami a pronukleuszok megfelelő helyzetbe történő beállításához nélkülözhetetlen.

Az injektálókapszula működtetését szabályozó fecskendő

Az injektálókapszula adapteréhez műanyag csövön keresztül üveg, vagy műanyag fecskendőt csatlakoztatunk. Az adapterbe beleerősítjük a DNS oldattal töltött injektálókapszulát. A tartókapillárisal ellentétben ez a rendszer nem olajjal, hanem levegővel működtethető. A fecskendő dugattyújának összenyomásával légnyomás fokozható a rendszerben, és ennek hatására DNS oldat áramlik ki a kapszulából.

Az injektálandó DNS tisztítása (alkalikus lízis/PEG kicsapás)

A plazmid DNS tisztításához használt anyagok és oldatok:

- GTE puffer (50 mM glükóz, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)) (200 µl/cső)
- 0.2 N NaOH / 1% SDS (frissen készíteni) (300 µl/cső)
- 3.0 M Kálium-acetát (pH 4.8) (300 µl/cső)
- RN-áz A (DN-áz mentes) (10 mg/ml) (2 µl/cső)
- Kloroform (400 µl/cső)
- Izopropanol, 100%
- Etanol, 70%

-4.0 M NaCl

-13% PEG₈₀₀₀ (autoklávban sterilizálni)

-ioncserélt víz

-TB tápoldat (1 liter készítése: 12 g Bacto-tryptone, 24 g Bacto yeast extract, 4.0 ml glicerol 900 ml steril vízben oldva, utána autoklávozás. Ehhez adni 100 ml steril 0.17 M KH₂PO₄ és 0.72 M K₂HPO₄ oldatot).

1. A plazmid DNS-t tartalmazó baktériumot TB tápoldatba oltjuk, amely a megfelelő antibiotikumot is tartalmazza. (A baktériumok szaporítása történhet Erlenmeyer flaskában vagy 50 ml-es polipropilén csőben. A tápoldat térfogata ne legyen több, mint a flaska vagy a cső térfogatának 1/4-e, hogy a megfelelő oxigénellátás biztosított legyen a baktérium növekedéséhez.)

2. A baktérium kultúrából 1.5 ml-es térfogatokat Eppendorf csövekbe mérünk, és mikrocentrifugában 1 percig centrifugáljuk. A felülúszót eltávolítjuk. Egy Eppendorf csőben 4.5 ml baktérium kultúrából lehet a baktériumokat összegyűjteni, hogy az alábbi plazmid tisztítás kivitelezhető legyen.

3. Az ülepitett baktériumokat 200 µl GTE pufferben felfuszpendáljuk.

4. 300 µl 0.2 N NaOH/1% SDS oldatot adunk hozzá és a cső fel-le forgatásával a szuszpenziót addig keverjük, amíg fel nem tisztul. Ekkor 5 percig jégen inkubáljuk. (A tisztítási módszer egész folyamata alatt el kell kerülni a Vortex használatát azért, hogy ne töredezzon a kromoszómális DNS, amely szennyezheti a plazmid preparátumot.)

5. Neutralizáció: 300 µl 3.0 M kálium acetát (pH 4.8) hozzáadásával. Homogenizálás után 5 percig jégen állni hagyjuk.

6. 10 perc szobahőmérsékleten végzett mikrocentrifugálással gyűjtjük a sejttörmelékét. A centrifugálás után a csomóba gyűlt sejttörmelék steril fogpiszkálóval eltávolítható.

7. Az RNS-t 37 °C-on végzett 20 perces RN-áz-A (DN-áz mentes) kezeléssel távolítjuk el.

8. A fehérjék és szennyeződések eltávolítását kloroformos extrakcióval végezzük. 400 μ l kloroformot mérünk a mintára, majd a csövet kézzel forgatva összekeverjük a fázisokat. A fázisok elválasztását 1 perc mikrofugálással végezzük. A felső, vizes fázist új csőbe rakjuk és addig ismétljük a kloroformos extrakciót, amíg a fázishatáron szennyeződés figyelhető meg.

9. A DNS kicsapása egyenlő térfogat 100% izopropanollal történik. Rögtön az alkohol hozzáadása után 10 perc mikrofugálást végzünk.

10. A csapadékot 500 μ l 70%-os etanollal mossuk, majd vákuumban szárítjuk.

11. A kiszárított DNS csapadékot 32 μ l ionmentesített vízben oldjuk, majd 8 μ l 4 M-os NaCl és 40 μ l 13%-os PEG₈₀₀₀ hozzáadásával kicsapjuk.

12. 20 perc jégen történt tárolás után, a kicsapódott DNS-t 4 °C-on végzett 15 perces mikrofugálással gyűjtjük.

13. A felülúszó eltávolítása után a csapadékot 70%-os etanollal mossuk, majd vákuumban szárítjuk. Végül a DNS-t 20 μ l ionmentesített vízben oldjuk.

14. A fentiek alapján a transzgénikus munkához megfelelő tisztaságú DNS-t nyerhetünk.

DNS oldat

Az injektáláshoz használt DNS oldat koncentrációját úgy állítjuk be, hogy az 1-5 μ g/ml-es koncentrációtartományba essen. A DNS oldásához 5-10 mM Tris-t (pH=7.4) és 0.1-0.25 mM EDTA-t tartalmazó oldatot használunk. A DNS oldatot 0.2 μ m pórusméretű steril filteren szűrjük, hogy eltávolítsuk belőle az olyan részecskéket, amelyek az injektálókapilláris eltömődését okozhatják.

A DNS oldat mikroinjektálása a megtermékenyített petesejtek him pronukleuszaiba

Az injektálás megkezdése előtt a következők előkészítése feltétlenül szükséges:

- injektáláshoz előkészített, inkubátorban tárolt zigóták
- zigóta gyűjtőkapillárisok

- zigóta tartókapillárisok
- mikroinjektálókapiillárisok
- mikroinjektáló felszerelés
- injektálandó DNS oldat
- CO₂ termosztátban előinkubált paraffin olaj
- vált tárgylemezek mikroinjektáláshoz

1. Egy vált tárgylemez közepére M2 cseppet helyezünk, majd előinkubált paraffinolajjal lefedjük. Az inkubátorban tartott mikrocsepp kultúrából 10-20 zigótát kiveszünk és a tárgylemez M2 cseppjébe tesszük. A tárgylemezt a mikroszkóp tárgyasztalára erősítjük.

2. Kis nagyításnál (10x-es objektív) az élességet a zigótákra állítjuk be, majd a tartókapillárist a cseppbe merítve azonos optikai síkba hozzuk a zigótákkal. A tartókapillárisal egy zigótát elválasztunk a többitől és addig forgatjuk, amíg a hím pronukleusz (vagy mindkét pronukleusz) jól láthatóvá válik. A tartókapillárison keresztül gyakorolt szívó hatás segítségével a zigótát a kapilláris végéhez rögzítjük.

3. A rögzített zigóta zóna pellucidáját egy erőteljes nyomással átszűrva a mikroinjektáló kapilláris hegyét a pronukleuszba vezetjük és a hozzá kapcsolt fecskendőre gyakorolt nyomással DNS oldatot juttatunk bele (néhány picolitert). Az injektálás akkor jó, ha a pronukleusz kb. 1.5-2x-esére dagad. Ha a pronukleusz mérete nem növekszik, akkor vagy nem sikerült a kapillárist belejuttatni, és így a citoplazmába került a DNS oldat, vagy a kapilláris eldugult. A kapilláris átjárhatóságát úgy ellenőrizhetjük, hogy egy szabad zigóta széléhez közel visszük a hegyét, és DNS oldatot próbálunk kijuttatni belőle. Ha átjárható akkor a zigóta elfordul.

4. Óvatosan kihúzzuk a kapillárist a zigótából. Ha az injektálás sikerült, akkor a zigóta megőrzi eredeti színét és formáját. Az injektált zigótákat az M2 tápoldat cseppjének egy elkülönített részén gyűjtjük össze.

5. Ha a cseppben lévő valamennyi zigóta injektálásával végeztünk, akkor mikrocsepp kultúrában visszatesszük őket az inkubátorba, és a visszaültetésig ott tároljuk őket.

6. Az 1-5. pontokat a többi zigótával is megismételjük.

7. Az injektált zigótákat a már korábban leírtak alapján álvenhies nőstény petevezetőjébe ültetjük be (C, alfejezet).

E, A transzgén jelenlétének kimutatása

Egér genomikus DNS tisztítása egérfarokból

1. A mikroinjektált, visszaültetett zigótákból született egerek farkából 7-30 napos korban, egy körülbelül 0.5 cm-es darabot levágunk és azt egy megfelelő azonosítóval ellátott 1.5 ml-es Eppendorf centrifuga csőbe tesszük. Az egérfarokra 450 µl proteináz-K puffert (50 mM Tris.HCl, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, pH=8.0) mérünk.

2. Ezt követően a 10 mg/ml vízben oldott proteináz-K oldatból 50 µl-t adunk hozzá.

3. 55 °C-on 8-12 órán át inkubáljuk.

4. A proteináz-K kezelés után 500 µl fenolt mérünk a csőbe, majd körülbelül 1 percen át homogenizáljuk (Vortex).

5. Mikrofügalás: 3 perc, 13000xg.

6. A felső, vizes fázist óvatosan, hogy ne kerüljön bele fenol, vagy a köztes fázisban található anyag, új csőbe pipettázzuk.

7. A vizes fázishoz 500 µl 1:1 arányú fenol/kloroformot mérünk. 1 perc Vortex.

8. Mikrofügalás: 3 perc, 13000xg.

9. A felső, vizes fázist új csőbe rakjuk, majd 500 µl kloroformot mérünk hozzá. 1 perc Vortex.

10. Mikrofügalás: 3 perc, 13000xg.

11. Felső, vizes fázist új csőbe rakjuk. Majd 1 ml 95%-os, -20 °C-os alkoholt mérünk rá.

A DNS azonnal kicsapódik és kis rázogatós után, gombolyagszerű csapadékot képez.

12. Mikrofügalás: 1 perc, 13000xg.
13. A felülúszót eltávolítjuk, majd 500 µl 70%-os alkoholt mérünk rá.
14. Vortex és mikrofügalás után az alkoholt eltávolítjuk, és a DNS-t vákuumban megszáritjuk.
15. A kiszáradt DNS-t 40 µl TE-ben (10mM Tris.HCl, 1mM EDTA, pH=8.0) oldjuk.
16. A fentiek alapján készült DNS sok RNS-t is tartalmaz, de ez a restrikciós endonukleázokkal történő emésztést, illetve a Southern hibridizációt nem zavarja.

A transzgén jelenlétének kimutatása Southern (DNS-DNS) hibridizációval

A megfelelő restrikciós endonukleázzal emésztett egér genomikus DNS-t Hybond-N filterre kötöttük vákuumtranszferrel, majd radioaktív DNS-DNS hibridizációval mutattuk ki a transzgénnek jelenlétét. A vákuumtranszfert és a radioaktív DNS-DNS hibridizációt a 77. hivatkozásban leírtak alapján végeztük el.

A transzgén jelenlétének kimutatása polimeráz láncreakcióval (PCR)

A polimeráz láncreakció lényege, hogy hőstabil DNS polimeráz (pl. Taq, Pfu), és a cél DNS molekulában előforduló ismert szekvencia elemekkel homológ, DNS szálspecifikus oligonukleotidok segítségével, a cél DNS molekula primerek közötti szakaszát nagy példányszámban megsokszorozzuk. A reakció meghatározott méretű DNS molekulapopulációt eredményez, ami agaróz gélelektroforézissel kimutatható. Kísérleteinkben az injektált plazmid molekula egyik alkotóelemét, a puromicin gént választottuk a PCR reakció célszekvenciájául.

A PCR puffer összetétele (1 ml-re):

300 µl 1 M Tris-HCl (pH 8.5)

500 µl 100 mM β-merkaptóetanol

100 µl 10 mg/ml zselatin

5 μ l TWEEN-20

95 μ l steril ioncserélt víz

Az alkalmazott PCR reakció körülményei:

A PCR reakciókat egy Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600-as készülékkel hajtottuk végre, 100 μ l-es reakció-térfogatban.

A 100 μ l-es reakció-térfogat az alábbi összetevőket tartalmazta:

-10 μ l PCR puffer

-2-2 μ l a puromicin primerekből, amelyek koncentrációja 50 pmol/ μ l volt

(véggkoncentráció: 1 pmol/ μ l)

-1 μ l 25 mM dNTP mix (véggkoncentráció: 0.25 mM)

-8 μ l 25 mM MgCl₂ (véggkoncentráció: 2 mM)

-az egér genomikus DNS-ből kb. 1 μ g

-vagy Perkin Elmer AmpliTaq, vagy pedig Pfu hőstabil DNS polimerázt

használtunk

A reakciót a következő program szerint hajtottuk végre:

95 °C, 3 perc (elődenaturálás, a proteázok inaktiválása)

Majd 30 ciklus az alábbiak szerint:

95 °C, 30 másodperc (denaturálás)

65 °C, 45 másodperc (annealing)

72 °C, 1 perc (primer extenzió)

Végül 72 °C, 5 perc (a reakció befejezése), utána pedig 4 °C a minták eltávolításáig.

A reakció végeztével a reakció-térfogat 1/10-ét felhasználva, agaróz gélelektroforézissel ellenőrizzük a specifikus termék jelenlétét.

F, A transzgének expressziójának kimutatása:

A poliadenilált (poliA) vagy mRNS tisztítása

A poliA RNS preparátumok az INVITROGEN cég által forgalmazott FastTrack 2.0 mRNA Isolation Kit felhasználásával, a gyártó által megadott felhasználási útmutató alapján készültek.

A transzgének expressziójának kimutatása RT-PCR reakcióval

Az RT-PCR (= Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) kísérlet lényege, hogy a reakció során először reverz transzkriptázzal egyszálú DNS-t írunk át a templát RNS-ről, majd az egyszálú DNS-ről specifikus primerekkel amplifikáljuk a vizsgált gén szekvenciáját polimeráz láncreakcióval.

Kísérleteimhez a Boehringer-Mannheim cég által gyártott TITAN RT-PCR Kit-et használtam, a gyártó által javasolt módon.

Az RT-PCR reakcióhoz használt körülmények:

1. Reverz transzkripció: 50 °C, 30 perc.

2. "Hot" start: 95 °C, 2 perc.

3. PCR amplifikáció:

10 ciklus:

95 °C, 30 másodperc (denaturálás)

57 °C, 30 másodperc (primer-templát hibridizáció)

68 °C, 1 perc (primer extenzió)

25 ciklus:

95 °C, 30 másodperc (denaturálás)

57 °C, 30 másodperc (primer-templát hibridizáció)

68 °C, 1 perc 5 másodperc (primer extenzió). Minden ciklusban növelve 5-

5 másodperccel.

4. 68 °C, 7 perc.

5. 4 °C.

A PCR és az RT-PCR reakciókban használt primerek szekvenciái:

A hygromicin gén kimutatására használt primerek szekvenciái:

HygF primer:

5'-GAATCTCGTGCTTTCAGCTTCGAT-3'

HygR primer:

5'-GTTTCCACTATCGGCGAGTACTTC-3'

A puromicin gén kimutatására használt primerek szekvenciái:

PuroF primer:

5'-ATGACCGAGTACAAGCCCACGGTGCGC-3'

PuroR primer:

5'-TCAGGCACCGGGCTTGCGGGTCATGCA-3'

PacR primer:

5'-GAGGCCTTCCATCTGTTGCTGCGC-3'

Az anti-HIVgag-riboszim „gén” kimutatására használt primerek szekvenciái:

CCMV primer:

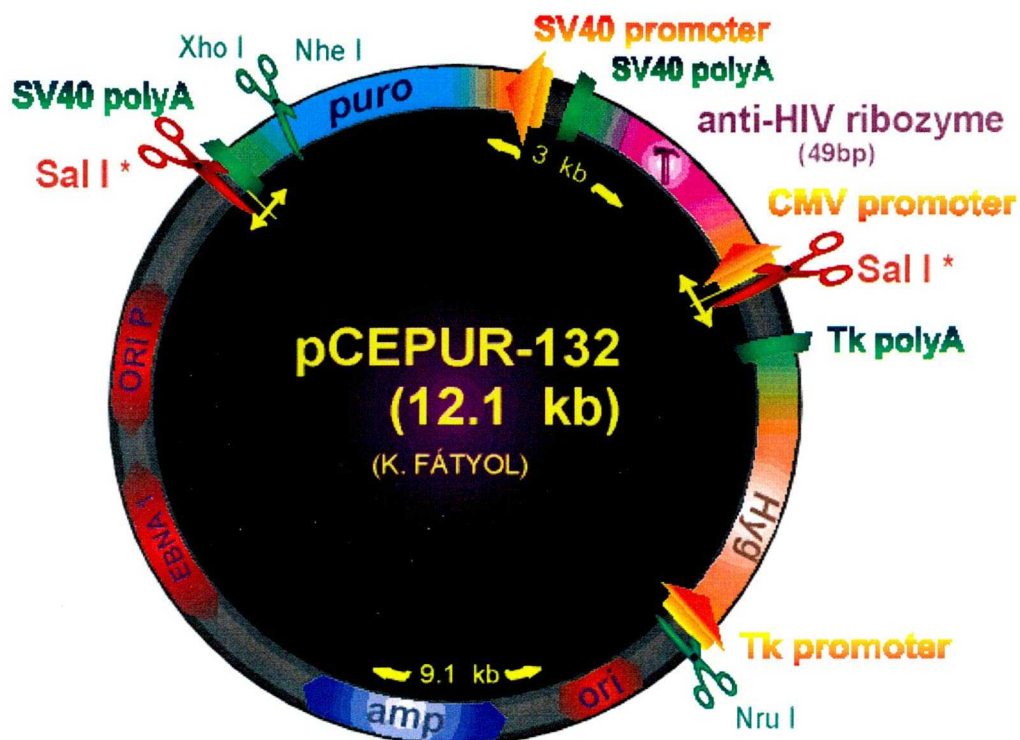
5'-CTGCAGCCCAAGCTTCGAGGGAT-3'

SV400929 primer:

5'-TGTCCAAACTCATCAATGTATC-3'

3. Eredmények

3.1. Az anti-HIVgag-ribozim transzgenikus egér előállítás a pCePur132 plazmid DNS-t tartalmazó oldat egér zigóták pronukleuszaiba történt mikroinjekciójával



3. ábra pCePur132 plazmid konstrukció

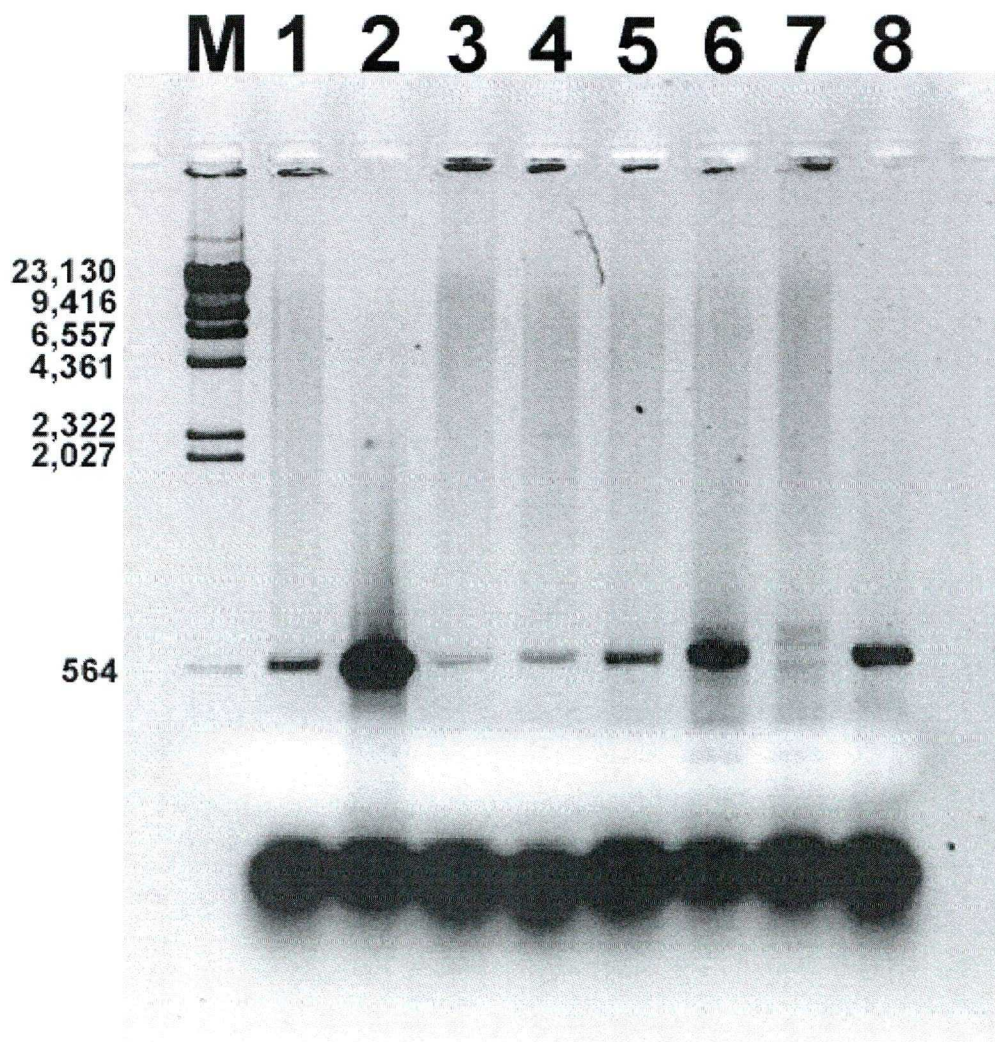
Homozigóta transzgenikus vonalak előállítása:

Mikroinjektálási kísérleteimhez a pCePur132 plazmid konstrukciót választottam. A konstrukció egy CMV promoterről működő anti-HIVgag-ribozim „gén”-t, két emlős szelekciós markergént (puromicin, hygromicin rezisztencia gének) és a baktériumban történő sokszorozáshoz szükséges alkotóelemeket tartalmazza (3. ábra). A pCePur132 vektort NruI restriktív endonukleázzal linearizáltam (3. ábra). Az NruI endonukleáznak egyetlen hasító helye van a vektorban, a hygromicin rezisztencia gén közelében. A linearizált vektor DNS-t alkoholos kicsapás és szárítás után 1-5 µg/ml-es koncentrációban, injektáló pufferben oldottam fel, majd 0.2 µm pórusméretű szűrőn (Sigma) sterilre szűrtem. A szűrő a nagyobb

No.	Mikroinjek- tálás napja	Visszaülte- tés napja	Injektált zi- góták száma	Túl- élt	Vissza- ültetett	Szüle- tett	Születés napja
1	95.09.14.	95.09.15.	90	23	23	0	
2	95.09.27.	95.09.28.	65	18	18	0	
3	95.09.28.	nem volt	116	26	0	0	
4	95.10.02.	95.10.03.	38	15	15	0	
5	95.10.03.	95.10.04.	95	50	50	6	95.10.23.
6	95.10.04.	95.10.05.	65	18	18	1	95.10.25.
7	95.10.06.	95.10.07.	55	26	26	1	95.10.27.
8	95.10.09.	95.10.10.	87	50	50	1	95.10.30.
9	95.10.10.-11.	95.10.11.	107	37	37	1	95.10.31.
10	95.10.13.	95.10.13.	58	35	35	0	
11	95.10.17.	95.10.17.	50	26	26	6	95.11.04.
12	95.10.18.	95.10.19.	58	39	39	0	
13	95.10.20.	95.10.20.	48	31	31	7	95.11.08.
14	95.10.25.	95.10.25.	86	49	49	5	95.11.13.
15	95.10.27.	95.10.27.	89	56	56	12	95.11.15.
16	95.10.30.	95.10.30.	63	36	36	5	95.11.18.
17	95.10.31.	95.10.31.	45	28	28	2	95.11.20.
18	95.11.01.	95.11.01.	112	57	57	5	95.11.20.
19	95.11.07.	95.11.07.	90	51	51	10	95.11.26.
20	95.11.08.	95.11.08.	82	56	56	2	95.11.27.
21	95.11.10.	95.11.10.	89	57	57	4	95.11.29.
22	95.11.13.	95.11.13.	50	28	24	Az anya	elpusztult
23	95.11.15.	95.11.15.	80	46	42	5	95.12.03.
	Összesítés:		1752	872	838	74	

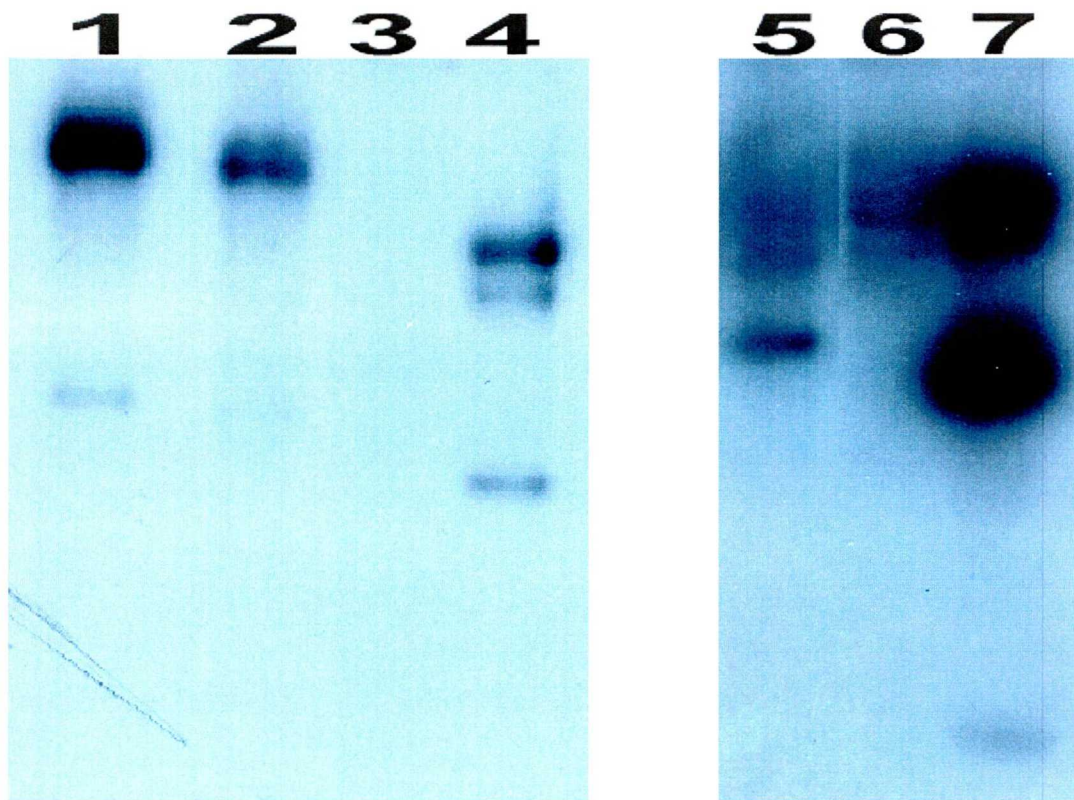
1. táblázat A linearizált pCePur132 plazmid konstrukció mikroinjektálása F2 hibrid ([C57BL/6J x CBA/J] F1 hibrid hím x [C57BL/6J x CBA/J] F1 hibrid nőstény) zigóták hím pronukleuszaiba.

méretű részecskéket is eltávolította a DNS oldatból, csökkentve ezzel az injektálókapilláris eltömődésének esélyét. A linearizált pCePur132 plazmid konstrukciót tartalmazó oldatot a **Módszerek** című fejezetben leírtak alapján izolált zigóták hím pronukleuszaiba injektáltam (**1. táblázat**). Az injektált zigótákat „nevelő” anyába ültettem. Az injektált és visszaültetett zigótákból 74 egér született, ebből 3 egér halva (**1. táblázat**). A megszületett egerek farkának egy darabjából genomikus DNS-t tisztítottam és a transzgén jelenlétét PCR reakcióval (**4. ábra**), illetve Southern DNS-DNS hibridizációval vizsgáltam (**5. ábra**). A PCR reakcióban a puromicin rezisztencia génre specifikus primereket (PuroF és PuroR primerek) használtam, míg a Southern hibridizációban EcoRI-SmaI restrikciós endonukleázokkal hasított, radioaktí-



4. ábra A puromicin rezisztencia transzgén jelenlétének vizsgálata egér genomikus DNS-en végzett, a génre specifikus PCR reakcióval (Puro-PCR). **M** (marker): λ fág DNS HindIII restriktációs endonukleázzal emésztve. **1.** Puro-PCR az E17-es sorszámú egér genomikus DNS-én. **2.** Puro-PCR az E20-as sorszámú egér genomikus DNS-én. **3.** Puro-PCR az E28-as sorszámú egér genomikus DNS-én. **4.** Puro-PCR az E48-as sorszámú egér genomikus DNS-én. **5.** Puro-PCR az E49-es sorszámú egér genomikus DNS-én. **6.** Puro-PCR az E76-os sorszámú heterozigóta egér (az E17-es egér utódja) genomikus DNS-én. **7.** Negatív kontroll: Puro-PCR a puromicin rezisztencia gént nem hordozó LMTK- fibroblaszt sejtvonala genomikus DNS-én. **8.** Pozitív kontroll: Puro-PCR a puromicin rezisztencia gént hordozó U212Ú sejtvonala genomikus DNS-én.

van jelölt (α -³²P-dCTP) pCePur132 plazmid konstrukció volt a próba. Az egér genomikus DNS-eken végrehajtott radioaktív DNS-DNS hibridizációval kimutatott sávok (5. ábra 1., 2. és 5.) egyrészt a transzgénikus egerek genomjába beépült pCePur132 plazmidok EcoRI restriktációs endonukleázzal kivágott darabjai, másrészt olyan plazmid darabok, amelyeket az



5. ábra Southern DNS-DNS hibridizáció EcoRI restriktions endonukleázzal emésztett egér genomikus DNS preparátumokon. Próba: EcoRI-SmaI restriktions endonukleázokkal emésztett, radioaktívan jelölt pCePur132 plazmid konstrukció. **1.** Az E28-as sorszámú egér EcoRI restriktions endonukleázzal emésztett genomikus DNS-én végzett Southern hibridizáció. **2.** Az E31-es sorszámú egér EcoRI restriktions endonukleázzal emésztett genomikus DNS-én végzett Southern hibridizáció. **5.** Az E68-as sorszámú egér EcoRI restriktions endonukleázzal emésztett genomikus DNS-én végzett Southern hibridizáció. **3. és 6.** Negatív kontroll: A transzgénetet nem tartalmazó LMTK⁻ fibroblaszt sejtvonalt EcoRI restriktions endonukleázzal emésztett genomikus DNS-én végzett Southern hibridizáció. **4. és 7.** Pozitív kontroll: A hygromicin rezisztencia gént és az anti-HIVgag-riboszim „gén”-t hordozó H1D3 sejtvonalt EcoRI restriktions endonukleázzal emésztett genomikus DNS-én végzett Southern hibridizáció.

EcoRI endonukleáz az integrációs hely környéki genomiális DNS szekvenciákkal együtt vágott ki.

A Southern hibridizációs kísérletekben negatív kontrollnak LMTK⁻ egér fibroblaszt sejtekből tisztított genomikus DNS-t használtam (**5. ábra 3. és 6.**), amely nem tartalmazott a pCePur132 plazmidban található transzgénekkal (puromicin és hygromicin rezisztencia gének, anti-HIVgag-riboszim „gén”) homológ szekvenciákat. A pozitív kontroll pedig egy olyan

sejtvonalból (H1D3) származó genomikus DNS volt, amely az anti-HIVgag-riboszim és a hygromicin rezisztencia géneket egy mesterséges kromoszómába építve tartalmazza. A H1D3 sejtvonalból származó genomikus DNS-en végrehajtott hibridizáció azért mutat más mintázatot (5. ábra 4. és 7.), mert más plazmid konstrukcióba építve tartalmazza a pCePur132 plazmidban is előforduló transzgéneket (hygromicin rezisztencia gén, anti-HIVgag-riboszim „gén”). Az injektálásból született elsődleges egerek genomikus DNS-ét mindkét módszerrel vizsgáltam. A 71 egér közül 7 (E17, E20, E28, E31, E48, E49, E68) bizonyult transzgénikusnak (2. táblázat). A kísérletek alapján megállapítható, hogy az alkalmazott körülmények mellett egyes esetekben a PCR reakció, míg máskor a Southern hibridizáció bizonyult értékelhetőbbnek. Például az E31-es és az E68-as egerekben a transzgének jelenlétét csak a Southern DNS-DNS hibridizációval sikerült kimutatni (5. ábra 2. és 5.), ugyanakkor az E17, E20, E48 és E49-es egerek esetében a Puro-PCR reakció volt csak értékelhető (4. ábra 1., 2., 4. és 5.).

A transzgénikusnak bizonyult egereket normál, transzgéneket nem hordozó egerekkel kereszteztem és a transzgének továbbvitelét a született utódok genomikus DNS-ének vizsgálatával ellenőriztem. Az E17, E20, E28, E48 és E31-es jelű elsődleges transzgénikus egerek a transzgéneket ivarsejtjeikben hordozták, így utódjaikba azokat tovább is örökölték. A keresztezési kísérletekben született transzgéneket hordozó utódok a transzgénekre nézve heterozigóták. Ahhoz, hogy homozigóta egereket kapjak, az azonos alomból származó transzgéneket hordozó hímeket és nőstényeket kereszteztem egymással. A született utódok genomikus DNS-ében a transzgének jelenlétét Southern DNS-DNS hibridizációval állapítottam meg. Ezek között az utódok között már feltételezhető, hogy homozigóták is vannak. Annak eldöntésére, hogy közülük melyek homozigóták, a legalkalmasabbnak a tesztelő keresztezést találtam. A tesztelő keresztezés a feltételezetten homozigóta és egy normál, transzgéneket nem hordozó egér keresztezését jelenti. Ha a feltételezetten homozigóta egér valóban homozigóta, akkor egy tesztelő keresztezésből született minden utódnak hordoz-

Egér száma	Neme	Szül. idő	DNS nyerés	Puro-PCR	Southern
E1	hím	95.10.23.	95.11.02.	negatív	negatív
E2	nőstény	95.10.23.	95.11.02.	negatív	negatív
E3	nőstény	95.10.23.	95.11.02.	negatív	negatív
E4	nőstény	95.10.23.	95.11.02.	negatív	negatív
E5	hím	95.10.23.	95.11.02.	negatív	negatív
E6	nőstény	95.10.23.	95.11.02.	negatív	negatív
E7	hím	95.10.23.	95.11.02.	negatív	negatív
E8	hím	95.10.27.	95.11.08.	negatív	negatív
E9	nőstény	95.11.04.	95.11.15.	negatív	negatív
E10	hím	95.11.04.	95.11.15.	negatív	negatív
E11	nőstény	95.11.04.	95.11.15.	negatív	negatív
E12	hím	95.11.04.	95.11.15.	negatív	negatív
E13	hím	95.11.04.	95.11.15.	negatív	negatív
E14	nőstény	95.11.04.	95.11.15.	negatív	negatív
E15	nőstény	95.11.08.	95.11.30.	negatív	negatív
E16	hím	95.11.08.	95.11.30.	negatív	negatív
E17	nőstény	95.11.08.	95.11.30.	pozitív	negatív
E18	nőstény	95.11.08.	95.11.30.	negatív	negatív
E19	hím	95.11.08.	95.11.30.	negatív	negatív
E20	hím	95.11.08.	95.11.30.	pozitív	negatív
E21	nőstény	95.11.08.	95.11.30.	negatív	negatív
E22	nőstény	95.11.13.	95.12.05.	negatív	negatív
E23	hím	95.11.13.	95.12.05.	negatív	negatív
E24	hím	95.11.13.	95.12.05.	negatív	negatív
E25	nőstény	95.11.13.	95.12.05.	negatív	negatív
E26	hím	95.11.13.	95.12.05.	negatív	negatív
E27	nőstény	95.11.15.	95.12.11.	negatív	negatív
E28	hím	95.11.15.	95.12.11.	pozitív	pozitív
E29	nőstény	95.11.15.	95.12.11.	negatív	negatív
E30	nőstény	95.11.15.	95.12.11.	negatív	negatív
E31	nőstény	95.11.15.	95.12.11.	negatív	pozitív
E32	hím	95.11.15.	95.12.11.	negatív	negatív
E33	nőstény	95.11.15.	95.12.11.	negatív	negatív
E34	nőstény	95.11.15.	95.12.11.	negatív	negatív
E35	nőstény	95.11.15.	95.12.11.	negatív	negatív
E36	nőstény	95.11.15.	95.12.11.	negatív	negatív
E37	nőstény	95.11.15.	95.12.11.	negatív	negatív
E38	nőstény	95.11.15.	95.12.11.	negatív	negatív
E39	hím	95.11.18.	95.12.14.	negatív	negatív
E40	hím	95.11.18.	95.12.14.	negatív	negatív
E41	hím	95.11.18.	95.12.14.	negatív	negatív
E42	nőstény	95.11.18.	95.12.14.	negatív	negatív
E43	hím	95.11.18.	95.12.14.	negatív	negatív
E44	nőstény	95.11.20.	95.12.14.	negatív	negatív
E45	hím	95.11.20.	95.12.14.	negatív	negatív
E46	nőstény	95.11.20.	95.12.14.	negatív	negatív
E47	hím	95.11.20.	95.12.14.	negatív	negatív

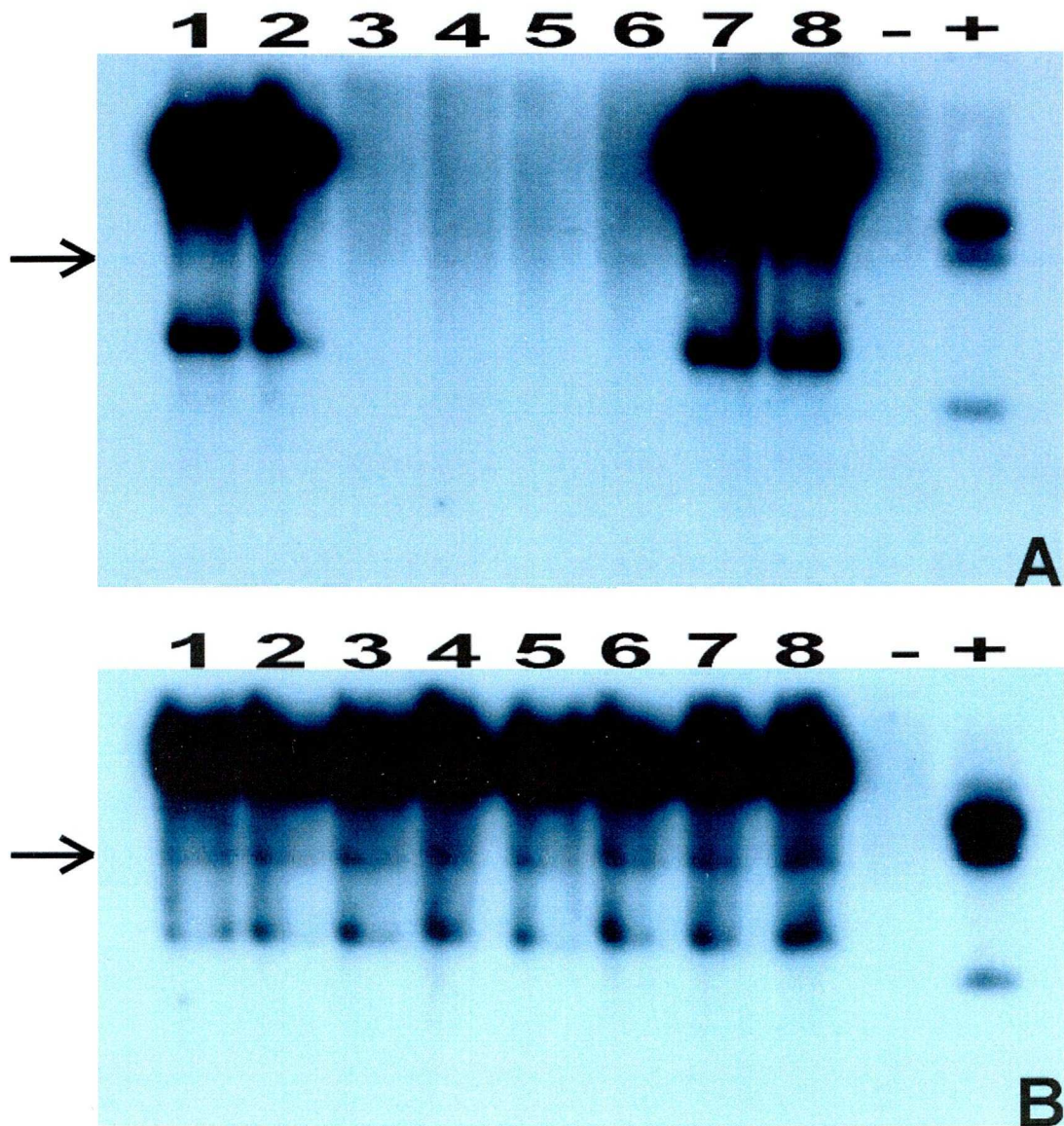
2. táblázat A transzgén jelenlétének kimutatása a mikroinjektálásból született egerek genomikus DNS-éből Southern hibridizációval és Puro-PCR reakcióval.

Egér száma	Neme	Szül. idő	DNS nyerés	Puro-PCR	Southern
E48	hím	95.11.20.	95.12.14.	pozitív	negatív
E49	nőstény	95.11.20.	95.12.14.	pozitív	negatív
E50	nőstény	95.11.20.	95.12.14.	negatív	negatív
E51	hím	95.11.26.	95.12.20.	negatív	negatív
E52	hím	95.11.26.	95.12.20.	negatív	negatív
E53	hím	95.11.26.	95.12.20.	negatív	negatív
E54	nőstény	95.11.26.	95.12.20.	negatív	negatív
E55	hím	95.11.26.	95.12.20.	negatív	negatív
E56	nőstény	95.11.26.	95.12.20.	negatív	negatív
E57	hím	95.11.26.	95.12.20.	negatív	negatív
E58	nőstény	95.11.26.	95.12.20.	negatív	negatív
E59	hím	95.11.26.	95.12.20.	negatív	negatív
E60	hím	95.11.27.	95.12.20.	negatív	negatív
E61	hím	95.11.27.	95.12.20.	negatív	negatív
E62	hím	95.11.29.	95.12.20.	negatív	negatív
E63	nőstény	95.11.29.	95.12.20.	negatív	negatív
E64	nőstény	95.11.29.	95.12.20.	negatív	negatív
E65	nőstény	95.11.29.	95.12.20.	negatív	negatív
E66	nőstény	95.11.29.	95.12.20.	negatív	negatív
E67	nőstény	95.12.03.	96.01.05.	nem volt	negatív
E68	nőstény	95.12.03.	96.01.05.	nem volt	pozitív
E69	nőstény	95.12.03.	96.01.05.	nem volt	negatív
E70	nőstény	95.12.03.	96.01.05.	nem volt	negatív
E71	nőstény	95.12.03.	96.01.05.	nem volt	negatív

2. táblázat A transzgén jelenlétének kimutatása a mikroinjektálásból született egerek genomikus DNS-éből Southern hibridizációval és Puro-PCR reakcióval.

nia kell a transzgéneket (pl: **6. ábra/B**). A **6. ábrán** látható Southern DNS-DNS hibridizációk esetében alkalmazott körülmények és kontroll genomikus DNS-ek megegyeznek az **5. ábrán** látható Southern DNS-DNS hibridizációkéval.

A tesztelő keresztezések alapján 3 elsődlegesen transzgénikus egér leszármazottai (E20, E28 és E48) adtak homozigóta utódokat, amelyekben a transzgének genomikus integrációs helye feltételezhetően különböző. Erre mutatnak bizonyítékot a **6. ábrán az A, és B, ábrarészek**en feltüntetett nyilak, amelyek a transzgénikus egerek genomikus DNS-én megfigyelhető hibridizációs mintázatbeli különbséget szemléltetik. Ez a különbség abból adódik, hogy a különböző transzgénikus vonalakban (**6/A**, E28-as vonal illetve **6/B**, E48-as vonal) az integrációk helye eltérő volt. Ezek alapján tehát 3 különböző homozigóta transzgéni-



6. ábra Homozigóták keresése tesztelő keresztezéssel. A képeken a feltételezett homozigóták farkából tisztított, EcoRI restriktációs endonukleázzal emésztett genomikus DNS-en végrehajtott Southern hibridizáció eredménye látható. Próba: radioaktívan jelölt, EcoRI-SmaI restriktációs endonukleázokkal emésztett pCePur132 plazmid DNS. A nyilak a hibridizációs mintázatban látható különbségre utalnak. **A, 1.-8.** Az E28-as vonalba tartozó hím utódjai. Mivel a 3.-6. sorszámú utódok nem mutattak hibridizációs jelet, így az E28-as vonalba tartozó apa heterozigóta. **B, 1.-8.** Az E48-as vonalba tartozó hím utódjai. Mivel minden utód tartalmazta a transzgént, így az E48-as vonalba tartozó hím homozigóta.

- : Negatív kontroll: EcoRI restriktációs endonukleázzal emésztett LMTK⁻ genomikus DNS, amely nem tartalmaz transzgéneket.

+ : Pozitív kontroll: EcoRI restriktációs endonukleázzal emésztett H1D3 genomikus DNS, amely tartalmazza a hygromicin rezisztencia és az anti-HIVgag-ribozim géneket.

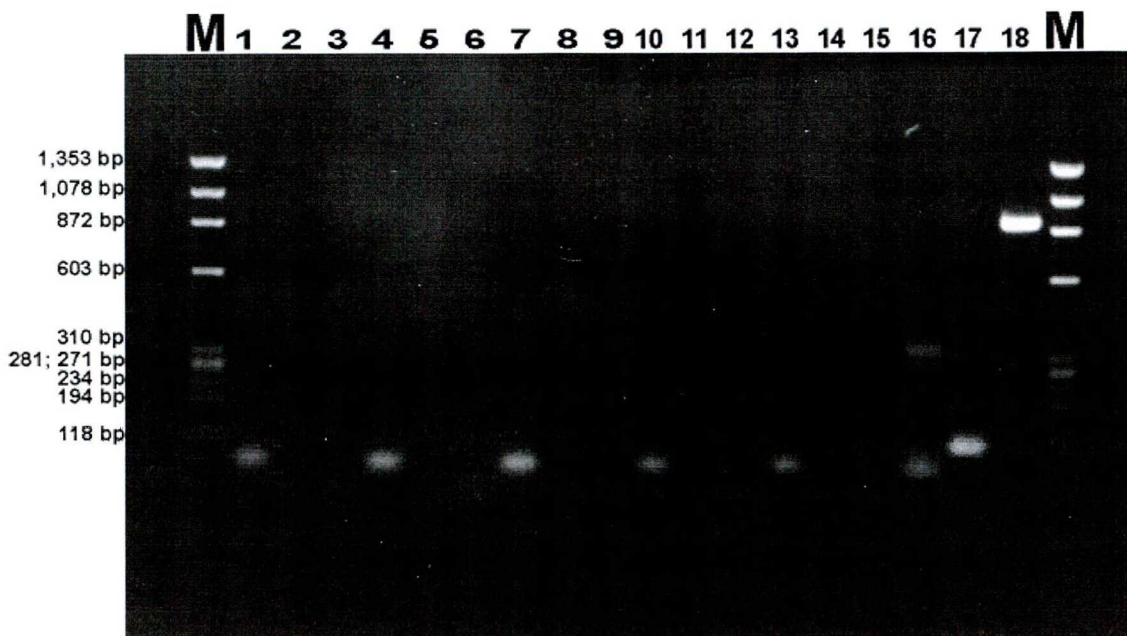
kus vonal hozható létre a homozigóta testvérek keresztezése révén. A későbbiekben a különböző vonalak homozigóta egyedei keresztezhetők egymással, és így olyan egereket állíthatunk elő, amelyek a transzgéneket nagyobb kópiaszámban, különböző integrációs helyeken megosztva tartalmazzák.

3.2 Expresszió vizsgálatok

A transzgenikus vonalak létrehozása után a következő megválaszolendő kérdés az volt, hogy vajon az egerek genomjába épített transzgének (anti-HIVgag-ribozim, puomicin és hygromicin rezisztencia gének) kifejeződnek-e. Mivel az integráció véletlenszerű, így könnyen előfordulhat, hogy olyan helyre épültek be az egér genetikai állományába, ahol a kromatin a génexpresszió szempontjából inaktív struktúrát képez, és így az új genetikai anyag megnyilvánulását is gátolja, vagy annak mértékét csökkenti. Ezen kívül nem zárható ki annak a lehetősége sem, hogy az egérben azok a virális promoterek, amelyek a bejuttatott gének kifejeződését irányítják nem, vagy csak gyengén működnek.

A transzgének expressziójának vizsgálatához a jelenleg hozzáférhető legérzékenyebb rendszert, az RT-PCR-t (**Módszerek**), választottam.

A transzgenikus egerek veséjéből és májából poliA RNS-t tisztítottam. A poliA RNS preparátumokon először polimeráz lánreakciót hajtottam végre a megfelelő transzgén-specifikus primerek alkalmazásával annak eldöntésére, hogy a preparátumok nem tartalmazznak-e genomikus DNS szennyezést. Abban az esetben, ha a PCR reakcióban a transzgénekre specifikus „sáv”-ok jelennek meg agaróz gélelektroforézis és EtBr festés után, akkor a preparátum genomikus DNS-el szennyezett, így RT-PCR kísérletekben nem használható, mert félrevezető pozitív eredményt adhat. Tiszta preparátum esetén PCR termék nem képződik. A kísérlet eredményét a **7. ábra** szemlélteti, amelyen látható, hogy minden



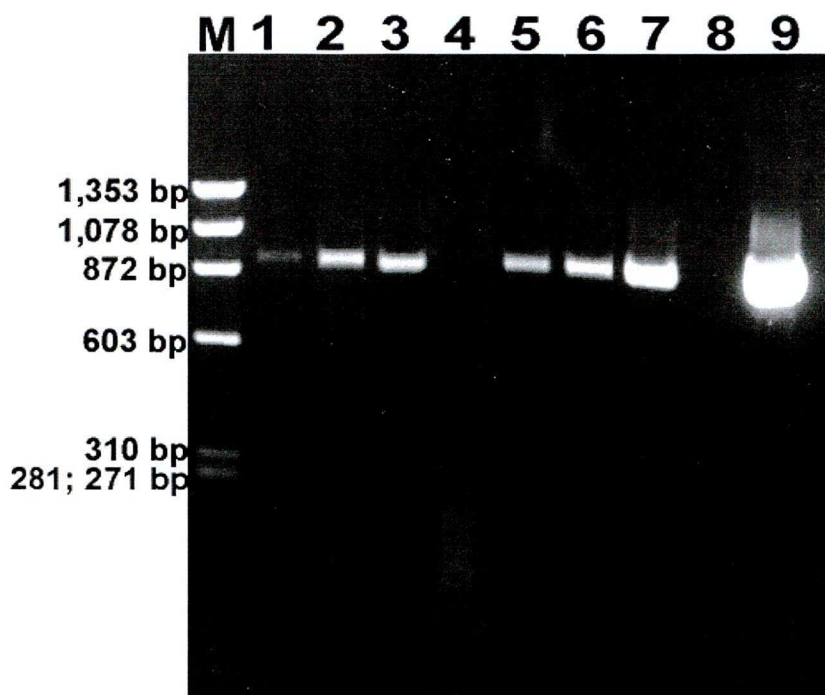
7. ábra A poliA RNS preparátumok genomikus szennyezés mentességének vizsgálata PCR reakcióval. ~2-2 µg poliA RNS-t tartalmazott minden reakció. **M:** HaeIII restrikciós endonukleázzal emésztett ϕ X174 fág DNS. **1.** Puromicin rezisztencia génre specifikus PCR (Puro-PCR), az E20-as vonalból származó homozigóta egér máj-poliA RNS-én. **2.** Anti-HIVgag-ribozim „gén”-re specifikus PCR (Ribo-PCR), az E20-as vonalból származó homozigóta egér máj-poliA RNS-én. **3.** Hygromicin rezisztencia génre specifikus PCR (Hyg-PCR), az E20-as vonalból származó homozigóta egér máj-poliA RNS-én. **4.** Puro-PCR az E20-as vonalból származó homozigóta egér vese-poliA RNS-én. **5.** Ribo-PCR az E20-as vonalból származó homozigóta egér vese-poliA RNS-én. **6.** Hyg-PCR az E20-as vonalból származó homozigóta egér vese-poliA RNS-én. **7.** Puro-PCR az E28-as vonalból származó homozigóta egér vese-poliA RNS-én. **8.** Ribo-PCR az E28-as vonalból származó homozigóta egér vese-poliA RNS-én. **9.** Hyg-PCR az E28-as vonalból származó homozigóta egér vese-poliA RNS-én. **10.** Puro-PCR az E48-as vonalból származó homozigóta egér vese-poliA RNS-én. **11.** Ribo-PCR az E48-as vonalból származó homozigóta egér vese-poliA RNS-én. **12.** Hyg-PCR az E48-as vonalból származó homozigóta egér vese-poliA RNS-én. **13.** Negatív kontroll: Puro-PCR templát nélkül. **14.** Negatív kontroll: Ribo-PCR templát nélkül. **15.** Negatív kontroll: Hyg-PCR templát nélkül. **16.** Pozitív kontroll: Puro-RT-PCR a puromicin rezisztencia gént hordozó mM2C1pCep8-as sejtvonalból származó poliA RNS-en. **17.** Pozitív kontroll: Ribo-RT-PCR az anti-HIVgag-ribozim „gén”-t hordozó mM2C1pCep8-as sejtvonalból származó poliA RNS-en. **18.** Pozitív kontroll: Hyg-RT-PCR a hygromicin gént hordozó mM2C1pCep8-as sejtvonalból származó poliA RNS-en.

poliA RNS preparátum genomikus DNS szennyezés mentes volt, mert a specifikus PCR reakciók egyik esetben sem adtak a génekre specifikus sávokat, vagyis ún. „üres” reakciókat kaptam (**7. ábra 1.-12.**). A templátot nem tartalmazó, negatív kontroll kísérletek célja annak

eldöntése volt, hogy a PCR reakciókban használt oldatok nem tartalmaznak-e valamilyen DNS szennyeződést, amely ugyancsak félrevezető eredményeket adhatna. Mivel ezekben a reakciókban sem kaptam meg a génekre specifikus sávokat így kijelenthető, hogy a PCR reakciókhoz használt oldatok sem tartalmaztak DNS szennyezést (7. ábra 13.-15.). A pozitív kontroll kísérletekben az mM2C1pCep8 sejtvonalból származó, genomikus DNS szennyezés mentes poliA RNS-en, mint templáton hajtottam végre génspecifikus RT-PCR reakciókat. Ez a sejtvonala a genomjában hordozza és expresszálja a puromicin és hygromicin rezisztencia géneket, valamint az anti-HIVgag-ribozim „gén”-t, így alkalmas pozitív kontroll kísérletekre. A sejtvonalból származó poliA RNS-en végzett génspecifikus RT-PCR kísérletekben minden gén esetében megjelentek a megfelelő specifikus termékek (7. ábra 16.-18.). Mind a PCR, mind pedig az RT-PCR kísérletek alkalmával az egyes reakciókhoz ~2-2 µg genomikus DNS szennyezés mentes poliA RNS preparátumot használtam fel. A 7. ábrán a puromicin rezisztencia génre specifikus PCR és RT-PCR reakciókban a körülbelül 70 bázispárnál megjelenő sávot a puromicin rezisztencia génre specifikus, a reakcióban fel nem használt primerek adják. Az, hogy a többi génekre specifikus reakciókban nem láthatók az el nem használt primerek, az egyes primerek eltérő stabilitásából adódik.

A, A hygromicin rezisztencia gén kifejeződésének kimutatása RT-PCR reakcióval:

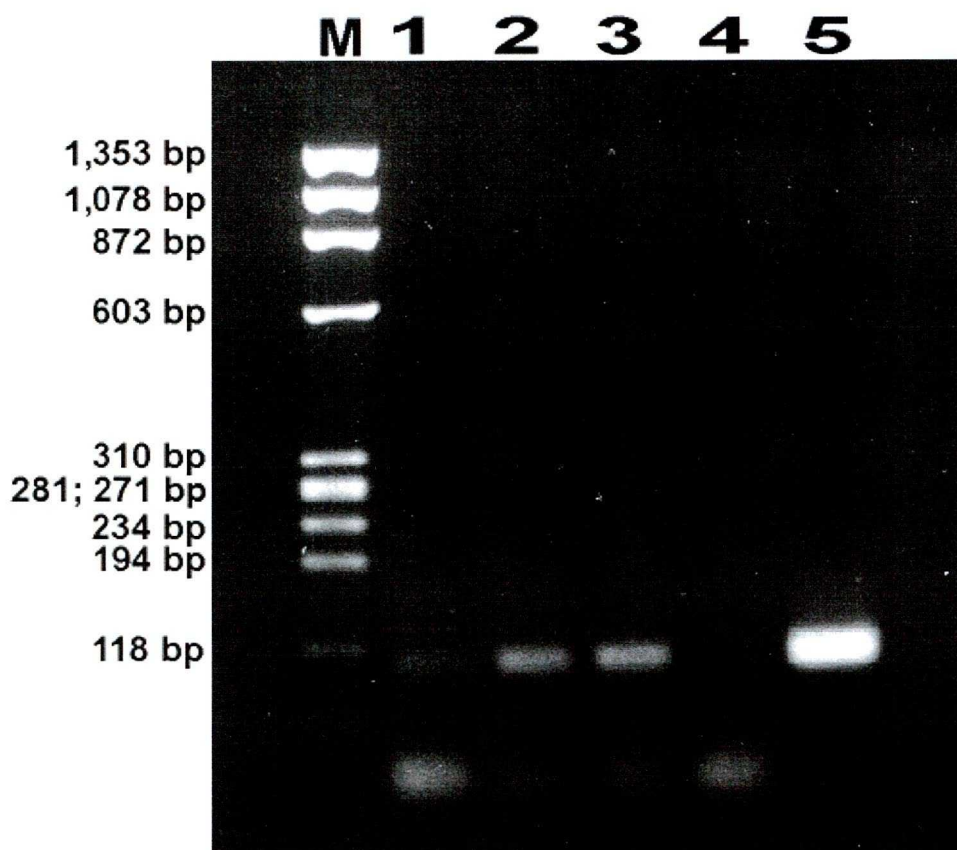
A *Herpes simplex* vírus timidin-kináz promotereiről kifejeződő hygromicin rezisztencia gén expressziójának kimutatásához használt primerek mindegyike a génen belül található szekvenciákkal volt homológ. Az RT-PCR reakcióval egy 870 bázispáros terméket vártam, amelyet mindegyik homozigóta vonalból sikerült kimutatni (8. ábra). Mivel a transzgénikus egerek veséjéből tisztított poliA RNS-en végzett RT-PCR reakcióval erősebb jeleket kaptam, mint a májból tisztított poliA RNS-en, (8. ábra) ezért valószínűsíthető, hogy ebből a szövetből nagyobb mértékű a kifejeződés. Így a későbbiekben csak a veséből tisztított poliA RNS preparátumokat használtam az expresszió kimutatására.



8. ábra Hygromicin rezisztencia génre specifikus RT-PCR reakció (Hyg-RT-PCR) tisztított poliA RNS preparátumokon. **M:** HaeIII restrikciós endonukleázzal emésztett ϕ X174 fág DNS. **1.** Hyg-RT-PCR az E20-as vonalból származó homozigóta egér máj-poliA RNS-én. **2.** Hyg-RT-PCR az E48-as vonalból származó heterozigóta egér máj-poliA RNS-én. **3.** Hyg-RT-PCR az E28-as vonalból származó homozigóta egér máj-poliA RNS-én. **4.** Negatív kontroll: Hyg-RT-PCR nem transzgénikus egér máj-poliA RNS-én. **5.** Hyg-RT-PCR az E20-as vonalból származó homozigóta egér vese-poliA RNS-én. **6.** Hyg-RT-PCR az E48-as vonalból származó heterozigóta egér vese-poliA RNS-én. **7.** Hyg-RT-PCR az E28-as vonalból származó homozigóta egér vese-poliA RNS-én. **8.** Negatív kontroll: RT-PCR nem transzgénikus egér vese-poliA RNS-én. **9.** Pozitív kontroll: Hyg-RT-PCR a hygromicin rezisztencia gént expresszáló sejtvonalból (mM2C1pCep8) származó poliA RNS-en.

B, Az anti-HIVgag-ribosim „gén” kifejeződésének kimutatása RT-PCR reakcióval:

A citomegalovírus promoterről kifejeződő anti-HIVgag-ribosim „gén” egy 47 bp hosszúságú „gén”, ezért az expresszió kimutatásához használt primereket a könnyebb kezelhetőség kedvéért úgy választottam meg, hogy az RT-PCR során kapott termék 120 bp legyen, ami 1.8 % agarózt tartalmazó gélen jól elválasztható, egyértelmű sávot ad. Ezért az egyik primer a CMV promoter egy szakaszával, illetve a gén első négy nukleotidjával homológ, és a transzkripció kezdőpont után helyezkedik el (CCMV primer). A másik primer az SV40 poliadenilációs jel szekvenciájának egy szakaszával homológ, amely a poliadeniláci-

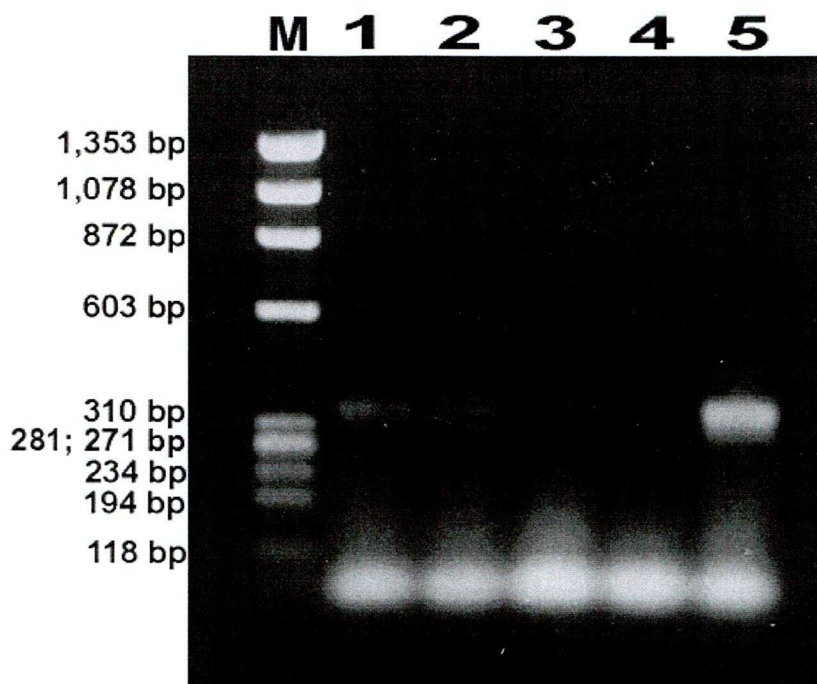


9. ábra Az anti-HIVgag-ribosim „gén”-re specifikus RT-PCR reakció (Ribo-RT-PCR) tisztított poliA RNS preparátumokon. **M:** HaeIII restrikciós endonukleázzal emésztett ϕ X174 fág DNS. **1.** Ribo-RT-PCR az E20-as vonalból származó homozigóta egér vese-poliA RNS-én. **2.** Ribo-RT-PCR az E48-as vonalból származó heterozigóta egér vese-poliA RNS-én. **3.** Ribo-RT-PCR az E28-as vonalból származó homozigóta egér vese-poliA RNS-én. **4.** Negatív kontroll: Ribo-RT-PCR nem transzgénikus egér vese-poliA RNS-én. **5.** Pozitív kontroll: Ribo-RT-PCR az anti-HIVgag-ribosim „gén”-t expresszáló sejtvonalból (mM2C1pCep8) származó poliA RNS-en.

ős kezdőpont és a gén között helyezkedik el. Mindhárom homozigóta vonalból sikerült kimutatni az anti-HIVgag-ribosim „gén” kifejeződését (**9. ábra**).

C, A puromicin rezisztencia gén kifejeződésének kimutatása RT-PCR reakcióval:

Az SV40 promoterről kifejeződő puromicin rezisztencia gén expressziójának kimutatásához használt primerek (PuroF és PacR primerek) mindegyike a génen belül található szekvenciákkal volt homológ. Az RT-PCR reakcióval egy 330 bázispáros terméket vártam, amelyet sikerült valamennyi homozigóta vonalból kimutatni (**10. ábra**).



10. ábra A puromicin rezisztencia génre specifikus RT-PCR reakció (Puro-RT-PCR) tisztított poliA RNS preparátumokon. **M:** HaeIII restrikciós endonukleázzal emésztett ϕ X174 fág DNS. **1.** Puro-RT-PCR az E28-as vonalból származó homozigóta egér vese-poliA RNS-én. **2.** Puro-RT-PCR az E48-as vonalból származó homozigóta egér vese-poliA RNS-én. **3.** Puro-RT-PCR az E20-as vonalból származó homozigóta egér vese-poliA RNS-én. **4.** Negatív kontroll: Puro-RT-PCR nem transzgénikus egér vese-poliA RNS-én. **5.** Pozitív kontroll: Puro-RT-PCR a puromicin rezisztencia gént expresszáló sejtvonalból (mM2C1pCep8) származó poliA RNS-en.

4. Eredmények megvitatása

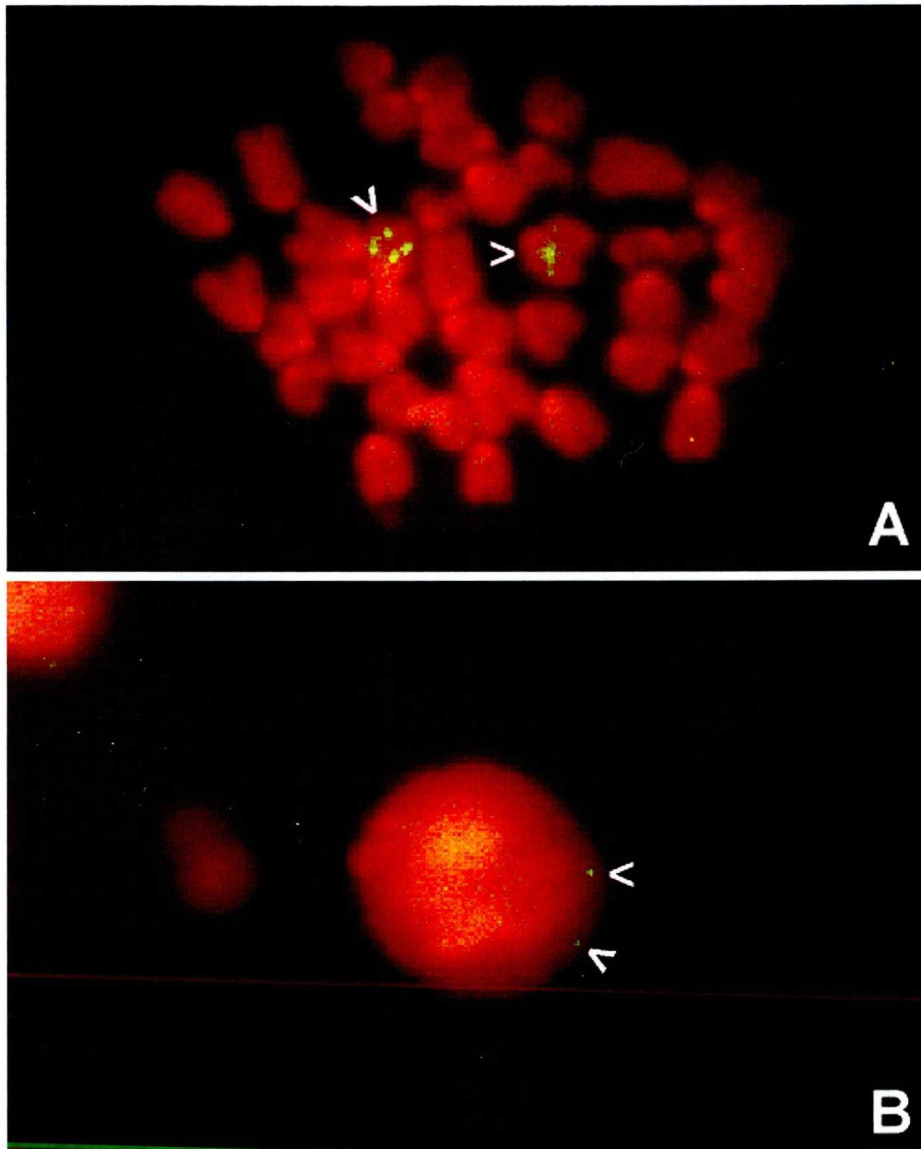
A pCePur132 plazmid konstrukció egér zigóták hím pronukleuszaiba történt mikroinjekciójával sikerült előállítanom olyan transzgénikus egereket, amelyek a transzgéneket ivarsejtjeikben is hordozták, így azokat utódjaikba örökítették. Keresztezési kísérletekkel három homozigóta vonalat (E20, E28, E48) hoztam létre. Mindhárom vonalból sikerült kimutatni a transzgének (anti-HIVgag-ribozim „gén”, puromicin és hygromicin rezisztencia gének) kifejeződését RT-PCR reakcióval (**8., 9., 10. ábrák**).

Az expresszió vizsgálatok során az egyes vonalakban a transzgének kifejeződésének pontos mennyiségi meghatározása ugyan nem történt meg, mivel azonban az RT-PCR reakciók körülményei (TITAN RT-PCR Kit), és a reakciókban használt poliA RNS

mennyiségek azonosak voltak, így a gélelektroforézis és EtBr festés után kapott PCR termékek mennyiségének összehasonlítása alapján néhány következtetés vonható le. Megállapítható, hogy a leggyengébb expressziót az E20-as homozigóta vonal mutatta (8., 9., 10. ábrák). Az E28-as és az E48-as vonal hasonló erősségű kifejeződést mutatott. Megállapítható az is, hogy minden esetben az SV40 promoterről működő puromicin rezisztencia gén expressziója volt a leggyengébb, ezért valószínűsíthető, hogy a legkevésbé ez a promoter alkalmas a transzgének kifejeztetésére egérben (8., 9., 10. ábrák). Az **Eredmények** fejezetben arról is esett szó, hogy a gének kifejeződése alacsonyabb szintű volt a májszövetekben, mint a veseszövetekben. A gének expressziójában megfigyelt különbségek kialakulását befolyásolja, hogy a transzgenikus kísérletekhez milyen egértörzset választottunk, hogy az egér genomjába a transzgének hova épültek be, valamint hogy milyen szabályozó elemeket használtunk a transzgének kifejeztetésére. Korábban már megfigyelték, hogy egyetlen zigótán elvégzett injektálási kísérlet alkalmával az injektált DNS molekulák általában több kópiában és fej-farok elrendeződésben épülnek be az egér genom egy adott pontjára (7). Az utóbbi időben vették észre, hogy ez a beépülési mód nem kedvez a gének kifejeződésének, sőt a kísérletekből az következik, hogy minél nagyobb példányszámú a beépülés, annál gyengébb a bevitt gének expressziója. Ez valószínűleg az ismétlődő kópiák által létrehozott, és legjobban a heterokromatinhoz hasonlítható kromatinszerkezet kialakulásának a következménye (23).

Az E48-as vonalból izolált limfocita sejtek metafázisos kromoszóma, illetve interfázisos sejtmagi preparátumain fluoreszcens *in situ* hibridizációval a kromoszómális integráció helyét is sikerült kimutatni (11. ábra). Az *in situ* hibridizációban használt biotinilált próba egy olyan plazmid konstrukció volt, amely tartalmazta a puromicin rezisztencia gént. A 11. ábrán látható fluoreszcens *in situ* hibridizáción látható jel erősségéből azt állapíthatjuk meg, hogy az egér genomba több kópiában épült be a pCePur132 plazmid konstrukció. Az **Eredmények** fejezetben korábban már bemutatott Southern DNS-DNS hibridizációk (6. ábra) is a több

példányban történt beépülést támasztják alá, ugyanis a Southern hibridizációknál pozitív kontrollként használt H1D3 sejtvonala genomjában a hygromicin rezisztencia gén, illetve az anti-HIVgag-riboszim „gén” 35-50 kópiában fordul elő, amit csoportunk korábbi munkája során állapítottunk meg. Mivel a kísérletekhez a transzgénikus egerek genomikus DNS-éből



11. ábra Fluoreszcens *in situ* hibridizáció biotinizált, puromicin rezisztencia génre specifikus próbával. A fluoreszcens-izotiocianátot (FITC) gerjesztő hullámhosszú fényel készült képek. **A**, A nyílhegyek a hibridizáló jeleket hordozó homológ kromoszómákat mutatják lépsejt metafázisos kromoszóma preparátumán. **B**, A nyílhegyek a hibridizáló jeleket hordozó homológ kromoszómákat mutatják lépsejt interfázisos sejtmagi preparátumán.

ugyanolyan mennyiséget használtam, mint a H1D3 sejtvonalból származó genomikus DNS-

ből így azok hibridizációs erősségét összehasonlítva a kópiaszám megbecsülhető. A **6. ábrán** látható hibridizációs jel legalább olyan erős, ha nem erősebb a transzgénikus egerek genomikus DNS-én, mint a H1D3 sejtvonalból származó genomikus DNS-en. Mivel a hibridizációs próba az EcoRI-SalI restrikciós endonukleázokkal emésztett pCePur132 plazmid DNS volt, amely specifikus hibridizációt ad mindegyik genomikus DNS-el, így megállapíthatjuk, hogy a pCePur132 plazmid konstrukció legkevesebb 35-50 kópiában épült be a **6. ábrán** látható transzgénikus egér vonalak egyedeinek genomjába.

Az expresszió vizsgálatok alapján pedig kijelenthető, hogy a bejuttatott transzgenek kifejeződnek az egér szöveteiben (**8-10. ábrák**). További vizsgálatok szükségesek annak kiderítésére, hogy ez a kifejeződés elegendő-e a funkció ellátására.

Locardi és munkacsoportja megállapította (**52**), hogy az egerek fertőzhetők az AIDS vírust túltermelő sejtekkel. Ez lehetővé teszi az anti-HIVgag-riboszim funkcionális vizsgálatát, mivel a transzgénikus egerek HIV fertőzése után a vírus RNS hasítási termékeinek megléte vizsgálható.

A puromicin és hygromicin rezisztencia gének működőképességének vizsgálatára az embrionális fibroblaszt sejtek izolálása, és szelektív körülmények között való tenyésztése a legkézenfekvőbb, hiszen a kísérletek egyik távlati célja hygromicin-puromicin rezisztenciát mutató embrionális fibroblaszt sejtek izolálása, amelyeket későbbi kísérletekben tápláló kötőszöveti sejtekként lehetne használni az embrionális-össejt alapú transzgénikus egér előállítási kísérletekben.

A célkitűzésekben feltett kérdésre, hogy az anti-HIVgag-riboszim jelenléte megzavarja-e az egér szervezetének normális működését, és így adhat-e tévesen negatív eredményt a szatellit DNS alapú mesterséges kromoszómát hordozó transzgénikus egér előállításakor, az eredmények alapján a válasz határozott **nem**. Ezt támasztja alá, hogy nem fedezhető fel semmilyen elváltozás, ha a homozigóta egereket összehasonlítjuk normál, nem transzgénikus egerekkel.

5. Összefoglalás

Munkám során 7 elsődlegesen transzgenikus egeret (E17, E20, E28, E31, E48, E49, E68) állítottam elő a pCePur132 plazmid DNS konstrukció egér megtermékenyített petesejtek hím pronukleuszába történt mikroinjektálásával. A transzgenikus egereket pároztattam normál, nem transzgenikus egerekkel, és az utódok vizsgálata után kiderült, hogy 5 elsődlegesen transzgenikus egér (E17, E20, E28, E31, E48) tudta utódjaiba örökíteni a transzgéneket. Ezek közül keresztezési kísérletekkel 3 homozigóta transzgenikus egér vonalat tudtam előállítani (E20, E28, E48). Az egerek genomikus DNS-éből a transzgén jelenlétét a puromicin rezisztencia génre specifikus PCR reakcióval (Puro-PCR), illetve Southern DNS-DNS hibridizáció alkalmazásával mutattam ki. A pCePur132 vektor tartalmazott két emlős szelekciós jelzőgént (hygromicin, puromicin rezisztencia gének), és egy anti-HIVgag-ribozim „gén”-t. Az említett gének expresszióját veséből, illetve egyes esetekben májból tisztított, genomikus DNS szennyezés mentes poliA RNS-en végrehajtott, a transzgénekre specifikus RT-PCR reakcióval mutattam ki. Az RT-PCR kísérletek mindhárom homozigóta transzgenikus vonal esetében igazolták, hogy a transzgének kifejeződnek.

Kísérleteim során sikerült előállítanom olyan homozigóta transzgenikus egér vonalakat, amelyek a későbbiekben olyan funkcionális vizsgálatok elvégzését tehetik lehetővé, mint az anti-HIVgag-ribozim működőképességének vizsgálata egerben, valamint alkalmasak lehetnek hygromicin-puromicin rezisztens „tápláló” fibroblaszt sejtek izolálására.

6. Summary

I generated 7 primary transgenic mice (E17, E20, E28, E31, E48, E49, E68) by microinjection of the pCePur132 plasmid DNA construction into the male pronuclei of fertilized mouse eggs. The primary transgenic mice were crossed with normal, non-transgenic mice, and the examination of the offsprings revealed that 5 out of 7 (E17, E20, E28, E31, E48)

could hand down the transgenes into their progeny. It was possible to breed 3 homozygous lines (E20, E28, E48) out of the 5 transgene carrier mice. The presence of transgenes in the mice's genomic DNA were demonstrated by puromycin resistance gene specific PCR reaction (Puro-PCR) and Southern DNA-DNA hybridization. The pCePur132 vector contained two selectable marker genes (puromycin, hygromycin resistance genes) and an anti-HIVgag-ribozyme „gene”. The expression of the transgenes were demonstrated by transgene specific RT-PCR on kidney and in some cases on liver polyA RNAs, which were free from genomic DNA contamination. The RT-PCR experiments gave positive result for all three homozygous transgenic lines.

These homozygous transgenic mice may serve as a model system for studying the cleavage action of the anti-HIVgag-ribozyme *in vivo*, and might provide a source for isolation of hygromycin-puromycin resistant „feeder” fibroblast cells from homozygous embryos.

7. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönettel tartozom Dr. Hadlaczky Gyulának, akinek türelmes és támogató témavezetői munkája, tanácsai és az elkeseredés pillanatain átlendítő lelkesítő szavai nélkül a homozigóta transzgenikus egereim csak gondolatban léteznének.

Szeretném megköszönni Mózesné Holló Gyöngyinek a Southern DNS-DNS hibridizációk elkészítésénél nyújtott nélkülözhetetlen segítségét, mert nélküle valószínűleg nem tudtam volna megvizsgálni, hogy a született egerek közül melyek hordozzák a transzgéneket.

Köszönettel tartozom Sinkó Ildikónak, akinek tanácsai és segítsége nélkül valószínűleg soha nem láttam volna neki transzgenikus egér kísérleteknek.

Köszönöm Dr. Fodor Katalinnak és Dr. Udvardy Andornak az expresszió vizsgálatok elvégzéséhez adott hasznos tanácsait, és Dr. Cserpán Imrének a PCR kísérletekhez nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Dr. Kiss Istvánnak, Dr. Praznovszky Tündének, Dr. Fodor Katalinnak és Dr. Cserpán Imrének, hogy kritikusan elolvasták a Ph. D. dolgozatomat, és végleges formájának kialakításához hasznos tanácsokkal láttak el.

Végezetül szeretném megköszönni a csoportunkban dolgozó többi munkatársamnak is (Dr. Csonka Erika, Kereső Judit, Novák Istvánné, Rózsavölgyi Márta, Fátyol Károly,) a napi gondokban, problémákban nyújtott segítségét.

8. Irodalomjegyzék

8.1 Saját közlemények

1. Holló, Gy., Kereső, J., Praznovszky, T., Cserpán, I., Fodor, K., Katona, R., Csonka, E., Fátyol, K., Szeles, A., Szalay, A.A., Hadlaczky, Gy.: Evidence for a megareplicon covering megabases of centromeric chromosome segments. 1996. *Chromosome Research* **4**: 240-247
2. Katona, R., Szeles, A., Hadlaczky, Gy.: Mouse euchromatin specific “genome-painting” with a LINE probe: A rapid method for identification and mapping of human chromosomes in mouse-human microcell hybrids by two-color FISH (1996) *Hereditas* **124**: 131-135
3. Kereső, J., Praznovszky, T., Cserpán, I., Fodor, K., Katona, R., Csonka, E., Fátyol, K., Holló, Gy., Szeles, A., Ross, A.R., Sumner, A.T., Szalay, A.A., Hadlaczky, Gy.: *De novo* chromosome formations by large scale amplification of the centromeric region of mouse chromosomes. (1996) *Chromosome Research* **4**: 226-239

8.2 Az értekezés témaköréhez kapcsolódó egyéb közlemények

4. Anderson, W.F.: Human gene therapy. 1992. *Science* **256**: 808-813.
5. Bagai, S., and Sarkar, D. P. (1993) Targeted delivery of hygromycin B using reconstituted Sendai viral envelopes lacking haemagglutinin-neuraminidase. *FEBS Letters* **326**: 183-188.

6. Blease, R. M., Anderson, W. F.: The ADA human gene therapy clinical protocol. 1990. *Human Gene Therapy* **1**: 327-362.
7. Brinster, R. L., Chen, H. Y., Trumbauer, M. E., Yagle, M. K., Palmiter, R. D.: Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. 1985. *PNAS* **82**: 4438-4442.
8. Brown, W., Heller, R., Loupart, M.-L., Shen, M.-H., Chand, A.: Mammalian Artificial Chromosomes. 1996. *Current Opinion in Genetics and Development* **6**: 281-288.
9. Buerstedde, J.M., Takeda, S.: Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. 1991. *Cell* **67**: 179-188.
10. Castanotto, D., Rossi, J.J., Sarver, N.: Antisense Catalytic RNAs as Therapeutic Agents 1994. *Advances in Pharmacology* **25**: 289-317.
11. Chakraborty, A. K., Zink, M. A., Boman, B. M., Hodgson, C. P.: Synthetic retrotransposon vectors for gene therapy. 1993. *FASEB J.* **7**: 971-977.
12. Chang, P. S., Cantin, E. M., Zaia, J. A., Ladne, P. A., Stephens, D. A., Sarver, N., Rossi, J. J.: Ribozyme-mediated site-specific cleavage of the HIV-1 genome. 1990. *Clinical Biotechnology* **2**: 23-31.
13. Cline, M. J., Stang, H., Mercola, K., Morse, L., Ruprecht, R., Brown, J., Salser, W.: Gene transfer in intact animals. 1980. *Nature* **284**: 422-425.
14. Connor, J., Huang, L.: Efficient cytoplasmic delivery of a fluorescent dye by pH-sensitive immunoliposomes. 1985. *J. Cell. Biol.* **101**: 582-589.
15. Cress, D. E., Kiefer, M. C., Owens, R. A.: Construction of infectious potato spindle tuber viroid cDNA clones. 1983. *Nucleic Acids Res.* **11**: 6821-6835.
16. Darr, S. C., Brown, J. W., Pace, N. R.: The varieties of ribonuclease P. 1992. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 178-182.
17. Diener, T. O.: Subviral pathogens of plants: viroids and viroidlike satellite RNAs. 1991. *FASEB J.* **5**: 2808-2813.

18. Farr, C. J., Bayne, R. A. L., Kipling, D., Mills, W., Critcher, R., Cooke, H. J.: Generation of a human X-derived minichromosome using telomer associated chromosome fragmentation. 1995. *EMBO J.* **14**: 5444-5454.
19. Findeis, M.A., Merwin, J. R., Spitalny, G. L., Chiou, H. C.: Targeted delivery of DNA for gene therapy via receptors. 1993. *Trends Biotechnol.* **11**: 202-205.
20. Forster, A. C., Symons, R. H.: Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. 1987. *Cell* **49**: 211-220.
21. Friedmann, T. and Jinnah, H. A.: Gene therapy for disorders of the nervous system. 1993. *Trends Biotechnol.* **11**: 192-197.
22. Gardiner, K. J., Marsh, T. L., Pace, N. R.: Ion dependence of the *Bacillus subtilis* Rnáz P reaction. 1985. *J. Biol. Chem.* **260**: 5415-5419.
23. Garrick, D., Fiering, S., Martin, D.I.K., Whitelaw, E.: Repeat-induced gene silencing in mammals. 1998. *Nature Genetics* **18**: 56-59.
24. Glorioso, J. C., DeLuca, N.A., Fink, D.J.: Development and application of Herpes Simplex virus vectors for human gene therapy. 1995. **49**: 675-710.
25. Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A., Ruddle, F. H.: Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. 1980. *PNAS* **77**: 7380-7384.
26. Gregoriadis, G.: Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. 1995. *Trends Biotechnol.* **13**: 527-536.
27. Grosshans, C. A., Cech, T. R.: Metal ion requirements for sequence-specific endoribonuclease activity of the *Tetrahymena* ribozyme. 1989. *Biochemistry* **28**: 6888-6894.
28. Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., Altman, S.: The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. 1983. *Cell* **35**: 849-857.

29. Hadlaczky, Gy., Praznovszky, T., Cserpán, I., Kereső, J., Péterfy, M., Kelemen, I., Atalay, E., Szeles, A., Szelei, J., Tubak, V., Burg, K.: Centromere formation in mouse cells cotransformed with human DNA and a dominant marker gene. 1991. *PNAS* **88**: 8106-8110.
30. Hampel, A., Tritz, R., Hicks, M., Cruz, P.: 'Hairpin' catalytic RNA model: evidence for helices and sequence requirement for substrate RNA. 1990. *Nucleic Acids Res.* **18**: 299-304.
31. Harrington, J.J., Bokkelen, G.V., Mays, R.W., Gustashaw, K., Willard, H.F.: Formation of *de novo* centromeres and construction of first-generation human artificial chromosomes. 1997. *Nature Genetics* **15**: 345-355.
32. Haseloff, J., Gerlach, W. L.: Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. 1988. *Nature* **334**: 585-591.
33. Hastie, N. D., Held, W. A.: Analysis of mRNA populations by cDNA.mRNA hybrid-mediated inhibition of cell-free protein synthesis. 1978. *PNAS* **75**: 1217-1221.
34. Heller, R, Brown, K. E., Burgtorf, C., Brown, W. R. A.: Mini-chromosomes derived from the human Y-chromosome by telomere directed chromosome breakage. 1996. *PNAS* **93**: 7125-7130.
35. Heus, H. A., Pardi, A.: Nuclear magnetic resonance studies of the hammerhead ribozyme domain. Secondary structure formation and magnesium ion dependence. 1991 *J Mol Biol.* **217**: 113-124.
36. Hodgson, C.P.: The vector void in gene therapy. 1995. *BioTechnology* **13**: 222-225.
37. Hoeben, R.C., Migchielsen, A.A.J., van der Jagt, R.C.M., van Ormondt, H., and van der Eb, A.J.: Inactivation of the Moloney murine leukemia virus long terminal repeat in murine fibroblast cell lines is associated with methylation and dependent on its chromosomal position. 1991. *J. Virol.* **65**: 904-912.
38. Hofmann, C., Sandig, V., Jennings, G., Rudolph, M., Schlag, P., Strauss, M.: Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. 1995. *PNAS* **92**: 10099-10103.

39. Hogan, B., Beddington, R., Constantini, F., Lacy, E.: Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. 1994. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
40. Hutchins, C. J., Rathjen, P. D., Forster, A. C., Symons, R. H.: Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. 1986. *Nucleic Acids Res.* **14**: 3627-3640.
41. van der Horst, G., Tabak, H. F.: Self-splicing of yeast mitochondrial ribosomal and messenger RNA precursors. 1985. *Cell* **40**: 759-766.
42. Izant, J. G., Weintraub, H.: Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis. 1984. *Cell* **36**: 1007-1015.
43. Jaenisch, R.: Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. 1976. *PNAS* **73**: 1260-1264.
44. Jaenisch, R., Mintz, B.: Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. 1974. *PNAS* **71**: 1250-1254.
45. Katsuki, M., Sato, M., Kimura, M., Yokoyama, M., Kobayashi, K., Nomura, T.: Conversion of normal behavior to shiverer by myelin basic protein antisense cDNA in transgenic mice. 1988. *Science* **241**: 593-595.
46. Kazakov, S., Altman, S.: Site-specific cleavage by metal ion cofactors and inhibitors of M1 RNA, the catalytic subunit of RNáz P from Escherichia coli. 1991. *PNAS* **88**: 9193-9197.
47. Kioussis, D., Wilson, F., Daniels, C., Leveton, C., Taverne, J., Playfair, J. H.: Expression and rescuing of a cloned human tumour necrosis factor gene using an EBV-based shuttle cosmid vector. 1987. *EMBO J.* **6**: 355-361.
48. Koizumi, M., Iwai, S., Ohtsuka, E.: Cleavage of specific sites of RNA by designed ribozymes. 1988. *FEBS Lett.* **239**: 285-288.
49. van der Krol, A. R., Mol, J. N., Stuitje, A. R.: Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences. 1988. *BioTechniques* **6**: 958-976.

50. Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E., Cech, T.R.: Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. 1982. *Cell* **31**: 147-157.
51. Lambowitz, A. M., Perlman, P. S.: 1990 Involvement of aminoacyl-tRNA synthetases and other proteins in group I and group II intron splicing. *Trends Biochem Sci.* **20**: 440-444.
52. Locardi, C., Puddu, P., Ferrantini, M., Parlanti, E., Sestili, P., Varano, F., Belardelli, F.: Persistent infection of normal mice with human immunodeficiency virus. 1992. *J. of Virology* **66**: 1649-1654.
53. McGarry, T. J., Lindquist, S.: Inhibition of heat shock protein synthesis by heat-inducible antisense RNA. 1986. *PNAS* **83**: 399-403.
54. McGrath, J., Solter, D.: Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. 1983. *Science* **220**: 1300-1302.
55. Melton, D. A.: Injected anti-sense RNAs specifically block messenger RNA translation in vivo. 1985. *PNAS* **82**: 144-148.
56. Michel, F., Dujon, B.: Conservation of RNA secondary structures in two intron families including mitochondrial-, chloroplast- and nuclear-encoded members. 1983. *EMBO J.* **2**: 33-38.
57. Miller, N., and Vile, R.: Targeted vectors for gene therapy. 1995. *FASEB J.* **9**: 190-199.
58. Mintz, B., Cronmiller, C.: METT-1: A karyotypically normal in vitro line of developmentally totipotent mouse teratocarcinoma cells. 1981. *Somatic Cell Genet.* **7**: 489-505.
59. Mitani, K., Caskey, C. T.: Delivering therapeutic genes-matching approach and application. 1993. *TIBTECH* **11**: 162-166.
60. Mizuno, M., Yoshida, J., Sugita, K., Inoue, I., Seo, H., Hayashi, Y., Koshozaka, T., and Yagi, K.: Growth inhibition of glioma cells transfected with the human β -interferon gene by liposomes coupled with a monoclonal antibody. 1990. *Cancer Res.* **50**: 7826-7829.

61. Morgan, R. A., Anderson, W. F.: Human gene therapy. 1993. *Annu. Rev. Biochem.* **62**: 191-217.
62. Morishita, R., Gibbons, G. H., Kaneda, Y., Ogihara, T., and Dzau, V. J.: Novel in vitro method for study of local modulators in vascular smooth muscle cells. 1993. *Hypertension* **21**: 894-899.
63. Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L., Wu, J-R.: A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. 1988. *PNAS* **85**: 6622-6626.
64. Mulligan, R.C.: The basic science of gene therapy. 1993. *Science* **260**: 926-932.
65. Murray, A. W., Szostak, J. W.: Construction of artificial chromosomes in yeast. 1983. *Nature* **305**: 189-193.
66. Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., Roder, J. C.: Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. 1993. *PNAS* **90**: 8424-8428.
67. Paterson, B. M., Roberts, B. E., Kuff, E. L.: Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation. 1977. *Biochemistry* **74**: 4370-4374.
68. Pease, A. C., Wemmer, D. E.: Characterization of the secondary structure and melting of a self-cleaved RNA hammerhead domain by ¹H NMR spectroscopy. 1990. *Biochemistry* **29**: 9039-9046.
69. Pinkel, D., Landegent, J., Collins, C., Fuscoe, J., Segraves, R., Lucas, J., Gray, J.: Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. 1988. *PNAS* **85**: 9138-9142.
70. Praznovszky, T., Kereső, J., Tubak, V., Cserpán, I., Fátyol, K., Hadlaczky, Gy.: *De novo* chromosome formation in rodent cells. .1991. *PNAS* **88**: 11042-11046.
71. Riesner, D., Gross, H. J.: Viroids. 1985. *Annu Rev Biochem.* **54**: 531-564.

72. Rigden, J. E., Rezaian, M. A.: In vitro synthesis of an infectious viroid: analysis of the infectivity of monomeric linear CEV. 1992. *Virology* **186**: 201-206.
73. Robertson, H. D., Altman, S., Smith, J. D.: Purification and properties of a specific *Escherichia coli* ribonuclease which cleaves a tyrosine transfer ribonucleic acid precursor. 1972. *J. Biol. Chem.* **247**: 5243-5251.
74. Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M., Evans, M.: Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. 1986. *Nature* **323**: 445-448.
75. Rogers, S.: Change in the structure of Shope papilloma virus-induced arginase associated with mutation of the virus. 1971. *J Exp Med.* **134**: 1442-1452.
76. Roossinck, M. J., Sleat, D., Palukaitis, P.: Satellite RNAs of plant viruses: structures and biological effects. 1992. *Microbiol Rev.* **56**: 265-279.
77. Rosenberg, S. A., Blease, R. M., Anderson, W. F.: The N2-TIL human gene transfer protocol. 1990. *Human Gene Therapy* **1**: 73-92.
78. Rowen, L., Mahairas, G., Hood, L.: Sequencing the human genome. 1997. *Science* **278**: 605-607.
79. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.: Molecular cloning. A laboratory manual. 1989. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*
80. Sarver, N., Cantin, E. M., Chang, P. S., Zaia, J. A., Ladne, P. A., Stephens, D. A., Rossi, J. J.: Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. 1990. *Science* **247**: 1222-1225.
81. Smith, D., Burgin, A. B., Haas, E. S., Pace, N. R.: Influence of metal ions on the ribonuclease P reaction. 1992. *J. Biol. Chem.* **267**: 2429-2436.
82. Smith, A. E.: Viral vectors in gene therapy. 1995. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 807-838.
83. Stavridi, J. C., Deliconstantinos, G., Psallidopoulos, M. C., Armenakas, N. A., Hadjiminias, D. J., and Hadjiminias, J. Construction of transferrin coated liposomes for in vivo transport of exogeneous DNA to bone marrow erythroblasts in rabbits. 1986. *Exp. Cell. Res.* **164**: 568-572

84. Strauss, W. M., Jaenisch, R.: Molecular complementation of a collagen mutation in mammalian cells using yeast artificial chromosomes. 1992. *EMBO J.* **11**: 417-422.
85. Sun, T-Q., Fenstermacher, D.A., Vos, J-M., H.: Human artificial episomal chromosomes for cloning large DNA fragments in human cells. 1994. *Nature Genetics* **8**: 33-41.
86. Thomas, E. D.: Marrow transplantation and gene transfer as therapy for hematopoietic diseases. 1986. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**: 1009-1012.
87. Uhlenbeck, O. C.: A small catalytic oligoribonucleotide. 1987. *Nature* **328**: 596-600.
88. Vos, J-M. H.: The simplicity of complex MACs. 1997. *Nature Biotechnology* **15**: 1257-1259
89. Wilkie, T. M., Brinster, R. L., Palmiter, R. D.: Germline and somatic mosaicism in transgenic mice. 1986. *Developmental Biology* **118**: 9-18.
90. Wood, S. A., Allen, N. D., Rossant, J., Auerbach, A., Nagy, A.: Non-injection methods for the production of embryonic stem cell-embryo chimeras 1993. *Nature* **365**: 87-89.
91. Zamecnik, P. C., Stephenson, M. L.: Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. 1978. *PNAS* **75**: 280-284.
92. Yates, J.L., Warren, N., Sugden, B.: Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. 1985. *Nature* **313**: 812-815.
93. Zaug, A. J., Grabowski, P. J., Cech, T. R.: Autocatalytic cyclization of an excised intervening sequence RNA is a cleavage-ligation reaction. 1983. *Nature* **301**: 578-583.

Summary

Production of homozygous transgenic lines:

pCePur132 plasmid construction was used for the microinjection experiments. This vector contains an anti-HIVgag-ribozyme „gene”, two mammalian selectable marker genes (puromycin and hygromycin resistance genes) and sequences for maintaining and multiplying in bacteria. NruI restriction endonuclease was used for linearizing the vector. This endonuclease has only one cleavage site in the plasmid, close to the hygromicine resistance gene. The linearized vector DNA was dissolved in injection buffer, in 1-5 µg/ml concentration and filtered to sterilise the DNA solution, and to remove the particles, that might clog the capillary. The DNA solution was injected into the male pronuclei of fertilised mouse eggs. Seventy-four pups were born (from which 3 was dead) from the injection experiments. Genomic DNA was purified from a piece of the mice's tail and the presence of the transgenes were examined by Southern DNA-DNA hybridisation and by Polymerase Chain Reaction (PCR). In the Southern experiments, radioactively labelled pCePur132 plasmid DNA was used, which was previously digested by both EcoRI and SmaI restriction endonucleases. The PCR experiment was carried out by using specific primers to the puromycin resistance gene. As a result of this analysis, 7 mice out of the 71 (E17, E20, E28, E31, E48, E49, E68) proved to be transgenics.

Transgenic mice were crossed with normal mice, which were not carried transgenes in their genome. Genomic DNA was purified from the offspring of each crossing, and the germline transmission of the transgenes was examined by Southern DNA-DNA hybridisations. Five mice out of seven (E17, E20, E28, E31, E48) could hand down the transgenes to their progeny. The offspring of these primary transgenic mice were heterozygous for the presence of the transgenes.

In order to produce homozygous transgenic mice for maintaining the strain and for expression experiments, brothers and sisters were crossed with each other. The genomic DNA of the progeny was examined by Southern DNA-DNA hybridisation for the presence of the transgenes. Those mice that contained the transgenes were further examined by test-crossing. In the test-cross, the “would-be” homozygous transgenic mice were crossed with normal mice, which were not carried the transgenes in their genome. The genomic DNA of the offsprings of these experiments was examined by Southern DNA-DNA hybridisation for the presence of the transgenes. Those mice, which could hand down the transgenes all of their progeny, were homozygous for the presence of the transgenes. These mice were double checked for the homozygosity with a second test-crossing. Three primary transgenic mice’s offsprings could give homozygous transgenic pups (E17, E20, E28) and in this way, three homozygous lines were established. The genomic integration of the transgenes might be different in these homozygous lines. It was indicated by the different pattern of hybridisation bands in Southern DNA-DNA hybridisation on the genomic DNAs of the different homozygous lines (e.g.: Figure 6.).

Detection of transgene expression:

The expression of the transgenes was demonstrated by transgene-specific Reverse-Transcriptase-Polymerase-Chain-Reactin (RT-PCR) experiments. Kidney, and liver polyA RNAs were prepared from the transgenic mice. The polyA RNA samples were tested for genomic DNA contamination by transgene-specific PCR experiments. If genomic DNA contamination was present in the polyA RNA sample, then the transgene-specific band would appear on the agarose gel used for analyse the PCR products. The solutions for the PCR and RT-PCR experiments were also tested for the presence of DNA contamination, and only the pure solutions were used. Approximately 2 µg poliA RNA sample was used in every PCR and

RT-PCR experiment. PolIA RNA was prepared from the kidney. and from liver of normal mice too, and these were used as negative controls in the RT-PCR experiments. The mM2C1pCep8 cell line was used as a positive control in these experiment, a cell line that carried the anti-HIVgag-ribozyme „gene” and the hygromycin and puromycin resistance genes in its genome.

The hygromycin resistance gene was expressed from a *Herpes simplex* virus thymidin-kinase promoter. The primers (HygF and HygR), that were used in the RT-PCR experiments, were both inside the coding sequence of the gene. The RT-PCR gave a 870 bp product with these primers. The expression of the hygromycin gene was successfully detected in all three transgenic lines. The highest expression was observed from the kidney polIA RNAs, therefore, in further RT-PCR experiments, kidney polIA RNA samples were used.

The anti-HIVgag-ribozyme „gene” was expressed from a *Cytomegalovirus* promoter. One of the used primers was specific to a section of the CMV promoter, close to the gene, and this primer contained 4 bp from the beginning of the gene, too (CCMV primer). The second primer was specific to a section of the SV40 polyadenilation signal, before the polIA addition site (SV400929. primer). The RT-PCR reaction gave a 120 bp product, which was easily discernible by 1.8 % agarose gelelectrophoresis and EtBr staining. The expression of the transgene was detected in all three transgenic lines.

The puromycin resistance gene was expressed from the SV40 promoter. The primers (PuroF and PacR), that were used in the RT-PCR experiments, were both inside the coding sequence of the gene. The RT-PCR gave a 330 bp product with these primers. The expression of the puromycin gene was demonstrated from all three transgenic lines.

These homozygous transgenic mice produced may serve as a model system for studying the cleavage action of the anti-HIVgag-ribozyme *in vivo*, and might provide a source for isolation of hygromycin-puromycin resistant „feeder” fibroblast cells from homozygous embryos.