

Az IgG kötő neonatális Fc receptor szerkezet-funkció összefüggés vizsgálata

szakmai zárójelentés (PD101733)

Transzgénikus patkány technológia kidolgozása

A transzgénikus állatok előállításának módszereit a kutatásokban leggyakrabban használt modellállaton, az egéren régóta rutinszerűen alkalmazzák. A transzgénikus állatok előállítására szakosodott kutatócsoportok és laboratóriumok az aktuális igényeknek megfelelő modellállatok létrehozásához alkalmas technológiák fejlesztésével igyekeznek hatékonyabbá tenni a genetikai módosítás sikerességét. A különböző laboratóriumi állatfajok esetében ezek a technológiák nem egyformán működnek, azaz az egyes fajok esetében különböző, az adott fajra nézve specifikus eljárások kidolgozására van szükség. A legáltalánosabban elterjedt modellállat az egér esetében a módszerek nagyrészt kidolgozottak és a legtöbb transzgénikus laborban alkalmazhatóak is. Az egéren kívül egyre nagyobb igény mutatkozik a transzgénikus patkánymodellek iránt is, viszont nagyon kevés olyan kutatócsoport és szakember van aki vállalkozik transzgénikus patkánymodell előállítására (1). A genetikailag módosított patkánymodellek kialakítása számos olyan problémát és nehézséget vet fel, ami az egér esetében megoldott, patkány fajban viszont gondot okoz. A nagyszámú egysejtes embrió előállításához szükséges szuperovulátási protokoll, az embriókimosás, az embriók maturálathoz szükséges médiumok beállítása, a mikroinjektálás, az embriótraszfer és egyéb, a transzgénikus vonalalapításhoz szükséges eljárások komoly kihívások elé állítják a szakembereket. A nemzetközi gyakorlatnak megfelelően, Magyarországon sem volt kidolgozott, rutinszerűen működő módszer transzgénikus patkány létrehozásához. A pályázat benyújtásakor a hozzáférhető szakirodalom is csak csekély számban tartalmazott transzgénikus patkányok előállításáról beszámoló közleményeket.

Az OTKA pályázatban vállaltuk, hogy kidolgozunk egy olyan protokollt, amelyik alkalmas transzgénikus patkánymodell előállítására. A kísérleteket SD (Sprague Dawley) törzsre optimalizáltuk, mivel a patkánymodellt igénylő kutatásokhoz leggyakrabban ezt a törzset használják. A szakirodalomban fellelhető eredményeket saját tapasztalatainkkal kiegészítve beállítottunk egy megbízhatóan működő szuperovulátási protokollt, aminek alkalmazásával megfelelő számú egysejtes embriót nyerhető. Eddigi tapasztalataink azt mutatták, hogy egér esetében az egysejtes embriók zona pellucidája viszonylag kemény, előmagvaik körülhatárolhatóak és e két tulajdonság miatt jól mikroinjektálhatóak. Kísérleteink során megfigyeltük, hogy a patkány embriók esetében a zona pellucida sokkal puhább és rugalmasabb, valamint az előmagvak kontúrjai sem láthatóak olyan élesen mint egér fajban. Az embriók emiatt sokkal sérülékenyebbek és nem jól tolerálják az előmagba történő mikroinjektálást. Ezt a hátrányt kiküszöbölendő speciális szűrőkapillárist fejlesztettünk, annak érdekében, hogy a mikroinjektálás során elkerülhetetlenül fellépő fizikai károsodás minél kisebb legyen és a szűrés miatt kialakuló stressz kevésbé gyengítse az embriót. Megfigyeléseink szerint a patkányembriók mikroinjektálásához fejlesztett szűrőkapilláris alkalmazásával az injektálást túlélő embriók száma nőtt, valamint a szűrési stressz enyhítésével

a beültetést követően az embriók nagyobb eséllyel tapadtak meg. A sikeres embriótranszfer kivitelezéséhez kifejlesztésre került egy olyan mikrosebészeti eljárás is (oviductus punkció), amely a manipulált (mikroinjektált) egysejtű embriók biztonságos és sikeres beültetését teszi lehetővé az álvemhes recipiens nőstényekbe. Egéknél embrióbeültetéshez recipiensnek leggyakrabban CD1 nőstényeket használnak a magas alomszám és a jó nevelőképesség miatt. Patkány esetében nem találtunk ilyen paraméterekre utaló közleményt. Több kísérletet is végeztünk annak érdekében, hogy recipiensnek megfelelő törzset találjunk. Eredményeink szerint a WISTAR patkányok a CD1 egerekhez hasonlóan nagyon jó eredményeket mutatnak az alomnagyságban és az utódnevelő képességben emiatt alkalmasak a manipulált embriók beültetésére és a megszületett utódok eredményes felnevelésére.

Az OTKA szerződésben vállalt metodika-fejlesztési részfeladatok, más projekttel kapcsolatos eredményeit tartalmazó nemzetközi közlemények társszerzőségemmel az OTKA témaszámom feltüntetésével:

Szebényi K, Füredi A, Kolacsek O, Pergel E, Bősze Z, **Bender B**, Vajdovich P, Tóvári J, Homolya L, Szakács G, Héja L, Enyedi Á, Sarkadi B, Apáti Á, Orbán TI.: Generation of a Homozygous Transgenic Rat Strain Stably Expressing a Calcium Sensor Protein for Direct Examination of Calcium Signaling. *Sci Rep*. 2015 Aug 3;5:12645. doi: 10.1038/srep12645. **IF: 5,57**

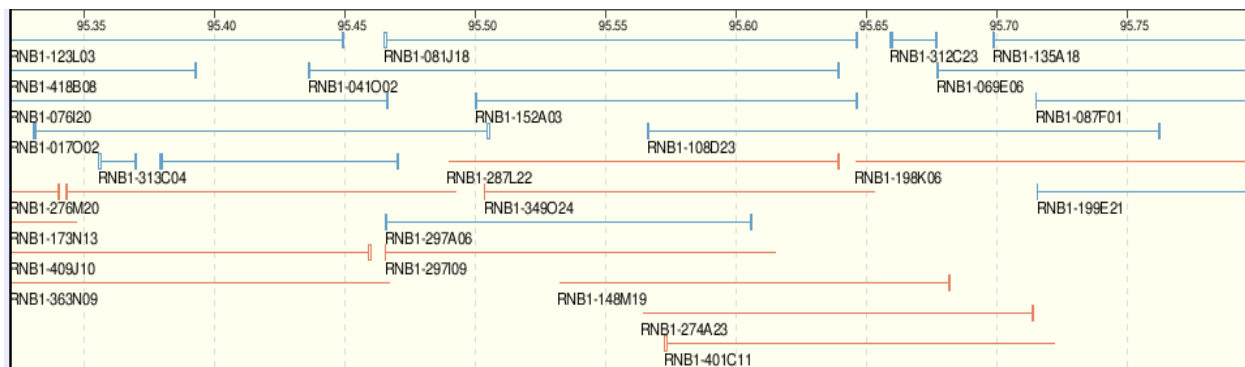
Szebényi K, Füredi A, Kolacsek O, Csohány R, Prókai Á, Kis-Petik K, Szabó A, Bősze Z, **Bender B**, Tóvári J, Enyedi Á, Orbán TI, Apáti Á, Sarkadi B.: Visualization of Calcium Dynamics in Kidney Proximal Tubules. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Nov;26(11):2731-40. doi: 10.1681/ASN.2014070705. Epub 2015 Mar 18. **IF: 9.34**

A BAC mutációk elkészítése, leírás, eredmény bemutatása, szekvenálási adatok

A mesterséges kromoszómák olyan klónozó vektorok, amelyek a valódi kromoszómák néhány tulajdonságával rendelkeznek és viszonylag nagy DNS darabok klónozására használhatók. A bakteriális mesterséges kromoszómák (BAC-ok) akár nagyjából 300 kilobázis (kb) hosszúságú idegen DNS darabot is beépíthetnek. Azokban az esetekben ahol komplex reguláló szakaszok együttes jelenléte szükséges a kívánt gén vagy gének kifejeződéséhez célszerű a BAC alkalmazása. A mesterséges kromoszóma típusú vektorok alkalmazása kópiaszám függő, integrációs helytől független, optimális kifejeződést biztosít. Ennek oka, hogy az a mérettartomány, amelyet befogadni képesek, biztosítja az összes szükséges szabályozó elem és a határoló elemek együttes meglétét. A határoló elemek vagy inzulátorok egyfelől védik az expressziós domént az integráció helyétől függő a kromoszómaszerkezet által létrehozott pozicionális hatásoktól, másfelől megakadályozzák, hogy a határoló elemek kívül eső szabályozó elemek is hatással legyenek a kifejezteni kívánt gén promóterére. E konstrukciók elkészítése sokkal munkaigényesebb és az injektálásuk is nagyobb gyakorlatot igényel. A beültetést követően általában a megszületett utódok 2-8%-a transzgenikus (2). A kópiaszám rendszerint alacsony (1-5 beépült kópia), amely részben annak tulajdonítható, hogy a nagy méret miatt az injektáló oldat kevesebb DNS molekulát tartalmaz, mint a hagyományos konstrukciók.

A vad típusú patkány FcRn-t túlexpresszázó transzgénikus patkánymodell előállítását mesterséges kromoszóma alapú transzgénikus eljárással (BAC - Bacterial Artificial Chromosome) terveztük végrehajtani. A BAC transzgenezis sikeréhez szükséges potenciális kiindulópontot jelentő BAC klónoknak nagyon szigorú feltételeknek kellett megfelelniük. A szóba jöhető klónoknak jól karakterizáltaknak kell lenniük valamint olyan hasítási helyeket kell tartalmazniuk, amelyek lehetővé teszik az ideális konstrukció kialakítását. A BAC klón adatbázisokban történő keresés alapján három BAC klón felelt meg annak a feltételnek, hogy kedvező pozícióban tartalmazza a patkány FCGRT gént

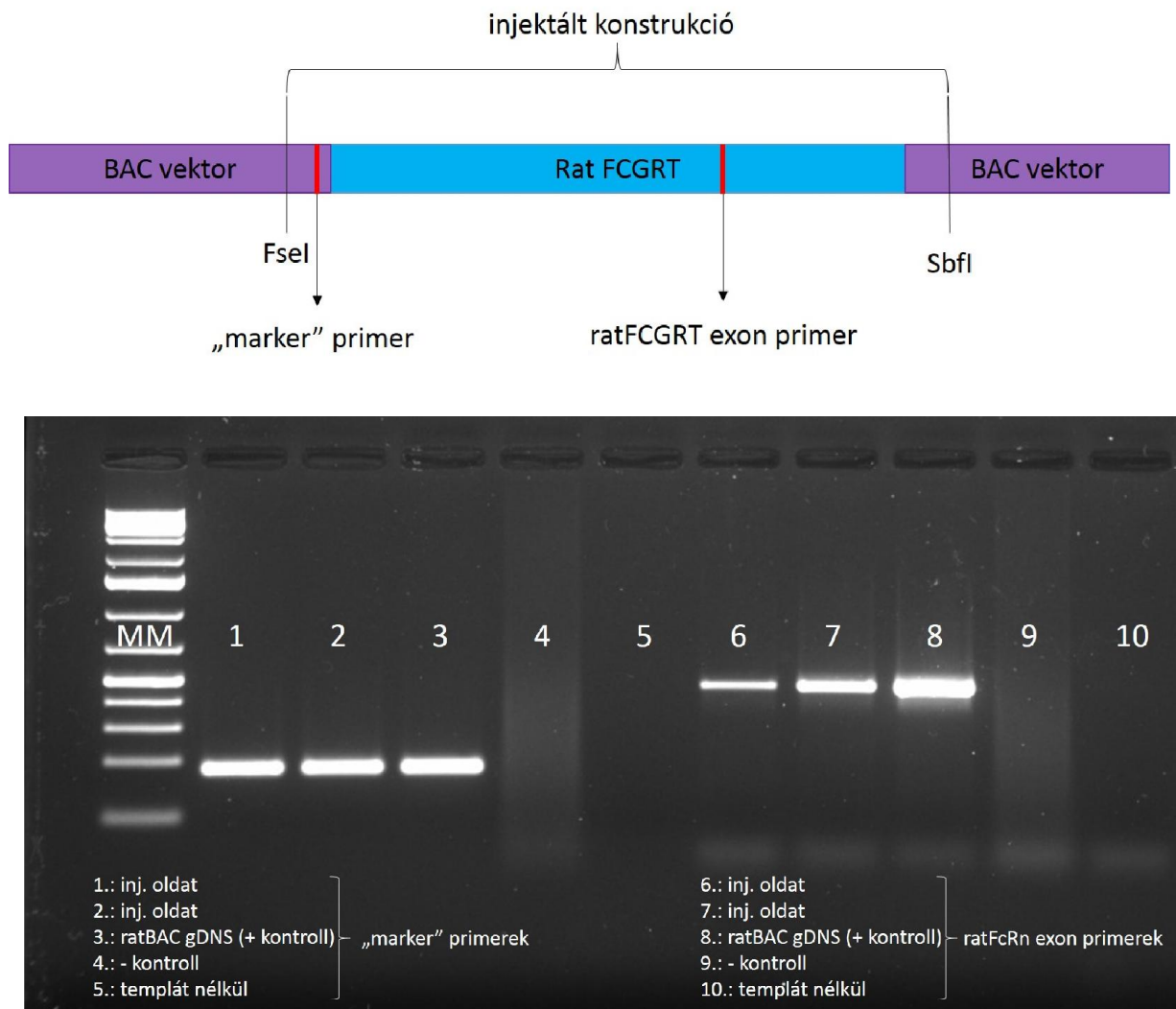
(<http://analysis2.lab.nig.ac.jp/ratBrowser/cgi-bin/halDetail.cgi?org=rn&chr=1&level=6¢er=95571181&keyword=29558>). A legelőször beszerzett klónok több hónapos tesztelését követően derült csak ki egyértelműen, hogy az nem alkalmas a transzgén konstrukció előállítására. Ezt követően egy másik klónt kellett beszereznünk, amely a tesztelések alapján alkalmasnak bizonyult a konstrukció előállításához. A RNB1-152A03 azonosítóval rendelkező BAC klón tartalmazza a patkány FcRn-t kódoló FCGRT gént, annak teljes határoló elemeivel és szabályozó szakaszaival együtt (1 ábra).



1. ábra ratBAC klónok azonosítása BAC adatbázis alapján

A BAC klón antibiotikum szelekciós felnevesztése sikerrel járt és a felnevesztett klónból totál DNS-t izoláltunk. A rendelkezésünkre álló BAC DNS-ből restriktions enzimek segítségével vágtuk ki azt a szakaszt, amely tartalmazza az FCGRT gént annak teljes szabályozó régiójával együtt. Mivel ezekben a transzgénikus patkányokban a patkány FCGRT-t termeltetjük túl, a lehetségesen transzgénikus alapítók azonosítása nehézségekbe ütközhet, hiszen a bevitt és az endogén gén nem különbözik. Ahhoz hogy hiánytalan patkány FCGRT-t tartalmazó injektáló oldatot állítsunk elő és mégis biztosan tudjuk azonosítani a transzgénikus alapító egyedeket, azt a megoldást választottuk, hogy olyan restriktions enzimet vagy enzimbizonyítót kerestünk, amelyek segítségével az injektálandó konstrukcióban benne van a teljes patkány FCGRT gén annak összes szabályozó elemével együtt és a BAC klón vektorának egy rövid, 100-150 bp hosszúságú darabja. Az így előállított konstrukció előnye a teljes FCGRT gén valamint az egyértelmű azonosításhoz szükséges marker elem (vektor DNS) (2 ábra) jelenléte. A specifikus BAC emésztéshez FseI és SbfI enzimbizonyítók bizonyultak használhatónak. A nagyméretű BAC szakaszokat tartalmazó injektáló oldat összetétele – eltérően a kisebb konstrukciók injektálásához szükséges oldatoktól – speciális igényeknek kell, hogy megfeleljen. A BAC injektáló oldatok általában tartalmaznak egy spermin-spermidin polyamin

mixet ami a nagyméretű konstrukció fizikai károsodásának (törés) esélyét csökkenti. Eddigi tapasztalataink azt mutatták, hogy a polyamin mix DNS védő hatása mellett kedvezőtlen tulajdonsággal is bír, azaz a konstrukció beépülésének esélyét csökkenti (4). Ezen tapasztalatunk figyelembevételével az oldatból mellőztük a spermin-spermidint tartalmazó polyamin mixet. Az azonosításhoz olyan jól működő multiplex PCR rendszert terveztünk, amelyik egyfelől a patkány FCGRT gént, másfelől a BAC klón rövid DNS szakaszát amplifikálja egyidejűleg. A két célszakaszra kapott PCR termékek nagy méretkülönbséggel rendelkeznek, ami megkönnyíti azok egyidejű vizsgálatát és azonosítását az agaróz gél-elektroforézis során (2. ábra).

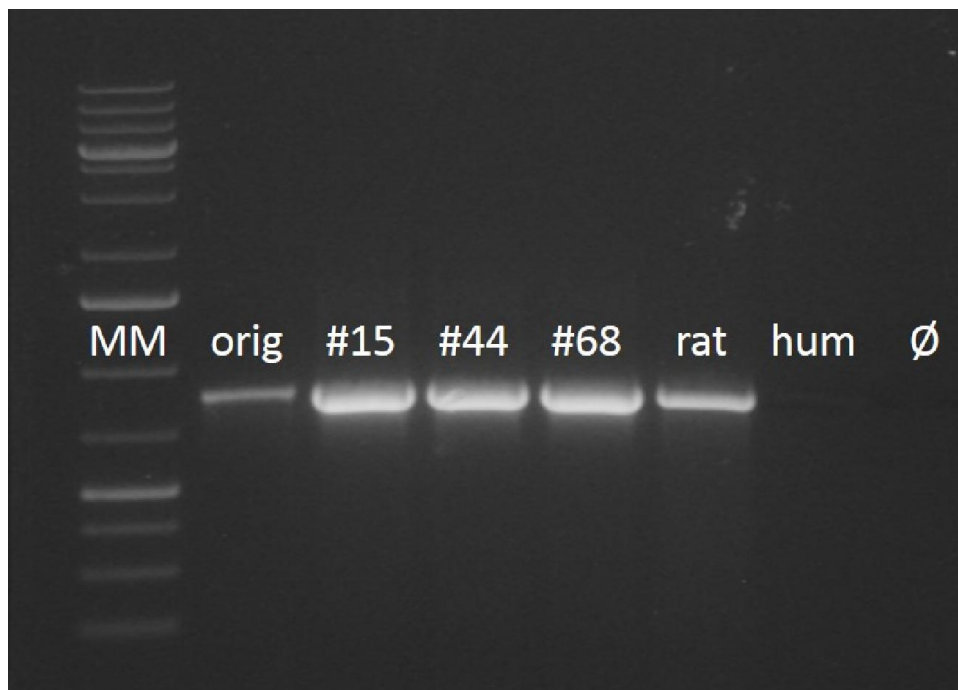


2. ábra ratRcRn BAC azonosításához tervezett primerek ellenőrzése PCR-rel (gél elektroforézis)

A vad típusú patkány FCGRT-re generálódó termék megjelenése egyben a DNS minőségét is jelzi, hiszen az injektálásból származó utódok mindegyike hordozza 2 kópiában a vad patkány FCGRT-t. Ez azt jelenti, hogy minden tesztelt mintában kapnunk kell a patkány FCGRT-ről amplifikált terméket és amelyik mintában a „marker” primerekkel összeállított reakcióból is érkezik értékelhető fragment, azokba az egyedekbe beépült a konstrukció azaz

több mint két kópiában van jelen a patkány FCGRT gén. Így nem kell attól tartanunk, hogy egy DNS preparálási hiba miatt veszítünk el egy lehetséges transzgenikus jelöltet.

A másik tervezett transzgenikus patkánymodell lényege, hogy az FCGRT kódoló régiójában lévő négy N-glikán kötőhelyeit úgy mutáltatjuk el, hogy az N-glikozilációs pontok (Asn-X-Ser/Thr, ahol X bármilyen aminosav lehet a prolint, szerint és treonint kivéve) helyett az emberi FcRn-ben ugyanitt lévő aminosavat integráljuk. A célzott mutációk generálása egy nagyméretű BAC klónon nagyon bonyolult. Az integrációs helytől független, kópiaszámfüggő expressziót biztosító BAC konstrukciók tervezése és előállítása valamint injektálása tovább nehezíti (a nagyméretű konstrukció fizikai károsodása) a transzgenikus modellállatok előállítását. Ezen problémákon felül a nagyméretű BAC konstrukciók igen alacsony százaléku beépülési esélye is erősen csökkenti a transzgenezis sikerét. A mutált BAC konstrukció előállításához a már sikeresen izolált és tesztelt patkány FCGRT-t tartalmazó RNB1-152A03 azonosítójú BAC klónt használtuk. Counter-Selection BAC Modification Kit használatával (<http://www.genebridges.com/storage/NeueManuals/K002%20Counter%20Selection%20Kit-Version3.3-2014.pdf>) használatával elkészítettük a módosított konstrukciót. A módosítás lényege a patkány FcRn fehérje 109-es pozíciójában lévő Asn (N) cseréje Lys (K) -re. A BAC klón célzott mutációinak végrehajtása sikerrel járt. A három, mutációt hordozó klónt PCR-rel teszteltük (3. ábra) majd szekvenálással ellenőriztük az aminosavcserét kódoló mutációk sikerességét. Az eredmények jobb megerősítése érdekében két irányból is megszekvenáltuk a klónokat. A szekvenálás eredménye bizonyította, hogy mind a 3 módosított klónban sikerült a pontmutáció, azaz a kodon aac-ről (Asn) acc-re (Thr) változott.



3. ábra Mutáltatott ratBAC klónok ellenőrzése PCR-rel szekvenálás előtt

A kidolgozott patkány szuperovuláltatási és mikroinjektálási protokollt alkalmazva 223 donor nőstény patkányt használtunk fel. A PCR-rel ellenőrzött konstrukciókat tartalmazó injektáló oldatot 850 db egysejtes patkány embrió előmagjába injektáltuk. A megszületett 264 db utód egyike sem bizonyult transzgénikusnak. A megszületett utódok és a beültetett embriók aránya közel megfelel a szakirodalomban leírtaknak (1). Saját eddigi tapasztalataink szerint a BAC transzgenézis az egyéb transzgénikus módszerekkel (lentivírus vektorok, Sleeping Beauty, plazmid) ellentétben nagyon sok időt és munkát igényel, valamint az eljárás munka- és embrióigénye is rendkívül magas (1. táblázat). A BAC konstrukciók nagy mérete miatt az injektálást követő esetenként fellépő fizikai károsodás (törés) is növeli a sikeres beépülés kockázatát.

konstrukció	méret	beültetett embrió (db)	megszületett utód (db)	transzgénikus utód (db)	%
BAC (4)	102 kb	688	240	5	2
lentivírus (3)	10 kb	8	4	1	25
Sleeping Beauty (5)	6 kb	156	75	16	21

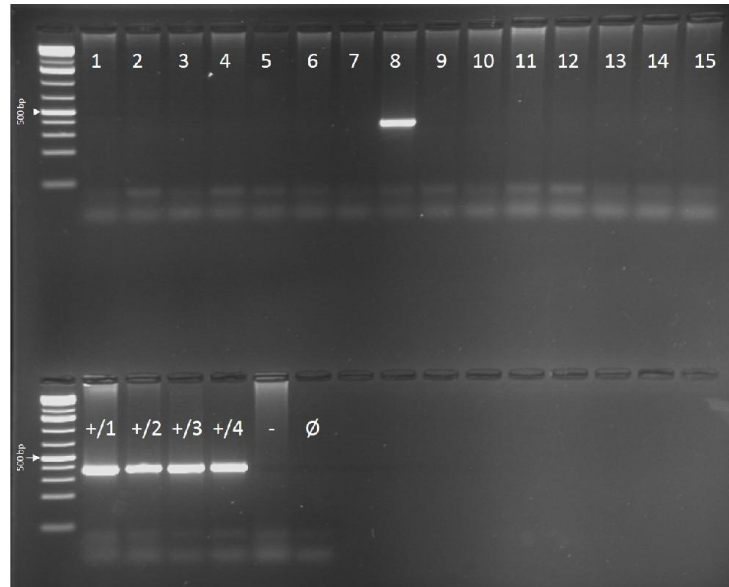
1. táblázat Transzgénikus módszerek összehasonlítása hatékonyság alapján

A humán FcRn patkány, mint áthidaló megoldás bemutatása

A felmerülő nehézségek miatt új megközelítéssel próbálkoztunk. Patkány lépből RNS-t izoláltunk, majd arról cDNS-t szintetizáltattunk ABI High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit segítségével. A teljes FcRn gén kódoló régióira primereket terveztünk és a cDNS-t templátként használva PCR reakciót végeztünk. Az eljárás további részeként a keletkezett PCR terméket megszekvenáltattuk ellenőrizendő, hogy a várt szekvenciát kapjuk-e? Amennyiben a szekvenálás eredménye pozitív, a terméket beklónozzuk egy polyA farkat is tartalmazó pcDNA 3.1 expressziós vektorba. Ezek után elvégezhetjük a mutagenéziseket. Mivel a patkány genom teljes mértékben ismert specifikus primerek segítségével PCR-rel izolálhatjuk a patkány FcRn saját promóterét. A pozitív eredménnyel záródó mutációs eljárás után a konstrukcióhoz hozzáillesztjük az izolált patkány FcRn saját promóterét. Az így összeállított konstrukciót restriktációs enzimekkel kivágjuk a vektorból és injektáló pufferbe felvéve előállítjuk a mutációkat tartalmazó injektáló oldatot, amelyet egysejtes patkány embriókba mikroinjektálunk. Erőfeszítéseink ellenére nem sikerült ezzel a módszerrel a célnak megfelelő konstrukciót előállítanunk.

Mivel a patkány FCGRT glikán oldalláncait kódoló módosított BAC konstrukcióval sem sikerült transzgénikus patkányt előállítani, ezért alternatívaként megpróbálkoztunk egy FCGRT tartalmazó humán BAC klón injektálásával. Eredetileg ezt a konstrukciót a már sikeresen használt, patkány FcRn gént teljes szabályozó régiójával együtt tartalmazó RNB1-152A03 BAC klón több ponton történő elmutáltatásával szeretnénk volna létrehozni irányított mutagenézissel a GeneBridges Quick & Easy BAC Modification Kit segítségével. BAC könyvtárakban végzett elemzések eredményeképpen egy CTD-2523C15 azonosítójú klónnal

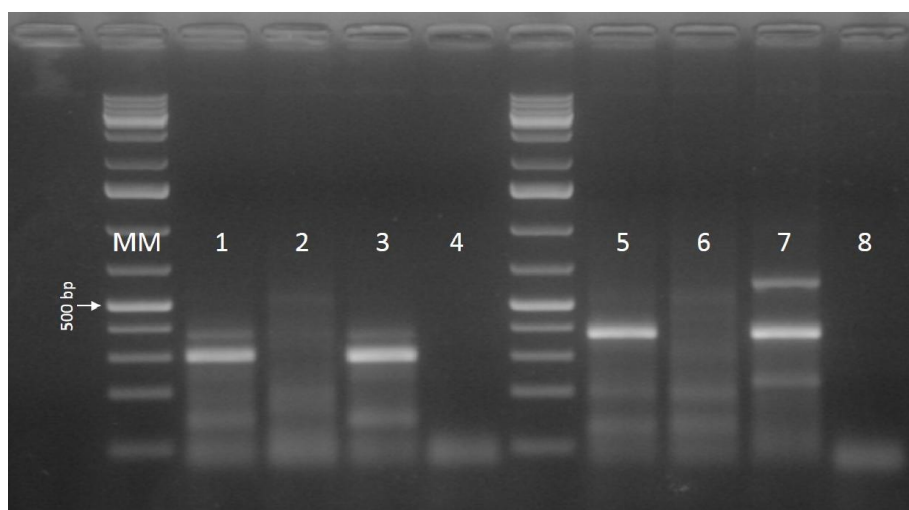
dolgoztunk, mert a megfelelő génszegmens kinyeréséhez kedvező hasítási helyekkel rendelkezett. Az injektálandó régiót PmeI és NotI restriktációs enzimekkel vágtuk ki a BAC DNS-ből, majd Pulse Field gélelektóforézis segítségével választottuk el a fragmenteket. 64 utódot tudtunk tesztelni a transzgénre specifikus primerekkel. Az eddigi eredmények alapján sikerült detektálnunk egy olyan utódot, amelyik a PCR szerint hordozza a hFCGRT gént (4 ábra).



4. ábra humán FcRn azonosítása patkányokban

1-15: patkány; +/1: humán genomi DNS; +/2: humBAC DNS; +/3: injektáló oldat; +/4 humán genomi DNS; -: nyúl genomi DNS; Ø: víz

A tenyésztérett (kilenc hetes) kor elérésekor ezt az alapító egyedeket vad típusú SD patkánnyal keresztezve F1 utódokat hozunk létre. RT-PCR-rel meggyőződünk arról, expresszál-e a beépült transzgén. A reakcióban résztvevő primerek a humán FCGRT gén második exonjára lettek tervezve. cDNS esetében pozitív kontrollként humán cDNS-t alkalmaztunk, a genomi



5. ábra humFcRn expresszió detektálása RT-PCR-rel

1.: heterozigóta TG cDNS; 2.: WT SD cDNS 3.: + kontroll cDNS; 4.:templát nélküli reakció; 5.: heterozigóta TG gDNS, 6.: WT SD gDNS; 7.: + kontroll gDNS; 8.: templát nélküli reakció

DNS-sel végzett reakcióban pedig humán szövetből izolált DNS-t használtunk. cDNS esetében a várt termék mérete: 298 bp, genomiális DNS esetében 375 bp. A kapott eredmények alapján kijelenthető, hogy a beépült transzgérő RNS íródik, azaz a transzgénikus patkányokban a humán FcGRT gén expresszál (5. ábra).

A humán FcRn-t hordozó patkányokból sikerült heterozigóta vonalat alapítani. Az RT-PCR-rel bizonyított expresszió ellenére a humán FcRn fehérjét nem sikerült kimutatni a transzgénikus patkányokban. Ennek valószínűsíthető oka az, hogy a nagyméretű BAC a beépüléskor fizikailag károsodott. Ennek következtében olyan szabályozó régió is sérülhetett, amely ugyan gyenge expressziót lehetővé tesz, de a gén funkcionálisan működésképtelen, vagy olyan kis mennyiségű fehérje képződik, amely nem detektálható. Saját megfigyeléseink szerint (4) a nagyméretű BAC konstrukciók esetében a fizikai károsodás nem ritka. A rutinszerű protokollok útmutatásai szerint a konstrukció törését elkerülendő speciális összetételű (polyamin-mix) injektáló puffer alkalmazását javasolják (spermin-spermidin). A polyamin-mix alkalmazása viszont azzal a hátránnyal jár, hogy a konstrukció beépülésének esélye jelentősen romlik. A transzgénikus technológia egyre dinamikusabban fejlődik. Fokozatosan szélesedik az egyszerűbben kivitelezhető, hatékonyabb eljárások köre (Sleeping Beauty, Zink Finger, TALEN, CRISPR). A BAC transzgenézis nehézségét és bonyolultságát az újabban megjelenő technológiák kiküszöbölhetik. Az OTKA pályázat tapasztalatait és új eredményeit (transzgén patkány előállítási metodika) hasznosítva és a korszerűbb, hatékonyabb technológiákkal ötvözve sikeres transzgénikus rendszer alakítható ki a patkány mint fontos modellállat tekintetében is.

1. Takahashi R1, Ueda M.: Generation of transgenic rats using YAC and BAC DNA constructs. *Methods Mol Biol.* 2010;597:93-108. doi: 10.1007/978-1-60327-389-3_7.
2. Takahashi R, Ito K, Fujiwara Y, Kodaira K, Kodaira K, Hirabayashi M, Ueda M.: Generation of transgenic rats with YACs and BACs: preparation procedures and integrity of microinjected DNA. *Exp Anim.* 2000 Jul;49(3):229-33.
3. **Bender B**, Hoffmann OI, Negre D, Kvell K, Bősze Z, Hiripi L.: Low titer lentiviral transgenesis in rodents with simian immunodeficiency virus vector. *Biotechniques.* 2013 Sep;55(3):137-40. doi: 10.2144/000114078.
4. **Bender B**, Bodrogi L, Mayer B, Schneider Z, Zhao Y, Hammarström L, Eggen A, Kacs Kovics I, Bosze Z.: Position independent and copy-number-related expression of the bovine neonatal Fc receptor alpha-chain in transgenic mice carrying a 102 kb BAC genomic fragment. *Transgenic Res.* 2007 Oct;16(5):613-27. Epub 2007 Jun 27.

5. Szabényi K, Füredi A, Kolacsek O, Pergel E, Bősze Z, **Bender B**, Vajdovich P, Tóvári J, Homolya L, Szakács G, Héja L, Enyedi Á, Sarkadi B, Apáti Á, Orbán TI.: Generation of a Homozygous Transgenic Rat Strain Stably Expressing a Calcium Sensor Protein for Direct Examination of Calcium Signaling. *Sci Rep.* 2015 Aug 3;5:12645. doi: 10.1038/srep12645.

Gödöllő, 2016. március 01.

Dr. Bender Balázs
vezető kutató