

Humán alkalikus foszfatázt termelő transzgenikus nyulak előállítása lentivírus géntranszferrel

OTKA T049034

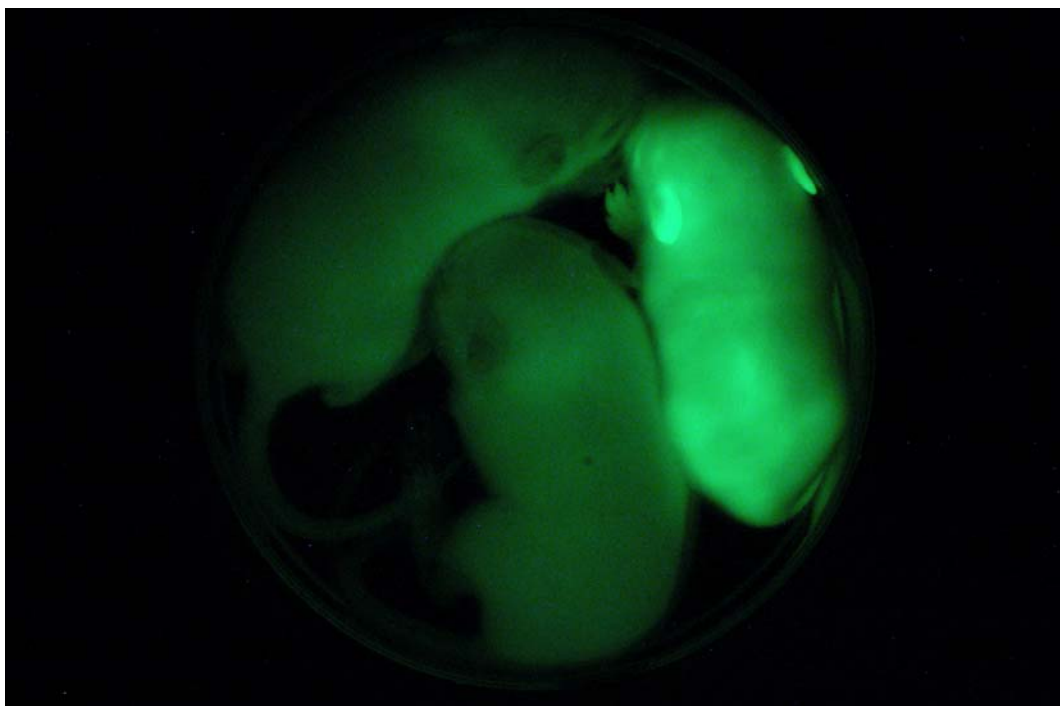
Zárójelentés

I. A lentivírus transzgenezis adaptálása nyúlban

A lentivírus transzgenezis hatékonysága fajspecifikus különbségeket mutat, egyes fajokban pl. sertés, csirke jó hatásfokkal működik, míg más fajokban nem, vagy csak kis hatásfokkal pl. majom, szarvasmarha. Szarvasmarhában a korai embrió nem, csak a petesejt volt transzdukálható lentivírussal. Ugyanakkor az eddig vizsgált haszonállatfajok mindegyikében a HIV vírusból kifejlesztett lentivírus vektorokat használtak (Hofmann et al. 2004).

A nyúlra szabott lentivírus transzgenezis módszer kifejlesztéséhez általános génkifejeződést biztosító indikátor génes HIV alapú lentivírus vektorokat használtunk. Elsőként az rHIV-PPT-PGK-GFP-WPRE vektort (HIV-PGK-GFP), mely harmadik generációs ún. öninaktiváló lentivírus vektor, melyben a „háztartási gén” foszfoglicerát kináz promóter (PGK) irányítása alá helyezték a jelző zöld fluoreszcens protein gén kódoló régióját (GFP). A lentivírus preparátumok minden esetben Kvell Krisztiánnal és Czömpöly Tamással együttműködve (Pécsi Orvostudományi Egyetem Immunológiai és Biotechnológiai Intézet) készültek és ők végezték a vírus titerek meghatározását is. A vírus titerek meghatározása szövettényészeti sejtekbe történő transzdukción követő FACS analízissel történt. Egy újabb HIV alapú lentivírus vektort is használtunk a pHIV-PPT-EF1-GFP-t (HIV-EF1-GFP), amelyben az erős, széles szövetspecifitású, humán elongation factor 1 alfa (EF1) promóter irányítás alá helyezték a GFP jelzőgént (Kvell et al. 2005). Mind az EF1 promóterrel mind a PGK promóterrel működő vírussal előállítottunk transzgenikus egereket. Tudomásunk szerint Magyarországon elsőként nekünk sikerült lentivírussal transzgenikus egereket létrehozni. Nemesak a hagyományosan transzgenikus egerek előállítására használt FVB/n, hanem az előmag injektálásra alkalmatlan Balb/c egértörzsből is sikerült nagy hatékonysággal minden szövetükben zöld jelzőgént expresszáló egérvonalakat előállítani (**1. ábra és 1. táblázat**). Ennek az a jelentősége, hogy a hagyományos mikroinjektálásra - jól látható előmagja miatt - csak néhány egértörzset illetve azok F1 hibridjeit használják, míg lentivírus transzgenezissel bármely egértörzsből nagy hatékonysággal lehet transzgenikus módosítást végrehajtani (Kissler et al. 2006).

1. ábra: A HIV-EF1-GFP lentivírus vektorral perivitelláris térbe injektált embrió beültetéséből született GFP-t expresszáló Balb/c egér nem transzgenikus alomtársai között



LENTIVÍRUS	EGÉRTÖRZS	INJEKTÁLT ÉS BEÜLTETETT EMBRIÓK	UTÓDOK SZÁMA	PCR POZITÍV	ZÖLD EGÉR
HIV-PGK-GFP	FVB/n	10	3	2	1
HIV-EF1-GFP	FVB/n	41	27	13	9
HIV-EF1-GFP	Balb/c	20	12	7	4

1. táblázat: A HIV lentivírus vektor perivitelláris térbe történt injektálásából született utódok FVB/n és Balb /c egértörzsekben

A stabil GFP+ transzgenikus Balb/C egerek hisztológiai és citometriás eredményei alapján EF1 promóter használatával a transzgén stabilan –hat generáción keresztül- öröklődik. Az expresszió mozaikmentes. A GFP+ transzgenikus Balb/c egérrel elvégzett sejt- illetve szövetátültetés esetében könnyen követhetők a donor eredetű sejtek natívan, sőt akár in vivo is. Ez jelentősen megkönnyíthet egyes immunológiai témájú kutatásokat. A lentivirussal létehozott GFP+ Balb/c egereket FACS analízisnek is alávetettük. Eredményeinkről egy kéziratot

készítettünk, mely a Transgenic Research-ben közlés alatt áll (Kvell K., Czömpöly T., Hiripi L., Balogh P., Kóbor J., Bodrogi L., Pongrácz J. E., Ritchie W.A. , Bősze Zs. (2009). Characterisation of eGFP-transgenic BALB/c mouse strain established by lentiviral transgenesis. Submitted to *Transgenic Res.*).

Mivel mindkét HIV alapú lentivírus vektorral létrehoztunk transzgenikus egereket, ki tudtuk zárni, hogy bármilyen technikai probléma illetve a vírus titer lenne az oka annak, hogy egyik vektorral sem sikerült transzgenikus nyulat létrehoznunk. A HIV-PGK-GFP lentivírus / 1×10^9 U/ml/ perivitelláris térbe történő injektálásából több mint ötven nyúl született azonban ezek egyike sem volt GFP pozitív és ami még meglepőbb, a transzgennek a nyúl DNS-be történő integrációját sem sikerült kimutatnunk (**2. táblázat**).

Injektált lentivírus vektor	Injektálás időpontja	Beültetett embriók száma	Recipiensek száma	Megszületett utód	PCR +	Zöld
HIV -EF1-GFP	1 sejtes embrió	370	28	50	0	-
HIV- EF1-GFP	Szedercsira embrió	49	3	2	0	-
HIV- PGK-GFP	1 sejtes embrió	285	15	32	0	-
HIV-PGK-GFP	Szedercsira embrió	33	2	6	0	-

2. táblázat: A HIV lentivírus vektorral egysejtes nyúl embriók perivitelláris terébe történt injektálások eredménye

Tekintettel arra, hogy a HIV alapú vírusokkal nem sikerült transzgenikus nyulat létrehoznunk elkértünk és megkaptuk az un. simian virus /SIV/ alapú lentivírus létrehozására alkalmas vektorokat, Dr Cossettől /Inserm, Lyon, Franciaország/. Erre azért volt szükség, mert egy közlemény szerint, a nyúl sejtekben a HIV alapú vektorok un. post-entry block következtében aberráns módon tudnak csak eljutni a sejtmagba és emiatt a HIV alapú vektorok fertőzőképessége nyúlban rendkívül alacsony (Cutino-Moguel and Fassati 2006). Simian immunodeficiency vírus (SIV) vektorokat több laboratóriumban is előállítottak és alkalmazzák elsősorban génterápiás kísérletekben. Ezen vektorok jellemzése világossá tette, hogy a HIV vírus vektorokhoz hasonlóan

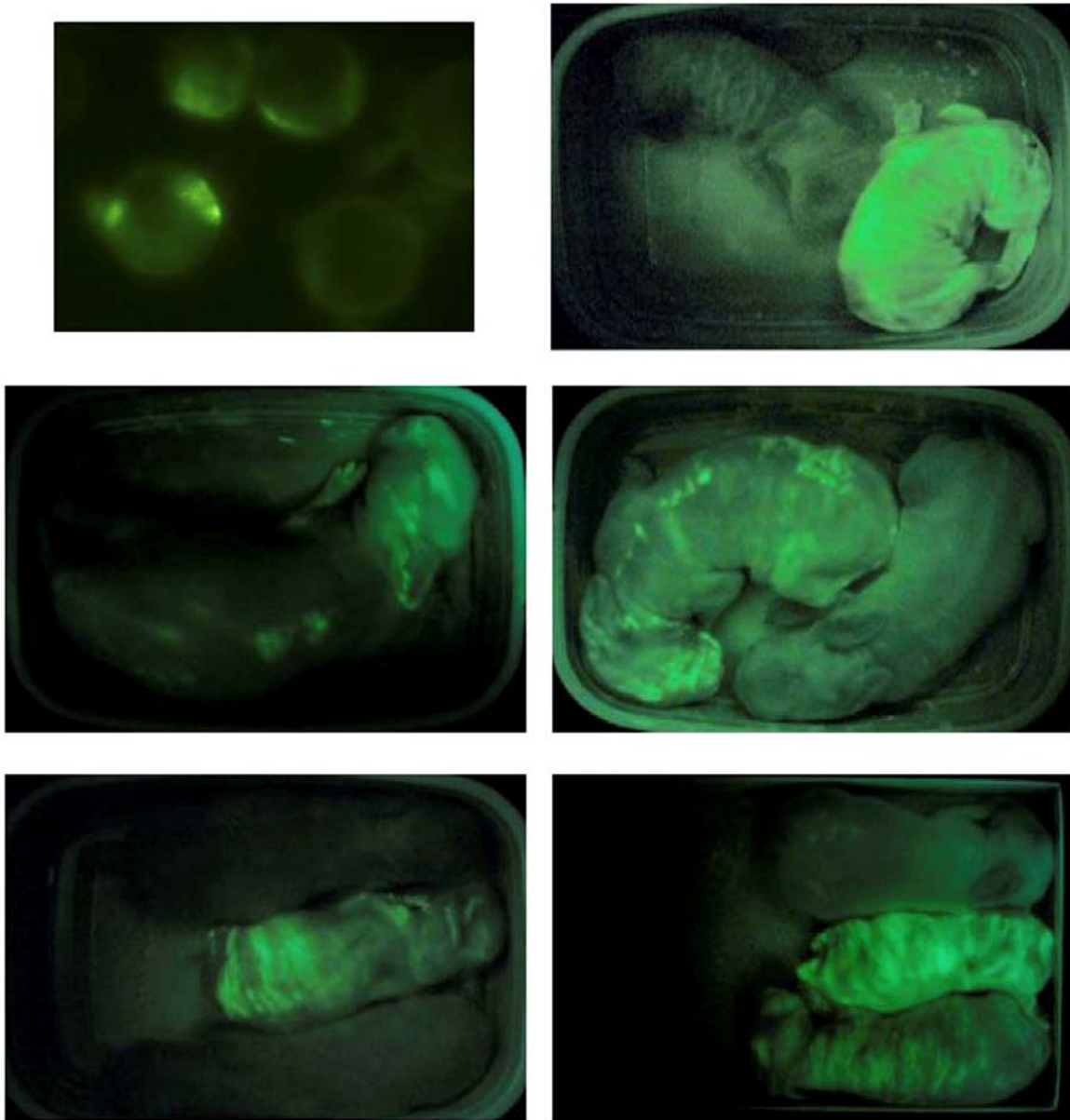
képesek nem osztódó sejteket is fertőzni, de ugyanakkor az eddigi adatok alapján simian sejtekben jobban működnek mint a HIV vektorok, amely alkalmassá teszi azokat preklinikai kísérletek folytatására (Negre and Cosset 2002). Az elsőként előállított SIV-GAE-CAG-eGFP-WPRE-SIN LTR lentivírus (SIV-CAG-GFP) a CAG promóter irányítása alatt hordozta az eGFP jelzőgént. A CAG promóter beépítését az indokolta, hogy a CAG promótert tartalmazó SIV vírussal már sikerült *in vitro* nyúl őssejteket transzdukálni egy francia kutatócsoportnak (Affanasieff M. személyes közlés). A CAG egy mesterségesen létrehozott promóter, amely a CMV vírus enhanszert, a béta aktin promótert és intront tartalmazza egybeépítve. A CAG promótert korábban már alkalmazták egér illetve humán őssejtekben is (Xie et al. 2007). Dr Cossett rendelkezésünkre bocsátott egy másik SIV lentivírust is, amely az ún. „spleen focus forming virus” (SFFV) promóterét tartalmazza. Az első kísérletsorozatban létrehozott SIV vírus a CAG promóter irányítása alatt tartalmazta az eGFP-jelzőgént, titere a korábbi HIV vírusokhoz képest két nagyságrenddel alacsonyabb (4×10^6 U/ml) volt. Az alacsony vírus titer ellensúlyozására a nyúl embriókat, egy 2007-ben megjelent közlemény (Ritchie et al. 2007) alapján a perivitelláris térbe (PVI) történt többszöri injektálással állítottuk elő. Összességében 50-100 μ l vírus tartalmú oldatot juttattunk embrióként -folyamatos pozitív nyomást alkalmazva az injektáló kapillárisban- a perivitelláris térbe.

INJEKTÁLT LENTIVÍRUS VEKTOR	BEÜLTETETT EMBRIÓK SZÁMA	RECIPIENSEK SZÁMA	MEGSZÜLETETT UTÓD	PCR+ %	ZÖLD %
SIV-CAG-GFP-	430	11	64	24 37%	16 25%
SIV-SFFV-GFP-	192	11	32	10 31%	0

3. táblázat: A SIV-CAG-GFP és a SIV-SFFV-GFP lentivírus vektorokkal egysejtes nyúl embriók perivitelláris terébe történt injektálások eredménye

A második kísérletsorozatban a promóterében különböző SIV-SFFV-eGFP-SIV vírust használtuk. Ennek titere 2×10^7 U/ml volt. Amint az a **3. táblázat** adataiból kitűnik mindkét SIV vírus vektorral *sikerült a lentivírus vektorok esetében „elvárt” hatékonysággal (31-37%) transzgenikus nyulakat előállítanunk!* A beépülést transzgen specifikus PCR-el bizonyítottuk a nyulak szövetmintáiból kivont genomi DNS-t használva templátnak. A meglepő eredmény azonban az volt, hogy míg a CAG lentivírus injektált embriókból 16 (25%)

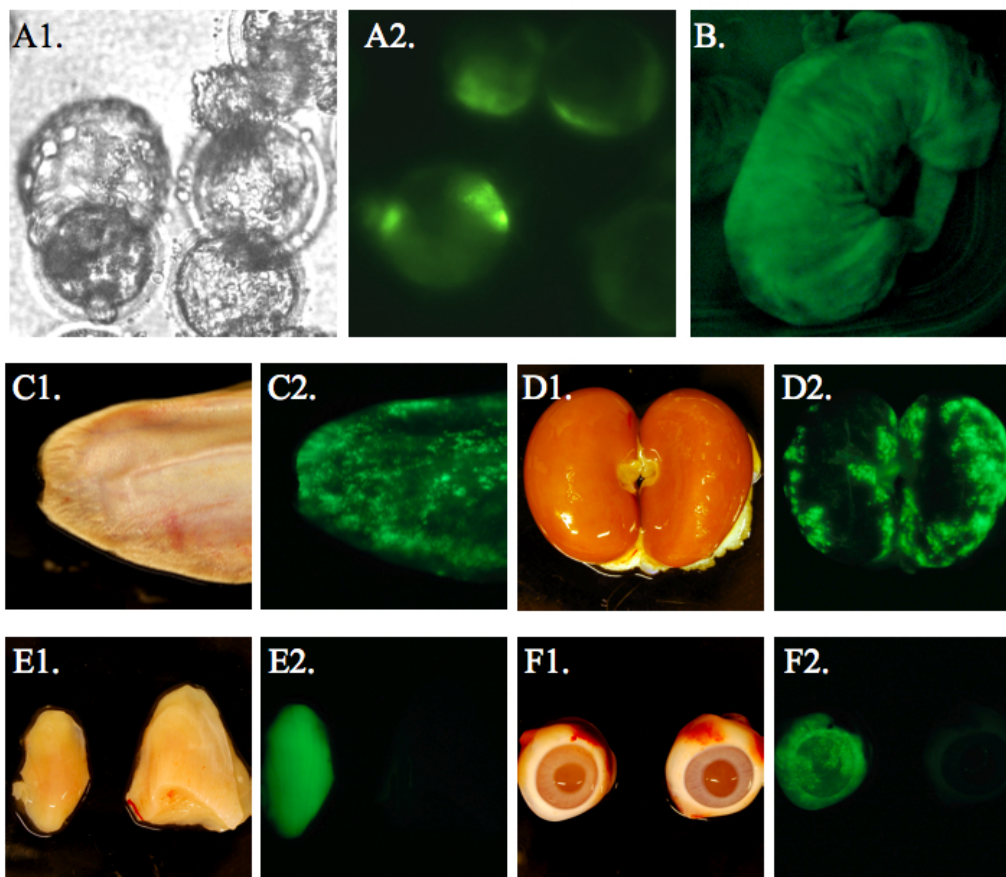
teljesen vagy mozaikosan zöld nyulat, azaz in vivo GFP expressziót mutató állatot azonosítottunk (**2. ábra**) addig az SFFV promótert hordozó vírussal létrehozott nyulak egyike sem expresszálja a zöld jelzőgént.



2 ábra: *SIV-CAG-GFP* lentivírus injektálásából született GFP expressziót mutató zöld „alapító” nyulak

A SIV-CAG-GFP transzgenikus alapító zöld nyulak közül egynek a szöveteit részletes vizsgálatnak vetettük alá (SIV3/1). Ezen alapító transzgenikus nyúl számos – de nem összes - szövetében tudunk eGFP expressziót detektálni. Különösen jelentős azonban, hogy az ondóvezető szöveti metszetében zölden világító sperma sejteket tudunk kimutatni (**4. ábra**).

3. ábra: SIV-CAG-GFP lenti vírus konstrukció injektálás után kapott transzgenikus embriók, illetve újszülött transzgenikus és kontroll nyúl szerveinek összehasonlítása



*A.: 4 napos GFP-t expresszálló nyúl embriók
 B.: transzgenikus újszülött "alapító" nyúl
 C.: transzgenikus állat fül szövete
 D.: transzgenikus állat veséi
 E.: bal oldalt transzgenikus állat vázizom szövete, jobb oldalt kontroll vázizom
 F.: bal oldalt transzgenikus állat szeme, jobb oldalt kontroll szem
 (1.: normál nézet, 2.: GFP expresszió vizsgálata)
 A1, C1, D1, E1, F1 normál fényben
 A2, B, C2, D2, E2, F2 UV fényben*

Ez a tény arra utalt, hogy az életben maradt transzgenikus alapító egyedek között a szövettanilag feldolgozott alapítóhoz hasonlóan ivarsejt transzgenikus egyedek megléte valószínűsíthető. A bakok közül háromnak a

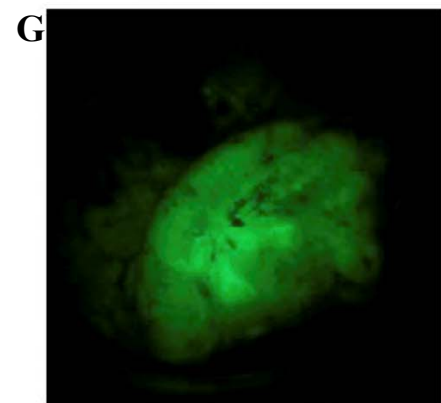
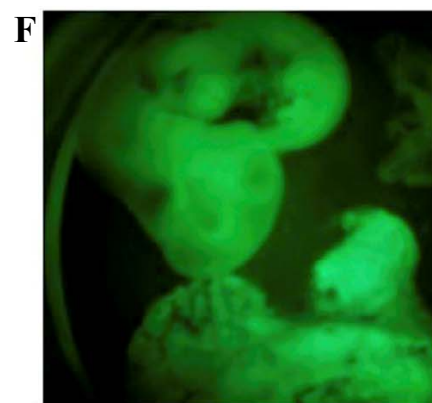
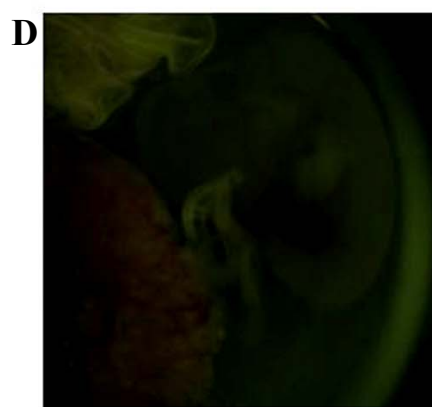
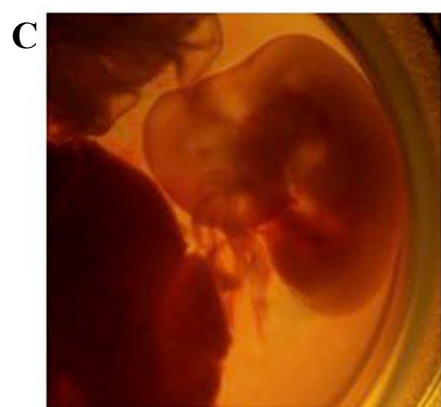
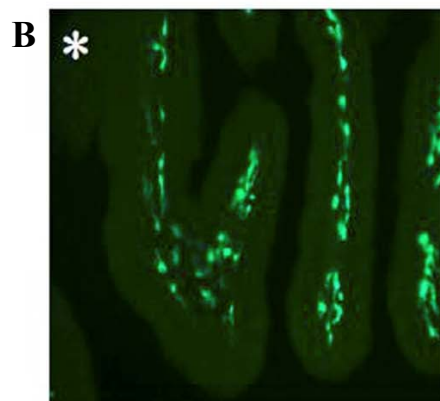
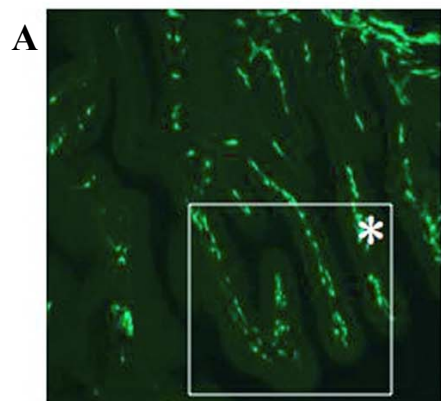
spermájában PCR-el ki tudtuk mutatni a transzgént ezért ezekkel kontrol nőstényeket termékenyítettünk (4.táblázat).

Alapítók	In vivo eGFP expresszió/ összes megszületett utód	Transzgenikus utód PCR-el/ összes megszületett utód
SIV-CAG3 BT hím	1/70 FACS 0/17*	1/70 FACS 0/17*
SIV-CAG7JT hím	0/85	3/85
SIV-CAG 9 JBK hím	0/23	3/23
SIV-CAG 10 JBK nőstény	0/37	1/37

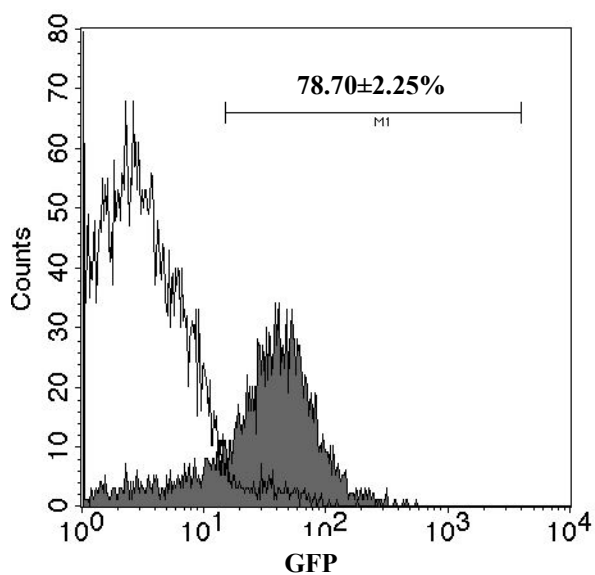
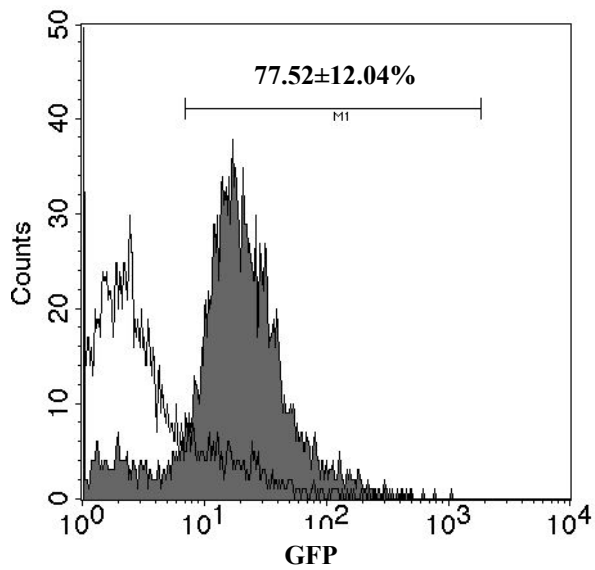
* eGFP pozitív, FACS dúsított sperma minták

4. táblázat: SIV-CAG EGFP+ spermával törént termékenyítések adatai, illetve eGFP+ (PCR) nőstény utódainak vizsgálata a transzgén jelenlétére

A SIV-CAG3BT jelű hím esetében egyetlen egy esetben zöld utódot találtunk, azonban azt a kontrol nőstényt amelyiket termékenyítettük, a vemhessége 13.5 napján feláldoztuk és az utódokat szövettanilag feldolgoztuk.



4. ábra A transzgén öröklődés bizonyítása. A SIV 3/1 alapító ondóvezetőjének metszeti képe(A és B). A SIV-CAG3 BT hím transzgenikus(E,F) és kontrol utódjának(C,D) vizsgálata látható és UV fényben(13.5 napos embryo). A transzgenikus embryo méhlepénye (G) és szikzacskója (H) UV fényben.



5. ábra: eGFP+ sperma frakció dúsítása FACS szeparálással /Kvell K. és Czömpöly T. POTE, Immunológia és Biotechnológiai Tsz/. Az eGFP+ dúsított sperma frakcióval mindkét független kísérletben kontrol nyulakat termékenyítettünk. □ Dúsítás előtt ■ Dúsítás után

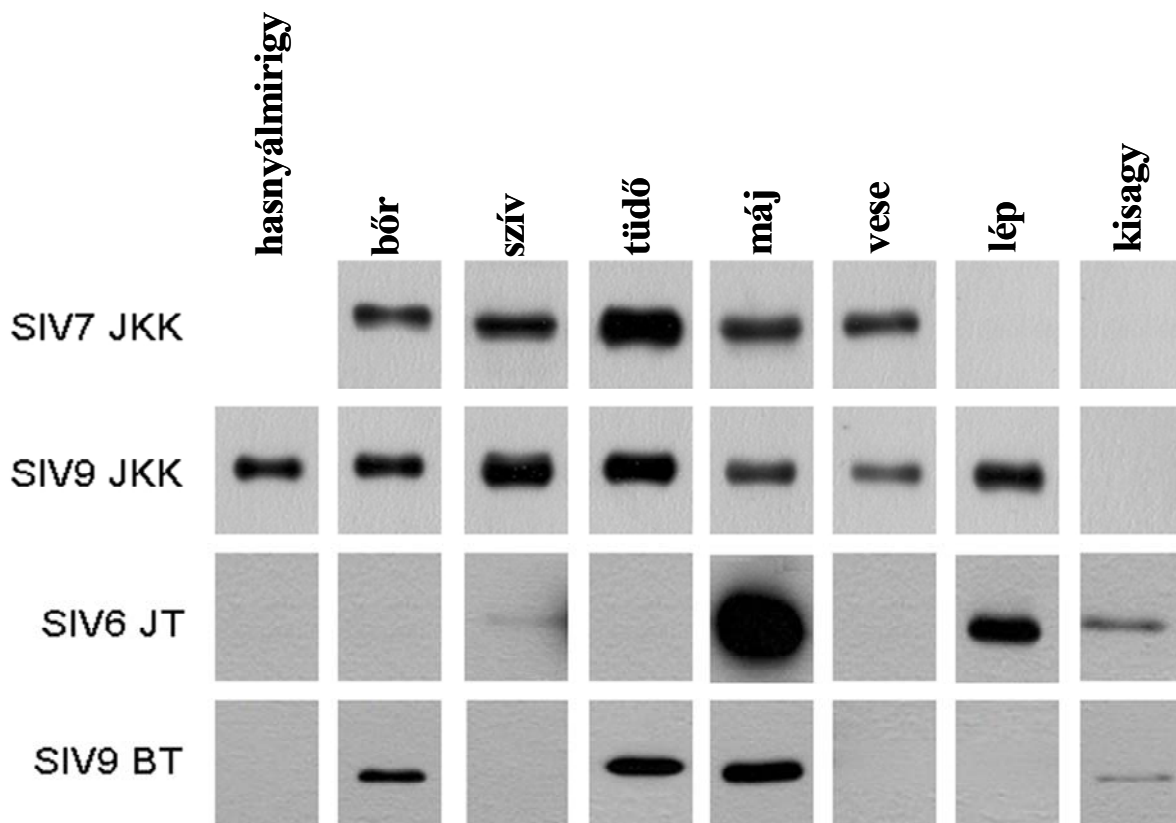
A FACS szétválasztás adatai szerint a kiindulási 3-8% eGFP+ sperma arányt 70-80%-ra sikerült feldúsítanunk.

A dúsított sperma minősége rossz volt és kevés $\sim 10^5$ spermát kaptunk, de a spermák egy része viabilis, mozgékony volt ezért a termékenyítést megkíséreltük. Sajnos azonban zöld nyúl nem született (4. táblázat).

Erre jelenleg pontos magyarázatot nem tudunk adni, elképzelhető hogy mind a dúsítatlan mind a dúsított sperma

mintában a nem transzgenikus spermák élet- vagy mozgásképesége jobb, ezért ezek a termékenyítésnél előnybe kerülnek. A kevés számban megszületett, az eGFP transzgénre PCR pozitív de nem zöld utód arra utal, hogy bizonyos gyakorisággal az ivarsejtvonalon történő áthaladásakor a transzgén expresszió epigenetikus módosítás következtében megszűnhet, erre azonban kísérleti bizonyítékunk még nincs. Hasonló jelenségről beszámoltak lentivírus transzgenikus eGFP+ transzgenikus sertések esetében (Hofmann et al. 2006).

6. ábra: Az eGFP fehérje kimutatása Western analízissel „alapító” nyulak szöveteiben



Az alapító egyedek részletes szövettani vizsgálatát eGFP fehérje specifikus Western analízissel végeztük el. Az egyes alapítók eltérő szöveteiben eltérő mennyiségű eGFP fehérjét tudtunk kimutatni (6. ábra), mely összhangban áll az in vivo megfigyelt mozaikosságukkal. Ugyanakkor megállapíthattuk, hogy a lentivirussal bejuttatott transzgén az összes embrionális csíravonalba képes beépülni, mert az egyes alapítók esetében eGFP fehérjét tudtunk kimutatni a bőrben (ektodermális), a kisagyban (neuro-ectodermális), vesében (mezodermális), hasnyálmirigyben (endodermális).

A nyúlban történő lentivírus transzgenezis módszer alkalmazásáról szóló közleményünk megírása folyamatban van, benyújtása egy-két hónapon belül várható.

II. A lentivírus bejuttatása nyúl őssejtvonalba és abból nukleusz transzferrel transzgenikus nyúl létrehozása

Kecske esetében oly módon is létrehoztak lentivírus transzgenikus vonalakat, hogy a lentivírussal transzdukált fibroblaszt sejtmagjával klónozott állatokat hoztak létre (Golding et al. 2006). Nyúlban erre alkalmas lehet egy hosszabb ideig dedifferenciált állapotban tartható őssejtvonal. Kísérleteink egy része egy jól jellemzett nyúl őssejtvonal létrehozására irányult (Catunda et al. 2008). A nyúl őssejtvonal alapítás jelenlegi állásáról egy összefoglaló könyvfejezetet írtunk (Gócza és Bősze, Rabbit Biotechnology (eds: L-M. Houdebine., J. Fan) Springer, Dordrecht Heidelberg London New York, ISBN 978-90-481-2226-4 2009.)

III. hTNAP tisztítása transzgenikus nyúltejéből

A rekombináns fehérje izolálását a következő módszerekkel kíséreltük meg:

1. Fordított-fázisú HPLC (RP-HPLC)
 - a. teljes tejből
 - b. tejsír frakcióból
2. Immunabszorpciós kromatográfia
3. Extrakció natív poliakrilamid gélből

1. RP-HPLC kísérletek

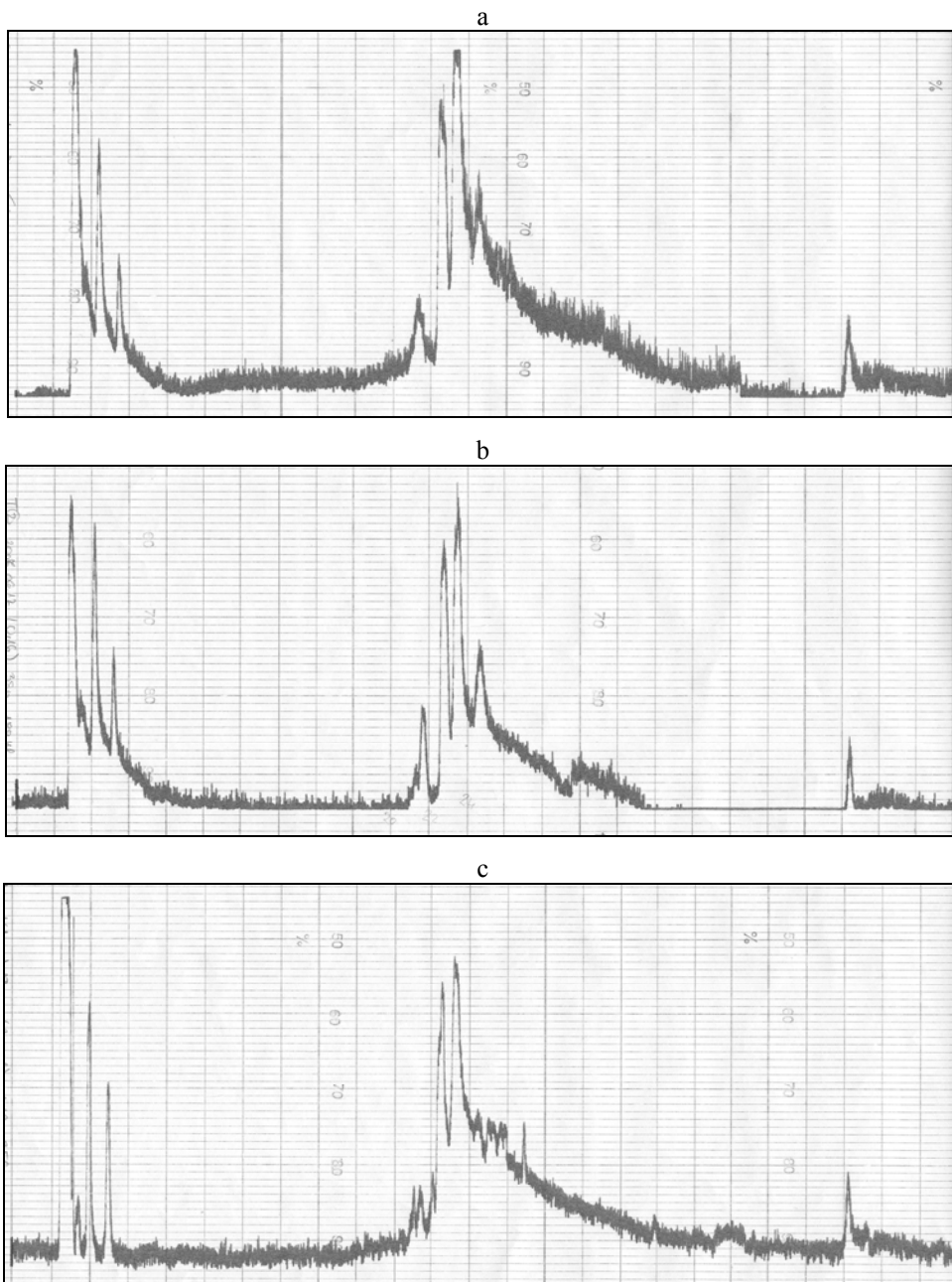
A transzgenikus nyulak tejébe expresszált rekombináns hTNAP fehérje izolálását első nekifutásban fordított-fázisú HPLC-vel kíséreltük meg. Választásunk azért esett erre a módszerre, mert korábban már sikeresen alkalmaztuk nyúl tejfehérjék elválasztására (Baranyi et.al., Comp. Biochem. Physiol. 1995, Vol.111B, no. 3, pp. 407-415).

Az alkalikus foszfatáz egy membránhoz kötött glikoprotein, amely a tej esetében a zsírgömböcskék membránjához kapcsolódik. A friss vagy lefagyasztott tejet ezért butanollal extraháltuk, majd centrifugálás után izoláltuk a rhTNAP-t tartalmazó tejsavó frakciót. A rekombináns fehérje tisztítását a tejsavóból Jupiter 5 μ C4 300A oszlopon (Phenomenex) kíséreltük meg. Az elúciós oldatok a következők voltak: A = 0,1% (tf) TFA vizes oldata, B = 0,1% (tf) TFA 80% acetonitrilben. 0,8 ml/perces áramlási sebesség mellett a B oldat koncentrációját 20 perc alatt lineárisan 10%-ról 100%-ra emeltük. A transzgenikus és nem transzgenikus minták elúciós profilja között (7.a és 7.b ábra) sajnos nem láttunk szignifikáns különbséget. Alkalikus foszfatáz kontrollként egy kereskedelmi forgalomban kapható humán alkalikus foszfatázt (Alkaline Phosphatase Control Kit, HL-4-3886L, Helena Biosciences Europe) használtunk. Ebből kiderült, hogy az alkalikus foszfatáz ugyanott jön le az oszlopról (7.c ábra), mint a savó fehérjék, ezért azt ily módon nem tudtuk azoktól elválasztani.

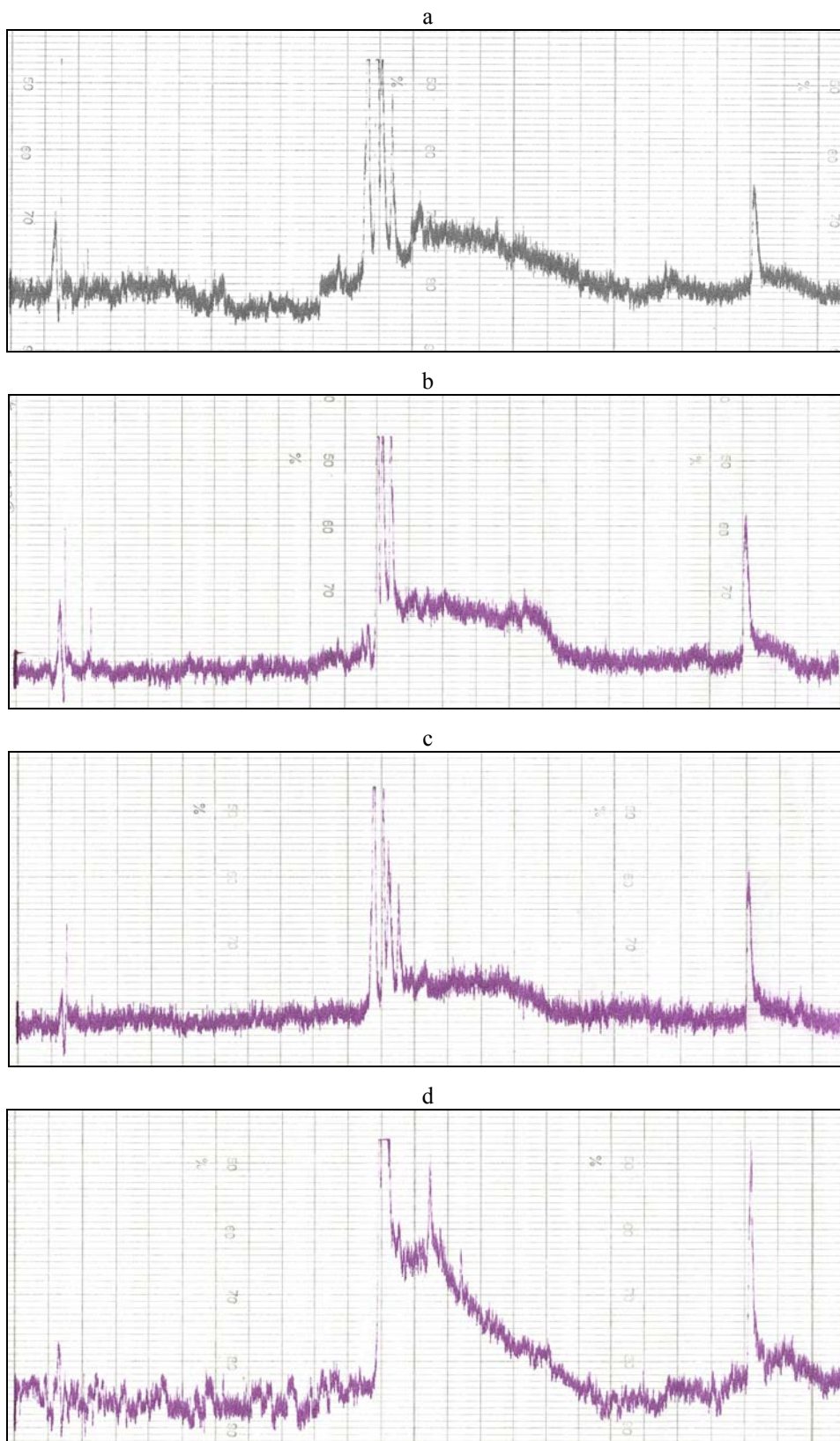
A további RP-HPLC kísérletek során kiindulási anyagként - hogy minél több tejfehérjétől megszabaduljunk - a tejsír frakciót használtuk fel. A friss tejből centrifugálással izoláltuk a tejsírt, majd

reszuszpendáltuk milliQ vízben vagy 20mM Tris (pH 8,0) oldatban. Ezután végeztük a butanolos extrakciót, és a centrifugálással elválasztott, hTNAP-t tartalmazó, vizes fázist vizsgáltuk. A RP-HPLC elúciós profilok alapján kiderült, hogy nem sikerült teljesen megszabadulnunk a tejfehérjéktől, és akár csak az előző kísérletnél, mind a kontroll, mind a transzgenikus nyúl tejsír frakció esetében is 3 vagy 4 elúciós csúcsot észleltünk a 21. és 23. perc között, és a kontroll hAP is ebben a tartományban eluálódott az oszlopról (8. ábra).

7. ábra: *Nyúl tejsavó elválasztása fordított fázisú HPLC-vel (a: kontroll nyúl, b: transzgenikus nyúl, c: humán alkalikus foszfatáz kontroll)*



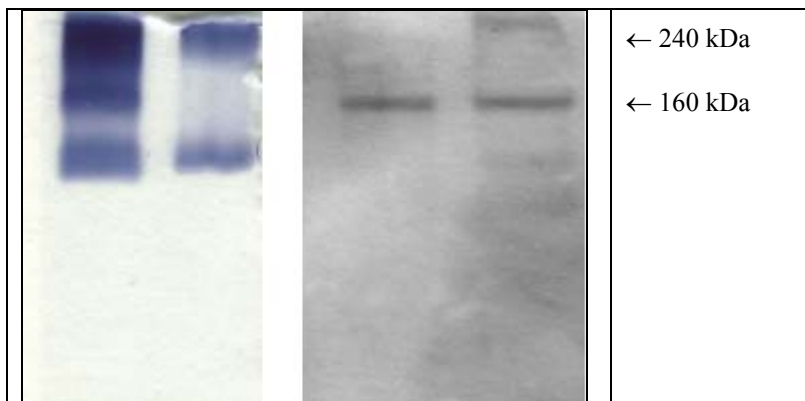
8. ábra: Nyúl tejszír elválasztása fordított fázisú HPLC-vel (a: kontroll nyúl, b és c: transzgenikus nyúl, d: humán alkalikus foszfatáz kontroll)



Mivel a Jupiter 5 μ C4 300A oszlop segítségével nem sikerült izolálni a rekombináns hTNAP fehérjét, kipróbáltunk egy anioncserélő oszlopot is (HRLC[®]MA7Q Anion Exchange Column, Bio-Rad). Az elúciós oldatok a következők voltak: A = 0,02 M Tris (pH8,5) ill. B = 0,02 M Tris, 0,05 M Tris (pH8,5). 0,8 ml/perces áramlási sebesség mellett a B oldat koncentrációját 10 perc alatt lineárisan 0%-ról 100%-ra emeltük. Mivel semmilyen értékelhető jelet nem kaptunk, az előző oszlopnál használt TFA/acetonitril pufferekkel is megkíséreltük az elválasztást, de így sem kaptunk értékelhető elúciós profilt.

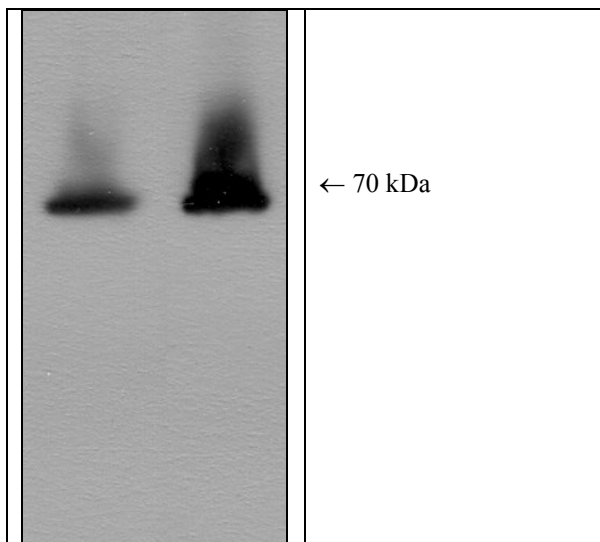
9. ábra: *hTNAP kimutatása specifikus ellenanyag segítségével. (a) Csirkében termelt, saját fejlesztésű peptid ellenanyag. (b) Monoklonális ellenanyag (ab54778, Abcam).*

(a)



Natív-PAGE

(b)



SDS-PAGE

2. Immunabszorpciós kromatográfia

Következő lépésben affinitás kromatográfiával szeretnénk volna megkísérelni a fehérje izolálását. Rendelkezésünkre állt egy korábban, a Western kísérletekhez peptid immunizálással, csirkében előállított hTNAP specifikus ellenanyag, amelyet egy AminoLink[®] Plus Immobilization Kit (Pierce) segítségével oszlopra

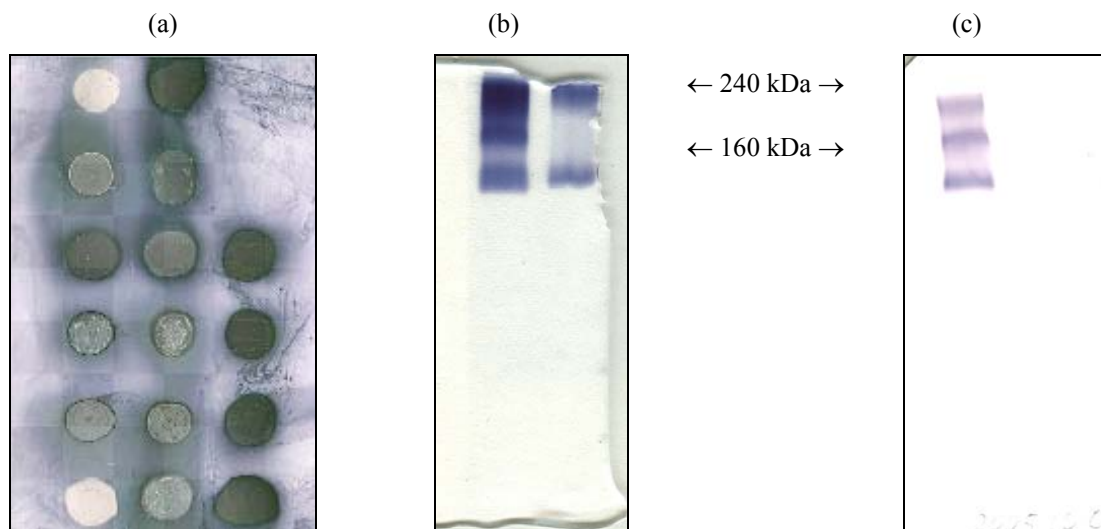
kötöttünk és így, immunabszorpció módszerrel próbáltuk tisztítani a transzgenikus fehérjét. Sajnos azonban az ellenanyag affinitása olyan alacsonynak bizonyult (Western-blot kísérleteinken is nagyon gyengén működött, ld. 9.a ábra), hogy nem volt képes kellőképpen megkötni a rekombináns hTNAP-t, így ezzel a módszerrel sem sikerült a fehérjét hatékonyan elválasztani.

A projekt indításakor még nem létezett kereskedelmi forgalomban hTNAP specifikus ellenanyag. Ez a helyzet 2008-ra megváltozott. Megvásároltunk egy anti-hTNAP monoklonális ellenanyagot (ab54778, Abcam), amely Western-blot kísérleteinkben kiválóan működött (9.b ábra). Ezt az ellenanyagot rendkívül magas ára miatt azonban szintén nem tudtuk immunabszorpció kromatográfiai célokra használni.

3. hTNAP izolálása poliakrilamid gélből

Amíg nem állt rendelkezésünkre jó minőségű anti-hTNAP ellenanyag, a rekombináns fehérjét enzimaktivitása alapján, BCIP / NBT szubsztrát oldat (B1911, Sigma) segítségével mutattuk ki. Ez a rendszer igen egyszerű és kiválóan alkalmas a fehérje kimutatására akár natív poliakrilamid gélben, akár transzfer membránra csepegtetett vagy abba átblottolt minta esetében is (10. ábra).

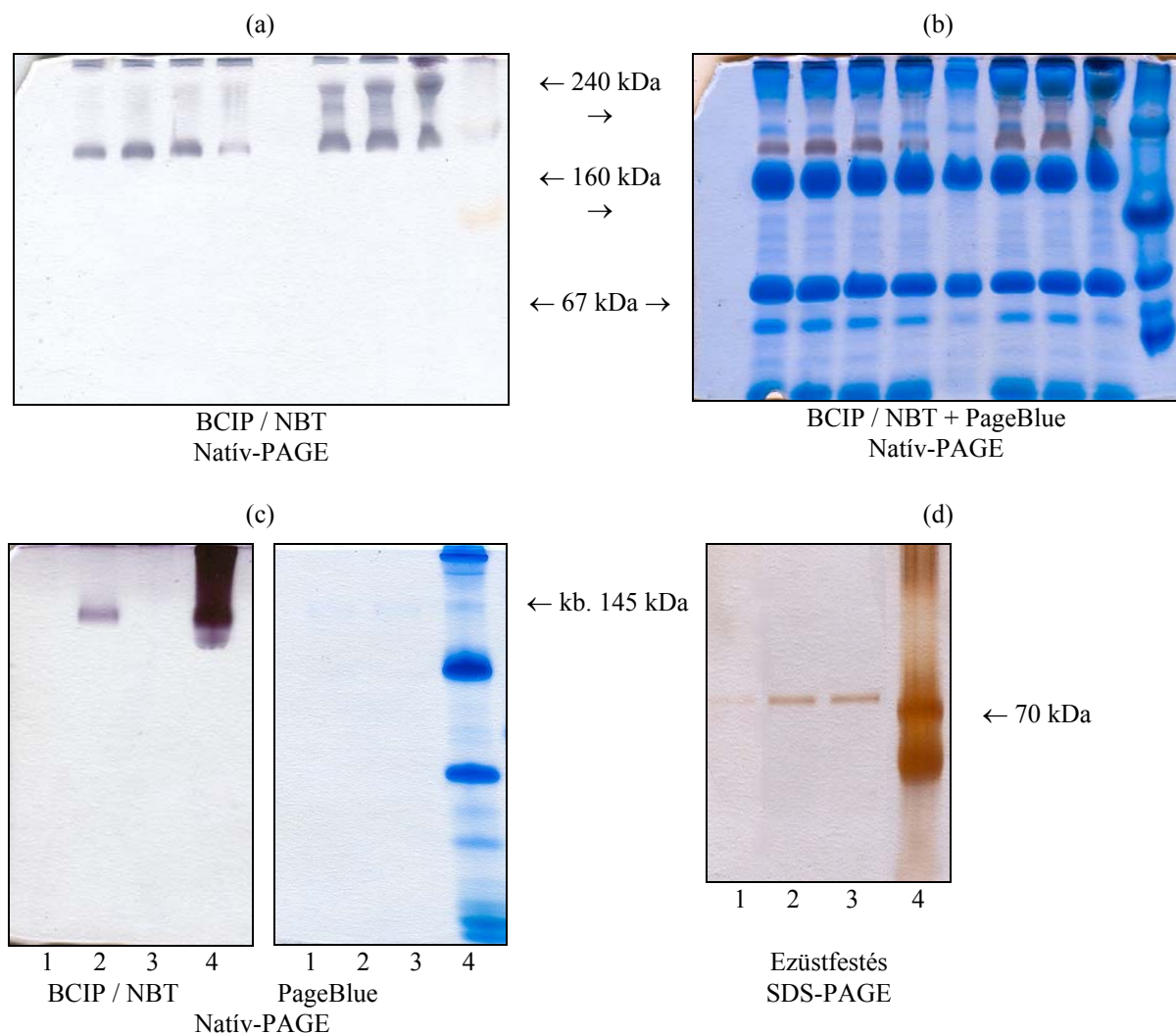
10. ábra: Rekombináns hTNAP fehérje kimutatása BCIP / NBT szubsztráttal. Butanol extrakcióval tisztított hTNAP (a) transzfer membránra csepegtetve, (b) natív poliakrilamid gélen megfuttatva, (c) natív-PAGE után transzfer membránba átblottolva.



A fehérje gélből történő extrakciójához először meg kellett állapítanunk, hogy mi a hTNAP helyzete a többi fehérjéhez képest - ki tudjuk-e vágni úgy a gélből, hogy lehetőleg más fehérjék ne kerüljenek bele. Ehhez először a butanol extrakcióval tisztított hTNAP frakciókat megfuttattuk 10%-os natív poliakrilamid gélen. Ezután a géllel megfestettük a BCIP / NBT szubsztrát oldattal (11.a ábra) a hTNAP fehérje megjelenítéséhez, majd egy módosított coomassie festékkel (PageBlue, Fermentas), amely láthatóvá tette az összes többi fehérjét is (11.b ábra). Ebből kiderült, hogy az alkalikus foszfatáz aktivitás egyik csíkja (kb. 145 kDa) jól elkülönül a többi fehérjétől. Ezt a gélcsíkot vágtuk ki a gélből, egy éles pengével felaprítottuk, majd 20 mM Tris (pH 7,5)

oldatban rázattuk 2 óra hosszat vagy egy éjszakán át, szobahőn ill. 50°C-on. Aktív fehérjét akkor sikerült visszanyernünk a gélből, amikor szobahőn rázattuk egy éjszakán át (11.c ábra). PageBlue (11.c ábra) és ezüsfestéssel (11.d ábra) bizonyítottuk, hogy az így izolált hTNAP tiszta, nem szennyezett más fehérjékkel. Mivel azonban e módszer hatékonysága igen alacsony és nagy a fehérje veszteség, nem alkalmas nagyobb mennyiségű rekombináns fehérje izolálására.

11. ábra: *hTNAP extrakciója natív poliakrilamid gélből. A kivágandó gélcsík pozíciójának meghatározása: natív gélen megfuttatott butanollal extrahált hTNAP frakciók (a) BCIP / NBT szubsztráttal festve, (b) először BCIP / NBT szubsztráttal majd PageBlue festékkel festve. (c) Gélből extrahált hTNAP (1-3. slot) és butanollal extrahált fehérje kontroll (4. slot) futtatása natív poliakrilamid gélen, majd festve BCIP / NBT szubsztráttal illetve (d) ezüsfestéssel.*



- 1 - gélből izolált hTNAP (rázatás 2 óra, szobahőn)
- 2 - gélből izolált hTNAP (rázatás éjszakán át, szobahőn)
- 3 - gélből izolált hTNAP (rázatás éjszakán át, 50°C-on)
- 4 - kontroll (butanollal extrahált hTNAP)

A fent leírt módszerek egyikével sem sikerült hatékonyan tisztítani a hTNAP, ezért a nyúltejben termeltetett fehérje aktivitását igazoló állatkísérleteket a butanollal extrahált formával végezzük. Ehhez a nyúltej zsír frakcióját elkülönítettük - hogy a lehető legkevesebb tejfehérjét vigyük tovább - majd butanolos extrakcióval a

zsírgömbök membránjából felszabadítottuk a rekombináns hTNAP fehérjét. A centrifugálás után kapott vizes fázist (ez tartalmazza a hTNAP fehérjét némi tejfehérjével szennyezve) liofilizáltuk, és a fiziológias sóoldatban visszaoldott formát használjuk az állatkísérletekhez.

Összefoglalás

SIV lentivírus vektorral GFP-t expresszáló transzgenikus alapító nyulakat állítottunk elő. Legjobb tudásunk szerint lentivirussal elsőként sikerült transzgenikus nyulat előállítanunk világszerte. Mivel azonban az alapító nyulak különböző mértékben mozaikosak, élő zöld utódnnyúl nem született. Emiatt az előre nem látható fajspecifikus különbség miatt, a pályázatban eredetileg tervezett emlőszövetspecifikus promóter - humán szöveti nonspecifikus foszfatáz transzgenikus nyulak előállítására lentivírus transzgenézissel nem került sor. Az előmag mikroinjektálással korábban előállított transzgenikus nyulak tejéből, három különböző módon próbáltunk tisztított rekombináns humán szöveti nonspecifikus foszfatáz fehérjét izolálni. A tisztított rekombináns fehérje biológiai hatásának igazolása szepszis egérmodellel folyamatban van.

Summary

GFP expressing transgenic rabbits were created with SIV lentiviral vector. To our knowledge those are the first lentiviral transgenic rabbits worldwide. Since the founder rabbits were expressing the transgene in mosaic pattern to different extent, alive green rabbits were not born from any of the founders. Due to this species specific difference in the efficiency of lentiviral transgenesis, we did not try to establish lentiviral transgenic rabbits with the planned mammary gland specific promoter - human tissue non-specific alkaline phosphatase lentiviral construct. From the milk of the human tissue non-specific alkaline phosphatase expressing transgenic rabbits, which were created by pronuclear microinjection we tried to isolate the recombinant protein on three different ways. Evaluation of the biological activity of the purified recombinant human tissue non-specific alkaline phosphatase is in progress.

Idézett irodalom

- Catunda AP, Gocza E, Carstea BV, Hiripi L, Hayes H, Rogel-Gaillard C, Bertaud M, Bosze Z. 2008. Characterization, chromosomal assignment, and role of LIFR in early embryogenesis and stem cell establishment of rabbits. *Cloning and stem cells* 10(4):523-534.
- Cutino-Moguel T, Fassati A. 2006. A phenotypic recessive, post-entry block in rabbit cells that results in aberrant trafficking of HIV-1. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 7(8):978-992.
- Golding MC, Long CR, Carmell MA, Hannon GJ, Westhusin ME. 2006. Suppression of prion protein in livestock by RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(14):5285-5290.
- Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Kabermann A, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. 2006. Epigenetic regulation of lentiviral transgene vectors in a large animal model. *Mol Ther* 13(1):59-66.
- Hofmann A, Zakhartchenko V, Weppert M, Sebald H, Wenigerkind H, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. 2004. Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biol Reprod* 71(2):405-409.
- Kissler S, Stern P, Takahashi K, Hunter K, Peterson LB, Wicker LS. 2006. In vivo RNA interference demonstrates a role for Nramp1 in modifying susceptibility to type 1 diabetes. *Nature genetics* 38(4):479-483.
- Kvell K, Nguyen TH, Salmon P, Glauser F, Werner-Favre C, Barnet M, Schneider P, Trono D, Zubler RH. 2005. Transduction of CpG DNA-stimulated primary human B cells with bicistronic lentivectors. *Mol Ther* 12(5):892-899.
- Negre D, Cosset FL. 2002. Vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIV). *Biochimie* 84(11):1161-1171.
- Ritchie WA, Neil C, King T, Whitelaw CB. 2007. Transgenic embryos and mice produced from low titre lentiviral vectors. *Transgenic research* 16(5):661-664.
- Xie CQ, Zhang J, Xiao Y, Zhang L, Mou Y, Liu X, Akinbami M, Cui T, Chen YE. 2007. Transplantation of human undifferentiated embryonic stem cells into a myocardial infarction rat model. *Stem cells and development* 16(1):25-29.