

Előzmények

ELTE TTK, Gödi Biológiai Állomás, Embriológiai Laboratórium (1984-1995)

- Egér ESC létrehozás módszerének kidolgozása
- Tetraploid aggregációs kiméra technika kidolgozása
- Egér embrionális őssejt eredetű utódok létrehozása

NAIK, MBK, ÁBSZ, AES (1996-)

- Transzgénikus egér és nyúl ESC vonalak létrehozása



NAIK MBK ÁB



❖ Nyúl mint modellállat

- ❖ Korai embrionális fejlődés vizsgálata
- ❖ Betegség modell - cukorbetegség, szív rendellenesség, érelmeszesedés
- ❖ Bioreaktor - tejbe kiválasztható biológiailag aktív fehérjék

❖ Transzgenezis ES sejteket felhasználva

- ❖ Célzott genetikai módosítások létrehozása lehetséges
 - ❖ Szövetspecifikus, időben szabályozható módosítások
- ## ❖ Madár ősvarsejtek tenyésztése, kimérák létrehozása

Transzgénikus állatok előállítási lehetőségei

DNS mikroinjektálás

Spermium közvetített génbevétel

Retrovírus közvetített génbevétel

Lentivírus közvetített génbevétel

Transzpozon-transzpozász rendszer felhasználásával

Minikromoszómák felhasználásával

DNS injektálás spermatogóniumba

Transzgénikus SC és ES sejtekből magátültetési klónozással

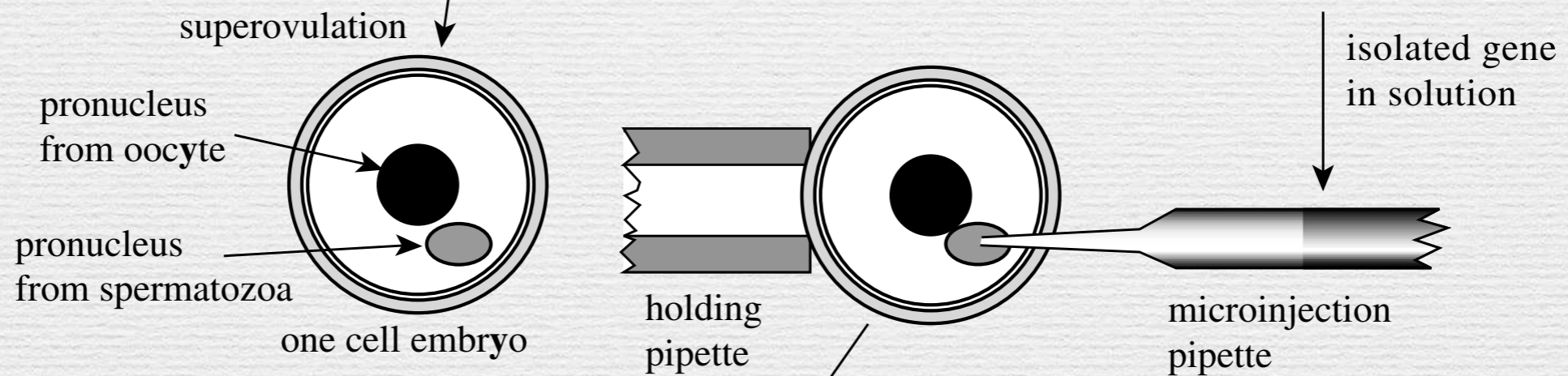
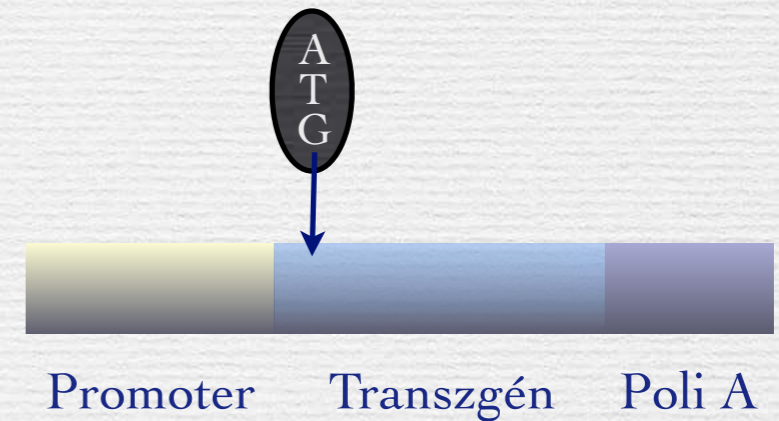
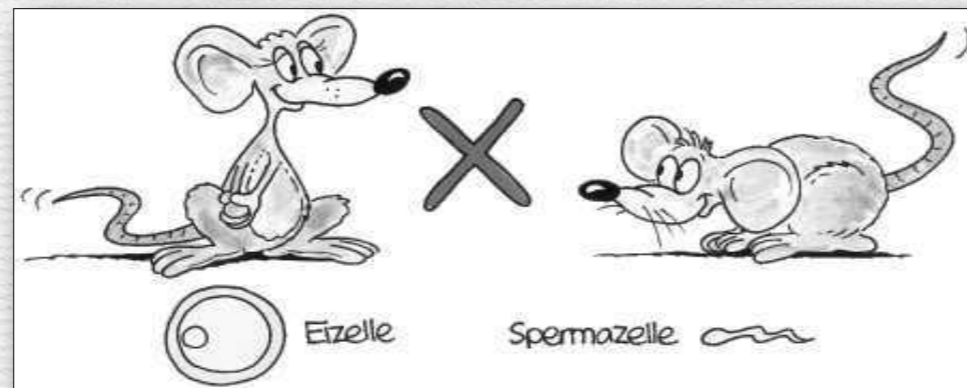
Célzott génbevétel transzgénikus ES sejt vonalak felhasználásával

Transzgénikus spermatogóniális őssejtek beültetésével

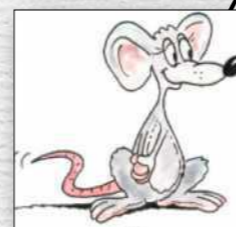
Genom szerkesztés - ZFN, TALEN, CRISPR/CAS9



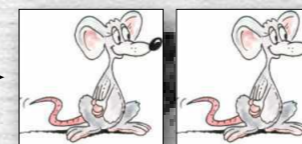
Transzgénikus egerek előállítása mikro-injektálással



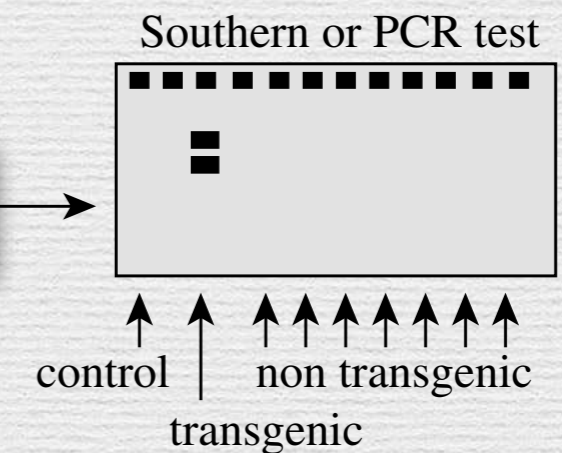
embryo implantation into oviduct of pseudopregnant female



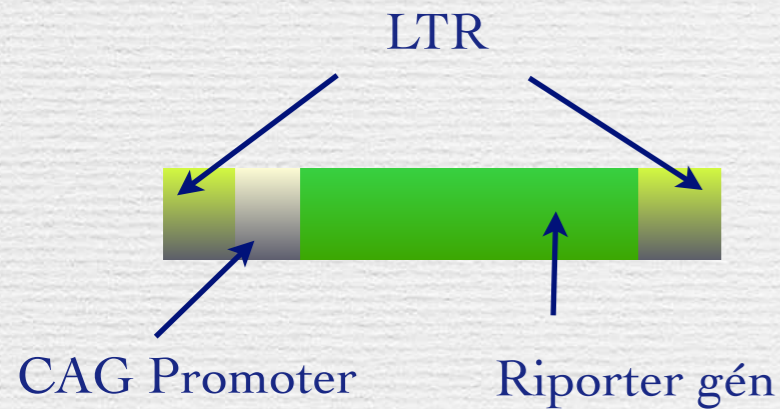
♀



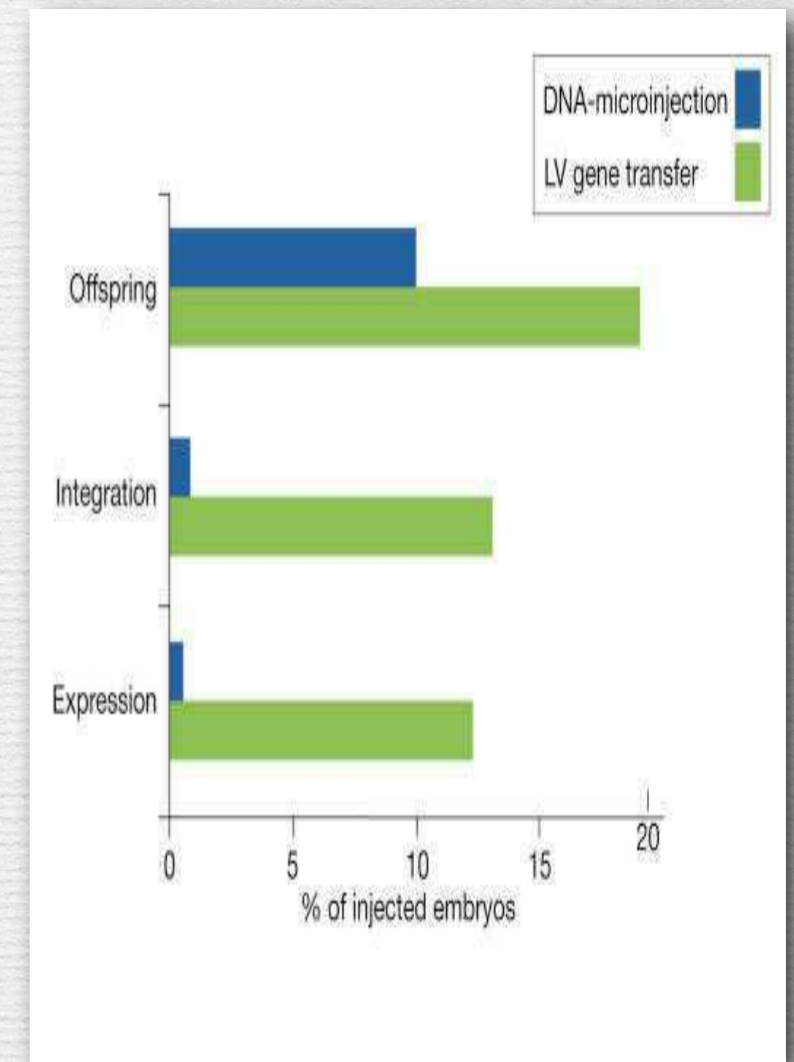
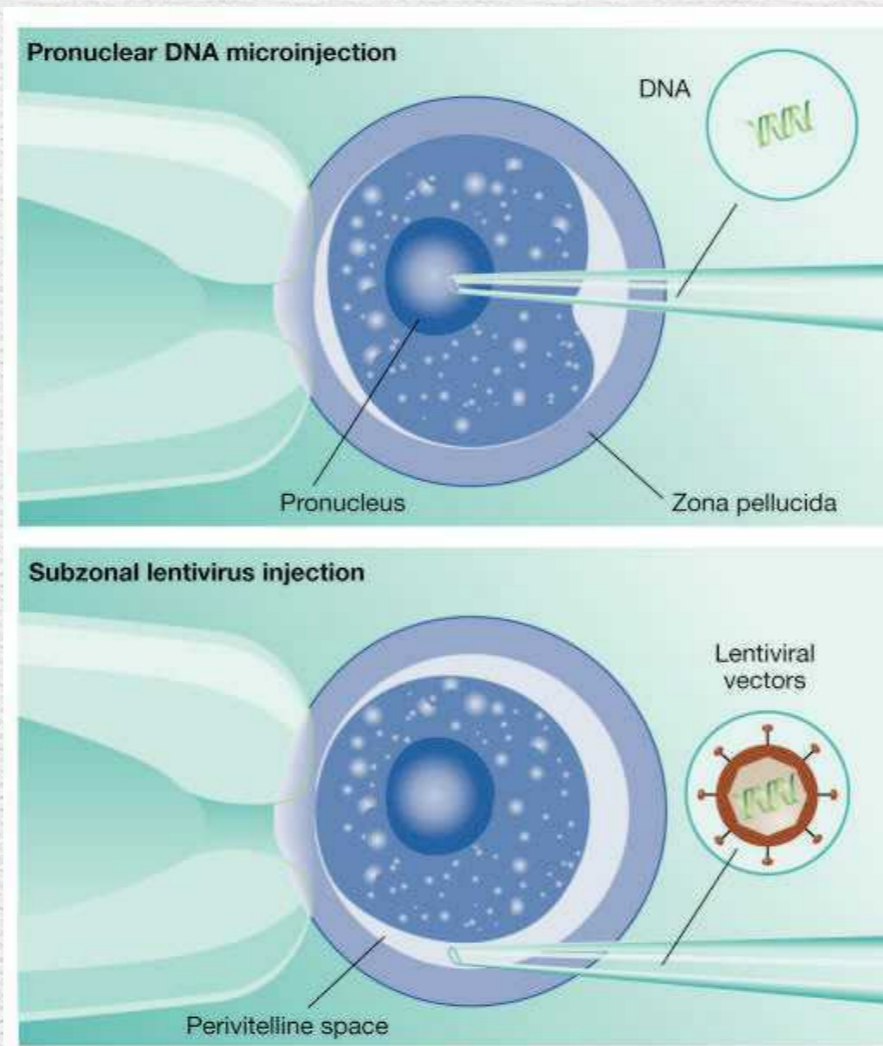
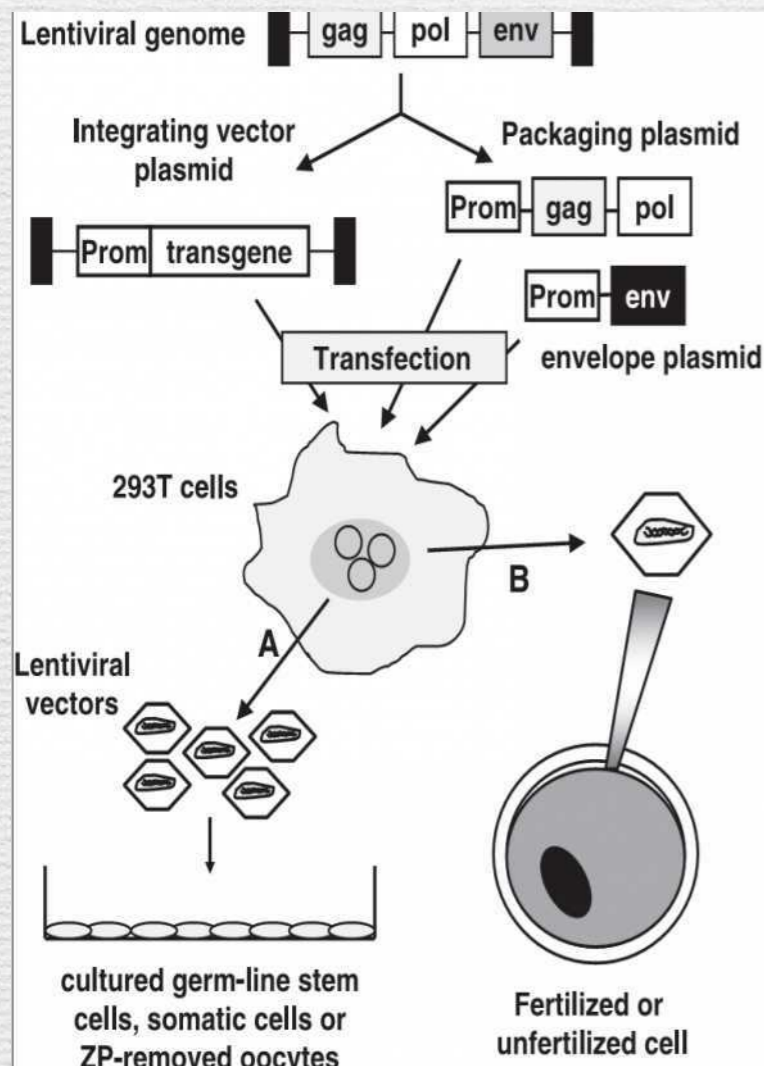
offspring



Transzgénikus egerek előállítása lenti vírus vektor (LV) transzdukcióval

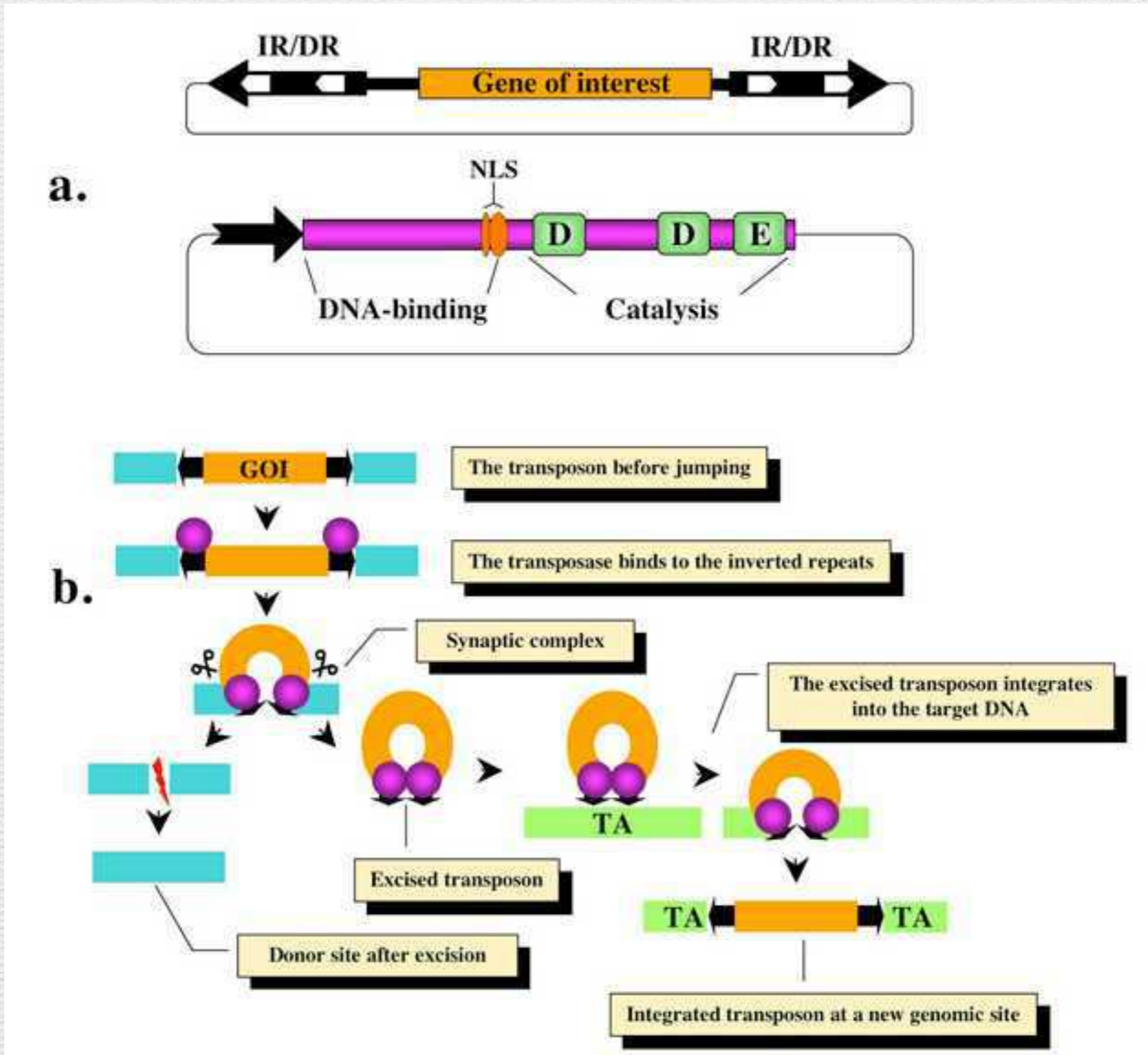


DNS és LV injektálás módszerének összehasonlítása



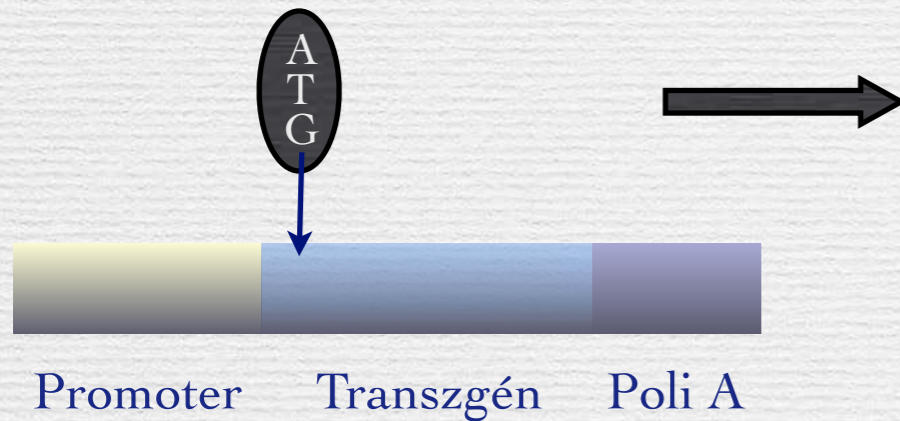
DNS és LV injektálás hatékonyságának összehasonlítása (sertés)

Transzpozon közvetített génbevitel

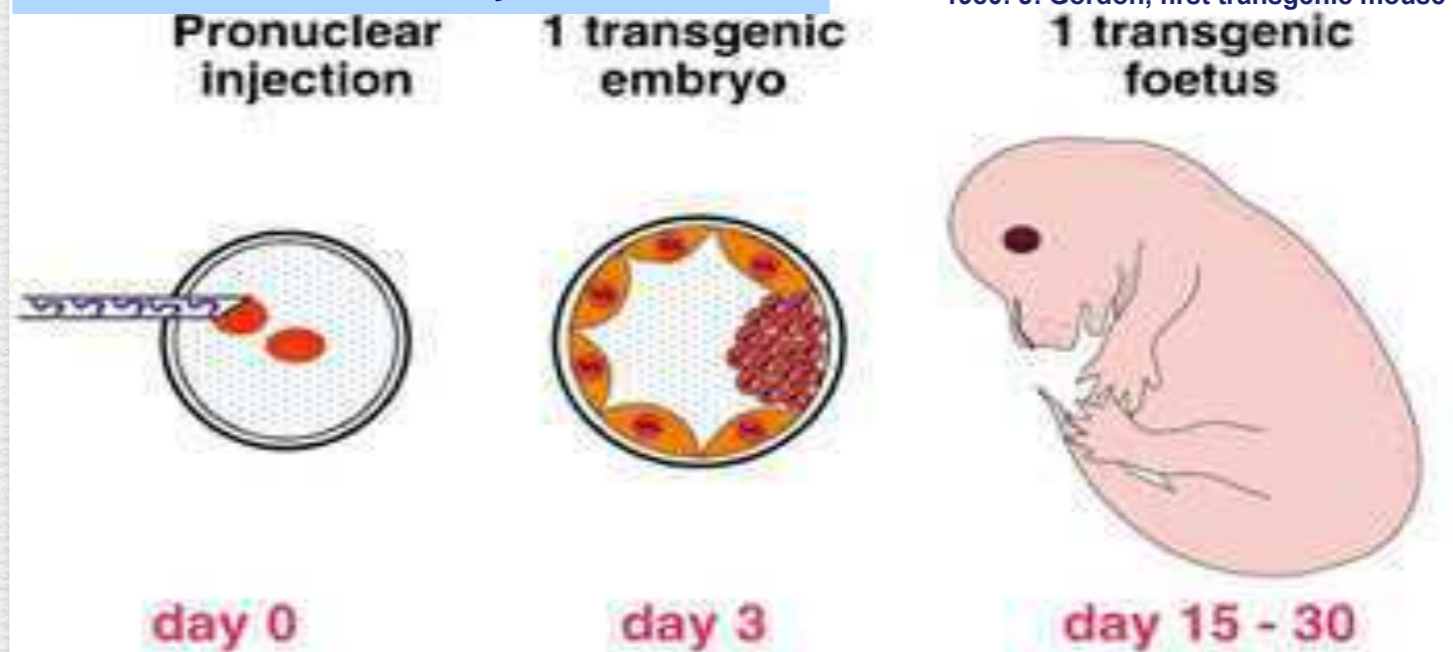


Transzgénikus egerek előállítása

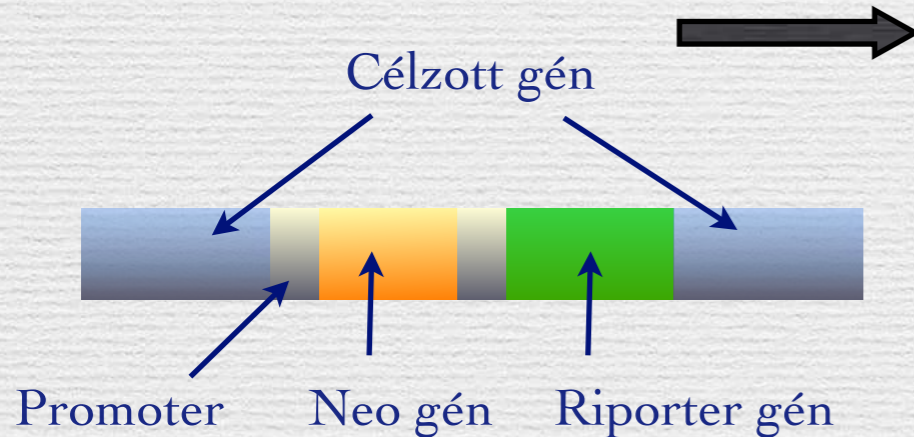
Random inszerció



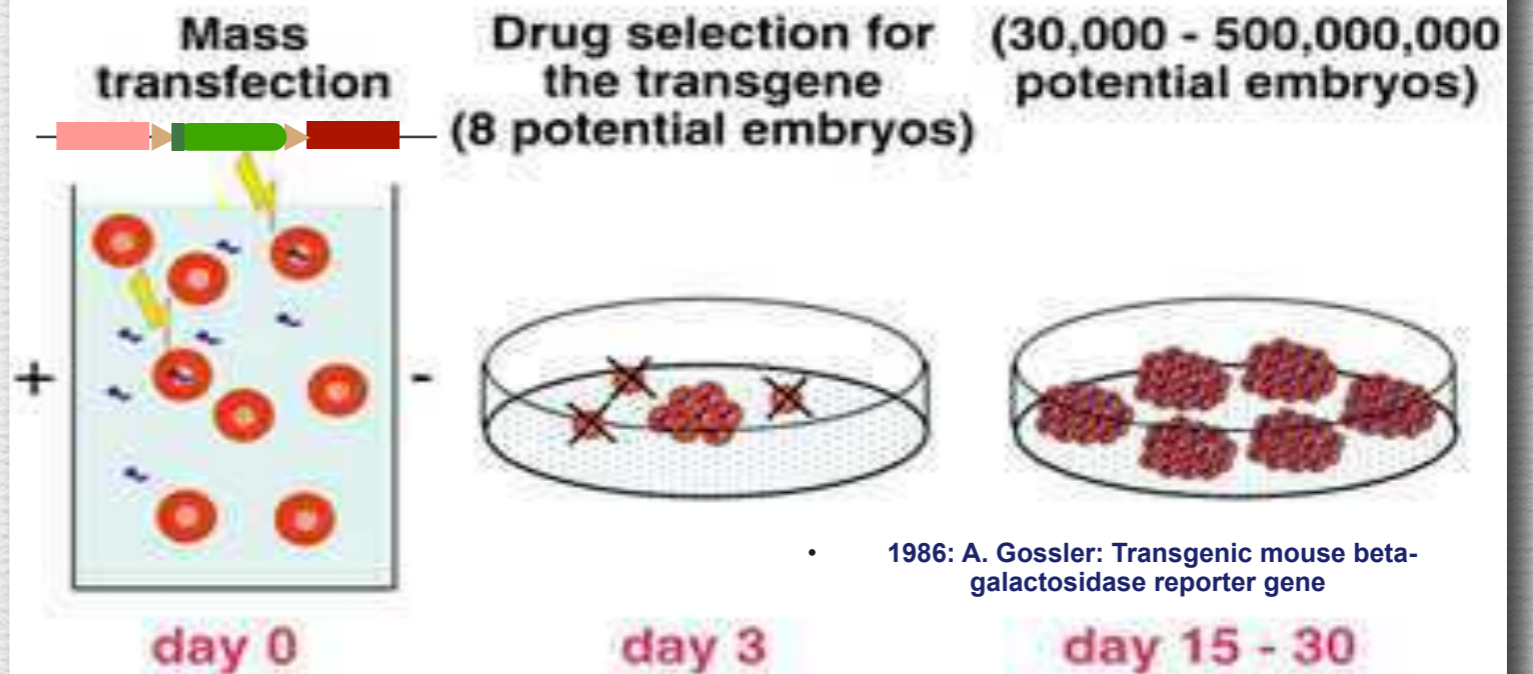
DNS mikrojektálás

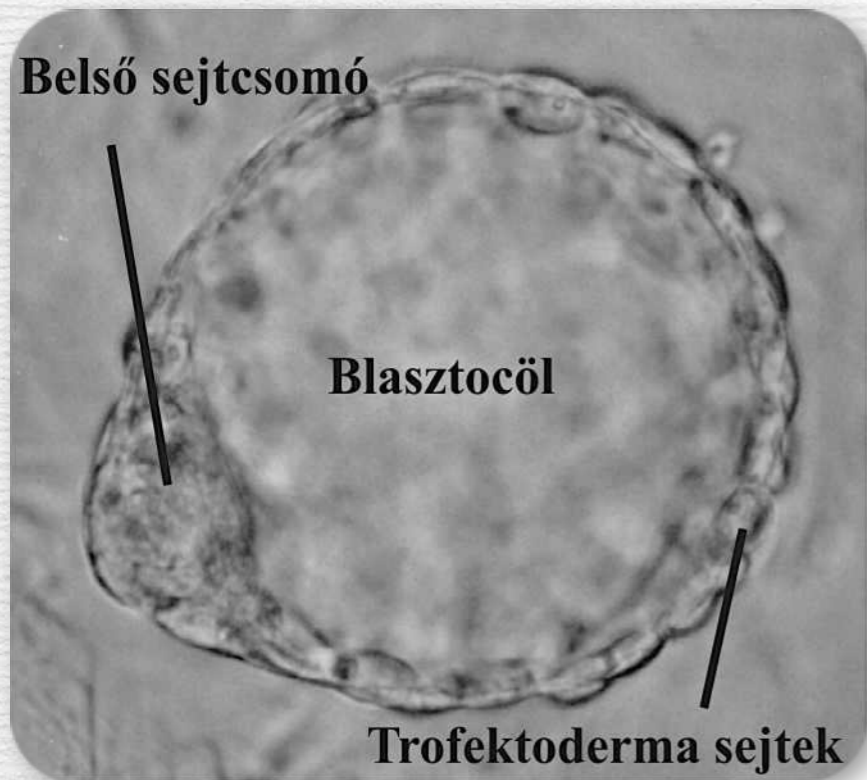


Célzott génmódosítás

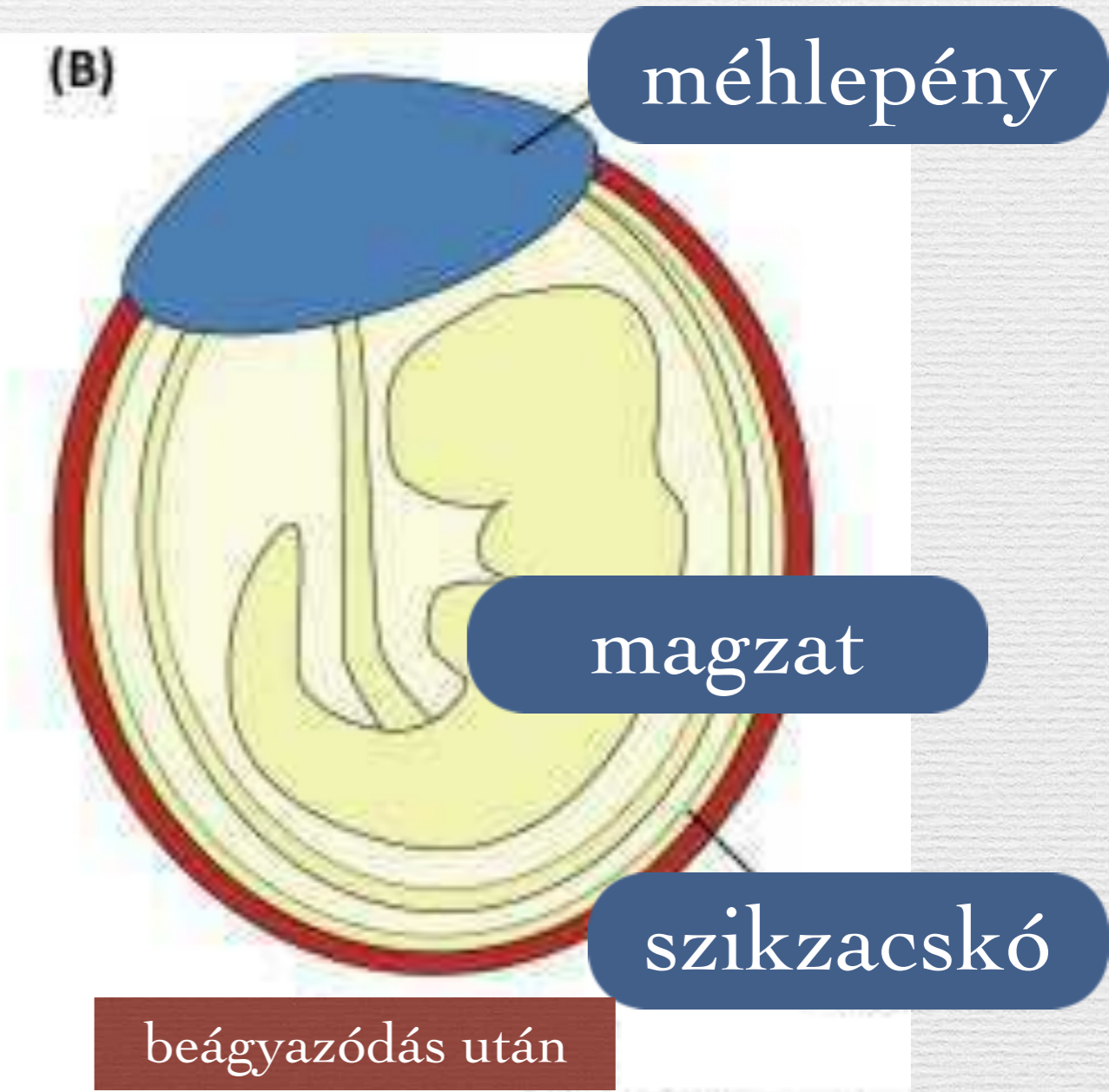
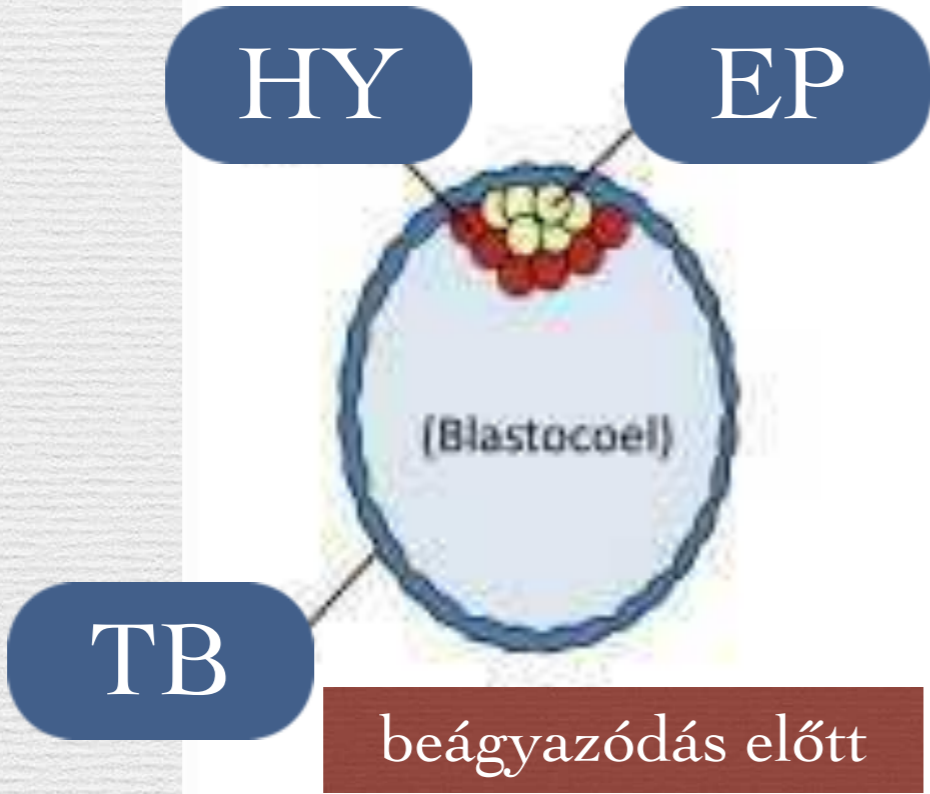


ES sejtek felhasználásával

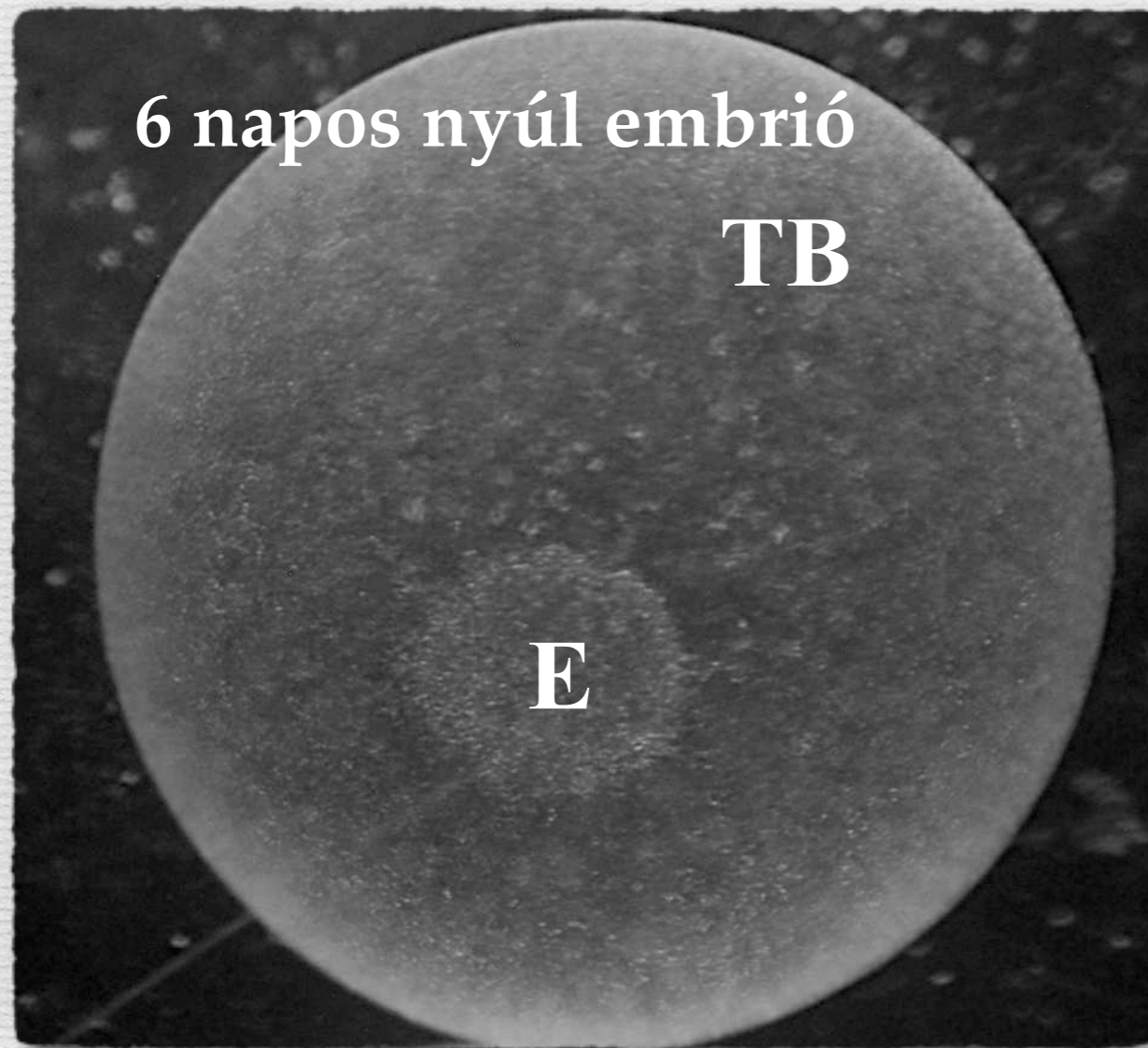




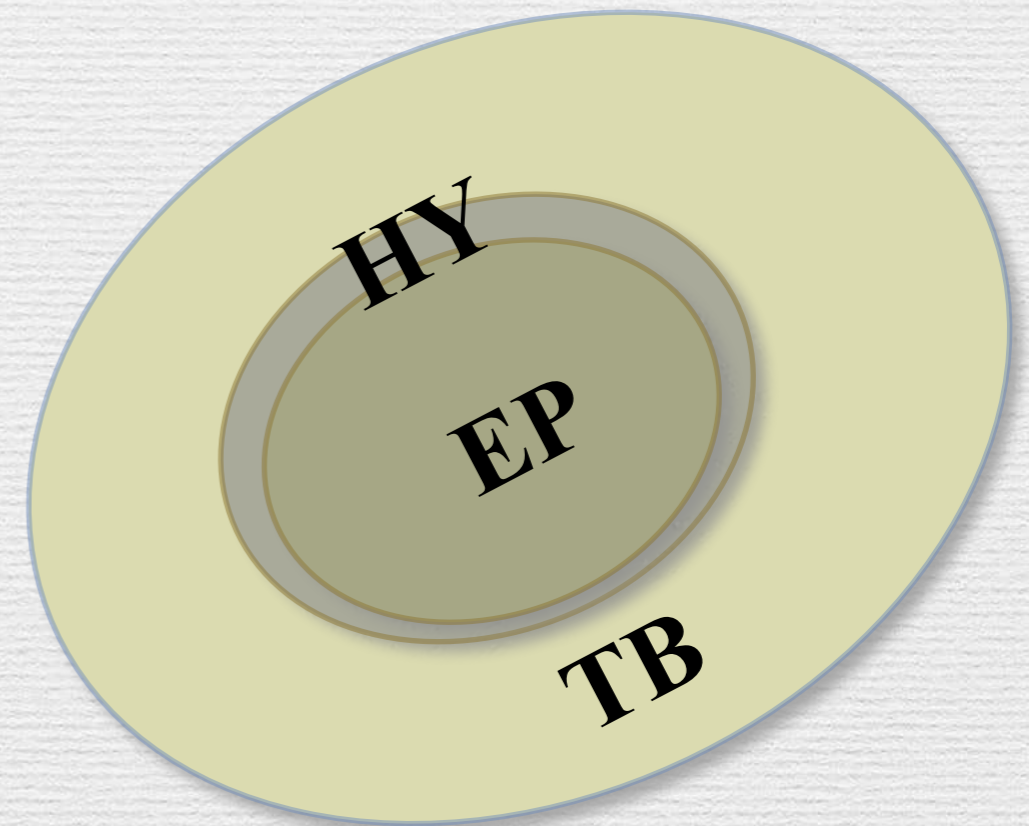
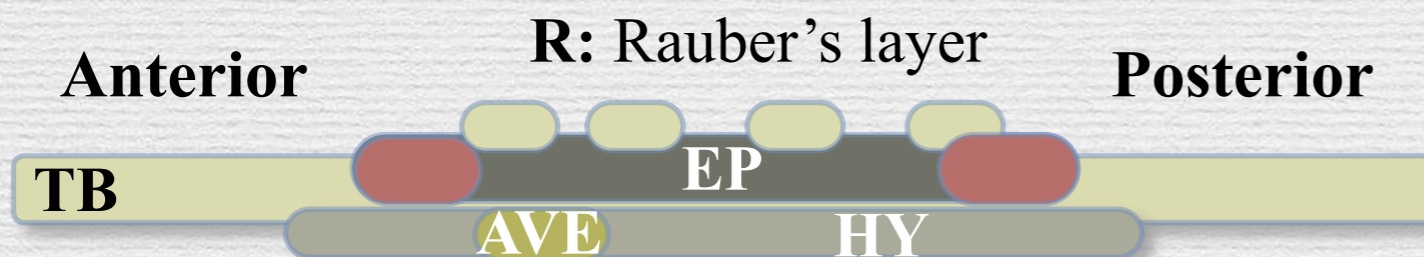
Egér embriók fejlődése



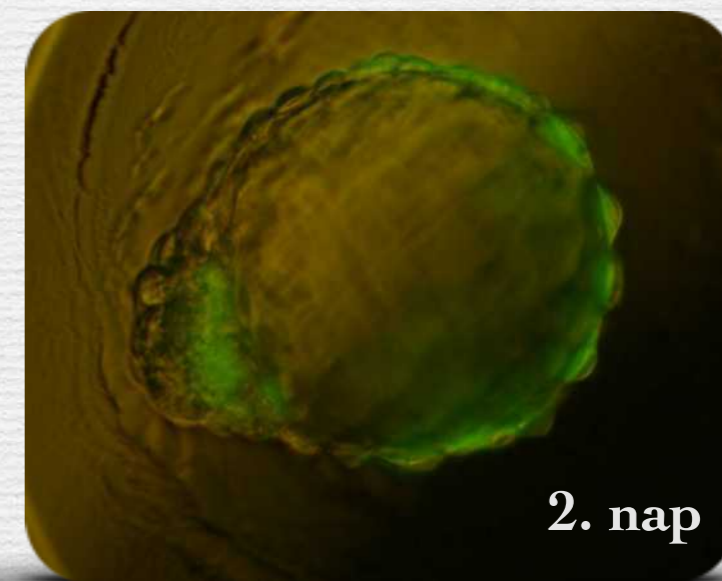
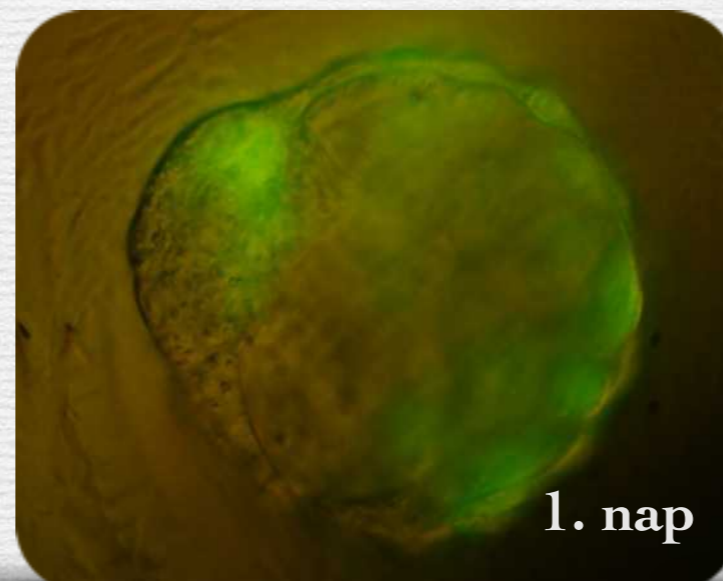
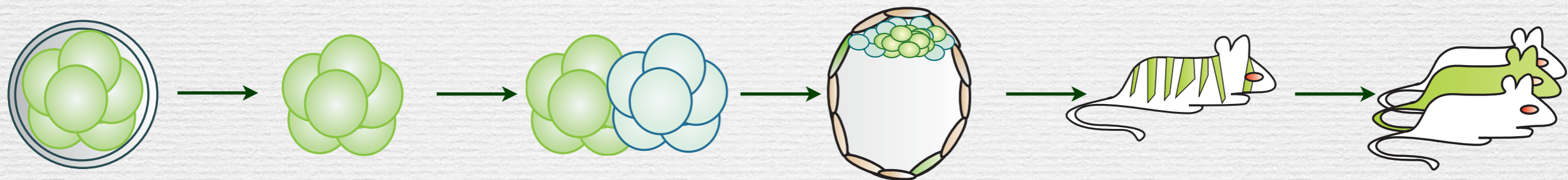
Nyúl embriók fejlődése



- ❖ E: embriódiszk → EP, HY
- ❖ TB: trofoblaszt → méhlepény
- ❖ HY: hipoblaszt → szik, amnion
- ❖ EP: epiblaszt → magzat



Kimérák a tudományban



XX-XY, XY-XX, XX-XX, XY-XY → 75% hím utód

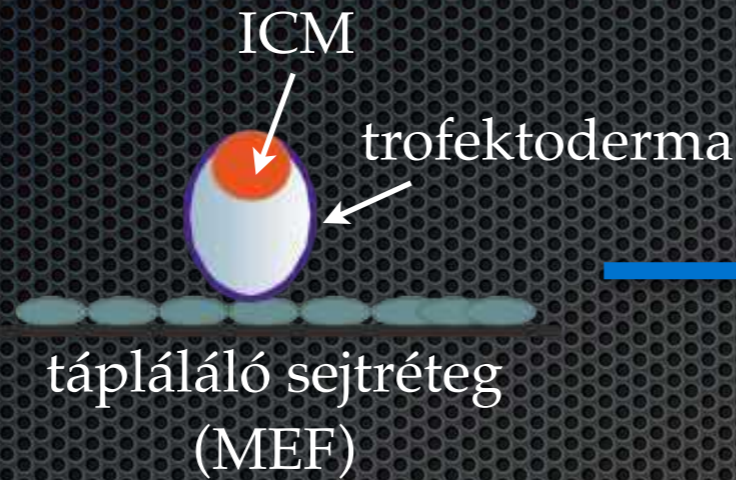
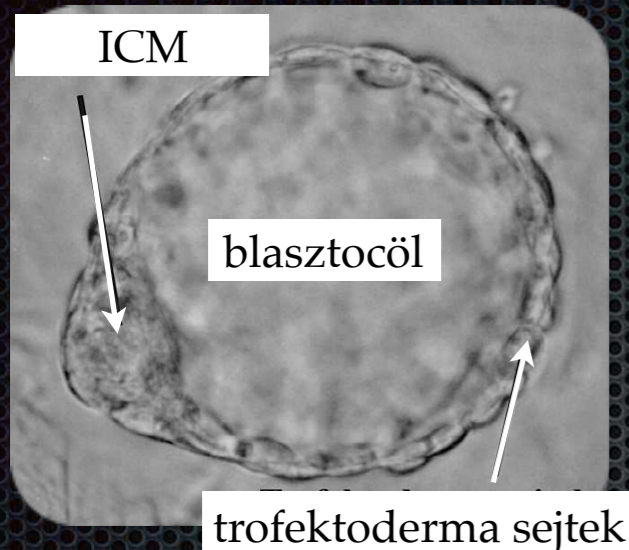
szexdetermináció vizsgálata

Tarkowski AK.: Germ cells in XX in equilibrium XY mouse chimeras. Basic Life Sci. 1978

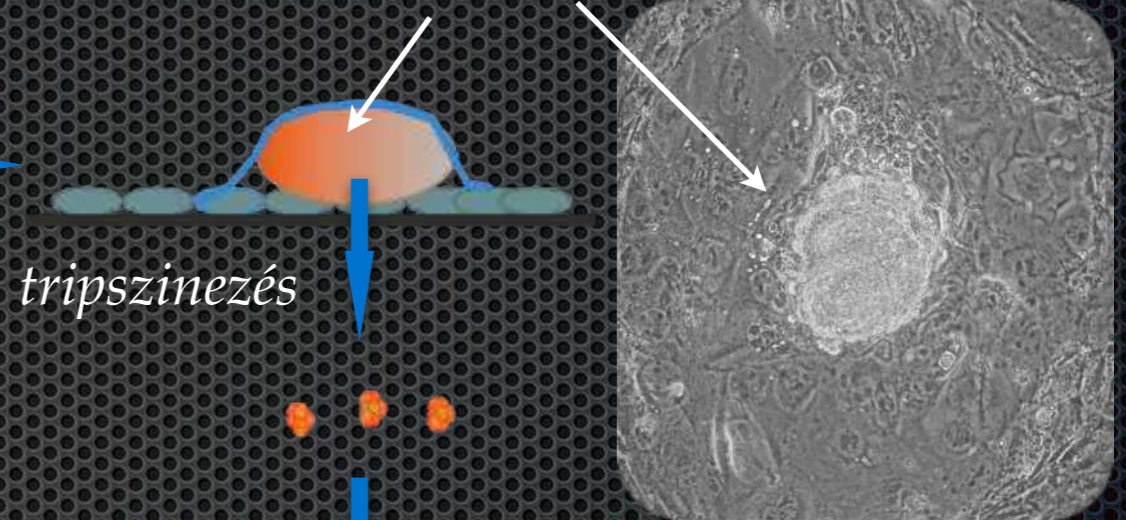


Pluripotens embrionális eredetű egér őssejt vonal (mESC)

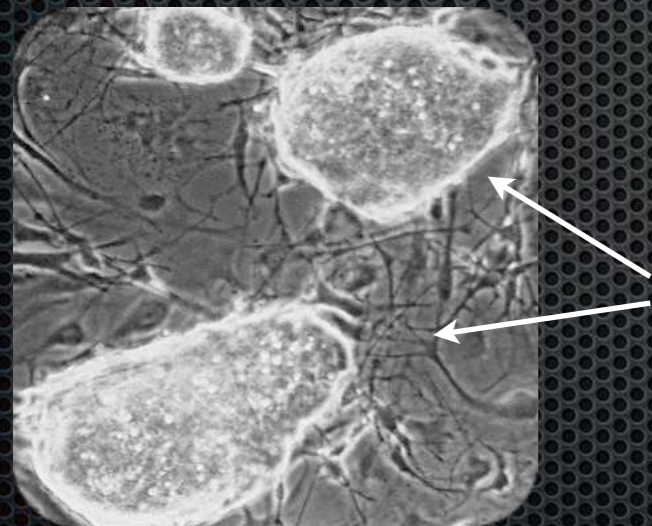
egér blasztociszta



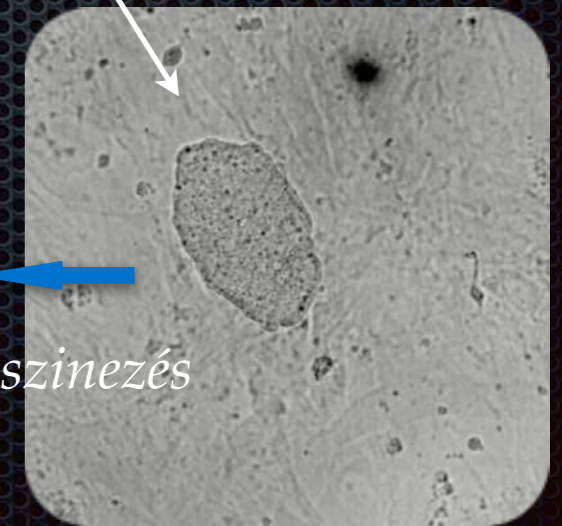
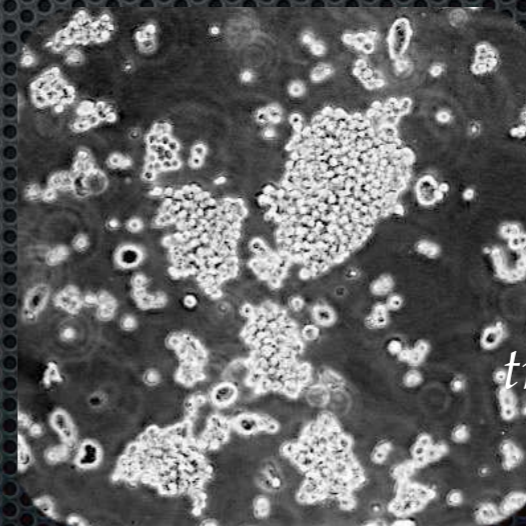
letapadt ICM csomó



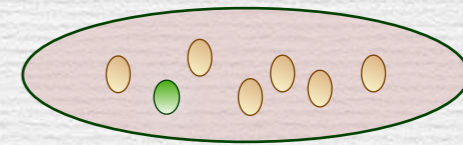
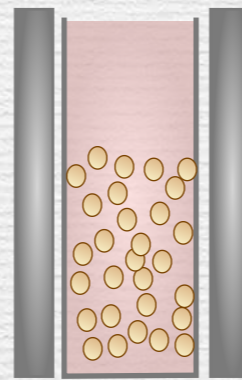
- ✦ *tripszin*
- ✦ *mLIF*
- ✦ *KO-DMEM*
- ✦ *20% FBS*



ES sejt vonal

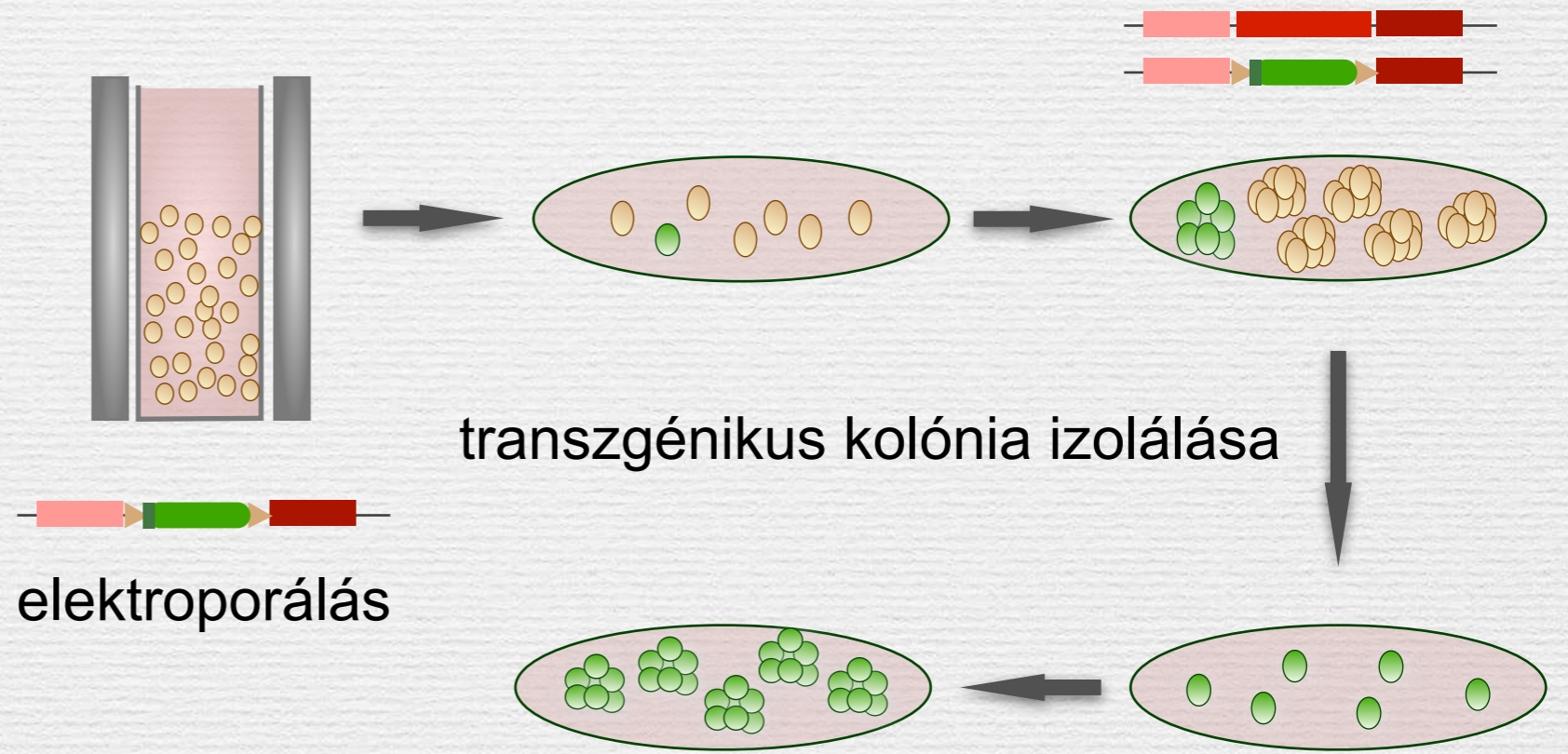


DNS elektroporálás ES sejtekbe

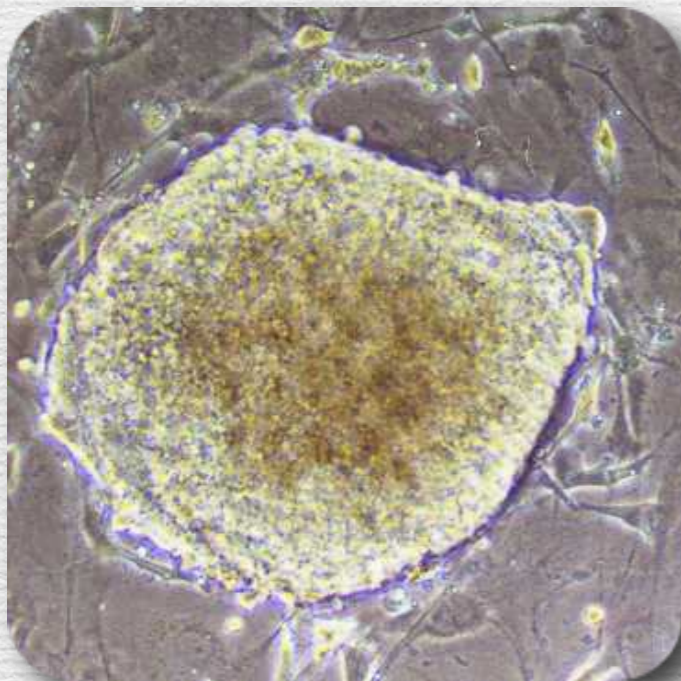


elektroporálás

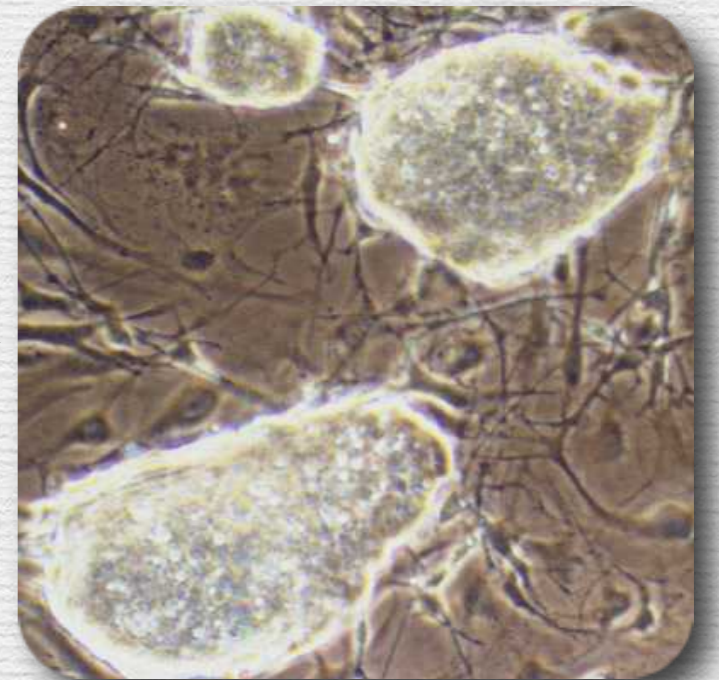
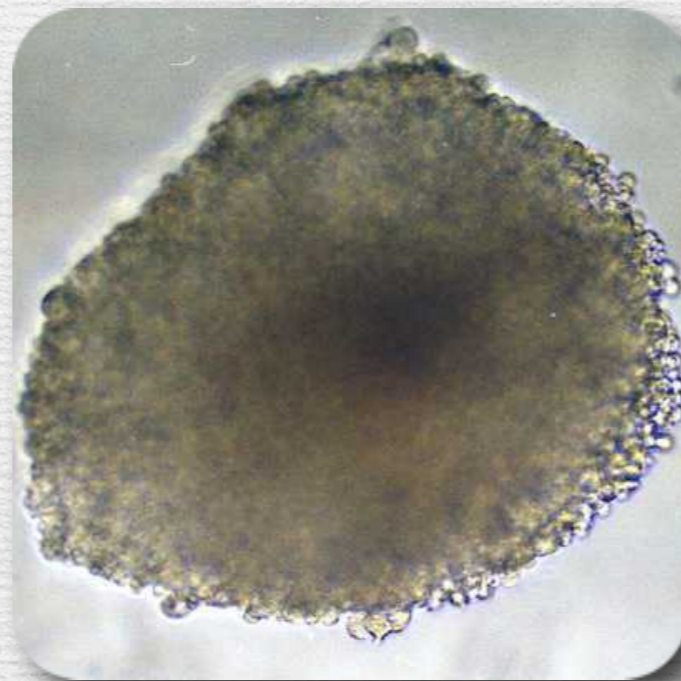
DNS elektroporálás ES sejtekbe



rezisztens kolónia

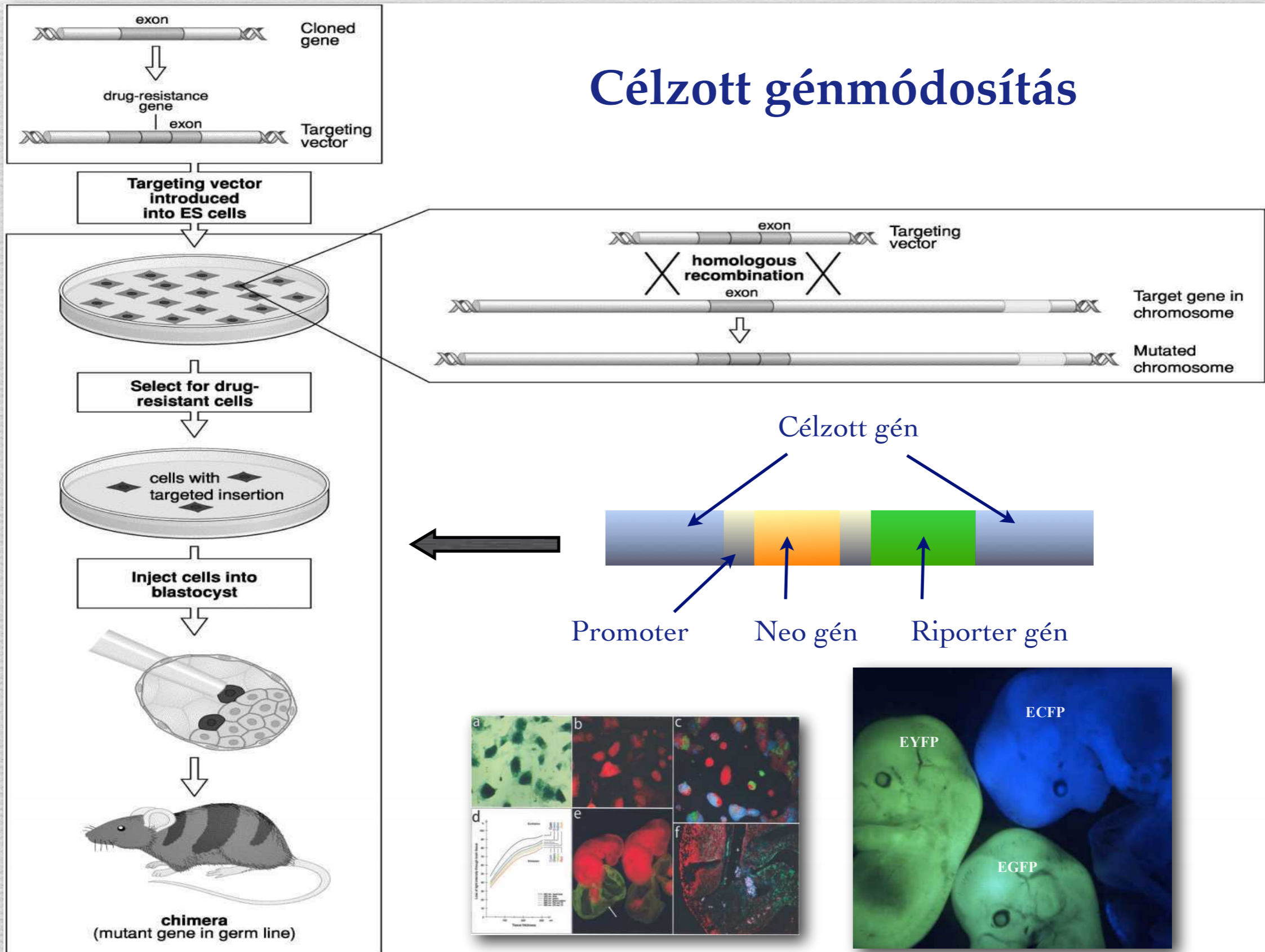


kolónia tripszinben

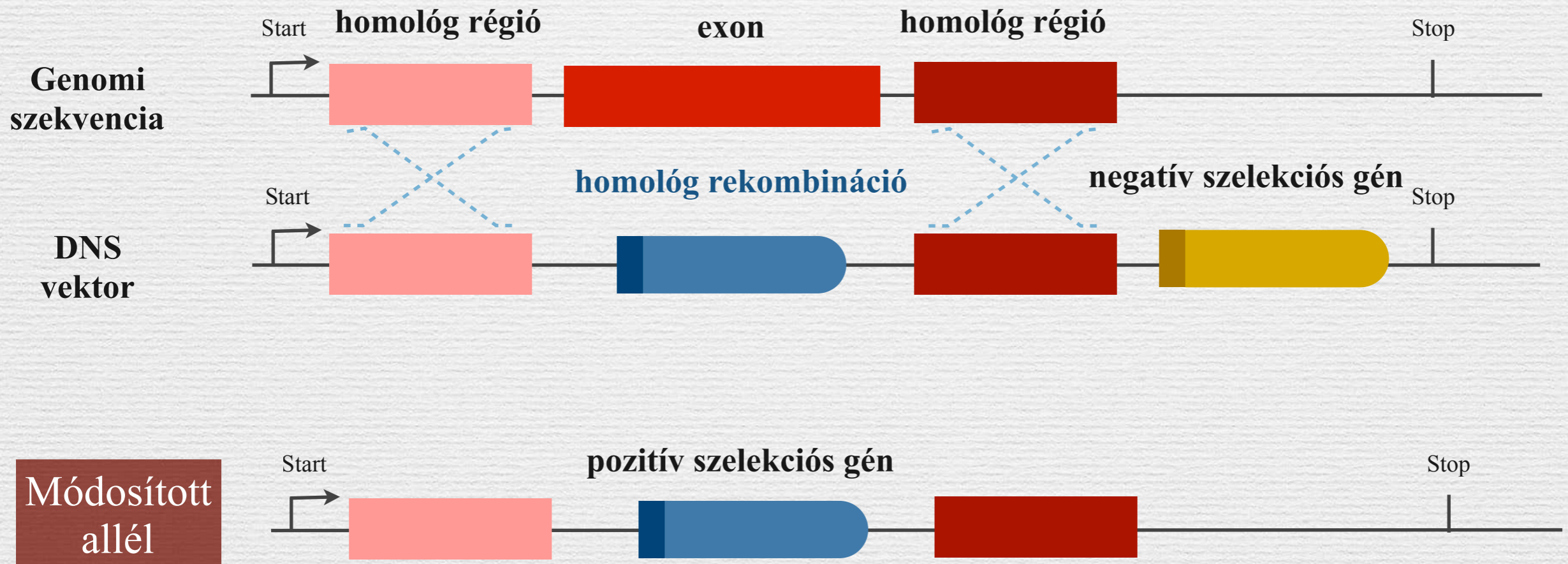


Transzgénikus ES sejtvonalak alkalmazása

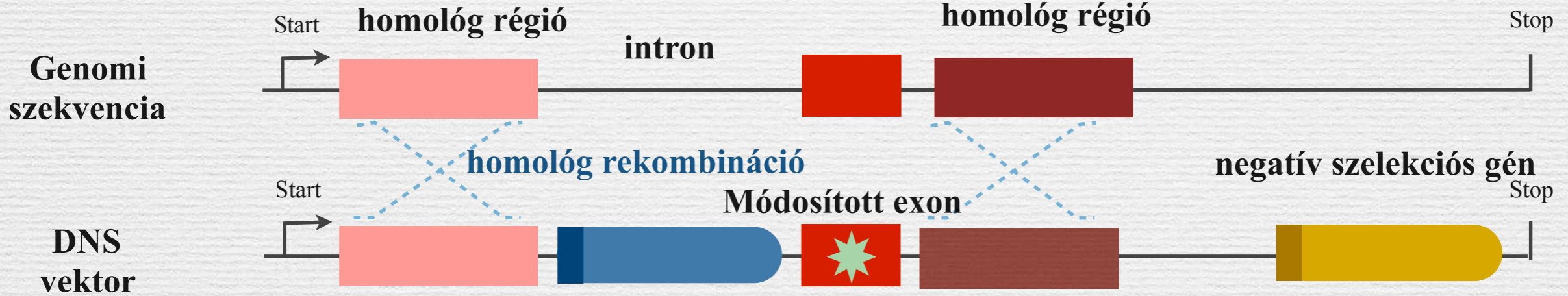
Célzott génmódosítás



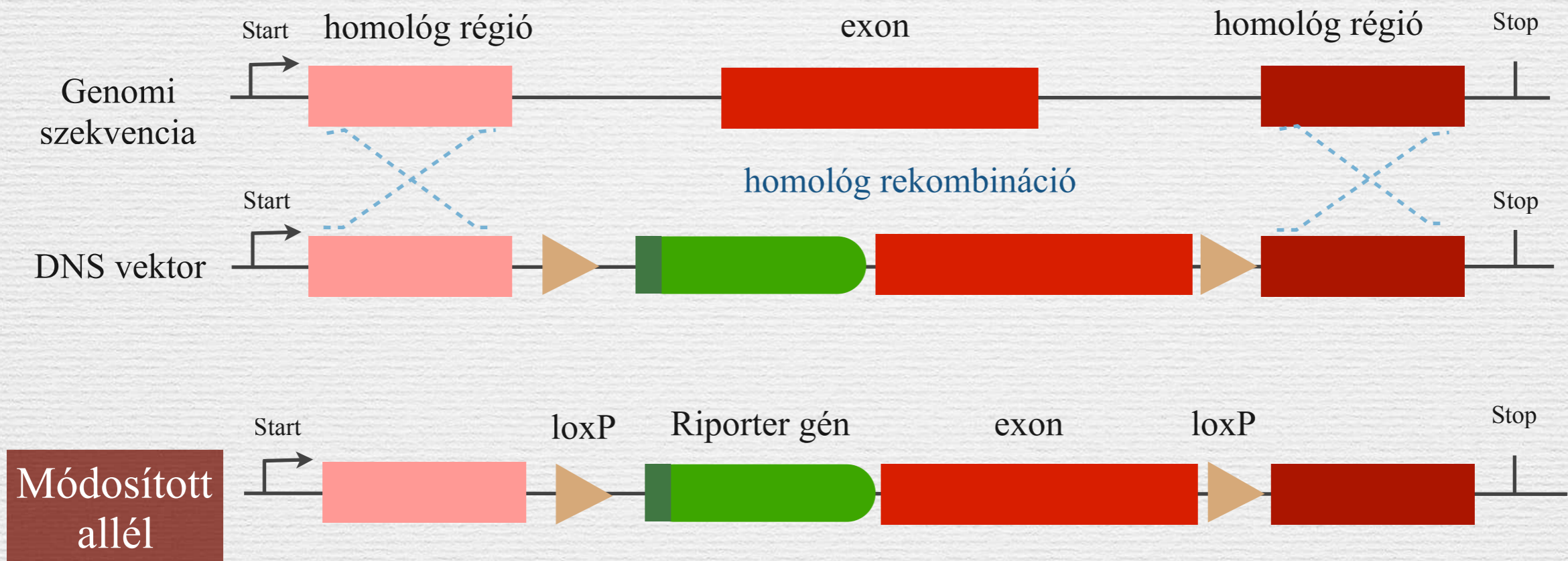
HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓ - CÉLZOTT GÉNKIÜTÉS



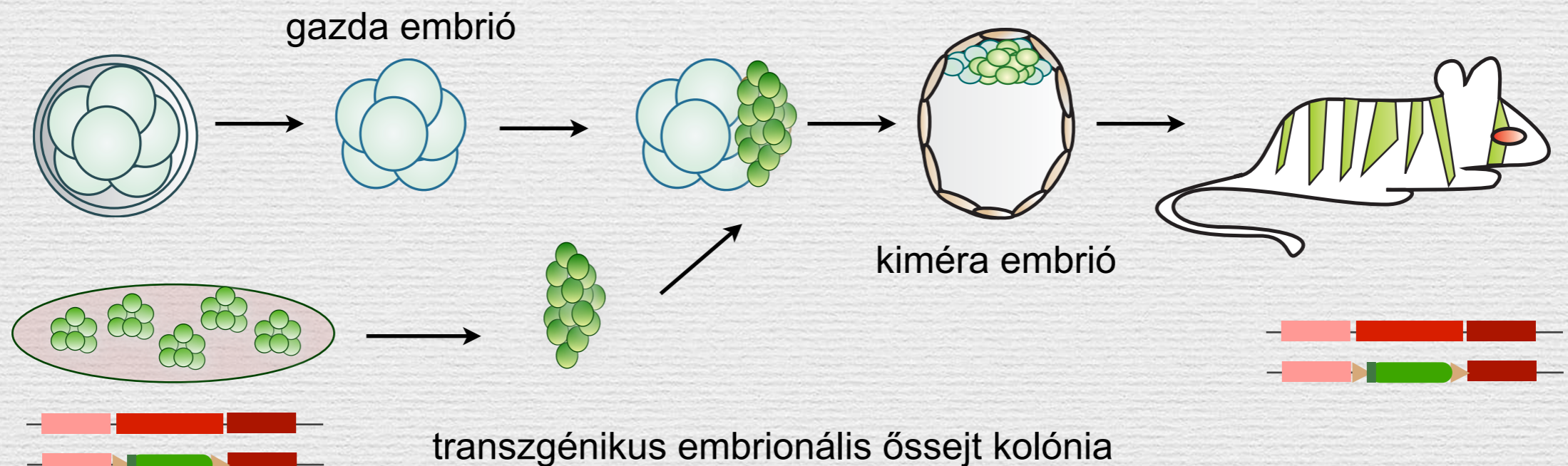
HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓ - CÉLZOTT GÉNMODOSÍTÁS



HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓ - KONDITIONÁLIS GÉNKIÜTÉS

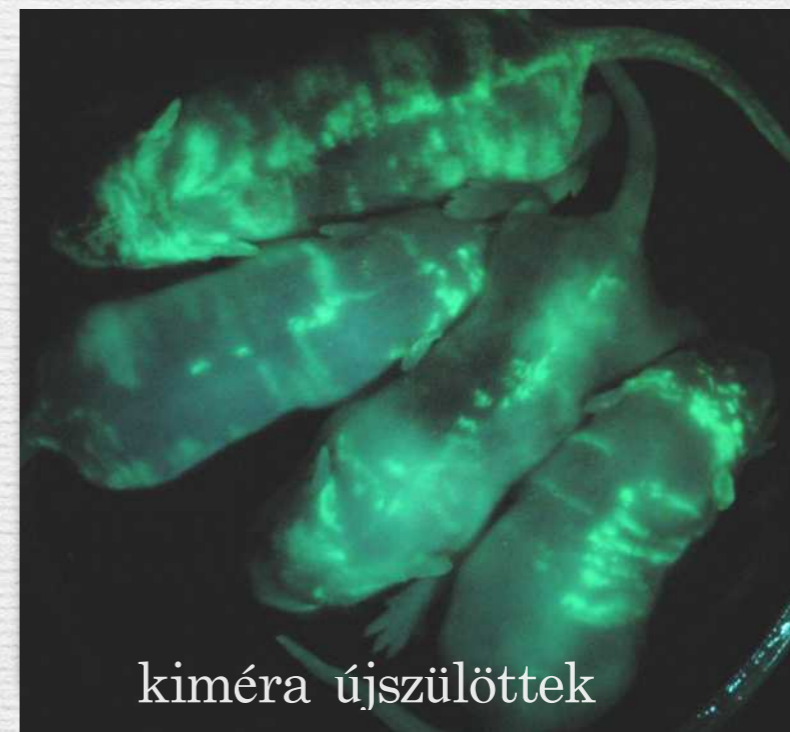
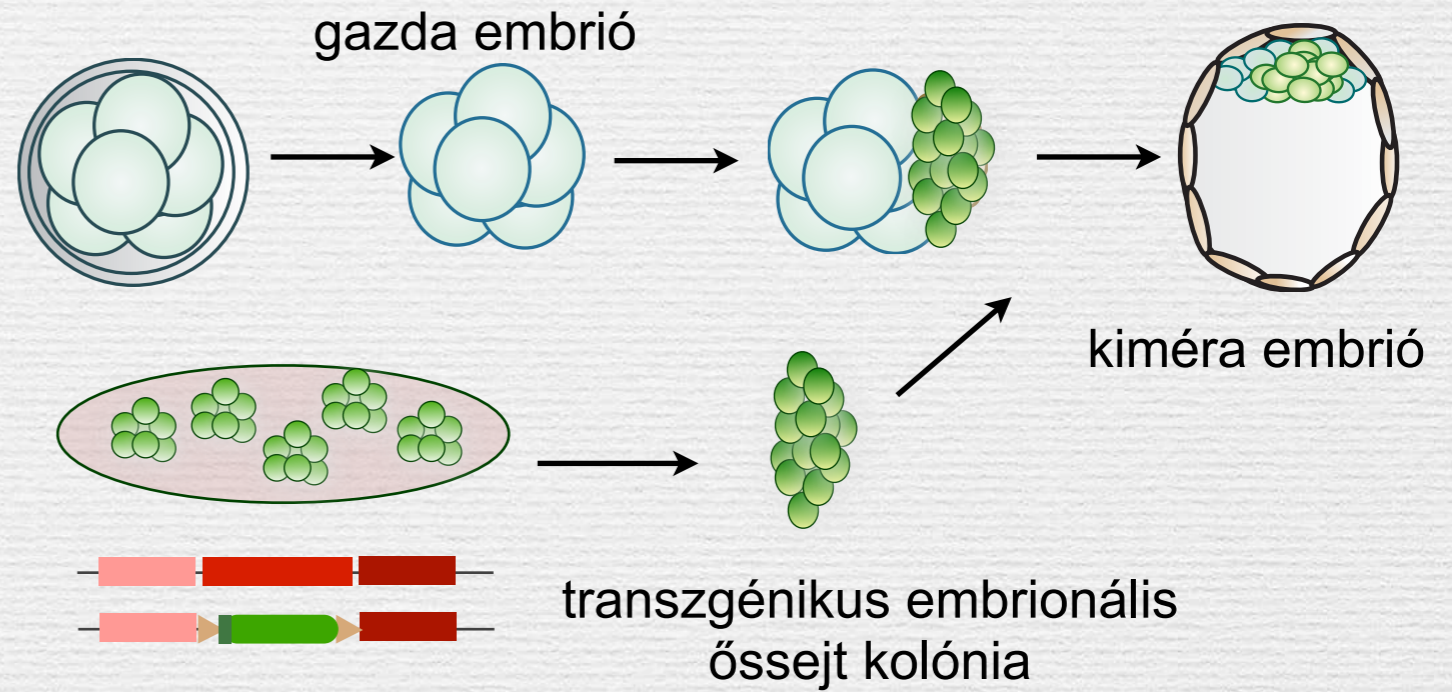
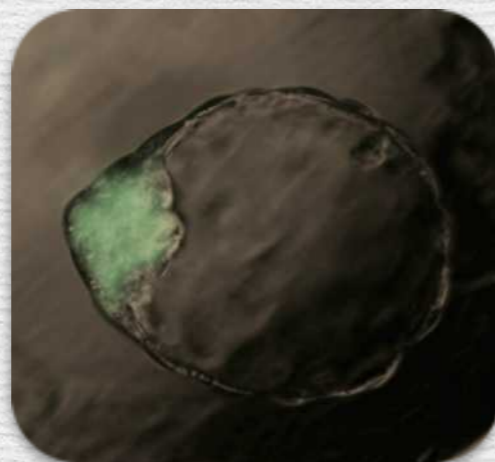
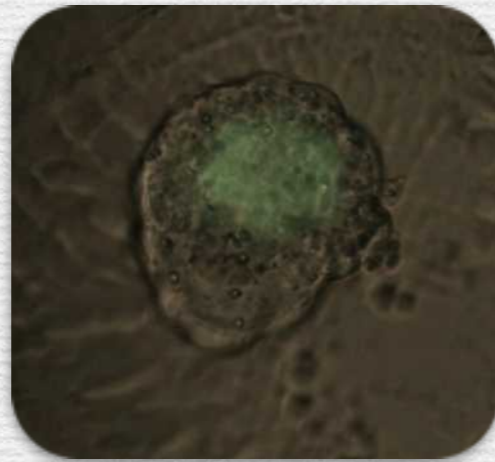
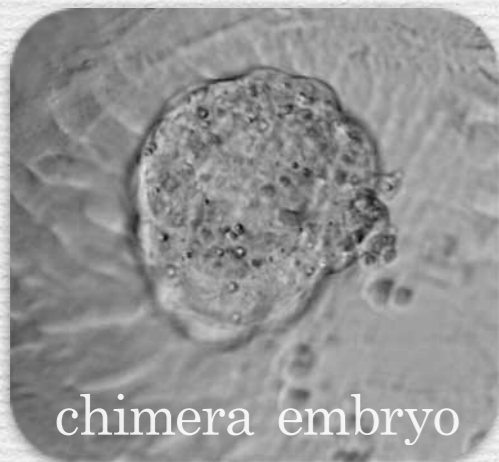
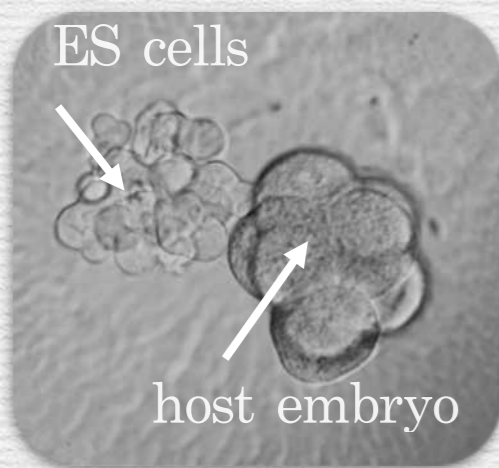


TRANSZGÉNIKUS KIMÉRA EGEREK LÉTREHOZÁSA



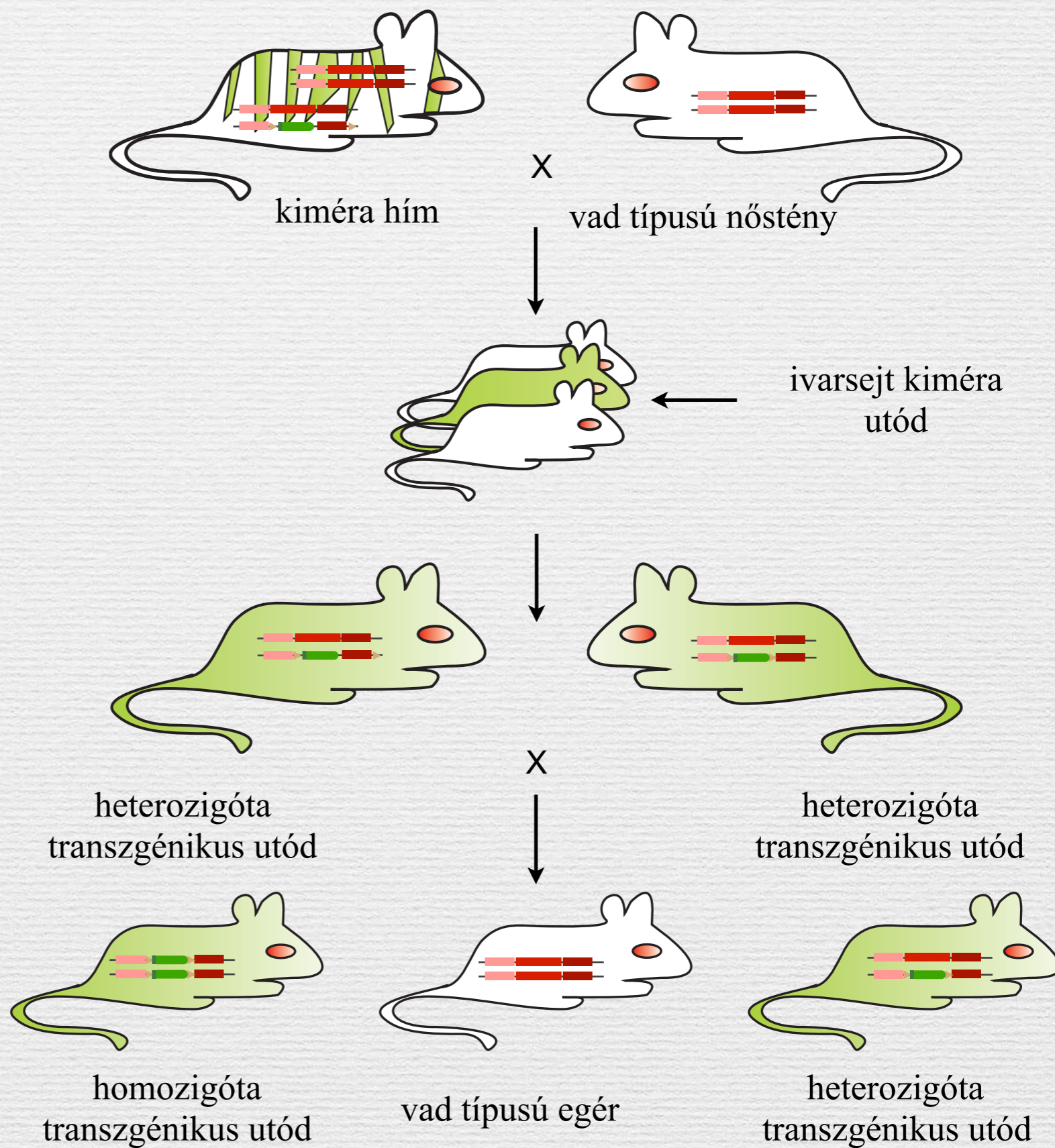
TRANSZGÉNIKUS ES SEJTEK AGGREGÁLTATÁSA GAZDA EMBRIÓVAL

AGGREGÁCIÓS KIMÉRÁK

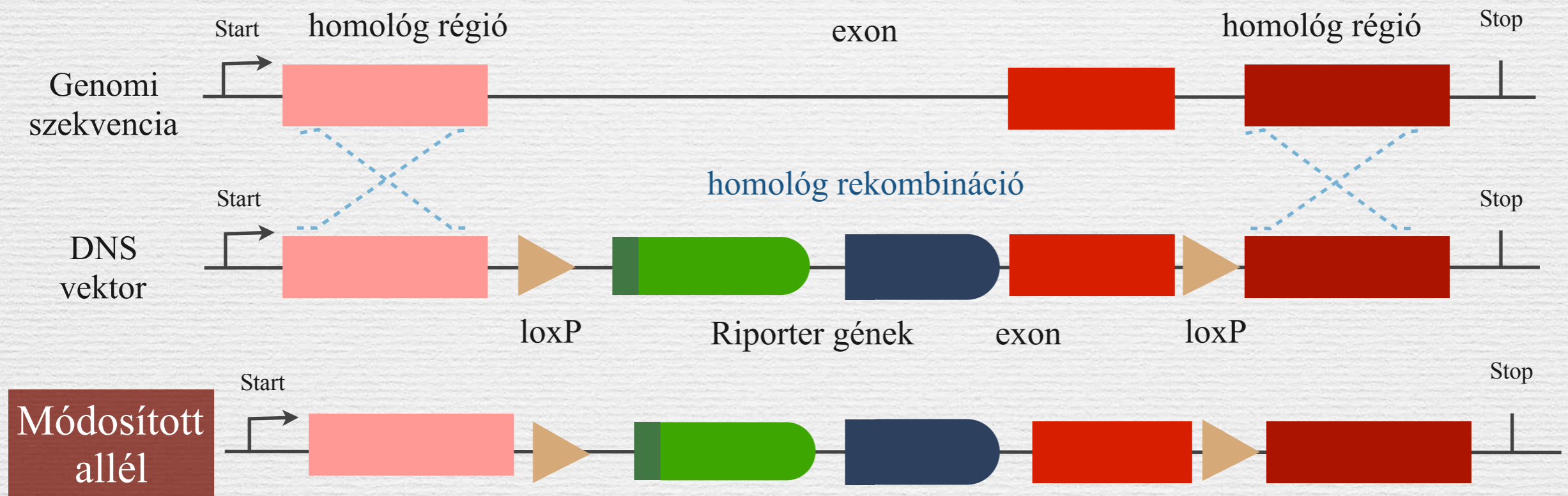


GFP visualisation: BLS-Ltd

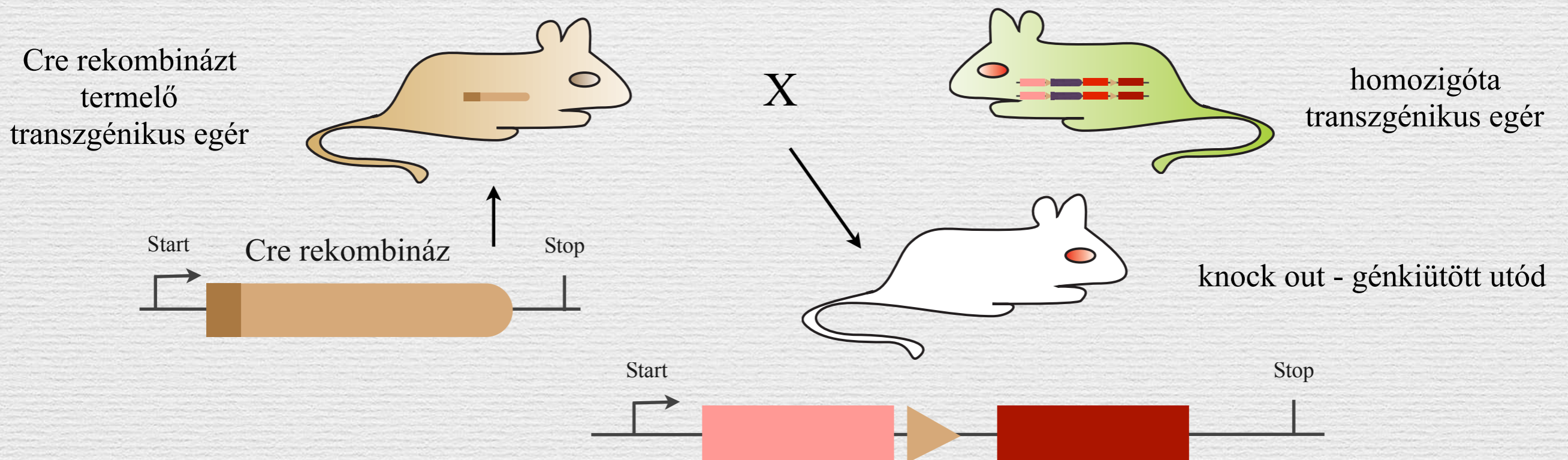
HOMOZIGÓTA TRANSZGÉNIKUS EGEREK LÉTREHOZÁSA



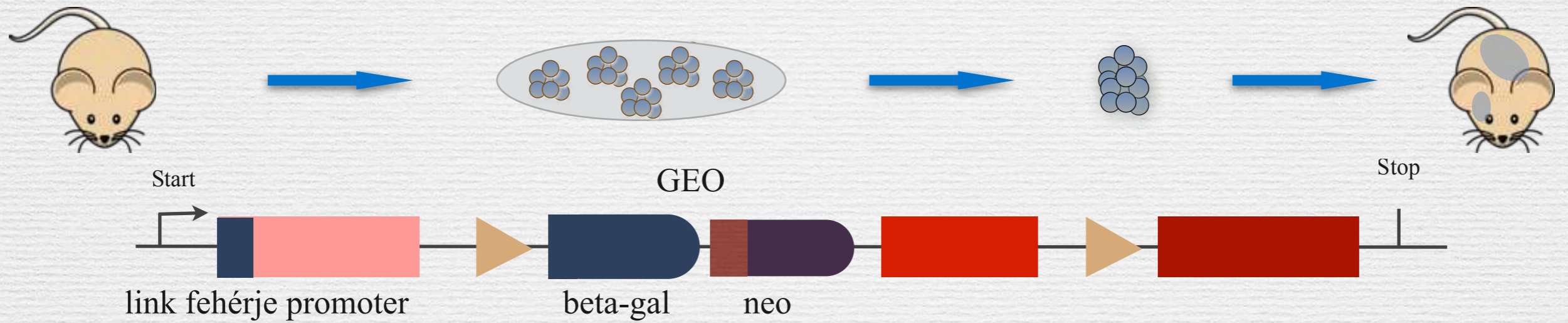
HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓ - KONDITIONÁLIS GÉNKIÜTÉS



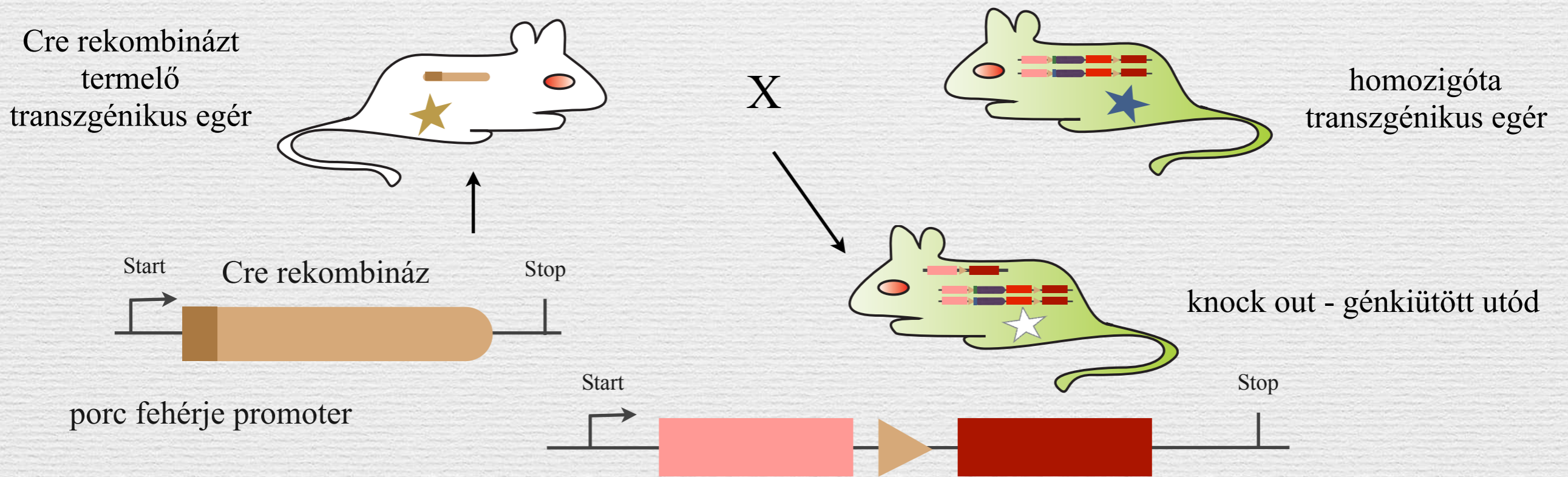
HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓ - KONDITIONÁLIS GÉNKIÜTÉS



HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓ - SZÖVETSPECIFIKUS RIPORTER GÉN EXPRESSZIÓ - KONDITIONÁLIS GÉNKIÜTÉS

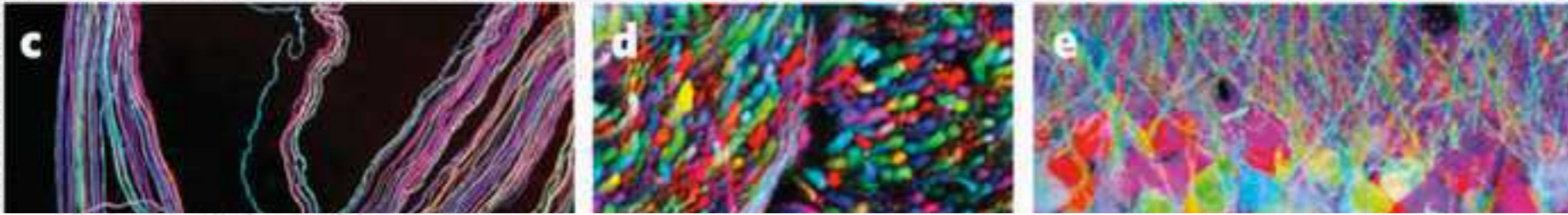


HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓ - KONDITIONÁLIS GÉNKIÜTÉS



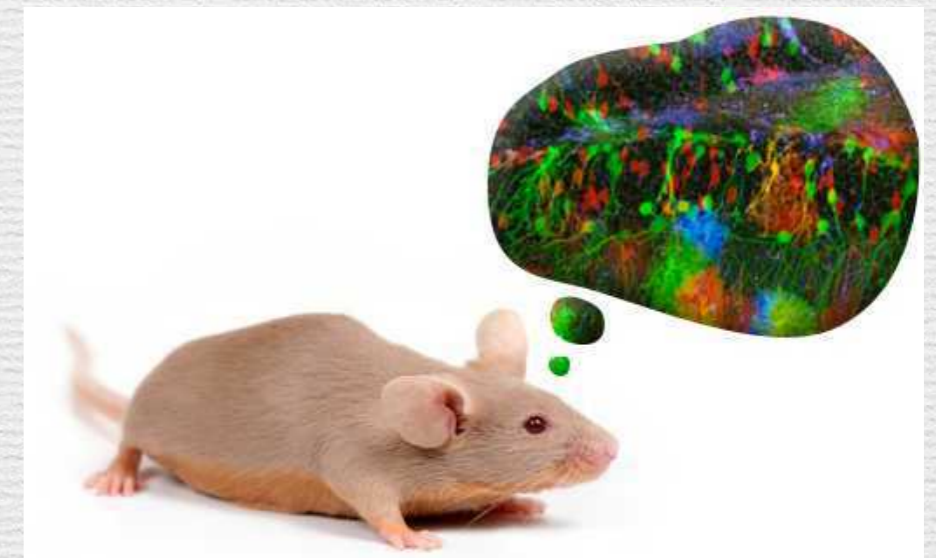
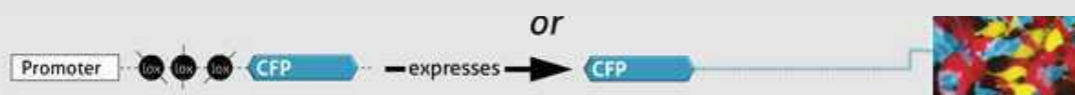
link fehérje expresszió követése transzgénikus egerek porc szövetében

Brainbow mouse



Building Brainbow

Three copies of the genetic construct allow for the expression of multiple fluorophore color combinations.



Brainbow mouse

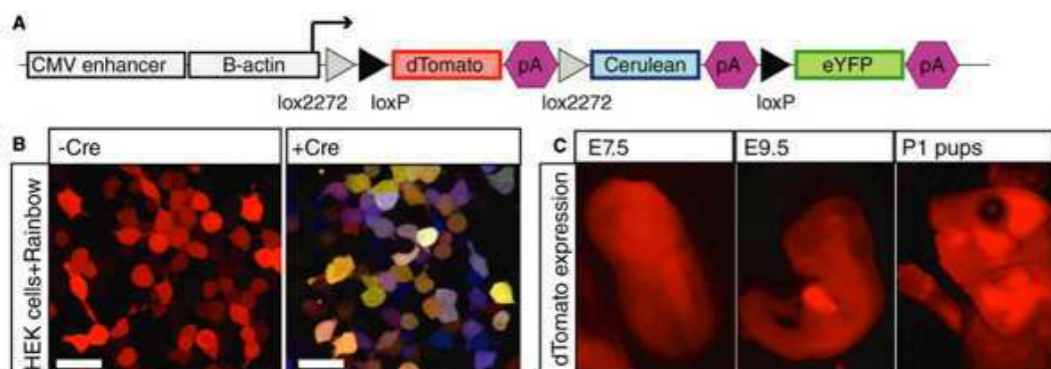
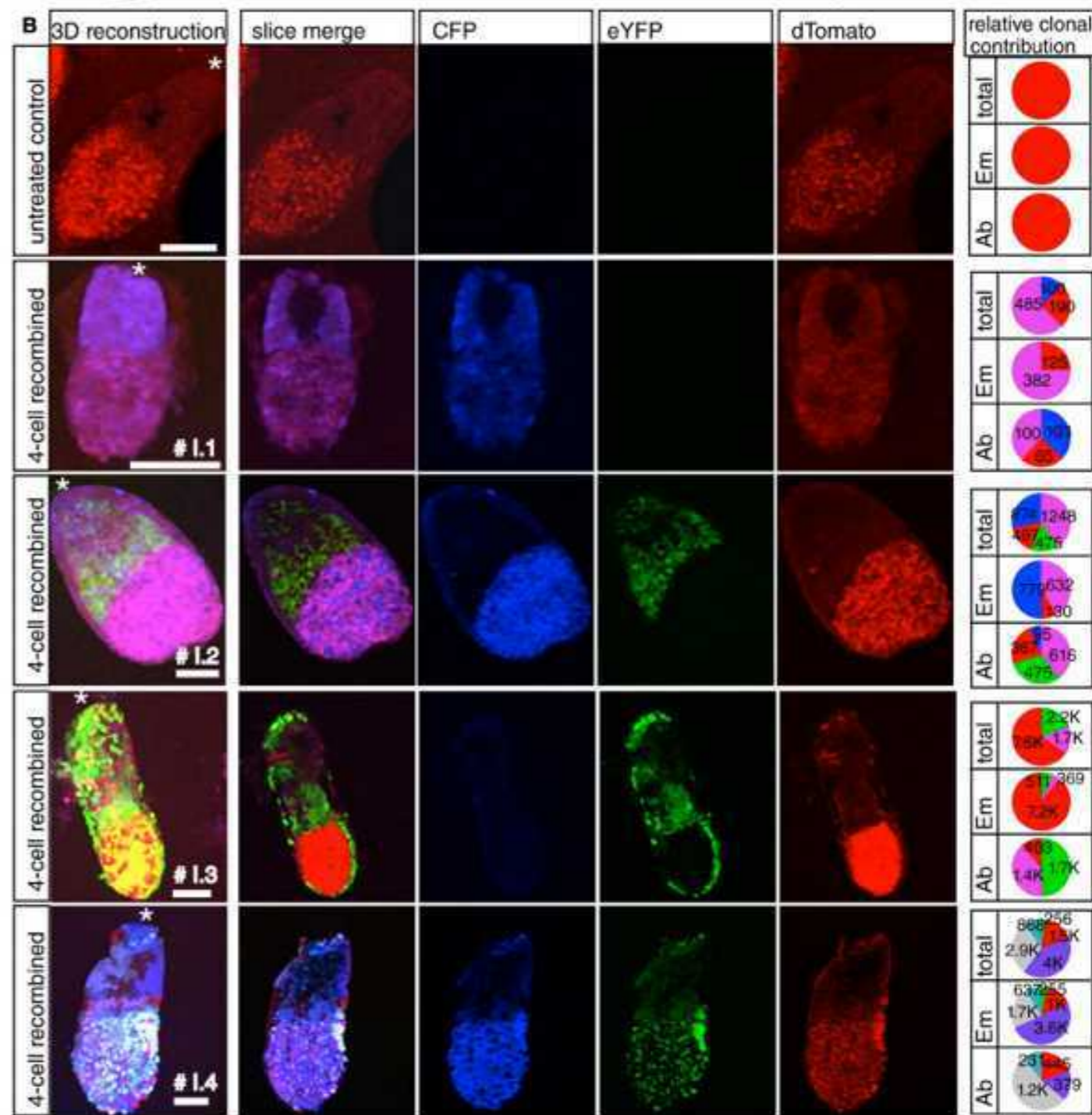
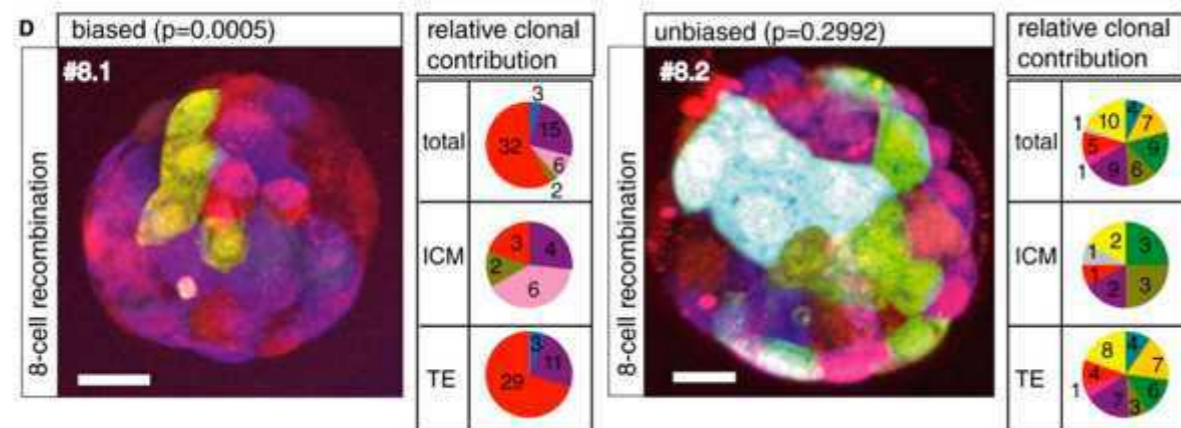
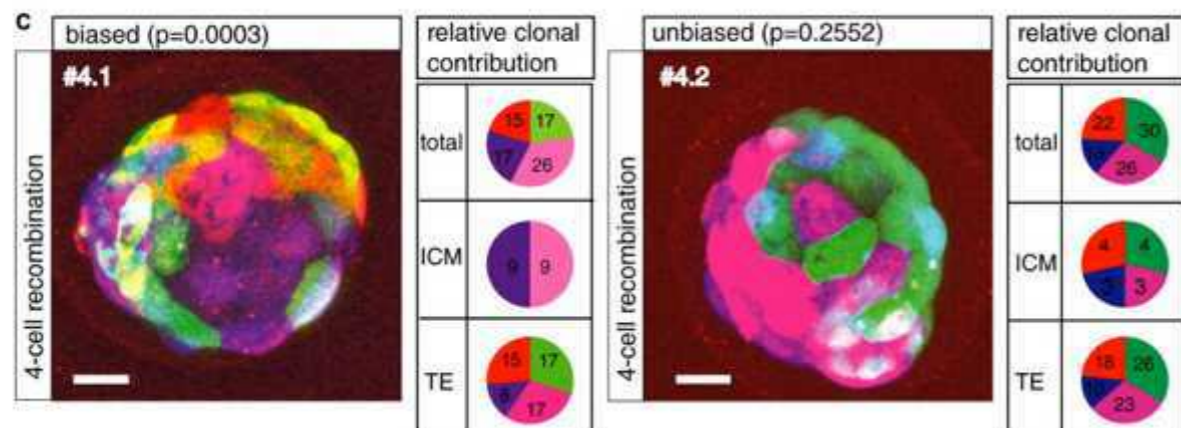
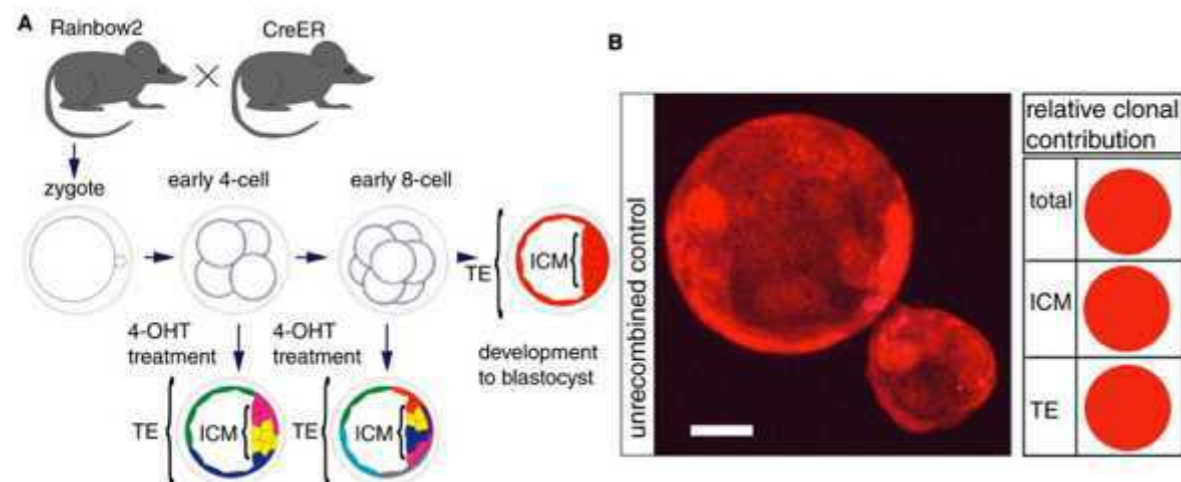
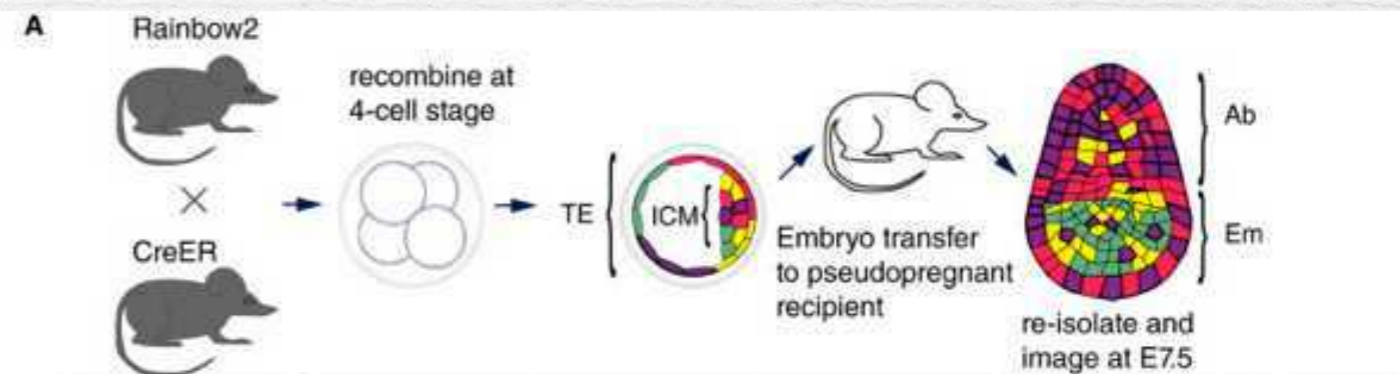


Figure 1. A Mouse for Rainbow Lineage Tracing(A) The *Rainbow* construct is shown.(B) *Rainbow* recombination after cotransfection with Cre into HEK cells is shown.(C) dTomato expression at E6.5, E9.5, and in P1 Rainbow2 pups is shown. See also Figure S1.



Evans, Capecchi, Smitish - 2007 Nobel díj!



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2007

"for their discoveries of principles for introducing specific gene modifications in mice by the use of embryonic stem cells"



Photo: Tim Roberts/PR Newswire, © HHMI

Mario R. Capecchi

🕒 1/3 of the prize

USA

University of Utah;
Howard Hughes Medical
Institute
Salt Lake City, UT, USA

b. 1937
(in Italy)



Photo © Cardiff University

Sir Martin J. Evans

🕒 1/3 of the prize

United Kingdom

Cardiff University
Cardiff, United Kingdom

b. 1941



Photo: Scanpix/Dan Sears

Oliver Smithies

🕒 1/3 of the prize

USA

University of North
Carolina at Chapel Hill
Chapel Hill, NC, USA

b. 1925
(in United Kingdom)

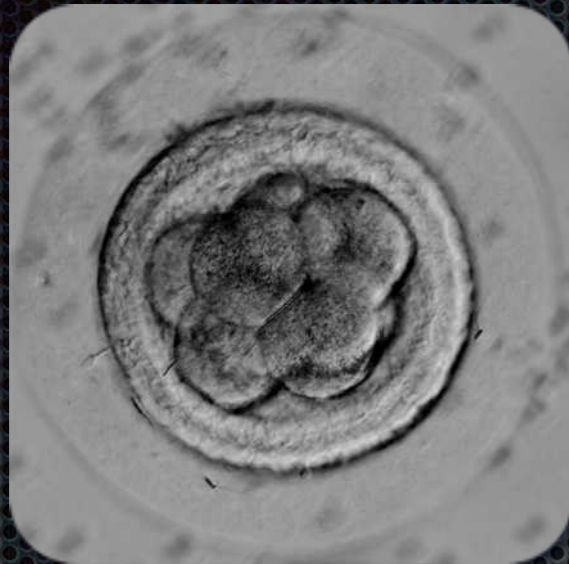
- Martin J. Evans (első ES, EC sejtek)
- Mario R. Capecchi (homológ rekombináció, neo, HSV-tk, hpert gén bejuttatás)
- Oliver Smithies (homológ rekombináció humán sejtekben, mutáns hpert gén javítás)

Evans, Capecchi, Smitesh - 2007 Nobel díj - történeti áttekintés

- EC sejtek (Evans M.J.; Martin G.R. 1972, 1974, 1975)
- EC sejtek microinjektálása egér blasztocisztába (Papaioannou V.E., McBurney M., Gardner R.L., Evans M.J. 1975)
- DNA microinjektálás sejtenyészeti sejtekbe (Capecchi MR, 1980)
- Egér embrió transzformálása mikroinjektálással (Gordon J.W. 1980)
- ES sejtvonalak léterhozása (Evans, M.J., Kaufman, M.H.; Martin G.R. 1981)
- A humán beta-globin lokuszba DNS szekvencia bejuttatása homológ rekombinációval (Smithies, O. 1985)
- Csíravonal kimérák előállítása retrovirus transzformált ES sejteket felhasználva (Robertson E, Bradley, A., Kuehn, M., Evans, M.; Gossler A, Doetschman, T. 1986)
- Mutáns Hprt gén kijavítása egérben homológ rekombinációval (Doetschman T., Thompson S., Smithies O. Nature.1987)
- Mutagenézis célzott génmódosítással egér ES sejtekben (Thomas KR, Capecchi, M.R. 1987)
- Szövet- és helyspecifikus DNS rekombináció transzgénikus egerekben (Orban P.C., 1992)
- Indukálható génmódosítás egérben, Cre rekombináz alkalmazásával (Kuhn R., Schwenk F., Aguet M., Rajewsky K. 1995)

Pluripotens embrionális eredetű nyúl őssejtvonala (rabESC)

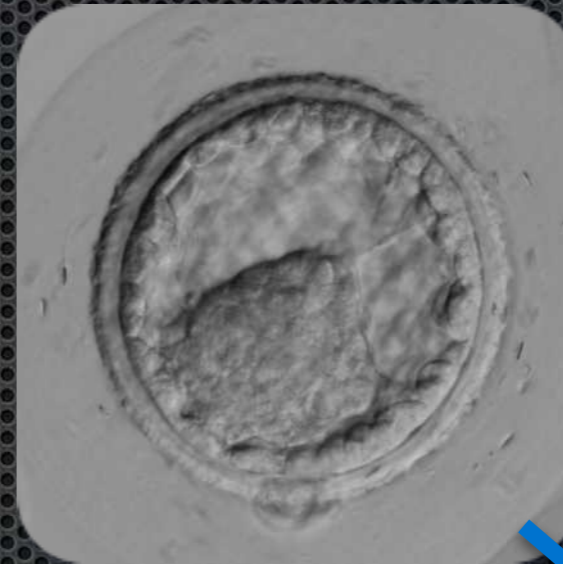
2 napos nyúl embrió



3 napos nyúl embrió

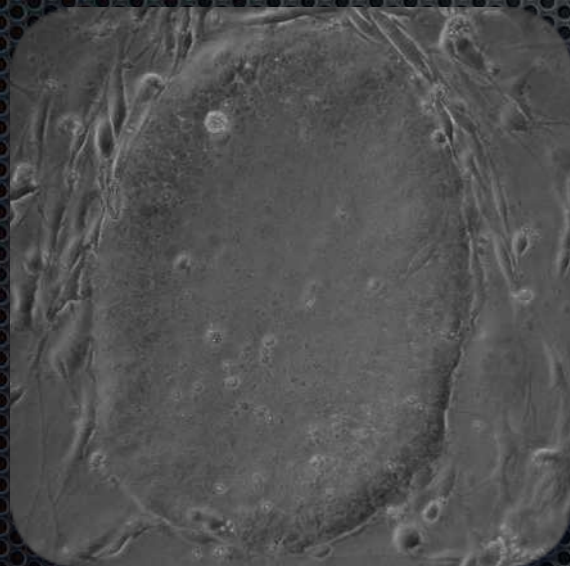


4 napos nyúl embrió

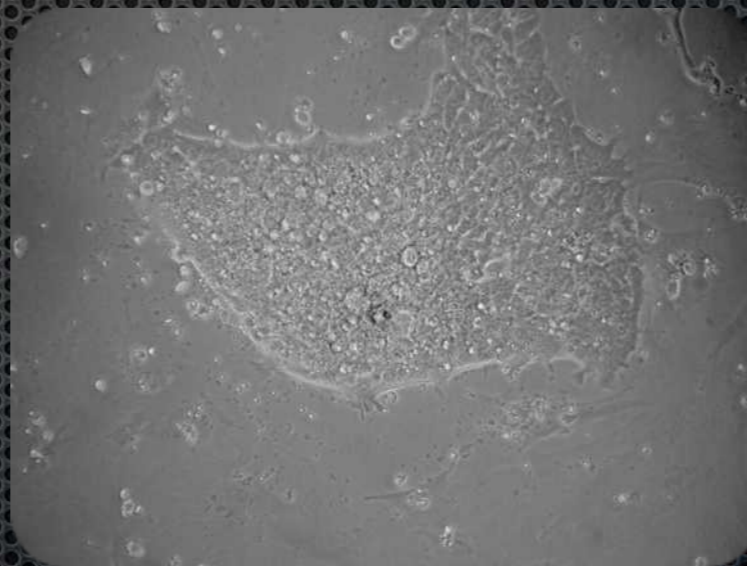


- * MEF+zselatin
- * no ZP
- * accutáz
- * patkány LIF
- * humán bFGF
- * KO-DMEM
- * ISCOVE'S
- * 15% KO-SR

ES kolónia (4. passzáz)

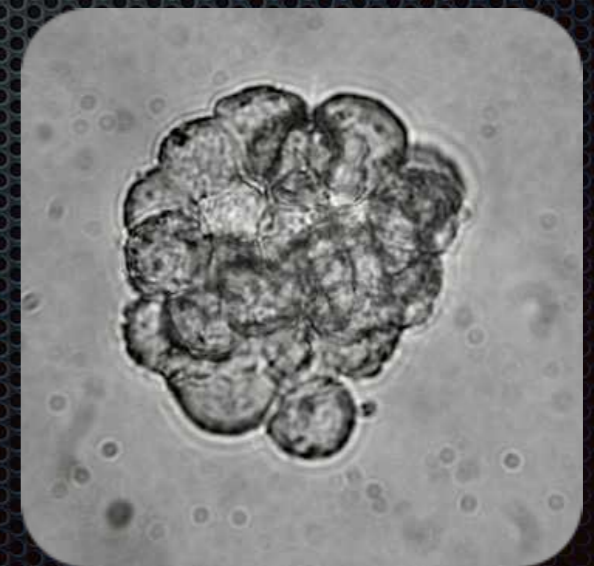


letapadt ICM



0.5% propanáz

izolált ICM



accutáz

accutáz

egér embrionális fibroblaszton

ES sejtek pluripotenciáját befolyásoló faktorok

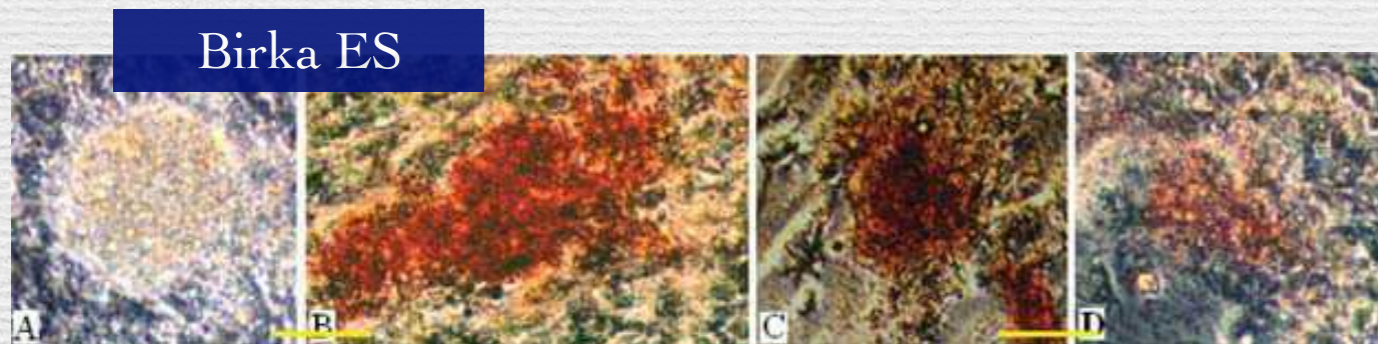
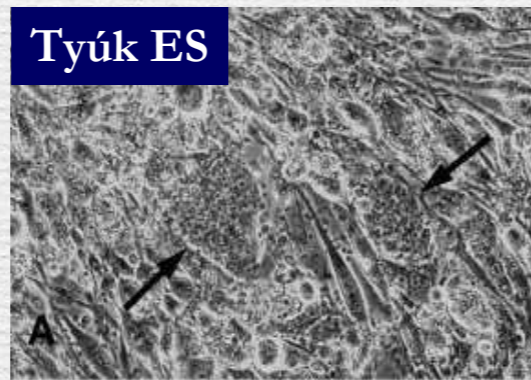
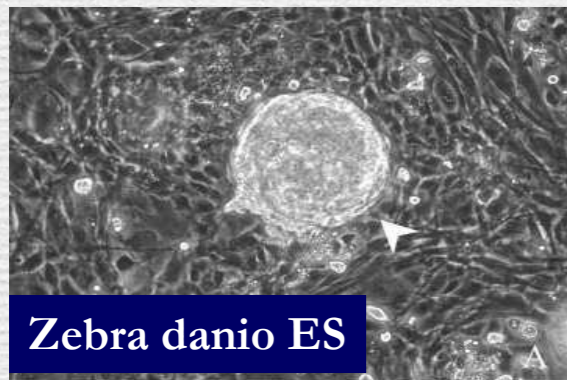
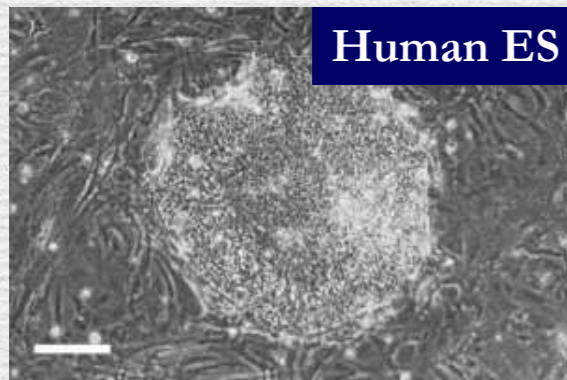
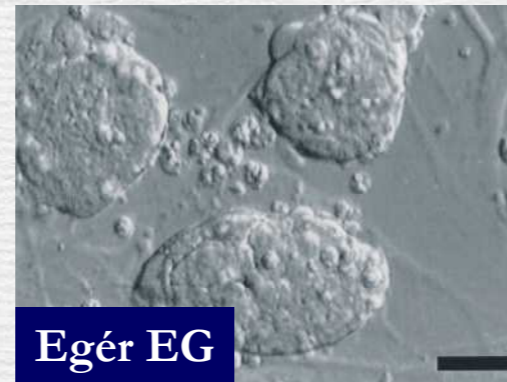
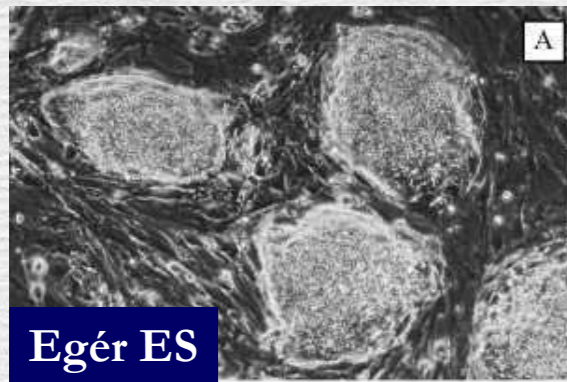


- ❖ KO-EM, 15%FBS, mLIF
- ❖ CD1 MEF
- ❖ tripszin
- ❖ ZP, egész blasztociszta
- ❖ AP, SSEA-1
- ❖ in vitro differenciálódás
- ❖ teratokarcinoma képzés
- ❖ ivarsejt kiméra

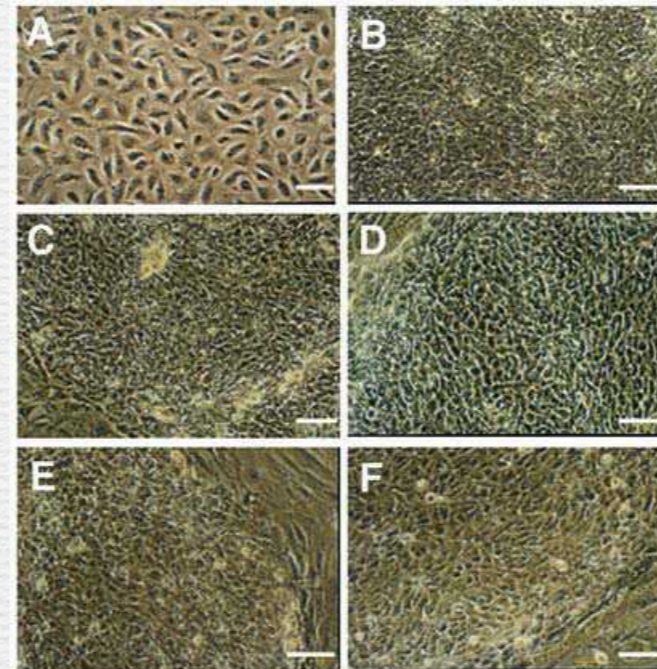
- LIF (hu, m, r, rab)
- FBS ↔ SRL
- collagenáz ?
- SSEA-3
- 2i, 3i, 4i ↔ GATA6
- activin
- egyéb faktorok...

- ❖ KO-EM/F12, 15%SRL, bFGF
- ❖ OF1 MEF
- ❖ accutáz
- ❖ nincs ZP, csak ICM
- ❖ AP, SSEA-1, SSEA-4
- ❖ in vitro differenciálódás
- ❖ teratokarcinoma képzés
- ❖ kiméra

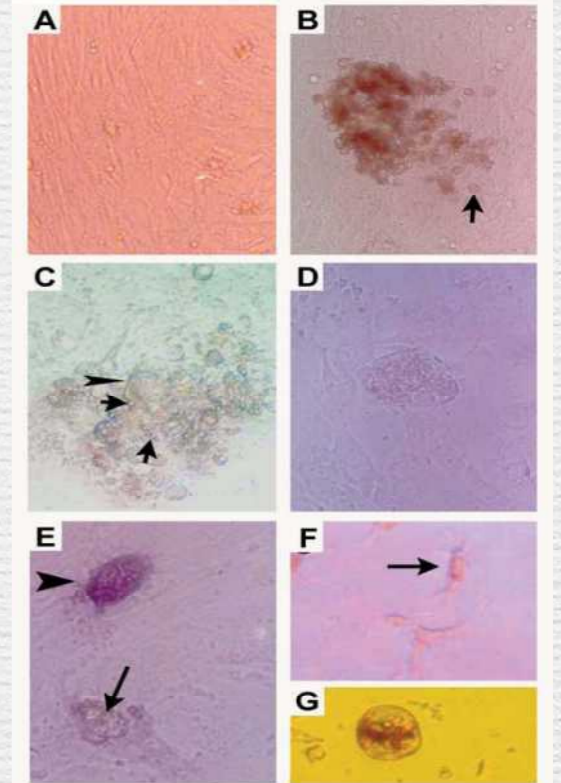
GERINCES EMBRIÓKBÓL SZÁRMAZÓ ES, EG SEJTVONALAK



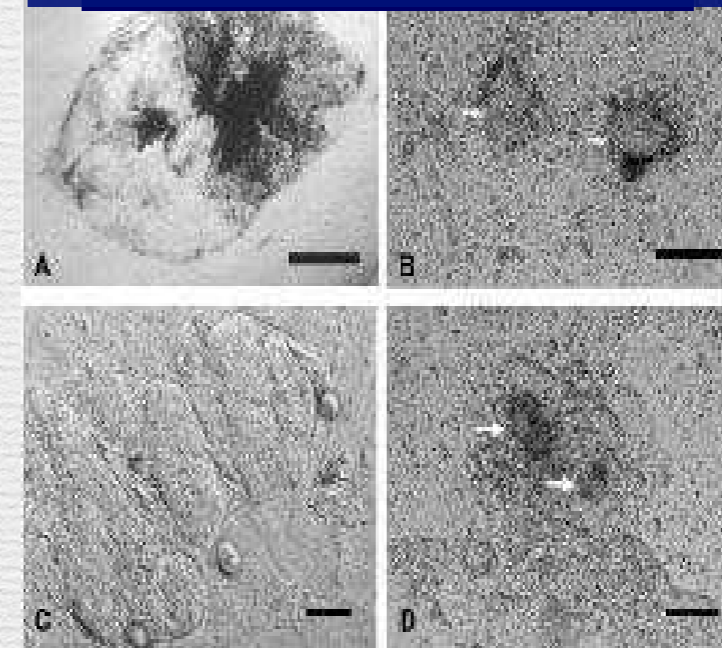
Rhesus monkey ESCs



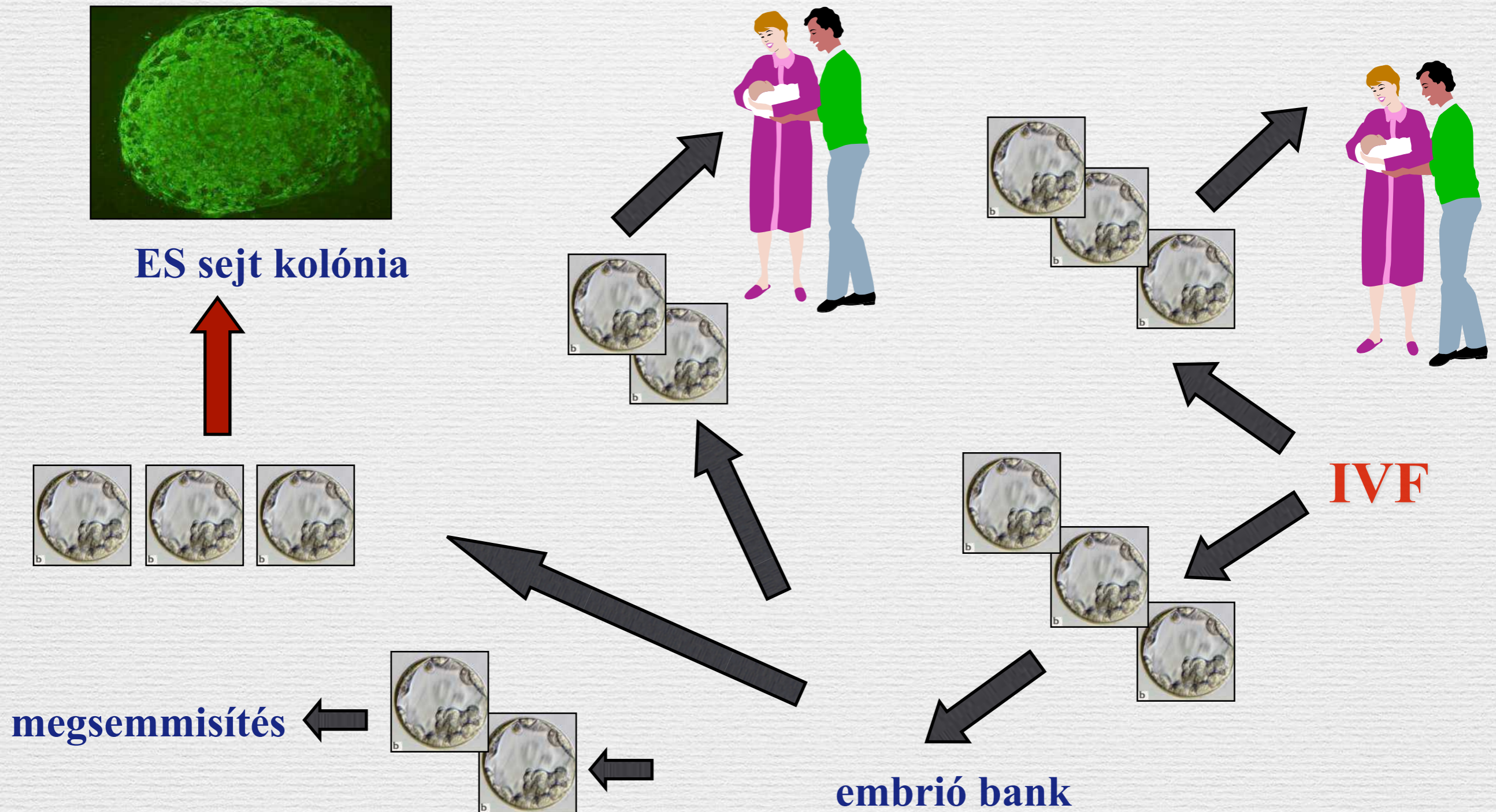
Porcsertés NT/ES/EGonies



Szarvasmarha NT ES/EG

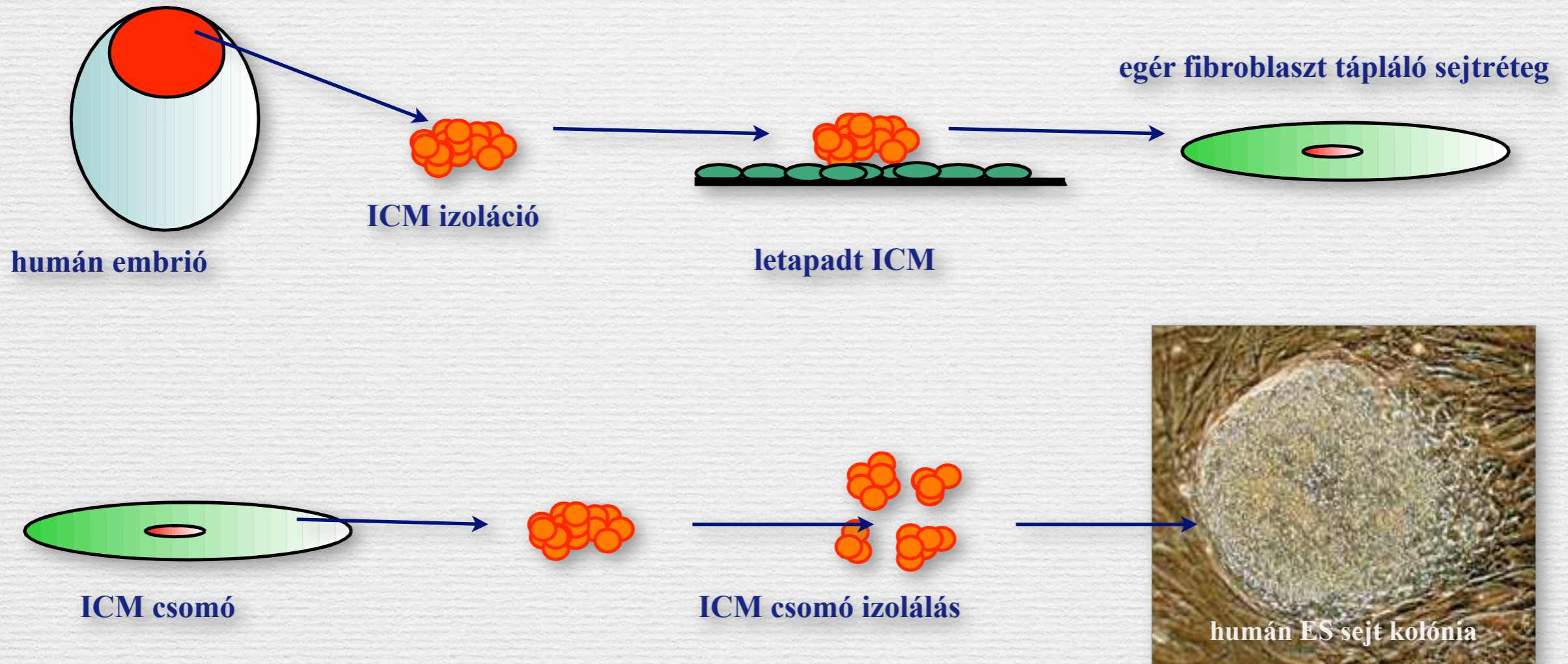


HUMÁN EMBRIONÁLIS ŐSSEJT-VONALAK LÉTREHOZÁSA



92 eddig publikált hESC sejtvonala (2005 nyara)

HUMÁN EMBRIONÁLIS ŐSSEJT-VONALAK LÉTREHOZÁSA



- SSEA-1 negatív, SSEA-3, SSEA-4 pozitív, AP pozitív, Oct4 pozitív, telomeráz pozitív
- bFGF, egér tápláló sejtréteg, aktivin
- nem tripszines passzálás (kis aggregátumokban)
- EB, teratokarcinoma formálás
- Homolog rekombináció, GFP transzgénikus hESC

Humán embrionál

NIH Human Embryonic Stem Cell Registry

Research Using These Lines is Eligible for NIH Funding

The lines listed below are eligible for use in NIH funded research. Those lines that carry disease-specific mutations are noted as such under the line name.

For guidance regarding applications proposing to use hESC see: NIH Guide Notices [NOT-OD-10-020](#) and [NOT-OD-10-029](#).

Eligible Lines: 351 (in 141 Submissions)
Sorted by: NIH Registration Number
Date/Time: 11/16/2015 at 11:50 PM

stemcells.nih.gov

U.S. Department of Health & Human Services

NIH National Institutes of Health
 Turning Discovery Into Health

Home Current Research Stem Cell Research at NIH NIH Stem Cell Unit NIH Stem Cell Unit

STEM CELL INFORMATION

- General Information
- Clinical Trials
- Funding Information
- Current Research
- Policy
- Glossary
- Site Map

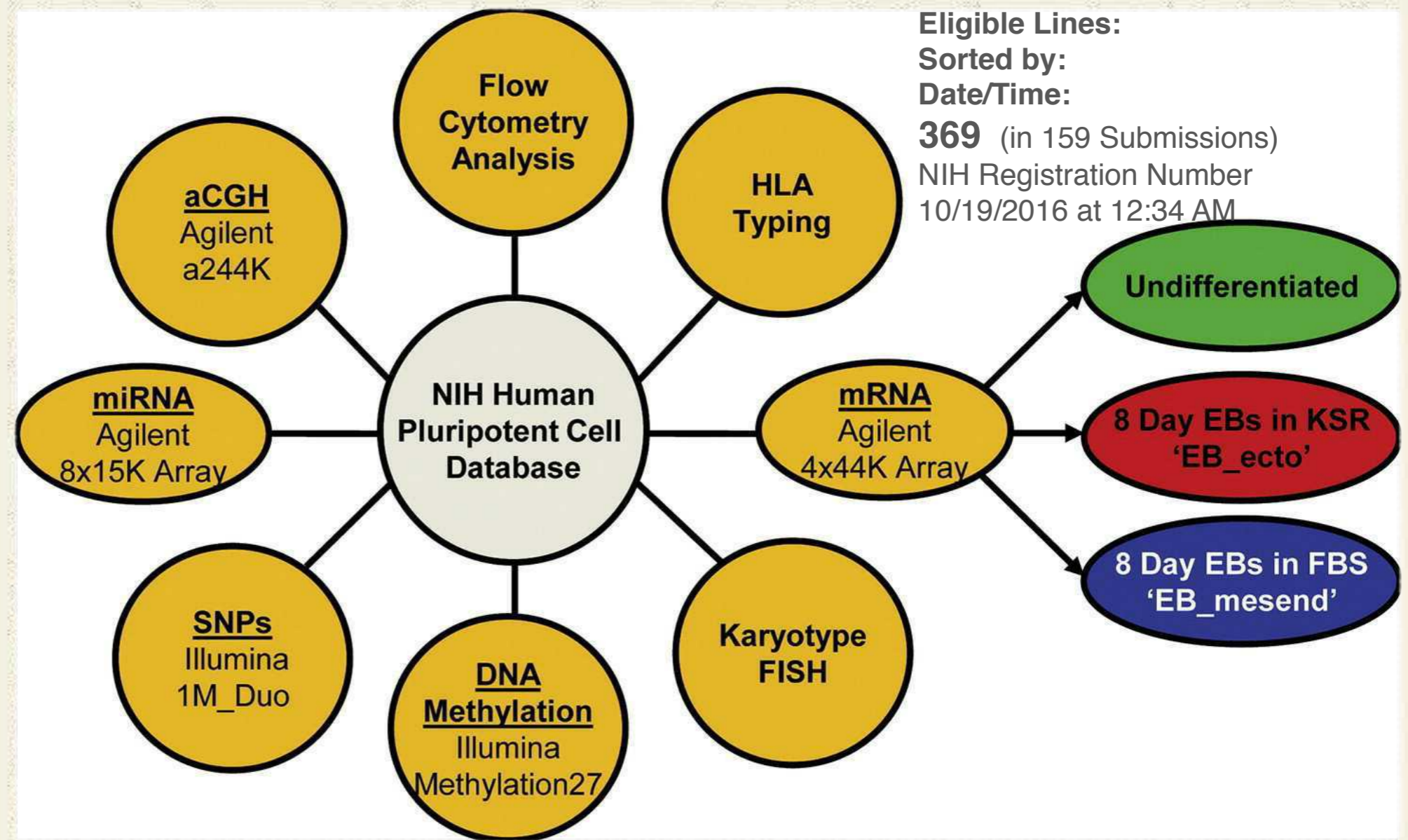
Chen
[consi](#)
 2014

Chen
[insigh](#)
[pluri](#)

Mallo
[embr](#)
 2014



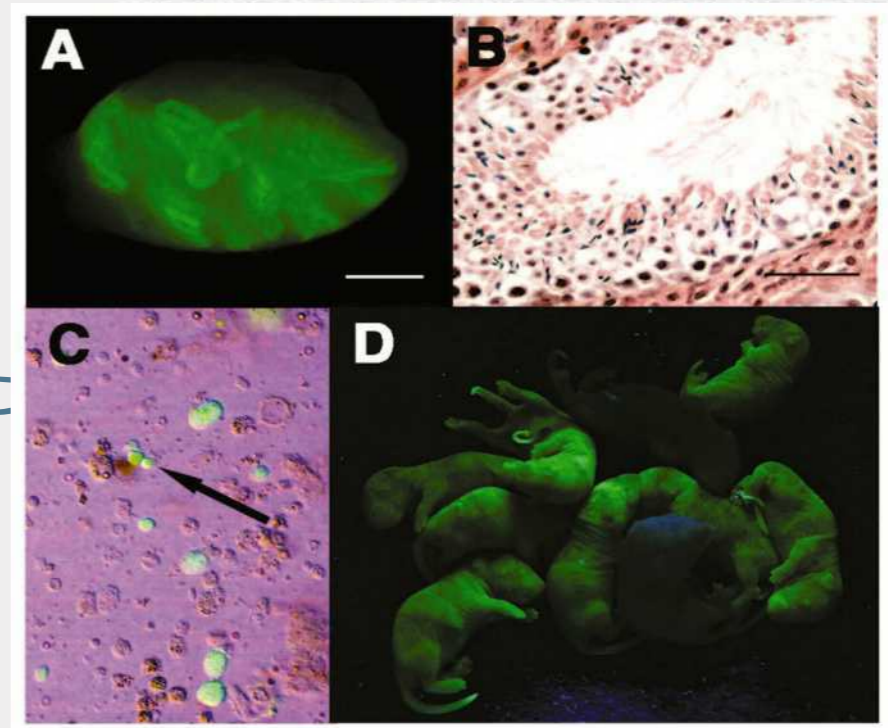
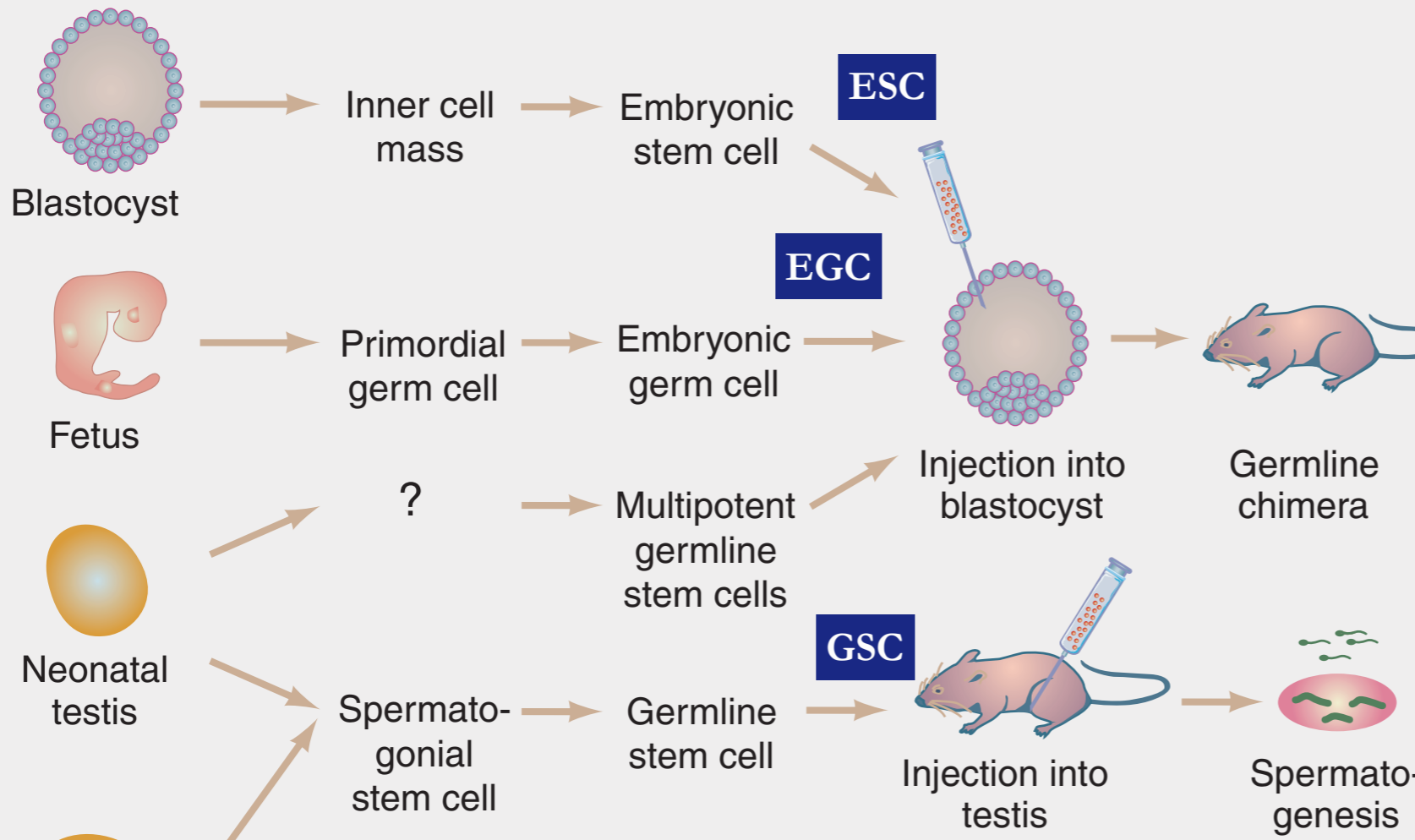
Eligible Lines:
Sorted by:
Date/Time:
369 (in 159 Submissions)
 NIH Registration Number
 10/19/2016 at 12:34 AM



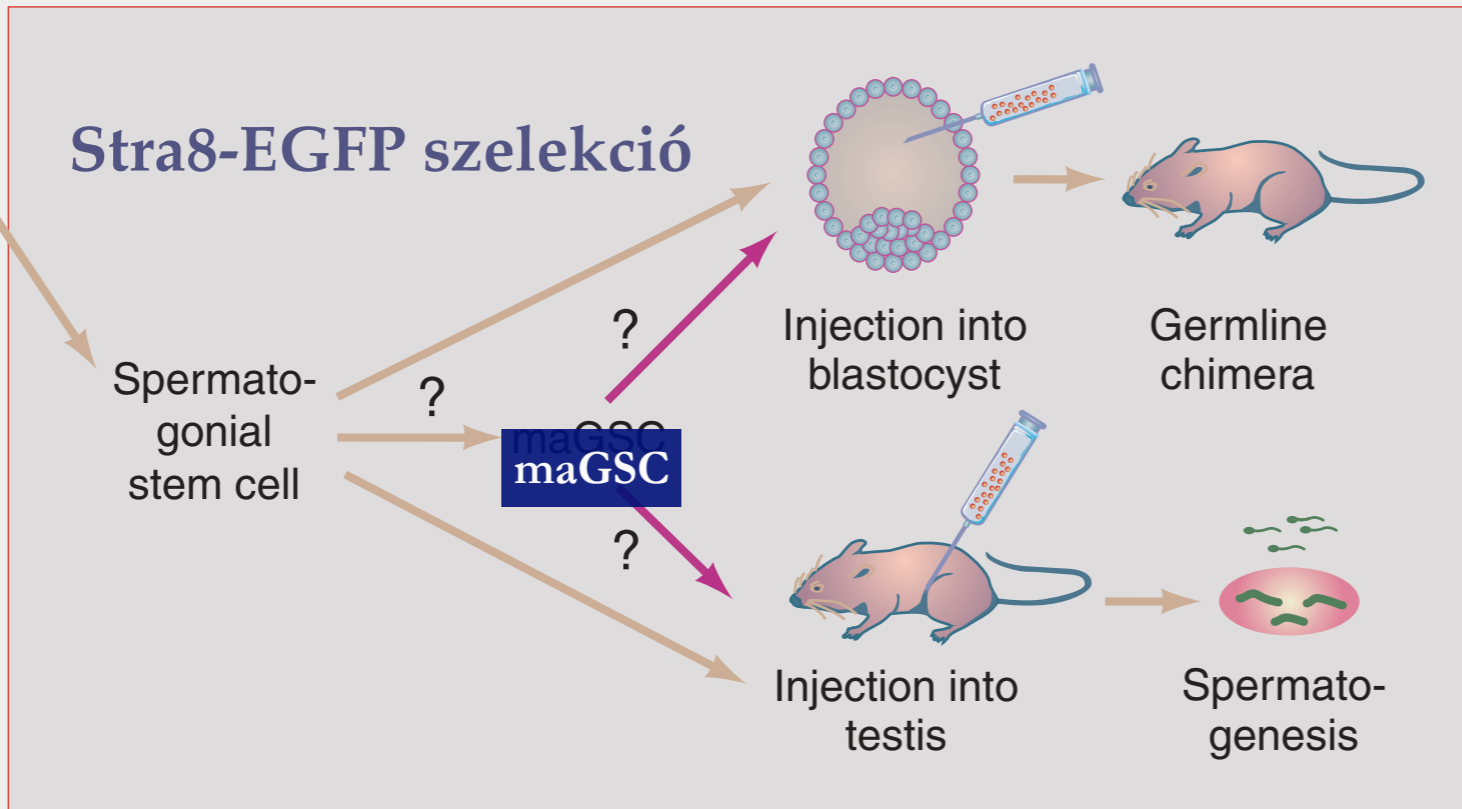
megsemmisítés ←

Őssejt vonalak	EB	Teratoma	kiméra	csíravonalba bejutás
Egér EC sejtek	+	+		
Humán EC	+	+	+	
Egér ES sejtek	+	+	+	+
Patkány ES sejtek	+	+	+	+
Madár ES sejtek	+	+	+	+
Kutya ES sejtek	+	+		
Majom ES sejtek	+	+	+	
Humán ES sejtek	+	+		
Nyúl ES, iPS sejtek	+	+	+	
Egér EG sejtek	+	+	+	+
Humán EG sejtek	+	+		
csirke EG sejtek	+	+	+	+
sertés EG sejtek	+	+	+	+
Egér EpiS sejtek	+	+	-	-
Patkány EpiS sejtek	+	+	-	-
Egér iPS sejtek	+	+	+	+
Humán iPS sejtek	+	+		
Patkány iPS sejtek	+	+	+	+

őssejt vonalak	AP	SSEA-1	SSEA-3	SSEA-4	LIF kiegészítés	bFGF (FGF2) kiegészítés	egyéb kiegészítések
Egér EC sejtek	+	+	-	-			
Humán EC	+	-	+	+			
Egér ES sejtek	+	+	-	-	+	-	
Patkány ES	+	+	-	-	+	-	
Madár ES sejtek	+	+			+	+	SCF
Kutya ES sejtek	+	alacsony	+	+			
Majom ES sejtek	+	-	+	+	-	+	activin
Humán ES	+	-	+	+	-	+	IGF2, activin
Nyúl ES, iPS	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-	4i, activin
Egér EG sejtek	+	+			+	+	SCF
Humán EG	+	-	+	+	+	+	SCF, forskolin
Csirke EG sejtek	+	+			+	+	SCF, IL-11, IGF-1
Sertés EG sejtek	+				+	+	SCF
Egér EpiS sejtek	+	+			-	+	activin
Patkány EpiS	+	+			-	+	activin
Egér iPS sejtek	+	+	-	-	+	-	
Humán iPS	+	-	+	+	-	+	activin
Patkány iPS	+	+	-	-	+	-	



Adult spermatogonial stem cells SSCs (GSC)

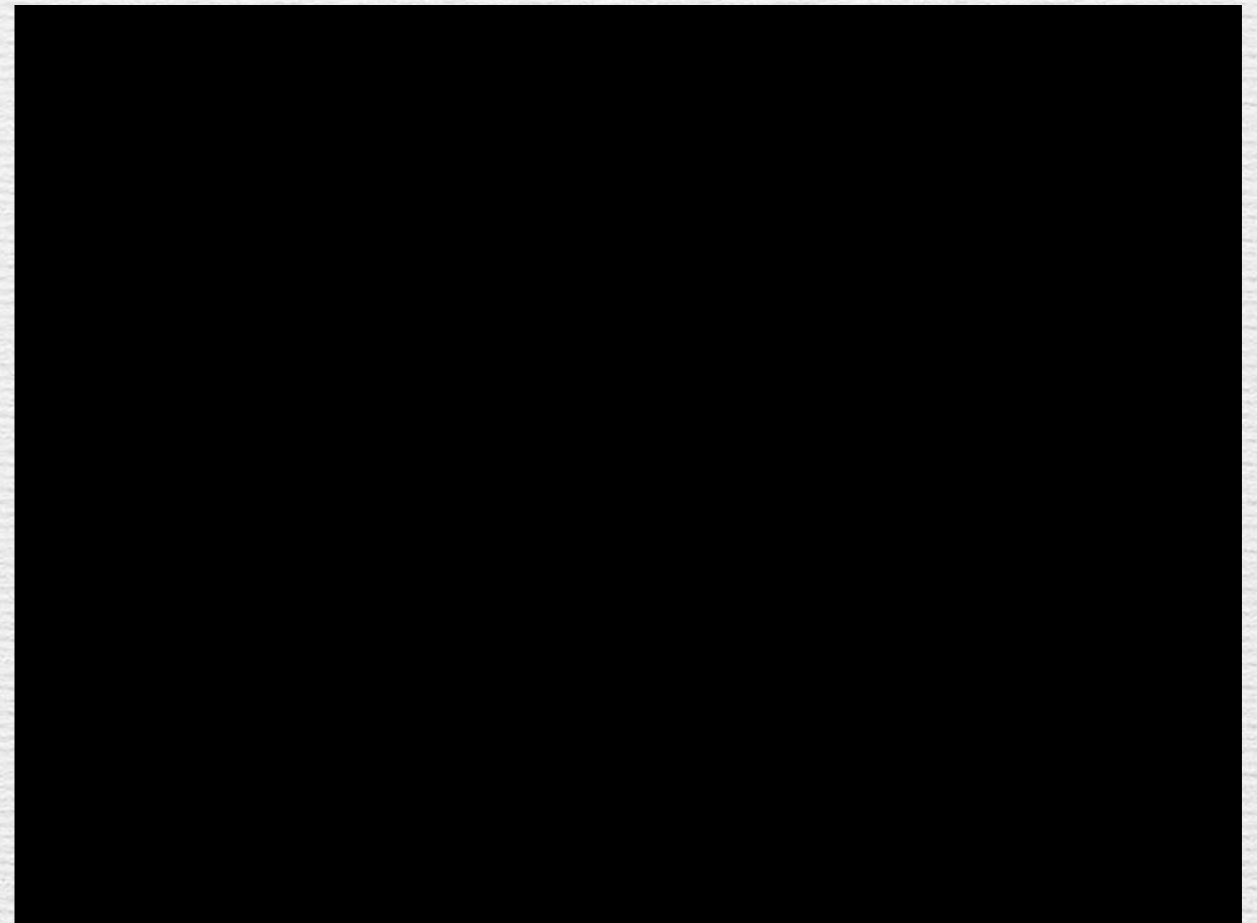


Multipotent adult germline stem cells maGSCs (maGSC)

Bob Crimi

12-12-00 2H Oocyte Enucleation
14:19:47

Sejtmag-átültetési klónozás (NT)



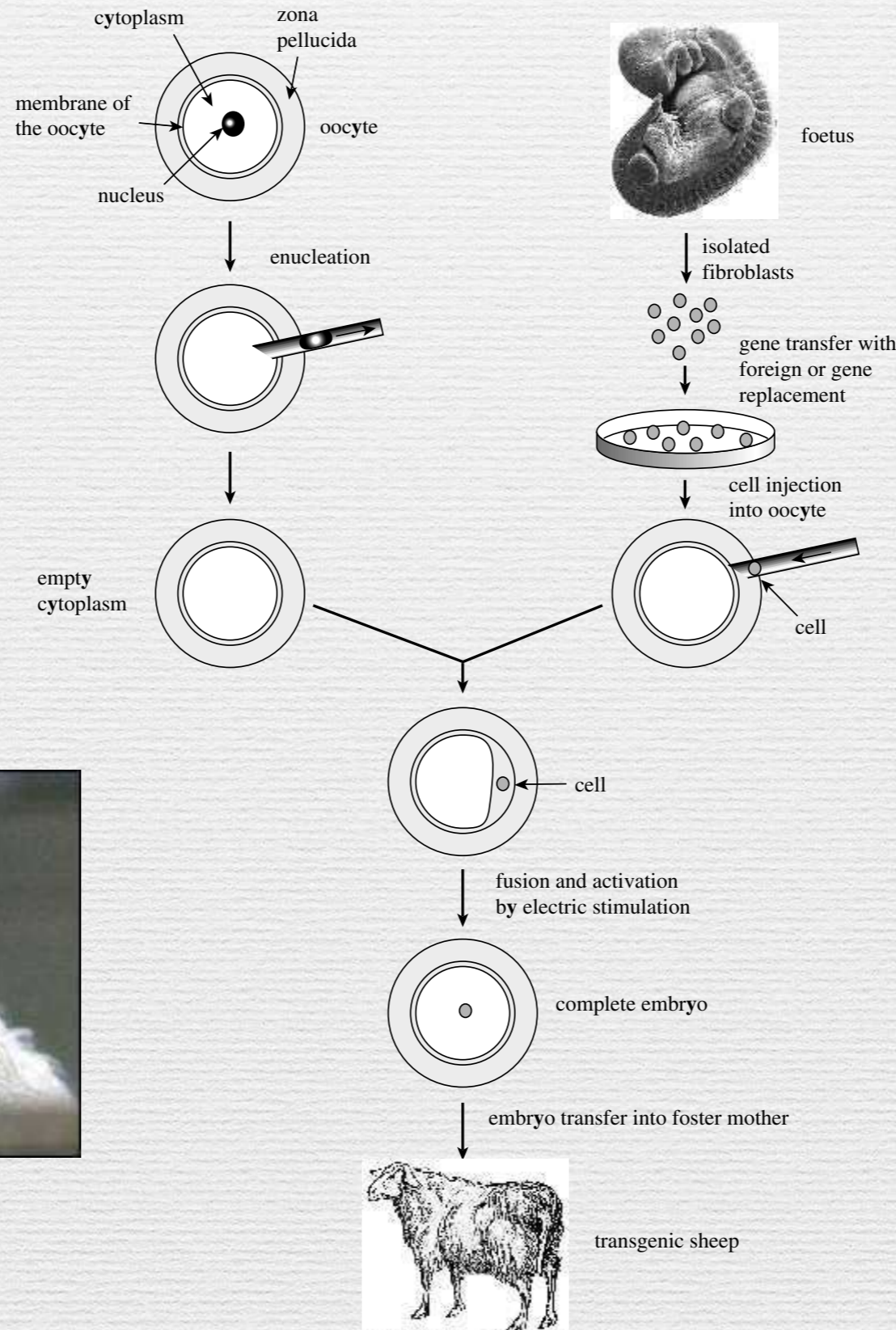
Transzgénikus ES és SC sejtekből sejtmagátültetési klónozással (NT)



emlő mirigy sejtvonal sejt- Dolly

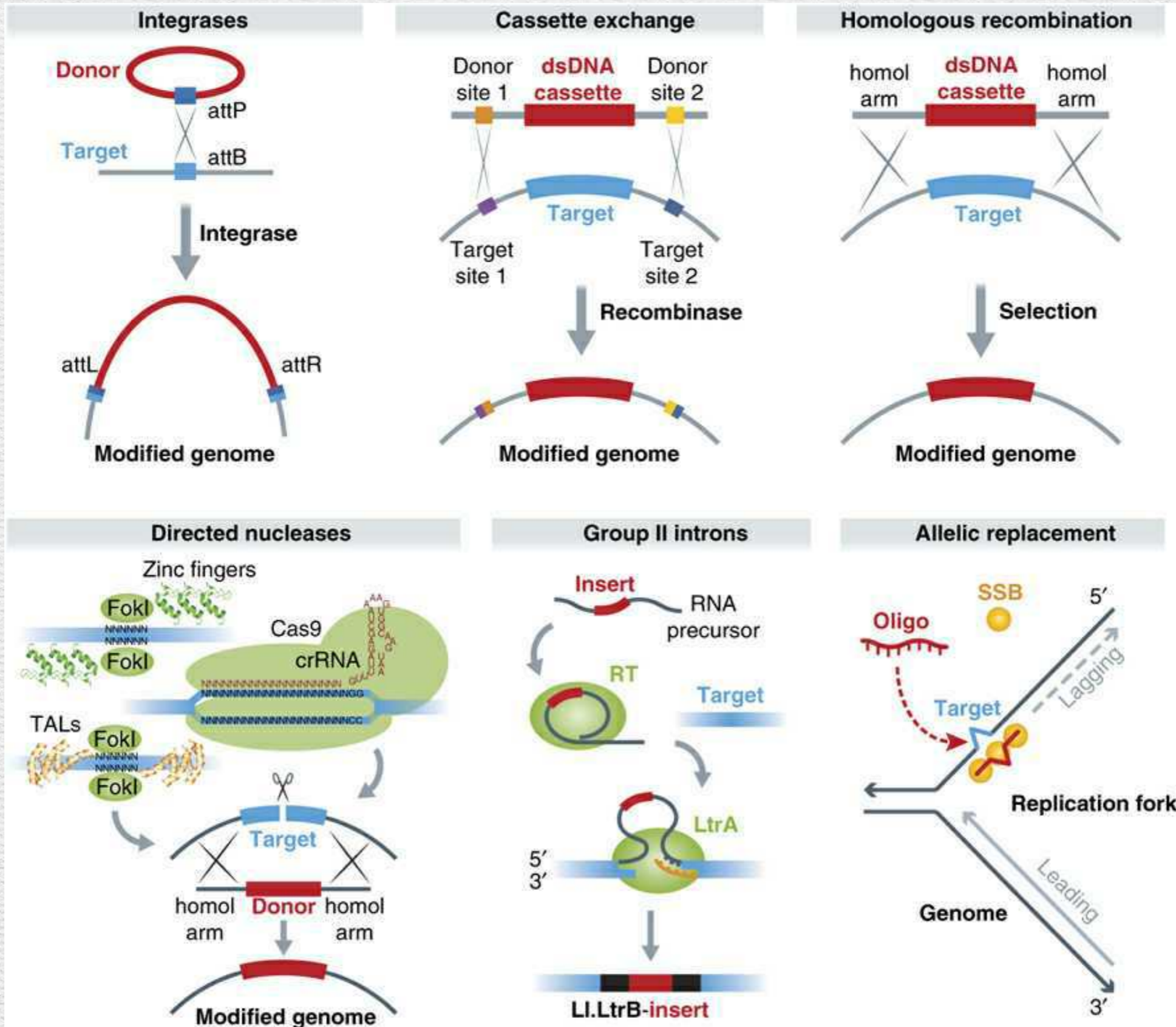


Morgan - ES sejt NT



Annie - első masztitisz rezisztens transzgénikus szarvasmarha (fibroblaszt) (*lysostaphin*)

Genom editálási technológiák



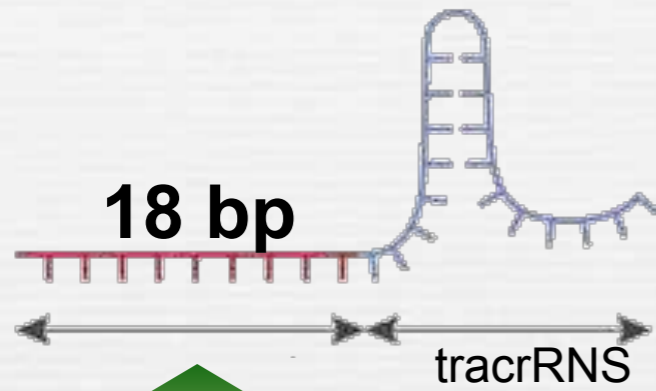
miosztatin mutáció / CRISPR

CRISPR konstrukció

1. Exon

2. Exon

3. Exon

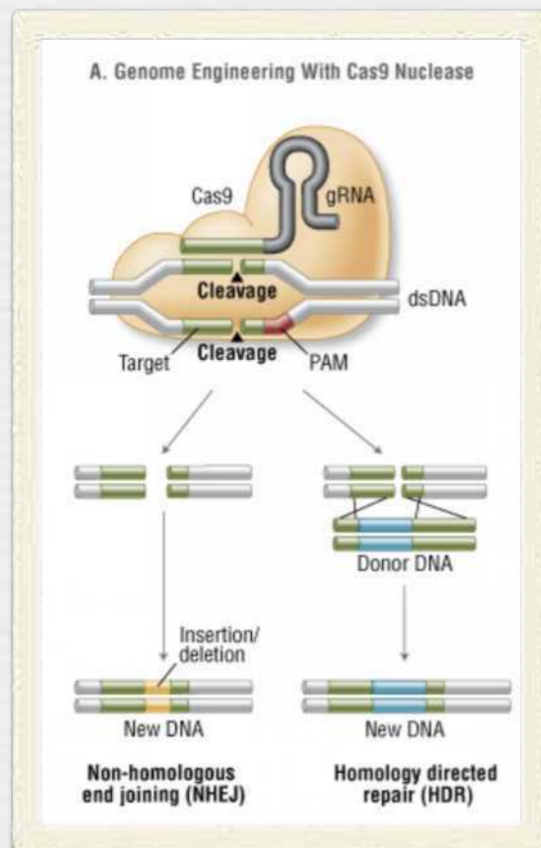


3' – CCTTGTACCGTCTTTCAT – 5'
15 ng/ul sgRNA

Cas9
mRNS
150 ng/ul



Off target helyek
száma:
78
génben:
0



miosztatin mutáns nyúl
(**NAIK,ABC, Hiripi László**)



The work was presented on 5 October at a meeting of the US National Academy of Sciences (NAS) in Washington DC on human gene editing. Geneticist George Church of Harvard Medical School in Boston, Massachusetts, announced that he and colleagues had used the **CRISPR/Cas9 gene-editing technology** to inactivate 62 porcine endogenous retroviruses (PERVs) in pig embryos. These viruses are embedded in all pigs' genomes and cannot be treated or neutralized. **It is feared that they could cause disease** in human transplant recipients.

Church's group also modified more than 20 genes in a separate set of pig embryos, including genes that encode proteins that sit on the surface of pig cells and are known to trigger a human immune response or cause blood clotting. Church declined to reveal the exact genes, however, because the work is as yet unpublished. Eventually, pigs intended for organ transplants would need both these modifications and the PERV deletions.

Preparing for implantation

"This is something I've been wanting to do for almost a decade," Church says. A biotech company that he co-founded to produce pigs for organ transplantation, eGenesis in Boston, is now trying to make the process as cheap as possible.



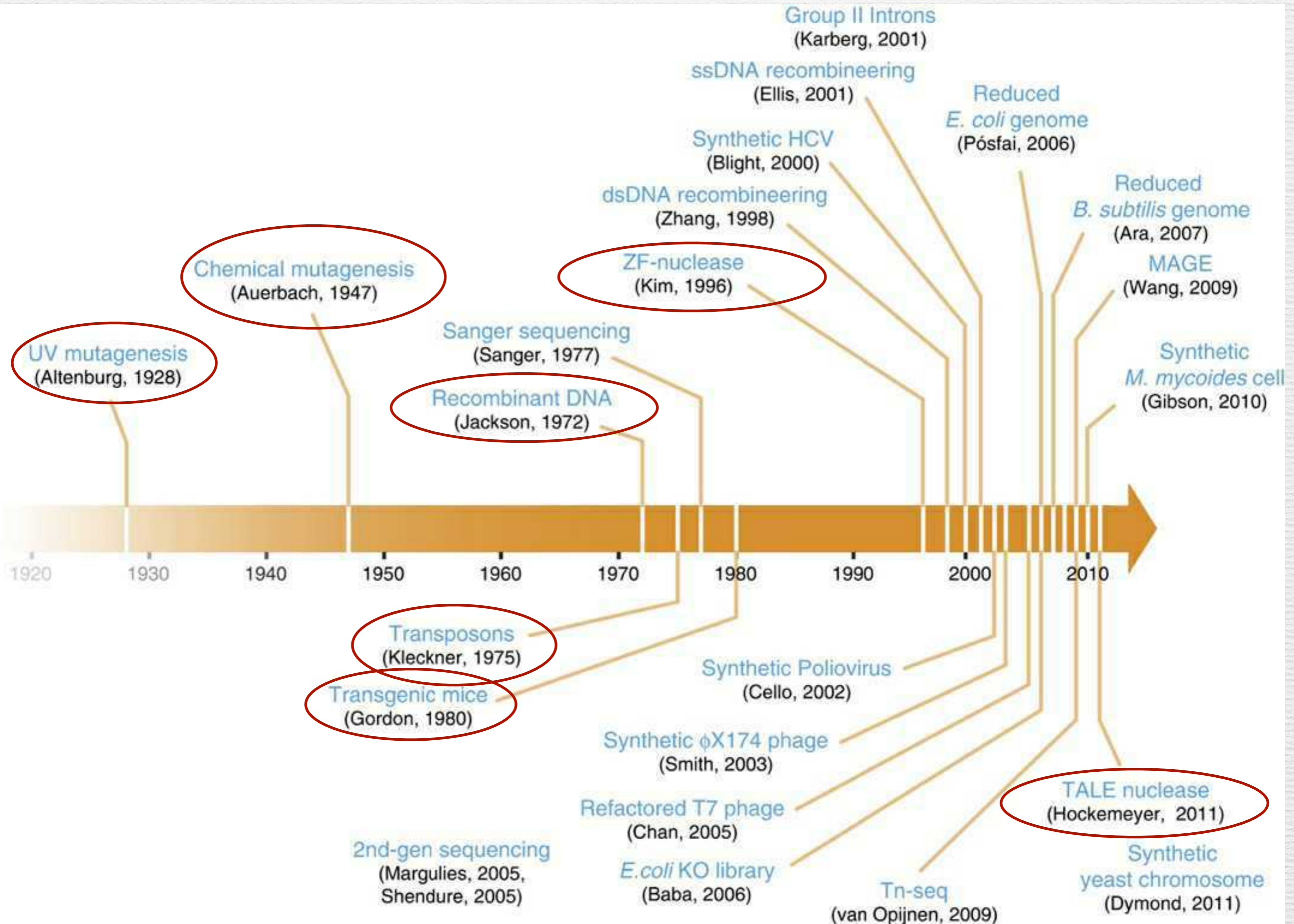
ableimages / Alamy Stock Photo

The gene-edited pigs will be raised in isolation from pathogens.

Transzgénikus állatok előállítási lehetőségei

technika	vektor	célzott sejt	vektor hossza	CÉLZOTT módosítás	hatás fok	technikai nehézség
Mikro-injektálás	DNS	zigóta sejtmagja	50-1000 kb	nem lehet	++	+++
	Vírus	zigóta perivitellináris	5-10 kb	nem lehet	+++	++
	Transzpozon (SB, PB)	zigóta citoplazmája	50-100 kb	nem lehet	+++	++
	ZFN, TALEN, CRISPR/CAS9	zigóta sejtmagja	18 bp célszekvencia	lehetséges	+ +	+++
	Mesterséges kromoszóma	zigóta sejtmagja	100-2000 kb	nem lehet	+	++++
Elektroporálás, liposzóma	DNS	őssejt, testi sejt	100-2000 kb	lehetséges	+++	+
	Vírus		5-10 kb		+++	
	Transzpozon		50-1000 kb		+++	
	Dupla szálú RNS		19-23 bp		++	

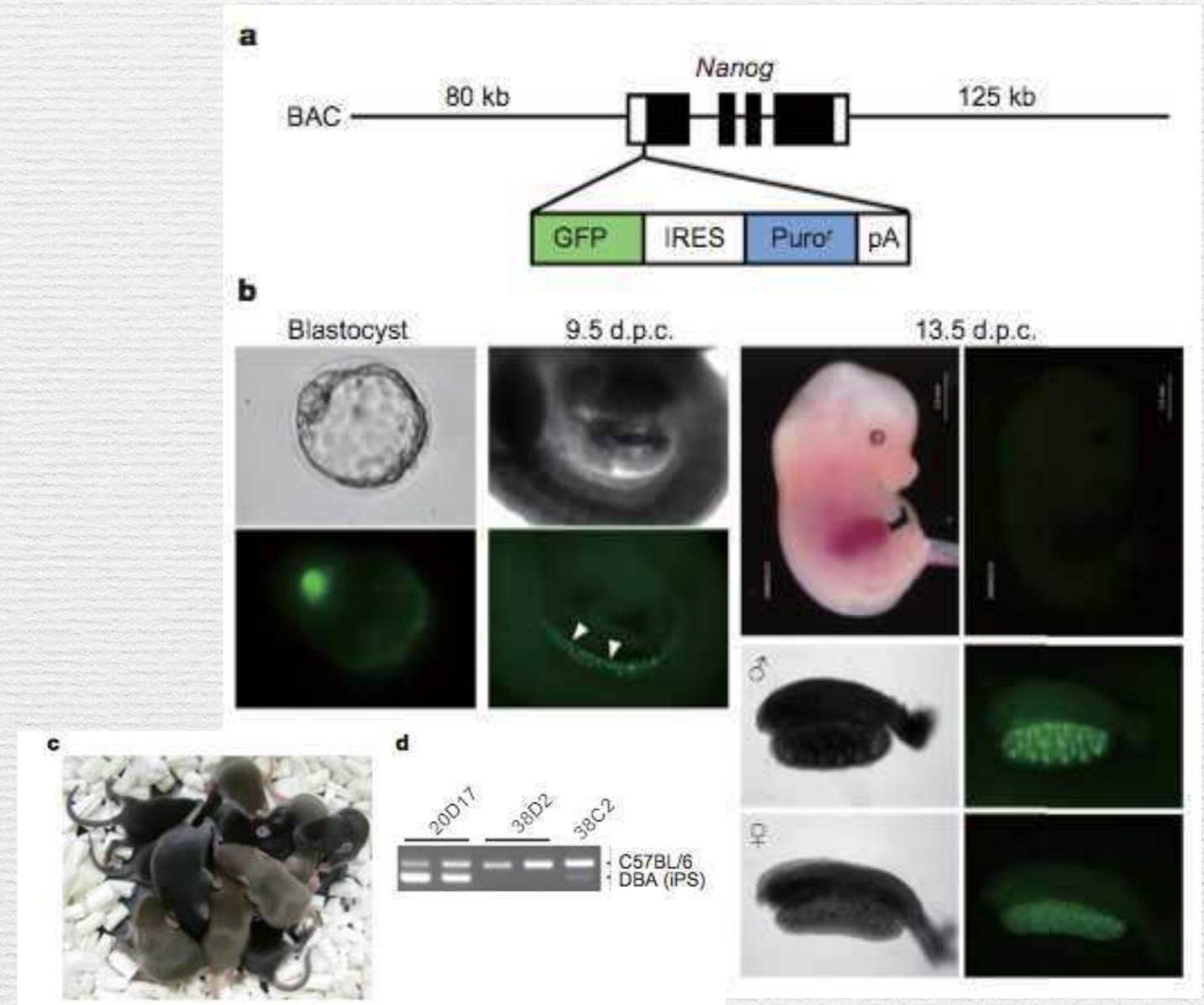
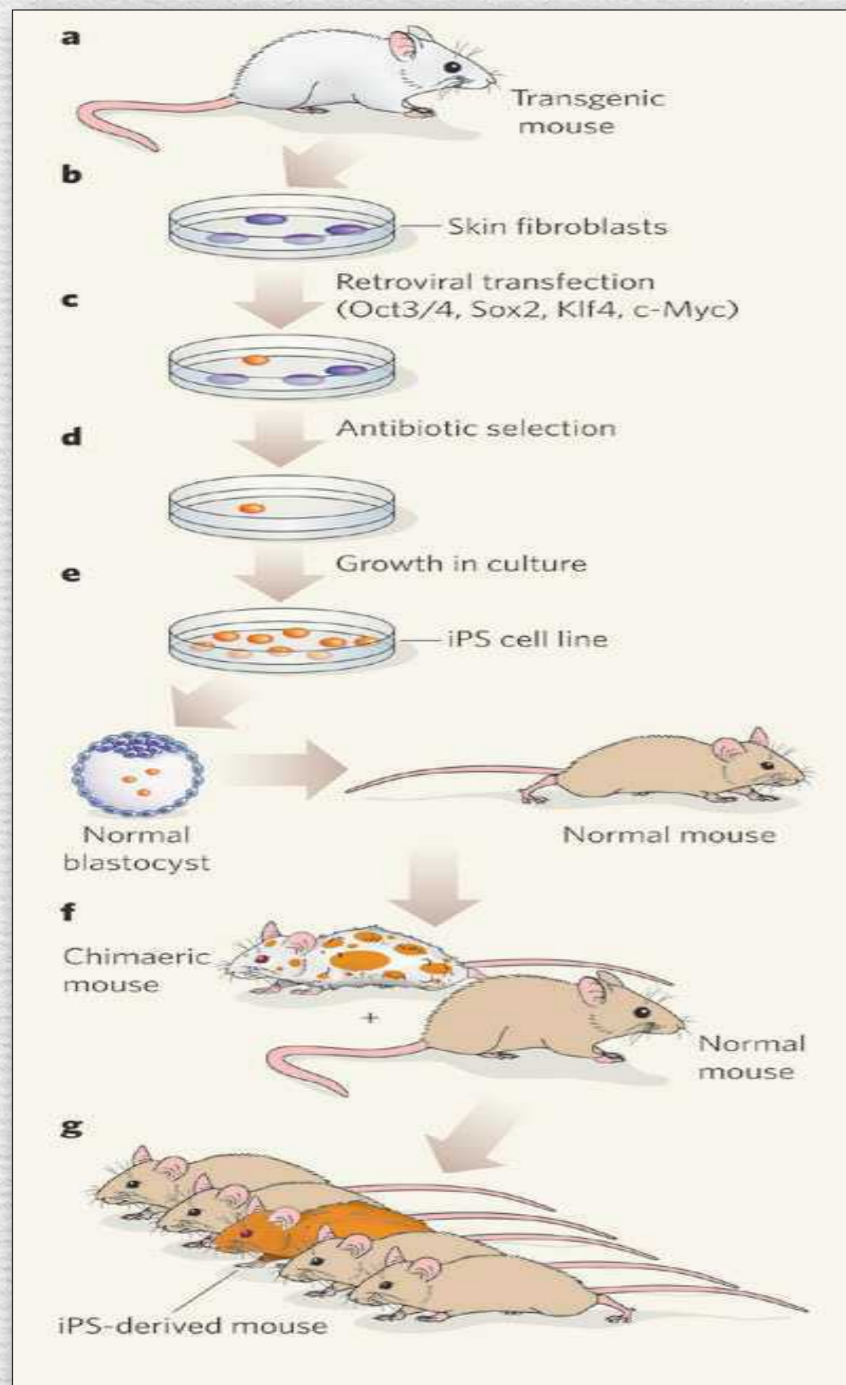
Genom módosítási technológiák



Alternatív lehetőségek embrionális őssejtek létrehozására

h Somatic-cell dedifferentiation

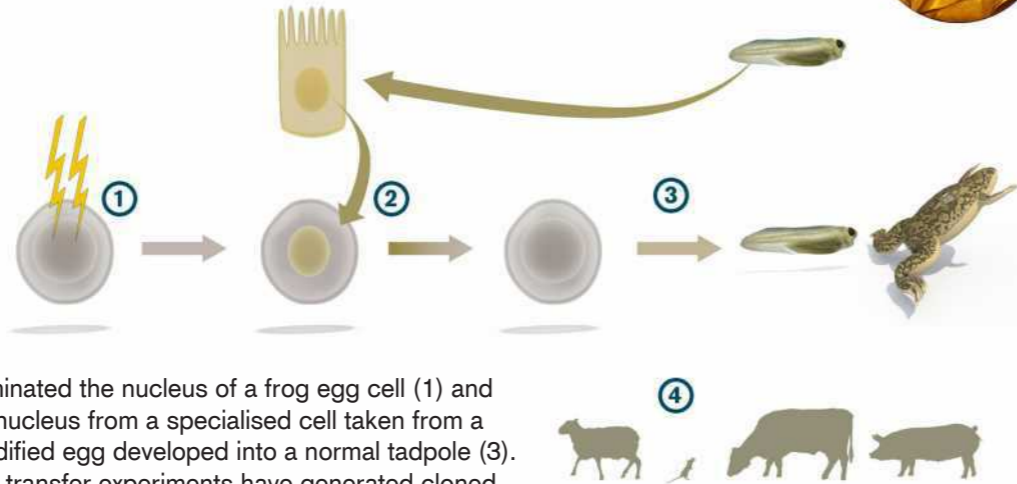
+Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012



John B. Gurdon



John B. Gurdon eliminated the nucleus of a frog egg cell (1) and replaced it with the nucleus from a specialised cell taken from a tadpole (2). The modified egg developed into a normal tadpole (3). Subsequent nuclear transfer experiments have generated cloned mammals (4).

Gurdon, Yamanaka - 2012 Nobel díj!



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012
Sir John B. Gurdon, Shinya Yamanaka

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012

Sir John B. Gurdon

Shinya Yamanaka



Photo; Creative Commons Attr. 2.0
Generic license

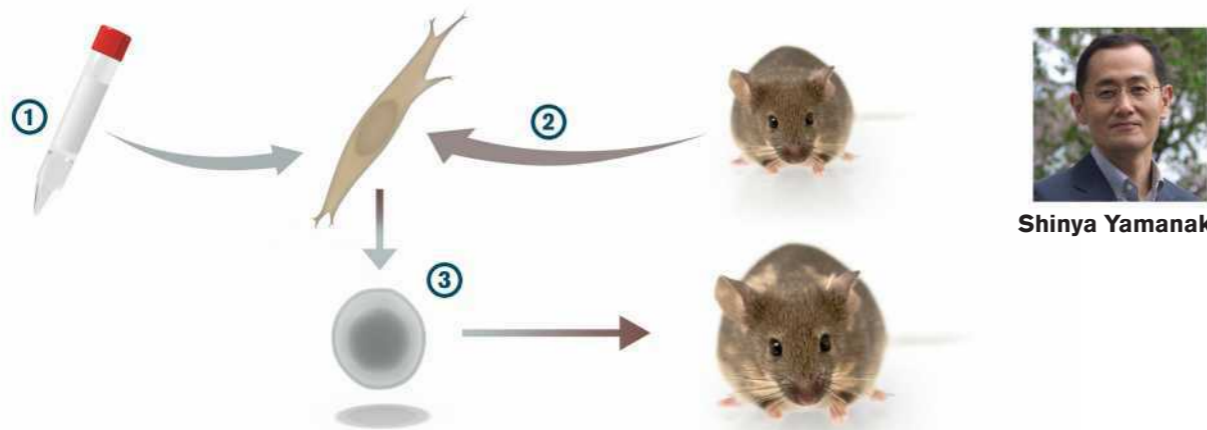
Sir John B. Gurdon



Photo; Creative Commons Attr. 2.0
Generic license

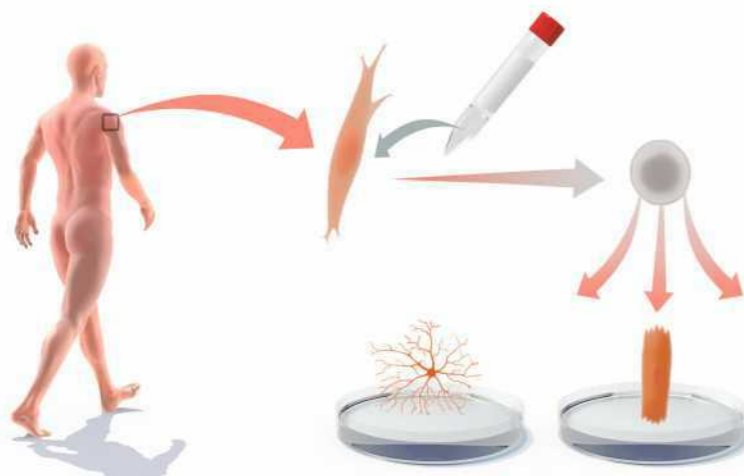
Shinya Yamanaka

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012 was awarded jointly to Sir John B. Gurdon and Shinya Yamanaka *"for the discovery that mature cells can be reprogrammed to become pluripotent"*



Shinya Yamanaka

Shinya Yamanaka studied genes that are important for stem cell function. When he transferred four such genes (1) into cells taken from the skin (2), they were reprogrammed into pluripotent stem cells (3) that could develop into all cell types of an adult mouse. He named these cells induced pluripotent stem (iPS) cells.



iPS cells can now be generated from humans, including patients with disease. Mature cells including nerve, heart and liver cells can be derived from these iPS cells, thereby allowing scientists to study disease mechanisms in new ways.