



SZENT ISTVÁN EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR

**A SZARVASMARHA IgG TRANSZPORTER
FcR_n RECEPTOR EXPRESSZIÓJÁNAK
VIZSGÁLATA IN VIVO TRANSZGÉNIKUS
EGÉRMODELLBEN**

Doktori értekezés tézisei

Bender Balázs

Gödöllő
2009

A doktori iskola

megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Állattenyésztés-tudomány

vezetője: Dr. Mézes Miklós
egyetemi tanár, MTA doktora
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Állattudományi Alapok Intézet, Takarmányozástani Tanszék

témavezető: Dr. Bősze Zsuzsanna
tudományos tanácsadó, MTA doktora
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont
Genetikai Módosítás Program Csoport

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

1. AZ ÉRTEKEZÉS ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

1.1. Előzmények

A szervezetben található immunglobulinok (Ig) közül legjelentősebb és egyben a vérpályában legnagyobb mennyiségben jelenlevő ellenanyag – az IgG – védelmet biztosít vírusok, baktériumok, illetve paraziták fertőzése ellen. Az antigénnel történő kapcsolódását követően allergiás és gyulladásos reakciókat vált ki, amellyel aktiválja az immunsejteket és az extravasatio folyamatával a kívánt szöveti helyre irányítja őket. Az epithel sejtekben expresszálandó IgG-kötő illetve -transzportáló Fc receptornak csak egyetlen típusát ismerjük. Ez a receptor az MHC-I típusú Fc receptor (FcRn), amely különböző epitheliális barrieréken keresztül transzportálja az IgG-t, sőt több állatfajban a maternális immunanyagok átvitelét is megvalósítja. Az FcRn receptor egy heterodimer molekula, amely egy α -láncból és a hozzá másodlagos kötőerőkkel kapcsolódó $\beta 2$ -mikroglobulinból épül fel. Az epithel sejtekben expresszálandó FcRn az IgG transzportban, az endothel sejtekben jelen lévő receptor pedig az IgG homeosztázisában játszik szerepet. Kacs Kovics és munkatársai klónozták a szarvasmarha FcRn α -láncát és Northern blottal több szövetből, köztük a tőgyből és a vékonybélből is kimutatták ezen gén expresszióját (Kacs Kovics et al. 2000). Az emlősállatok összetett folyamatokkal biztosítják az IgG pre- illetve postnatalis transzportját (maternális immunitás) valamint a vér mindenkori magas IgG szintjét. E két folyamat biztosítását a jelenlegi ismereteink szerint az FcRn receptor valósítja meg.

Ahhoz hogy az *in vitro* kísérletekben azonosított szabályozó elemeket, illetve azok *in vivo* szerepét vizsgálni tudjuk, olyan transzgénikus állatmodellt kell létrehoznunk, amely az elméletileg legpontosabb módon másolja le mind a gén szövet- és fejlődésspecifikus kifejeződését, mind pedig a génről átíródó fehérje mennyiségét. A hagyományos transzgén konstrukciókkal létrehozott transzgénikus állatok az ismert szabályozó elemek optimális kombinációja esetében is a döntő többségükben a transzgén integráció helyétől függő génkifejeződést mutatnak, melyhez igen gyakran ektopikus expresszió (olyan szövetben is kifejeződnek ahol az endogén gén nem) és a kópiaszámától függetlenül változó mennyiségű géntermék keletkezése is társul.

Egy olyan gén esetében mint a szarvasmarha FcRn receptor ahol a legfontosabb szabályozó elemekről egyelőre csak korlátozott ismereteink vannak az egyik lehetséges megoldás egy úgynevezett „knock in”, génkicserélt transzgénikus állat létrehozása lenne, melyben az FcRn gén kódoló szakaszát kicserélnék egy könnyen nyomon követhető

indikátor génre. Ebben a transzgénikus szarvasmarhában megpróbálhatnánk választ kapni arra, hogy van-e szabályozó hatású molekuláknak (pl. hormonoknak) olyan kombinációja, mellyel az állatot kezelve szövetspecifikus módon befolyásolni tudjuk az FcRn receptor mennyiségét és/vagy fejlődési szakasztól függő megjelenését. Ilyen típusú szarvasmarhát azonban még senkinek nem sikerült előállítani. Az egér FcRn receptorának ilyen módon történő vizsgálata pedig azért nem volna célszerű, mert a szarvasmarha (általánosabban a kérődző) FcRn receptor vélhetően olyan tulajdonságokkal is rendelkezik, mely az egér (rágcsálók) FcRn receptorára nem jellemzőek. Ebben az esetben tehát az optimális megoldást egy olyan transzgénikus modellállat létrehozása jelenti, amelyben vélhetően teljes expressziós domén biztosítja a szarvasmarha FcRn receptor α -láncát kódoló gén integrációs helytől független, kópiaszámfüggő kifejeződését.

A mesterséges kromoszómák illetve a mesterséges kromoszóma típusú vektorok (YAC, BAC, PAC) alkalmasak nagyméretű genomi fragmentumok befogadására ezért megfelelőek a tervezett transzgénikus egérmodell vektorának. Kísérleteim kezdetekor Magyarországon még nem állítottak elő BAC transzgénikus egeret ezért a tervezett rendszer ebből a szempontból nézve úttörő jelleggel bírt. Mivel az FcRn egy heterodimer molekula hangsúlyoznom kell, hogy a tervezett kísérletben a szarvasmarha nehézlánc és az egér könnyűláncok fogják a receptort felépíteni. Elméletileg felmerült a kérdés, hogy vajon egy ilyen molekula megőrzi-e az eredeti funkcióját és képes lesz-e IgG-t kötni. *In vitro* patkány sejtvonalon kapott előzetes adatok alapján feltételeztük, hogy a szarvasmarha FcRn α -lánc funkcionális receptort képez az egér $\beta 2$ mikroglobulinnal hiszen a patkány és az egér $\beta 2$ mikroglobulinja közötti eltérés jelentéktelennek tűnt. Remélhető volt az is, hogy a receptor kifejeződésével és működésével kapcsolatos, eddig feltáratlan élettani jelenségek pontosabb tanulmányozása is lehetővé válik. A BAC transzgenézis eredményességének és hasznosságának igazolására bemutatom egy, a humán glicin transzporter 1-et kódoló gént (SLC6A9) expresszáló transzgénikus egérvonal előállítását is.

1.2. Az értekezés célkitűzései

- Olyan transzgenikus modellállat előállítása, amelyben *in vivo* tanulmányozni tudjuk a szarvasmarha FcRn receptorának (bFcRn) működését.
- A BAC transzgenikus állatok jellemzése DNS, mRNS és fehérjeszinten, az állatokon megjelenő esetleges élettani eltérések vizsgálata valamint az integrációs helytől független, kópiaszámfüggő génkifejeződés bizonyítása.
- Funkcionális markerrendszer kidolgozása a transzgén működésének igazolásához.
- Kettős transzgenikus egérmodell előállítása a szarvasmarha FcRn receptor közvetlen vizsgálatához.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Génkonstrukció előállítása

A transzgén kiválasztásához három, a szarvasmarha FcRn α -nehézlánc gént (FCGRT) magában foglaló BAC klónt izoláltunk. A 90 α BAC klón egy 2 éves Jersey szarvasmarha limfocitájából izolált BAC könyvtárból származott (Resource Center/Primary database of the German Human Genome Project, www.rzpd.de). A 189H02 és a 128E04 BAC klónokat pedig egy másik független BAC könyvtárból (Eggen et al. Gen. Sel. Evol. 33:543-548. 2001) választottuk ki. A 90 α BAC klónban *Bam*HI, a 189H02 és a 128E04 BAC klónban pedig *Not*I emésztést követő pulse field gélelektroforézissel (BIO-RAD) és Expand Long Template (ELT) PCR módszerrel (Roche) határoztam meg a klónokban lévő genomi DNS méretét illetve az FCGRT gént határoló 5' és 3' szakasz hosszát. A 128E04 BAC klónban sem az 5' sem a 3' határoló szakasz pontos méretét nem sikerült megállapítani. Tekintettel arra, hogy ezzel a módszerrel maximum 20 kb hosszú szakaszt lehet amplifikálni ez azt kellett jelentse, hogy ez a klón mindkét irányban 20 kb-nál nagyobb határoló szakaszt tartalmaz. Mivel az injektálandó konstrukciónak tartalmazni a kellett a bFCGRT teljes α -láncát kódoló szakaszt és legalább 20-70 kb hosszúságú szabályozó régiót 5' és 3' irányban a 90 α klón használatát elvettem mivel az 5' határoló szakasz csak 8,5 kb méretűnek adódott. Az ELT PCR eredményei alapján kiderült, hogy a 189H02 BAC klón kb. 130 kilobázis méretű inzertet hordoz a 128E04 pedig kb. 100 kilobázis nagyságút. Az injektálandó BAC klón pontos méretének meghatározásához későbbiekben a szarvasmarha genomszekvencia adatbázist használtam (www.ncbi.nlm.nih.gov) annak nyilvánosságra kerülését követően. Mivel a

128E04 klón 5' és 3' végének szekvenciájából a kontigok kialakítása miatt megszekvenáltak néhány száz bázispár hosszú szakaszt ezért ezeket a szekvenciadarabokat BLAST-olva a szarvasmarha genomon pontosan meg tudtam határozni a 128E04 BAC klón teljes méretét (102 kb) és megállapítottam a az 5' és 3' határoló szakaszok pontos méretét valamint a gén hosszát (8 kb). A három BAC klón jellemzését követően megállapítottam, hogy a 128E04 BAC klón mind az inzert mind pedig a kifejezteni kívánt gén 5' és 3' határoló szakasz mérete alapján a legmegfelelőbb, ezért a továbbiakban csak ezt a BAC klónt használtam. A 128E04 BAC klónt LB-ben 37 °C-on overnight felnövesztettem, majd Plasmid Maxi Kit-tel (Qiagen) DNS-t tisztítottam a gyártó utasításait betartva. Ezt követően *NotI* restrikciós enzimmel (Promega) emésztettem. A restrikciós fragmentumokat 1%-os PFCA gélben (BIO-RAD) 0,5x TBE pufferben, 14 °C-on 12 órán át tartó PFGE-sel választottam szét (BIO-RAD). Az inzertet 1%-os Low Melting Point gélbe futtattam át. Az átfutott fragmentumot Gelase enzimmel (Epicentre) emésztettem majd Microcon YM50 oszlopon (Millipore) tisztítottam és 1x BAC injektáló pufferrel (10 mM TRIS, 0,1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1x poliamin mix, pH 7,5) eluáltam az injektálandó fragmentumot. Az izolált fragmentum koncentrációját gélelektroforézissel ellenőriztem.

2.2. A BAC transzgénikus egérvonalak előállítása és a transzgén integrációjának vizsgálata

A kísérlethez szükséges egérembriókat 8 hetes FVB/N nőtény egerek szuperovuláltatásával nyertem (Charles River Laboratory). A transzgénikus állatok előállításakor a genetikai manipuláció korai (egysejtés) embrionális korban történt. A mikroinjektálást Nomarski differenciál interferencia kontraszt egységgel és háromdimenziós mozgást biztosító mikromanipulátor karokkal (Narishige, Japán) felszerelt IMT-2 invert mikroszkóppal (Olympus, Japán) végeztem. A mikroinjektálást túlélő embriókat 10 hetes álvemhes CD1 nőtényekbe ültettem vissza. A mikroinjektált embriókból született utódokból mintát vettem és a szövetből tisztított DNS-ben PCR módszerrel vizsgáltam a transzgén jelenlétét. A PCR-hez használt primerek a szarvasmarha FCGRT gén promóterére (fcmprf: 5'-CGG CCA CCT CTA TCA CAT TT-3' fcmpr: 5'-TGC ATT GAC CAC ACT TGG TT-3') és 4. exonjára (bFcRnex4f: 5'-CCA AGT TTG CCC TGA ACG-3' bFcRnex4r: 5'-GTG TGG GCA GGA GTA GAG GA-3') voltak specifikusak. A teljes BAC beépülésének ellenőrzése céljából az injektált klón 5' és 3' végi ismert szekvenciákra primereket terveztem, amelyek – PCR reakciót végezve – alkalmasak a beépült BAC klón épségének kimutatására.

2.3. A transzgén kópiaszámának meghatározása

Az integrálódott transzgén kópiaszámának meghatározását Dr. Bodrogi Lilla által adaptált kvantitatív valós idejű PCR módszerrel végeztem. A PCR-hez szükséges primereket és próbákat az Applied Biosystems primertervező programjával terveztem meg. Viszonyítási pontnak az egér β -aktin gént használtam. Egér genomiális DNS templát segítségével felvettem a kalibrációs görbét a β -aktin génhez. Ezt a görbét használtam a vizsgálatok során a DNS mennyiségének meghatározásához. A vizsgálat során a szarvasmarha FcRn gén (FCGRT) kópiaszámát határoztam meg diploid hemizigóta sejtben. A szarvasmarha FcRn kópiaszámának meghatározásához szükséges kalibrációs görbe felvételéhez kétféle mintát használtam: szarvasmarha genomi DNS-t illetve egér genomi DNS-sel kevert plazmid DNS-t. A kalibrációs görbék alapján határoztam meg a bFcRn gén kópiáinak számát valamint a diploid genom mennyiségét a reakcióba bevitt DNS mennyiségében. A két adatból aránypárral számoltam ki a bFcRn gén kópiaszámát.

2.4. A transzgénikus állatvonalak alapítása és fenntartása

A transzgénikus vonalak alapításához az alapító egyedeket vad típusú egerekkel párosítottam. A megszületett utódok közül a már korábban leírt PCR rendszer segítségével válogattam ki a transzgént hordozó utódokat. Ennek az ún. G1 generációnak a transzgént hordozó egyedek heterozigóták a bFcRn-re nézve. A heterozigóta egyedek egymás közötti párosításával előállított utódokban a transzgén a mendeli szabályoknak megfelelően szegregál, amennyiben a beépülés egyetlen lókuszt érint. A homozigóta jelölt állatokat vad típusú egerekkel párosítottam. Azok az egyedek, amelyeknek minden utóda pozitív volt a transzgénre nézve homozigótának fogadtam el.

2.5. Kettős transzgénikus egérvonalak előállítása

Ahhoz, hogy a transzgénikus egerekben egyidejűleg jelen lévő egér FcRn α -lánc által okozott esetleges interferenciát ki tudjuk zárni, létre kellett hoznom egy kettős transzgénikus egérmodellt. A bFcRn-t hordozó egereket kereszteztem egy egér FcRn hiányos egérvonallal (mFcRn^{-/-}). Ezt a törzset a The Jackson Laboratory-tól szereztem be (<http://jaxmice.jax.org/query/f?p=205:1:12381716879708076363>). A két vonal keresztezéséből származó G2 generáció vonalon belüli párosításából született utódok

alkalmasak a bFcRn közvetlen vizsgálatához. Az utódok genotipizálásához olyan multiplex PCR-t terveztem, amelyben egy PCR reakcióval a mendeli szabályoknak megfelelő, minden lehetséges genotípusos variáció egyértelműen kimutatható (mFcRn, bFcRn, NEO). Ezzel a primerrendszerrel egyértelműen detektálhatók azok az egerek, amelyeknek hiányzik az egér saját FcRn α -lánc de jelen van a szarvasmarha FcRn gén.

2.6. Expresszió vizsgálata RNS szinten

A bFcRn egérvonalak G1 generációjában vizsgáltam a transzgénre specifikus mRNS jelenlétét azokban a szövetekben, ahol eddigi ismereteink szerint a bFcRn receptornak termelődnie kellene. Mivel a BAC transzgenézisnek megfelelően a transzgénikus egerekben a szarvasmarháéval azonos szövet- és fejlődésspecifikus módon fejeződik ki a transzgén a transzgénikus vonalak egy-egy egyedéből máj, vékonybél és laktáló nőstényekből emlőszövet mintákat gyűjtöttem (50 mg) és RT-PCR-rel vizsgáltam a transzgénről képződő mRNS-re specifikus méretű cDNS megjelenését. Totál RNS izoláláshoz a savas guanídium-izothiociánát-fenol-kloroform extrakciós eljárást alkalmaztam (RNA-Bee – RNA isolation reagent, IsoTex Diagnostics, Inc.). Az RT-PCR reakciót Acces RT-PCR System (Promega) kittel és szarvasmarha FcRn α -lánc specifikus primerekkel végeztem. Az RNS minőségének vizsgálatához és az RT-PCR működésének ellenőrzéséhez egér β -aktin primereket használtam.

2.7. A transzgén expressziójának vizsgálata Northern analízissel

A 2.6. pontban leírtak szerint totál RNS-t izoláltam szarvasmarha, vad típusú egér valamint bFcRn transzgénikus egérvonalakból származó egerek májából. 5 μ g totál RNS-t választottam szét 1 %-os formaldehid gélen. A gélen szétválasztott RNS frakciókat Hybond N⁺ membránra (Amersham) vittem át kapilláris blottolási technikával. A próbát a bFCGRT 5. és 7. exonjára tervezett primerekkel szintetizáltattam szarvasmarha tőgy cDNSről majd ³²P-vel jelöltem HexaLabelTM DNA Labeling Kit-tel (Fermentas) a gyártó utasításait követve. 1 óra 65 °C-on történő prehibridizálást követően 65 °C-on 24 órán keresztül PerfectHybTM Plus hibridizációs pufferben (Sigma) hibridizáltam. A próba működőképességét Phosphorimage Analyser Scannerrel (STORM 840, Molecular Dynamics) ellenőriztem majd Fuji röntgenfilmre autoradiográfiát készítettem.

2.8. Kópiaszám függő expresszió bizonyítása Northern blottal

Mivel a BAC transzgenezis egyik nagy előnye a kópiaszámfüggő expresszió ezért feltételeztem, hogy a különböző kópiaszámú transzgénikus egérvonalaink is eltérő módon expresszálják a bFcRn-t. Ennek bizonyítására azonos mennyiségű (5 µg) szarvasmarha, vad típusú egér, 2 bFcRn-kópiás egér és 5 bFcRn kópiás egér májából készült RNS-ből a 2.7. pontban leírtak alapján Northern blot-ot készítettem. A röntgenfilmen detektált jeleket beszkeneltem és Soft Imaging System AnalySYS Pro 3000 képelemző programmal elemeztem a denzitást a felvitt RNS mennyiségek függvényében. A kapott eredményeket MS Excel programmal dolgoztam fel.

2.9. A transzgénről íródó fehérje detektálása Western blottal

Vad típusú egér valamint transzgénikus egérvonalakból származó tüdőmintákból homogenizátumot készítettem. Pozitív kontrollnak szarvasmarha emlőepitheliális sejt vonalat (B4) használtam, amely stabilan expresszálja a bFcRn α -láncát. Az antiszérum CLEWKEPPSMRLKAR szekvenciájú FcRn α -lánc egy részletét tartalmazó oligopeptiddel immunizált új-zélandi nyulakban lett előállítva. A megkötődött elsődleges ellenanyagot peroxidázzal kapcsolt, kecskében előállított anti-nyúl antitesttel (Vector Laboratories, Burlingame, CA) inkubáltam. A megkötődött másodlagos antitestet luminol alapú kemilumineszcenciás szubsztrát oldat hozzáadásával detektáltam. A kemilumineszcens jelek előhívásához Hyperfilm (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) filmet használtam.

2.10. Az injektált BAC klónon található további gének azonosítása

Mivel a BAC klónokban egy ismert faj genomjának bizonyos méretű, összefüggő része található feltételezhető, hogy a célgénünkön kívül más géneket is bejuttattunk a transzgenezis során. Ez a tény felhasználható annak kiderítése érdekében, hogy a 128E04 BAC klónnal injektált transzgénikus egérvonalaimba a teljes méretű BAC beépült-e? A szarvasmarha genomszekvencia adatbázis felhasználásával primereket terveztem a BAC klónon található hipotetikus génekre. A PCR eredményekből következtetni lehet az esetleges letört szakaszok méretére.

2.11. Fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH)

A transzgén kromoszómális elhelyezkedésének vizsgálata érdekében fluoreszcens in situ hibridizációs vizsgálatot végeztem. A kromoszóma preparátumok a TG14 vonal homozigóta 4 kópiás és a TG19 vonal homozigóta 10 kópiás, 13.5 napos embrióinak vinblasztin kezelt fibroblasztjaiból származtak. A további lépések a standard protokollnak megfelelően hipotóniás kezelés majd metanol és ecetsav 3:1 arányú oldatával történő fixálás voltak. A hibridizációhoz a BAC128E04 DNS-t izoláltam és biotin-14-dATP felhasználásával nick-transzlációs módszer segítségével (BioNick Labeling Kit, Invitrogen, USA) jelöltem. A biotinizált próbát denaturáltam és 37 °C-on overnight hibridizáltam a kromoszómakenetre. A jel detektálásához kecskében termeltetett anti-biotin antitestet használtam (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA). A második ellenanyag nyúlban termeltetett fluoresceinnel konjugált anti-kecske IgG volt (Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Netherlands). A kromoszómába történő integrálódás helyét Nikon Eclipse E600 epifluoreszcens mikroszkóppal (Nikon Instruments, Kawasaki, Japan) detektáltam. A dokumentáláshoz Cohu 4912 CCD kamerát és MacProbe 4.3 FISH szoftvert (Applied Imaging, Newcastle upon Tyne, UK) használtam.

2.12. Funkcionális markerrendszer kidolgozása

A szarvasmarha FcRn receptor α -nehézláncából és az egér FcRn receptor β 2 mikroglobulinjából felépülő „hibrid receptor” működőképességének vizsgálatához ismert ellenanyagok kiürülési idejét határoztam meg. A vizsgálatban alkalmazott rendszer azon alapszik, hogy a szarvasmarha FcRn az egér FcRn-nel ellentétben nagy affinitással köti a humán IgG-t. Mind egér IgG-vel mind humán IgG-vel elvégeztem a farmakokinetikai elemzést. A féléletidők mérésének kiszámításához az IgG-k lebomlását reprezentáló kétfázisú görbe adatait használtam.

2.13. *In vivo* LPS injektálás hatása az bFcRn receptor expressziójára

Amennyiben a sejtfelületi receptorokhoz a megfelelő ligand kötődik (LPS, TNF α) úgy a szignálkaskád hatására az I κ B fehérje lebomlik és a felszabaduló NF- κ B transzkripciós faktorok a sejtmagba kerülnek és ott a megfelelő promóter szakaszokhoz kapcsolódva indukálják az adott gént. Ezt bizonyítandó három egymástól független biológiai párhuzamos

csoportot (A, B, C) alakítottam ki 4 kópiás kettős transzgenikus egerekből csoportonként 8 db állattal és 250 µg/100 g LPS-t (SIGMA L-3129) injektáltam i.p.. Az LPS injektálást követően 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 órával mindhárom csoportból egy-egy állatot leöltem és kivettem a májat és a lépét. Minden mintavételi időpontnál minden állatnak rektálisan megmértem a testhőmérsékletét (Multi Thermometer Precision, Roth). Az egerek hőmérsékletének folyamatos követése (csökkenő tendencia) és egyéb tüneteik (borzolt szőr, levertség, étvágytalanság) arra utaltak, hogy az LPS kezelés hatására sepszis alakult ki, melyet a szervek boncoláskori állapota is alátámasztott. Az expresszió változását Northern analízissel és Real-Time PCR-rel detektáltam. Az RNS loadingot és a Northern blot-on kapott jelek denzitását GeneTools From Syngene programmal értékeltem és a kapott értékeket Excel program segítségével ábrázoltam.

2.14. A humán GLYT1 konstrukció előállítás

Az RPCI human BAC library 11 genomi könyvtárból (Children's Hospital Oakland Research Institute, USA) az RP11-107-F21 és RP11-445-G20 jelzésű, a GLYT1 transzporter génjét tartalmazó BAC klónt szereztem be. Az ismert és jól jellemzett szabályozó szakasszal bíró génnek nagy többségében a szabályozó elemek a gén 5' határoló szakaszán helyezkednek el. Ezért arra törekedem, hogy 5' irányban minél nagyobb méretű határoló szakaszt biztosítsak. A transzgenikus egerek előállításának metodikája megegyezik a bFcRn transzgenikus egereknél leírtakkal. Az alapító egyedek azonosításához az alábbi primereket alkalmaztam: GLY1_L: 5'- CTCTGGAGGCTGTGGTTGAG - 3'; GLY1_R: 5'- GTCCACCTACARCGGCATCT - 3'. A kópiaszám meghatározását dot-blot módszerrel végeztem. Próbaként az előbbi primerek segítségével előállított PCR fragmentumot alkalmaztam.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Az állatok létrehozása és a transzgén integrációjának vizsgálata

Előállítottam az injektáláshoz használt a szarvasmarha FcRn receptor α -lánc teljes kódoló szakaszát és a megfelelő határoló régiókat tartalmazó BAC-klónt tartalmazó injektáló oldatot, amellyel 3 transzgénikus egérvonalat hoztam létre (TG9, TG14, TG19). Az alapítók utódai között megjelenő transzgénikus egyedek aránya arra utalt, hogy az alapító egyedek nem mozaikosak. A G1 heterozigóta egyedek egymás közötti párosításából született utódok közel kétharmada transzgénikus a TG14 és a TG19 vonal esetében. A TG9 vonalban több mint 90% körüli (72 összes utód – 67 transzgénikus utód) a transzgénikus egyedek aránya. Ebből arra következtethetünk, hogy ebben a vonalban a transzgén két független kromoszómára is beépült és ez okozza az elméletileg várhatónál magasabb százalékban történő beépülést vagy pedig kettétört a DNS. Ezen tények ismeretében homozigóta transzgénikus egérvonalakat csak a TG14 és a TG19 egereknek kontroll egerekkel, illetve a G2 generáció vonalon belüli keresztezésével alakítottam ki. Az integrálódott transzgén kópiaszámának meghatározását kvantitatív valós idejű PCR módszerrel végeztem. A TG14 vonalban 2 kópia a TG19 vonalban 5 kópia integrálódott a transzgénből.

3.2. Expressziós vizsgálatok RT-PCR-rel

A szarvasmarha pozitív kontroll szervekhez viszonyítva megállapítható, hogy mindhárom alapító vonal (TG9, TG14, TG19) a megfelelő helyen expresszálja a transzgént. Mivel az FcRn α -lánc a vérerek endothelsejtjeiben is kifejeződik ezért ektopikus expressziót nem vizsgáltam, mert értelemszerűen minden olyan szervben kimutatható lett volna az FcRn α -lánc amelyekben erek vannak.

3.3. Kópiaszám függő, integrációs helytől független génkifejeződés bizonyítása Northern analízissel

A BAC transzgénikus módszer legfontosabb előnye az, hogy a nagyméretű DNS szakasz nagy valószínűséggel magában foglalja a vizsgált gén szövet- és fejlődésspecifikus, magas szintű kifejeződéséhez szükséges összes szabályozó elemet. A termelődő mRNS mennyisége ebben az esetben csak a transzgén kópiaszámától függ, de független annak

integrációs helyétől. Vizsgálataim során a kétkópiás vonalban (TG14 heterozigóta) a szarvasmarha endogénnel megegyező mennyiségű bFcRn mRNS-t tudtam kimutatni. Mivel a szarvasmarhában eredetileg is két kópiában van jelen a bFcRn ezért a 4 kópiás (TG14 homozigóta), 5 kópiás (TG19 heterozigóta) és 10 kópiás (TG19 homozigóta) egerek mRNS mennyiségének változása azonos mennyiségű totál RNS felvitele esetén bizonyíthatóan arányos a kópiaszámmal. A Northern eredményeim szerint tehát kimondható, hogy a különböző kópiaszámú transzgenikus egerek a kópiaszámmal arányosan expresszálják a transzgenspecifikus mRNS-t.

3.4. Kópiaszám függő, integrációs helytől független génkifejeződés bizonyítása Western blottal

A TG14 vonal heterozigóta 2 kópiás és a TG19 vonal heterozigóta 5 kópiás egyednek tüdejéből készített fehérjeizolátummal végzett Western blot vizsgálat eredményei szerint a bFcRn transzgén 5 kópiában hordozó egér esetében a kapott jel a kópiaszám függvényében erősebb, mint a bFcRn-t csak két kópiában hordozó állatnál. Mivel a heterozigóta állapotban a két- és ötkópiás állatok két külön vonalból származnak, a Western blot alapján igazolható, hogy a bFcRn transzgén mindkét vonalban fehérjeszinten is kópiaszámfüggően fejeződik ki.

3.5. A transzgén kromoszómára történő beépülésének ellenőrzése FISH módszerrel

A transzgén genomi integrációjának vizuális megjelenítése érdekében fluoreszcens in situ hibridizációt végeztem a TG14 vonal és a TG19 vonal egy-egy homozigóta egyedén. Ezzel a módszerrel bizonyítottam, hogy mindkét egérvonalon egy-egy integrációs helyre de két különböző kromoszómára épült be a bFcRn azaz a fenotípus valóban nem függ a transzgén beépülési helyétől. Ezt a tényt a transzgenikus vonalakon végzett öröklésment vizsgálatok is alátámasztották.

3.6. Kettős transzgenikus egérvonalak előállítása

A szarvasmarha FcRn transzgenikus egereket olyan egértörzsszel kereszteztem, amelyből génkiütéssel eltávolították az egér saját FcRn α -láncának kódoló szakaszát (mFcRn^{-/-}). Az utódok vizsgálata multiplex PCR reakcióval történt. A két egértörzs homozigóta egyedek keresztezéséből származó G1 nemzedékben minden utód hordozza a

bFcRn, a mFcRn és a NEO (marker) géneket. Ezen G1 generáció egyedeinek párosításából származó utódok között kis százalékban már olyan egyedeket találunk, amelyek nem hordozzák az egér saját FcRn α -láncot kódoló gént de a bFGRT gént igen. Az így kapott egerekben mért bármely, az FcRn receptorhoz köthető tulajdonságot a szarvasmarhából átvitt α -lánc fog meghatározni. Ezeket a példányokat kiemelve és továbbtenyésztve homozigóta 4 és 10 kópiás vonalokhoz jutottam (a keresztezés megkezdésekor mind a két BAC transzgénikus homozigóta vonal rendelkezésemre állt). Természetesen a kópiaszámot felezhetjük is a fentiek alapján előállított homozigóta állatok mFcRn KO egerekkel való keresztezésével, így heterozigóta formában 2 és 5 kópiás kettős transzgénikus vonalakkal is végezhetőek fenotípusos vizsgálatok.

3.7. *In vivo* LPS injektálás hatása az bFcRn receptor expressziójára kettős transzgénikus egérmodellen

Az FcRn receptor expressziójának változását az LPS-sel kezelt egerek lépéből izolált RNS Northern hibridizációjával igazoltam. A Northern hibridizációkkal kapott eredményeket Real Time PCR adatokkal is megerősítettem. Mindkét vizsgálati módszer megközelítőleg hasonló trendet hozott az bFcRn expresszió változását mérve. Eredményeim szerint az LPS kezelt transzgénikus egerekben a bovine FcRn mRNS igen gyors indukciója következik be, amely csökkenő amplitúdóval 24 óra alatt megközelíti a kiindulási értéket. Ez az eredmény arra utal, hogy az FcRn molekula expressziójának szabályozásában az NF κ B transzkripció faktor fontos szerepet játszik.

3.8. Funkcionális marker rendszer létrehozása

Az első vizsgálat esetében mIgG injektáltam 4 kópiás (TG14 homozigóta) transzgénikus és vad típusú egerekbe. Megállapítható hogy az injektálást követően a transzgénikus egerek esetében a mIgG kiürülése elhúzódóbb, mint a vad típus esetében. A clearance görbe kétfázisú. Az első (alfa) fázis a mIgG intravasculáris és extravasculáris terek közti egyensúlyi eloszlását mutatja. A második (béta) fázis a mIgG lassú eliminációját reprezentálja. A becsült alfa fázis féléletidők 5 óra elmúltával közel azonosak voltak mind a vad típusú mind a transzgénikus egerekben. Ezzel szemben szignifikáns különbség volt tapasztalható a béta fázisban mérhető féléletidők között ($P < 0,05$). A kétkompartmentes matematikai modellvizsgálat eredményei szerint a béta fázisban a vad típusú egerekben a

mIgG féléletideje $125,4 \pm 3,2$ óra volt, még a transzgénikus állatok esetében ugyan ennél a paraméternél $165,1 \pm 7,8$ óra értéket tapasztaltam.

A második vizsgálatban a bFcRn által nagy affinitással köthető humán IgG-t injektáltam transzgénikus 4 kópiás (TG14 homozigóta) és vad típusú egerek farokvénájába két különböző dózisban. A vizsgálatok szerint a szérumban található hIgG féléletideje bFcRn transzgénikus egerek esetén átlagosan 168 óra volt, a vad típusú egerek esetében ugyan ez az érték csak 105 óra. Eredményeim azt mutatják, hogy a transzgénikus egerek vérében az idő előrehaladtával magasabb humán IgG koncentráció volt kimutatható, mint a vad típusú egereknél azaz 4 kópiás transzgénikus egerekben az IgG életideje szignifikánsan hosszabb mint a vad típus esetében. Ez feltehetően a vérfal endothel sejtjeiben is jelen lévő, a transzgenről termelődő bFcRn receptor hatásának tudható be és azt bizonyítja, hogy a rekombináns szarvasmarha FcRn α -lánc működőképes receptort alkot az egér β 2 mikroglobulinnal.

3.9. A humán GLYT-1 transzportert hordozó egérvonalak előállítása

A mikroinjektálást három sorozatban végeztem. Az első sorozatban 87 egér született meg a mikroinjektált és álvemhes recipiens nőtényekbe ültetett embriókból. Ezek PCR vizsgálatával nem találtunk egyetlen a transzgent hordozó alapító utódot sem. A második sorozatból megszületett és transzgen specifikus PCR-el megvizsgált egerek száma 105 db volt. Ebből egy egér bizonyult transzgénikusnak (TG71). Annak bizonyítására, hogy a TG71 számú alapító egér farok DNS-éből kapott, a várttal megegyező méretű PCR fragmentum valóban a humán GLYT1 gén egy szakaszával azonos, a transzgen PCR terméket izoláltam és direkt PCR fragmentum szekvenálást végeztem rajta. A számítógépes BLAST analízis eredménye szerint a PCR fragmentum szekvenciája 99%-os egybeesést mutat a humán SLC6A9 azaz a GLYT1 gén adatbázisbeli szekvenciájával. Az utolsó injektálási sorozatból született 24 egérből transzgen specifikus PCR-el újabb három alapító egyedét azonosítottam (TG11; TG13; TG18). Mivel nagyobb számú pozitív utóda csak a TG71 alapító egérnek született, ezért csak ebből tudtam transzgénikus vonalat létrehozni. A TG71 vonalhoz tartozó G1 és G2 egerekben az öröklődés megfelel a mendeli szabályoknak.

3.9.1. A transzgén kópiaszámának meghatározása

Az integrálódott transzgén kópiaszámának meghatározásához dot-blot eljárást alkalmaztam. A P-11-445-G20 BAC klón hígítási sorával összehasonlítva a transzgénikus állatokat reprezentáló pöttyöket megállapítottam, hogy a TG71-ben ~2, míg a TG8, TG11 és TG18 heterozigótákban ~1 kópia integrálódott a transzgénből. Ez az eredmény nem magyarázza, hogy miért öröklődik az elméletileg vártnál alacsonyabb arányban a transzgén a TG8, TG11 és TG18 vonalakban.

3.9.2. A beépült transzgén expressziójának vizsgálata

A transzgén beépülés és öröklődés vizsgálatával párhuzamosan RT-PCR-rel ellenőriztem, hogy a humán SLC6A9 (GLYT-1) génről átíródó mRNS kimutatható-e a TG71 vonal G1 heterozigóta egyedében. A TG71 egér minden vizsgált szövetében a humán szövetmintáéval azonos, várt méretű cDNS-t kaptam, ami egyértelműen azt mutatja, hogy a humán SLC6A9 (GLYT-1) gén kifejeződik a transzgénikus egerekben.

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Magyarországon először állítottam elő baktérium alapú mesterséges kromoszóma vektorral (BAC) transzgénikus egeret, mely egyben az első szarvasmarha BAC klónnal előállított transzgénikus egér a világon.
2. Eredményeim alapján bizonyítható, hogy 5' irányban 44 kb, 3' irányban pedig 50 kb hosszúságú szabályozó szakasz megléte elegendő a transzgén endogén génnel megegyező teljes értékű kifejeződéséhez.
3. A BAC transzgénikus egérvonalak kópiaszámfüggően, integrációs helytől függetlenül, szövetspecifikusan expresszálják a szarvasmarha FcRn receptort valamint a transzgén fehérjeszinten is a kópiaszám függvényében fejeződik ki.
4. A kidolgozott fiziológiai markerrendszert bizonyítja, hogy a transzgénről termelődő szarvasmarha α -lánc és az egér saját β 2 mikroglobulinja működőképes, funkcionális heterodimer receptort képez.
5. A bFcRn transzgénről átíródó α -lánc meghosszabbítja a vérben keringő IgG-k féléletidejét.
6. Olyan kettős transzgénikus egérvonalat állítottam elő, amelyben csak a szarvasmarha FcRn receptor van jelen és megállapítottam, hogy *in vivo* LPS hatására a FcRn szarvasmarha mRNS igen gyors indukciója következik be ami arra utal, hogy az FcRn molekula expressziójának szabályozásában az NF κ B transzkripció faktor fontos szerepet játszik.
7. Humán glicintranszporter (GLYT-1) receptort expresszáló transzgénikus egeret hoztam létre BAC transzgenezissel.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A transzgénikus technológiák színrelépésével számos olyan folyamat vált kutathatóvá, amelyeket modellállatok nélkül nem lehetett pontosan vizsgálni. Az embriológia és a rekombináns DNS technika gyors fejlődése tette lehetővé az emlősgenom módosítását. A hagyományos transzgenkonstrukciókkal szemben a mesterséges kromoszóma alapú vektorok integrációs helytől független, kópiaszámfüggő expressziót biztosítanak. Emiatt a BAC transzgenezissel létrehozott állatokban az endogén génnel megegyező szövet- és fejlődésspecifikus kifejeződés tapasztalható függetlenül attól, hogy milyen más emlősből származik a transzgén. A fentiekén kívül BAC transzgénikus állatok alkalmasak a géntől nagy távolságban elhelyezkedő szabályozó elemek vizsgálatára is. A transzgénikus egerek előállításához egy szarvasmarha BAC genomi könyvtárból izolált 102 kb méretű BAC klónt használtam, amely tartalmazza az FcRn receptor α -láncát valamint 5' irányban 44 kb, 3' irányban pedig 50 kb hosszúságú szabályozó régiót. A BAC transzgenézis alkalmazásával olyan modellállatok birtokába juthatunk, amelyekkel egyes gének hatásai közvetlenül vizsgálhatóak.

Az előállított bFcRn transzgénikus egérvonalakban a transzgén terméke a szarvasmarha endogén receptorral azonos szövettípusokban jelenik meg. Ezért ezek az állatok alkalmasak az FcRn receptor, növekvő mennyiségben történő termelődésének következményeinek tanulmányozására. Vizsgálhatóak az FcRn receptor különböző mértékben megnövekedett koncentrációjának következményei azokban a szövettípusokban ahol már tisztázott, hogy mi a szerepe és azon szövetekben is hozzásegíthet a receptor funkciójának megértéséhez, ahol eddig ezt nem sikerült tisztázni. Az általam kialakított kettős transzgénikus egérmodell lehetőséget ad arra, hogy az FcRn α -lánc szabályozásában részt vevő faktorokat *in vivo* vizsgálhassuk. Együttműködő partnereink (Dr. Kacs Kovics Imre munkacsoportja ELTE Immunológiai Tanszék) *in vitro* adatai szerint a bFcRn α -lánc promótere három NF κ B transzkripciós faktor kötőhelyet tartalmaz, melyek indukálhatóak illetve mutációval aktivitásuk megszüntethető. Kísérleteimben az NF κ B faktornak az FcRn gén szabályozásában játszott szerepét *in vivo* bizonyítottam. A kettős transzgénikus egérmodell felhasználható lesz további, szabályozó szerepet játszó hormonok illetve bioaktív vegyületek *in vivo* hatékonyságának és szövetspecifitásának tesztelésére.

Az epitheliochorialis (syndesmochorialis) placentával rendelkező kérődzőknél a maternalis immunitás átadása, vagyis az anyai IgG transzport nem a méhlepényen keresztül, hanem kizárólag a kolosztrum felvételével valósul meg. Ezen folyamat első lépése a tőgy kolosztrumba irányuló IgG szekréciója már régóta ismert. A kettős transzgénikus egérmodell

segítségével tisztázni tudjuk a receptor pontos szerepét az anya és az újszülött közötti IgG transzportban. Eddigi eredmények azt mutatják, hogy a szarvasmarha neonatalis Fc receptor (FcRn) nemcsak a tőgyben, hanem más szervek azon sejtjeiben fejeződik ki, amelyek a nyálkahártya immunvédelmében közreműködő IgG1 szekrécióját biztosítják. További elemzések megerősítették, hogy ez a receptor a szarvasmarha vérér endothel sejtjeiben is kifejeződik és hasonlóan az eddig vizsgált fajokhoz, megakadályozza a keringő IgG gyors lebomlását. Tisztázásra vár, hogy az epithel sejtekben milyen módon történik az IgG transzcitózisa, milyen tényezők befolyásolják a receptor intracelluláris lokalizációját és milyen hatással bír a tőgyszövetben tapasztalt átrendeződés a sejtek IgG transzportjára. Fontos kérdés, hogy milyen faktorok befolyásolják a receptor expresszióját ezekben a sejtekben és hogyan lehetne azt mesterségesen befolyásolni.

Az általam előállított transzgenikus egérvonalak vérében keringő IgG-k féléletideje hosszabb, mint a vad típusú egerekben. Közismert, hogy egyes súlyos vírusfertőzések illetve bakteriális toxinok leküzdésére olyan vérplazma készítményeket injektálnak a beteg szervezetébe, amelyek nagy mennyiségben tartalmaznak ellenanyagokat az adott kórokozóra nézve (például Hepatitis B és veszettség vírusok illetve Botulinus toxin elleni humán immunglobulin preparátumok). Minthogy a más fajból származó idegen molekulák nemkívánatos immunreakciót is kiválthatnak vagyis a szervezetbe a parenterálisan (vénába, izomba, bőr alatti kötőszövetbe) bejuttatott védő ellenanyagokat is idegennek ismeri fel a test és saját ellenanyag-termeléssel igyekszik azokat semlegesíteni. Az ilyen kezelések lehetőleg fajazonos azaz humánterápia esetén emberből származó készítményekkel történhetnek. Ez a korlátozás azonban nem vonatkozik a bélcsatornába juttatott ellenanyagokra, hiszen ezen molekulák innen általában nem kerülnek a vérkeringésbe, tehát nem aktiválják a gazdaszervezet immunrendszerét. Ugyanakkor szinte korlátlan lehetőséget biztosítanak a terápiás beavatkozásra azzal, hogy ezek a molekulák ugyanolyan hatékonysággal, szelektíven képesek azokhoz a struktúrákhoz kapcsolódni, amelyekkel a kórokozó a bélhámsejtekhez kötődik. Igaz ez különösen akkor, ha az ellenanyag-termelő egyed ezt megelőzően egy adott kórokozó elpusztított vagy legyengített változatával immunizáljuk. Minthogy embereket ilyen kezeléseknél későbbi ellenanyag-termelés céljából természetesen nem tehetünk ki, az ilyen módon előállított ellenanyagok kizárólag állatból származhatnak. További előnye az állati eredetű immunglobulin készítményeknek, hogy velük nem terjednek az emberi kórokozók (HIV, hepatitis C, stb.). Jelentős immunglobulin forrás a tehén kolosztruma, amellyel szintén számos kedvező tapasztalat gyűlt össze.

Az immunrendszer a szervezetbe jutott kórokozók leküzdésére ellenanyagot termel és ez a folyamat mesterségesen – védőoltással is – kialakítható. Számos esetben azonban nincs arra lehetőség, hogy egy kórokozó vagy mérgeanyag sokszor életveszélyes hatásaira előre felkészítsük a szervezetet. Ilyenkor az egyén egy másik személyben illetve gyakran állatban „termelt” ellenanyag-terápiában részesül. Arra is van példa, hogy az emberek képtelenek megfelelő mennyiségű ellenanyagot termelni, ilyenkor a tudomány jelenlegi fejlettségi szintjén heti rendszerességgel ellenanyag-terápiában részesülnek és immunglobulinok védik meg szervezetüket a további szövődmények kialakulásától (IVIG terápia). Az ellenanyagok (elsősorban a monoklonális ellenanyagok) terápia alkalmazása a 80-as évek elején kezdődött és mára már kiemelt jelentőségűvé vált. Jelenleg az ellenanyag-piac forgalma körülbelül 23-25 milliárd dollárra becsülhető.

Világszerte mintegy 100 tonna emberi ellenanyagot alkalmaznak évente és a szükséges mennyiség minden évben jelentősen emelkedik (bár ugyanakkor egyre növekvő igény mutatkozik a terápiás, diagnosztikai és *in vitro* kutatásokra is). Ugyanakkor, az emberek véréből nyert ellenanyagok egyre inkább korlátozott mértékben állnak rendelkezésre és folyamatosan fennáll a különböző ismert, illetve még fel nem ismert fertőzések veszélye. Éppen ezért az elmúlt években több olyan cég alakult, amely arra összpontosít, hogy az emberi ellenanyagokat transzgénikus állatokban állítsák elő (ilyen a transzkromoszómális szarvasmarhákkal dolgozó Hematech, a transzgénikus nyulakkal vizsgálatokat végző THP-Roche vagy a transzgénikus sertések előállításán dolgozó Revivacor). Az állati ellenanyagok alkalmazása azonban nem korlátozódik a közvetlen terápiára, hiszen jelentős mértékben használják a kutatásban és a klinikai diagnosztikumban (pl. kórokozók kimutatása) is.

Az állatokban termelt rekombináns ellenanyagok iránt mutatkozó növekvő világpiaci igény ismeretében az MBK és az ELTE kutatói szabadalmi bejelentést tettek (I. Kacs Kovics, Z. Bősze, B. Bender, J. Cervenak, and L. Hiripi. 2007. Transgenic animal with enhanced immune response and method for the preparation thereof. PCT/IB2007/054770). A nemzetközi szabadalmi bejelentés továbbvitelére és hasznosítására jött létre az ImmunoGenes Kft. A PhD dolgozatomban is leírt bFcRN transzgénikus egereket az Immunogenes Kft vezetésével létrejött IGRABBIT konzorcium továbbbra is fontos modellként használja innovatív kutatásaiban.

6. MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

Impakt faktoros közlemények

- Mayer B., Doleschall M., **Bender B.**, Bartyik J., Bősze Zs., Frenyó V. L. and Kacskovics I.: Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) in the bovine mammary gland – J. Dairy Res. 2005. 72 Spec No:107-12. IF.: 1,233
- **Balázs Bender**, Lilla Bodrogi, Balázs Mayer, Zita Schneider, Yaofeng Zhao, Lennart Hammarström, Andre Eggen, Zsuzsanna Bősze, Imre Kacskovics: Position independent and copy-number-related expression of the bovine neonatal Fc receptor α -chain (bFCGRT) in transgenic mice carrying a 102 kb BAC genomic fragment Transgenic Research 2007. 16:613-627. IF.: 2,587

Absztrakt impaktos folyóiratban

- **Bender B.**, Bodrogi L, Zhao YF, Mayer B, Hammarström L, Kacskovics I, Bősze Z (2005) Generation and initial characterisation of bovine FcRn alpha chain BAC transgenic mice, FEBS Journal vol. 272. suppl. 1 IF.: 3,26
- **Bender B.**, Bodrogi L, Zhao YF, Kacskovics I, Hammarström L, Bősze Z (2004) Generation of bovine FcRn alpha chain BAC transgenic mice, Tissue Antigens vol. 64. 374-375 IF.: 1,737
- **Bender B.**, Bodrogi L., Zhao Y., Kacskovics I., Hammarström L., Bősze Zs. Establishing BAC transgenic mouse lines overexpressing bovine FcRn alpha chain. – abstract Transgenic Research 15. 524 2005 IF.: 2,543
- Bodrogi L, Raaben W, Fiechter D, **Bender B.**, Brands R, Seinen W, Bősze Z (2005) Production of human LBK-type alkaline phosphatase in the milk of transgenic rabbits, FEBS Journal vol. 272. suppl. 1 IF.: 3,26
- Baranyi M, Lemos APC, Bodrogi L, **Bender B.**, Szabó L, Hiripi L, Bősze Z (2005) Expression of low-phenylalanine kappa-casein in the milk of transgenic rabbits, FEBS Journal vol. 272. suppl. 1 IF.: 3,26

Egyéb konferencia absztraktok

- **Balázs Bender,** Lilla Bodrogi, Yaofeng Zhao, Imre Kacs Kovics, Lennart Hammarström, Zsuzsanna Bősze: Generation of bovine FcRn alpha chain BAC transgenic mice. 1st International Conference on Basic and Clinical Immunogenomics – 3-7 October 2004 Budapest, Hungary
- **Bender B,** Bodrogi L, Zhao Y, Mayer B, Hiripi L, Hammarstrom L, Kacs Kovics I, Bősze Z (2005) Generation of bovine FcRn alpha chain harboring BAC transgenic mice, Proceedings of the 5th International Conference on Transgenic Animals, Kína
- **Balázs Bender,** Lilla Bodrogi, Balázs Mayer, Yaofeng Zhao, Lennart Hammarström, Andre Eggen Zsuzsanna Bősze, Imre Kacs Kovics: BAC transgenic mouse model to analyze the role of the bovine FcRn in IgG metabolism – II. International Conference on Basic and Clinical Immunogenomics – 8-12. October 2006. Budapest, Hungary
- Bodrogi L, RaabenW, Fichter D, **Bender B,** Brands R, Seinen W, Bősze Z (2005) Feasibility of producing human LBK alkaline phosphatase in the milk of transgenic rabbits, 13th IMP Conference and IMBA Inaugural Conference, Bécs, Ausztria
- Bodrogi L, RaabenW, Fichter D, **Bender B,** Brands R, Seinen W, Bősze Z (2004) Production of recombinant human LBK alkaline phosphatase in transgenic rabbit milk, Physiology and pathology of mammary cell proliferation and death COST B20 meeting, Varsó, Lengyelország
- Baranyi M, Catunda APC, Bodrogi L, **Bender B,** Szabó L, Hiripi L, Bősze Z (2005) Characterization of recombinant low-phenylalanine kappa-casein produced by transgenic rabbits, Satellite meeting of the 30th FEBS congress and 9th IUBMB Conference, Dubrovnik, Horvátország
- Hiripi L, Baranyi M, Carnwath JW, Niemann H, Bodrogi L, Raaben W, Brands, Seinen W, Lemos APC, **Bender B,** Szabó L, Bősze Z (2005) Transgenic rabbits as models for producing biologically active human recombinant proteins, Proceedings of the 5th International Conference on Transgenic Animals, Kína
- **Bender B.,** Bodrogi L., Cervenak J., Schneider Z., Mayer B., Zhao Y., Hammarstrom L., Eggen A., Bosze Z. & Kacs Kovics I. (2007) The role of the neonatal Fc receptor in IgG catabolism and homeostasis: IgG metabolism in bovine FcRn transgenic mice. In: 8th International Veterinary Immunology Symposium (ed. by Santos IKFdM), p. 43, Ouro Preto, Brasil.

Magyar cikk

- **Bender Balázs**, Bodrogi Lilla, Mayer Balázs, Yaofeng Zao, Lennart Hammarström, Bősze Zsuzsanna, Kacs Kovics Imre: BAC transzgénikus egerek előállítása a szarvasmarha FcRn alfa lánc funkciójának és működésének vizsgálatához – Állattenyésztés és takarmányozás különszám 2006. 55.
- Bősze Zs., **Bender B.**, Baranyi M., Harsányi I., Catunda A.P., Kacs Kovics I., Németh V., Bartyik J., A tejösszetétel módosítása molekuláris genetikai módszerekkel. Állattenyésztés és takarmányozás 53. 465-475. 2004.
- Kacs Kovics I., Mayer B., Kis Z., Doleschall M., Bősze Z., **Bender B.** Az IgG transzportját és katabolizmusát szabályozó FcRn génregulációs elemzések szarvasmarhában Magyar Tudomány 2005/6.
- Cervenak Judit, **Bender Balázs**, Magna Melinda, Schneider Zita, Erdei Anna, Bősze Zsuzsanna, Kacs Kovics Imre: Az IgG-kötő FcRn fokozott expressziója jelentősen növeli az immunizálás hatékonyságát – Magyar Immunológia 2007. 4.

Szabadalom

- I. Kacs Kovics, Z. Bősze, **B. Bender**, J. Cervenak and L. Hiripi. 2007. Transgenic animal with enhanced immune response and method for the preparation thereof. PCT/IB2007/054770

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozat elkészítéséhez szükséges kísérleteket a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban, a SZIE Állatorvostudományi Karának Élettani és Biokémiai Tanszékén valamint az ELTE Immunológiai Tanszékén végeztem.

Köszönöm Dr. Nagy Ferencnek és Dr. Kiss György Botondnak az MBK volt és jelenlegi főigazgatóinak, hogy lehetővé tették a dolgozat elkészítését.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Bősze Zsuzsannának valamint Dr. Kacs Kovics Imrének a hosszúra nyúlt munkám során nyújtott folyamatos és nélkülözhetetlen segítségükért.

Hálával tartozom Dr. Hiripi Lászlónak, Dr. Baranyi Máriának, Dr. Góczy Elennek, Dr. Bodrogi Lillának, Dr. Ana Paula Catunda Lemosnak, Dr. Szabó Lászlónak, Grófné Marikának és az egész Genetikai Módosítás Program csoportnak a kísérletekben nyújtott segítségükért. Sokat köszönhetek Dr. Mayer Balásznak, Dr. Doleschell Mártonnak és Cervenak Juditnak az immunológiai kísérletekben nyújtott segítségükért valamint Dr. Hársing Lászlónak a GLYT-1 transzgenikus egérmodell tervezésében való közreműködéséért.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Bárdos Lászlónak és a SZIE MKK Állat-életteni és Állat-egészségtani Tanszéknek munkám során tanúsított önzetlen segítségükért.

Külön köszönettel tartozom szüleimnek és családomnak akik végig mellettem álltak és bíztak abban, hogy eljutok idáig.

Munkám anyagi fedezetét az alábbi pályázatok biztosították: CALVES05 (OMFB-00176/2006), IGRABBIT (OM-00118/2008), EGIS KF-29/2006

