

MEZŐGAZDASÁGI
BIOTECHNOLÓGIAI
KUTATÓINTÉZET



ALKALMAZOTT EMBRIOLÓGIA ÉS
ŐSSEJTKUTATÓ CSOPORT

Dr Gócza Elen, DSc
csoportvezető, tudományos tanácsadó

[http://www.abc.hu/hu/intezetek/allatbiotechnologiai-szekcio/
alkalmazott-embriologia-es-ossejt-kutato-csoport.html](http://www.abc.hu/hu/intezetek/allatbiotechnologiai-szekcio/alkalmazott-embriologia-es-ossejt-kutato-csoport.html)

Embriológiai kutatások

OH, GOD...

klónozás

iker kutatások

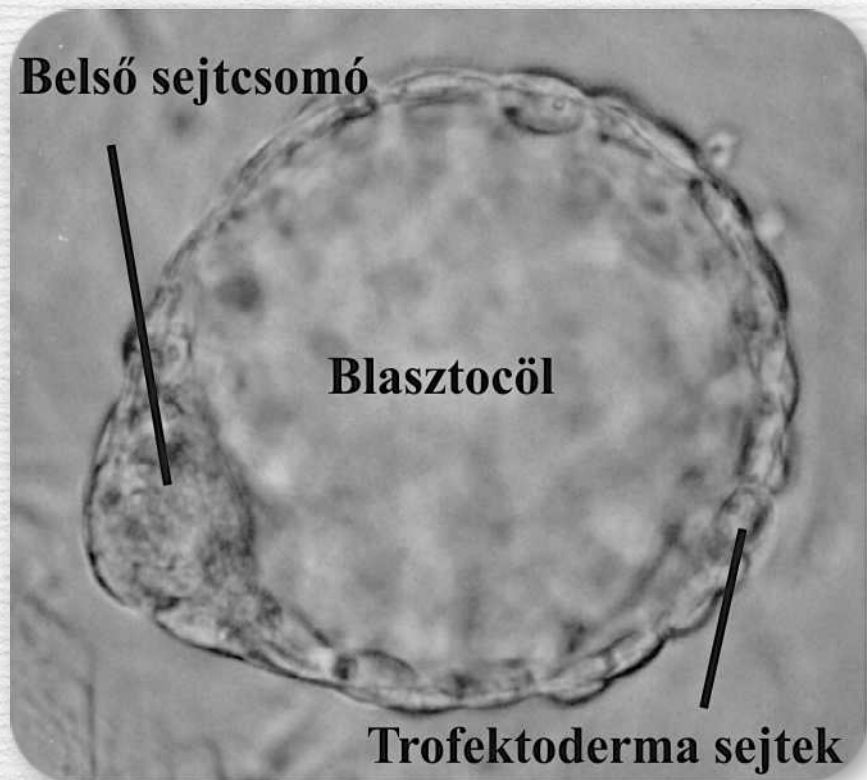
YES?

transzgenezis

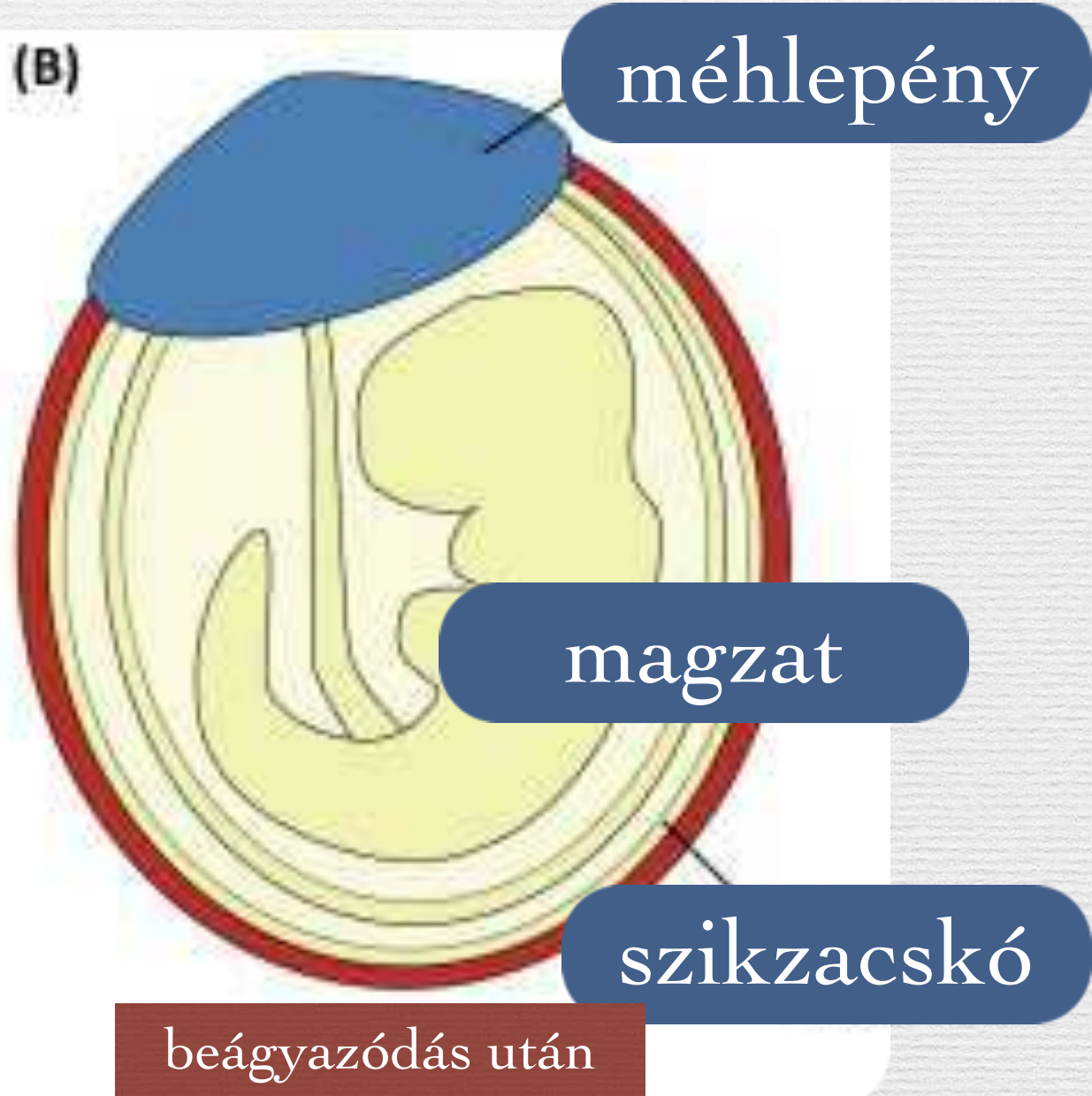
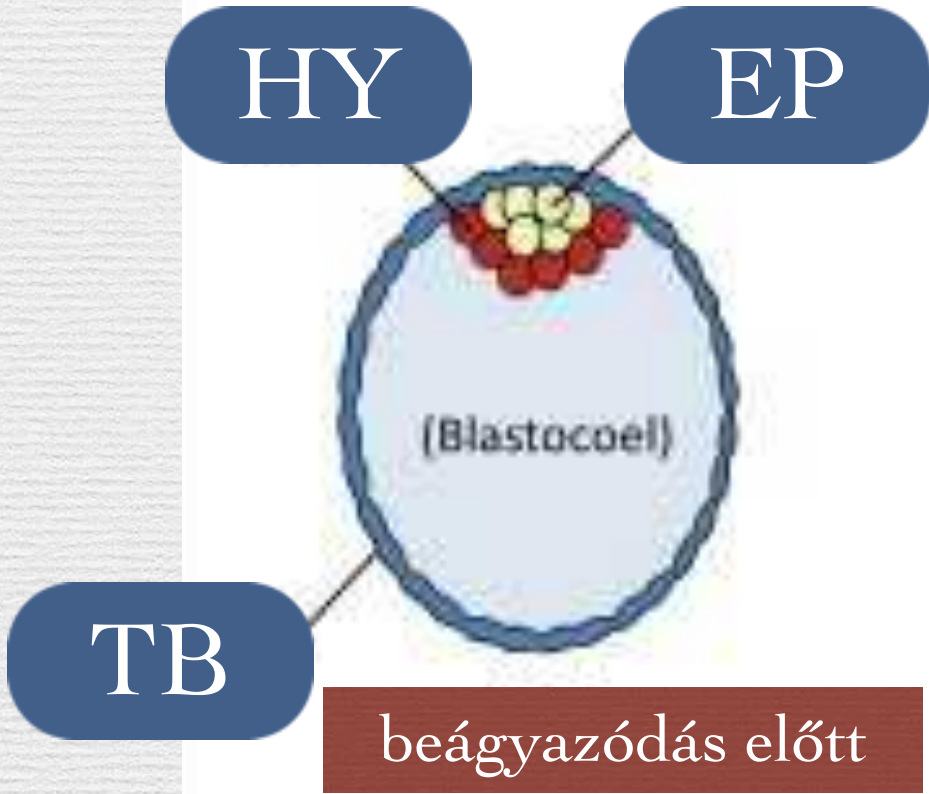
kimérák

őssejtek



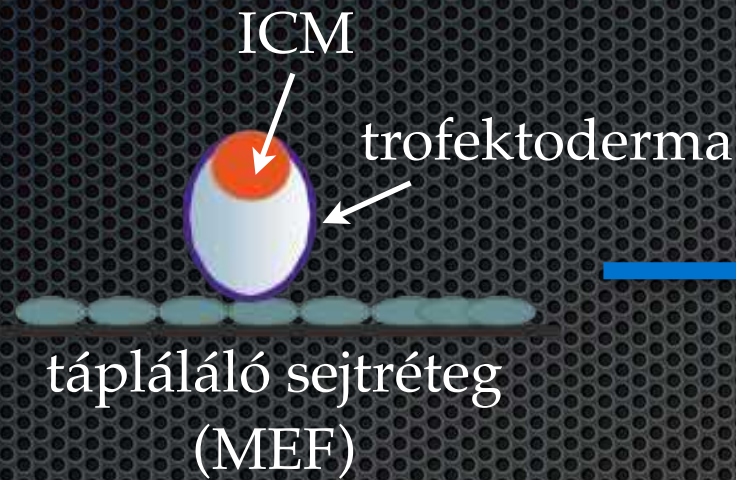
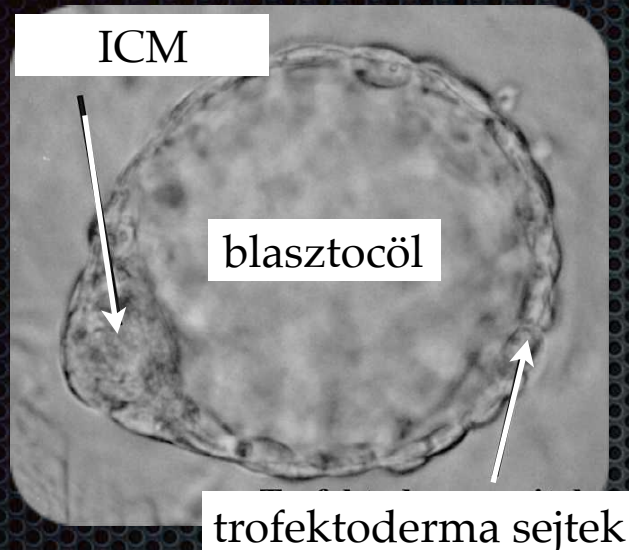


Egér embriók fejlődése

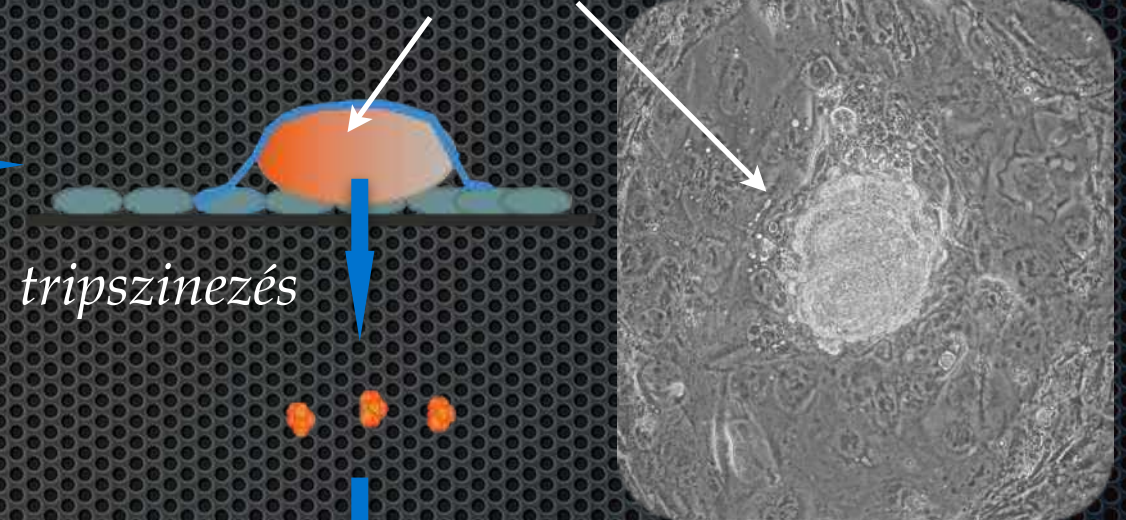


Pluripotens embrionális eredetű egér őssejt vonal (mESC)

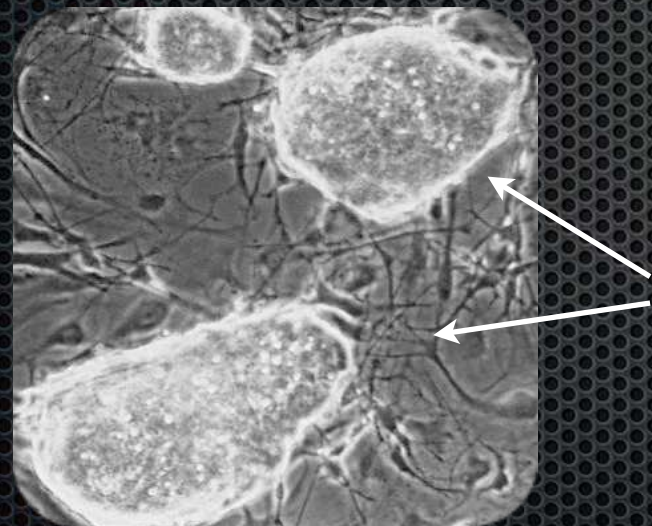
egér blasztociszta



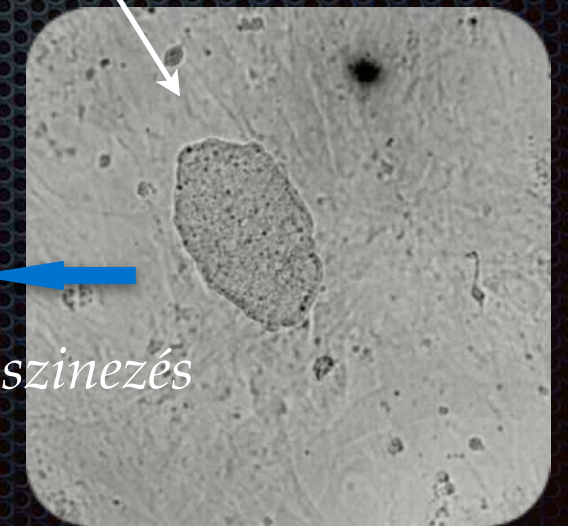
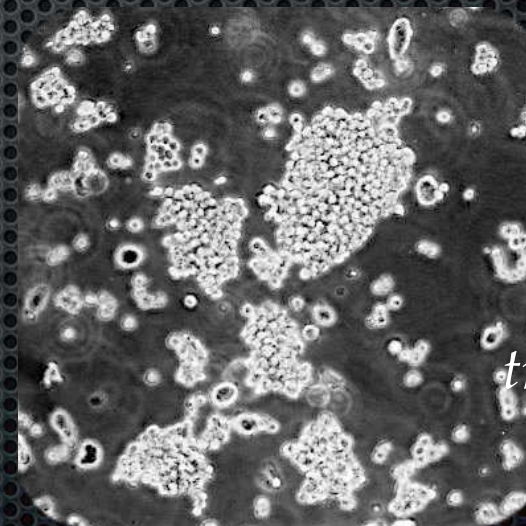
letapadt ICM csomó



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

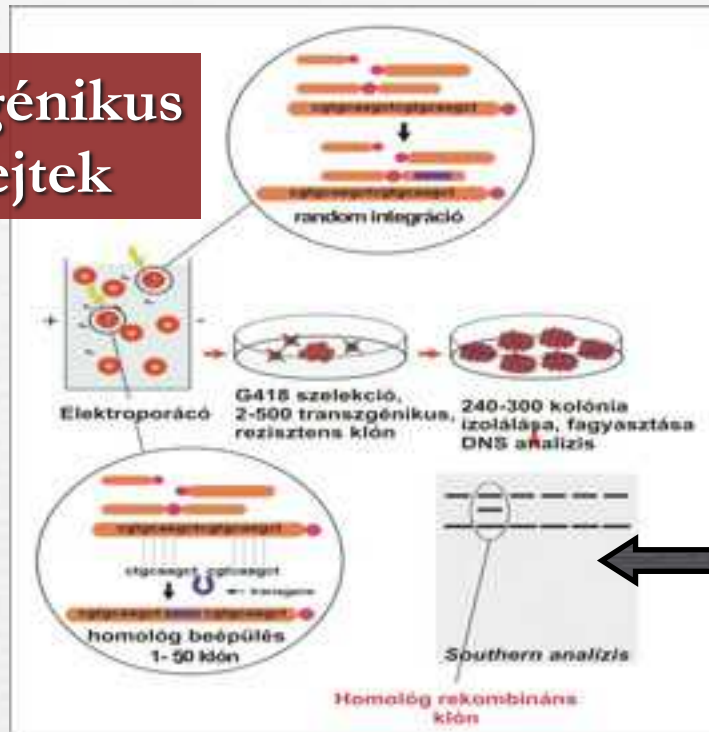


ES sejt vonal

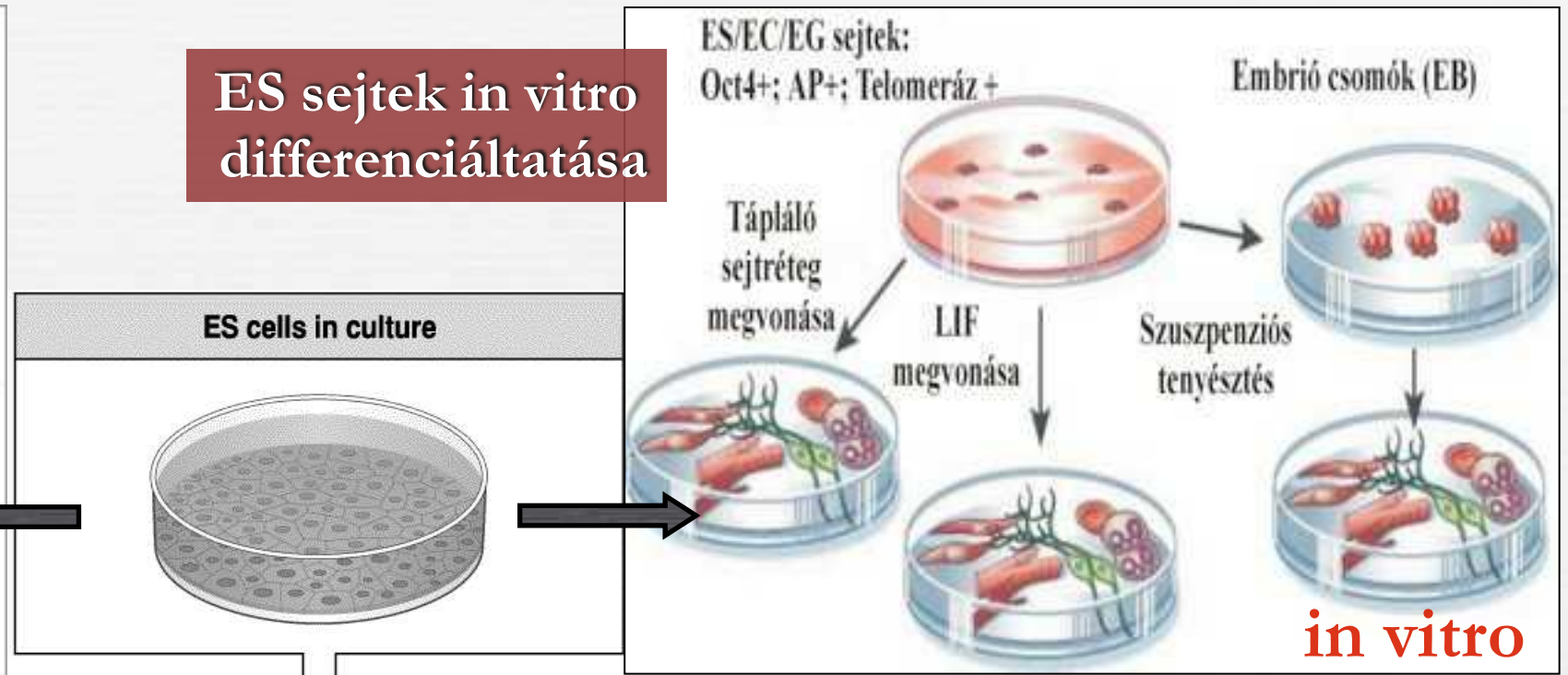


egér ESC vonalak alkalmazási lehetősége

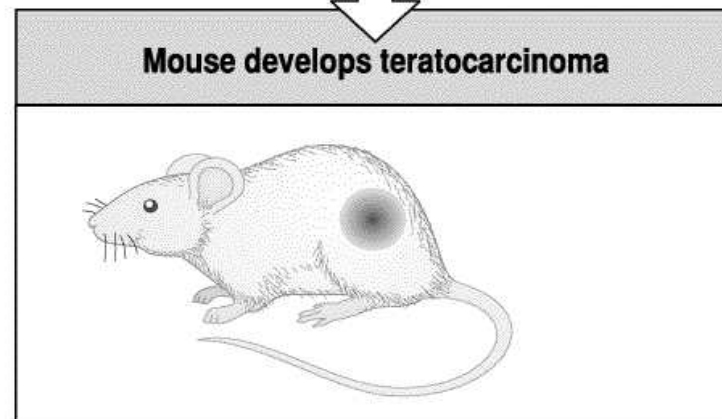
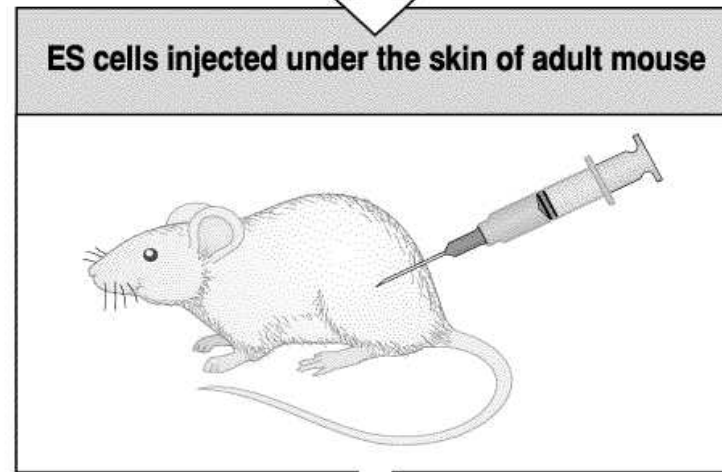
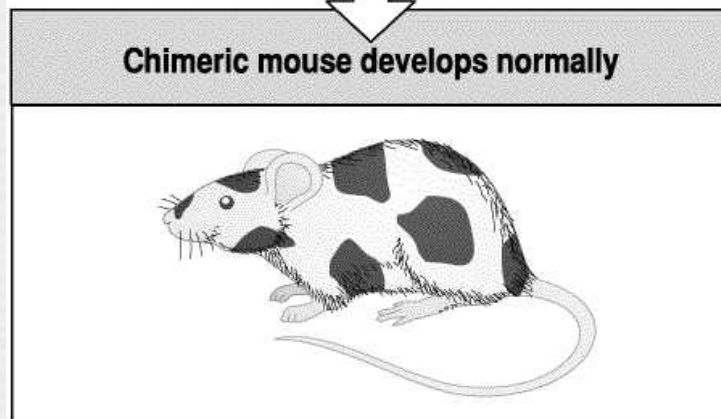
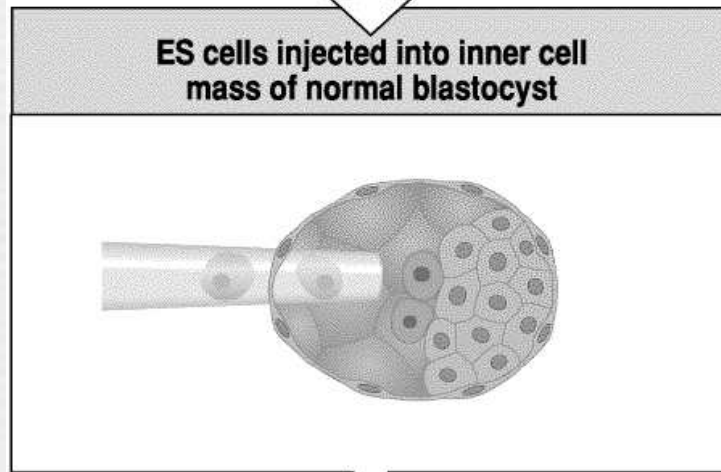
Transzgénikus ES sejtek



ES sejtek in vitro differenciáltatása



in vivo



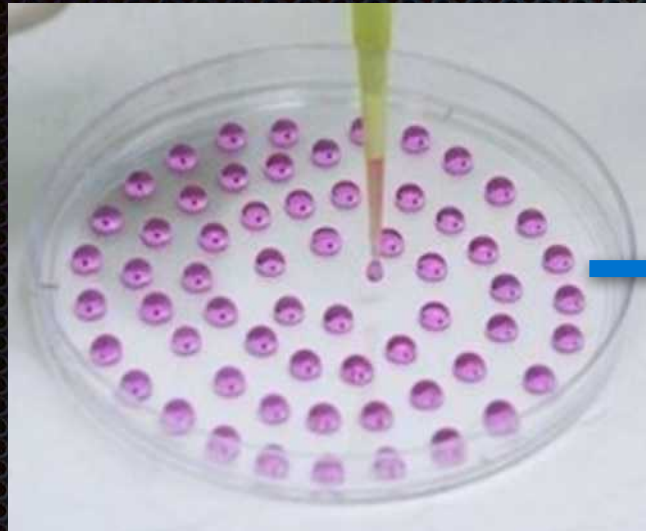
in vivo

Transzgénikus állatok

Teratokarcinómák fejlődése

mESC in vitro differenciálása

ES sejt szuszpenzió:
függőcseppek készítése

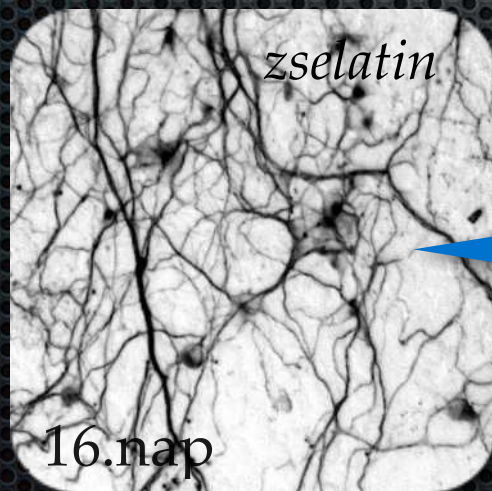


embriócsomó (EB) formálódása
a függőcseppekben



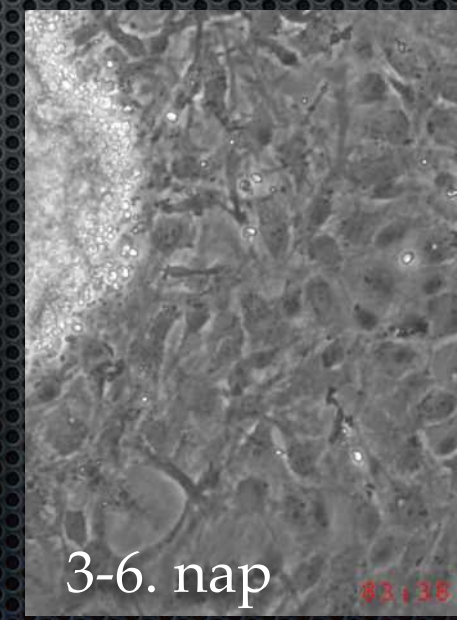
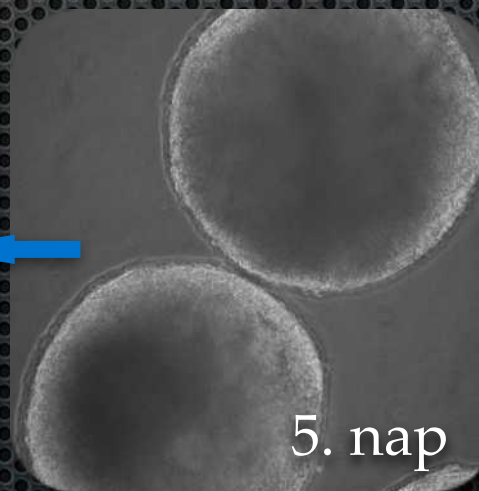
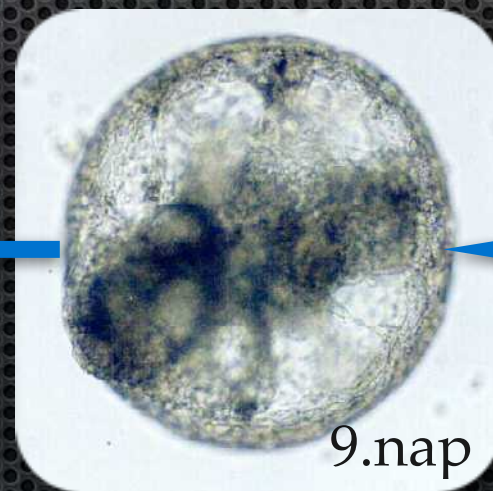
RA
receptor

EB letapadás,
differenciálódás



idegsejtek

EB növekedés, differen-
ciálódás szuszpenzióban

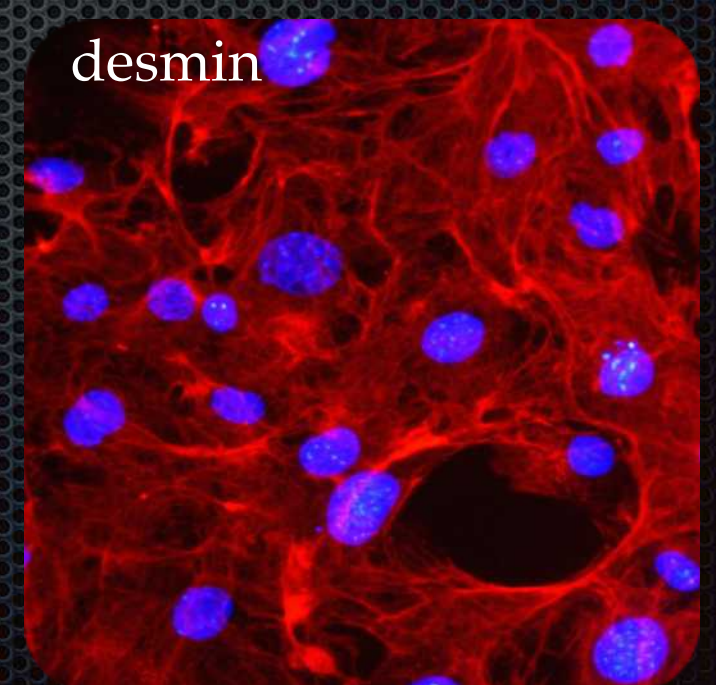
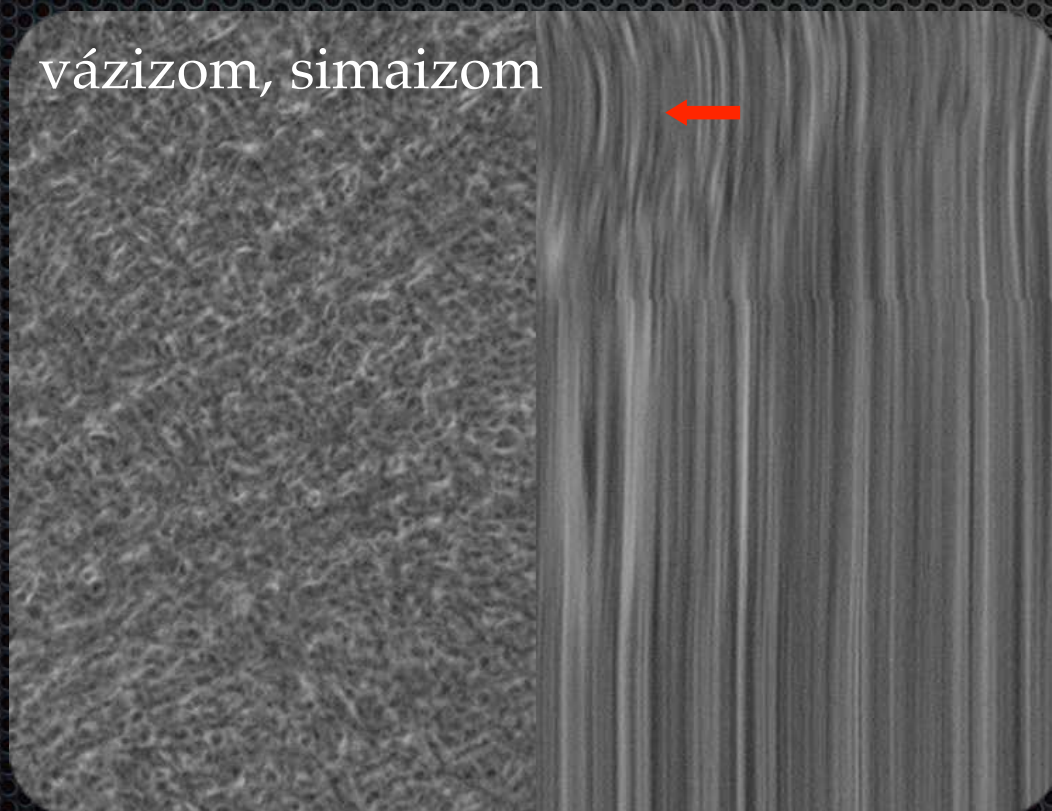
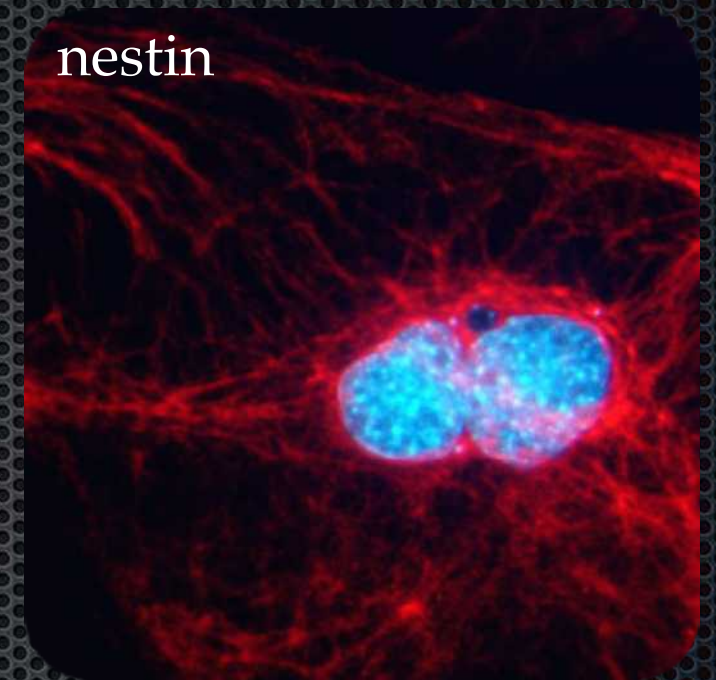
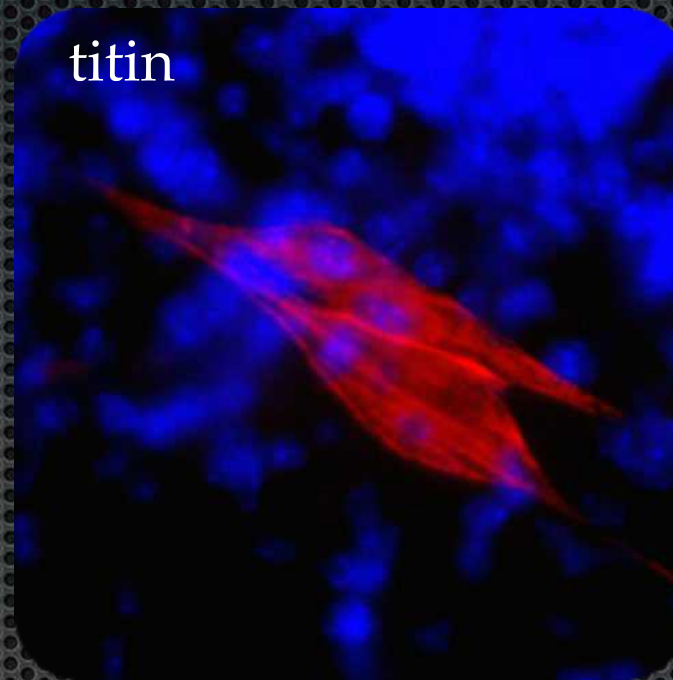
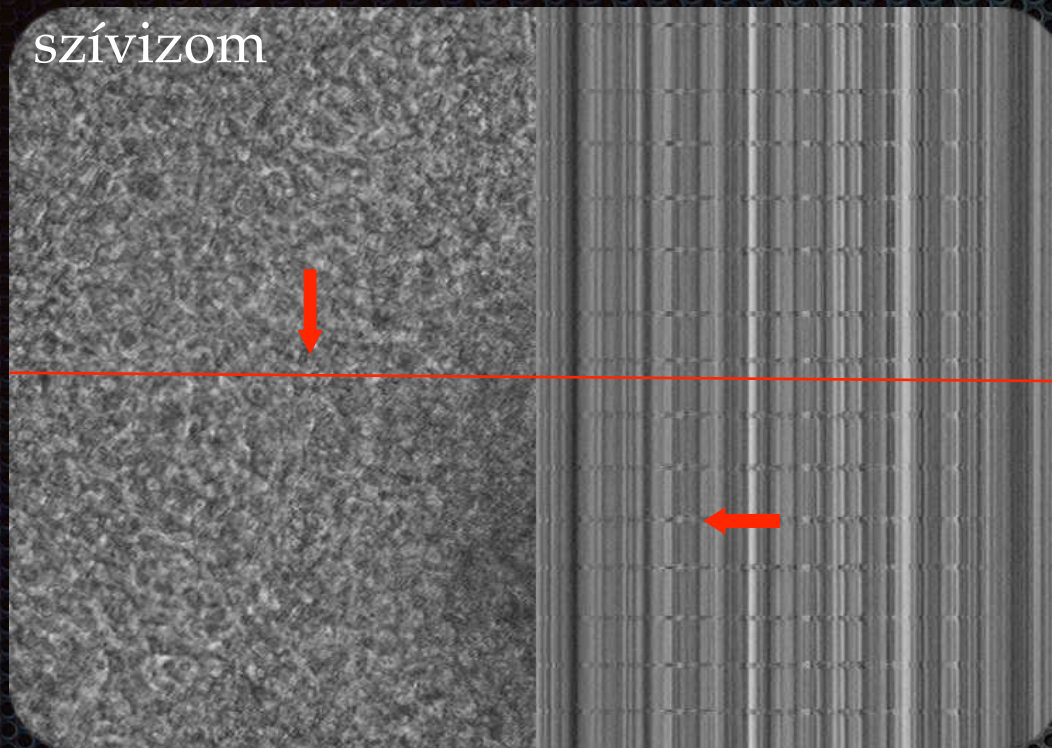


idegsejtek



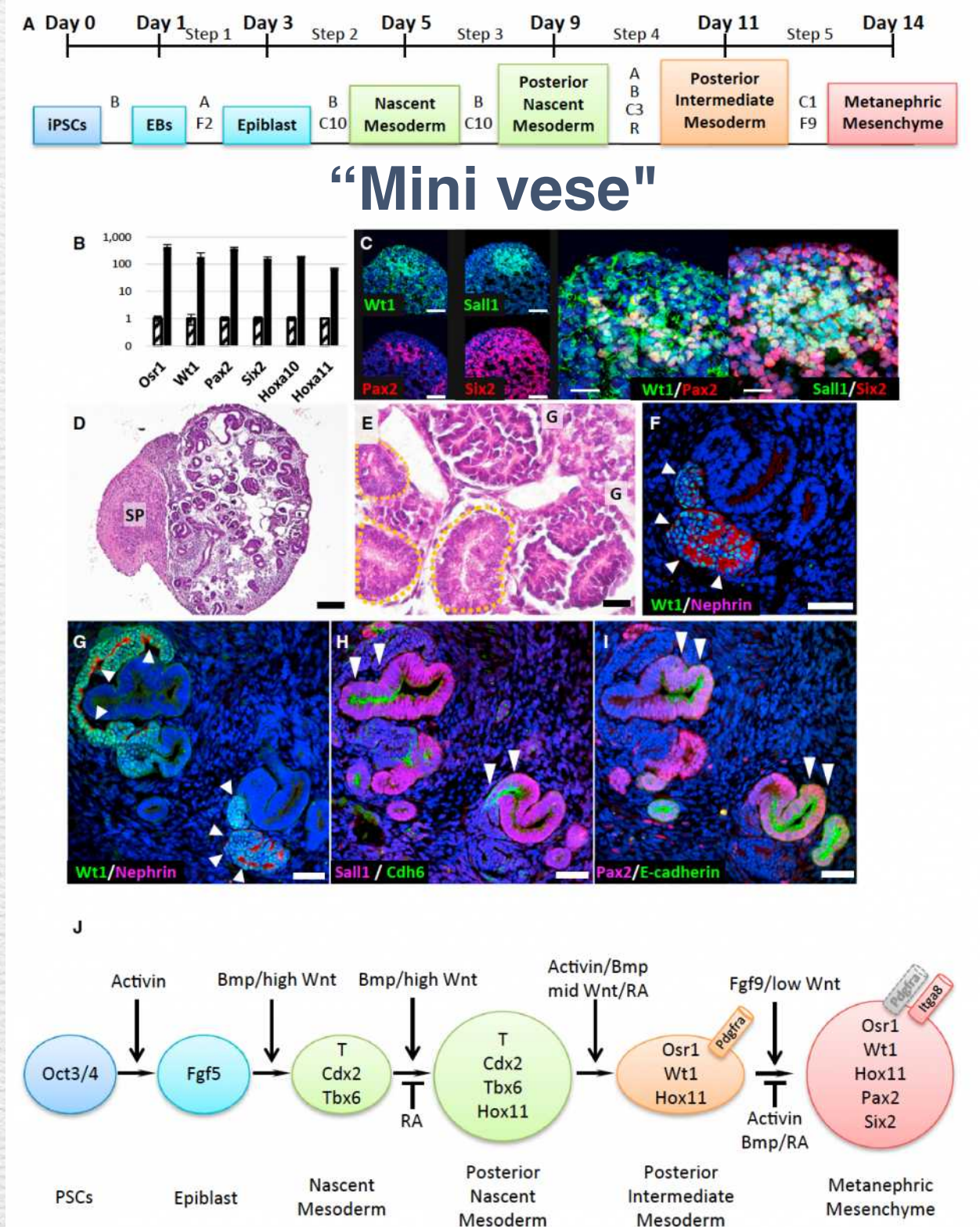
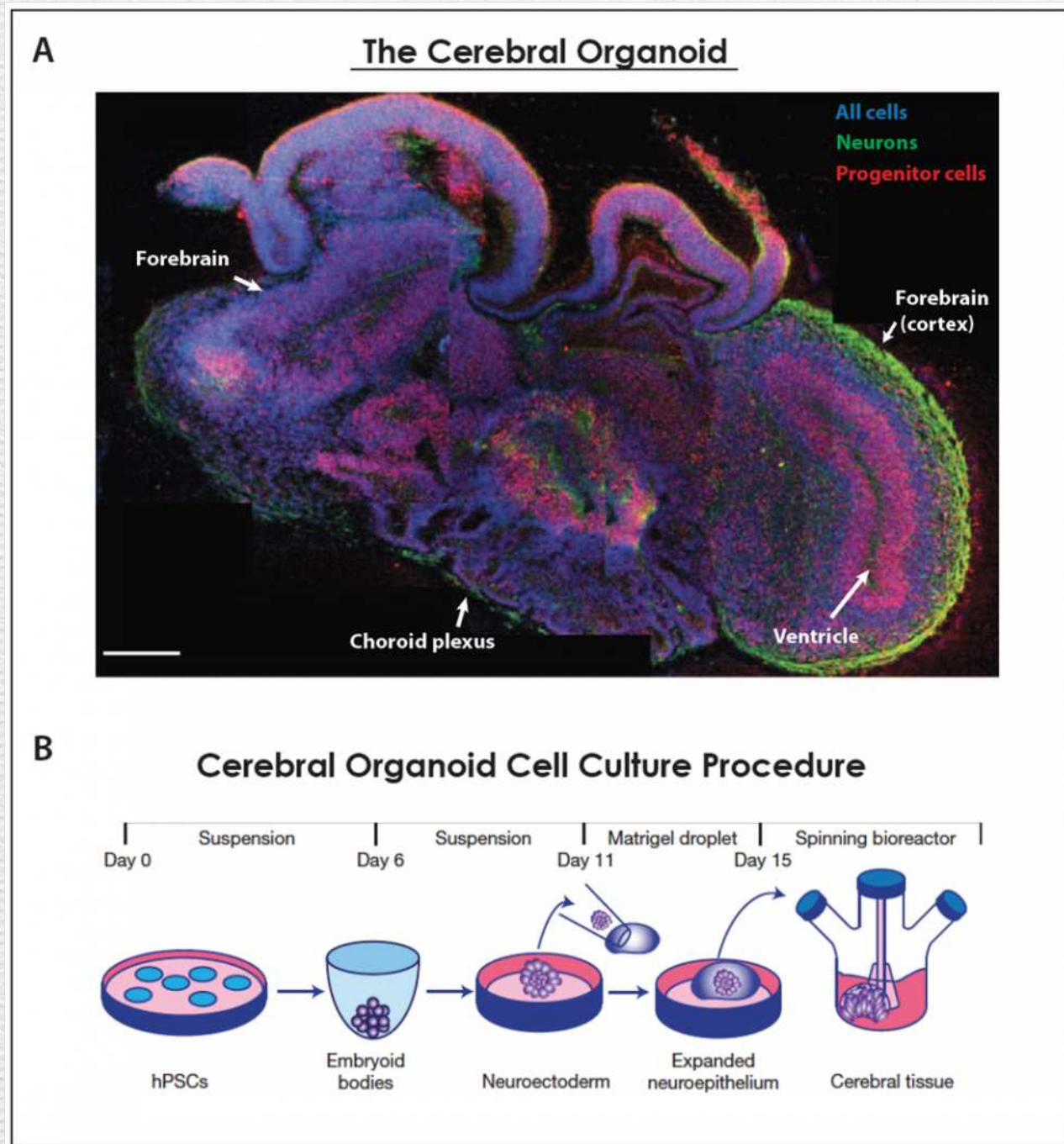
szívizom sejtek

mESC in vitro izom irányú differenciálata



ESC vonalak alkalmazási lehetősége - in vitro

“Mini agy”



Cerebral organoids model human brain development and microcephaly
 Lancaster, Nature 501, 373–379, 2013

Redefining the In Vivo Origin of Metanephric Nephron Progenitors Enables Generation of Complex Kidney Structures from Pluripotent Stem Cells., Taguchi, Stem Cell 14, 53–67, 2014

ESC vonalak alkalmazási lehetősége - in vitro

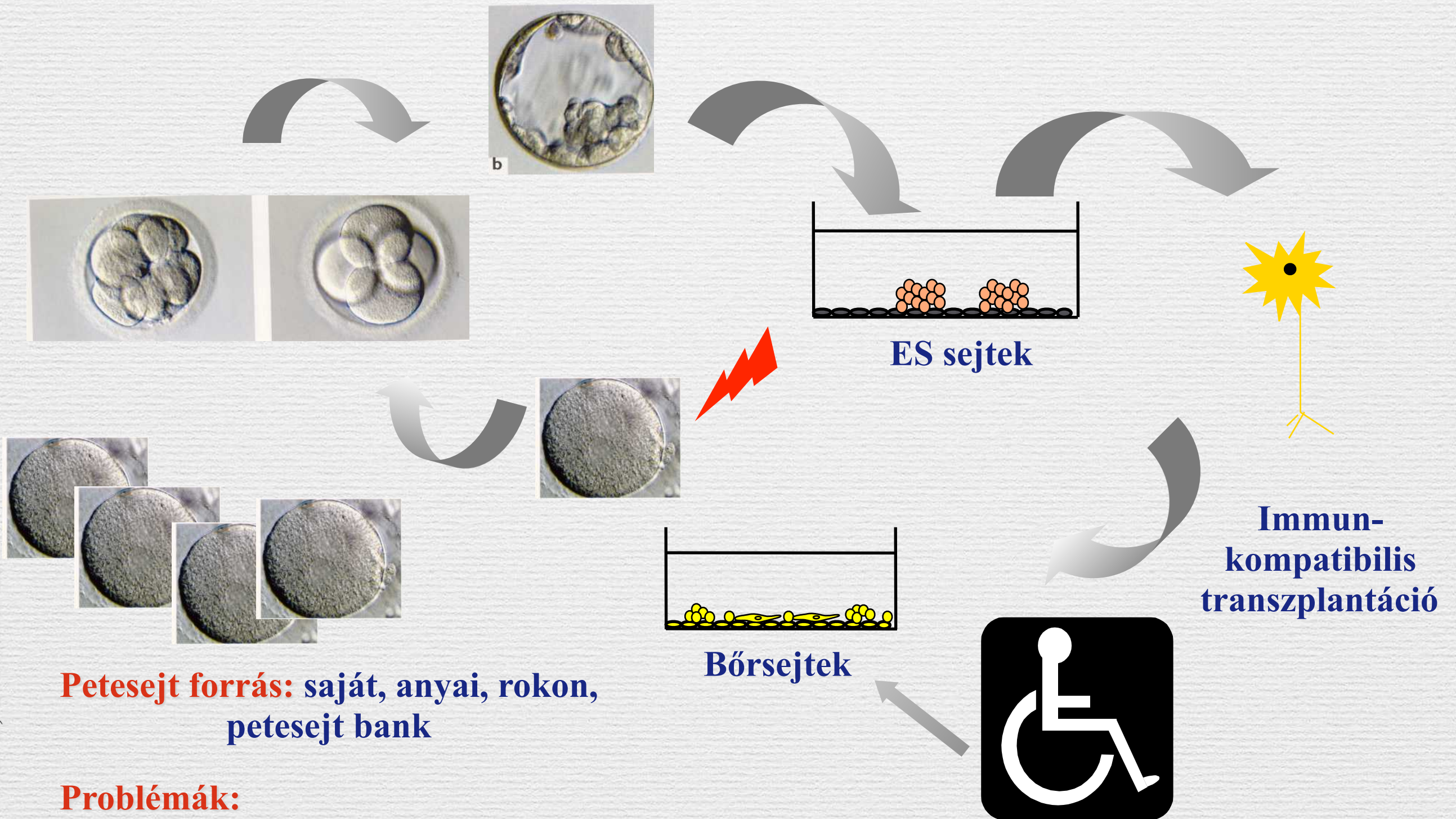
- **KO, illetve transzgénikus ES sejtvonalak jó in vitro modellrendszerként szolgálhatnak**
- **Az embrionális fejlődés során lejátszódó folyamatok in vitro differenciálódás során tanulmányozhatóak**
- Toxikológiai tesztekben kiválthatják az állatkísérletek egy részét
- Humán betegségek in vitro modellezhetőek
- Mutációt hordozó mESC, huESC sejtvonalak jól alkalmazása gyógyszerteresztekben
- Transzplantációs kísérletekben való alkalmazás

- **Allogén transzplantáció – sok új ES sejt kellene (kb. 1000 huESC)**
- **Autológ transzplantáció – **terápiás klónozás****

Etikai problémák



Transzplantációs terápia-Terápiás klónozás

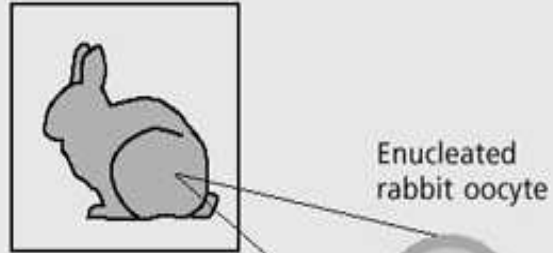


Petesejt forrás: saját, anyai, rokon, petesejt bank

Problémák:

- Nem túl hatékony (legalább 100 petesejt kell)
- Technikailag nagyon igényes: majdnem minden kórházban szükség lenne rá

HUMÁN ES SEJTVONALAK ALAPÍTÁSA KLÓNOZOTT NYÚLEMBRIÓKBÓL



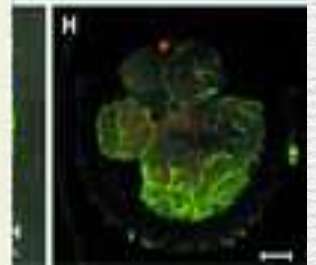
S Korea cloning research was fake

Research by South Korea's top human cloning scientist - hailed as a breakthrough earlier this year - was fabricated, colleagues have concluded.

A Seoul National University panel said the research by world-renowned Hwang Woo-suk was "intentionally fabricated" and he would be



Dr Hwang has been hailed as a hero in South Korea



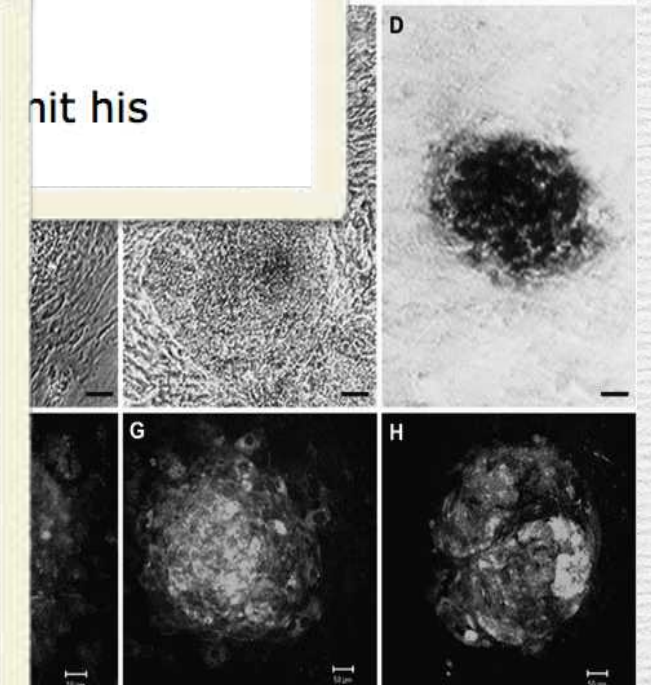
Blastocyst

By HAROLD M. SCHMECK Jr.
Published: February 26, 1984

An international review committee has found "no compelling evidence" that Dr. Karl Illmensee of the University of Geneva fabricated data in experiments conducted in 1982, but it said shortcomings had "cast grave doubts" on the validity of his work.

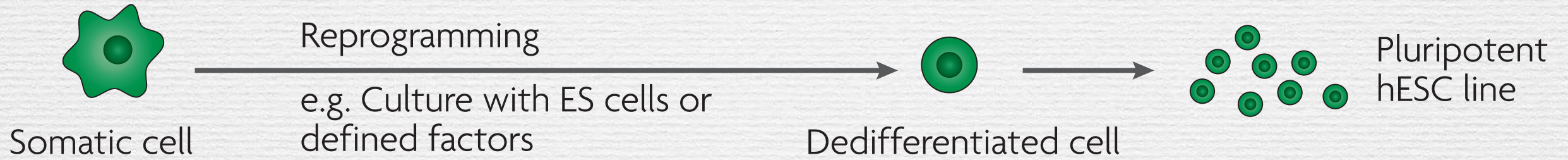
The work of Dr. Illmensee, an internationally known scientist who reported he had successfully cloned mice, was under review because of assertions by members of his staff that there had been irregularities in record-keeping.

nit his

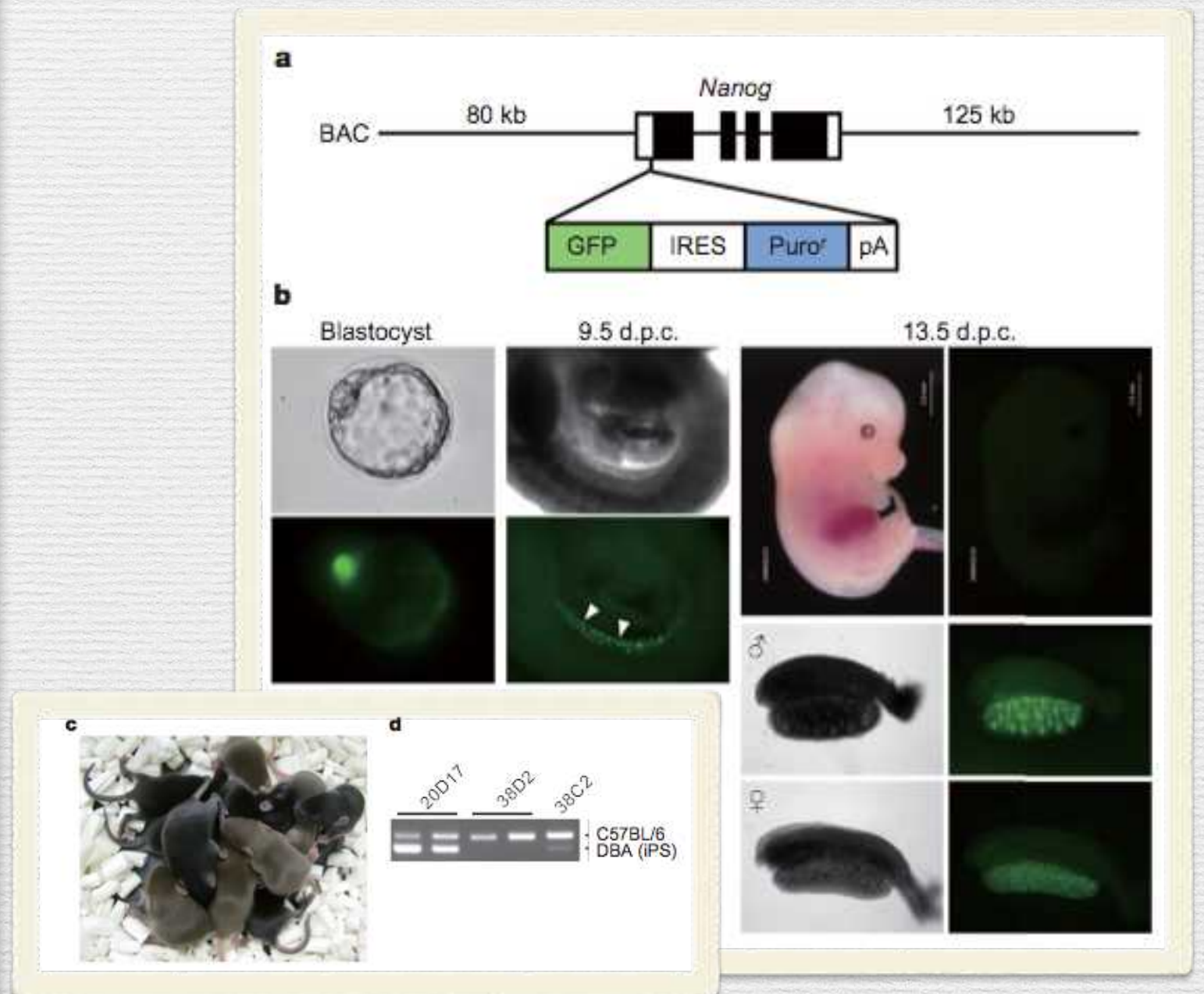
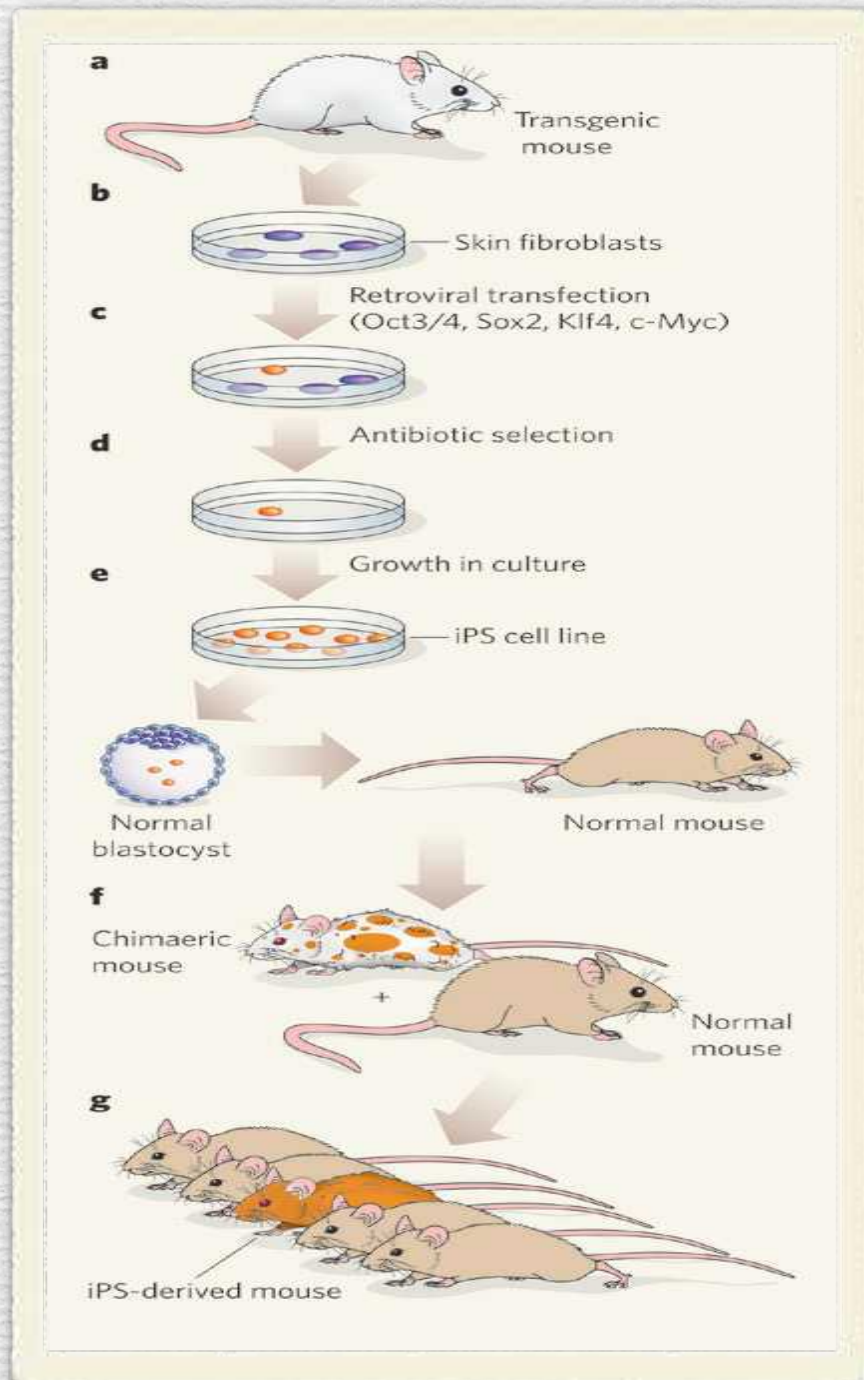


ARCH, 13(4):251-264., 2003.

Indukált pluripotens őssejt vonalak létrehozása



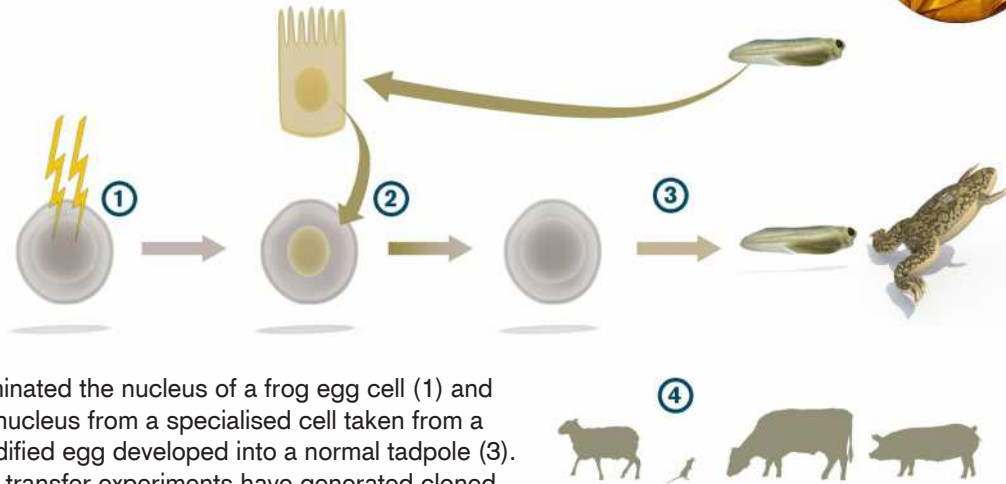
+Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012



John B. Gurdon

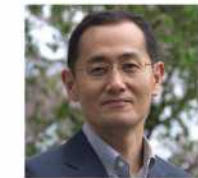
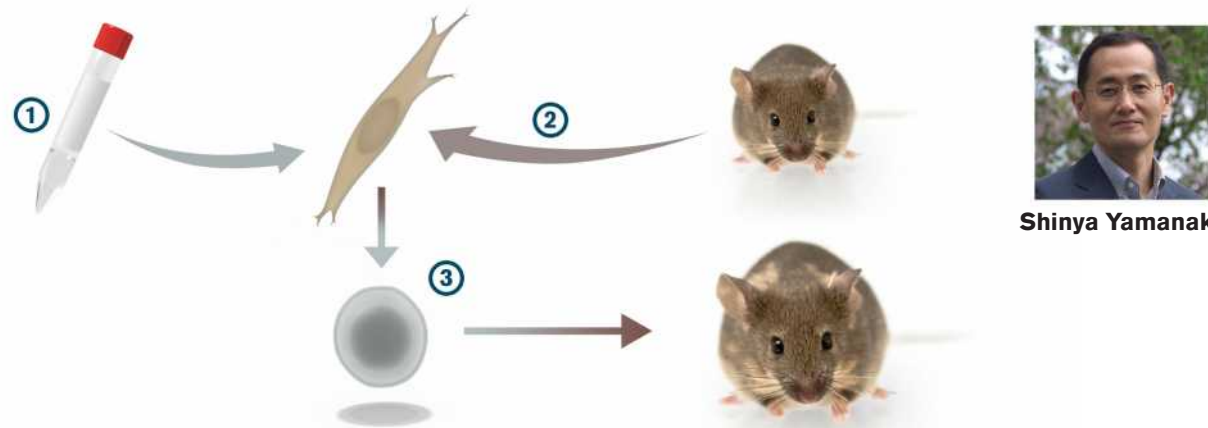


John B. Gurdon eliminated the nucleus of a frog egg cell (1) and replaced it with the nucleus from a specialised cell taken from a tadpole (2). The modified egg developed into a normal tadpole (3). Subsequent nuclear transfer experiments have generated cloned mammals (4).

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	▼



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.



Photo; Creative Commons Attr. 2.0
Generic license

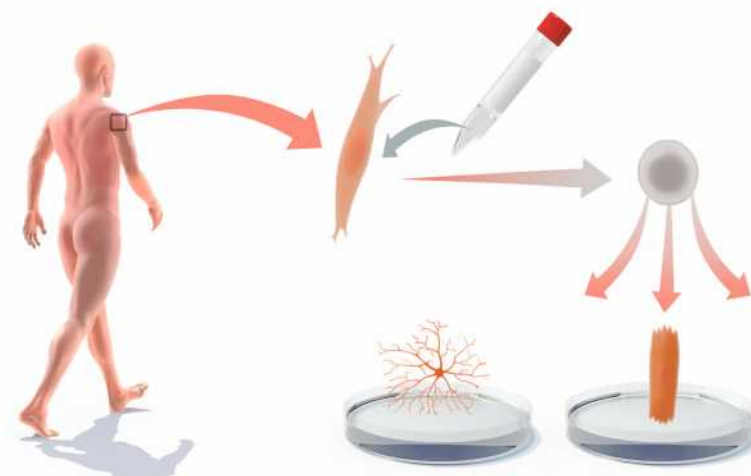
Sir John B. Gurdon



Photo; Creative Commons Attr. 2.0
Generic license

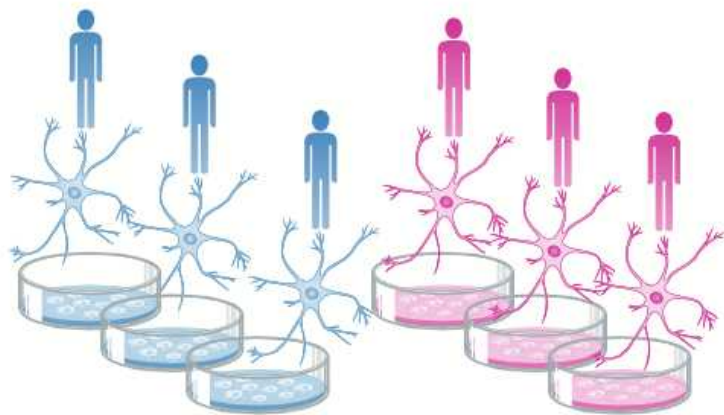
Shinya Yamanaka

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"*



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.

betegség modellezés



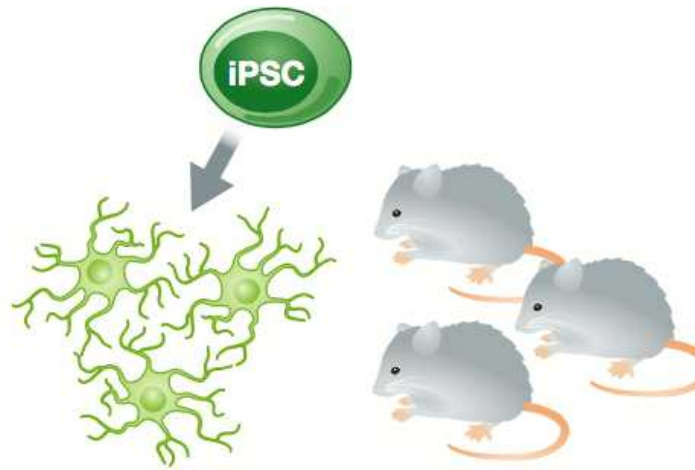
Genome-wide expression analysis

Multi-omics
Array analysis of
→ pathways
→ interactomes
→ cellular circuitries

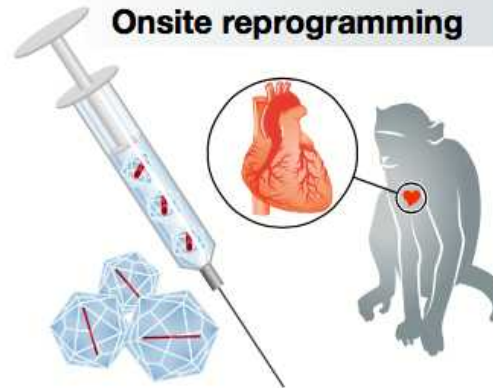
Drug discovery



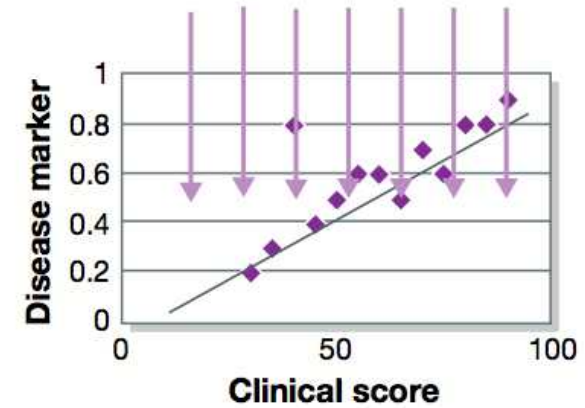
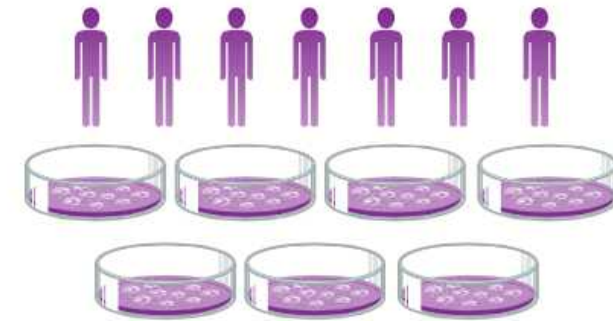
sejt transzplantáció



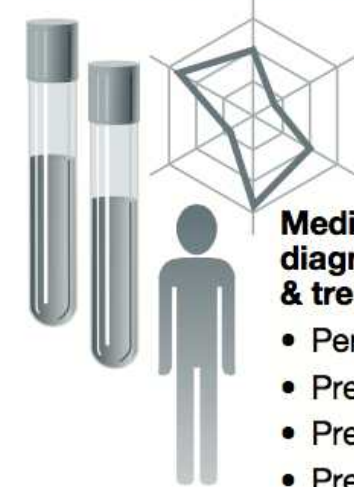
Onsite reprogramming



klinikai alkalmazás



Patient stratification



Medical diagnosis & treatment

- Personalized
- Predictive
- Preemptive
- Precision

iPSC technológia

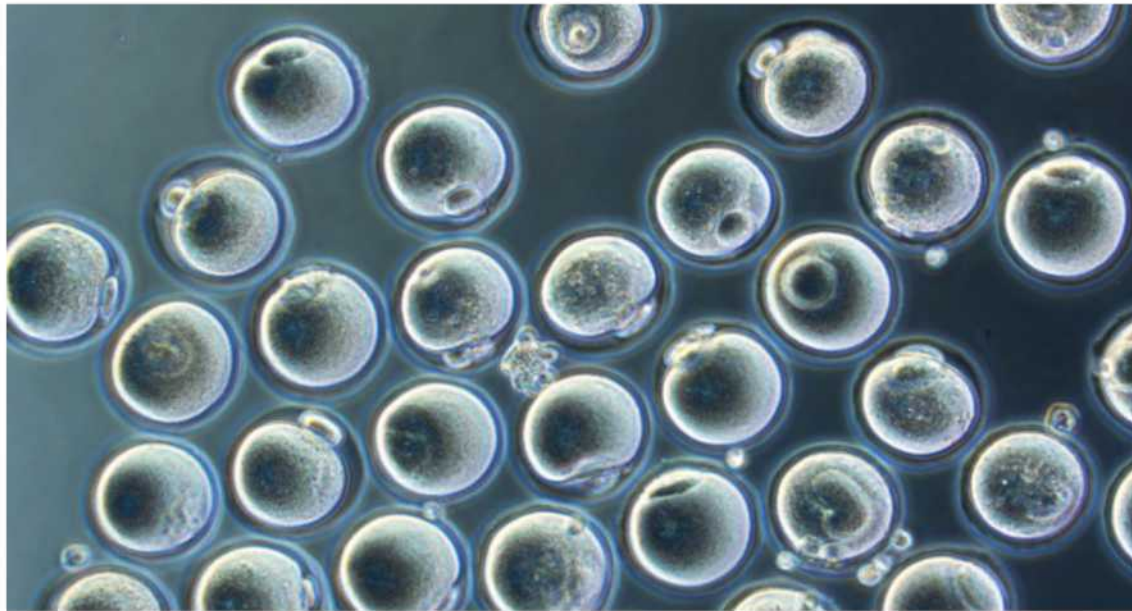
From Stem Cell to Oocyte In a Dish

For the first time, scientists generate functional mouse eggs from stem cells in culture.

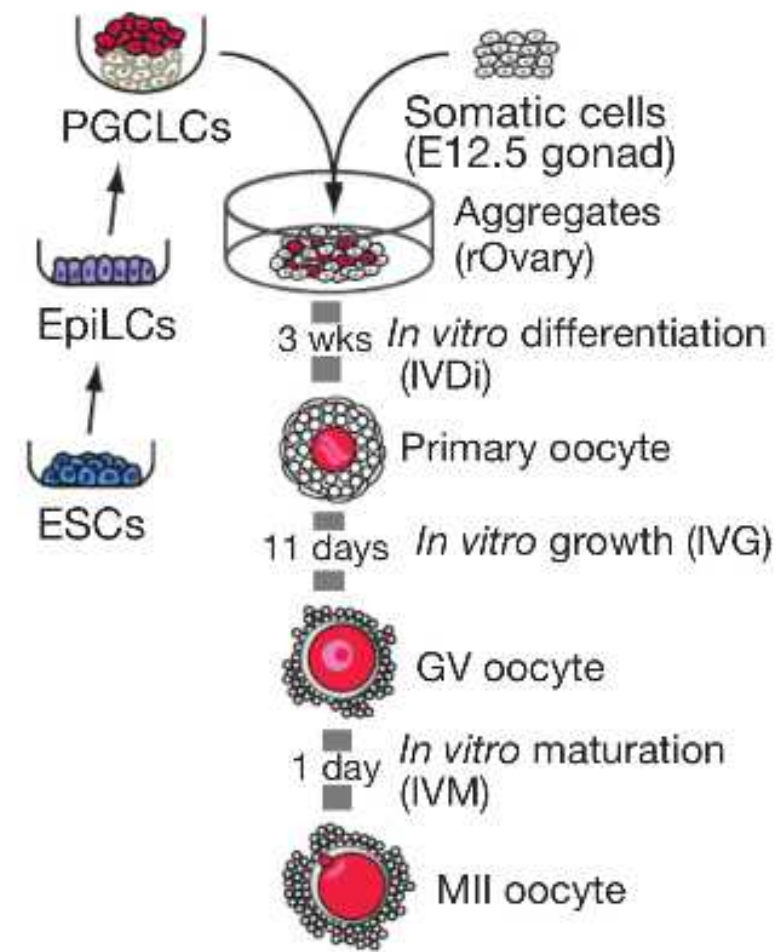
By Anna Azvolinsky | October 17, 2016



2016.10.17



Meiosis II murine oocytes developed in vitro from tail-derived iPSCs
KATSUHIKO HAYASHI, KYUSHU UNIVERSITY, JAPAN



Origin

hESC (XX, XY)

hiPSC (XX, XY)

hESC (XX)



Home

Reference

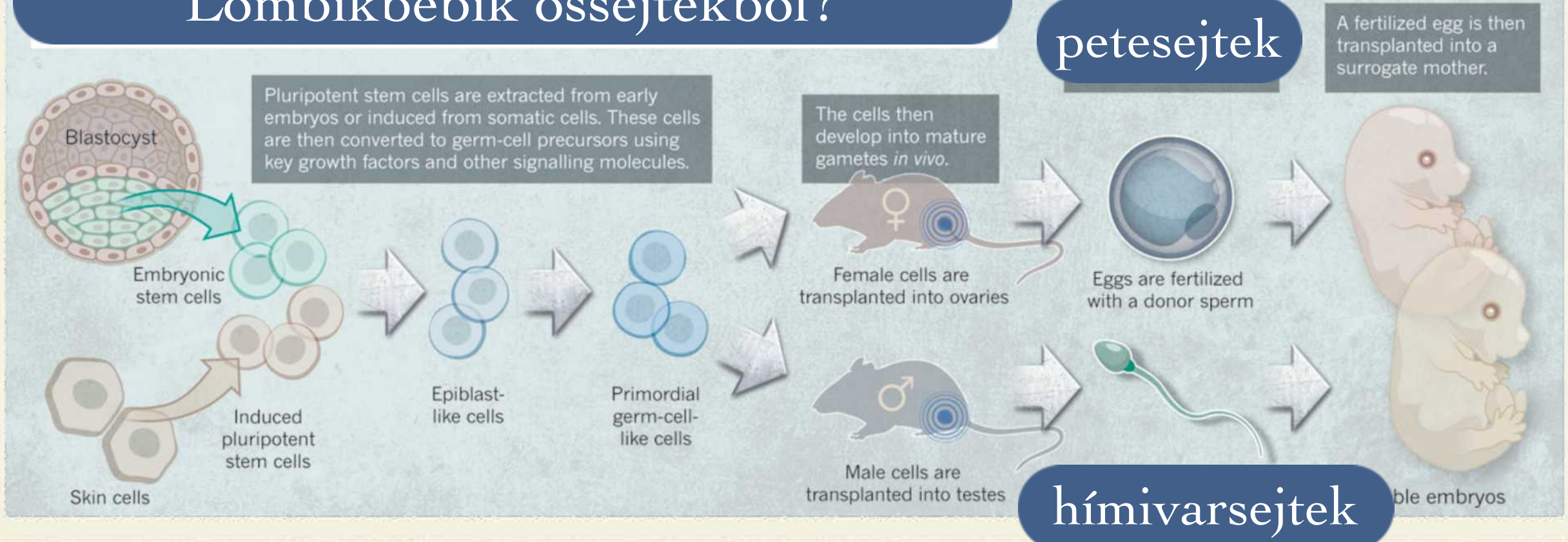
[53]

Cs

[54]

EGÉR ES SEJTEKBŐL PETESEJTEK, ÚJSZÜLÖTTEK

Lombikbábik őssejtekből?



17 October 2016



K.Hayashi, Kyushu Univ.

El kell kezdeni a vitát ennek a technikának az etikájáról mielőbb, mondta Azim Surani (University of Cambridge, UK) aki a kutatás területén. "Itt a megfelelő idő, hogy a lakosságot bevonjuk ezekben a megbeszélésekbe, jóval azelőtt, mielőtt ez az eljárás lehetővé válik az emberben is"

Etikai problémák



Transzgénikus állatok előállítási lehetőségei

DNS mikroinjektálás

Spermium közvetített génbevitel

Retrovírus közvetített génbevitel

Lentivírus közvetített génbevitel

Transzpozon - transzpozáz rendszer felhasználása

Minikromoszómák felhasználása

DNS injektálás spermatogóniumba

Transzgénikus SC és ES sejtekből magátültetéses klónozás

Genetikai módosítás transzgénikus ESC kimérák segítségével

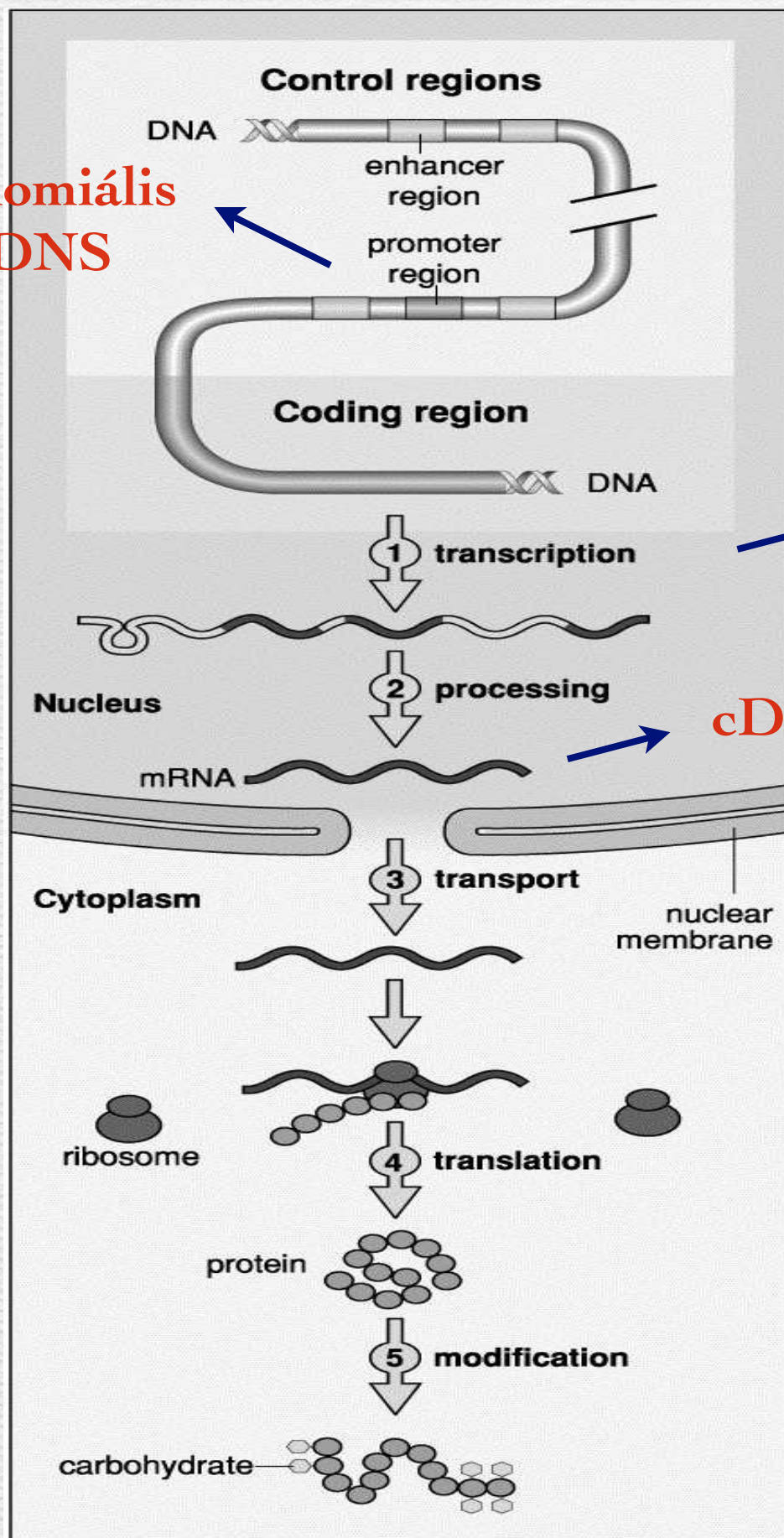
Transzgénikus spermatogóniális őssejtek beültetése

Genom szerkesztés - ZFN, TALEN, CRISPR/CAS9



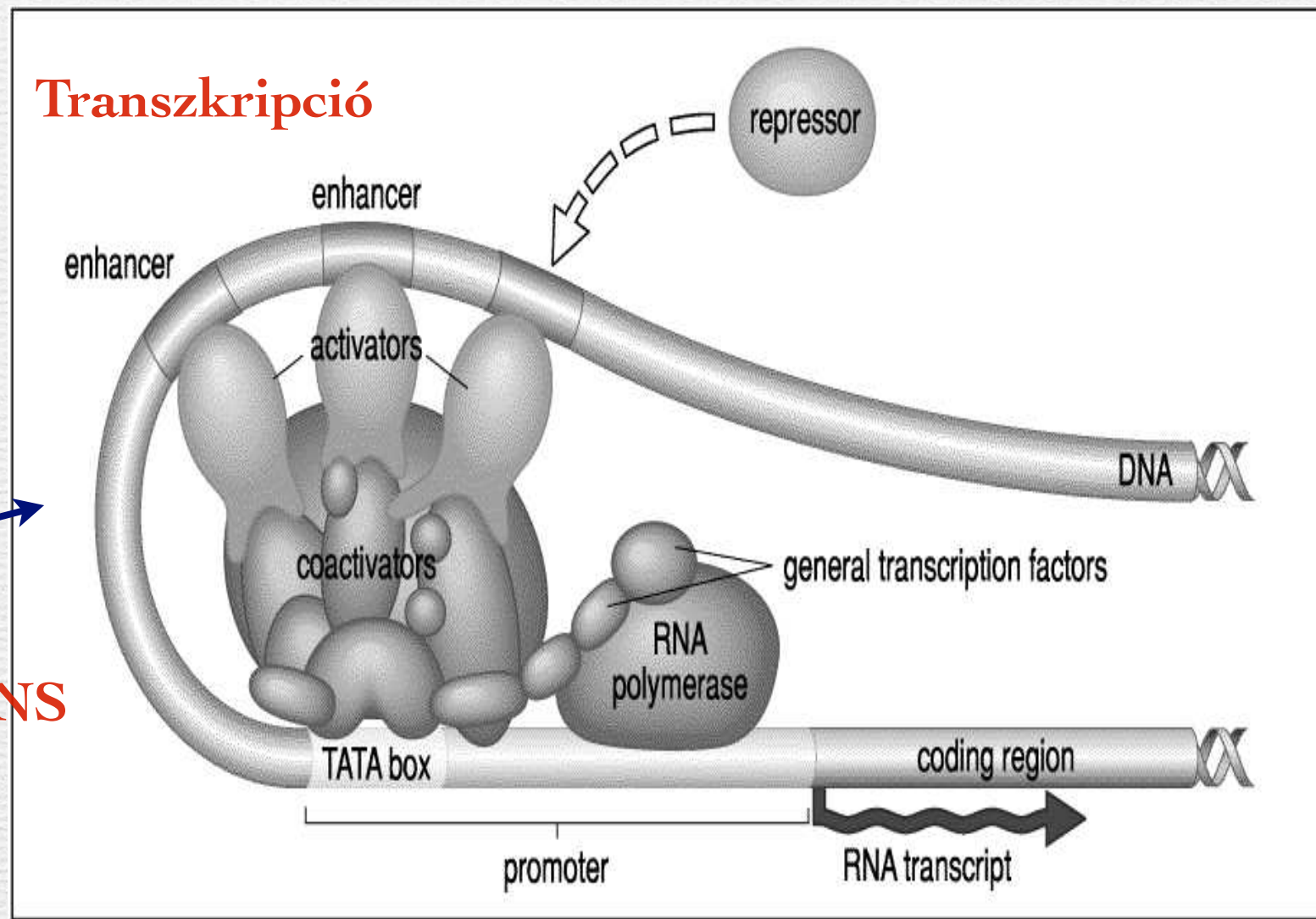
Transzkripció-transzláció

genomiális
DNS

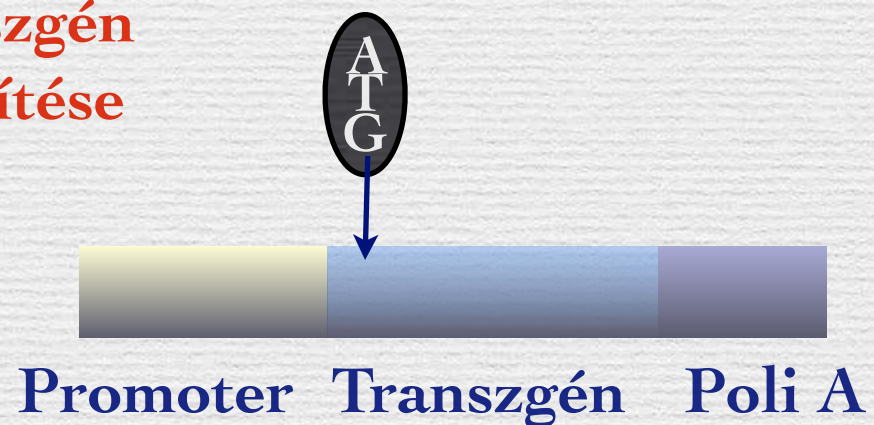


cDNS

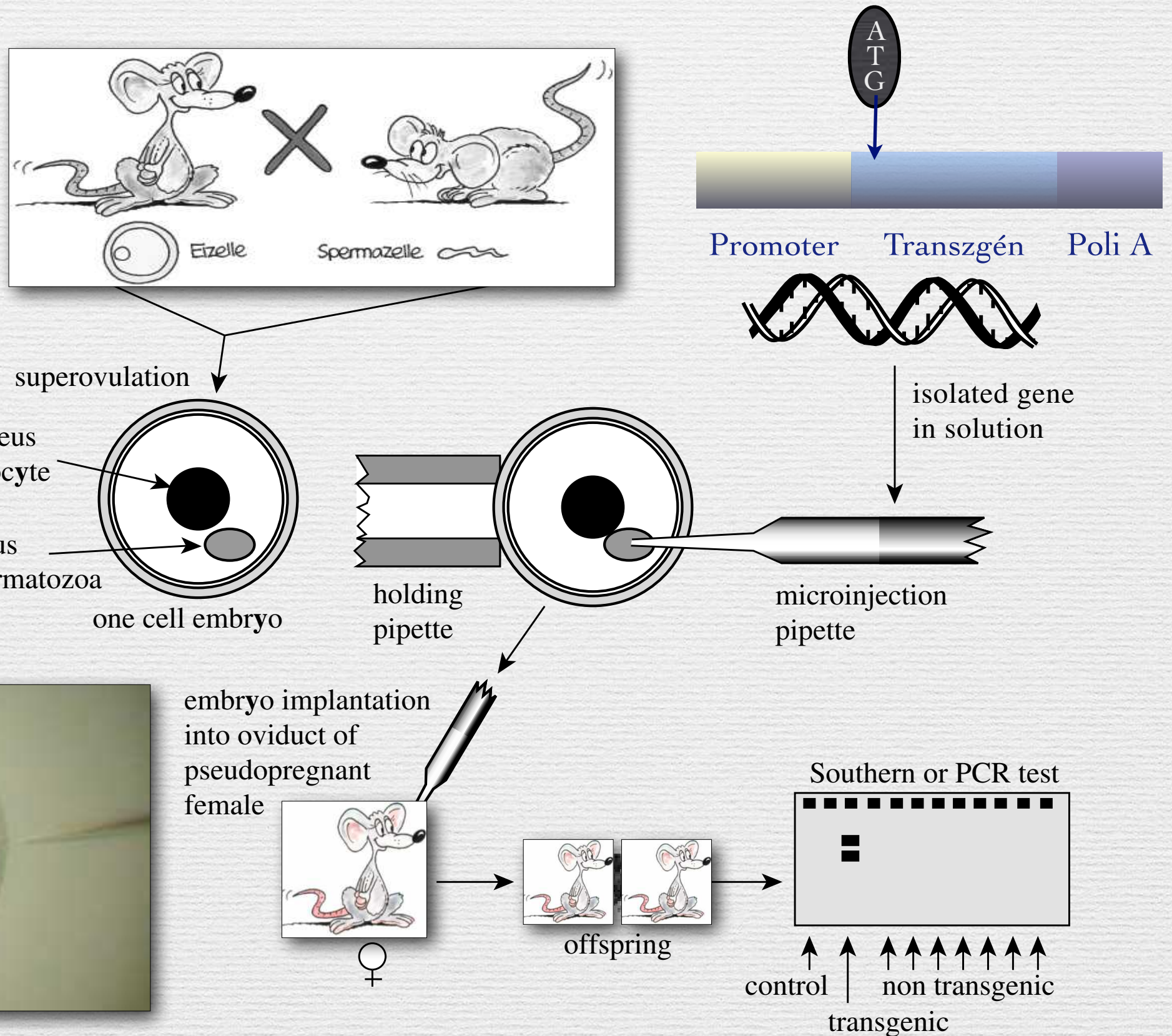
Transzkripció



Transzgén
felépítése



Transzgénikus egerek előállítása mikroinjektálással



Transzgénikus állatok előállítási lehetőségei

DNS mikroinjektálás

Spermium közvetített génbevitel

Retrovírus közvetített génbevitel

Lentivírus közvetített génbevitel

Transzpozon - transzpozáz rendszer felhasználása

Minikromoszómák felhasználása

DNS injektálás spermatogóniumba

Transzgénikus SC és ES sejtekből magátöltetési klónozás

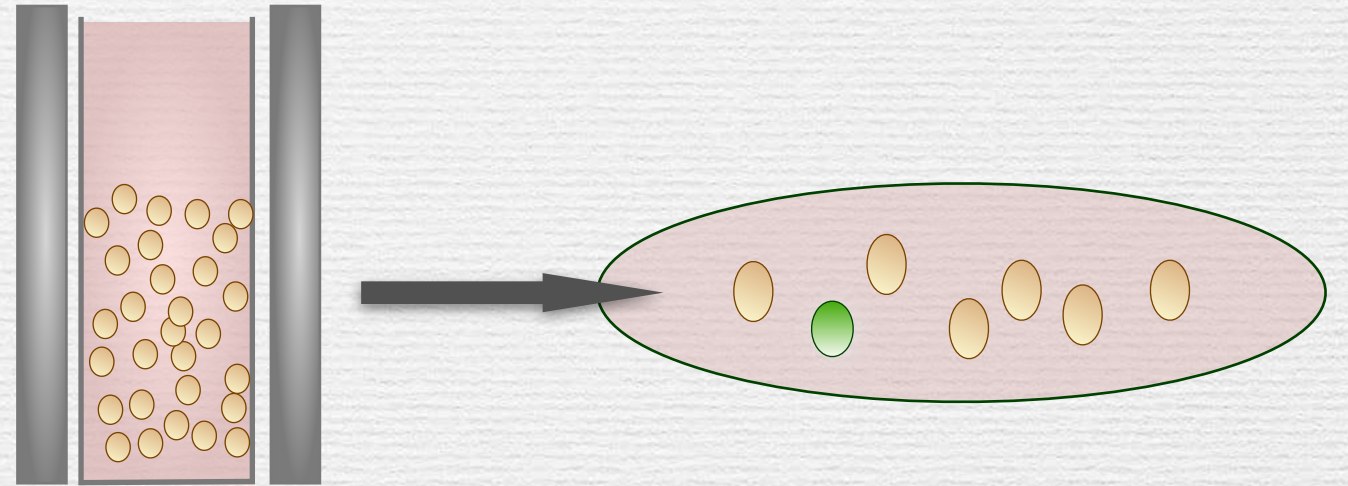
Genetikai módosítás transzgénikus ESC kimérák segítségével

Transzgénikus spermatogóniális őssejtek beültetése

Genom szerkesztés - ZFN, TALEN, CRISPR/CAS9



DNS elektroporálás ES sejtekbe

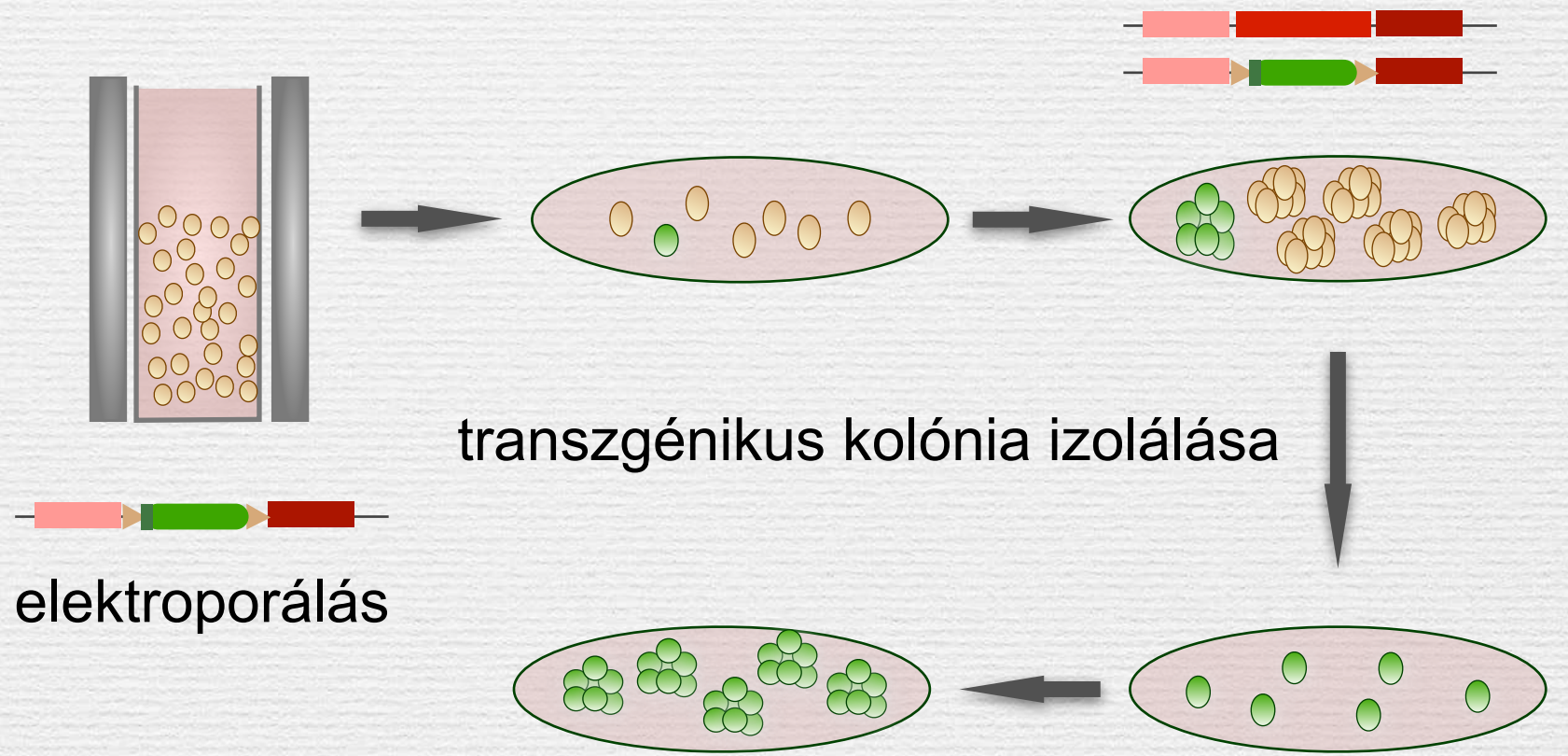


elektroporálás

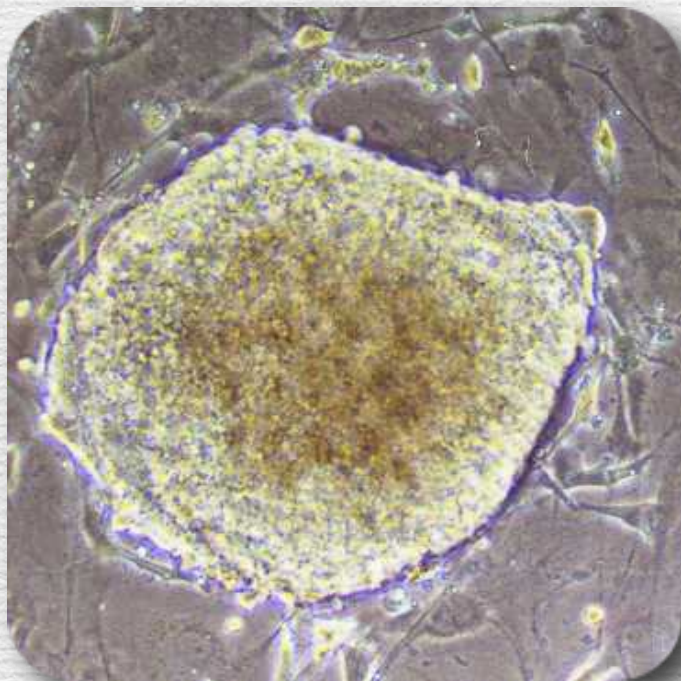


BioRad X-cell cell elektroporátor

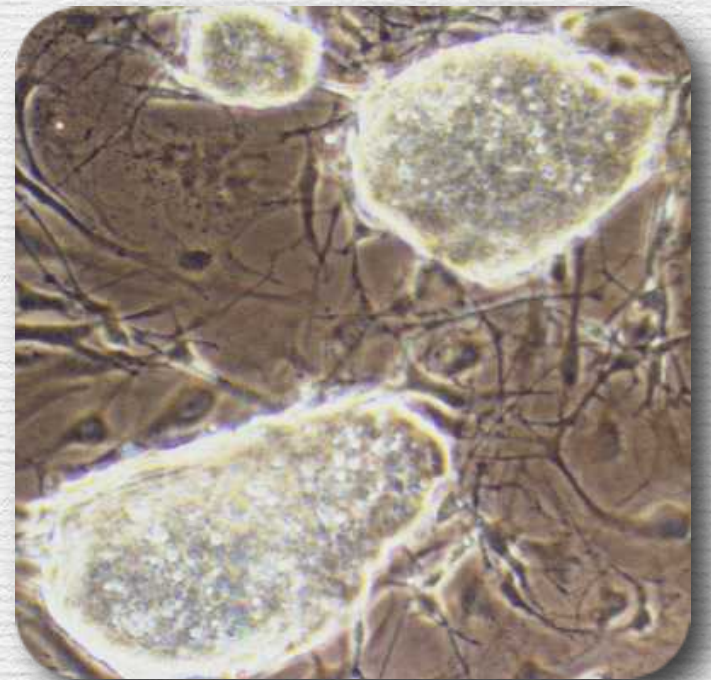
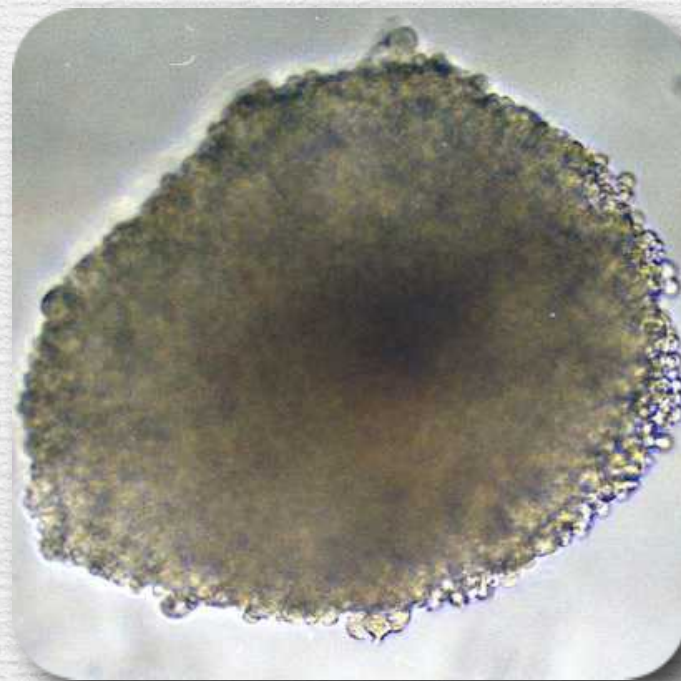
DNS elektroporálás ES sejtekbe



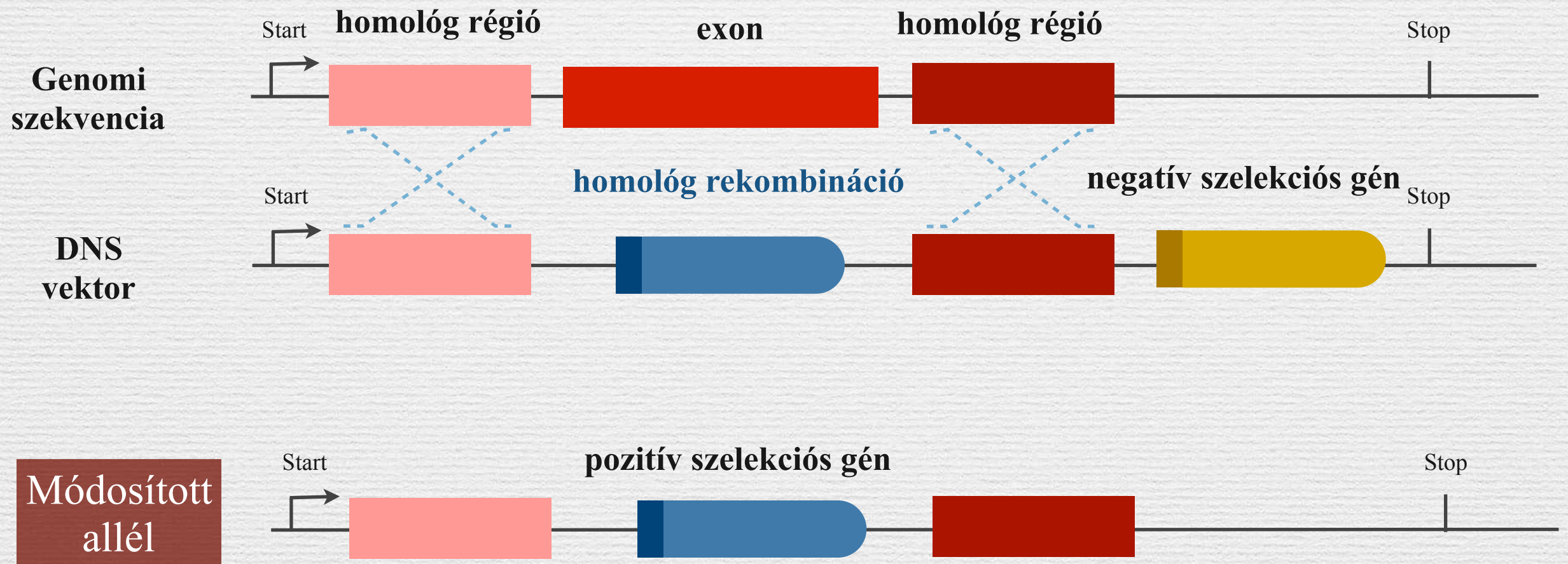
rezisztens kolónia



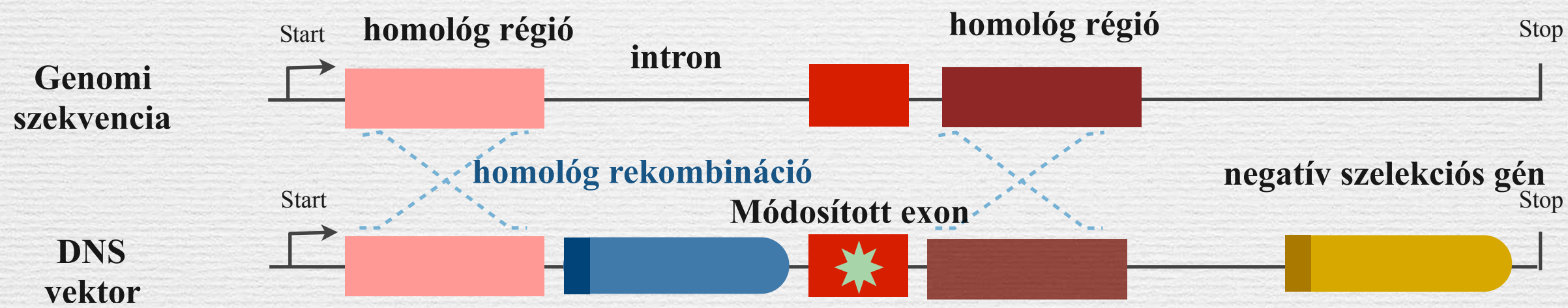
kolónia tripszinben



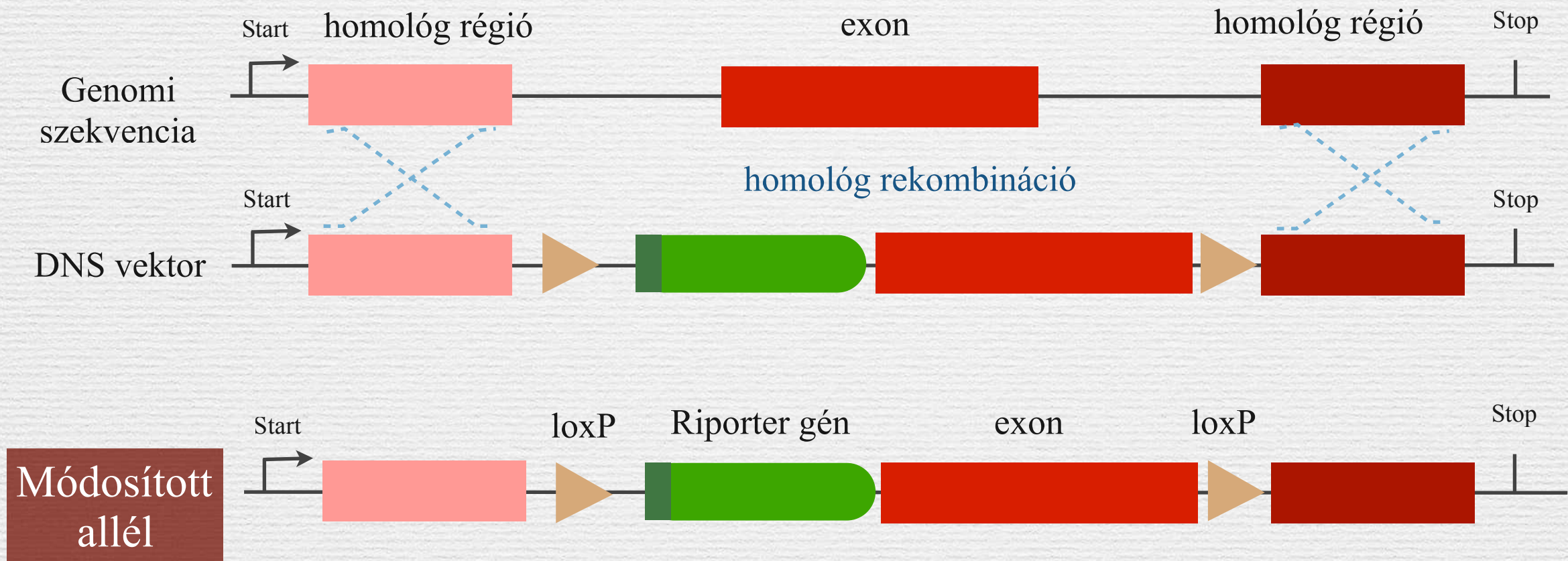
HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓ - CÉLZOTT GÉNKIÜTÉS



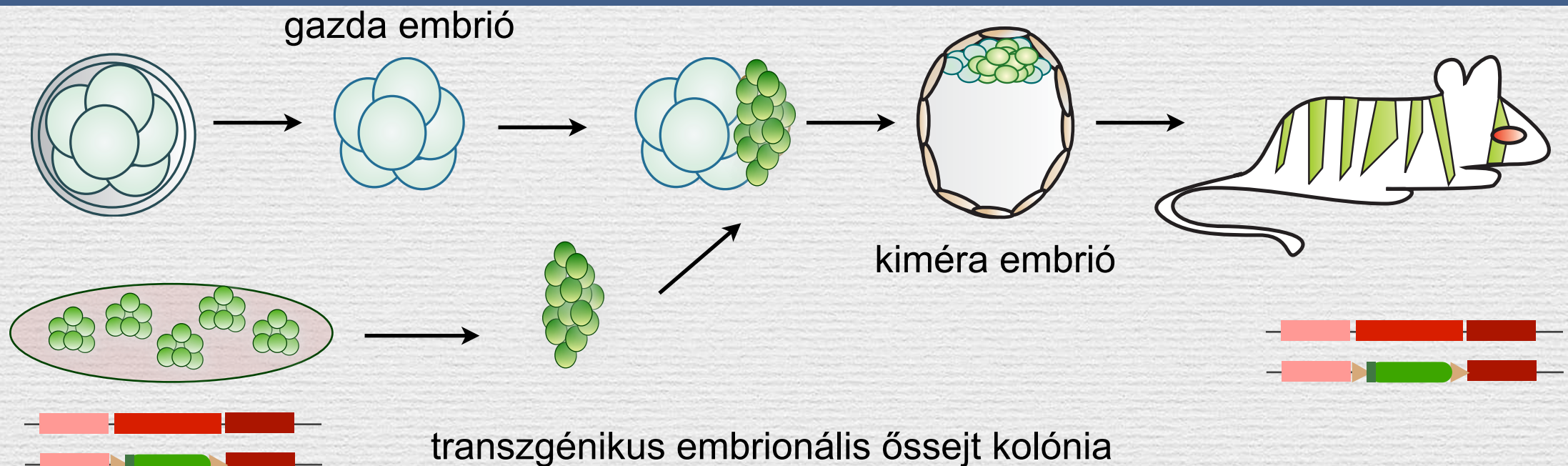
HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓ - CÉLZOTT GÉNMODOSÍTÁS



HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓ - KONDITIONÁLIS GÉNKIÜTÉS



TRANSZGÉNIKUS KIMÉRA EGEREK LÉTREHOZÁSA



Kimérák

Különböző állatok testrészeit összeállítva létrehozott képzeletbeli lények a mitológiában



Csupán képzeletben léteznek



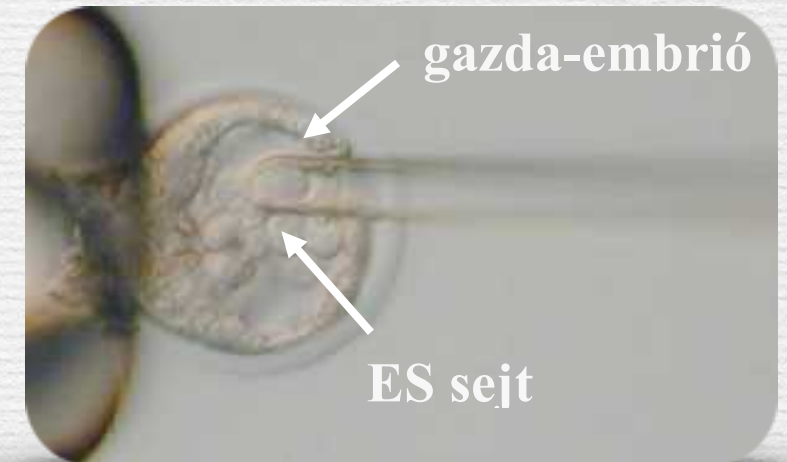
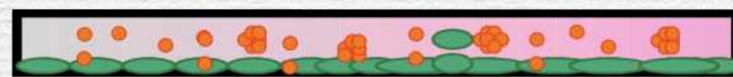
Növény-állat-ember kimérák



Csupán a filmekben léteznek

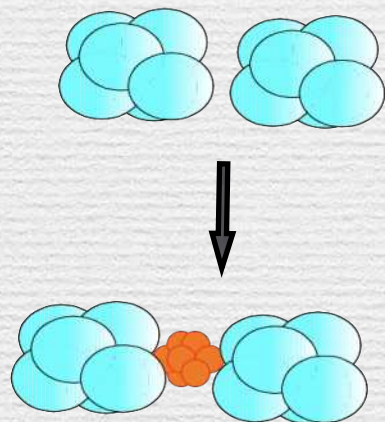


Embriionális őssejt kimérák létrehozása



AGGREGÁCIÓ

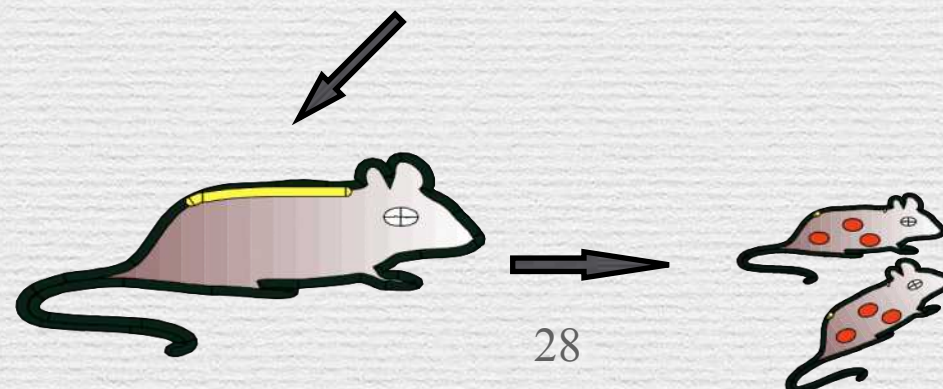
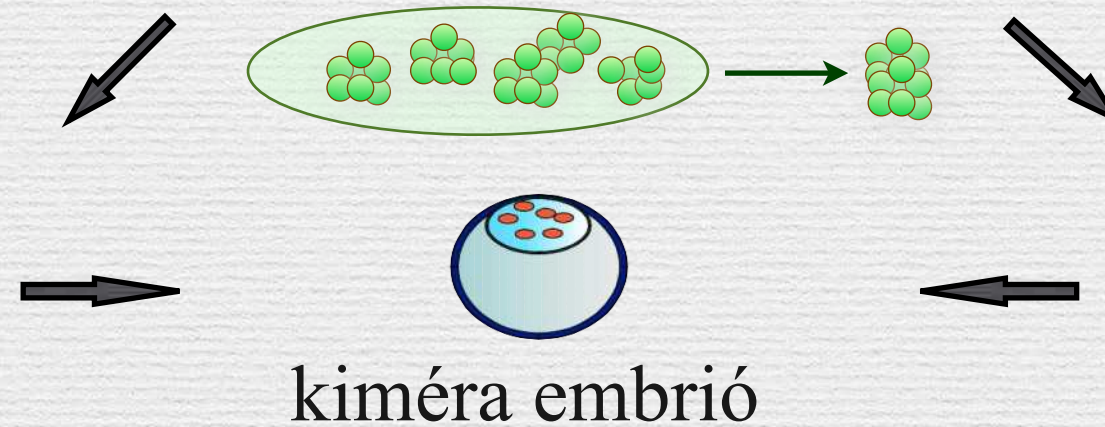
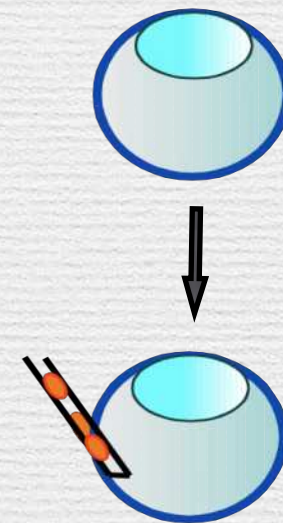
gazda-embriók



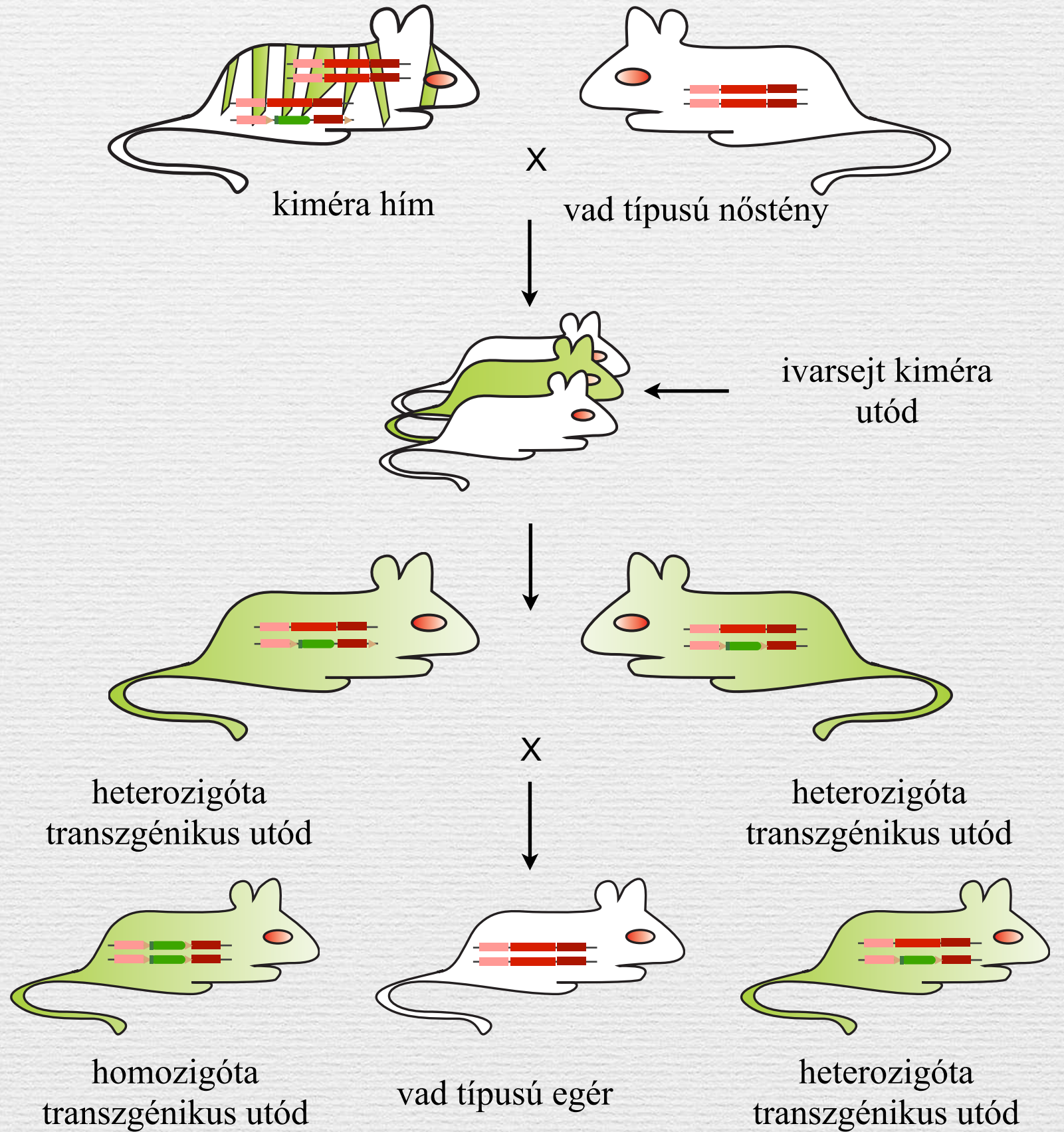
embriionális őssejtek
(ESC)

INJEKTÁLÁS

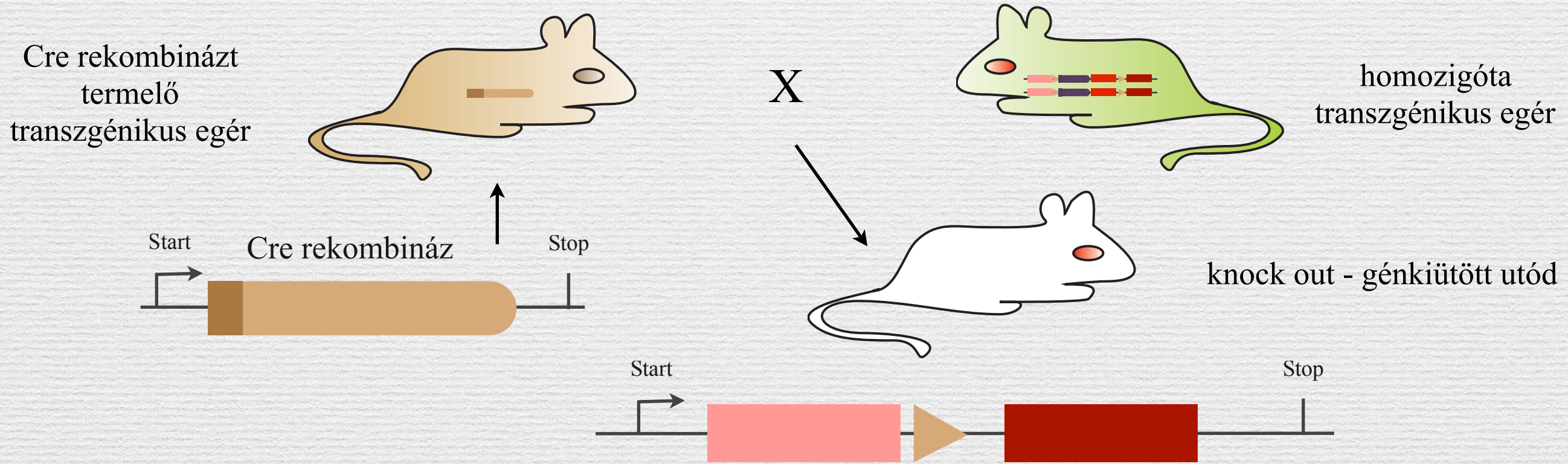
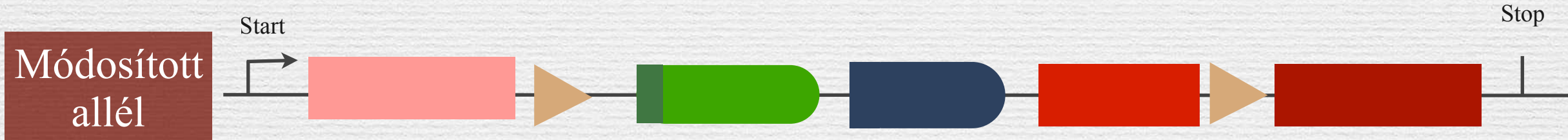
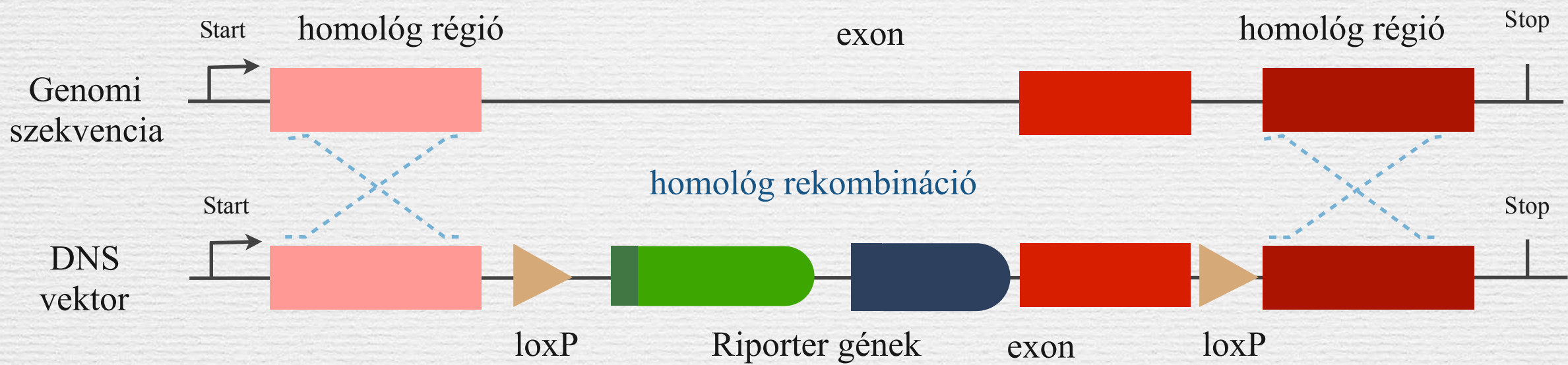
gazda-embrió



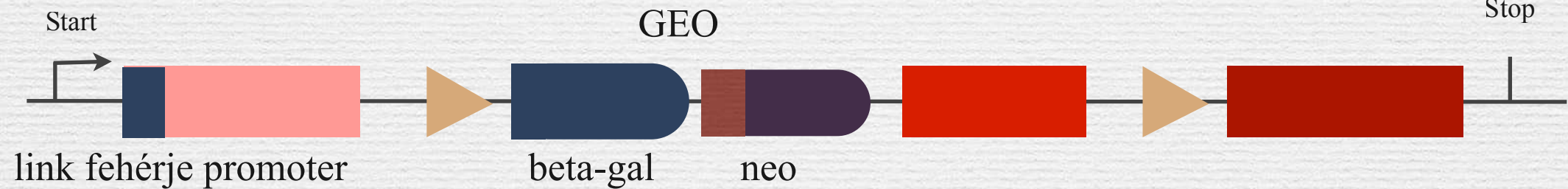
HOMOZIGÓTA TRANSZGÉNIKUS EGEREK LÉTREHOZÁSA



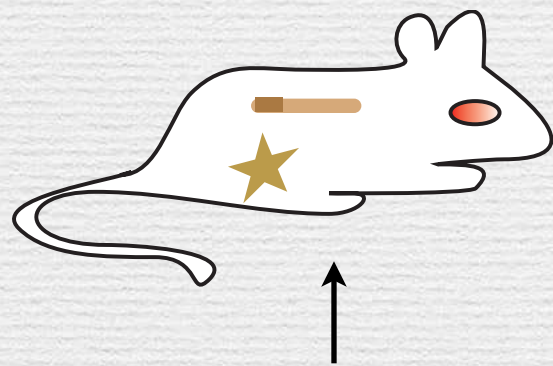
HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓ - KONDITIONÁLIS GÉNKIÜTÉS



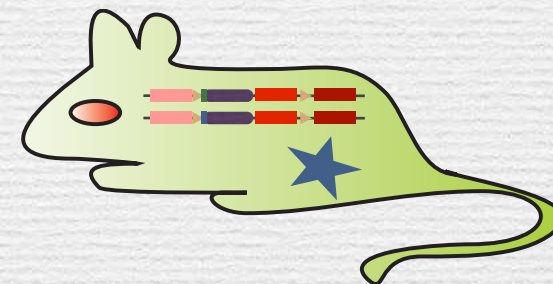
HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓ - szövetspecifikus riportergén kondicionális génkiütés



Cre rekombinázt termelő transzgénikus egér



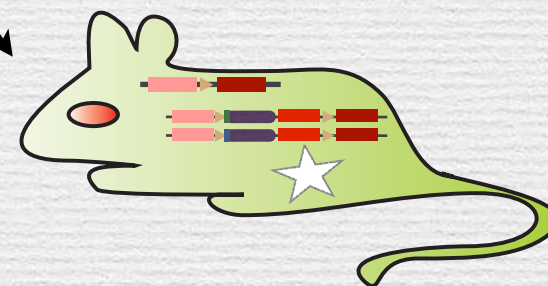
X



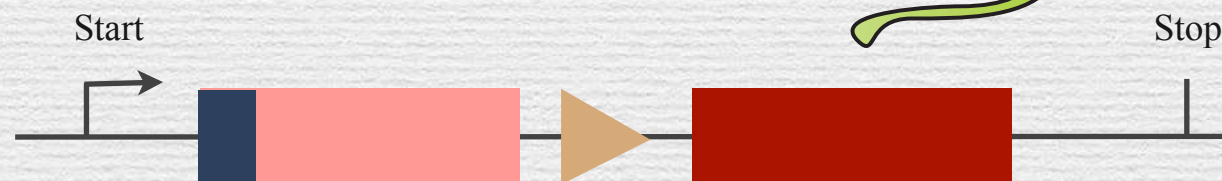
homozigóta transzgénikus egér



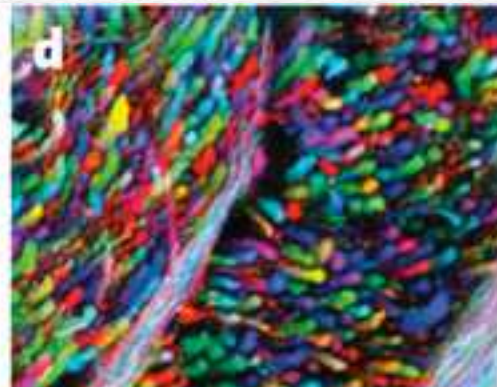
porc fehérje promoter



knock out - génkiütött utód

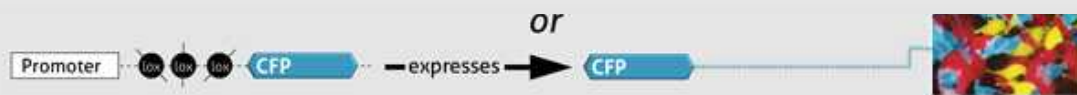


link fehérje expresszió követése transzgénikus egerek porcszövetében

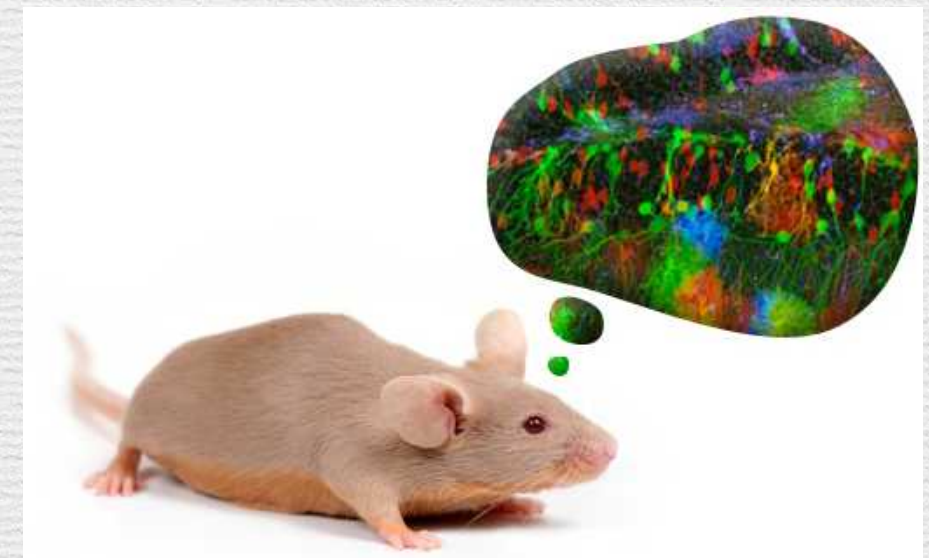


Building Brainbow

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



BRAINBOW MOUSE



BRAINBOW MOUSE

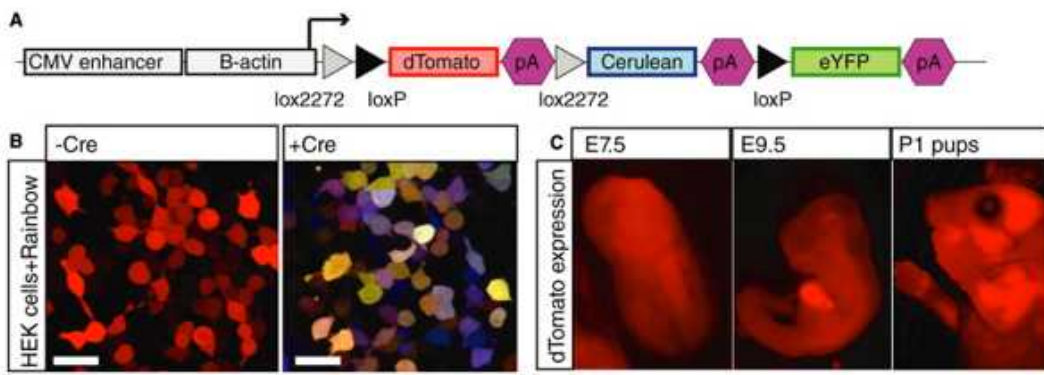
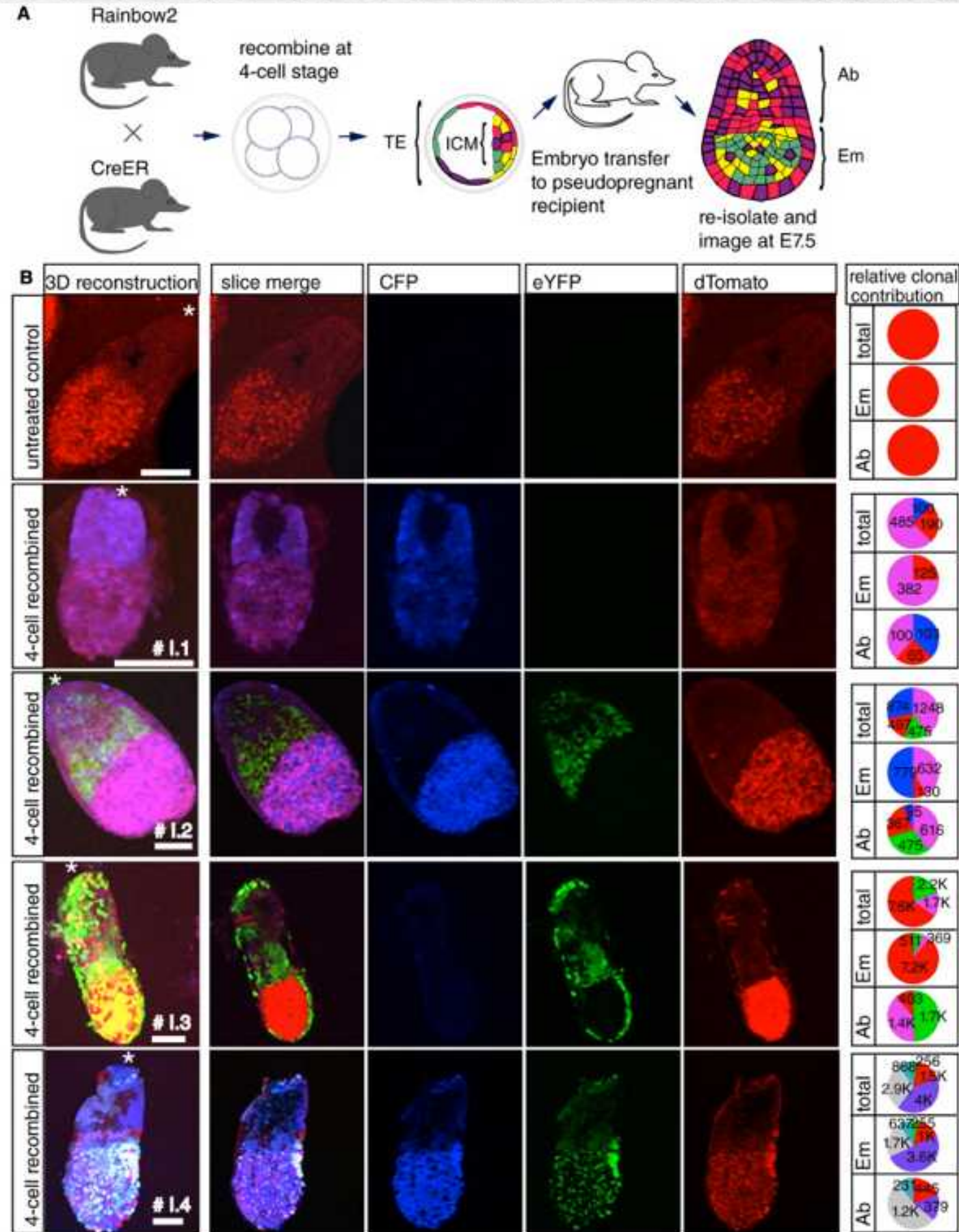


Figure 1. A Mouse for Rainbow Lineage Tracing(A) The *Rainbow* construct is shown.(B) *Rainbow* recombination after cotransfection with Cre into HEK cells is shown.(C) dTomato expression at E6.5, E9.5, and in P1 Rainbow2 pups is shown. See also Figure S1.





UCDAVIS

MOUSE BIOLOGY PROGRAM



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, hprt gén bejuttatás)
- Oliver Smithies (homológ rekombináció humán sejtekben, mutáns hprt gén javítás)

Transzgénikus állatok előállítási lehetőségei

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

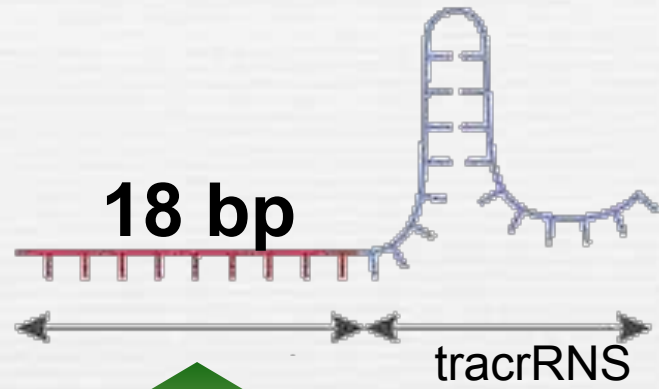
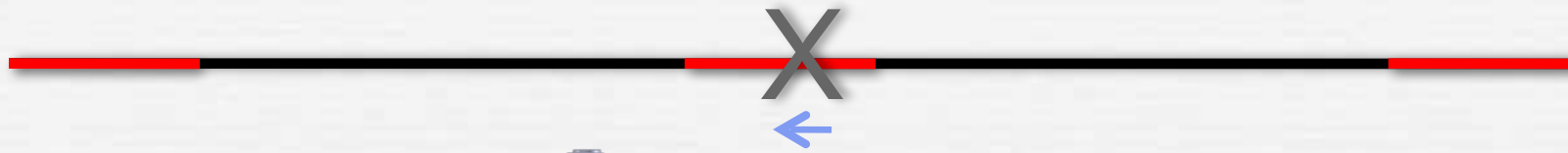
GENOM EDITÁLÁS CRISPR/CAS9

CRISPR konstrukció

1. Exon

2. Exon

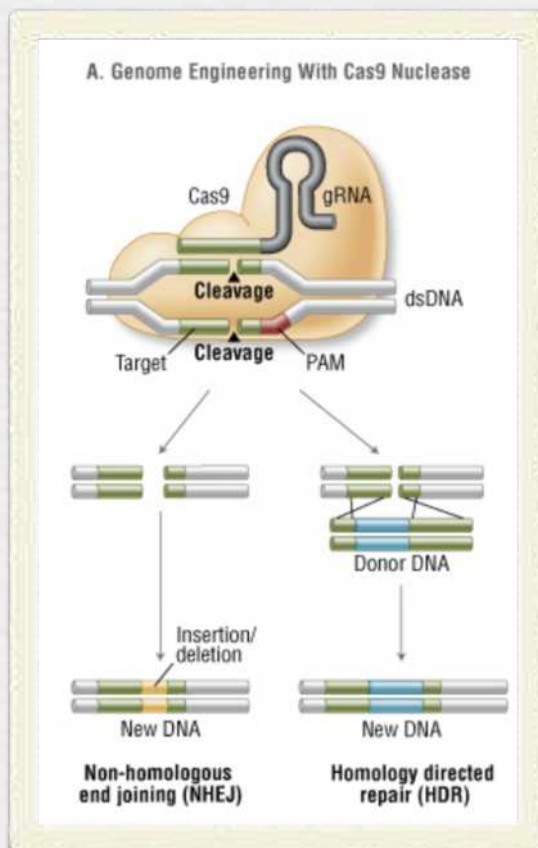
3. Exon



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

Cas9
mRNS
150 ng/ul

Off target helyek
száma:
78
génben:
0



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



Ivarszervi kimérák létrehozására alkalmas őssejtvonalak genom editálása madarakban

EGK X



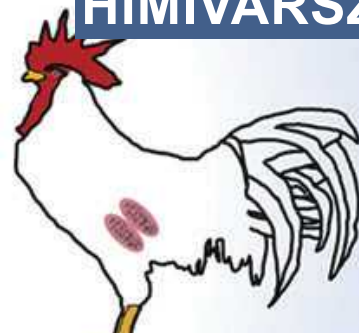
HH13-14



HH28

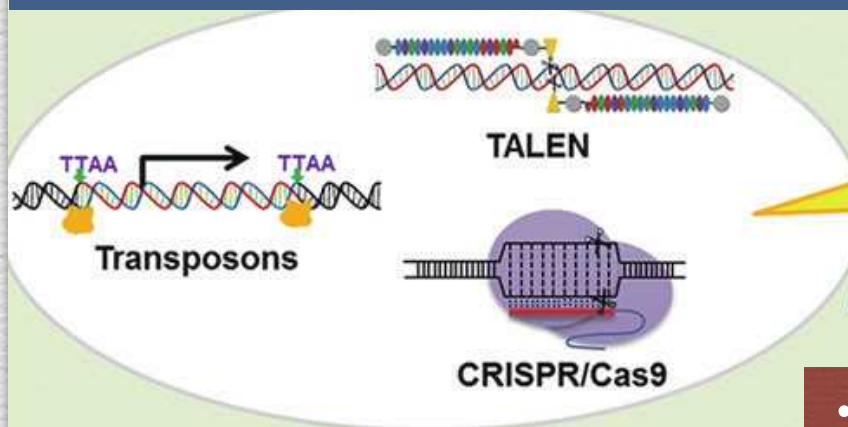


HÍMIVARSZERV

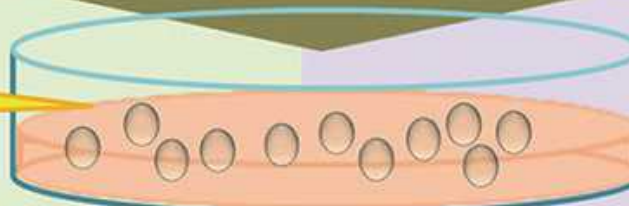


IVARSEJT KIMÉRA KÉPZÉSRE ALKALMAS
ŐSSEJTEK

PGC IZOLÁLÁS KIHALÁSSAL
VESZÉLYEZTETETT FAJOK EMBRIÓIBÓL



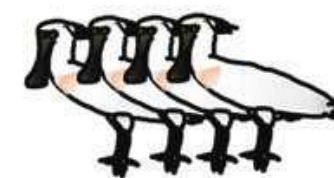
Genetic modification



in vitro PGC tenyészetek

Germline chimera system

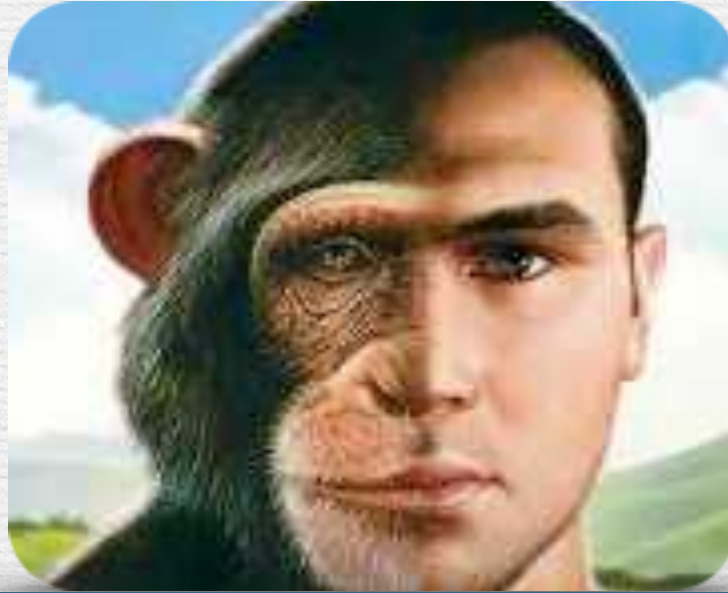
Interspecies germline chimera system



ÁLLATMODELLEK
LÉTREHOZÁSA

GÉNBANKOK
LÉTREHOZÁSA PGCK
FELHASZNÁLÁSÁVAL

Növény-állat-ember kimérák



Csupán a filmekben léteznek



Fajok közti kimérák

Két különböző faj embrióiból keletkezett, mindkét faj embriójából származó sejteket tartalmazó állatok



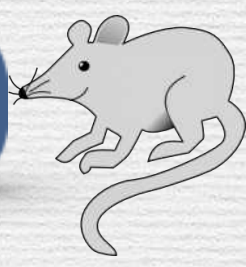
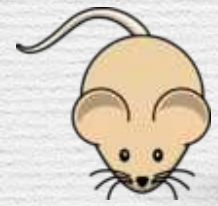
birka-kecske kiméra

MacLaren LA: Inter- and intraspecific placentae in sheep, goats and sheep-goat chimaeras. JComp Pathol. 1992



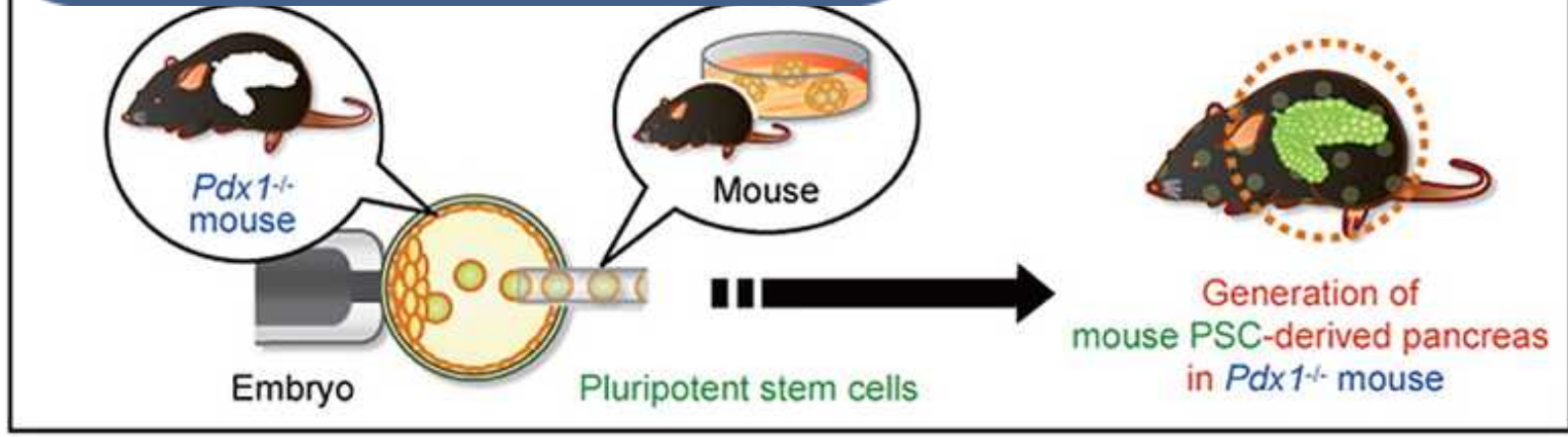
csirke-fürj kiméra

Phillips MT : Analysis of cranial neural crest distribution in the developing heart using quail-chick chimeras. Circ Res. 1987



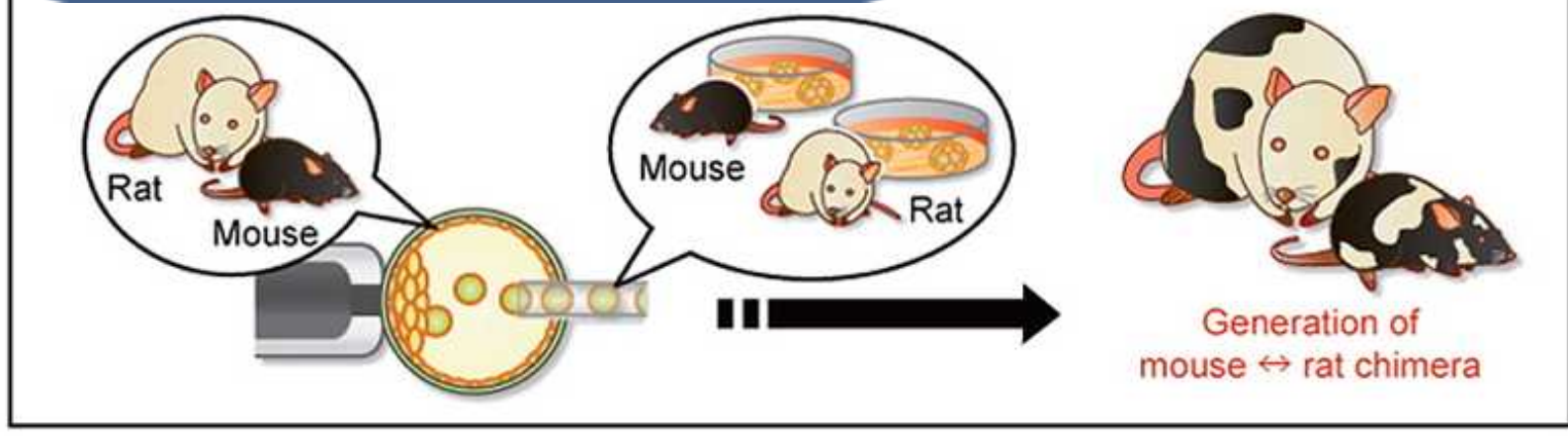
Fajok közti kimérák - szervátültetéshez

egér - egér kimérák

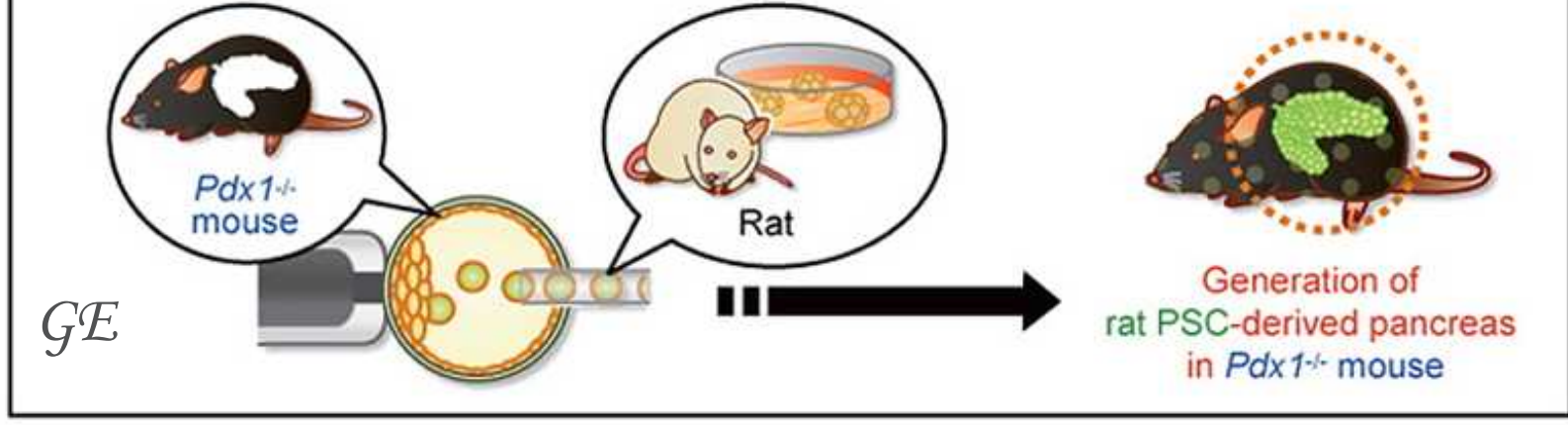


Kobayashi T.: Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. Cell., 2010

egér - patkány kimérák



egér - patkány kimérák



patkány ESC eredetű
hasnyálmirigy
növekedése egérben

GE



Fajok közti szervátültetés

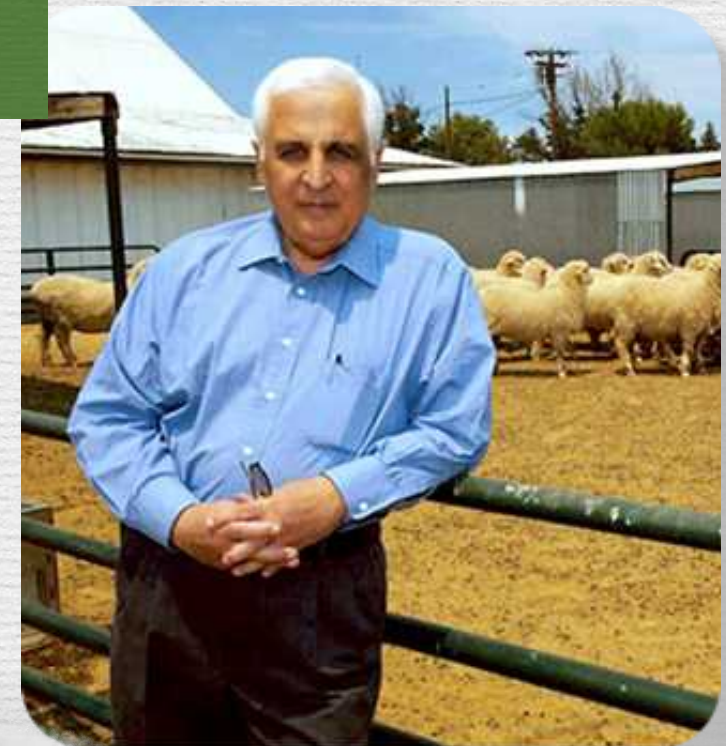


Iranian scientist creates world's first human-sheep chimera

Tehran, Apr. 02 (SINA) - An Iranian scientist has successfully created the world's first human-sheep chimera through bringing to life a sheep that has half human organs. Professor Esmail Zanjani at the University of Nevada's School of Medicine has successfully created the world's first sheep which has the body of a sheep but half-human organs.

humán MSC eredetű
hasnyálmirigy a
kiméra juhokban?

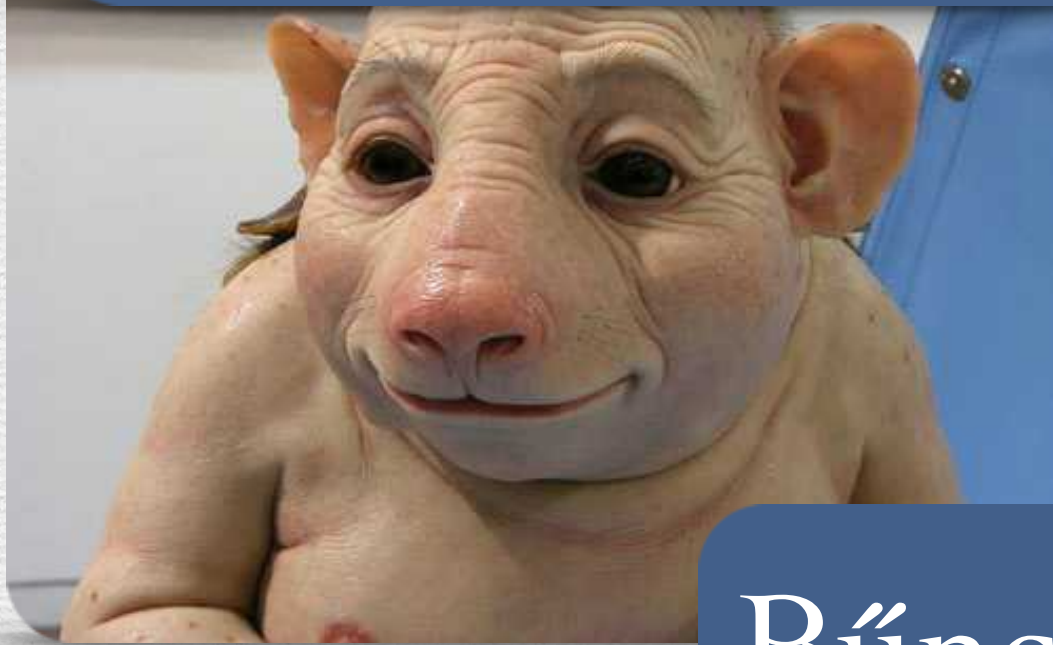
*Esmail Zanjani
University of Nevada*



kiméra birkák, 1-2% humán BMC, MSC
eredetű sejtet tartalmaznak a kimérák a
májban, tüdőben, agyban



Állati és **emberi** beágyazódás előtti embriókból létrehozott kimérák?



around in lab could create 'Planet of Apes'

Published on July 22, 2011 by Michael Vall - No Comments



Like 10 likes. Sign Up to see what your friends like.



Source: IE

Action is needed now to prevent nightmarish 'Planet Of The Apes' science ever turning from fiction to fact, according to a group of eminent experts.

Their report calls for a new rules to supervise sensitive research that involves humanising animals.

One area of concern is experiments which the report describes as

...ing compelling scientific justification or raise ...g ethical concerns" and should be

...e given is the creation of primates with ... human characteristics, such as

speech.

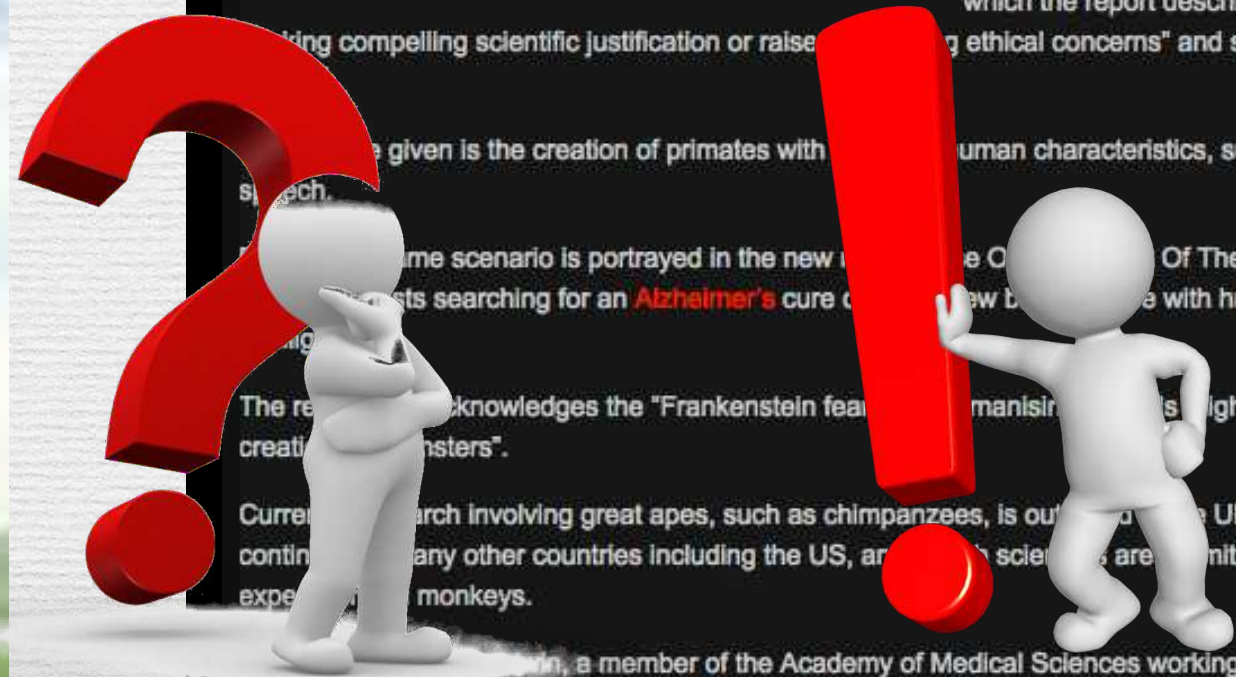
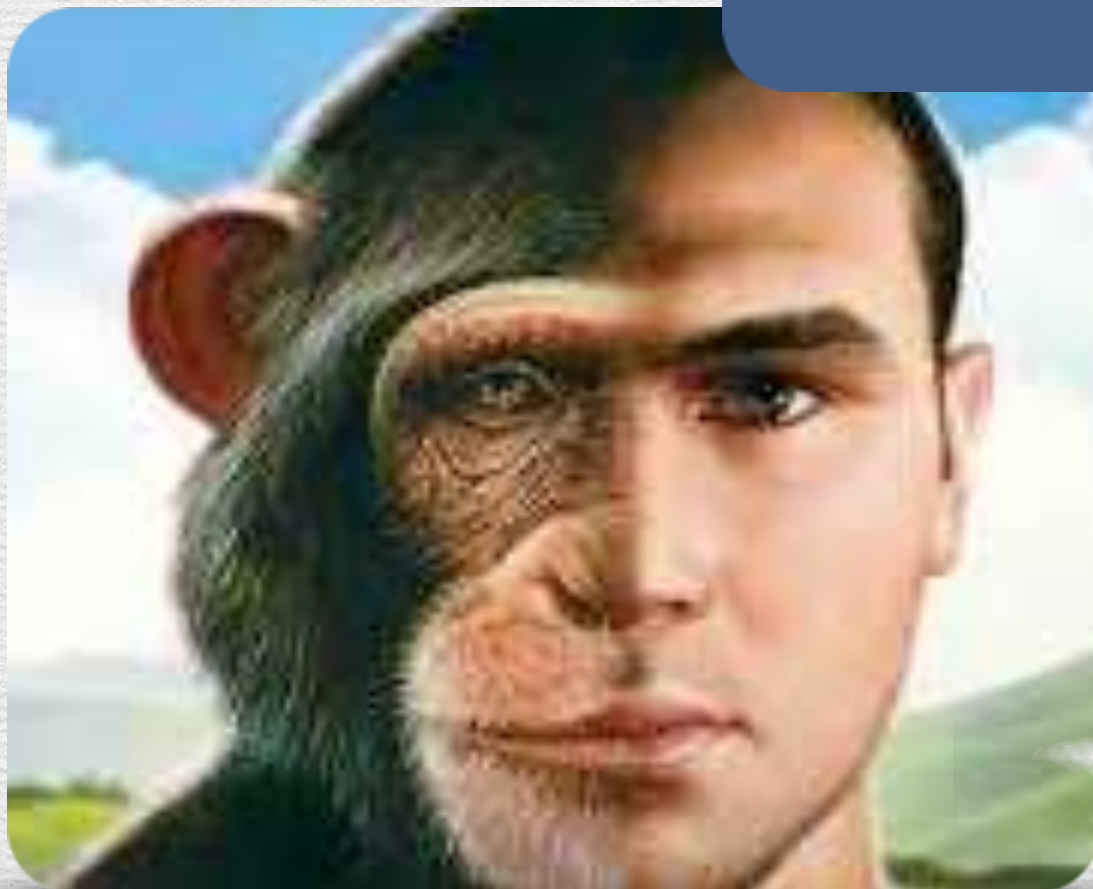
...me scenario is portrayed in the new ... Of The Apes', in ...
...sts searching for an **Alzheimer's** cure ... new ... with human-like

The re ... acknowledges the "Frankenstein fear ... manising ... might lead to the ...
creati ... nsters".

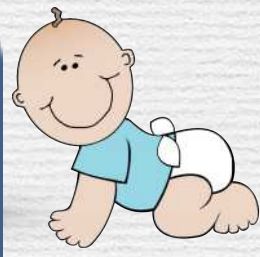
Curre ... arch involving great apes, such as chimpanzees, is out ... UK. But it ...
contine ... any other countries including the US, an ... sci ... are ...mitted to ...
exper ... monkeys.

...in, a member of the Academy of Medical Sciences working group that produced the report, said the possibility of humanised apes should be taken seriously.

Bűncselekmény



Precíziós nemesítés - génszerkesztett malacok - CRISPR/CAS9



egér-



Rat

patkány
kim



Rat

human-s
kimé



Human

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.

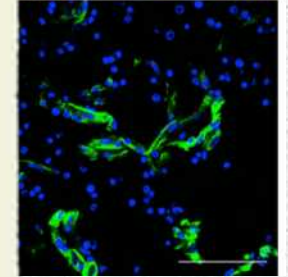
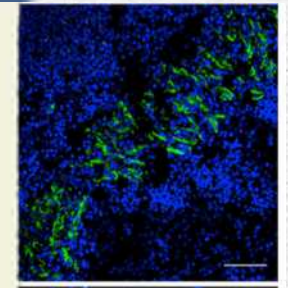
Preparing for implantation

"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.



és embriókban

s őssejtek
képesek
rha vagy
állapotú
ban kis
k meg a
a kiméra
ött.