



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

Miosztatin génkiütött házinyúl létrehozása genomeditálással

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Skoda Gabriella

Gödöllő

2021

A doktori iskola

megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Állattenyésztés-tudomány

vezetője: **Dr. Mézes Miklós DSc., az MTA rendes tagja**

Tanszékvezető, egyetemi tanár

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Élettani és Takarmányozástani Intézet

Takarmánybiztonsági Tanszék

témavezető: **Dr. Hiripi László PhD.**

Tudományos tanácsadó, csoportvezető

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Genetika és Biotechnológia Intézet

Állatbiotechnológia Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, KITŰZÖTT CÉLOK

Napjainkra a biotechnológia eszközei széles körben felhasználható segítséget nyújtanak a különböző szervezetekben lejáró folyamatok megértéséhez, gének, fehérjék feladatainak feltáráshoz. Az 1980-as évekre visszanyúló transzgenikus állat előállítás ebben rendkívül nagy szerepet játszik, mely az évek során megannyi génmódosítást előidéző eszközzel gyarapodott. Az elmúlt évtizedben kifejlesztett ún. újgenerációs genomszerkesztő módszerek használatával mára már jóval egyszerűbben lehet génmódosításokat előidézni a különböző sejtekben, élőlényekben.

Munkám során a baktériumok és archeák „immunrendszeréből” adaptált CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9) és a szintén bakteriális eredetű TALEN (transcription activator-like effector nuclease) rendszerrel kísértem meg miosztatin génkiütött (KO) házinyúl létrehozását.

A házinyúl a biotechnológia fontos alanya, mely méretéből és fiziológiás jellemzőiből adódóan kiválóan alkalmazható különböző humán betegségek modellezésére, gének funkciójának vizsgálatára.

Doktori munkám során génkiütött nyúlban kívántam vizsgálni a miosztatin gén hiányában fellépő elváltozásokat két különböző genetikai háttéren. Már számos természetben előforduló, illetve mesterségesen létrehozott miosztatin hiányos állatfajról számoltak be, melyek alapján elmondható, hogy a miosztatin az izomnövekedés negatív szabályozó faktora, amelynek köszönhetően kialakul az egyedek fajra jellemző vázizomzata. Hiányában számos fajnál „dupla-izomt” fenotípus megjelenését tapasztalták. A vázizomzat mellett jelen van a szívizomzatban, és idegrendszeri miosztatin expressziót is kimutattak patkányban, melynek pontos szerepe még nem tisztázott, ezért további kutatások szükségesek ennek feltáráására. Továbbá, a zsírszövet alakulására, a csontok fejlődésére is hatással van, emellett hiányában az izomzat összetétele is megváltozhat egyes fajokban. A miosztatin a placenta glükóz anyagcseréjében és feltehetően egyéb tápanyagok felvételének szabályozásában is szerepet játszik, de ezek részletes folyamata még nem ismert.

Miközben folytak kísérleteink, más csoportok is publikáltak miosztatin génkiütött nyúl létrehozásáról. Az egyik esetben az utódok megnövekedett testtömege mellett jelentős arányban megjelenő megnagyobbodott nyelv szindrómát tapasztaltak. A másik cikk az utódok megnövekedett izomtömegéről, és annak jellemzéséről számol be, illetve az ezáltal kialakult ellési problémák megjelenését említi.

A miosztatin szervezetben betöltött szerepének részletesebb megismerése nagy segítséget jelenthet az izomvesztéssel járó megbetegedések terápiás kezeléseinek fejlesztésénél, vagy akár a „hobby” testépítés folyamatának elősegítésénél. Emellett mezőgazdasági szempontból is érdekes lehet a miosztatin hiánnyal összefüggő jellegek vizsgálata nagyobb izomtömeggel rendelkező, gyors izomtömeg növekedésre szelektált nyúlfaftán.

A jövőben amellet, hogy a létrehozott állatok az izomzat betegségeinek vizsgálatában, izomfejlődésbeli rendellenességek megismerésében játszhatnak szerepet, az idegrendszeri elváltozások és placenta anyagcsere zavarainak modellezésére is alkalmasak lehetnek.

A miosztatin hiányos nyúl létrehozás mellett a csoportunk hosszú távú célja, hogy placenta-specifikus gén inaktiválással vizsgálhassuk a miosztatin szövetspecifikus szerepét. Mivel a placenta-specifikus géntranszfer módszere még nem volt kidolgozva nyúlban, ezért doktori témám során olyan zöld fluoreszcens fehérje (GFP) riportergénnel ellátott placenta-specifikus modell rendszer létrehozása is cél volt, mellyel könnyen lehet a későbbiekben vizsgálni a miosztatin mediált extraembrionális anyagcserét.

1.1. Célkitűzések

Célul tűztem ki a házinyúl miosztatin génjének kiütését genomeditáló technológiák alkalmazásával.

Célkitűzéseim között szerepelt miosztatin mutáció létrehozása Hycol és Pannon fehér nyúlfaftában, majd a keletkezett fenotípusok faftánkénti összehasonlító vizsgálata. Tanulmányozni kívántam a különböző genetikai háttér adott génkiütésre gyakorolt hatását nyúlban.

Emellett céloom volt GFP riportergénnel ellátott placenta-specifikus modellrendszer kidolgozása, mely a jövőben a placenta működéséhez köthető gének tanulmányozásában, a méhlepény betegségeinek vizsgálatában lehet alkalmazható.

2. ANYAG ÉSMÓDSZER

A genomszerkesztett nyúlvonalak létrehozásánál Hycote hibrid húsnyúllal, és gyors izomtömeg növekedésre szelektált Pannon fehér nyúlfajtával dolgoztam. A lentivírus alapú kísérleteket Új-zélandi fehér nyúlfajtán végeztem. Az állatkísérletek szabályozásáról szóló 40/2013-as kormányrendelet betartása mellett a MATE Genetika és Biotechnológia Intézetének épületében található konvencionális állatházban kerültek elhelyezésre az állatok. Egyedi ketreces tartás mellett, 18 ± 3 °C hőmérsékletet, 12 óra megvilágítást, *ad libitum* takarmányozást, és folyamatos ivóvíz ellátást biztosítottunk számukra. A nyulakkal történő kísérleteket a megfelelő állatkísérleti engedélyek (Eng. szám: PEI/001/329-4/2013) birtokában végeztem el.

A legalább 18 hetes, körülbelül 3,5 kg testtömegű embriódonor nőtény nyulak ivarzásának indukálására 120 nemzetközi egység PMSG injekciót alkalmaztam, melyet intramuszkulárisan juttattam az állatokba. Az ovuláció kiváltásának elősegítésére a PMSG kezelés után 72 óra elteltével 180 nemzetközi egység hCG fecskendeztem a nőtény nyulak fülvénájába. A hCG beadását követően 10 percen belül mesterségesen termékenyítettem a nőtény nyulakat.

A termékenyítést követő napon a nőtények petevezetőjét eltávolítottam. A petevezetőt ki-preparáltam, a zigótákat 20%-os PBS:FCS médiummal történő petevezető atmoszással nyertem ki.

A miosztatin gént célzó genomszerkesztő konstrukciók mRNS-ét citoplazmába történő mikroinjektálással juttattam egysejtes nyúl embriókba.

A Kvell Krisztián és munkatársai által összeállított GFP-t tartalmazó lentivírus vektor mikroinjektálása az embriók perivitellináris terébe történt.

Az embrió tesztek követően a specifikus genomszerkesztő konstrukciókkal mikroinjektált embriókat álvemhes nőtények petevezetőjébe juttattam vissza laparoszko-pos technikával. A létrehozott állatok vizsgálata a következő módszerekkel történt.

A megszülető utódok közül T7 endonukleáz assay segítségével és szekvencia analízissel válogattam ki a mutációkat hordozó egyedeket. Két különböző genetikai háttérrel rendelkező alapító állatot választottam továbbtenyésztésre.

Fenotípusos változásokat keresve vizsgáltam a testtömeg gyarapodásukat és az izom-zsír arányuk alakulását CT segítségével. Végeztem hisztológiai vizsgálatokat a hipertrófia és hiperplázia meglétére vonatkozóan. Molekuláris jellemzésük során a miosztatin expressziós szintjét kvantitatív PCR segítségével vizsgáltam, illetve az alapító állatoknál off-target analízist végeztem az esetlegesen nem célgenen kialakuló mutációk szűrésére.

A lentivírus alapú transzgenezis során -a hatékonyságvizsgálatra és a promóter-hatás tanulmányozására irányuló embrióteszteket követően- az aszinkron módon hormonkezelt álvemhes nőtények petevezetőjébe juttattam a 8-16 sejtes állapotban mikroinjektált embriókat. A magzatokat és a hozzájuk kapcsolódó szöveteket 14,5 napos korban vizsgáltam RT PCR-rel, és fluoreszcens mikroszkópiával.

3. EREDMÉNYEK

Először TALEN technikával igyekeztünk célzott mutációt előidézni a nyúl miosztatin génjén, de nem detektáltunk módosítást az adott génszakaszon sem a megszülető utódokban, sem az *in vitro* blasztociszta stádiumig tenyésztett embriókban. Két, a miosztatin gén első exonjára tervezett TALEN konstrukció eredménytelen alkalmazása után váltottunk az akkoriban terjedőben lévő CRISPR/Cas9 módszerre.

Az embriókban való tesztelés után, a leghatékonyabbnak (41%) vélt sgRNS-t alkalmaztam a génkiütött nyúl előállítás során. A kiválasztott konstrukció a megszülető utódok 20%-ánál indukált monoallélikus mutagenézist. A vonalalapításra szánt két alapító egyedben az előidézett deléciók megakadályozták az adott allélről történő fehérje expressziót, a heterozigóta állatokban a vad típusú állatokhoz képest fele mennyiségű miosztatin mRNS szintet detektáltunk. Vizsgálataink azt támasztották alá, hogy a prediktált off-target helyeken nem történt változás, mely befolyásolta volna az állatok fenotípusát.

Az általunk létrehozott utódok egyike sem mutatott a már publikált miosztatin KO nyulakéhoz hasonló, szignifikánsan megnövekedett izomtömeget, vagy megnagyobbodott nyelv méretet.

A miosztatin génen 11 bp delécióval rendelkező alapító nőstény állat Pannon fehér genetikai háttérrel rendelkezett, mely a tenyésztési folyamatok eredményeként jelentős izomtömeggel bírt. Ennél az állatnál a zsírszövet felhalmozásban figyeltünk meg változást, jelentősen csökkent zsír/izom arányt detektálunk CT segítségével a kontroll egyedekhez képest. Feltehetően az állat fitnessét csökkentő kevés zsírszövetraktárhoz köthető a tapasztalt vemhesülési nehézség is. A három mesterséges termékenyítésből két megszülető utód is elpusztult a születés után pár órával.

A miosztatin hiányhoz köthető új fenotípus megjelenését tapasztaltuk: körülbelül három és fél hónapos korban jelentkező, főleg hátsó végtagokat érintő bénulást észleltünk, melynek állapota az idő előrehaladtával folyamatosan súlyosbodott.

A jelenségre a NÉBIH Emlős-, Vad- és Baromfibetegségek laboratóriumából származó megfigyelés adott magyarázatot, miszerint heveny idegrost elfajulás alakult ki a combizomzatban. A vázrendszerben és az izomzatban kóros jellegű elváltozást nem figyeltünk meg.

Ezek következtében sajnos nem sikerült vonalat alapítani ebből az állatból.

A 14 bp deléciót tartalmazó hím egyed Hycole fajtából származott, ennek tovább tenyésztése sikeres volt, de homozigóta egyedeket egyik F2-F3 alomban sem azonosítottunk. A megszülető utódok között nem tapasztaltunk jelentős zsírszövet csökkenést, mint ahogy azt a Pannon fehér alapító esetében sem észleltük.

A csökkent miosztatin szinttel rendelkező állatok egyes egyedeinél megfigyeltük a fentebb említett mozgással kapcsolatos tüneteket. A mozgási nehézségek minden esetben a hátsó végtagokkal kezdődtek, és az idő előre haladtával a törzs, és mellső végtagok is érintetté váltak. Nem tapasztaltunk eltérést a kontroll állatokhoz képest a termékenységgel, vemhességgel, utódgondozással kapcsolatos tulajdonságokban.

A miosztatin pontos szerepe a placenta glükóz-metabolizmusában máig nem teljesen tisztázott. A nyúl, mint modellállat sok szempontból alkalmasabb a placenta betegségeinek, molekuláris folyamatainak vizsgálatára, mint az egér vagy patkány modellek. Ezért kifejlesztettünk olyan lentivírus alapú, extraembrionális szövet-specifikus géntranszferrel előállított nyúlmodell rendszert, mely alkalmas a placenta miosztatin-közvetített folyamatainak részletes vizsgálatára.

Az alkalmazott lentivírus konstrukciónk EF1 konstitutív promóter által vezérelt zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) tartalmazott. Extraembrionális szövet-specifikus GFP expressziót detektáltunk nyolc darab 14,5 napos nyúl magzathoz kapcsolt szövetben (placentában és szikzacskóban). A magzatok egyikében sem történt transzgén kifejeződés. Négy placenta és két szikzacskó mutatott különböző mértékű GFP expresszót. Emellett mintánként eltérő arányú mozaikosságot figyeltünk meg.

3.1. Új tudományos eredmények

1. Sikeresen indukáltam mutációt Hycote és Pannon fehér nyúlajták miosztatin génjén CRISPR/Cas9 módszer alkalmazásával.
2. A világon elsőként, csökkent miosztatin szinthez köthető *nervus tibialis* degenerációt detektáltam nyúlban, mely mozgásproblémák kialakulásához vezetett. Ezáltal igazoltam a miosztatin perifériás idegrendszerben betöltött szerepének fontosságát.
3. Bizonyítottam, hogy a részleges miosztatin hiányos állapot házinyúlban testzsír csökkenést, az izom-zsír arány megváltozását okozhatja nőstény állatokban, ami termékenységi problémákat is előidézhet.
4. Először igazoltam, hogy a lentivírus alapú transzgenézis segítségével előállított, extraembriónális szövet-specifikus génexpresszió nyúlban kialakítható.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A doktori munka középpontjában a miosztatin gén, illetve a működésének hiányában kialakult elváltozások vizsgálata állt. Ennek megvalósításához génkiütött Hycole és Pannon fehér nyúl fajtákat kívántunk létrehozni TALEN, illetve CRISPR/Cas9 genomeditáló módszerrel.

Ezek a technikák ugyan sokkal gyorsabb, hatékonyabb, specifikusabb DNS szerkesztést biztosítanak, mint az ezeket megelőző génmódosítási módszerek, de nem minden esetben váltják be a hozzájuk fűzött reményeket.

A meghiúsult TALEN rendszerrel történő kísérleteket követően sajnos az első két CRISPR/Cas9 konstrukció sem eredményezett mutagenezist embriókon. A TALEN esetében előfordulhat, hogy a konstrukciók nem megfelelő koncentrációban történő alkalmazása állt az alacsonyabb utódszám, ill. a mutációk hiányának a hátterében. Esetleg tervezési, illetve konstrukció összerakási hiba léphetett fel, vagy ezen apró okok összessége eredményezett szuboptimális működést. Egyes CRISPR/Cas9 konstrukciók meghiúsult működésének hátterében, feltehetően az a jelenség állhat, hogy a Cas9 fehérje nem minden esetben képes a cél-DNS szakasztól való leválasztásra.

A további CRISPR/Cas9 konstrukciók 21-41%-os hatékonysággal idéztek elő módosításokat az embriók célzott génszakaszain. A legnagyobb hatékonyságúnak vélt sgRNS/Cas9 komplex (CRISPR2) az embriótranszfert követően, a megszülető utódok 20%-ában idézett elő mutációt a miosztatin gén második exonján. A laboratóriumunk további genomszerkesztési kísérletei során viszont javasolnám két CRISPR sgRNS egyszerre történő mikroinjektálását, mely alkalmazás bizonyítottan magasabb hatékonysággal működik.

Az embriótranszferből születő almokban tíz utód rendelkezett monoallélikus mutációval a miosztatin gén célzott szakaszán. A kiválasztott két alapító állat genomjának off-target vizsgálata során nem detektáltunk módosult szekvenciát a sgRNS célszekvenciájához leghasonlóbb kilenc DNS szakaszon. Úgy véljük, hogy a megváltozott tulajdonságok minden esetben a csökkent miosztatin fehérje szinttel hozhatók összefüggésbe, és nem a kis valószínűséggel létrejövő nem vizsgált off-target mutációk miatt alakultak ki a független vonalakban.

A Pannon fehér nőténynél, és a Hycole vonal egyes egyedeinél a csökkent miosztatin szinttel kapcsolatba hozható hátsó végtagi bénulással kezdődő mozgásproblémát tapasztaltunk. Feltételezésünk szerint az alacsonyabb miosztatin szint hatással van a motoneuronok mielinizációjára, ezáltal az akciós potenciál terjedése zavart szenvedhet. Ezt támasztotta alá az megfigyelés

is, mely szerint az ilyen fenotípussal rendelkező állatoknál a *nervus tibialis* heveny idegrostel-fajulása alakult ki, ugyanakkor a (comb)izomzatban és a vázrendszerben kórjelző értékű elváltozást nem történt.

Ezek alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a csökkent miosztatin szinthez köthető korlátozott mozgás oka kizárólag idegrendszeri eredetű. Az irodalomban találunk már patkány központi idegrendszerben történő miosztatin expresszió kimutatásáról szóló vizsgálatot, de a fehérje idegrendszerben betöltött szerepéről még nem sokat tudunk.

Komputertomográfias vizsgálataink azt mutatták, hogy a Pannon fehér alapító nőtény jelentősen lecsökkent zsírszövet raktárral rendelkezett. Feltételezésünk szerint erre a jelenségre vezethető vissza alacsonyabb vemhesülési képessége is. A genomszerkesztett Hycole fajtában nem figyeltünk meg ennyire drasztikus módon lecsökkent zsírszövet állományt, és nem detektáltunk szaporodással, utódgondozással kapcsolatos problémát sem. Feltételezhetően a húsipari tenyésztés során gyors izomtömeg növekedésre szelektált, az általános anyagcserét magasabb fokon folytató Pannon fehér fajta zsír metabolizmusát a miosztatin részleges hiánya is könnyebben fel tudta borítani. Emellett az is magyarázat lehet, hogy a CT-vel szelektált húsipari állományban olyan mennyiségű lett az izomzat, mely önmagában is alacsonyabb termékenyülést okoz (valószínűleg a csökkent testzsír százalék miatt). A megjelenő káros fenotípusok (nehezebb vemhesülési képesség, mozgásszervi problémák) alapján elmondhatjuk, hogy tenyésztési szempontból nem ideális ennek a módszernek az alkalmazása izomtömeg növekedésre szelektált fajtákon.

A Pannon fehér esetében tapasztalt, fentebb leírt tulajdonságok miatt nem sikerült az alapító állat továbbtenyésztése, a génmódosított vonal létrehozása.

A Hycole hím szaporodásbiológiai tulajdonságaiban nem tapasztaltunk eltérést, de továbbtenyésztése során nem azonosítottunk homozigóta egyedeket egyik alomban sem. Valószínűsítjük, hogy esetünkben az előidézett mutáció olyan formában jelent meg, mely homozigótákban élettelen összeegyeztethetetlen változásokat idézett elő embrionális, vagy magzati korban. Más miosztatin KO nyulakkal kapcsolatos kísérletekben születtek homozigóta egyedek is. Ennek magyarázata lehet, hogy azokban az esetekben nem húsnyúl fajtán idéztek elő módosításokat, hanem laboratóriumi körökben általános használatos Új-zélandi fehér fajtát használtak. A homozigóta állatok hiánya felveti a kérdést, hogy vajon mikor és miért pusztulhattak el a Mendeli öröklődés szabálya alapján várható homozigóta egyedek. Ennek feltérképezésére további vizsgálatok szükségesek, melyekkel jobban megérthetnénk a miosztatin embrionális, illetve magzati korban betöltött szerepét.

A Pannon fehér nőténynél a miosztatin hiány nagyobb testtömeget eredményezett a kontroll állatokhoz képest, egészen a nem várt fenotípus kialakulásáig. Az utódok megszületésének

hányában azonban statisztikailag értékelhető szignifikáns testtömeg különbséget nem tudtunk kimutatni.

A Hycole alapú miosztatin mutáns vonalnál nem tapasztaltunk szignifikáns növekedést a heterozigóta egyedek testtömegében. Bár az alapító hím CT alapján számított izom térfogata a legnagyobb volt a kontroll csoporthoz képest, de ezt később nem tudtuk megerősíteni utódainak vizsgálataival. A miosztatin hiányra jellemző szuperizmolt fenotípust nem figyeltünk meg egyik heterozigóta állatunk esetében sem. Valószínű, hogy az előidézett mutációk csak homozigóta formában eredményeztek volna jelentős izomtömeg növekedést, szuperizmolt jelleget, az irodalmi adatoknak megfelelően.

Egyes publikált esetekben a szuperizmolttság nem várt, káros tulajdonság megjelenésével is együtt járt, például a nyelv olyan mértékű megnagyobbodásával, mely korai elhulláshoz vezetett. Kísérleteink során egyik utódnál sem figyeltünk meg hasonló fenotípust.

Úgy tűnik, hogy a fajtaválasztás befolyásolhatja a miosztatin szint csökkenés következményeinek kialakulását. Az eleve nagyobb fejlődési potenciállal rendelkező Pannon fehér fajtában eltérő módon tudott érvényesülni a miosztatin hiányának hatása, az idegrost gyulladás már az alapító egyednél kialakult, és az adipogenezis is zavart szenvedett. Nemcsak a vázizomhoz köthető zsír raktárak felhalmozása csökkent, hanem a test számos szövetének zsírtartalma is megváltozott. Ennek következménye lehet a myelin hüvelyek nem megfelelő alakulása, és az idegrendszeri problémák megjelenése.

A Hycole vonal tenyésztése során is megjelent ez a fenotípus már az F1 generáció első alomjának egy hím állatában, de az idegrost elfajulás nem mindig járt együtt csökkent zsírszövettel. A jelenség ivarfüggetlenül, almonként legfeljebb egy-két állatnál alakult ki. A tenyésztés során a Hycole fajtához kevert Pannon fehér genetikai hátterének hatásával sem mutatott korrelációt az említett tulajdonság megjelenése. Jellemzően felnőtt, és időskorban alakult ki, kisnyulak esetében még nem volt megfigyelhető. Az idegrendszeri elváltozások kialakulásának háttere nem tisztázott, részletes megismerésére további kutatásokra lenne szükség.

Ezen eredményeink alátámasztják, hogy a hosszú évekig/évtizedekig tartó tenyésztési munka során kialakított izomtömeget, mint biológiai tulajdonságot nem lehet a végletekig növelni mellékhatások nélkül, ha egyáltalán lehet további pozitív hatást előidézni. Hasonló jelenség figyelhető meg transzgenikus pisztrángok esetében is, ahol a növekedési hormon túlexpresszáltatásával vad pisztrángok mérete jelentősen növelhető volt, de a tenyésztett állatoknál már nem tudtak szignifikáns méretnövekedést elérni.

A miosztatin fontos szerepet tölt be a placenta anyagcserefolyamatainak szabályozásában is (Peiris and Mitchell 2012), de heterozigóta Hycole nőstény állataink esetében nem figyeltünk

meg megváltozott termékenyülési/vemhesülési képességet, utódaik a vad típusú almok jellemzőivel bírtak.

A miosztatin placentában betöltött szerepének vizsgálatára is alkalmas extreembrionális szövet-specifikus modellrendszert dolgoztunk ki nyúlban, melyet lentivírus alapú transzgenezissel valósítottunk meg. Ez a rendszer bizonyítottan csak az extraembionális szövetekben eredményezett transzgén expressziót. A miosztatin extraembrionális szövet-specifikus inaktiválása mellett akár lehetőség van a riportergén miosztatinra való cseréjével, (vagy mögé építésével) szövet-specifikus miosztatin szint növelésre, mely lehetőséget teremt a placenta miosztatin mediált folyamatainak vizsgálatára.

A miosztatin KO nyulak, élelmiszeripari termékként való forgalmazását egyelőre nem javasolnám. Véleményem szerint a hosszú tenyésztési folyamatok eredményeként létrehozott húsnyúl fajták testtömeg gyarapodásánál nem nyújtott szignifikánsan többet az általunk létrehozott transzgenikus nyúl, ellenben előfordulhat a tenyésztés szempontjából kevésbé előnyös tulajdonságok (nehéz termékenyülés, idegrendszeri zavarok általi mozgásproblémák) megjelenése. Esetlegesen előnyt jelenthet a többvonalas hibrid nyulak kiváltása olyan módon, hogy a nagyon jó anyai tulajdonságokra szelektált vonalon végezzük el a miosztatin kiütését, így létrehozva olyan fajtát, mely megfelelően izmolt, és egyben jó anyai tulajdonságokkal rendelkezik. Ilyen nyúlvonalon a negatív hatások még valószínűleg nem jelennének meg. Ennek tesztelése azonban további kísérleteket igényel.

5. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

1. *Impaktfaktoros folyóiratban megjelent elsőszerzős publikáció*

Skoda Gabriella, Hoffmann Orsolya Ivett, Gócza Elen, Bodrogi Lilla, Kerekes Andrea, Bősze Zsuzsanna, Hiripi László (2017) „Placenta-specific gene manipulation in rabbits.” *Journal of Biotechnology* 259 pp. 86-90, 5 p.
IF=3,163

Skoda Gabriella, Kerekes Andrea, Hoffmann Orsolya Ivett, Lipták Nándor, Tatiana Flisikowska, Angelika E. Schnieke, Donkó Tamás, Meinrad Odermatt, Atkári Tamás, Bősze Zsuzsanna, Hiripi László (2021) „Investigation of a new phenotype in myostatin mutated rabbit created by CRISPR/Cas9 method.” *Gene*. Publikálásra beküldve
IF=2,984

2. *Impaktfaktoros folyóiratban megjelent nem elsőszerzős publikációk*

Petheő Gábor L., Kerekes Andrea, Mihálffy Máté, Donkó Ágnes, Bodrogi Lilla, **Skoda Gabriella**, Baráth Mónika, Hoffmann Orsolya Ivett, Szeles Zsolt, Balázs Bernadett, Sirokmány Gábor, Fábrián Júlia R., Tóth, Zsuzsanna E., Baksa Ivett, Kacsokovics Imre, Hunyady László, Hiripi László, Bősze Zsuzsanna, Geiszt Miklós (2021) „Disruption of the NADPH Oxidase 5 Gene Aggravates Atherosclerosis in Rabbits” *CIRCRESAHA*. (2021) 120.318611. Elfogadva
IF=15,211

Pintér Tímea, Geiszt Miklós, Petheő Gábor, Mihálffy Máté, **Skoda Gabriella**, Lipták Nándor, Kerekes Andrea, Bősze Zsuzsanna, Hiripi László, Bodrogi Lilla (2020) „The creation of a multi-allele knockout genotype in rabbit using CRISPR/Cas9 and its application in translational medicine.” *Applied Sciences-Basel*. (2020) 10. 23 Paper: 8508, 14 p. IF=2,474

3. *Impaktfaktor nélküli nemzetközi folyóiratban megjelent publikáció*

Major Péter, Kerekes Andrea, **Skoda Gabriella**, Hiripi László, Bősze Zsuzsanna (2013) „Genetically modified animals as potential genetic resources.” *Slovak Journal of Animal Sciences* (2013) 46: 4 pp. 155-159., 5 p.

4. *Nemzetközi konferencián tartott előadás*

Skoda Gabriella, Kerekes Andrea, Atkári Tamás, Meinrad Odermatt, Tatiana Flisikowska, Hiripi László (2017) „Myostatin knock-out rabbit line generation using CRISPR/Cas9 system.” Magyarország, Eger. In: *Heiszler Zsuzsanna, Hohol Róbert, Éles-Etele Nóra (szerk.) Hungarian Molecular Life Sciences (2017): Programme and Book of abstracts. Budapest, Magyarország: Diamond Congress Ltd., ISBN 978-615-5270-34-5*

Hiripi László, Hoffmann Orsolya Ivett, **Skoda Gabriella**, Bősze, Zsuzsanna (2014) „New generation transgenic techniques in rabbits.” In: *Bene Szabolcs (szerk.) 20th Youth Scientific Forum: University of Pannonia Georgikon Faculty Keszthely, Magyarország: Pannon Egyetem Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar, (2014) pp. 1-6., 6 p.*

5. Hazai konferencián tartott előadás

Skoda Gabriella, Kerekes Andrea, Hoffmann Orsolya Ivett, Bősze Zsuzsanna, Hiripi László (2016) „Célzott genom módosítás a nyúl miosztatin génjében.” In: *Gócza Elen; Kiss Erzsébet; Maráz Anna; Várallyay Éva (szerk.) Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája, Gödöllő, Magyarország: Szent István Egyetemi Kiadó, (2016) pp. 26-26., 1 p.*

Skoda Gabriella, Kerekes Andrea, Hoffmann Orsolya Ivett, Bősze Zsuzsanna, Hiripi, László (2015) „Célzott genetikai módosítás nyúlban.” Magyarország, Gödöllő. 25. *MBK Napok 2015.11.11.*

6. Nemzetközi konferencián bemutatott poszter

Skoda Gabriella, Kerekes Andrea, Atkári Tamás, Meinrad Odermatt, Tatiana Flisikowska, Bősze Zsuzsanna, Hiripi László (2017) „The effect of genetic background on the phenotype of myostatin KO rabbits.” Németország, Halle (Saale): *SALAAM Final conference 2017.09.28-2017.09.29.*

Hiripi László, Gócza Elen, Bodó Szilárd, Hoffmann Orsolya Ivett, **Skoda Gabriella**, Kerekes Andrea, Bontovics Babett, Lázár Bence, Bősze Zsuzsanna (2014) „Rabbit Biotechnology in the NARIC-Agricultural Biotechnology Institute.” Horvátország, Zágráb, *3th RGB-Net Meeting 2014.05.06.*

7. Hazai konferencián bemutatott poszter

Kerekes Andrea, **Skoda Gabriella**, Hoffmann Orsolya Ivett, Balogh Laura, Debnár Viktória Johanna, Bősze Zsuzsanna, Hiripi László, Bodó Szilárd (2014) „Transzgenikus állatvonalak *ex situ* genetikai megőrzése.” Magyarország, Herceghalom. In: *20. Szaporodásbiológiai Találkozó (2014) pp. 25-25., 1 p.*