dc_512_12

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Őssejt specifikus markerek és mikroRNS-ek expressziójának vizsgálata egér és nyúl embriókban, embrionális őssejtekben

Gócza Elen

MBK, Állatbiotechnológiai Intézet

GÖDÖLLŐ, 2012

BEVEZETÉS

1981-ben hozták létre az első egér embrionális őssejt vonalakat (ES sejtek). A 90-es évekre sikerült kidolgozni azokat a molekuláris genetikai módszereket is, amelyek lehetővé tették az ES sejtek célzott genetikai módosítását. Ezzel lehetővé vált az egér génjeinek tervezett módosítása, génkiütött (knock out), vagy éppen az adott gén módosított változatát tartalmazó ES sejtvonalak létrehozása. Az ES sejtek segítségével az egér genetikai módosítása irányítottan, indukált és helyspecifikus módon történhetett, amit egyszerű DNS mikroinjektálásos módszerrel nem lehetett megvalósítani. A módosított géneket hordozó ES sejteket gazda embrióba injektálva, vagy azzal aggregáltatva, kiméra embriók hozhatók létre. Ezeket recipiens nősténybe beültetve olyan kiméra utódok születnek, amelyek ivarsejtjei között megtalálhatók az ES sejtekből differenciálódott transzgénikus ivarsejtek, így a genetikai módosítás átöröklődhetett az utódokba is. Ez a technika lehetővé tette, hogy mára több ezer genetikailag módosított egeret hozzanak létre, köztük számos betegség modell állatot is.

Emlős embriók embrionális fejlődésnek vizsgálata azt mutatja, hogy az egér és patkány embriók fejlődése számos helyen eltér más emlős embriók korai embrionális fejlődésétől. A trofektodermában és az embriócsomóban lejátszódó folyamatok és a pluripotens sejtek differenciálódást befolyásoló faktorok a nyúl és a szarvasmarha embrióban inkább hasonlítanak a humán embriókéhoz, mint az egéréhez. Ez magyarázhatja azt, hogy mind a mai napig nem sikerült létrehozni az egér ES sejtekhez hasonló nyúl embrionális őssejtvonalakat, amelyekben célzott génkiütést tudtak volna végrehajtani, illetve ivarsejt kiméra állatokat lehetett volna előállítani.

Úgy gondoljuk, hogy ha ismernénk a nyúl korai embrionális fejlődését, illetve a beágyazódást irányító faktorokat, közelebb juthatnánk valóban pluripotens sejteket tartalmazó nyúl őssejtvonalak létrehozásához.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Szerettem volna kidolgozni olyan kiméra előállító módszert, melynek segítségével hatékonyan lehet létrehozni kiméra egereket és nyulakat. Az így létrehozott kiméra embriók fejődésének vizsgálata lehetőséget teremthet az ivari determináció, illetve a sejtek elköteleződése során zajló molekuláris folyamatok jobb megismerésében. Választ kaphatunk arra, hogy képes-e egyetlen XY genotípusú blasztomer átfordítani egy XX genotípusú diploid gazda-embriók ivarát. Lehetséges-e tetraploid komplementációs rendszert alkalmazva identikus iker egereket létrehozni úgy, hogy azonos embrióból származó egy-egy blasztomert aggregáltatunk egy-egy tetraploid gazda embrióval?

2. Pluripotens egér és nyúl sejttenyészetekben, illetve a nyúl embriók fejlődése során, a fejlődés specifikus gének expressziós mintázatának feltérképezésével szerettem volna pontosabb képet kapni arról, milyen faktorok irányítják az egér és nyúl embriók fejlődését, ezen keresztül az őssejtek pluripotenciájának megtartását. A transzkripciós faktorok szerepének vizsgálata mellett, igazolni szerettem volna, hogy a Leukémia Inhibitor Faktor (LIF) nem csak az egér ES sejtvonalak esetében szükséges komponense a sejttenyésztő médiumnak, hanem nyúl ES sejtek pluripotenciájának fenntartásában is fontos szerepet játszik.

3. Választ szerettem volna kapni arra, hogy milyen hatással van az egér őssejt specifikus miR-290-295 klaszter túltermeltetése az egér embrionális őssejtek pluripotenciájának megőrzésben, megnevezhető-e egy fő biológiai mechanizmus, aminek a szabályzásával a miR-290-295 klaszter kifejti hatását az egér ES sejtekben. Egér ES sejtek esetében a miR-290-295-ös klaszter játszik meghatározó szerepet, addig és humán ES sejtek esetében a miR-371-373 klaszter. Választ szerettem volna kapni arra, hogy a nyúl ES

sejtek esetében melyik klaszter expressziója mutatható ki, a nyúl miRNS mintázat a humán vagy inkább az egér miRNS mintázathoz hasonlít jobban.

Dolgozatomban azokat a kísérleti megközelítéseket foglaltam össze, amelyek segítségével sikerült megválaszolnom a munkám kezdetekor feltett kérdéseket.

AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A leukémia inhibitor faktor (LIF) és receptora (LIFR) szerepet játszik az embrió beágyazódásában és az őssejtvonalak alapításának sikerességében is. A LIF egy olyan citokin, ami a sejtfelszíni LIFR-hoz köt. LIFR ennek hatására heterodimert képez egy másik transzmembrán fehérjével, a glikoprotein-130-al (gp130). A heterodimer egy kináz kaszkádot aktivál. A STAT3 transzkripciós faktoron keresztül a sejtmagban Oct4 és Nanog együttes hatására megindul az ES sejtekre jellemző gének expressziója, ezzel párhuzamosan pedig gátlás alá kerülnek a differenciálódást elősegítő gének.

A LIF különbözőképpen befolyásolja az egyes fajokban az ES sejtek önmegújuló képességét, pluripotenciáját. A LIFR nem volt kimutatható a nyúl embriók korai embrionális fejlődési szakaszában, RNS szinten először 6,5 napos embrióban detektálható jelenléte, amely megfelel a beágyazódás körüli időszaknak. A LIF mRNS hasonlóan a többi emlősállathoz a korai hólyagcsíra állapotú embrióban jelenik meg először. A laboratóriumunkban fenntartott ES sejtenyészetek esetében a tenyésztő médiumban a LIF jelenléte nélkü-lözhetetlennek bizonyult, LIF hiányában a nyúl őssejtek szívizom irányba differenciálódtak.

Az ES sejtek fejlődési potenciáljának vizsgálata történhet az ES sejtek *in vitro* differenciáltatásával, illetve *in vivo*, kiméra embriókat létrehozva, a kimérákban nyomon követve az ES sejtek sorsát. Annak igazolására, hogy a

nyúl ES sejtek képesek *in vivo* is létrehozni a legkülönbözőbb sejteket, szöveteket, ki kellett fejlesztenünk egy hatékony kiméra előállító rendszert nyúl esetében is. Míg az egér ES sejtek esetén aggregációs kimérákat hoztunk létre, addig a nyulak esetében az injektálásos kiméra előállító módszert választottuk. A kiméra embriók fejődésének vizsgálata lehetőséget teremtett az ivari determináció, illetve a sejtek elköteleződése során zajló molekuláris folyamatok jobb megértéséhez. A rendelkezésünkre álló zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) expresszáló transzgénikus egerekből, nyulakból származó blasztomerek, ES sejtek beépülése a gazda embrióba nyomon követhetővé vált. Egerek esetében tetraploid gazda-embriót alkalmazva azt vizsgáltuk, hogy elegendő-e egyetlen blasztomer egy teljes állat létrehozásához, illetve hogy a tetraploid komplementációs rendszer alkalmas-e identikus iker egerek létrehozására abban az esetben, ha azonos embrióból származó egy-egy blasztomert aggregáltatunk egy-egy tetraploid gazda embrióval. Tetraploid komplementációs rendszer segítségével sikerült előre meghatározott nemmel rendelkező, kettes és hármas iker egereket létrehozni. Injektálásos módszerrel létrehozott nyúl kimérákat beültetve recipiens nőstényekbe ivarsejt kiméra utódjaink születtek.

A genom nagy részét alkotó, nem kódoló szekvenciák sem funkció nélküli, felesleges szakaszok. A nem kódoló gének csoportjába tartoznak a mikroRNS-ek (miRNS-ek) is. A miRNS-ek olyan, kb. 22 nukleotid hosszú, fehérjét nem kódoló, egyszálú RNS molekulák, amelyek alapvető szabályozó funkciók érzékeny beállításában vesznek részt. Szabályozó szerepüket a gének poszt-transzkripcionális módosítása során fejtik ki azáltal, hogy az mRNS 3’ végén található nem transzlálódó régióhoz (UTR) kötődnek, és ott a transzlációt gátolják, vagy az mRNS degradációját okozzák.

Az őssejt specifikus miRNS-ek közös jellemezője, hogy magas expressziós szintet mutatnak az ES sejtekben, de expressziós szintjük a

differenciálódás kezdetével rohamosan elkezd csökkenni. Az Oct4, a Sox2 és a Nanog (őssejt specifikus markerek), közvetlenül a miRNS-ek promóteréhez kötve szabályozzák az őssejt specifikus miRNS-ek expresszióját. Az egér ES sejtekben, a miRNS-ek nagy része a miR-290-295 klaszterről keletkezik. A miR-290-295 klaszter csak méhlepényes emlősökben fordul elő. A miR-290-295 klaszter nagy mértékű evolúciós változékonyságot mutat, amely arra utal, hogy a klaszter evolúciós értelemben viszonylag új, és emlős-specifikus tulajdonságokat szabályozhat. Egér ES sejtek esetében igazoltuk, hogy a miR-290-295 klaszter elősegíti az ES sejtek pluripotens állapotának fenntartását, amit elsősorban a sejtciklus közvetlen, több pontú szabályozásával ér el. Megállapítottuk azt is, hogy a miR-290-es klaszter tagjainak expressziója a 4 sejtes állapotú nyúl embriókban kezdődik. Míg a másik őssejt specifikus klaszter, a miR-302-es mikroRNS klaszter tagjainak expressziója először 3.5 napos nyúl embriókban kezdődik, és magas expressziós értéket mutat a pluripotens nyúl őssejtekben. Megállapítható, hogy a miR-302 klaszter tagjai magasabb expressziós szintet mutatnak a nyúl ES sejtekben, míg a miR-290 klaszter tagjai feltételezhetően a korai embrionális fejlődés során játszhatnak fontos szerepet.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A PhD munkám során kidolgozott tetraploid komplementációs technikát ötvözve, sikerült előre meghatározott nemmel rendelkező, kettes és hármas iker egereket létrehoznom.

2. Sikerült igazolnom, hogy a LIF és LIFR fontos szerepet játszik a nyúl korai embrionális fejlődésében és a pluripotens embrionális eredetű nyúl őssejtek pluripotenciájának fenntartásában.

3. Igazoltam, hogy míg az egér miR-290 mikroRNS klaszter elemei elősegítik az egér ES sejtek pluripotenciájának megőrzését a sejtciklus

szabályozásán és a korai differenciálódás gátlásán keresztül, addig a nyúl miR-290 klaszter elemei inkább a nyúl korai embrionális fejlődésében játszanak fontos szerepet.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A tetraploid gazda embriók és embrionális őssejtek felhasználásával történő aggregációs kiméra technikát alkalmazva sikerült előre meghatározott nemmel rendelkező, kettes és hármas iker egereket létrehoznom. Ellentétben a sejtmag átültetéses klónozással, ahol mitokondriális heterogenitás mutatható ki a klónozott állatokban, az általam alkalmazott technika segítségével létrehozott iker egerek mind mitokondriális, mind pedig sejtmagi DNS tekintetében azonosak egymással. Ez a technológia alkalmas olyan identikus iker egerek létrehozására, amelyek humán egypetéjű ikreken végzett epigenetikai vizsgálatok kontrolljaként alkalmazhatóak.

Az őssejtkutatás területén több, a pluripotenciát befolyásoló gén, illetve mikroRNS expressziós mintázatának feltérképezését célzó kutatásban vettem részt egér, nyúl és humán embrionális őssejteket, illetve egér mesenchymális őssejteket vizsgálva. Az egér és nyúl embriók korai embrionális fejlődésében, illetve a pluripotencia fenntartásában szerepet játszó leukémia inhibitor faktornak (LIF) és receptorának (LIFR) vizsgálata során, sikerült igazolnom, hogy a LIF és LIFR fontos szerepet játszik mind az egér, mind a nyúl korai embrionális fejlődésében, az egér és a nyúl pluripotens őssejtek (ES sejtek) pluripotenciájának fenntartásában.

Az őssejt specifikus miRNS-ek szerepét vizsgálva igazoltam, hogy míg az egér miR-290-es miRNS klaszter elemei elősegítik az egér ES sejtek pluripotenciájának megőrzését a sejtciklus szabályozásán és a korai differenciálódás gátlásán keresztül, addig a nyúl miR-290-es klaszter elemei a korai embrionális fejlődés során töltenek be irányító szerepet, ezzel

párhuzamosan a miR-302-es klaszter jelenlétét figyeltük meg a nyúl ES sejtekben.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Angol nyelvű tudományos folyóiratok

Táncos, Zs., Nemes, Cs., Polgar, Zs., **Gocza, E**., Daniel, N., Stout, T. A. E, Maraghechi, P,. Pirity, M. K., Osteil, P., Tapponnier, Y., Markossian S., Godet M., Afanassieff M., Bosze Zs., Duranthon, V., Savatier P., Dinnyes A. (2012): Generation of rabbit pluripotent stem cell lines. Review, *Theriogenology, 78(8):1774-86.* ***IF: 2,045***

Lichner, Zs., Páll, E., Kerekes, A., Pállinger, E., Maraghechi, P., Bősze, Zs., **Gócza, E.** (2011): The miR-290-295 cluster promotes pluripotency maintenance by regulating cell cycle phase distribution in mouse embryonic stem cells. Differentiation, 81(1):11-24. **IF: 2,807**

Hiripi, L., Negre, D., Cosset, F-L., Kvell, K., Czömpöly, T., Baranyi ,M., **Gócza, E.**, Hoffmann, O., Bender, B., Bősze, Zs. (2010): Transgenic rabbit production with simian immunodeficiency virus-derived lentiviral vector. Transgenic Research 19:799-808. **IF: 2,569**

Catunda, A.P., **Gócza E.**, Carstea ,V.B., Hiripi, L., Hayes, H., Rogel-Gaillard C., Bertaud, M., Bősze, Zs. (2008): Characterization, chromosomal assignment and role of LIFR in early embryogenesis and stem cell establishment of rabbit. Cloning Stem Cells, 10/4, pp. 523-34. **IF: 2,622**

Carstea, V.B., Lemos, A.P.C., Ilie, D., Varga, L., Bodó, Sz., Kovács, A., Bősze, Zs., **Gócza, E**. (2007): Production of identical mouse twins and a triplet with predicted gender. Cloning and Stem Cells, 9/2, pp. 247-56. **IF: 2,937**

Bodó, Sz., **Gócza, E**., Révay, T., Hiripi, L., Carstea, B., Kovács, A., Bodrogi, L., Bősze, Zs. (2004): Production of transgenic chimeric rabbits and transmission of the transgene through the germline. Molecular Reproduction and Development 68, pp. 435-440. **IF: 2,331**

Könyvfejezetek

Yousef, G. M., Lichner, Zs., **Gócza, E**. (2013): Maintenance of pluripotency in mouse embryonic stem cells with microRNAs. Springer, book chapter, Editor: E. Hayat (*in press*)

Sági L., **Gócza E.**, Kovács K. (2011): Plain Facts about GMOs.: Hungarian white paper. (Szerk: Balázs E., Dudits D., Sági L.,), Barabás Zoltán Federation of Biotechnology, Tisza Press Nyomda, ISBN:978 963-08 -1066-1, pp. 18-33.

Sági L., **Gócza E.**, Kovács K. (2011): A genetikailag módosított szervezetek előállításának módszerei "Genetikailag módosított élőlények (gmo-k) a tények tükrében. Magyar Fehér Könyv" (Szerk: Balázs E., Dudits D., Sági L.,), Tisza Press Nyomda, ISBN 978-963-08-1065-4, pp. 18-35.

Gócza, E., Bősze, Zs. (2009): Derivation and Characterization of Rabbit Embryonic Stem Cells in "Houdebine L.-M. and J. Fan (eds.), Rabbit Biotechnology: Rabbit Genomics, Transgenesis, Cloning and Models", © Springer Science + Business Media B.V. pp. 77-104.

Bősze Zs., **Gócza E.** (2005): Transzgénikus haszonállatok előállításának lehetőségei és céljai. „Mezőgazdasági Biotechnológia." (Szerk: Heszky L., Fésüs L., Hornok L), Agroinform Kiadó, Magyarország, 2005, ISBN: 963 502 8377. pp. 264-286.

Magyar nyelvű, tudományos folyóiratok

Carstea V.B., Lemos A.P.C., Ilie, D., Bodó Sz., Kovács A., Bősze Zs., **Gócza E.** (2006): Az ivar átfordítás lehetőségének vizsgálata egér kimérák alkalmazásával. Állattenyésztés és Takarmányozás 55./5. pp. 501-504.

Bodrogi L., Bodó Sz., **Gócza E**., Carstea B., Hiripi L. ,Révay T., Kovács A., Bősze Zs. (2004): Ivarsejt kiméra nyulak létrehozása mikroinjektálásos módszerrel. Állattenyésztés és takarmányozás. 53/2. pp. 174-177.

Baranyai B., **Gócza E**., Bodó Sz. (2004): Biopsziált egér és szarvasmarha embriók vitrifikálása mikrocsepp technikával. Állattenyésztés és takarmányozás. 53/2. pp. 169-170.

Gócza Elen (2004): Embrionális őssejtek és őssejt-vonalak. Magyar Tudomány 2004/3. pp. 285-291.

Magyar nyelvű, ismeretterjesztő folyóiratok

Gócza E. (2003): Őssejtkutatás: Az őssejtek bölcsője. Élet és Tudomány 18. pp. 550-553.

Gócza E. (2003): Őssejtkutatás: Sejtsorsok. Élet és Tudomány 19. pp. 591-593.

Gócza E. (1999): Új lehetőségek az emberi transzplantációs terápiában. Természettudományi Közlöny 130/4. pp. 183-184.

Gócza E. (1998): Emlősállatok futószalagon. Természettudományi Közlöny pp. 129/4. 166-168.

Gócza E. (1997): Transzgénikus pluripotens embrionális eredetű ős-sejtvonalak alkalmazása. Állattartók magazinja. II/7. pp. 6-7.

Gócza, E. (1997): Emlős állatok klónozása. Természettudományi Közlöny 128/8. pp. 352-356.

EGYÉB SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Angol nyelvű tudományos folyóiratok

Sági B, Maraghechi P, Urbán VS, Hegyi B, Szigeti A, Fajka-Boja R, Kudlik G, Német K, Monostori E, **Gócza E**, Uher F. (2012): Positional identity of murine mesenchymal stem cells resident in different organs is determined in the postsegmentation mesoderm. Stem Cells Dev., 21(5): 814-28. **IF: 4,459**

Orbán, TI, Apáti, A, Németh, A, Varga, N, Krizsik, V, Schamberger, A, Szebényi, K, Erdei, Z, Várady, G, Karászi, E, Homolya, L, Német, K, **Gócza, E**, Miskey, C, Mátés, L, Ivics, Z, Izsvák, Z, Sarkadi, B. (2009): Applying a "double-feature" promoter to identify cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells following transposon-based gene delivery. Stem Cells, 27(5):1077-87. **IF: 7,747**

Varga, B., Hadinger, N., **Gócza, E**, Dulberg, V., Madarasz E., Herberth, B. (2008): Generation of diverse neuronal subtypes in cloned populations of stem-like cells. Journal: BMC Developmental Biology, 22/8:89. PMID: 18808670 **IF: 3,079**

Urbán, V., Kiss, J., Kovács, J., **Gócza, E.,** Vas, V., Monostori, É., Uher, F. (2008): Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. Stem Cells, 26(1):244-53. **IF: 7,741**

Környei, Zs., **Gócza, E.**, Rühl, Vörös, E., Orsolits, B., Szabó, B., Vágovits, B., Madarász, E. (2007): Astroglia-derived retinoic acid is a key factor in glia induced neurogenesis. FASEB Journal, 10, pp. 2496-509. **IF: 6,791**

Környei, Zs., Szlávik, V., Szabó, B., **Gócza, E.**, Czirók, A., Madarász, E. (2005): Humoral and contact interactions in astroglia/stem cell co-

cultures in the course of glia-induced neurogenesis. Glia, 49/3, pp. 430-44. **IF: 4,276**

Baranyai, B., Bodó, Sz., Dinnyés, A., **Gócza, E.** (2005): Vitrification of biopsied mouse embryos. Acta Veterinaria Hungarica 53/1, pp. 103-112. **IF: 0,53**

KÖSZÖNET NYILVÁNÍTÁS

A dolgozat elkészítéséhez szükséges kísérleteket a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban végeztem. Köszönöm Dr. Solti Lászlónak az Állatbiotechnológiai Intézet egykori igazgatójának, Dr. Balázs Ervinnek, Dr. Nagy Ferencnek, Dr. Kiss György Botondnak és Dr. Burgyán Józsefnek, az MBK volt és jelenlegi főigazgatóinak, hogy lehetővé tették azt, hogy kísérleti munkámat az MBK-ban folytathassam.

Köszönettel tartozom Dr. Bősze Zsuzsannának kutató munkám során adott folyamatos biztatásért és támogatásért. Köszönöm a segítséget Dr. Hiripi Lászlónak, Dr. Baranyi Máriának, Dr. Bodrogi Lillának, Dr. Bender Balázsnak, Dr. Ana Paula Catunda Lemosnak, Dr. Carstea Valer Bogdánnak és Dr. Kovács Andrásnak, akik munkája nélkül nem jöhettek volna létre azok a közlemények, amik doktori dolgozatom alapjául szolgáltak. Továbbá köszönöm a segítséget Kerekes Andreának, Bontovics Babettnek, Pouneh Maraghechinek, külön köszönet Gróf Mihályné, Marikának, mindenkori segítségéért, ami nélkül nem működhetett volna sejttenyésztő laboratóriumunk.

Nem tudtam volna munkám során újabb és újabb technológiákat megismerni más kutató intézetekben dolgozó magyar és külföldi barátaim segítsége nélkül, akik közül külön is szeretném megköszönni a támogatást, Dr. Madarász Emíliának, Dr. Környei Zsuzsannának, Dr. Zoya Katarovának a KOKI munkatársainak, Dr. Uher Ferencnek, Dr. Urbán Veronikának, Dr. Német Katalinnak, Dr. Sarkadi Balázsnak, Dr. Apáti Ágotának és Dr. Orbán Tamásnak, az OVSZ munkatársainak, Dr. Falus Andrásnak és Dr. Tóth Sárának a SE munkatársainak.

Hálával tartozom Dr. Nagy Andrásnak, aki nélkül soha nem ismerkedhettem volna meg az egér embriók és őssejtek csodálatos világával.

Végül szeretném megköszönni férjemnek, Gyurinak, és gyerekeinknek Reginek és Ákosnak, hogy bár nélkülözniük kellett engem sokszor a kutatással töltött éjszakák, és hétvégék miatt, ennek ellenére is lelkesen támogatták kutató munkámat. Köszönöm szüleimnek, hogy megteremtették a lehetőségét annak, hogy elindulhassak ezen a pályán.