

**VÁLASZ DR. CSEH SÁNDOR PROFESSZOR ÚRNAK, AZ MTA DOKTORÁNAK, OPPONENSI
VÉLEMÉNYÉRE**

Nagyon köszönöm Dr. Cseh Sándor professzor úrnak, hogy elvállalta doktori értekezésem bírálatát. Köszönöm, hogy az általam végzett kutatásokat fontosnak, és időszerűnek tartja. Köszönöm, hogy a dolgozatomat formailag, és tartalmilag is megfelelőnek találta, és úgy gondolja, hogy az általam szerkesztett összefoglaló táblázatok, ábrák jól szerkesztettek és segítették a dolgozat megértését. Köszönöm, hogy az általam elért új tudományos eredményeket elfogadta, és javasolta doktori dolgozatom nyilvános vitára való bocsájtását.

Mielőtt válaszolnék az opponenseim által feltett kérdésekre, szeretném megköszönni munkatársaim, doktorandusz hallgatóim és szakdolgozóim munkáját, az ő segítségük nélkül nem tudtam volna az értekezésemben közölt tudományos eredményeket elérni.

Mindenkitől, aki olvasta doktori értekezésemet, elnézést kérek azért, hogy néhol az angoltól fordított részek kevésbé olvasmányosak, illetve azért is, hogy minden igyekezetem ellenére, maradtak a szövegben elütési, szerkesztési hibák. Remélem ezek a hibák nem zavarták meg a dolgozatban közölt eredmények megértését.

Részletes válaszok a dolgozat formáját, illetve tartalmát érintő kérdésekre:

A "freemartin szindróma" jelenségről az iker kutatásokhoz kapcsolódóan írtam. Cseh Sándor professzor jogosan hiányolta, hogy ehhez a témakörhöz a dolgozatomban nem adtam meg hivatkozásokat. Ezt válaszütemben szeretném pótolni, néhány a témakörhöz kapcsolódó referencia megadásával:

A freemartin szindróma okozta interszexualitás leggyakrabban szarvasmarhák esetében figyelhető meg, de egyre több szó esik más fajok esetében is erről a jelenségről napjaink tudományos publikációiban. A szarvasmarhák esetében gyakran megfigyelhető, hogy iker ellés esetében "freemartin szindróma" lép fel. Ez annak a következménye, hogy kapcsolat alakul ki az iker magzatok keringési rendszere között. A magzati vér tartalmaz hematopoetikus őssejteket, amik átjuthatnak egyik magzattól a másik magzatba. A freemartin szarvasmarha másodlagos nemi jellege

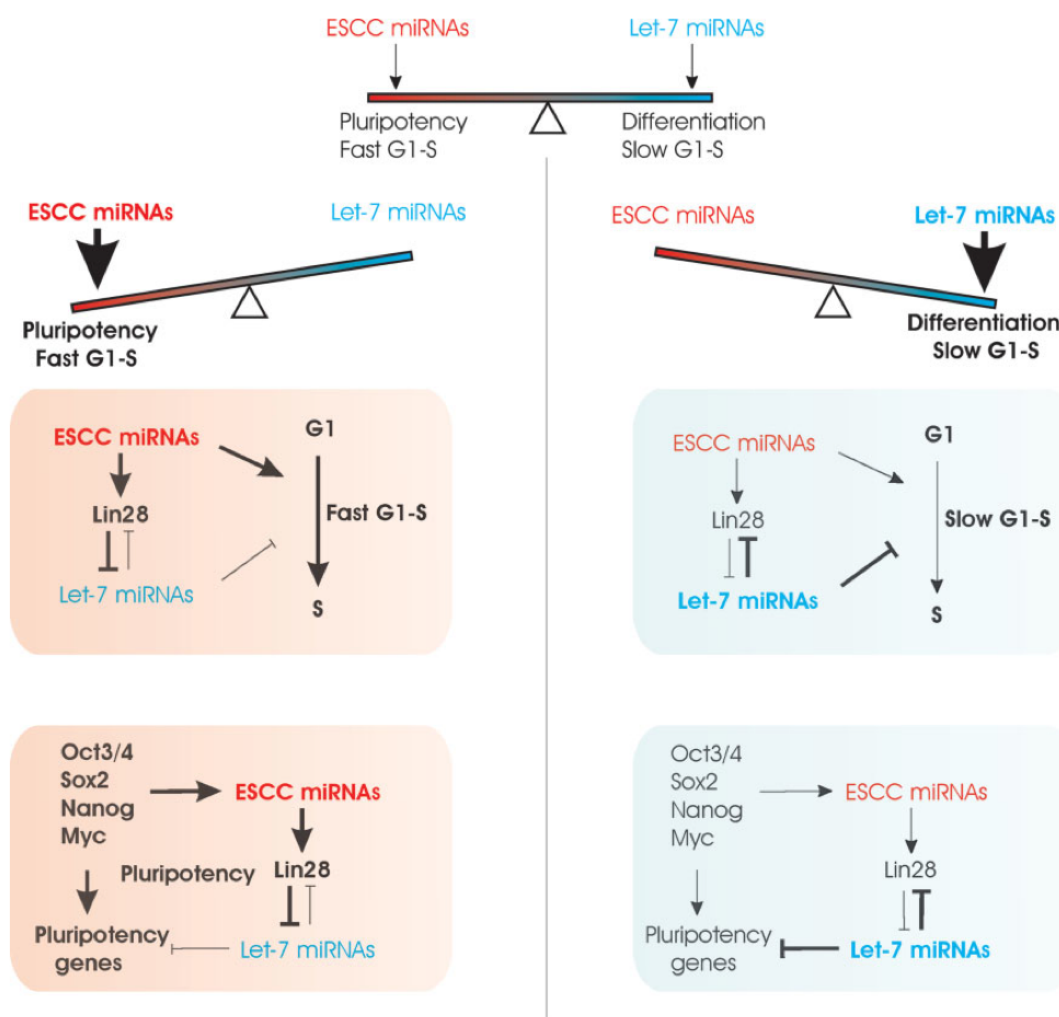
nem fejlődik ki, ökörré emlékeztető, semleges típust mutat. Normális esetben az emlős szexdetermináció során az XY magzatokban, az SRY indukálja a SOX9 expressziót a Sertoli sejtekben, aminek következtében here alakul ki. Az XX-es magzatban nem képződik SRY, így petefészek alakul ki. Amikor egy hím és nőstény szarvasmarha magzat együtt fejlődik, nem működő petefészek alakul ki, ezzel úgynevezett interszexuális fenotípus alakul ki. Harikae és munkatársai (2012), arról számolnak be, hogy egy szarvasmarha esetében, XX gonádban, minden a herére jellemző szomatikus sejtet megtaláltak, erősen hím jellegű ivarszerv fejlődött ki, SRY hiányában is. Nem lehet tudni, hogy hogyan, de ebben az állatban teljes ivarátfordítás történt. SOX9 pozitív Sertoli sejteket találtak, GDNF termelést megfigyeltek, és 3 β -HSD pozitív Leidig sejteket is találtak. Ez a munka azt feltételezi, hogy a petefészekben található szomatikus sejtek nagy plaszticitással rendelkeznek. Freemartinok előfordulhatnak más fajok esetében is, csak jóval kisebb arányban. A lovakban, selyemmajmokban, illetve az általunk vizsgált szex kiméra egerekben, a szarvasmarhákétól eltérően, bár ritkán, de előfordulnak XX/XY nőstények, és azok általában termékenyek.

1. The freemartin syndrome: an update. Padula AM. Anim Reprod Sci. 2005, 87(1-2):93-109.
2. Expression of AMH in female fetal intersex gonads in the bovine. Cagianca G, Rota A, Cozzi B, Ballarin C., Anat Histol Embryol. 2007, 36(1):24-6.
3. Sex chromosome chimerism and the freemartin syndrome in Rideau Arcott sheep. Brace MD, Peters O, Menzies P, King WA, Nino-Soto MI. Cytogenet Genome Res. 2008, 120(1-2): 132-9.
4. Freemartin in the amphibian *Pleurodeles waltl*: parabiosis between individuals from opposite sex triggers both germ and somatic cells alterations during female gonad development. Dumond H, Maufröid JP, Ko CI, Chardard D, Chesnel A, Flament S., Mol Reprod Dev. 2008, 75(3):439-49.
5. Blood chimerism in a girl with Down syndrome and possible freemartin effect leading to aplasia of the Müllerian derivatives. Bogdanova N, Siebers U, Kelsch R, Markoff A, Röpke A, Exeler R, Tsokas J, Wieacker P. Hum Reprod. 2010, 25(5):1339-43.
6. Evidence for almost complete sex-reversal in bovine freemartin gonads: formation of seminiferous tubule-like structures and transdifferentiation into typical testicular cell types. Harikae K, Tsunekawa N, Hiramatsu R, Toda S, Kurohmaru M, Kanai Y., J Reprod Dev. 2012, 58(6):654-60.

A 19. oldalon a helyes alfejezet számozás: 3.3.4. A pluripotencia fenntartásában résztvevő szignáltranszdukciós útvonalak. A következő alfejezet cím pedig így 3.3.5. LIF (Leukémia Inhibitor Faktor)-re módosulna.

A 20-26. oldalon, a miRNS-ek biogenezisének, a pluripotencia fenntartásában betöltött szerepének bemutatása történik. A bíráló itt a szöveg jobb megértését segítő ábrát hiányolta:

Észrevételével egyet értek, valóban ez a szövegrész, ebben a formában nehezen áttekinthető. Eredetileg be is illesztettem ide egy, a miRNS-ek szerepét összefoglaló ábrát, de ezen az ábrán túl sok új információ szerepelt, az ehhez szerkesztett ábra leírás, csak még bonyolultabbá tette volna a megértést. Válaszomhoz csatolok egy ábrát (1.ábra), aminek áttekintésével talán utólag érthetőbbé válik ez a rész is.



1. ábra

Az őssejt specifikus, egyben a sejt ciklust is szabályozó miRNS-eknek (ESCC miRNS) és a let-7 miRNS-eknek ellentétes szerepe van az ES sejtek pluripotenciájának, illetve differenciálódásának szabályozásában. Ezt az ellentétes szerepet a sejt ciklus szabályozásában résztvevő faktorok, illetve a pluripotenciát fenntartó gének expressziójának szabályozásán keresztül hozzák létre. Az ESCC miRNS-ek és a let-7 miRNS-ek között a kapcsoló elem a lin28 fehérje. Az ESCC miRNS-ek elősegítik a G1-S átmenetet. Ezzel egy időben a lin28 blokkolja a let-7 miRNS érését. A már differenciálódott sejtek nem expresszálják az ESCC miRNS-eket, azonban a let-7 miRNS-ek expressziójának szintje magas, így ezek gátolják a G1-S átmenetet. E mellett a let-7 csökkenti a pluripotencia gének expresszióját, így a sejtek differenciálódását még inkább elősegíti. A let-7 gátolja a Lin28 termelődését is (Meng Amy Li and Lin He, Bioessays 2012, 34: 670–680).

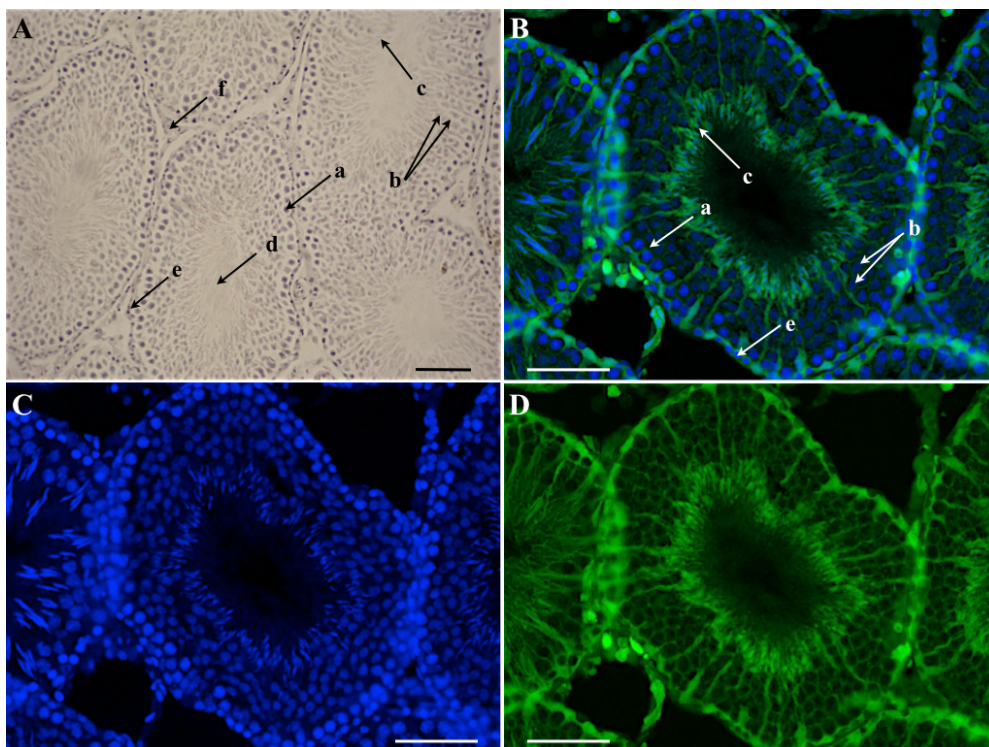
A lenti vírus injektálásával létrehozott mozaikosan transzgénikus hím nyúl esetében, a herékből készített metszeteken is igazoltuk, hogy GFP-t expresszáló, transzgénikus spermiumok is találhatóak abban. Ezeket a metszeteket mutatja be a 69. oldalon található ábra. Az opponens véleménye szerint az ábra mérete túl kicsi, nem láthatóak jól a betűjelek, illetve nehezítette az ábra megértését az, hogy a D2 felirat az ábra magyarázatban több helyen is szerepel.

A dolgozatban közölt 22/D ábrán valóban olvashatatlanul kicsik a feliratok és a D2 jelölés több alkalommal is szerepel. Az ábra feliratban a hivatkozások mind a D2 ábrára utalnak, azonban az általam közölt formában ez félreérthető. A válaszomhoz csatolok néhány magyarázó képet és a kifogásolt ábrát is, nagyobb méretben.



2.ábra

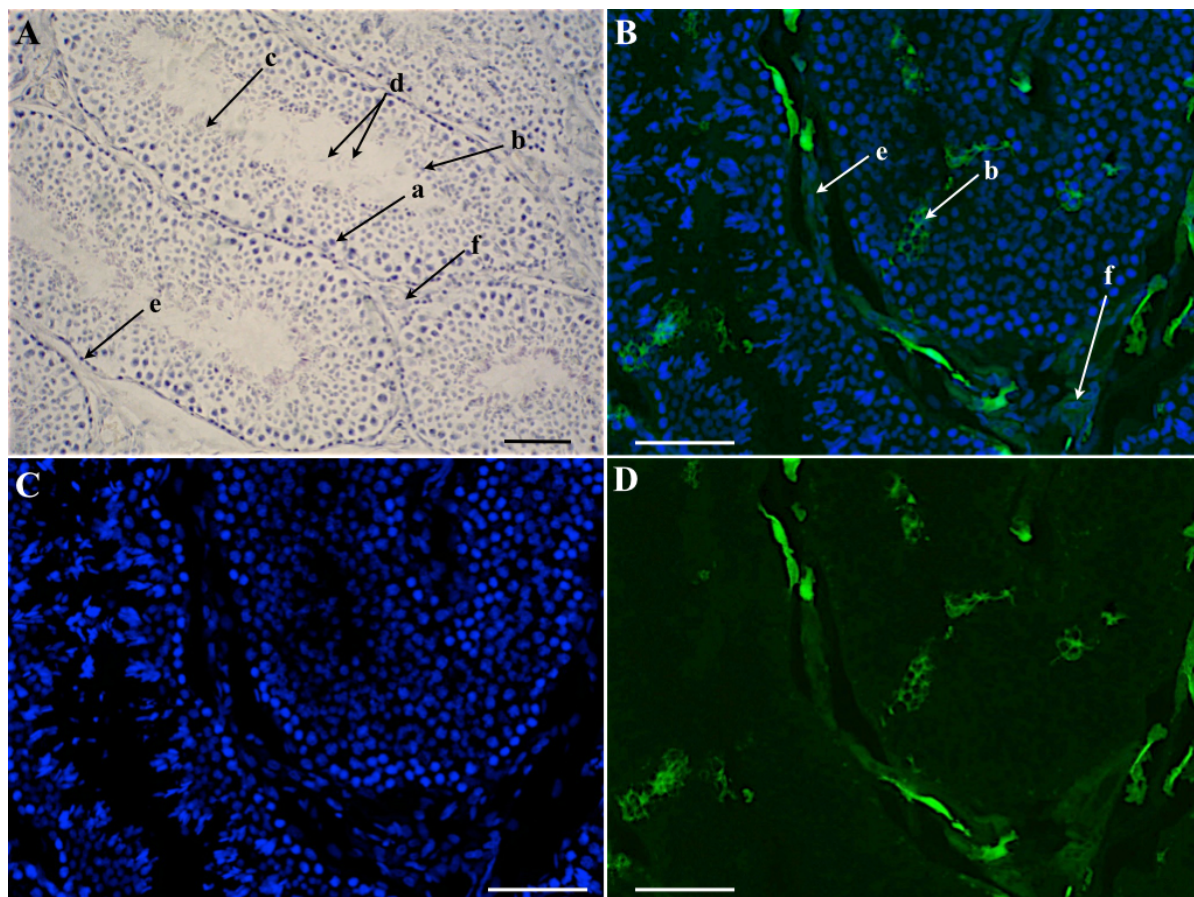
Patkány petefészek haematoxilin eosin festés (Eroschenko, 2005)



3.ábra

Lenti-SIV Transzgénikus patkány petefészek keresztmetszete

A: hematoxylin-eosin festés B: GFP-DAPI festés a: spermatogonium b: spermatida c: spermatida erő fázisban d: sperma e: sima izomsejt f: Leydig sejt B: EGFP és DAPI megjelenítése C: DAPI magfestés D: EGFP expresszió (Méret skála: 50uM)(saját felvételek)



4.ábra:

Spermatogenezis vizsgálata a transzgénikus nyulakban.

A: a here seminiferus tubulusok szaggitális metszete. B: EGFP-t expresszáló spermatidák, Leydig sejtek, és sima izom sejtek (hematoxylin-eosin festés). a: spermatogonium b: spermatida c: spermatida erő fázisban d: sperma e: sima izomsejt f: Leydig sejt B: EGFP és DAPI megjelenítése C: DAPI magfestés D: EGFP expresszió (Méret skála: 50uM)(saját felvételek)

Válaszok az opponens által feltett kérdésekre:

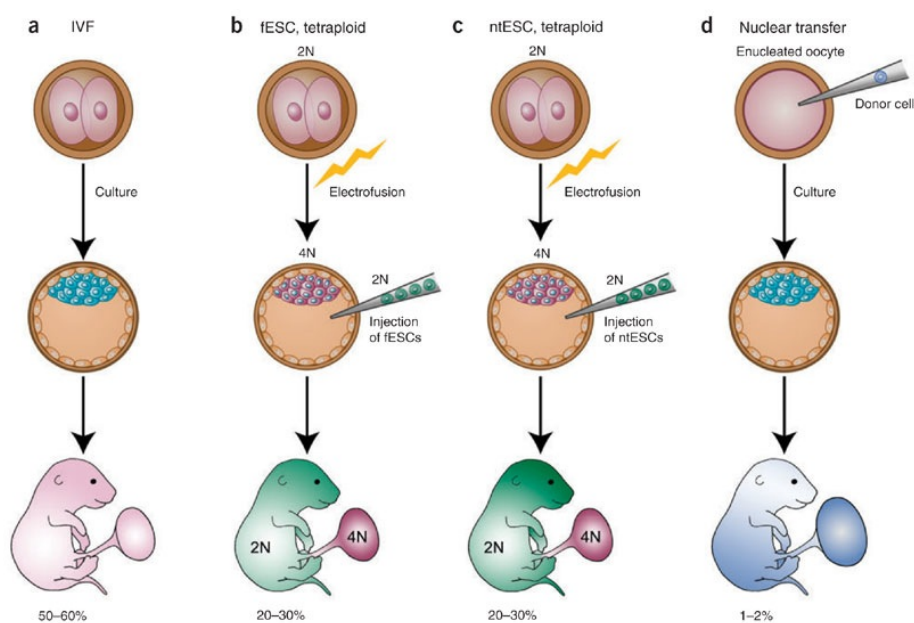
1: Összehasonlítva a két technikát röviden fejtse ki a véleményét a klónozás és egér tetraploid komplementációs módszer hatékonyságával kapcsolatban, továbbá mik az előnyök és hátrányok?

Az első sikeres emlős sejtmagátültetési klónozást Illmensee és Hoppe végezte 1981-ben, akik embrióból származó blasztomereket enukleált zigótába juttatva 3 egér születéséről számoltak be (McGrath és Solter, 1984). Később recipiensként petesejtet használtak zigóta helyett (Willadsen, 1986). Juhban és szarvasmarhában sejtmag donorként nyolc-tizenhat-sejtes embriók blasztomerjeit, recipiens sejtként pedig enukleált petesejteket használva sikerült utódokat előállítani. Bár néhány korábbi publikáció már leírta, hogy tenyésztett embrionális fibroblaszt, illetve őssejtek felhasználásával is sikeres klónozást (Sims, 1993; Campbell, 1996), Dolly születése után vált széles körben elfogadottá, hogy lehetséges differenciálódott, testi sejtek sejtmagjának enukleált petesejtbe juttatásával (SCNT) is életképes utódokat létrehozni (Wilmot, 1997). Wakayama csoportjának 1998-ban sikerült cumulus sejtekből származó klónozott egeret létrehozni (Wakayama, 1998). A beültetett klónozott embriók 2-2,8% született meg. Az egér SCNT hatékonysága nagy mértékben függ a recipiens petesejt, illetve a donor sejtmag genotípusától, a recipiens citoplazma állapotától, az hogy létre jön-e a citoplazmába bejuttatott sejtmag genetikai anyagának átprogramozása. A klónozott embriók beültetése után a vetélések aránya magas, a megszülető állatok nagy mérete, a méhlepény fejletlensége az oka azok korai pusztulásnak.

Több évtizedes kutatási múltra tekint vissza az iker egerek létrehozási technikájának kifejlesztése is. Kezdetben a morula, illetve hólyagcsíra állapotú embriókat kettéosztásával hoztak létre iker állatokat. Később az embriókból blasztomereket nyertek. A blasztomerek két-, négy-, vagy nyolc-sejtes embriókból származtak. Úgy tűnik, hogy egér esetében csak a kétsejtes embrió blasztomerje képes egészséges felnőtt állat létrehozására. Abban az esetben, mikor mindkét blasztomert hagyták külön fejlődni, identikus iker állatokat lehetett előállítani (Mullen, 1970). Azt feltételezik hogy a négy-, nyolc-sejtes embriók blasztomerjei már korlátozott fejlődési potenciállal rendelkeznek, emiatt nem képes életképes utód kifejlődni belőlük. Tarkowski tanulmányában, valamint Janet Rossant több publikációjában azt találta, hogy ezekből a blasztomerekből kifejlődő blasztociszták esetében alacsony a sejtszám, kis méretű az ICM, vagy egyáltalán nincs is. Ha azonban ezeket a blasztomereket aggregáltatták, és az így kialakuló blasztocisztákat ültették vissza, már életképes

utódot lehetett kapni (Tsunoda, 1987). A diploid és tetraploid embriók aggregáltatásával létrehozott kiméra embriók esetében a tetraploid embrióból származó sejtek elsősorban a fejlődő embrió extraembrionális szöveteiben jelennek meg. A négy-, illetve nyolc- sejtes embriókat egyetlen blasztomerre osztva, majd tetraploid gazda embrióval aggregáltatva azokat, életképes egereket lehetett kapni (Tarkowski, 2001). Azóta ezzel a módszerrel sikerült hármas-, és négyes iker egereket is létrehozni (Carstea 2007, Tarkowski 2010). Megfelelő genotípusú donor és recipiens embriókat alkalmazva aránylag magas megszületési arányokat lehetett elérni. Amikor CD1 genotípusú donor blasztemereket, illetve gazda embriókat alkalmaztunk a beültetett kiméra embriók 10%-a született meg (Carstea 2007).

A tetraploid komplementációs rendszert összejt eredetű utódok létrehozására Nagy András és munkatársai alkalmazták először (Nagy, 1990). Természetesen ebben az esetben is nagy mértékben függ a módszer hatékonysága az ES sejtek genotípusától, passzázs számától, tenyésztő médiumtól, hordozott transzgéntől, a gazda embrió genotípusától, a recipiens nőstény genotípusától. Optimális esetben akár a beültetett kiméra embriók 20-30%-a is megszülethet (5.ábra)(Nature, 2005). Azóta is elterjedten alkalmazzák ezt a módszert domináns negatív letális mutációt hordozó egér ES sejtekből származó kimérák embrionális fejlődésének vizsgálatára.



5. ábra

Az in vitro termékenyítéssel (IVF)(a), tetraploid komplementációs technikával (b, c), illetve sejtmagátültetési testi sejtes klónozással (NTSC) létrehozott embriók fejlődési arányának

összehasonlítása. Ebben az esetben embrionális őssejteket (ESCs) használtak donor sejtekként (Nature, 2005).

Összegzés képpen elmondható, hogy a tetraploid komplementációs technológia alkalmazásával lehetséges olyan identikus iker utódok létrehozása, amelyek mind a citoplazmában található mitokondriális DNS, mind pedig a sejtmagi DNS tekintetében azonosak lesznek.

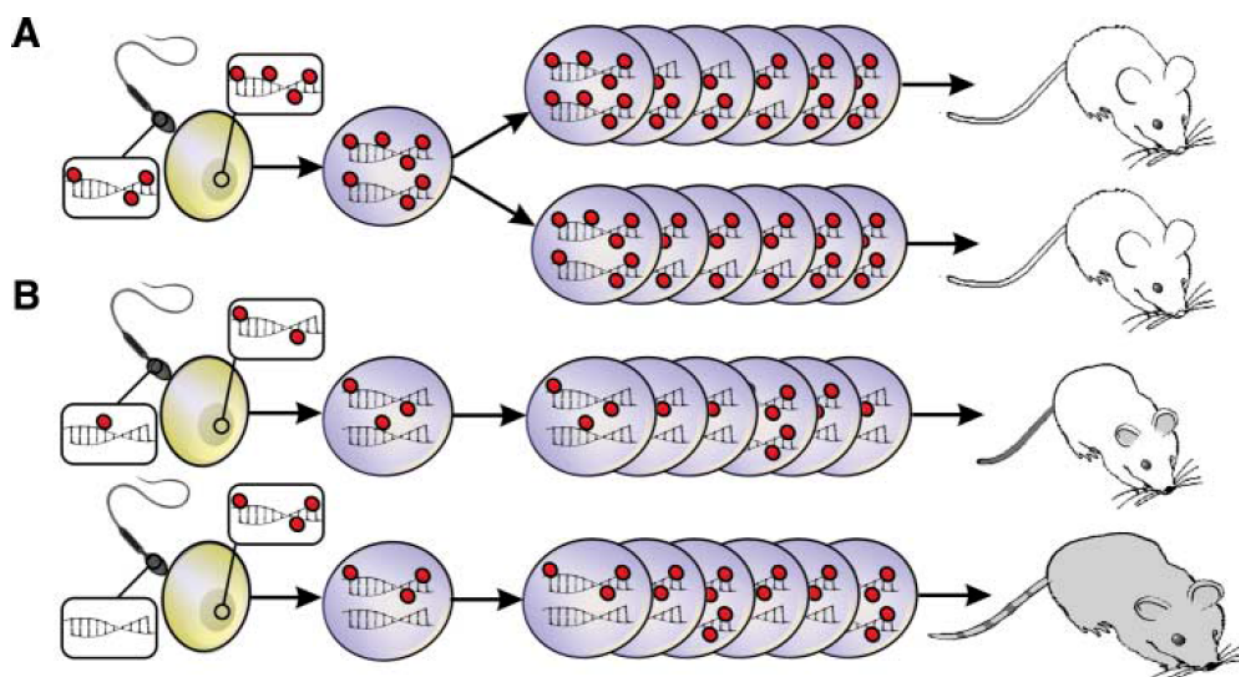
2. Orvos biológiai illetve állattenyésztési szempontból miért lenne jelentősége a technológia kifejlesztésének és elterjedésének?

Iker kutatásokat több évtizede folytatnak számos betegség genetikai hátterének kiderítésére. Napjainkra egyértelművé vált, hogy bizonyos betegségek, így a skizofrénia esetében is, azonos genetikai háttér mellett, egypetűjű (MZ) ikrek esetében is, eltérő mértékben jelentkezik a betegség. Azt gondolták, hogy ennek oka az eltérő környezeti hatások következményeként, a DNS másodlagos szerkezetében létrejövő módosulásokra vezethető vissza.

Ezek az epigenetikai különbségek azonban nem magyarázhatják azokat a paradox jelenségeket, eltérő tulajdonságokat, amik az ikrek, illetve betenyésztett állatok esetében megjelennek annak ellenére, hogy külső környezeti tényezők azonosnak tekinthetők (Boorhby, 2013).

Az egereken végzett iker kutatások azt jelzik hogy azonos környezeti feltételek mellett tartott DZ (kétpetűjű) és MZ (egypetűjű) iker egerek esetében is jelentős különbségek figyelhetők meg, amik öröklött epigenetikai különbségekre vezethetők vissza (6.ábra). A különbségek valódi eredetének igazolása azonban csak nagy számú iker egér összehasonlító vizsgálatával válhat lehetővé (Wong, 2005).

Mind a klónozás, mind pedig az iker utódok előállítása kis hatékonysággal működő technológia, ebből következően az identikus állatok előállítása nagyon költséges, így a mezőgazdaság területén történő alkalmazási lehetőségre jelenleg minimális esélyt látok. Összehasonlító iker kutatások jelentőségét az alapkutatás, gyógyszerkutatás és orvoslátás területén tartom fontosnak. Laboratóriumunkban jelenleg egér embriókkal végzett kutatásaink éppen azt a célt szolgálják, hogy kidolgozzunk egy genotípustól független, hatékonyan működő iker előállítási technológiát.



6.ábra

A kétpetűjű (DZ) ikrek esetében megfigyelhető nagyobb epigenetikai különbség a petesejt és a hímivarsejt kezdeti eltérő metilációs mintázatából származtatható. Az egypetűjű ikreknél (MZ) az epigenetikai “kezdőpont” teljesen azonos (Wong, 2005).

Gödöllő, 2014. 04. 03

Köszönettel,

Gócza Elen

Gócza Elen