

**VÁLASZ DR. HUSVÉTH FERENC PROFESSZOR ÚRNAK, AZ MTA DOKTORÁNAK OPPONENSI
VÉLEMÉNYÉRE**

Köszönöm Dr. Husvéth Ferenc professzor úrnak, hogy elvállalta doktori értekezésem bírálását.

Köszönöm, hogy úgy ítélte meg, hogy kutatásaim során jelentős eredeti tudományos eredményeket értem el, és köszönöm, hogy úgy gondolja, hogy ezzel hozzájárultam az általam vizsgált tudomány terület továbbfejlődéséhez. Köszönöm, hogy javasolta az értekezés elfogadását és a nyilvános vita kitérését.

Részletes válaszok a dolgozat formáját érintő kérdésekre:

1.: Valóban a „Következtetések és javaslatok„ rész túl rövid lett. A dolgozatomban nem választottam szét az “Eredmények és Következtetések” részt, az egyes részeredmények megadását követően közvetlenül ismertettem azok jelentőségét, összevetettem a mások által közölt eredményekkel. Az utolsó fejezetben röviden összegeztem az általam elért főbb eredményeket, így ennek a fejezetnek a megnevezéseként szerencsésebb lett volna az „Összefoglalás” címet adni.

2.: Köszönöm a dolgozatomban található szerkesztési, nyelvhelyességi hibákkal kapcsolatos észrevételeit, igyekszem további munkáimban a dolgozatomban most előfordult stilisztikai hibákat elkerülni.

3.: A 45. oldal első bekezdése helyesen: “Az expressziós értéket a miR-191 mikroRNS (nyúl miRNS) és GAPDH (Navarrete Santos et al., 2008) (nyúl mRNS expresszió) háztartási génekhez viszonyítva adtuk meg. Az analízist GenEx qPCR adat analízáló szoftverrel (<http://www.multid.se>) végeztük.”

4.: A 46. oldal első bekezdése helyesen: “A szekvenciák annotációját az ismert humán, szarvasmarha, és egér miRNS szekvenciákhoz hasonlítva végeztük el a miRBase (<http://www.mirbase.org/>) adatbázisban közölt szekvenciákat alapul véve.”

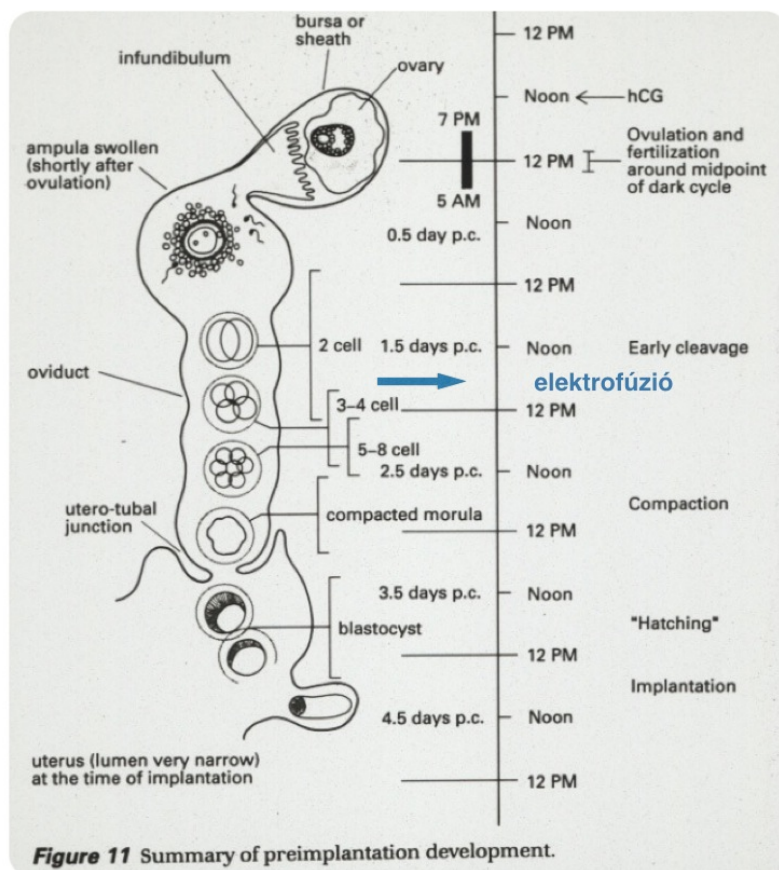
5.: Az új tudományos eredmények 1. pontjában megfogalmazott „A PhD munkám során kidolgozott...” szövegrész helyett valóban szerencsésebb lett volna azt írni: „A PhD munkámat követően kidolgozott...”.

6.: Köszönöm, hogy a dolgozatomban bemutatott ábrákat szemléletesnek találta. Sajnos nem minden ábra esetében sikerült az ábrát és az ahhoz tartozó magyarázó szöveget egy oldalra szerkesztenem, ami

nehezíthette bizonyos ábrák megértését. Valóban jobb lett volna a 3., 4., 5., 8. és a 11. ábra esetében inkább a “táblázat” megnevezést alkalmazni.

Részletes válaszok a dolgozat tartalmát érintő kérdésekre:

1.: “Az egerek párzását követően, a feltételezett megtermékenyülést követően, az állatok kiirtása, majd az embriómosás kb. mennyi idő múlva következett be? Ennek ellenőrzésére végeztek-e vizsgálatot? Hogy ellenőrizték azt, hogy a tetraploid embriók előállításához használt CD1 embriók kora a termékenyüléstől számítottan éppen 39 óra volt?”



1. ábra

Egér embrió fejlődésének bemutatása.

Az elektrofúzió időpontját jelöltem be az ábrán, ez kb. a megtermékenyüléstől számítva 39 óra (Nagy, 2003).

A szuperovuláltatott egereket a HCG injekció adását (12:00) követően helyeztük a hímekhez. Szakirodalmi adatok alapján a párzás a sötét periódus közepén történik *(1.ábra)(Nagy, 2003)*. A megtermékenyülés pontos idejét sajnos mi nem tudtuk meghatározni. Ebből következően szerencsésebb lett volna a dolgozatban a tetraploid embriók előállításakor nem a termékenyülés időpontjához viszonyítva megadni a fúzió időpontját, hanem a HCG injekció adásának időpontjához képest. Tapasztalatunk szerint, ha 12:00 órakor adjuk a HCG injekciót, akkor a fúzió elvégzésének optimális ideje az azt követő második nap, kb. 14:00-15:00 óra. Ez az az időpont, amikor a kimosott embriók között az első 3-4 sejtes embriók megjelennek.

2.: *“A kiméra blasztociszták kihordására használt álvemhes nőivarú egér egyedeket milyen módszerrel állították elő? Egy nőivarú egyedbe hány blasztocisztát ültettek be? (35. oldal)”*

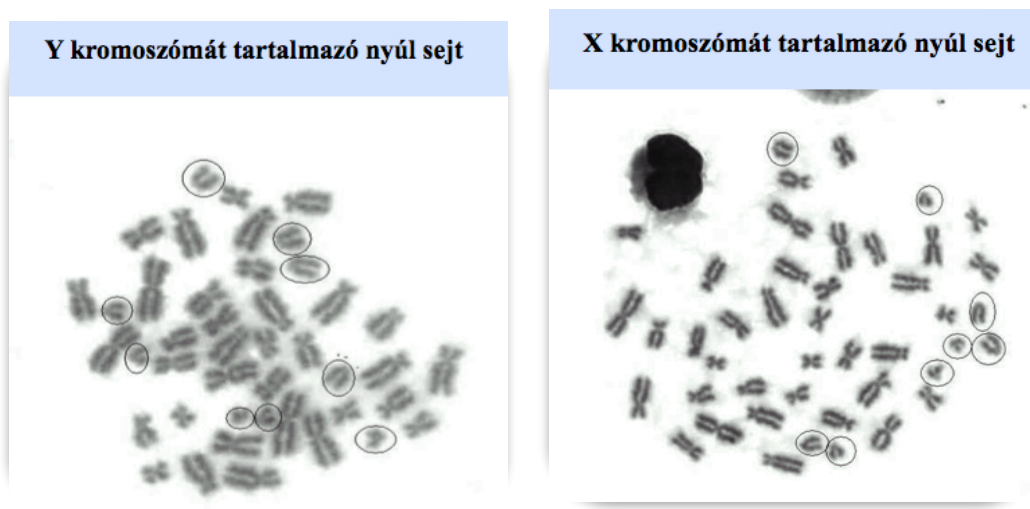
Az álvemhes (recipiens) nőtényeket nem kezeltük hormonnal. Azon a napon, amikor a donor nőtények párzását detektáltuk, nőtényeket tettünk ki a vazektomizált hímekhez. Azokat a nőtényeket használtuk fel recipiensként, amelyeknél másnap reggel a hüvelyben váladék dugó (plag) volt található. Ezeknek a nőtényeknek a méhébe ültettük be a plag napját követő második nap délutánján a blasztociszta állapotú kiméra embriókat. Általában 6-6 embrió ültettünk be a recipiens nőtények méhszarvaiba.

3.: *“Az embriókinyeréséhez használt nyulak korának, esetleg súlyának, tartási körülményeinek leírása hiányzik. A kísérleti állatok még nem ellett, de ivarérett állatok voltak, hogyan győződtek meg az állatok előzetes petefészek működésének állapotáról? (35-36. oldalak)”*

Nem vizsgáltuk a kísérletben használt nyulak petefészek működését szuperovuláltatásuk megkezdése előtt. A kísérletek nagy részében Új Zélandi nyulakat, néhány esetben Hycote hibrid nyulakat használtunk. A donor és recipiens nőivarú nyulakat ivaréretten, 17-18 hetes korban vásároltuk. Az első nap 30 NE/kg PMSG-t (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) kaptak intramuszkulárisan, majd ezt követően 72 órával 45 NE/kg hCG-t (Human Chorionic Gonadotropin) (Choragon injekció, Ferring GmbH) a fülvénába injektálva.

4.: *“A kromoszóma analízist a jelölt nyulak esetében perifériás vér limfocitákból végezte. Honnan (melyik érből) gyűjtött vért a vizsgálathoz? A vérből a limfocitákat hogyan izolálta és készítette elő a vizsgálathoz? (43. oldal)”*

A heparines vért a fülvénából vettük és lektineket (B-limfociták PokeWeed Mitogénnel (PWM), a T limfociták fitohemagglutininnal (PHA) poliklonálisan aktiválhatók) tartalmazó RPMI-tápfolyadékban, 38,5 C°-on tenyésztettük, hogy a leülepedő vörösvértestek felületén 2-3 napig osztódhassanak a limfociták. A tenyésztés végén két órára vinblasztint adtunk a tenyészetekhez, ezután centrifugáltuk, majd az üledéket 0,56% KCl-ban reszuszpendáltuk és 20 percre visszatettük a termosztátba. Ezután megint centrifugáltuk, majd reszuszpendáltuk a fixálóban (metanol/ecetsav, frissen készült 3:1 arányú keveréke) a sejteket. Ebben a fixálót tartalmazó oldatban -20 C°-on tárolhatjuk a sejtszuspenziót. A kromoszóma preparálás előtt a fixáló oldatban újra mostuk a sejtszuspenziót, majd hideg, párás lemezre cseppentettük azt. Vízszintesen tartva hagytuk megszáradni a lemezt. Másnap Giemsa oldattal festettük a lemezeket, majd megkerestük az osztódásokat. A komplett mitózisokat ($2n=44$) analizálva meghatározható a legkisebb akrocentrikus kromoszómák száma. Kilenc kis akrocentrikus kromoszóma (egy-egy pár 18, 19, 20, 21 és egy Y) esetében a sejt XY-os, nyolc ilyen kis akrocentrikus kromoszóma esetében pedig XX genotípusú. Ha kariogramot vagy FISH vizsgálatot is terveztünk, akkor a vizsgálat előtt G- vagy C-sávozást is kellett végeznünk.



2.ábra

A komplett mitózisok analizálása ($2n=44$) nyúl limfocitákban. A metafázisok vizsgálatával meghatározható a legkisebb akrocentrikus kromoszómák száma. Kilenc kis akrocentrikus kromoszóma esetében a sejt XY, nyolc ilyen kromoszóma esetében pedig XX genotípusú (saját ábra).

5.: “A nyúl esetében a cDNS (reverz transzkripcióval mRNS-ről átírt DNS szál) meghatározásához használt reagens (vegyszer) keveréket gyártó cég nevét a jelölt megfelelő módon közli. Nem tudom ugyanakkor az itt közölt „Supplementary Table 7” piros színnel közölt megjegyzést értelmezni. (45. oldal, 2. sor)”

Sajnos ebben az esetben bent maradt egy olyan rész a szövegben, amit előzőleg szöveg ellenőrzésekor megjelöltem piros színnel, hogy javítandó, de a végső változatban mégis bent maradt véletlenül.

6.: “A statisztikai analízis leírásakor a jelölt azt említi, hogy a kísérleteket legkevesebb 3 párhuzamos sorozatban végezte. Hogyan ítéli meg a vizsgálatok megbízhatóságát ilyen elemszámok alkalmazása mellett az Ön által végzett kísérletekben? (46. oldal) “

Különböző vizsgálatokban, különböző elemszámmal, különböző számú, és típusú ismétléssel dolgoztunk. Általánosságban elmondható, hogy ha embriókkal dolgozunk, azok *in vitro* fejlődését, vagy a beültetett embriók megszületési arányát vizsgáljuk, akkor sajnos a legtöbb esetben korlátozott számú embrió áll rendelkezésre. Ebben az esetben is lehet statisztikai vizsgálatokat végezni, három vagy több párhuzamos kísérlet adatainak elemzésével. A párhuzamos vizsgálatok között legtöbbször nagy szórás értékeket kapunk, de megfelelő statisztikai módszert választva eldönthető, hogy valóban szignifikáns különbségről van-e szó.

A qPCR vizsgálatok esetében minden esetben legalább három különböző kísérletből származó biológia párhuzamossal dolgoztunk. Minden biológiai mintából legalább két párhuzamos RNS izolálást végeztünk, majd a qPCR vizsgálatban ugyan abból a cDNS mintából három párhuzamost tettünk fel. Embrió vizsgálatok esetében, hogy elegendő RNS-t tudjunk kinyerni, “pooloz”-tuk az embriókat, vagyis több embrióból egyszerre nyertük ki az RNS-t, de ebben az esetben is legalább két kísérlet sorozatból származó embriókból létrehozott RNS mintát vizsgáltunk.

7.: “A kísérleti módszereit jóváhagyó állatvédelmi engedélyei a 2002-es, illetve a 2008-as évekből származnak. A ma érvényben levő „Alaptörvény” értelmében miként ítéli meg vizsgálatait etikai vonatkozásait.”

Magyarország 2012. január 1-től hatályos Alaptörvényének XX. cikke értelmében:

“(1) Mindenkinek joga van a testi és lelki egészséghez.

(2) Az (1) bekezdés szerinti jog érvényesülését Magyarország genetikailag módosított élőlényektől mentes mezőgazdasággal, az egészséges élelmiszerekhez és az ivóvízhez való hozzáférés

biztosításával, a munkavédelem és az egészségügyi ellátás megszervezésével, a sportolás és a rendszeres testedzés támogatásával, valamint a környezet védelmének biztosításával segíti elő."

A munkánk során létrehozott, illetve létrehozandó kiméra, iker, vagy transzgénikus egereket, nyulakat, az alapkutatóban, illetve az orvos biológia kutatásokban modell állatként szeretnénk felhasználni. Ezzel az orvosbiológia kutatásokat, a gyógyítást szeretnénk segíteni, ami a jövőben segítheti majd a magyar emberek "lelki és testi egészségét".

A jelenleg általam végzett állatkísérletekre PEI/001/303-4/2013 számmal 2013 óta újabb engedéllyel rendelkezem, ami 2018. február 13.-ig érvényes. Ez az engedély kérelem, az abban engedélyezett állatkísérletek már a legújabb Európai Unió szabályozás értelmében lettek megtervezve.

Részletes válaszok a dolgozat eredmények részét érintő kérdésekre:

8.: "A dolgozat 6.1.1. számozású fejezetében a jelölt egérkimérák előállítását célzó vizsgálataiban figyelemre méltó eredményeket kapott, amikor egy XY genotípusú blasztomert XX típusú gazdaembrióval aggregáltatott. A megszületett 22 embrió közül 12 kiméra lett, ezek közül 11 (85,7%) hímivarú volt, amelyek utódaikban is örökölték az EGFP transzgént, amely azt bizonyítja, hogy egyetlen XY genotípusú embrióból származó blasztomer képes átfordítani az XX gazdaembrióval aggregáltatva létrehozott kiméra ivarát. Ezen vizsgálatai során, bár az egyetlen nőivarú egyed fertilis volt, de nem örökölte a transzgénikus tulajdonságokat. Kérem, fejtse ki bővebben, hogy mivel magyarázható ez az eredmény, és ebből milyen általános következtetések vonhatók le! "

Úgy gondoljuk, hogy ebben az esetben a kiméra nőtény petefészkében nem voltak ott megfelelő helyen, megfelelő arányban, az XY-os embrióból származó sejtek, így a nem jöhetett létre az ivarátfordítás. A nőtényben csak XX-es, nem zöld petesejtek voltak, ezért nem kaptunk zöld utódokat.

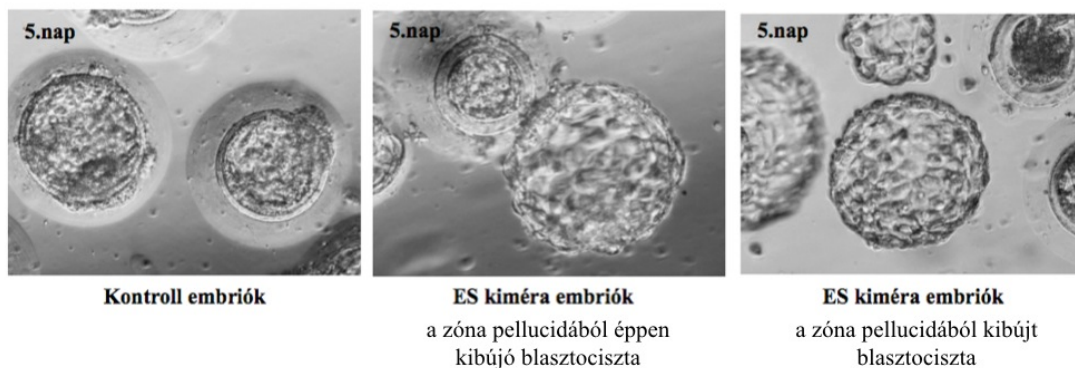
Egy kiméra szerveiben a két embrióból származó sejtek eloszlása nem teljesen egyenletes, lehetnek olyan szervek amelyekben az XY-os, zöld színű embrióból származó sejtekből kevesebb sejt jut be. Ha ez az embrió ivarlécében történik, akkor elképzelhető, hogy nem tud az ivarátfordítás megtörténni, mivel az ott található kis számú XY-os Sertoli sejt kis mennyiségű SRY-t termel, az alacsony koncentráció pedig nem elegendő az ivarátfordításhoz. Ha az ősvarsejtek (PGC sejtek)

kezdetben egy XX-es, nem zöld embrióból származnak, akkor csak fehér petesejt termelődik, fehér utód fog születni. Ha mind kettő jelenség együtt áll fent, akkor nem fog megtörténni a szexátfordítás és fehér utódok születnek.

9.: “Az előzőekben felvázolt kutatások eredményeit szemléltető 20. ábra alsó sorában bemutatott, egymás után következő 2. és 3. kép mindegyike ES kiméra embriókat mutat be. Megkérdezem a jelöltet, hogy a két azonos című kép miben különbözik egymástól?”

A két kép közt az a különbség, hogy míg a második képen éppen egy, a zóna pellucidából kibújó nyúl kiméra embrió látható, addig a harmadik képen már egy a zóna pellucidából kibújt kiméra. Az ábra feliratban ezt valóban fel kellett volna tüntetnem, úgy ahogy most a 3.ábrán lehet látni.

20. ábra (67. oldal)



3. ábra

A kontroll és kiméra nyúl embriók. Az egyik kiméra embrió éppen most bújik ki a zona pellucidából, a harmadik képen látható kiméra embrió, már sikeresen kibújt abból.

Gödöllő, 2014.04.03.

Köszönettel,

Góczy Elen