

dc_512_12

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

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

GÓCZA ELEN

**MEZŐGAZDASÁGI BIOTECHNOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT
GÖDÖLLŐ**

2012

1.RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
2.BEVEZETÉS	8
3.IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
3.1.EGÉR ÉS NYÚL EMBRIÓK EMBRIONÁLIS FEJLŐDÉSE	9
3.2.KIMÉRÁK SZEREPE AZ EMBRIOLÓGIA KUTATÁSOKBAN	10
3.3.EMBRIONÁLIS ÖSSEJTEK	13
3.3.1. A pluripotencia fogalma	13
3.3.2. A humán embrionális őssejt	15
3.3.3. Az egér embrionális őssejt	16
3.3.4. LIF (Leukémia Inhibitor Faktor)	19
3.4.MIRNSEK SZEREPE	20
3.4.1. Történeti áttekintés, a miRNS útvonal komponensei	20
3.4.2. miRNS-ek biogenezise	21
3.4.3. A miRNS-ek és az emlős embrionális őssejtek kapcsolata	24
3.4.4. A genetikailag módosított állatok előállítására alkalmazott módszerek	26
3.5.GENETIKAILAG MÓDOSÍTOTT ÁLLATOK ELŐÁLLÍTÁSÁRA ALKALMAZOTT MÓDSZEREK	26
3.5.1. DNS mikroinjektálása	27
3.5.2. Génkiütött ('knock-out') és génmódosított ('knock-in') állatok	27
3.5.3. Feltételesen génkiütött állatok	28
3.5.4. Cink-ujj nukleáz alkalmazása génkiütött állatok létrehozására	29
3.5.5. Klónozással létrehozott transzgénikus állatok	29
3.5.6. A transzgénikus nyulak alkalmazási lehetőségei alkalmazásának lehetőségei	30
4.CÉLKITŰZÉSEK	32
5.ANYAGOK MÓDSZEREK	33
5.1.EGÉR EMBRIÓK KINYERÉSE, TENYÉSZTÉSE, KIMÉRÁK LÉTREHOZÁSA, VISSZAÜLTETÉSE	33
5.1.1. Egér embriók kimosása, tenyésztése	33
5.1.2. Tetraploid embriók előállítása	33
5.1.3. Diploid blasztomerek izolálása	34
5.1.4. Blasztomerek szexálása egy sejt PCR-t alkalmazva	34

dc_512_12

5.1.5. Aggregációs kimérák előállítása szexált diploid blasztomerek és diploid vagy tetraploid gazda-embriók felhasználásával	35
5.1.6. Kiméra blasztociszták beültetése	35
5.2. NYÚL EMBRIÓK KINYERÉSE, TENYÉSZTÉSE, KIMÉRÁK LÉTREHOZÁSA, VISSZAÜLTETÉSE	35
5.2.1. Nyulak szuperovuláltatása	35
5.2.2. Nyúl embriók kimosása, in vitro tenyésztése	35
5.2.3. Kiméra embriók előállítása	36
5.2.4. Nyúl Embriók beültetése	36
5.3. EGÉR ES SEJTEK TENYÉSZTÉSE, JELLEMZÉSE, IN VITRO DIFFERENCIÁLTATÁSA	37
5.3.1. Fibroblaszt sejtek tenyésztése	37
5.3.2. Fibroblaszt sejtek mitomicines kezelése	37
5.3.3. ES sejt tenyésztés	38
5.3.4. Aggregációs ES kimérák előállítása	38
5.3.5. Immunfluoreszcens analízis	39
5.3.6. Sejtciklus analízis	39
5.3.7. DNS elektroporálása ES sejtekbe	39
5.3.8. Kolonia esszé	40
5.3.9. Alkalikus foszfatáz festés (APS)	40
5.4. NYÚL ES SEJTEK TENYÉSZTÉSE, JELLEMZÉSE, IN VITRO DIFFERENCIÁLTATÁSA	41
5.4.1. Nyúl ES sejtenyésztés	41
5.4.2. Nyúl ES kolóniák jellemzése	41
5.4.3. Immunfestés	42
5.4.4. Nyúl ES sejtek in vitro differenciáltatása	42
5.4.5. Nyúl kromoszómák analízise	43
5.4.6. FISH technika nyúlban	43
5.5. MOLEKULÁRIS GENETIKAI VIZSGÁLATOK	44
5.5.1. Felhasznált vektorok, klónozások	44
5.5.2. RNS izolálás és kvantitatív valós idejű RT-PCR (qRT-PCR)	44
5.5.3. Az alábbi TaqMan génexpressziós esszéket használtuk:	45
5.5.4. TaqMan Low Density Array (TLDA analízis)	45

dc_512_12

5.5.5. SOLiD™ szekvenálás és kis RNS analízis	46
5.5.6. Statisztikai analízis	46
5.5.7. Állatvédelmi szabályok	46
6. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	47
6.1. KIMÉRA EGEREK VIZSGÁLATA	47
6.1.1. Egér kimérák alkalmazása az ivari elköteleződés folyamatának vizsgálatára	47
6.1.2. Identikus iker egerek létrehozása	49
6.2. NYÚL ES SEJTVONALAK LÉTREHOZÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ FAKTOROK VIZSGÁLATA	53
6.2.1. Egér és nyúl ES sejtvonalak alapításának összehasonlítása	53
6.2.2. A nyúl korai embrionális fejlődését befolyásoló transzkripciós faktorok expresszió-jának vizsgálata	55
6.2.3. LIF hatásának vizsgálata a nyúl ES sejtek alapítása során	61
6.2.4. Nyúl ES sejtek in vitro differenciáltatása	65
6.3. KIMÉRA NYÚL EMBRIÓK LÉTREHOZÁS MÓDSZERÉNEK OPTIMALIZÁLÁSA	66
6.4. AZ EGÉR ÉS NYÚL ES SEJTEK PLURIPOTENCIÁJÁT BEFOLYÁSOLÓ MIKRO RNS-EK HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA	71
6.4.1. MiR 290-es klaszter túltermeltetésének hatása egér ES sejtek pluripotenciájára	71
6.4.2. Egér és nyúl összejt specifikus miRNS-ek összehasonlítása	78
7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	82
8. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	83
9. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	84
9.1. ANGOL NYELVŰ TUDOMÁNYOS FOLYÓIRATOK	84
9.2. KÖNYVFEJEZETEK	84
9.3. MAGYAR NYELVŰ, TUDOMÁNYOS FOLYÓIRATOK	85
9.4. MAGYAR NYELVŰ, ISMERETTERJESZTŐ FOLYÓIRATOK	86
10. EGYÉB SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	86
10.1. ANGOL NYELVŰ TUDOMÁNYOS FOLYÓIRATOK	86
11. KÖSZÖNET NYILVÁNÍTÁS	88
12. IRODALOMJEGYZÉK	89

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

3' UTR	3' nem transzlálódó szabályozó régió (3' untranslated region)
ADAR	duplaszálú RNS-specifikus adenzin deamináz
Ago2	Argonaute 2
AP	alkalikus foszfatáz (Alkaline Phosphatase)
ARE	Alu válaszelem (Alu responsive element)
BIO-6	bromo-indirubin-3'oxim GSK α/β inhibitor
BMP	bone morphogenic protein
bp	bázis pár
BSA	marha szérum albumin (bovine serum albumin)
C. elegans	Caenorhabditis elegans
CAP	eukarióta (és egyes virális) mRNS-ek 5' végén lévő 7-metil-guanozin módosított nukleotid
CDK	ciklin dependens kináz
cDNS	reverz transzkripcióval mRNS-ről átírt DNS szál
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region 8
DMSO	dimetil szulfoxid
dpc	nappal termékenyítést követően (days post coitum)
dsRBD	duplaszálú RNS kötő domén
dsRNS	duplaszálú RNS
EB	EB csomó, embrionális testecske (embryoid body)
EC	embrionális teratokarcinóma sejt vonal
EG	embrionális csírasejt vonalak (Embryonic germ cell line)
EGFP	zöld fluorescens fehérje módosított változata (Enhanced Green Fluorescent Protein)
EIF4E	eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E
EM	embrionális őssejt tenyésztő médium
EMT	epiteliális-mezenchimális tranzíció
EpiSC	epiblaszt őssejt (epiblast stem cell)
EPL	korai primitív ektoderma-szerű embrionális őssejt (early primitive ectoderm like stem cell)

dc_512_12

ERK	extracelluláris jel által szabályozott kináz (extracellular signal regulated kinase)
ES sejt	embrionális őssejt
ES sejtvonal	pluripotens embrionális eredetű őssejtvonal (Embryonic Stem Cell line)
FBS	magzati borjú savó (fetal bovine serum)
FCS	magzati borjú savó (Foetal Calf Serum)
FGF	fibroblaszt növekedési faktor (fibroblast growth factor)
FISH	fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció (Fluorescence in Situ Hybridization)
FM médium	fibroblaszt tenyésztő médium
FXR-fragilis	X-szerű fehérje
GFP	zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)
HCG	Human Chorionic Gonadotropin
hpg	órával a megtermékenyülést követően (hours post gestation)
ICM	embriócsomó vagy belső sejtcsoport (Inner Cell Mass)
iPS	indukált pluripotens őssejt (induced pluripotent stem cell)
JAK	Janus-associated tyrosine kinase
KLF4	Krüppel faktor szerű fehérje (Krüppel-like factor 4)
KSOM	Potassium Simplex Optimized Medium
LATS	large tumor suppressor protein
LIF	leukémia inhibitor faktor (Leukaemia Inhibitory Factor)
MEF	egér embrionális fibroblaszt (mouse embryonic fibroblast)
MEF kond	MEF kondicionált tápoldat
miRNS	mikroRNS
Oct-4	4-es oktamer kötő fehérje (Octamer binding protein 4)
P-body	processzáló testecske (processing body)
PAZ	Piwi/Argonaute/Zwille család
PBS	foszfát puffer oldat (Phosphate Buffer Solution)
PCR	polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)
PFA	paraformaldehid
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
R2D2	duplaszálú RNS kötő, DCR-2 asszociált fehérje
RA	all-transz retinsav (all-trans retinoic acid)
RAS	Rat sarcoma fehérje alcsalád

dc_512_12

RE	válaszelem (response element)
RDH	1:1:1 keveréke az RPMI, DMEM és Ham's F10 tenyésztő médiumoknak
RISC	RNS indukált géncsendesítő komplex (RNA induced silencing complex)
RLC	RISC töltő komplex (RISC loading complex)
RNSi	RNS interferencia
RT	szobahőmérséklet, 20-25 °C (room temperature)
RT PCR	reverz transzkripcióval kombinált polimeráz lánc reakció (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)
RTK	receptor tirozin kináz
siRNS	rövid interferáló RNS (small interfering RNA)
SSEA	Stage Specific Embryonic Antigen, fejlődési stádiumra jellemző sejtfelszíni antigén
STAT	Signal Transducer and Activator of transcription
TB	trofoblaszt
TGFβ	transzformáló növekedési faktor béta (transforming growth factor β)
TM	tris-malate puffer
TNFα	tumor nekrosis faktor α
TS	trofektoderma őssejt (trophoblast stem cell)
WNT	Drosophila wingless gén homológja
XEN	extraembrionális őssejt (extra-embryonic stem cell)
YAP	Yes-asszociált protein
ZEB1, ZEB2	zinc finger E-box binding homeobox 1 és 2
Zfx	zinc finger protein, X-linked
Zfy	zinc finger protein, Y-linked

2. 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 mikroinjektációs módszerrel nem lehetett megvalósítani. A módosított géneket hordozó ES sejteket gazda embrióba injektálva, vagy azzal aggregáltatva, kiméra embriók hozhatók létre. Ezeket recipiens nőténybe 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.

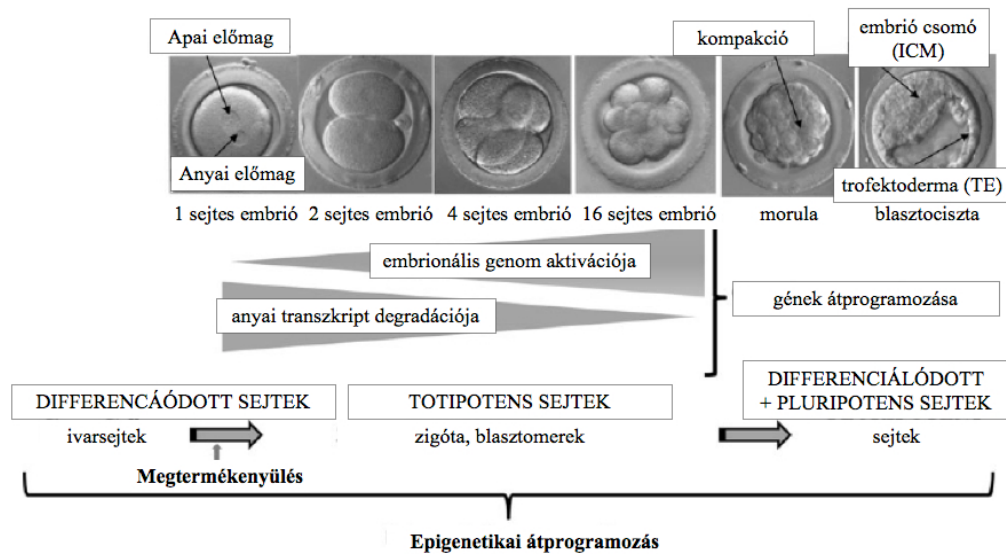
Emlős embriók embrionális fejlődésnek vizsgálata azt mutatja, hogy az egér és patkány embriók fejlődése számos helyen eltér más emlős embriók korai embrionális fejlődésétől. A trofektodermában és az embriócsomóban lejátszódó folyamatok és a pluripotens sejtek differenciálódást befolyásoló faktorok a 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 őssejt vonalakat, 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 őssejt vonalak létrehozásához.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. EGÉR ÉS NYÚL EMBRIÓK EMBRIONÁLIS FEJLŐDÉSE

Morfológiai szempontból a korai embrionális fejlődés az emlősökben nagyon hasonlóan tűnik azonban ez a látszólag egyszerű folyamat nagyon komplex molekuláris folyamatok összessége található **(1.ábra)**(Duranthon et al., 2012) A megtermékenyülés után a zigótában a petesejt citoplazmájában két differenciálódott ivarsejtből származó anyai és apai genom egyesül. Ahhoz hogy a totipotens embrionális genom létrejöhesse epigenetikailag át kell programozni az apai és anyai eredetű genomot. Az embrionális fejlődés során az embrió sejtjeinek fejlődési potenciálja lecsökken, hólyagsíra állapotú embrió (blasztocisza) két különböző sejtípust fog tartalmazni. Egy differenciálódott trofektoderma sejt réteget (TE), illetve a pluripotens embriócsomót (ICM). A folyamat során számos gén epigenetikai átprogramozásának kell megtörténnie. Ez az epigenetikai átprogramozás felelős az elsődleges anyai transzkriptumok lebomlásáért, s az embrió genomjáról történő átírás aktivációjáért is. Ez az átprogramozás minden emlős embrió esetében hasonlóan zajlik, azonban az átprogramozás idejében eltérések találhatók. Az egér embriók esetében már két sejt állapotra az embrionális genom aktivációja teljes mértékben megtörténik, míg más fajoknál erre több sejtciklusra van szükség. Jelentős eltérés figyelhető meg abban is, hogy az embriócsomóból hogyan alakul ki az epiblaszt, illetve a hipoblaszt réteg. A rágcsálókban a gasztruláció, vagyis az embrionális csíralemezek kialakulása egy 3D struktúrán belül történik, addig a többi emlős esetében egy lapos embriódiszk alakul ki a magzatban. Emiatt a térbeli különbség miatt a sejt-sejt közti kölcsönhatások is máshogy alakulnak. Berg és munkatársai arról számoltak be, hogy már a korai sejtelköteleződés során is különbség van az egér és más emlős embriók esetében a korai sejtelköteleződés során (Berg et al., 2011). Ebből következően az egér embrionális fejlődése során lejátszódó folyamatok nem modellezik más emlős embriók fejlődését, a nyúl. mint modell embrió, több információt adhat vizsgálataink során.



1. ábra: Az epigenetikai átprogramozás során az anyai transzkriptumok lebomlanak, az embrió genomjáról történő átírás aktiválódik. Az egér embriók esetében az embrionális genom aktivációja teljes mértékben megtörténik a két sejtes állapot során, míg más fajoknál erre több sejtciklus szükséges (Duranthon et al., 2000).

3.2. KIMÉRÁK SZEREPE AZ EMBRIOLÓGIA KUTATÁSOKBAN

A kiméra görög eredetű szó. Olyan élőlényt jelent, amely több egyed sejtjeiből jön létre. Mozaik állatokról akkor beszélhetünk, amikor szomatikus mutációval létrejött genetikailag különböző sejtpopulációk találhatók egy egyeden belül. A mozaikos állatok nem ritkák, a világon élő állatok több mint fele genetikailag mozaikos.

Léteznek természetes kimérák is. 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 magzathoz a másik magzatba. Ennek eredményeképpen mindkét magzat "hematopoetikus" kiméra lesz. A szarvasmarha freemartin másodlagos nemi jellege sem fejlődik ki, ökörré emlékeztető, semleges típust mutat. A jelenség oka, hogy a magzati fejlődés idején a vérkeringés összeköttetése folytán a bikaborjú androgén hormonjai bejutnak az üsző véráramába. Ez azért lehetséges, mert a herék korábban fejlődnek ki, mint a petefészkek és hormonjaik hatékonyabbak. A hím ivari

hormonok megzavarják a női nemi szervek normális kifejlődését. Freemartinok előfordulhatnak más fajok esetében is, csak jóval kisebb arányban. A lovakban, selyemmajmokban, azonban a szarvasmarhákától eltérően az XX/XY nőtények általában termékenyek.

Az irodalomban közölt kimérák legnagyobb hányadát az egér kimérák alkotják, de e mellett leírtak patkány (Mayer and Fritz, 1974), nyúl (Gardner and Munro, 1974), birka és szarvasmarha (Brem et al., 1984) kimérákat is. A gazdasági haszonállatok esetében a kiméra kutatások jelentősége kisebb, mivel mind a mai napig nem sikerült olyan embrionális őssejteket létrehozni, amelyek alkalmasak lennének ivarsejt kiméra állatok létrehozására.

Ha az ES sejteket immundeficiens, scid egerek bőre alá, vagy vesetokjába juttatják, a beinjektált sejtek olyan teratoma tumorokat hoznak létre, amelyekben mindhárom embrionális csíralemezből származó differenciálódott sejtek megtalálhatóak lesznek.

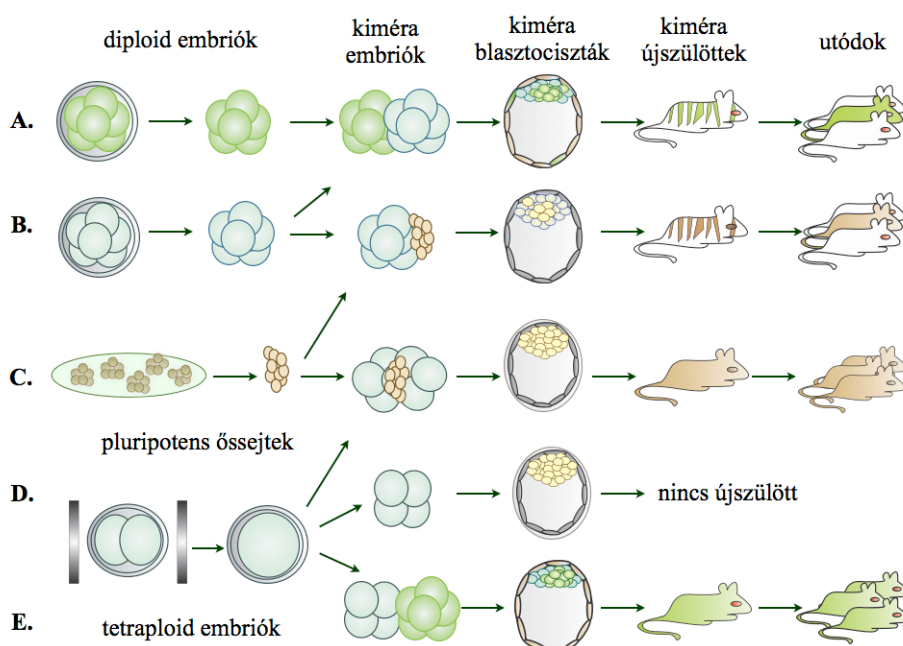
Ha azonban az ES sejteket gazda-embrióba injektálják, vagy nyolcsejtes gazda-embrióval aggregáltatják, az ES sejtek beépülnek gazda-embrió embriócsomójába. Az embrionális környezetbe visszakerülve, a valóban pluripotens ES sejtek differenciálódni kezdenek, s a normális embrionális fejlődés folyamatába bekapcsolódva a legkülönbözőbb sejtféleségekké alakulnak. Az ES sejtvonalból származó sejtek a megszülető ES kiméra állat minden szövetféleségében megtalálhatóak lesznek, így az ivarsejtek között is (Nagy et al., 1993)(Nagy et al., 2010)

Tetraploid gazda-embriók alkalmazásával lehetett igazolni, hogy az ES sejtek képesek kialakítani a magzat minden embrionális eredetű szövetét, és életképes, sejtvonal eredetű utódokat lehet létrehozni. Mivel a tetraploid embriókban az extraembrionális részek normálisan fejlődnek, de a magzat embrionális részei nem alakulnak ki, az embrió elpusztul. Megfigyelték, hogy tetraploid és diploid embriókból összeállított kiméra embriókban főleg a diploid sejtek vettek részt a magzat kialakításában (Nagy et al., 1990).

Ha ES sejteket aggregáltattak tetraploid embriókkal, a magzat embrionális részében az ES sejtek domináltak, és olyan életképes utódok születtek, amelyek minden sejtje sejtvonal eredetű volt, a tetraploid embrióból származó extraembrionális szövetek jelenléte csak segítette a normális embrionális fejlődést (Nagy et al., 1990), (Nagy et al., 1993).

A transzgénikus állatok előállítására kétféle módszer ismeretes: a mikroinjektálás és az aggregáltatás. Az elő magba történő injektálást követően a beépült gén kópiaszáma és helye előre nem határozható meg. Ezért sok injektált embrióra van szükség, hogy az

embriók között biztosan legyen olyan, amelyben a transzgén a megfelelő helyre és kópiaszámban integrálódott, és arról expresszió történik. A transzgenikus ES sejteket felhasználva a transzgenikus sejteket az embrióval való aggregáltatás előtt tesztelni lehet, így megállapítható, melyik az a transzgenikus sejtvonal, amelynek sejtjeiben a transzgén a kívánt helyre, stabilan épült be, és arról expresszió is történik (Bosze et al., 2003). A sejtvonalak mellett ivar és genetikai terheltség szempontjából is vizsgálhatók. Előre meghatározható lehet az embrió neme és megfelelő számú hímnemű ES sejtet felhasználva az ivar átfordítás is lehetségessé válik (Carstea et al., 2007) (Tarkowski et al., 2001). Az ivarsejt ES kiméra állatok esetében a transzgén átöröklődik az utódokba is, amelynek hatása a további generációkra is átadódik. Amennyiben egér kimérákat előállítva, jobban megismerjük a gazda-embrió és ES sejtek kölcsönhatása során működő folyamatok alapjait, gazdasági haszonállatok esetében is hatékonyabbá válhat az aggregációs kiméra előállítás, így a közeljövőben fontos szerepet tölthet be az állattenyésztésben is, nemcsak a biotechnológiai és fejlődésbiológiai kutatásokban (Bosze et al., 2003).



2. ábra: Egér kiméra embriók előállításának lehetőségei.

A.: Két nyolcsejtes embrió aggregáltatásával létrehozott kiméra embriók, ivarsejt kiméra utódok.

B.: Egy nyolcsejtes gazdaembrió és ES sejtek aggregáltatásával létrehozott kiméra embriók, ivarsejt kiméra utódok.

C.: Két tetraploid gazdaembrió és ES sejtek aggregáltatásával létrehozott kiméra embriók, ES sejtvonala eredetű identikus utódok születnek.

D.: A tetraploid embriókból kifejlődő blasztociszták beágyazódnak, de nem születik életképes utód a tetraploid embriókból.

E.: Egy tetraploid embrió és egy nyolc-sejtes embrió aggregáltatásával létrehozott kiméra embriók esetében a diploid embrióból származó utód születik.

3.3. EMBRIONÁLIS ÖSSEJTEK

3.3.1. A pluripotencia fogalma

Pluripotens (mind három embrionális csíralemez, így az embrionális ektoderma, mezoderma, endoderma sejtjeinek létrehozására is képes) egér embrionális összejt vonalakat (mESC) egér embrionális fibroblasztból létrehozott tápláló sejtrétegen (MEF) hólyagsíra állapotú embrió (blasztociszta) embriócsomójából (ICM), magzati borjúsavót (FBS) tartalmazó tenyésztő médiumban először 1981-ben sikerült létrehozni (Evans and Kaufman, 1981), (Martin, 1981). Az első pluripotens humán embrionális összejtek (hESC) létrehozása 1998-ban valósult meg (Thomson et al., 1998). Valóban pluripotens ES sejt vonalakat gazdasági haszonállatok embrióiból azonban, mind a mai napig nem sikerült létrehozni. A gazdasági haszonállatok embrióiból létrehozott ES-szerű sejt vonalak eltérő morfológiai tulajdonságokkal rendelkeznek, eltérő faktorokat igényelnének a pluripotens állapot megtartásához. Ezeket a faktorokat még nem pontosan ismerjük, csak azt tudjuk, hogy sem a humán ES sejtek létrehozásához használt médiumok, sem pedig az egér ES sejtek esetében használtak nem megfelelőek a haszonállatok embrióiból származó embrionális sejtek pluripotens állapotban való tartásához (Honda et al., 2008; Honda et al., 2009); (Zakhartchenko et al., 2011)

Az elmúlt években sikerült előrelépni a pluripotencia megtartásában szerepet játszó faktorok megismerésében. 2006-ban Takahashi és Yamanaka arról számolt be, hogy négy a pluripotenciát meghatározó faktor (Oct4, Sox2, Klf4, Myc) túltermeltetésével egér fibroblaszt sejtekben, egy új pluripotens sejt típust, az úgynevezett indukált pluripotens sejteket (iPS) sikerült létrehozniuk. Ezek az iPS sejtek, jelenlegi ismereteink alapján, minden tekintetben egyenértékűnek tekinthetők az embriók embriócsomójából származó ES sejt vonalak sejtjeivel (Takahashi and Yamanaka, 2006). Ezt a technikát hamarosan

dc_512_12

sikeresen alkalmazták humán iPS sejt vonalak (Takahashi et al., 2007); (Yu et al., 2007) létrehozására, és számos más állatfaj, beleértve a majmot (Liu et al., 2008); (Liao et al., 2009) esetében is. Nyúl iPS sejtek létrehozásáról is jelent meg közlemény, azonban ezeket a sejteket felhasználva nem sikerül kiméra embriókat létrehozni (Honda et al., 2010).

Ying és mtsai igazolták, hogy ha a PD0325901 (mitogen-activated protein kinase inhibitor) Mek inhibitort együtt adják a CHIR99021 Gsk3 inhibitorral, ez meg tudja tartani a sejtek pluripotenciáját. Igazolták, hogy CHIR99021 és a PD0325901 inhibitorok hozzáadása a tenyésztő médiumhoz (2i rendszer) egérben új sejt vonalak hatékony alapítását teszi lehetővé. Az ES sejtek pluripotenciája addig marad meg, amíg a differenciálódást indukáló Erk szignál rendszert gátolja a PD0325901 inhibitor (Ying et al., 2008), (Li et al., 2008). A Gsk3 gátlása elősegíti a sejtek önmegújulását, azáltal, hogy a sejteket folyamatosan osztódó állapotban tartja, illetve, hogy megakadályozza az idegsejt irányú differenciálódásukat.

Ying és mtsai-nak homológ rekombináción keresztül történő génkiütéssel egy tumor szupresszorban hiányos transzgenikus patkányokat sikerült előállítani a 2i médiumban létrehozott patkány ES sejteket felhasználva, 2010-ben. Ennek az eredménynek az a jelentősége, hogy ettől kezdve lehetségessé vált a patkányt is, mint modellállatot, az emberi betegségek tanulmányozására alkalmazni (Ying et al., 2008). Természetesen ugyanezzel a módszerrel elvben más fajokban, így nyúlban is lehetséges lesz célzott génmódosítást végrehajtani.

Az embrionális őssejteket jellemezhetjük differenciálódási képességükkel, például a három csíralemez irányú elköteleződési képességgel, illetve in vivo teratoma képződéssel, valamint in vitro spontán differenciálódással. A teratoma képződéses vizsgálat immunhiányos (SCID) egereken történik. A vesetokba injektálják be az embrionális őssejteket. Néhány hét múlva mindhárom csíravonal irányába differenciálódó sejteket találhatunk (hámsejtek, izomsejtek, ganglionsejt-szerű struktúrák, porcsejtek...) Spontán in vitro differenciáltatásos technika során embrionális őssejtekből soksejtes aggregátumokat, úgynevezett embrió-szerű testecskéket (EB) hozhatnak létre. Ezek sejtjei az idő előrehaladtával folyamatosan elvesztik pluripotenciájukat (pluripotencia markerek ellenőrzésével kimutatható) és képesek mindhárom csíralemez sejtjeinek létrehozására.

Tovább folytatva a sort, a primordiális ősvarsejtekből (őscsira sejtek, PGC) hozták létre az úgynevezett embrionális csírasejt eredetű (EG) őssejt vonalakat. Először Matsuinak sikerült előállítani EG sejttenyészeteket (Matsui et al., 1992). EG sejtekből

létrejöhetnek testi és ivari sejtek, valamint kiméra állatok is. Abban különböznek az ES sejtektől, hogy a genomi átíródás során érintett gének metilációja nem történt meg teljes mértékben, valószínűleg ennek következtében az EG sejtekből kisebb eséllyel kaphatunk ivarsejt kiméra állatokat.(Wobus and Boheler, 2005).

3.3.2.A humán embrionális őssejt

Mint minden őssejtet, a humán őssejteket is jellemezhetjük a fejlődési képesség, transzkripciós és epigenetikai profil és a sejtfelszíni markerek szempontjából. Fejlődési képesség alatt értjük, hogy az adott őssejtből milyen típusú sejtek alakulhatnak ki. Humán őssejtek esetében a legelfogadottabb eljárás az, hogy a humán őssejteket egérbe juttatják, ahol azok tumorokat alakítanak ki. Egy valódi pluripotens őssejtvonal esetében mindhárom csírasejt vonal sejtjei megtalálhatók a tumorokban. Egér embrionális őssejtek esetében a pluripotencia igazolására ivarsejt-kimérákat hoznak létre vagy a teratoma képzési képességgel jellemzik az őssejtek pluripotens állapotát. Ivarsejt-kiméra képzéskor a vizsgált őssejteket aggregáltatják nyolcsejtes gazda embriókkal, vagy belefecskendezik egy hólyagcsíra állapotú (blasztociszta) embrióba, majd az ebből kialakult kiméra embriót beültetik álvemhes nőtényekbe. A teljes pluripotenciát mutató őssejtek a blasztociszta szerves részévé válnak, és a kiméra embrió minden szövetébe beépülnek, így az ivarsejtekbe is. A kiméra állatokat egymással keresztezve tehát kaphatunk olyan utódot, amely kizárólag a vizsgált őssejtvonalból ered. Humán őssejtek esetében a fejlődési képesség csak korlátozottan vizsgálható, hiszen ivarsejt-kiméra létrehozása nem lehetséges.

A humán őssejt transzkriptum, proteom és epigenom tanulmányozása az őssejt biológia egyik legfontosabb területe. Számos sejtfelszíni marker áll rendelkezésre a humán őssejtek csoportosítására, ezek a markerek korreálnak az őssejtek származásával, specifikusak lehetnek az embrió eredetű (például embrionális őssejt vagy ES sejt) őssejtekre vagy indukált pluripotens sejtekre (iPS sejt)(Adewumi et al., 2007). A markerek egy csoportja (SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 and TRA-1-81, endogén Oct-4, Nanog, Sox2, Zfp42) alapvetően jellemzi az humán embrionális őssejteket függetlenül a sejtek izolálására alkalmazott technikától. Ugyanezeket a markereket hordozzák a humán embrió epiblaszt sejtjei is, ami arra utal, hogy ez a humán embrionális őssejtekhez legközelebb álló in vivo sejtípus (Henderson et al., 2002).

3.3.3. Az egér embrionális őssejt

Minden egér embrionális őssejtre jellemző az Oct4, Nanog és Sox2 együttes jelenléte. Ez a három transzkripciós faktor együtt köt azon gének promótereire, amelyek részt vesznek a pluripotencia vagy a korai elköteleződés szabályozásában, ezáltal biztosítják a pluripotencia fenntartását és gátolják a differenciálódást. Eddig három féle pluripotens sejtvonalat és két részlegesen elkötelezett őssejtvonalat sikerült előállítani közvetlenül az embrióból vagy a már létező egér embrionális sejtvonalakból átprogramozással létrehozni (1. ábra). A pluripotens vonalak az ES sejtek, korai primitív ektoderma-szerű sejtek (early primitive ectoderm-like, EPL sejtek) (Rathjen és mtsai., 1999) és epiblaszt őssejtek (epiblast stem cells, EpiSC) (Brons et al., 2007). A részlegesen elkötelezett őssejt típusok a trofoblaszt őssejt (trophoblast stem cell, TS), amiből a trofektoderma és extraembrionális rétegek fejlődnek; és az extra-embrionális endoderma őssejt (extra-embryonic endoderm, XEN őssejtek), amiből a primitív endoderma és az ebből származó sejtek alakulnak ki. Az EpiSC sejtek a késői epiblasztból erednek (Nichols et al., 2009). Mai ismereteink szerint az egér ES sejtek a korai preimplantációs embrió epiblasztjának in vitro megfelelői. Az epiblasztnak ez a stádiuma az extraembrionális elköteleződés, vagyis a trofektoderma létrejötte után jellemző, amikor az embriócsomóban (ICM) történő első differenciálódás lépést követően létrejönnek a primitív ektoderma és primitív endoderma sejtek. Később FGF, WNT, és BMP illetve ezek antagonistái hatására alakul ki az úgynevezett korai posztimplantációs epiblaszt.

Számos jel mutat arra, hogy a humán ES sejtek inkább az egér EpiSC sejteknek feleltethetőek meg (Brons et al., 2007). A humán ES sejtek és az egér EpiSC sejtek számára alapvetően fontos a Nodal/Aktivin jelátvitel a pluripotencia megőrzéséhez. Egér ES sejtekben ez nem szükséges. Ugyanakkor egér ES sejtek fenntartásához elengedhetetlen a LIF, míg LIF-nek nincs központi szerepe a humán ES sejtekben és az egér EpiSC sejtekben. Az egér ES sejtek életképesek maradnak, ha a sejteket egysejtes szuszpenziót létrehozva passzáljuk, míg ezt nem tehetjük meg humán ES vagy egér EpiSC sejtekkel. A számos hasonlóság mellett sok különbséget is találhatunk az egér EpiSC és humán ES sejtek összevetésekor. Egér EpiSC sejtekre (az egér ES sejtekhez hasonlóan) jellemző az SSEA1 (stage specific embryonic antigen) sejt felszíni glikopeptid. Az SSEA1 (vagy másképp CD15 antigén), egy szénhidrát adhéziós molekula, mely glikoproteinek, glikolipidek és pteroglikánok felszínéhez kapcsolódhat. Az egér embrionális őssejtek egyik

dc_512_12

legismertebb markere. Fontos szerepe van a sejtek adhéziójában és vándorlásában a preimplantációs embrióban.

ES sejt vonalakat gazdasági használatok embrióiból azonban, mind a mai napig nem sikerült létrehozni. Bár feltételezik, hogy a pluripotencia a sejtek alapállapota, mégis a különböző fajok embrióiból létrehozott ES-szerű sejt vonalak eltérő tulajdonságokkal rendelkeznek, eltérő faktorokat igényelnek a pluripotens állapotuk fenntartásához (Honda et al., 2008; Honda et al., 2009).

ÖSSEJT VONALAK	EB	TERATOMA	KIMÉRA	CSÍRAVONALBA BEJUTÁS	IRODALMI HIVATKOZÁSOK
Egér EC sejtek	+	+			Andrews et al. [2005]
Humán EC	+	+	+		Andrews et al. [2005]
Egér ES sejtek	+	+	+	+	Evans and Kaufman [1981], Martin [1981]
Patkány ES sejtek	+	+	+	+	Buehr et al. [2008], Li et al. [2008]
Madár ES sejtek	+	+	+	+	Pain et al. [1996]
Kutya ES sejtek	+	+			Vaags et al. [2009]
Majom ES sejtek	+	+	+		Cibelli et al. [2002], Thomson et al. [1995, 1996]
Humán ES sejtek	+	+			Thomson et al. [1998]
Nyúl ES, iPS sejtek	+	+	+		Honda [2008], Wang [2007], Intawicha [2008], Catunda [2008], Honda [2011], Zakhartchenko [2011], Tancos [2012]
Egér EG sejtek	+	+	+	+	Matsui et al. [1992] and Resnick et al. [1992]
Humán EG sejtek	+	+			Shamblott et al. [1998]
csirke EG sejtek	+	+	+	+	Park and Han [2000]
sertés EG sejtek	+	+	+	+	Shim et al. [1997]
Egér EpiS sejtek	+	+	-	-	Brons et al. [2007], Tesar et al. [2007]
Patkány EpiS sejtek	+	+	-	-	Brons et al. [2007]
Egér iPS sejtek	+	+	+	+	Takahashi and Yamanaka [2006]
Humán iPS sejtek	+	+			Takahashi et al. [2007a], Yu et al. [2007b]
Patkány iPS sejtek	+	+	+	+	Li et al. [2009]

3. ábra: Pluripotens sejt vonalak összehasonlítása: Kiméra alkotó képesség alapján összes hivatkozás beszúrása

ÖSSEJT VONALAK	AP	SSEA-1	SSEA-3	SSEA-4	LIF KIEGÉSZÍ- TÉS	BFGF (FGF2) KIEGÉSZÍ- TÉS	EGYÉB KIEGÉSZÍTÉSEK
Egér EC sejtek	+	+	-	-			
Humán EC	+	-	+	+			
Egér ES sejtek	+	+	-	-	+	-	
Patkány ES sejtek	+	+	-	-	+	-	
Madár ES sejtek	+	+			+	+	SCF
Kutya ES sejtek	+	alacsony	+	+			
Majom ES sejtek	+	-	+	+	-	+	activin
Humán ES sejtek	+	-	+	+	-	+	IGF2, activin
Nyúl ES, iPS sejtek,	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-	
Egér EG sejtek	+	+			+	+	SCF
Humán EG sejtek	+	-	+	+	+	+	SCF, forskolin
csirke EG sejtek	+	+			+	+	SCF, IL-11, IGF-1
sértés EG sejtek	+				+	+	SCF
Egér EpiS sejtek	+	+			-	+	activin
Patkány EpiS sejtek	+	+			-	+	activin
Egér iPS sejtek	+	+	-	-	+	-	
Humán iPS sejtek	+	-	+	+	-	+	activin
Patkány iPS sejtek	+	+	-	-	+	-	

4. ábra: Pluripotens sejtvonalak összehasonlítása: Pluripotens markerek expressziója alapján.

A pluripotencia fenntartásában résztvevő szignáltranszdukciós útvonalak

A pluripotencia fenntartásában résztvevő legfontosabb szignáltranszdukciós útvonalak a TGF- β (transforming growth factor β), receptor tirozin kináz (receptor tyrosine kinase, RTK), WNT, LIF és JAK-STAT útvonalakat. Egyes sejtfelszíni receptorok a külső jeleket a sejtmagba közvetítik, és ezáltal olyan kulcsfontosságú pluripotencia faktorok transzkripcióját érintik, mint az oktamer kötő Oct4 (OCT-4) vagy Nanog, valamint a sejt önmegújító képességét befolyásoló jelátviteli fehérje és transzkripciós aktivátor STAT3. Legrészletesebben a leukémia gátló faktor- receptor (leukemia inhibitor factor receptor vagy LIFR)-STAT3 útvonal ismert. A LIF egy 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, ami egyrészt felerősítheti és a sejtmagba közvetítheti a szignált, másrészt lehetővé teszi, hogy további szabályozó fehérjék kössenek a LIFR-gp130 komplexhez. A LIFR-gp130 komplex intracelluláris részéhez köthet a Janus tirozin kináz (JAK) és az antifoszfotirozin immunoreaktív kináz (TIK). A kötés hatására a LIF-GP130 komplex foszforilálódik. Ez a foszforilált forma képes az Src-2 homológ domént (SH2) tartalmazó fehérjék megkötésére, mint például a STAT3 transzkripciós faktor. A sejtmagban Stat3, Oct4 és Nanog együttes hatására megindul az embrionális őssejtekre jellemző gének expressziója, ezzel párhuzamosan pedig gátlás alá kerülnek a differenciációra jellemző gének. Oct4 a SRY-high mobility group -2 (HMG-2) domént tartalmazó fehérjékkel (például Sox2) együttműködve kijelöli, hogy a target gének közül melyiknek a transzkripciója kerül aktiválás vagy gátlás alá. Az ábra további rövidítései: GSK3 (glikogén szintáz kináz 3) fehérje; GAB1 és GRB2-kötő fehérje; Id: differenciációs inhibitor (inhibitor of differentiation) fehérje; MEK: mitogén aktivált protein kináz (MAPK) és extracelluláris sejt által szabályzott kináz (extracellular signal regulated kinase vagy ERK) protein kináz; SMAD: a Drosophila eredetű 'similar to mothers against decapentaplegic' fehérje homológja; SHP2: SH2 domént tartalmazó tirozin foszfát 2; WNT: a Drosophilából származó wingless típusú fehérje homológja.

3.3.4.LIF (Leukémia Inhibitor Faktor)

Az ES sejtek differenciálatlan állapotban való megtartásában kulcs citokinként tartjuk számon, alapvetően mind a három szignalizációs útvonalban szerepet játszhat. Alapvetően

dc_512_12

a LIF a DNS kötés és a STAT3 faktor működésében kap központi szerepet, amely a többi útvonalat is befolyásolhatja. Ezek alapján a LIF-et rutinosan adják az ES sejtenyésztő médiumokhoz, valamint differenciáltatáskor pedig eltávolítják.

Az mES sejtekkel szemben a hES sejtek fenntartásához a kutatások alapján az FGF2 és az activinA kapnak jelentős szerepet. Megkülönböztethetünk primer (már finoman, de a differenciálódás felé mutató alak) és naiv alakot (pluripotens jellemzőkkel rendelkező), a LIF-nek köszönhetően ilyen naiv alakokban tarthatjuk a mES sejteket.

LIF felfedezésének érdekes történeti háttéréről annyit megjegyezhetünk, hogy három független kutatás alapján jutottak el ugyanahhoz az anyaghoz. Az első csoport patkány májsejtekből állította elő, és funkciójáról nevezte differenciálódást gátló anyagnak (DIA), a második csoport Krebs sejtekből vonta ki és nevezte elsőnek LIF citokinnek, valamint a harmadik csoport egér leukémia sejtvonalból vonták ki és HILDA néven szerepeltették ezt az anyagot.

3.4. MIRNSEK SZEREPE

3.4.1. Történeti áttekintés, a miRNS útvonal komponensei

1986-ban találunk utalást először arra a mechanizmusra, amely során egy transzgén magas kópiaszáma a transzgén fehérje elvesztését eredményezte (Ecker and Davis, 1986). Az 1990-es évek elején Mello és Fire csoportja *C. elegans*-ban megállapította, hogy a transzgén inaktivációja a transzgén szekvenciájával megegyező dsRNS jelenlétében történik, és a mechanizmust RNS interferenciának (RNSi) nevezték el (Fire et al., 1998). Ennek az új génexpressziót szabályozó mechanizmusnak a leírásáért Mello és Fire 2006-ban Nobel díjat kapott. Az RNAi felfedezése óta az egyik legizgalmasabb kérdés, hogy milyen molekuláris komplexek vesznek részt ebben a szabályozó mechanizmusban, és hogyan működnek ezek. Különösen nagy hangsúlyt fektettek az RNS indukált csendesítés végrehajtó komplexének (RNA induced silencing complex, RISC) megismerésére.

Az állati miRNS gének endogén módon kódoltak, az mRNS-ek intronjaiban vagy intergenikusan találhatók meg a genomban. Az elsődleges transzkriptumot (pri-miRNS) az RNS polimeráz II írja át, és egy vagy több miRNS-t tartalmaz. Ezt a hosszú transzkriptumot a mikroprocesszor komplex hasítja el. A mikroprocesszor komplex tagjai közé tartozik a Drosha, ami egy RNáz III típusú endonukleáz, és ennek partnere, a DGCR8/Pasha fehérje,

ami egy duplaszálú RNS kötő protein. A mikroprocesszor komplex a kettős szálú RNS struktúrákat ismeri fel a pri-miRNS-en, és specifikusan a hajtű kanyar alakú szerkezet alapi részénél hasítja el az RNS-t. Így jön létre a 60-70 nukleotid hosszú miRNS prekursor (pre-miRNS). A pre-miRNS az Exportin-5 útvonalon keresztül kerül a citoszolba, ahol egy további endonukleázos hasítással létre jön a miR/miR* duplex. Ezt a második hasítást a Dicer nevű RNáz III típusú endonukleáz enzim végzi. A miR/miR* duplex beépül a nagy méretű, sok komponensű RISC végrehajtó komplexbe. A RISC alapvető fontosságú elemei a TRBP (TAR binding protein), a Dicer és egy Argonaute típusú fehérje (emberben az Ago2). A RISC komplex egyszálú miRNS komponense felelős a target mRNS-ek felismeréséért, míg a miR* szál nem része az érett komplexnek, hanem hamar degradálódik. A növényi miRNS-ekkel és a siRNS-ekkel szemben, az állati miRNS-ek nagy része nem teljesen komplementer a target felismerő szekvenciával, és ezért nem váltja ki a target mRNS hasítását. Ehelyett transzlációsán gátolja a target mRNS-t, valószínűleg oly módon, hogy a RISC megakadályozza a mRNS CAP régiójának felismerését. Ez a lépés a citoszol P-testecskéiben megy végbe, ahol felhalmozódnak a nem-transzlálódó mRNS-ek, valamint végbemegy a degradációjuk is.

3.4.2. miRNS-ek biogenezeise

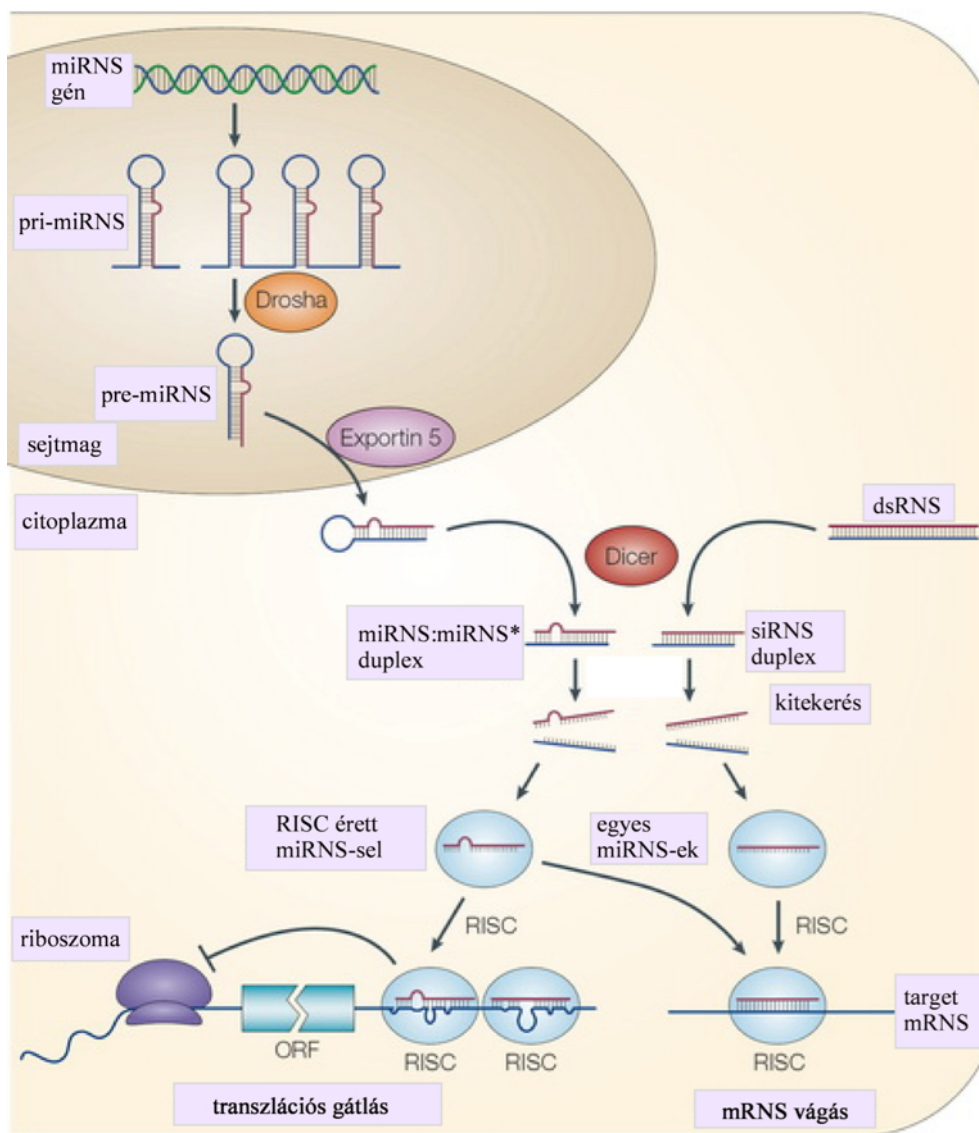
A miRNS gének transzkripcióját követően a Drosha (Denli et al., 2004) sejtmagi RNáz DGCR8 fehérjével komplexben, elvágja az elsődleges transzkriptumokat, vagy pri-miRNS-eket, kb. 70 bp hosszú hajtű alakú pre-miRNS-ekké. A pre-miRNS tartalmú komplex az Exportin5 fehérje segítségével a citoplazmába jut, ahol Dicer vágja, ennek eredményeképpen alakul ki a dupla szálú kb. 22 nukleotid (nt) hosszú miRNS duplex, amelynek egyik szála a RISC komplexbe épül. Az RNAi gépezet a siRNS vagy miRNS és a mRNS közötti Watson-Crick bázispár kölcsönhatással választja ki a cél mRNS molekulákat, ezek a targetek (Winter et al., 2009). Tuschl munkacsoportja leírta, hogy a HeLa sejtekből származó RISC a siRNS duplexnek csak az egyik szálát tartalmazza. UV érzékeny biotinilált siRNS templátot használva precipitálták a RISC komplexeket, és észrevették, hogy csak a 3' biotinilált antiszensz siRNSek tudtak kötni az enzim komplexhez (Martinez et al., 2002). Továbbá definiálták a siRNS ideális hosszát is, ami nem lehet kevesebb, mint 19 nt.

Ezzel párhuzamosan HeLa sejtekben, GFP-t, mint riporter gént használva, Chiu és Rana bemutatták, hogy a siRNS antiszensz szálán, az 5'foszfát hidroxil csoportja feltétlenül

dc_512_12

szükséges az RNAi-hoz, míg a 3' vég fontossága csekély (Chiu and Rana, 2002). Tuschl csoportja beszámolt arról, hogy a siRNS által targetált mRNS-ek endonukleázos vágással bomlanak Martinez.

Nemrégiben számos csoport jelezte, hogy a miRNS-ek szerepet játszhatnak a mRNS-ek degradációjában, ami ellentétben áll a korábbi elképzeléssel, mi szerint a miRNS-ek csak a mRNS-ek transzlációs gátlásában vesznek részt. Lim és mtsai. microarray analízissel bizonyították, hogy egyes miRNS-ek hatására sokféle transzkriptum expressziója csökken valószínűleg oly módon, hogy közvetlenül kötnek a mRNS-ekhez, és degradációval csökkentik a sejtben lévő szintjüket (Lim et al., 2005). Jing és mtsai. munkája alapján miR-16 szükséges az AU szekvenciában gazdag mRNS-ek degradációjához (Jing et al., 2005). Más csoportok let-7 és lin-4-ről mutatták be, hogy képesek a target mRNS-ek degradációjára.



6. ábra: miRNS biogenezis

Az állati miRNS gének endogén módon kódoltak, az mRNS-ek intronjaiban vagy intergenikusan találhatók meg a genomban. Az elsődleges transzkriptumot (pri-miRNS) az RNS polimeráz II írja át, és egy vagy több miRNS-t tartalmaz. Ezt a hosszú transzkriptumot a mikroprocesszor komplex hasítja el. A mikroprocesszor komplex tagjai közé tartozik a Drosha, ami egy RNáz III típusú endonukleáz, és ennek partnere, a DGCR8/Pasha fehérje, ami egy duplaszálú RNS kötő protein. A mikroprocesszor komplex a kettős szálú RNS strukturákat ismeri fel a pri-miRNS-en, és specifikusan a hajtű kanyar alakú szerkezet alapi részénél hasítja el az RNS-t. Így jön létre a 60-70 nukleotid hosszú miRNS prekursor (pre-miRNS). A pre-miRNS az Exportin-5 útvonalon keresztül kerül a citoszolba, ahol egy további endonukleázos hasítással létre jön a miR/miR duplex. Ezt a második hasítást a Dicer nevű RNáz III típusú endonukleáz enzim végzi. A miR/miR* duplex beépül a nagy méretű, sok komponensű RISC végrehajtó komplexbe. A RISC alapvető fontosságú elemei a TRBP (TAR binding protein), a Dicer és egy Argonaute típusú fehérje (emberben az Ago2). A RISC komplex egyszálú miRNS komponense felelős a target mRNS-ek felismeréséért, míg a miR* szál nem része az érett komplexnek, hanem hamar degradálódik. A növényi miRNS-ekkel és a siRNS-ekkel szemben, az állati miRNS-ek nagy része nem teljesen komplementer a target felismerő szekvenciával, és ezért nem váltja ki a target mRNS hasítását. Ehelyett translációsán gátolja a target mRNS-t, valószínűleg oly módon, hogy a RISC megakadályozza a mRNS CAP régiójának felismerését. Ez a lépés a citoszol P-testecskéiben megy végbe, ahol felhalmozódnak a nem-transzlálódó mRNS-ek, valamint végbemegy a degradációjuk is.*

Másrészt a miRNS útvonal így biztosítani tudja egy fehérje egyenletes expresszióját, és kivédi a szignáltranszdukciós útvonalak nem kívánatos, fluktuáló hatását. Tehát, képessé teszi az azonos sejtek csoportját arra, hogy (egy adott mértékű szignáltranszdukciós hatáson belül) a sejtek azonos szinten tartsák a target fehérje expresszióját. Pl. a pluripotens embrionális őssejtek szigorúan szabályozzák a Nodal kifejeződését, mivel a Nodal aktivitás korlátozza a két ellentétes sejtorsót: a pluripotenciát és a differenciációt. Az Oct4 aktiválja a Lefty-t és az őssejt-specifikus miR-290-295 klasztert, ami represszálja a Lefty-t. A Lefty a Nodal antagonistája, ezáltal a Nodal aktivitás folyamatos és egyenletes expressziót mutat (Choi et al., 2007).

A miRNS-eket, mint tumorszupresszorokat, vagy mint tumor induktorokat, egyre többször hozzák kapcsolatba rákos megbetegedésekkel. A Let-7-nek két fontos szerepe ismert: a fejlődési stádiumok időzítése az egyedfejlődés során, emellett számos sejtvonalban tumorszupresszorként működik. Mindez felveti azt a lehetőséget, hogy a *C. elegans*-ból ismert egyéb heterokronikus gének is rendelkeznek tumorszupresszor tulajdonsággal (Cho, 2008). Nem nehéz elképzelni, hogy a proliferáció és differenciálódás időbeli szabályozásának felbomlása az éretlen, multipotens sejtek felszaporodásához vezet. Ezt támasztja alá a tumorössejt hipotézis is, miszerint a tumorsejtek egy kevés sejtet tartalmazó, alacsony differenciálódási szintű sejtpopulációból (tumorössejtek) aszimmetrikus osztódás révén származnak (Rapp et al., 2008). Az össejtek egy hierarchikusan egymásra épülő lépéseket tartalmazó programon keresztül érik el végdifferenciált állapotukat. A sejtek sorsa pedig szorosan összefügg a proliferáció, elköteleződés, differenciálódás és érés időbeli koordinációjával. A tumorsejteket tekinthetjük úgy, mint olyan sejteket, amik nem képesek az egyik fejlődési stádiumból a következőbe lépni, vagy ez a lépés nem zajlik le a megfelelő időben, vagyis a tumorsejtek heterokronikusan hibás sejtek.

3.4.3. A miRNS-ek és az emlős embrionális össejtek kapcsolata

A miRNS útvonal szerepét az embrionális össejtek pluripotens képességének megtartásában, a miRNS biogenezisben deficiens egér sejtvonalon és állatokon tanulmányozták. A Dicer a miRNS-ek és siRNS-ek érésében is részt vesz, míg a DGCR8 nem szükséges a siRNS-ek kialakulásához (Babiarz et al., 2008). A Dicer null egér ES sejtek lassan osztódnak és nem képesek effektíven differenciálódni (Kanellopoulou et al., 2005) (Cao et al., 2009) (Suh et al., 2010). Embriótestecske kialakulásakor az Oct4 expresszió csak részlegesen csökken, és nem figyelhetők meg a mezoderma és endoderma irányú elköteleződés markerei. A DGCR8 null ES sejtek in vitro differenciálódása szintén hibás, differenciáltatáskor nem képesek a pluripotencia markerek visszaszorítására, és az elköteleződésre jellemző gének abnormális aktivációt mutatnak (Wang et al., 2008). A DGCR8 sejtek felhalmozódnak a sejtciklus G1 fázisában, ami arra utal, hogy a miRNS útvonal szükséges a normális sejtosztódáshoz és az össejtekre jellemző sejtciklus mintázat fenntartásához/felállításához (Wang and Blelloch, 2011).

A közelmúltban világossá vált, hogy egyes miRNS-ek a Sox2, az Oct4 és a Nanog által szabályzott génhálózat elemei. Az Oct4, a Sox2 és a Nanog közvetlenül, a promóterhez

kötvé regulálja az őssejt specifikus miRNS-ek expresszióját (Wei et al., 2009). Ezáltal nem csak a miRNS koncentrációt állítják be, hanem felhasználják a miRNS-eket saját targetjeik finom szabályozására is koherens és inkoherens visszacsatolásokon keresztül.

A Blelloch laboratórium munkájából ismert, hogy a DGCR8 null egér ES sejtek sejtciklusa abnormális. A csoport komplementációs teszttel kereste azokat a miRNS-eket, amelyek képesek a sejtciklus helyreállítására. Ezen miRNS-ek közé tartozik a miR-291a-3p, a miR-291b-3p, a miR-294, a miR-295 és a miR-302 (Wang et al., 2008). Az említett miRNS-ek, valamint a humán miR-92b valószínűleg a G1-S tranzíció előremozdításával járulnak hozzá az állandó és gyors osztódáshoz, ami alapvető jellemzője a pluripotens sejteknek. A miR-92b egyik lehetséges targetje a sejtciklus szabályzó p57 (Cdk inhibitor) (Sengupta et al., 2009), míg a miR-290-295 klaszter lehetséges targetjei közé tartozik a ciklin E-Cdk2 inhibitor p21 (Wang et al., 2008), a Rbl2 (Benetti et al., 2008) (Sinkkonen et al., 2008a) és a Lats2 (Voorhoeve et al., 2006). Fontos még megemlíteni, hogy a Sox2 és az Oct4 pluripotencia faktorok képesek asszociálni az egér miR-92b promóterével (Marson et al., 2008), és valószínűleg részt vesznek az egér ES sejt fenotípusának kialakításában. A Sox2, az Oct4 és a Nanog tehát a miRNS-eken keresztül valósítja meg a targetek finom szabályozását. Számos inkoherens és koherens visszacsatolással olyan miRNS-eket szabályoz, amik pl. a Lefty1, a Dnmt3a és a Dnmt3b fehérjeszintjét módosítják. (Sinkkonen et al., 2008b), (Benetti et al., 2008). Két, egymástól független tanulmány mutat rá, hogy a miR-290 család szükséges az ES sejtek de novo metiltranszferáz aktivitásának felépüléséhez. A Dicer null mutáns ES sejtek differenciálódási elégtelenségének egyik oka az, hogy Dicer hiányában az Oct4 promóter metilálása hiányos (Benetti et al., 2008); (Sinkkonen et al., 2008b)

A miR-290-295 család mellett az embrionális őssejtek másik fő miRNS-e a let-7. Bár let-7 érett formában nincs jelen a pluripotens sejtekben, promóteréhez Sox2, Oct4 és Nanog transzkripciós faktorok kötődnek, és pri-miRNS formában a let-7 expressziója nagymértékű (Marson et al., 2008). A Let-7 érését a LIN-28 gátolja. A LIN-28 szükséges az ES sejtek megfelelő sejtosztódásához (Rybak et al., 2009) és az Oct4 effektív transzlációjához. Egy kettős visszacsatolással az érett let-7 gátolja a Lin-28 transzlációját, ezzel a Lin-28 és a let-7 egy kapcsolót képez a pluripotens embrionális őssejtek és a differenciálódás között. A c-Myc is szerepet kap az ES sejtek önfenntartó képességének kialakításában, és a Lin-28 aktiválásán keresztül negatívan szabályozza a let-7 biogenezisét (Chang et al., 2009) Hasonlóan a Lin-28/let-7 szabályozáshoz, az érett let-7 miRNS

közvetlenül gátolja c-Myc expresszióját. A Let-7 nem csak a Lin28, c-Myc, Sall4, Oct4, Nanog és Sox2 pluripotencia faktorokat szabályozza negatívan, hanem a sejtciklus pozitív regulátorait (CDK6, CDC25, CiklinD) is humán tumorokban (Johnson et al., 2003), valamint más miRNS-eket is (miR-107, miR143, miR296) (Heo et al., 2009). Továbbá ismert, hogy a c-Myc kötődik a miR-290-295 klaszter promóteréhez és direkt módon aktiválja a klaszter kifejeződését. A c-Myc a miR-141, a miR-200 és a miR-429 promóteréhez is kötődik, és indukálja expressziójukat.

3.4.4. A genetikailag módosított állatok előállítására alkalmazott módszerek

Genetikailag módosított állatok létrehozásával lehetőség nyílt számos gén működésének megértésére, a humán betegségeket modellező transzgénikus állatok létrehozása pedig megteremtette a lehetőséget a betegségek genetikai hátterének megismerésére, melynek révén új gyógyszereket lehetett kifejleszteni. A téma jelentőségét 2007-ben orvosi Nobel díjjal ismerték el.

Számos tudományterület együttes fejlődésének eredményeképpen születhettek meg az első transzgénikus állatok. Rudolf Jaenisch 1974-ben vírus DNS-t injektált egér embrióba, ami kimutatható volt az élő egerek szerveiben is (Jaenisch and Mintz, 1974). Ez volt az első sikeresen végrehajtott genetikai módosítás állatokban. Gordon és munkatársai 1980-ban GM-egert állítottak elő úgy, hogy egysejtes embrió sejtmagjába mesterséges DNS-t mikroinjektáltak (Gordon et al., 1980). Mára számos DNS beviteli módszert dolgoztak ki a kutatók: ezek köre a mikroinjektálás mellett kiterjed többek között az elektroporációra, vírusok és mesterséges kromoszómák felhasználására is (**5.ábra**).

3.5. GENETIKAILAG MÓDOSÍTOTT ÁLLATOK ELŐÁLLÍTÁSÁRA ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

A DNS vektor beépülése a legtöbb módszer esetében elsősorban véletlen módon történik, ami megzavarhatja vagy elronthatja egy saját gén működését, ha éppen azon a helyen ékelődött a gazda szervezet DNS-ébe. De kerülhet a bevitt DNS egy inaktív kromoszóma régióba is, és így a sejteknek csak egy részében lesz működőképes, azaz a transzgén működését nézve mozaikos lehet a megszületett GM-állat. Speciális DNS vektorok alkalmazásával a homológ rekombináció és a géncsendesítés jelenségét kihasználva, vagy

dc_512_12

a cink-ujj nukleáz enzimek irányítható DNS javítóképességét felhasználva ma már megvalósítható a célzott génbevitel. Ezzel elérhető, hogy csak az általunk kiválasztott gént módosítsuk, vagy egyáltalán ne történjen megváltozás a transzgént hordozó egyedek egyetlen génjében sem.

3.5.1.DNS mikroinjektálása

A DNS mikroinjektálása a legelterjedtebb módszer transzgénikus állatok létrehozására. Az eljárás során a transzgént tartalmazó DNS-t megtermékenyített petesejtbe (zigótába) juttatják úgy, hogy az injektáló folyadékban oldott DNS-t közvetlenül a sejtmagba injektálják. Ehhez speciális eszközök (pl. mikromanipulátor) és jól képzett technikusok szükségesek. A transzgén beépülésének hatékonysága aránylag alacsony, a megszületett állatok mintegy 5-10%-a hordozza a bevitt gént.

Az így létrehozott transzgénikus állatokban tanulmányozni lehet a beépült génről termelődő fehérje hatását az embriók fejlődésére. Modell állatokban pedig betegség gyógyítására alkalmas kezeléseket lehet kidolgozni.

GM-haszonállatok előállítására különböző tulajdonságok megváltoztatása céljából akkor kerül sor, ha a hagyományos tenyésztési eljárásokkal a kívánt eredményt nem vagy csak nagyon hosszú idő alatt lehet elérni. Az eddigi kísérletek a belső elválasztású mirigyek, a tej és gyapjú szerkezeti fehérjéi, az immunrendszer megváltoztatását vagy betegség rezisztencia létrehozását célozták. A mezőgazdasági céllal előállított GM-állatokkal végzett kísérletek számos előre mutató eredményt hoztak. A transzgénikus haszonállatok bioreaktorként való felhasználása a gyakorlatban is alkalmazásra került.

3.5.2.Génkiütött ('knock-out') és génmódosított ('knock-in') állatok

Célzott genetikai módosítást végrehajtva hozták létre az első génkiütött állatokat. A homológ rekombináció lehetővé teszi, hogy a célzott gén egyes elemeit tartalmazó DNS vektor a kívánt génbe épüljön be. Ha a transzgén a célzott gén működéséhez elengedhetetlenül fontos területre (exonba) épül be, akkor az adott génről működésképtelen, vagy módosított fehérje termelődik, és így az adott génre nézve génkiütött, ill. génmódosított állatokat lehet létrehozni. A beépített DNS vektor

dc_512_12

tartalmazhat pozitív szelekciós géneket (pl. antibiotikum rezisztencia gént) vagy riporter gént (pl. zöld fluoreszcens fehérjét).

A homológ rekombináció előfordulási valószínűsége igen alacsony (egy a millióhoz), így egyszerre igen nagyszámú sejtbe kell bejuttatni a DNS vektort ahhoz, hogy esély legyen a transzformált sejtek közt olyat találni, amibe a bevitt DNS a célzott génbe épült be. Ha a DNS vektort embrionális eredetű őssejtekbe (ES sejtek) juttatják be elektroporációval, akkor a célzott génbeépítést tartalmazó sejt kolóniákat kaphatunk.

Az őssejteket korai (hólyagsíra) állapotú embrióba injektálva, vagy nyolc-sejtes embrióval egyesítve, azok beépülnek a gazda embrió sejtjei közé, és úgy fognak viselkedni, mintha mindig is az embrió részei lettek volna. Bekapcsolódnak az embrió természetes fejlődésébe, és részt vesznek a megszülető állat összes szövetének felépítésében. Az így létrejövő állatokat kiméráknak nevezzük, mivel szöveteiknek egy része a gazda embrió sejtjeiből, másik része pedig a transzgénikus embrionális őssejtekből alakul ki. A transzgénikus sejtekből ivarsejtek is létrejöhetnek, azokkal pedig transzgénikus egér törzseket alapíthatunk. Nagy nemzetközi együttműködések keretében több ezer transzgénikus embrionális őssejtvonalat hoztak létre, így mára az ismert egér gének 10%-át sikerült kiütni ezekben a sejtvonalakban.

3.5.3. Feltételesen génkiütött állatok

Az embrionális fejlődésben fontos szerepet játszó gének kiütése az embriók korai pusztulását eredményezheti, így ezeknek a géneknek a szerepe nem lenne tanulmányozható. Szerencsére sikerült olyan kondicionális génkiütési módszert kidolgozni, aminek segítségével elérhető, hogy csak speciális körülmények között, pl. idő- vagy szövetspecifikus módon távolítsuk el a vizsgált gént. Ezt az eredményt a Cre-lox rendszer alkalmazásával lehetett elérni. A Cre egy bakteriális rekombináza enzime, amely két loxP szekvencia között hasítja a DNS-t. A loxP szekvenciák beépíthetők a DNS vektorba, és ebben az esetben csak azokban a szövetekben zajlik le a génkiütés, amelyekben a Cre rekombináza enzim is jelen van. A feltételes és célzott génkiütést úgy tudjuk elérni, hogy a Cre rekombináza enzimet szövetspecifikusan termelő transzgénikus egereket a loxP szekvenciákat hordozó transzgénikus egerekkel párosítva kettős transzgénikus egereket hozunk létre.

3.5.4.Cink-ujj nukleáz alkalmazása génkiütött állatok létrehozására

Az adott gén célzott kiütését egy speciális nukleáz enzim, a cink-ujj fehérje ('zinc finger nuclease', ZFN) alkalmazásával is el lehet érni. Ez az enzim a sejtekben keletkezett elrontott DNS (véletlen mutációk) javításában vesz részt úgy, hogy első lépésben a hiba helyét felismerve, annak közelében elhasítja a DNS láncot. A második lépésben a sejt javító mechanizmusa beépíti a helyes szekvenciát a DNS-be. A mutációs helyhez történő specifikus kötődést is biztosítják a ZFN molekulák, melyek ma már szinte tetszőleges DNS szakaszokhoz tervezhetők, így elérhető, hogy bármilyen DNS kivágását követően létrejöjjön célzott génkiütés. A ZFN alkalmazásával azokban az állatfajokban is előidézhető génkiütés, amelyekben a homológ rekombináció ma még nem alkalmazható (pl. őssejtek hiányában). Távolabbi célként megfogalmazódott, hogy a ZFN alkalmazható lehet genetikai mutációk specifikus javítására is.

3.5.5.Klónozással létrehozott transzgénikus állatok

Testi sejtekből származó sejtmagok átültetését alkalmazva mára lehetségessé vált célzott genetikai módosítást hordozó transzgénikus haszonállatoknak nemcsak az előállítása, hanem klónozása is. Felnőtt állatokból származó sejtenyészetekbe elektroporációval (vagy lipo-szóma közvetítésével) lehet bejuttatni a DNS vektort. A kívánt módosítást hordozó sejteket magjuktól megfosztott petesejtek citoplazmájába injektálva klónozott embriókat, majd ezeket álvemhes nőstényekbe ültetve, klónozott utódokat lehet létrehozni. Az első így létrehozott klónozott transzgénikus juh, Polly, egy a humán gyógyászatban rendkívül fontos véralvadást gátló faktort termelt. A módszer – hatékonyságának további javítását követően – várhatóan számos orvosi és mezőgazdasági alkalmazásra nyújt majd lehetőséget a sejtmag átültetési klónozás.

TECHNIKA	VEKTOR	CÉLZOTT SEJT	VEKTOR HOSSZA	CÉLZOTT MÓDOSÍTÁS	HATÁS FOK	TECHNIKAI NEHÉZSÉG
Mikroinjektálás	DNS	zigóta sejtmagja	50-1000 kb	nem lehet	++	+++
	Vírus	zigóta perivitellinális tere	5-10 kb	nem lehet	+++	++
	Transzpozon	zigóta citoplazmája	50-1000 kb	nem lehet	+++	++
	Cink-ujj nukleáz	zigóta sejtmagja	18 bp célszekvencia	lehetséges	++	+++
	Mesterséges kromoszóma	zigóta sejtmagja	100-2000 kb	nem lehet	+	++++
Elektroporálás, liposzóma	DNS	összejt, testi sejt	100-2000 kb	lehetséges	+++	+
	Vírus		5-10 kb		+++	
	Transzpozon		50-1000 kb		+++	
	Dupla szálú RNS		19-23 bp		++	

5. ábra: A GM-állatok előállítására alkalmazott fontosabb technikák összehasonlítása (Sagi, 2011).

3.5.6.A transzgénikus nyulak alkalmazási lehetőségei alkalmazásának lehetőségei

A rekombináns (biotechnológiai úton előállított) fehérjék termeltetéséről transzgénikus állatok tejében sok ismeret gyűlt össze húsz év alatt. A nyulat amellet, hogy háziállat, kísérleti állatként is használják. Tartása és tenyésztése laboratóriumi körülmények között egyszerű. Felhasználható orvosbiológiai célokra, például diagnosztikai technikák fejlesztése, gyógyszerek vagy kozmetikumok toxicitási vizsgálata és felhasználják olyan protokollok fejlesztéséhez, amelyek emberi betegségek gyógyítására irányulnak. Mivel a nyúl fiziológiája meglehetősen hasonlít az emberéhez - nemcsak a kifejlett állapotban, hanem az embrionális korban is (a placenta és a transzkripció aktivitás kialakulása) - toxicitási tesztekhez is remekül alkalmazható.

A korai magzatfejlődés, a magzati fejlődés hosszú távú egészségügyi hatásai, komplex betegségek (a cukorbetegség, magas vérnyomás, érelmeszesedés, kövérség) jobban tanulmányozhatók nyúlban. A zöld jelzőgént kifejező GM nyulak lehetővé teszik szövetek

dc_512_12

és sejtek in vivo morfológiai vizsgálatát. Hasonló okok miatt a szív elektrofiziológiájához és a szívmegegyobbodáshoz köthető nyúlmodellek különösen hasznosnak bizonyultak a betegségmegelőzésben, illetve gyógyszer hatásvizsgálatokban is (Senthil et al., 2005)

4. CÉLKITÚZÉSEK

1. Szerettem volna kidolgozni olyan kiméra előállító módszert, melynek segítségével hatékonyan lehet létrehozni kiméra egereket és nyulakat. Az így létrehozott kiméra embriók fejlődésének 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 transzkripció 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.

5. ANYAGOK MÓDSZEREK

5.1. EGÉR EMBRIÓK KINYERÉSE, TENYÉSZTÉSE, KIMÉRÁK LÉTREHOZÁSA, VISSZAÜLTETÉSE

5.1.1.Egér embriók kimosása, tenyésztése

A kísérletekben felhasznált egereket a Charles Rivers, illetve a Harlan Laboratórium magyarországi képviselőjétől szereztük be. Az EGFP-t expresszáló transzgénikus B5/EGFP egér törzset Nagy András (Toronto) (Hadjantonakis et al., 1998) biztosította számunkra. A B5/EGFP transzgénikus hímeket CD1 nőtényekkel pároztattuk. Az utódokat több generáción át CD1 egerekkel kereszteztük vissza, így hoztuk létre a CD1/EGFP egér törzset.

A nőtény egerek szuperovulációja 5 NE PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) hormon intraperitoneálisan (hasüregbe) injektálásával kezdődik (Folligon injekció, Intervet). A PMSG beadása után 48 órával 5 NE HCG-vel (Human Chorionic Gonadotropin) (Choragon injekció, Ferring GmbH) beadása következik. A nőtények ezt követően hímekhez kerülnek. A párzás tényét a másnap látható hüvelydugó (plug) jelzi. Az egereket cervikális diszlokációval (nyaktörés) öltük meg. Az embriókat szuper-ovuláltatott vemhes nőtény petevezetőjét átmosva nyertük ki, majd egy üveg kapilláris és kézi pipetta segítségével gyűjtöttük össze a kimosó folyadékból. Ezt követően néhány M2 médium cseppben átmostuk az embriókat, majd ásványi olajjal (Sigma) lefedett KSOM médium cseppbe helyeztük azokat. Ezt követően 37°C-on, 5% CO₂ mellett továbbtenyésztettük az embriókat a megfelelő fejlődési állapot eléréséig.

5.1.2.Tetraploid embriók előállítása

Két-sejtes CD1 embriók blasztomerjeinek fúziójához CF-150B típusú elektrofúziós készülékét (BLS Ltd., Budapest, Hungary) alkalmaztunk, ami 39 hpg (órával a megtermékenyülést követően, hours post gestation), 2 sejtes egér embriók blasztomerjeinek fuzionáltatására optimalizáltak. A két-sejtes embriókat 0,3 M-os, 0,3% BSA-val (marha szérum albumin) kiegészített mannitol oldatba, két platina elektród közé

dc_512_12

(GSS-250) helyeztük, s egy elektromos impulzust adtunk az embrióknak (0,7 V AC mezőben, 2 ismétléssel, 30 V feszültségű, 40 µs nagyságú impulzus). Az embrió két blasztomerje ennek hatására fuzionált és egy-sejtes tetraploid embrió jött létre. A tetraploid embriókat tovább tenyésztettük KSOM médiumban 4 sejtes állapotig (24 órán át), 37°C-on, 5% CO₂ mellett.

5.1.3.Diploid blasztomerek izolálása

A nyolc-sejtes embriókat körülvevő *zona pellucidát* (fénylő hárttyát) savas Tyrode oldattal távolítottuk el (58 hpg). A zóna mentes embriókat Ca/Mg mentes, 1% BSA-val kiegészített PBS oldatba tettük 10 percre és óvatos pipettázással elválasztottuk az egyes blasztomereket egymástól. Minden embrióból egy blasztomert a szex meghatározásra szolgáló PCR reakcióban megvizsgáltunk, és a maradék 7 sejtet tartalmazó embriókat, vagy 7 különálló blasztomert a PCR vizsgálat idejére KSOM médiumba helyeztük (37°C-on, 5% CO₂).

5.1.4.Blasztomerek szexálása egy sejt PCR-t alkalmazva

Zfx és Zfy specifikus primer párokat terveztünk, amelyek eltérő méretű PCR termékeket adtak. A PCR reakció idejét 3 órára minimalizáltuk, így ez alatt a rövid idő alatt az embriók életképessége nem károsodott.

0,2 ml-s PCR csövekbe 2 µl steril vizet tettünk, majd ebbe helyeztük a blasztomereket. A mintákat -20°C-on tartottuk a PCR elvégzéséig. A DNS extrakcióhoz a blasztomereket proteináz K enzimmel emésztettük 56°C-on 45 percig. Az inkubációt követően a proteináz K enzimet 95°C-on 10 percig inaktiváltuk. A végtérfigatot 20 µl-re állítottuk be. A PCR reakció 95°C-on 5 percig, majd 35 cikluson keresztül, 95°C-on 40 mp, 1 perc 61°C és végül 1 perc 72°C-on zajlott. A 4°C-ra hűtés előtt a PCR terméket 72°C-on 10 percig tartottuk. A PCR terméket 2,5%-os agarózon futtattuk meg.

Elnevezés	Faj	Primer szekvencia	Fragment méret
Zfx-L	Egér	5'- AACATCCTGAACACCTTGCC - 3'	104bp
Zfx-R	Egér	5'- TAGCTTGTGGCTCTCCAGGT - 3'	
Zfy-L	Egér	5'- CCATCAGCACTCAAAAAGCA - 3'	299bp
Zfy-R	Egér	5'- GCCTTTGTGTGAACGGAAAT - 3'	

5.1.5. Aggregációs kimérák előállítása szexált diploid blasztomerek és diploid vagy tetraploid gazda-embriók felhasználásával

Az aggregáltatáshoz KSOM médium cseppekre ásványi olajat tettünk. A csepp közepén aggregációs tüvel (DN-10, BLS Ltd., Budapest, Hungary) kis mélyedést készítettünk, majd ebbe egyetlen EGFP-t expresszáló blasztomert és egy megfelelő genotípusú gazda-embriót helyeztünk egymás mellé (63 hpg). A kiméra embriókat 24 órán át tovább tenyésztettük KSOM médiumban, 37°C-on, 5% CO₂ mellett.

5.1.6. Kiméra blasztociszták beültetése

24 órás tenyésztést követően (87 hpg) a blasztocisztákat a 2,5 napos vemhes (dpc) állvemhes nőtények méhébe ültettük. Az újszülött egereket a vemhesség 19. napján, császármetszéssel segítettük világra.

5.2. NYÚL EMBRIÓK KINYERÉSE, TENYÉSZTÉSE, KIMÉRÁK LÉTREHOZÁSA, VISSZAÜLTETÉSE

5.2.1. Nyulak szuperovuláltatása

Megfelelő mennyiségű és minőségű embrió kinyeréséhez a donor állatokat (Besenfelder et al., 1998) módszere szerint szuperovuláltattuk. Fehér Új zélandi nyulakat 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) fülvénában injektálva. A donor nőtény nyulakat a hCG adását követően mesterségesen termékenyítettük bakoktól frissen nyert spermával. A szuperovulációt indukáló hormonok optimális megválasztásával, a fény ciklus paramétereinek pontos beállításával egy nyúlból átlagosan 20-30 embrió kinyerését lehet elérni.

5.2.2. Nyúl embriók kimosása, *in vitro* tenyésztése

dc_512_12

A nyúl embriókat 1-sejtes, 2-sejtes, 4-sejtes, 8-sejtes, illetve 2.5, 3.5, 4.5, 6, 7 napos és 14 napos (dpc) korban nyertük ki a nyulak petevezetőjéből, illetve méhéből. A nyolc-sejtes embriókat a termékenyítés után 44 órával nyertük ki. A petevezető és a méh kezdeti szakaszát a petevezető felől kb. 10 ml 20% FCS-t tartalmazó PBS oldattal mostuk át (Besenfelder et al., 1998). Ahhoz, hogy vizsgálni tudjuk a trofoblasztban, embrióblasztban a sejt specifikus expressziós mintázatot, a blasztocisztát körülvevő zóna pellucidát mechanikusan távolítottuk el, majd izoláltuk az embrióblasztot a trofoblasztól. Az izolált embrióblasztot, illetve trofoblasztot -70°C-on tároltuk az analízisig. Az embriók kultivációjára számos tenyésztő médium ismert, mi ezek közül az RDH médiumot használtuk, ami 1:1:1 keveréke az RPMI, DMEM és Ham's F10 tenyésztő médiumoknak (Jin et al., 2000). Az embriókat ásványi olajjal (Sigma) lefedett RDH médiumban, tenyésztettük 48 órán keresztül, 38,5°C-on, 5% CO₂ mellett míg elérték a hólyagsíra állapotot.

5.2.3. Kiméra embriók előállítása

A kimérák előállításához a transzgénikus donor embriókat, a szuperovuláltatott nőstényeket egy hVIII faktort termelő transzgénikus hímekkel pároztatva hoztuk létre (Hiripi et al., 2003). Egy, a transzgénikus embrióból származó blasztomert injektáltunk 16 sejtes gazda-embrió zóna pellucidája alá (Bodo et al., 2004). A kiméra embriókat *in vitro* tenyésztettük a beültetésig.

5.2.4. Nyúl Embriók beültetése

A kiméra embriókat 12 óra *in vitro* tenyésztést követően ketamin-xylozin anesztéziában lévő recipiens nőstények petevezetőjébe ültettük be laparoszkópos eljárással. Azért, hogy a recipiens állatok a donorokhoz képest egy napos aszinkronban legyenek, a recipiens nőstényeket a beültetés előtt 48 órával GnRH analóg készítménnyel (Receptal) kezeltük (Bodo et al., 2004). Ezt a módszert alkalmaztunk a nyúl ES kimérák előállítása során is. A felhasznált „ES like” kolóniákat tartalmazó sejtenyészeteket is transzgénikus nyúlból (Hiripi et al., 2003) származó embriókból hoztuk létre, így a transzgénikus ES sejtekből származó utódsejtek a kiméra embriókban is kimutathatók.

5.3. EGÉR ES SEJTEK TENYÉSZTÉSE, JELLEMZÉSE, IN VITRO DIFFERENCIÁLTATÁSA**5.3.1.Fibroblaszt sejtek tenyésztése**

Az egér fibroblaszt, tápláló sejtréteg tenyésztése 10 cm átmérőjű műanyag Petri-csészében történik. A fibroblaszt sejteket konfluens állapotig ($1-3 \times 10^7$ sejt / Petri-csésze) tenyésztjük, majd újabb Petri-csészébe osztjuk szét és szaporítjuk fel. A fibroblaszt sejtek átoltásakor (passzálásakor) eltávolítjuk az FM médiumot és a sejteket PBS oldattal mossuk (6 ml / Petri-csésze). A sejtek szétválasztására tripszin-EDTA oldatot használunk (3 ml tripszin-EDTA / Petri-csésze, 10 min, szobahőmérséklet). Ezt követően 3 ml FM médiummal leállítjuk az emésztést. A sejtszuszpenziót centrifugacsőbe helyezzük, majd centrifugáljuk ($1400-1600$ rpm, 7 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). A felülúszó eltávolítása után a sejteket FM médiumban szuszpendáljuk és új 10 cm átmérőjű Petri-csészébe helyezzük az oldatot (4×10^5 sejt / ml). A sejteket $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 5% CO_2 koncentráció mellett növesztjük.

5.3.2.Fibroblaszt sejtek mitomicines kezelése

Az ES sejtek tenyésztésére a fibroblaszt sejtréteget először osztódásban gátolni kell, hogy ne nője túl az ES sejtkolóniákat. Ezért mitomycin C kezelést alkalmazunk. A mitomycin C alacsony koncentrációban alkalmas a sejtek osztódását gátolni, így azok a kezelés hatására elveszítik osztódó képességüket, azonban továbbra is életképesek maradnak. Azonban a mitomycin magas koncentrációban sejtmeleg, ezért sejttípusonként szükséges a kezelések pontos beállítása. A laboratóriumunkban használt sejtek esetén 150 perc; 0,1 mitomycin C (SIGMA) $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; 5% CO_2 koncentrációt használtunk. A kezelést követően a sejteket az előzőleg ismertetett módon átoltjuk (passzáljuk).

A centrifugálást követően a sejtszuszpenziót FM médiumban 4×10^5 sejt / ml koncentrációban felszuszpendáljuk és az ES sejtek tenyésztésére használatos 6 cm átmérőjű Petri-csészékbe osztjuk szét. A 10 cm átmérőjű Petri-csészében lévő, jól fejlődő fibroblaszt sejteket 8 darab 6 cm átmérőjű Petri-csészébe osztjuk szét mitomycines kezelés után. Az így elkészített fibroblaszt sejtréteget másnap már használhatjuk és általában egy hétig megfelelő minőségű.

5.3.3.ES sejt tenyésztés

Az R1 sejtvonalat (129/Sv x 129/Sv-CP) F1 3.5 napos blasztocisztákból kiindulva alapították (Nagy et al., 1993). Az R1 és R1/E sejtvonalatokat Dr. Nagy András (Toronto) biztosította a kísérleteink elvégzéséhez. Az R1/E ES sejtvonala az R1 sejtvonala szubklónja. Az ES sejteket mitomycinnel kezelt egér embrionális fibroblaszt sejteken növesztettük. Sejttenyésztő tápoldatként módosított Dulbecco's Eagle médiumot használtunk (KO-DMEM médium, Gibco), amit a következő komponensekkel egészítettünk ki: glutamax (Gibco, 100x), 50 µg/ml streptomycin (Sigma), 50 U/ml penicillin (Sigma), 50mM β-mercaptoethanol (Sigma), 0,1mM nem-esszenciális aminosavak (Gibco), 1000 U/ml leukémia inhibitor faktor (ESGRO) és 15% magzati borjú savó (FBS, vagy fetal bovine serum) (HyClone). Két nappal a mérések előtt (proliferációs teszt, in vitro differenciáltatás, kolónia esszé, transzfektálás, luciferáz aktivitás mérés, RNS izolálás) az ES sejteket 0,1%-os zselatinnal (Sigma) kezelt petri-csészékre (Greiner) helyeztük. 6cm-es Petri-csészébe 3 ml ES tenyésztő médiumban felfuszpendált (1×10^6 sejt) ES sejtszuspenziót helyeztünk ki. A tenyészetben az EM médiumot minden nap cseréltük. Amikor a sejtek teljesen benőtték a Petri-csésze felületét (2×10^7) a sejteket új fibroblaszt rétegre oltottuk át (passzáltuk). Általában minden második napon szükséges az ES sejttenyészetek átpasszálása.

5.3.4.Aggregációs ES kimérák előállítása

Az ES kimérákat 8-sejtes gazda-embrió és 10-15 ES sejtet tartalmazó ES csomó aggregáltatásával hoztuk létre. Olyan ES tenyészeteket használtunk, amelyeket, a kiméra készítést megelőző napon zselatin rétegre passzáltunk. Az embriókról savas Tyrode oldattal leemésztettük a zóna pellucidát, majd egy zóna nélküli embriót és egy-egy ES csomót ásványi-olajjal lefedett KSOM médiumba helyeztük, szorosan egymás mellé. Másnapra az embriók az ES sejtekkel aggregálódtak és blasztociszta állapotú kiméra embrióvá fejlődtek, melyeket álvemhes nőtény méhébe ültettünk. Kísérleteink során az embrionális fejlődés 19. napján császármetszéssel kaptuk meg a magzatokat, melyeket dajka anya nevelt fel.

5.3.5.Immunfluoreszcens analízis

A sejteket fedőlemezeken tenyésztettük, majd a médium eltávolítását követően PBS-el mostuk, szobahőmérsékleten. A sejteket 4% paraformaldehidben (PFA, Sigma) fixáltuk (10 perc, RT), majd 0,5% BSA (Sigma) tartalmú PBS oldattal mostuk. A blokkolást 1% BSA-val kiegészített PBS oldatban végeztük (40 perc, RT). A mintákat egész éjszakán át inkubáltuk az elsődleges antitesttel 4°C-on, a másodlagos antitesttel egy órán keresztül inkubáltuk a mintákat (1 óra, RT). Az alábbi elsődleges antitesteket használtuk: nesztin (patkány 401, 1:3, Developmental Studies Hybridoma Bank), β III tubulin (G7121, 1:2000, egér IgG, Promega), nanog (963488, 1:10, kecske IgG, R&D Systems), Kdr (AF644, 1:10, kecske IgG, R&D Systems), brachyury (AF2085, 1:10, kecske IgG, R&D Systems), Oct4 (1 mg/100 ml koncentrációban. Másodlagos antitestként Cy3-al konjugált anti-kecske IgG-t és anti-egér IgG-t (Jackson ImmunoResearch, USA) használtunk 1:400 hígításban. A sejtmagokat DAPI tartalmú Vectashield mounting médiummal (Vector Laboratories) festettük, fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (Zeiss, Nikon).

5.3.6.Sejtciklus analízis

A sejteket etanollal fixáltuk, propidium-jodiddal festettük majd FACSCalibur áramlásos citometriai készüléken (Becton Dickinson, San Jose, USA) mértük CellQuest 3.1 (Becton Dickinson) programcsomagot használva. Minden minta esetében 20000 sejtet vettünk figyelembe. A sejtciklus fázisok meghatározásához WinMDi és Cyclhed programcsomagokat használtunk. (<http://beren.ml.uwcm.ac.uk:5080/UWCM/study/medicine/haematology/cytonetuk/software.htm>)

Az apoptotikus sejtek méréséhez a sejteket propidium-jodiddal és FITC–Annexin V-el (BD Biosciences Pharmingen) jelöltük és áramlásos citométerrel mértük. A propidium-jodid negatív és Annexin V pozitív sejtek populációja korai apoptózist mutat.

5.3.7.DNS elektroporálása ES sejtekbe

Az ES sejteket elektroporálás előtt 1-2 nappal passzáltuk, és 2 órával elektroporálás előtt friss tápoldatba helyeztük. 40 μ g DNS-t elektroporáltunk 10^7 sejt/ml koncentrációjú sejtuszpenzióba. 250 V feszültség és 500 μ F áramerősség mellett BioRad GenePulser

dc_512_12

X-Cell készülékkel. A sejteket ezt követően 10 cm átmérőjű csészékbe helyeztük, a tápoldatot a következő napon cseréltük. A Blaszticidin (10µg/ml, Invitrogen) szelekciót 24 óra elteltével kezdtük, a szelekciós tápoldatot naponta cseréltük, míg az antibiotikum rezisztens kolóniák megfelelő méretűre nem nőttek. Az így kapott rezisztens kolóniákat egyenként 24-lyukú csészébe helyeztük. A jó növekedést mutató kolóniák felét lefagyasztottuk, másik felét pedig DNS izolálásra használtuk föl, a teljes miR-290-295 klaszter integrációjának ellenőrzésére. A kísérletekhez három (#1, #2, #3) miR-290-295 túlexpresszázó ES klónt, kettő PBS-el elektroporált ES klónt, és három üres vektorral elektroporált klónt (A, B, C) használtunk.

5.3.8.Kolonia esszé

Az ES sejt kolónia esszéhez 12 lukú petri csészében, 5 napig, 500 sejt lett kitenyésztve és festve alkalikus foszfatáz aktivitáshoz. A kolóniák meg lettek számolva és morfológiailag osztályozva. A kísérletek legalább 3x lettek megismételve. Az eredmények átlaggal és szórással vannak kifejezve.

5.3.9.Alkalikus foszfatáz festés (APS)

A pluripotens ES sejtek alkalikus foszfatáz (AP) aktivitást mutatnak. Ennek következtében a pluripotens sejtek detektálására AP festést (APS) alkalmazhatunk. A pluripotens sejtek magas AP aktivitást mutatnak, melynek hatására a detektálás során használt Fast Red festék vörös színűre festi azokat. Az AP festést megelőzően az ES sejteket zselatinnal kezelt felületen tenyésztjük. Az EM médiumot Pasteur-pipetta és víz-légszivattyú segítségével távolítjuk el. A sejteket a törmeléktől PBS mosással tisztítjuk meg. Ezt követően 4% PFA oldattal fixáljuk a sejteket (3ml / Petri-csésze), majd 15 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk. PBS mosás után TM pufferben (1x Tris-malate) inkubáltuk a sejtjeinket (3ml / Petri-csésze; 10 perc; szobahőmérséklet). Az oldat eltávolítását követően a sejteket APS oldattal festettük (3ml / Petri-csésze; 30 perc; szobahőmérséklet). Az idő elteltével az ES sejteket PBS oldattal mostuk, és 4 °C-on tároltuk.

TM puffer (40x):

dc_512_12

23,72 m/m% Tris-maleate; 12,11 m/m% Tris base; milli Q vízben.

TM puffer (1x):

2,5 v/v% TM puffer (40x); milli Q vízben.

APS oldat:

2,5 v/v% TM puffer (40x); 0,8 v/v% MgCl₂; 0,04 m/m% Naphtyl phosphate; 0,1 m/m % Fast red; milli Q vízben.

5.4. NYÚL ES SEJTEK TENYÉSZTÉSE, JELLEMZÉSE, IN VITRO DIFFERENCIÁLTATÁSA

5.4.1. Nyúl ES sejtenyésztés

Nyúl embrionális eredetű őssejtvonal alapításkor Vassilieva és munkatársai által patkány embriókra leírt protokoll módosított változatát alkalmaztuk (Vassilieva et al., 2000). A 4.5 napos blasztocisztákat borító mucin réteget és zona pellucidát 0,5 % pronázos (Sigma) emésztést alkalmazva távolítottuk el. Az embriókat ezt követően nyúl ES sejtenyésztő médiumba, mitomycin C kezelt egér embrionális fibroblaszt rétegre helyeztük. Az embriók két napon belül letapadtak a tápláló sejtrétegre. A letapadást követően két- három nap múlva üveg kapillárist alkalmazva izoláltuk az ICM csomót. Az ICM csomót accutase-os emésztést alkalmazva disszociáltattuk, majd friss tápláló sejtrétegre helyeztük. A differenciálatlan sejteket egy hét múlva újra izoláltuk a tenyészetből, accutase-os emésztést követően sejt-szuszpenziót készítettünk és friss tápláló sejtrétegre helyeztük az így kapott sejt-szuszpenziót. A kinőtt kolóniákat 5-6 naponként passzáltuk tovább (**14.ábra**)

5.4.2. Nyúl ES kolóniák jellemzése

Az ES sejt kolóniákat 4%-os paraformaldehidben fixáltuk 10 percig. A fixálást követően az ES sejteket 0,5 % BSA-t tartalmazó PBS-ben mostuk. A blokkoláshoz 1% BSA-t tartalmazó PBS-t használtunk, szobahőmérsékleten, 30 percen keresztül. A mintákat 37°C-on, egy órán keresztül inkubáltuk az elsődleges ellenanyaggal, majd 3x PBS mosást követően 45 percen keresztül a másodlagos ellenanyaggal, szintén 37°C-on. A mintákon

utólag HOECHST 33342 (Sigma) festést végeztünk. A mintákat Olympus IX-71 invert mikroszkópot használva elemeztük.

Az immunfestéshez kecske poliklonális anti egér Oct-4 (N-19, Santa Cruz (1:200)), és monoklonális egér SSEA-1 (M480, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City (1:100)), mint elsődleges ellenanyagot használtunk. FITC jelölt anti-egér IgM és FITC jelölt anti kecske IgG (Jackson Immuno Research Company (1:800)) volt a másodlagos ellenanyag. A munka további részében a Human Embryonic Stem Cell Marker Antibody Panel Plus (R and D Systems SC009) kittből származó elsődleges ellenanyagokat használva vizsgáltuk az Oct4, SSEA-1, Nanog, CD9, PODXL, SSEA4 expressziót a nyúl ES sejtkolóniákban. A nyúl ES sejtkolóniákból mRNS-t is izoláltunk, s a LIFR expressziót vizsgáltuk RT PCR-el.

5.4.3.Immunfestés

A kiméra embriókat 4%-os PFA oldatban fixáltuk 15 percig, majd 0.1%-BSA-t tartalmazó PBS-el (PBS/BSA) mostuk 3x10 percig, 0,25% Triton X-100-el permeabilizáltuk, majd 45 percig blokkoltuk blokkoló pufferrel, ami 0,1%BSA-t, 0.01%Twin 20 és 2% szarumot (DS) tartalmazott.

A blokkolást követően az elsődleges ellenanyaggal az inkubálást 1 éjszakán át, 4 °C-on végezzük, majd a másodlagos ellenanyaggal 60 percig, 37 °C-on folytattuk. A fedőlemezeket 10 µl-es VECTA SHIELD (VECTOR LAB.) cseppekbe ágyazzuk. Az immunfestéshez kecske poliklonális Oct4, Nanog, Gata6, Cdx2 (1:10)(Abcam) és egér SSEA-1 (1:3)(Hybridoma Bank) elsődleges ellenanyagot használunk. Cy3-anti-egér IgG, Cy3-anti-kecske IgG és Cy3-anti-egér IgM (1:400) (Jackson Immuno Research Company) másodlagos ellenanyagokat használunk. A mintákat Olympus invert mikroszkópot (MBK, Állatbiotechnológiai Intézet), Zeis Axiovert (Biotalentum Kft., Gödöllő), illetve Zeis LSM konfokális mikroszkópot (Animal Production Research Centre, Nitra, Slovak Republic), használva fotózzuk le.

5.4.4.Nyúl ES sejtek in vitro differenciáltatása

Az általunk tenyésztett nyúl ES sejteket nem tudtuk zselatinos felszínen fenntartani, mivel az ES sejtek a zselatinos felszínre helyezést követően rövid időn belül elpusztulnak, így a

dc_512_12

sejteket GFP-t expresszáló, egér fibroblaszt sejteken növesztettük, hogy az esetlegesen a fibroblaszt sejtekből létrejövő differenciálódott sejteket el tudjuk különíteni a nyúl ES sejtekből létrejött sejtektől. A nyúl ES sejtek in vitro differenciálódási képességét szuszpenziós és függőcseppes differenciálódási rendszerben is vizsgáltuk .

5.4.5.Nyúl kromoszómák analízise

Kromoszóma analízis perifériás vér limfocitákból

A kromoszóma vizsgálatokat limfocita tenyészetekből származó preparátumokon végeztem. A komplett mitózisokat ($2n=44$) analizálva meghatároztam a legkisebb akrocentrikus kromoszómák számát. Kilenc kis akrocentrikus kromoszóma (egy-egy pár 18, 19, 20, 20, 21 és Y) esetében a sejt XY-, nyolc ilyen kromoszóma esetében pedig XX-genotípusú.

5.4.6.FISH technika nyúlban

A FISH technikát négy különböző nyúl BAC klón felhasználásával végeztük, melyek közül kettő a LIF receptor gént tartalmazta (102H02 és 206F02), a másik kettő (304A7 és 779H10) pedig a POU5F1(Oct4) génre lett kiválasztva. Ez a két POU5F1-et hordozó klón, mivel a humán kromoszómák esetében a HSA6p21.3 régióban (a fő-hisztokompabilitási géneket hordozó régióban) helyezkedik el, azt gondoltuk, hogy a 12. nyúl kromoszómán fog elhelyezkedni, míg a humán LIF receptor, a 5p13.1 régióban található, ami az összehasonlító nyúl-humán kromoszóma összehasonlítás alapján a nyúl 11-es kromoszómáján ad várhatóan jelet.

5.5. MOLEKULÁRIS GENETIKAI VIZSGÁLATOK**5.5.1. Felhasznált vektorok, klónozások**

Az mmu-miR-290-295 klasztert Long PCR Kit-tel (Fermentas) amplifikáltuk, ezt követően pEF6/V5-His TOPO TA vektorba klónoztuk (Invitrogen) T-A ligálással. A kapott baktérium telepekből DNS-t izoláltunk, és a kit szekvenáló primerjeivel ellenőriztük az integráció irányát a promóterhez képest. Üres és miR-290-295 klasztert tartalmazó baktérium kolóniákból Plazmid Mini Kit-el (Qiagen) izoláltunk nagy mennyiségben DNS-t, majd a kapott vektoriális DNS-t SpeI restrikciós enzimmel emésztettük.

5.5.2. RNS izolálás és kvantitatív valós idejű RT-PCR (qRT-PCR)

Az RNS izolálás fontos követelménye volt a kis RNS frakció megőrzése, ezért az RNS preparátumokat TriReagent (Sigma) használatával készítettük. A sejtekről eltávolítottuk a tápoldatot, majd a sejteket 1xPBS oldattal mostuk. TriReagent oldatban 10 percig szobahőmérsékleten lizáltuk a sejteket, a lizátumot azonnal felhasználtuk RNS izolálásra, vagy lefagyasztottuk folyékony nitrogénben és -80 °C fokon tartottuk max. 1 hónapig. Az RNS izolálást a gyártó leírása szerint végeztük. A kapott RNS minta koncentrációját Thermo Scientific NanoDrop TM 1000 Spectrophotometer-el mértük, az RNS minőségét TBE-agaróz gélen ellenőriztük. A cDNS szintézishez High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-et (Applied Biosystems) vagy TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit-et használtunk (Applied Biosystems) a kísérlet célja szerint. A cDNS szintézist a gyártó ajánlása alapján végeztük. A miRNS expressziót TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems), TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG vagy TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) használatával kvantifikáltuk. A miRNS expressziós értékeket a snoRNS135 kis nukleoláris RNS expressziójához normalizáltuk a gyártó ajánlása szerint. Az Oct4 (Pou5f1) kifejeződését a GAPDH és a HPRT1 (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems) gének expressziójához normalizáltuk. Az egyedi qRT-PCR génexpressziós vizsgálatokat Corbett RotoGene 3000 gépen végeztük a kapcsolódó RotoGene 6.0 programcsomag használatával (Corbett Research).

dc_512_12

Nyúl esetében a cDNS esetében qRT-PCR-t SYBR® Green PCR Master Mixet használtunk (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA; **Supplementary Table 7**). A qRT-PCR vizsgálatokat nyulak esetében Eppendorf Mastercycler® ep realplex4-es készüléken végeztük. Az expressziós értéket a miR-191-es mikroRNS-hez (nyúl miRNS ek esetében) és GAPDH-hoz (Navarrete Santos et al., 2008) (nyúl mRNS expresszióhoz). Az analízist GenEx qPCR adat analízáló szoftverrel (<http://www.multid.se>).

5.5.3. Az alábbi TaqMan génexpressziós esszéket használtuk:

GAPDH :Applied Biosystems, TaqMan Gene Expression Assay, P/N: Mm99999915_g1

HPRT1: Applied Biosystems, TaqMan Gene Expression Assays, P/N: Mm00446968_m1

mmu-miR-290-3p: Applied Biosystems, Assay ID: 000187, P/N: 4373320,

mmu-miR-295: Applied Biosystems, Assay ID: 000189, P/N: 4373327

mmu-miR-294: Applied Biosystems Assay ID:0011056, P/N:4373326

snoRNA135: Applied Biosystems, Assay ID: 001230, P/N: 4380912

Pou5f1 (Oct4): Applied Biosystems, TaqMan Gene Expression Assay, P/N: Mm00658129_gH

Zfp42 Mm01194090_g1, Kdr1Mm01222419_m1,

Brachyury (T) Mm01318252_m1, Fbxl5Mm00618788_m1

5.5.4. TaqMan Low Density Array (TLDA analízis)

2 µg RNS-t DNáz I enzimmel emésztettünk (RNase-Free DNase, Qiagen) majd a mintákat tovább tisztítottuk RNeasy MinElute (Qiagen) oszlopokon. Ismételten ellenőriztük a minták koncentrációját, majd 500 ng RNS-ből kiindulva cDNS-t készítettünk. Számos, különböző génszettet mérő kártya került forgalomba, ezek közül mi a TaqMan® Mouse Stem Cell Pluripotency Array (Applied Biosystems) kártyát használtuk a transzgenikus és a kontroll sejtvonalak transzkriptumának vizsgálatához. Ez a TLDA kártya 96 különböző összejt-specifikus és differenciálódási marker egyidejű kvantifikálását teszi lehetővé ugyanabból a cDNS mintából kiindulva. A méréseket két párhuzamosan végeztük. Az expressziós értékeket Ctnnb1-Mm00483033_m1, Eef1a1-Mm01966109_u1, Gapdh-Mm99999915_g1 és Raf1-Mm00466513_m1 geometriai átlagához normalizáltuk. Az 7. ábrán szereplő heatmap a MeV4.0 programmal készült.

5.5.5.SOLiD™ szekvenálás és kis RNS analízis

A totál RNS-t 7 és 14 napos nyúl embriókból nyúl PGC-ből, nyúl embrionális fibroblasztból (RaEF), nyúl ESC-ből, és egér embrionális fibroblasztból (MEF) TRI reagenst alkalmazva izoláltuk. A könyvtárakat gyöngy emulziós PCR-t végezve készítették, majd SOLiD™ 3 szisztem szekvenátort alkalmazva (Applied Biosystems) a Bay Zoltán Alapítvány, Szeged, Magyarország. SOLiD adatok először SOLiD System Small RNA Analysis Pipeline Tool (RNA2MAP, version 0.5) szoftverrel analizáltuk. A szekvenciák annotációját az ismert humán szarvasmarha, és egér miRNS szekvenciákhoz miRBase (<http://www.mirbase.org/>). Ahhoz, hogy megtudjuk a nyúl specifikus szekvenciákat, összehasonlítottuk a kapott szekvenciákat.

5.5.6.Statisztikai analízis

A kísérleteket (ha külön nem jeleztük) legkevesebb három párhuzamos sorozatban mértük. A grafikonok az eredmények átlagát és a $\pm$ szórás értékeket jelölik. Egér miRNS analízis esetében a két csoport közti statisztikai szignifikancia kimutatására t-tesztet. Nyúl miRNS vizsgálatoknál egy utas Anova analízist alkalmaztunk különböző csoportok átlagának összehasonlítására. Amikor az Anova teszt eredménye esetében a küszöb érték kisebb volt 0,05-nél, ($p < 0,05$) Tukey-Kramer's tesztet végeztünk GenEx szoftver segítségével.

5.5.7.Állatvédelmi szabályok

A munkám során kísérletekbe vont állatok (egér és nyúl) tartását, a rajtuk alkalmazott kísérleti eljárásokat, valamint az állatokból kinyert embriók kezelését a Munkahelyi Állatvédelmi Bizottság „Állatkísérlet végzésre szóló engedély”-ével végeztem (Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő; engedély szám: 767/002/2002, 22.1/1131/003/2008).

6. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

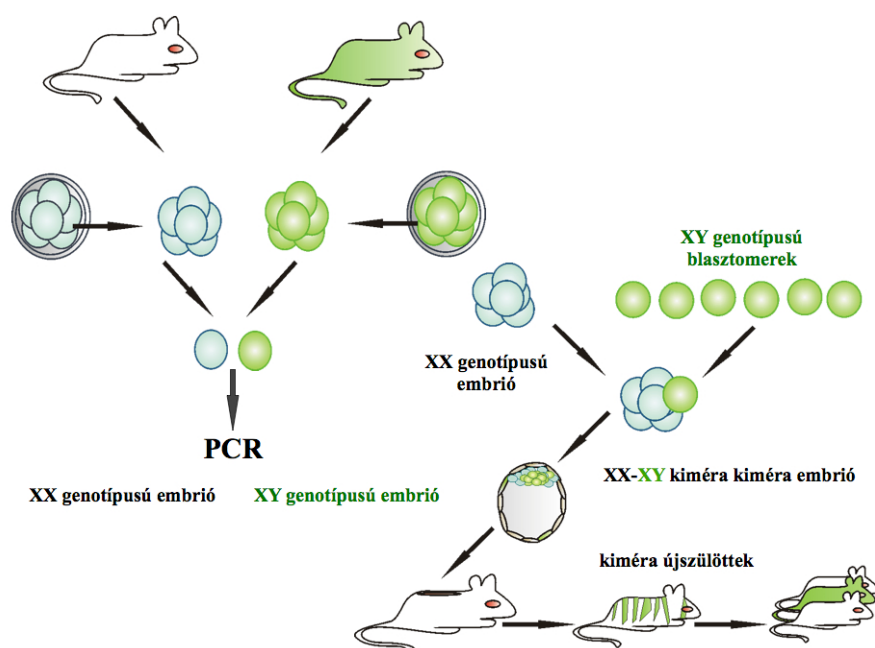
6.1. KIMÉRA EGEREK VIZSGÁLATA

6.1.1. Egér kimérák alkalmazása az ivari elköteleződés folyamatának vizsgálatára

Olyan kimérákat állítottunk elő, amelyekben egyetlen, EGFP-t expresszáló nyolcsejtes embrióból származó blasztomert nyolcsejtes diploid, vagy tetraploid gazdaembrióval aggregáltattunk. Az EGFP-t expresszáló blasztomerből származó sejtek sorsát 2.5-3.5-4.5 napos embriókban nyomon követve, megállapítottuk, hogy mind a diploid, mind pedig a tetraploid gazda embrió ICM-jébe be tudnak épülni ezek a sejtek, azonban nagyobb arányban találhatók meg a tetraploid gazdaembriók ICM-jében, mint diploid gazdaembriók esetében. Szexált embrióból származó EGFP-t expresszáló blasztomérákat aggregáltatva diploid gazdaembriókkal, azt vizsgáltuk, hogy egyetlen XY genotípusú embrióból származó blasztomer képes-e részt venni az állat különböző szöveteinek felépítésében, illetve képes-e átfordítani egy XY genotípusú blasztomer az XX genotípusú gazdaembrióval aggregáltatva létrehozott kiméra állat ivarát (**7.ábra**).

A 84 beültetett embrióból 39 beágyazódott, de elpusztult az embrionális fejlődés során. A megszületett 22 embrió közül 12 lett kiméra, és mutatott EGFP expressziót. Ezek közül 11 hím volt, és csak egy nőtényt kaptunk. Ez a nőtény XX/XY kiméra volt, mivel mind az XX és mind az XY genotípust ki tudtuk mutatni a szöveteiből. Bár ez a nőtény fertilis volt, de a 31 utódja közül egyikben sem örököltette az EGFP transzgént (**8.ábra**). Részletes szöveti analízissel a különböző szövetei 10% körüli EGFP expressziót mutattak. A 11 hím újszülött mind fertilis hímmé fejlődött, melyek utódaikba is örököltették az EGFP-t. Ezek alapján elmondható, hogy egyetlen XY genotípusú blasztomer is képes az XX genotípusú embrió ivarát megváltoztatni (**9.ábra**).

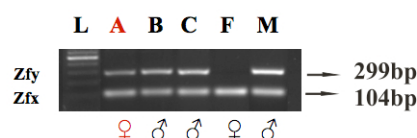
dc_512_12



7. ábra: EGFP-t expresszáló nyolc-sejtes, XY genotípusú embriónak egyetlen sejtjét aggregáltattuk egy EGFP-t nem expresszáló, XX genotípusú embrió hét sejtjével (a nyolc-sejtes embrió egy sejtjét a genotípus megállapításához használtuk fel).

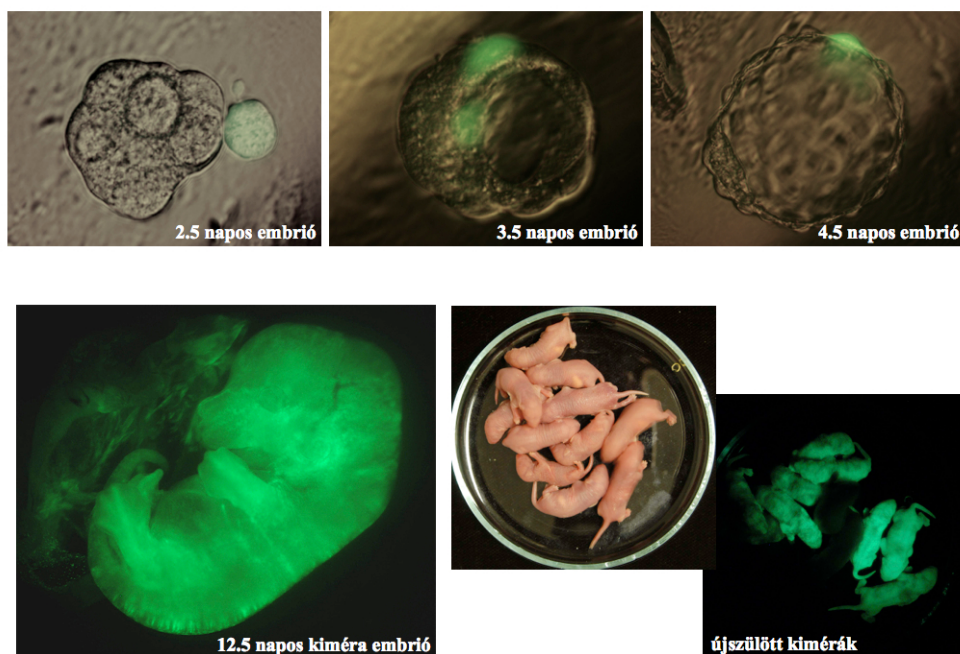
Kimérák típusa	[XY(2n)(1-sejt)]/ [XX(2n)(7-sejt)]
Beültetett embriók száma	84
Felszívódások aránya (Felszívódás / beültetett %)	39 (46,4)
Újszülöttek aránya (Újszülöttek száma / beültetett %)	22 (26,2)
Élő egerek száma (Élő egerek / beültetett embriók %)	14 (16,7)
Kimérák száma	12 (85,7)
Élő kimérák száma	12
Élő hím kimérák száma (Hím / Kiméra %)	11 (91,7)

Kimérák genomális DNS-ének vizsgálata



Kimérák	Nem	EGFP pozitív sejtek aránya a szövetekben (%)	Utódok száma	EGFP pozitív utódok aránya %		EGFP negatív utódok aránya %	
				hím	nőstény	hím	nőstény
A	nőstény	10	31	0,0	0,0	32,3	67,7
B	hím	10	14	28,6	14,3	28,6	28,6
C	hím	30	13	46,2	7,7	15,4	30,8

8. ábra: Az [XY(2n)(1-sejt)]/[XX(2n)(7-sejt)] kimérák közül 84-et ültettünk vissza, ebből 12 kiméra utód született. A megszületett utódok közt csak egy nőstényt találtunk. A normális fenotípusú termékeny nőstény szöveti sejtjeinek 10%-a expresszálta az EGFP-t, a PCR teszt és a FISH alapján XX/XY genotípusú, fertilis szex kiméra volt, de az utódai közt nem találtunk EGFP-t expresszálót.



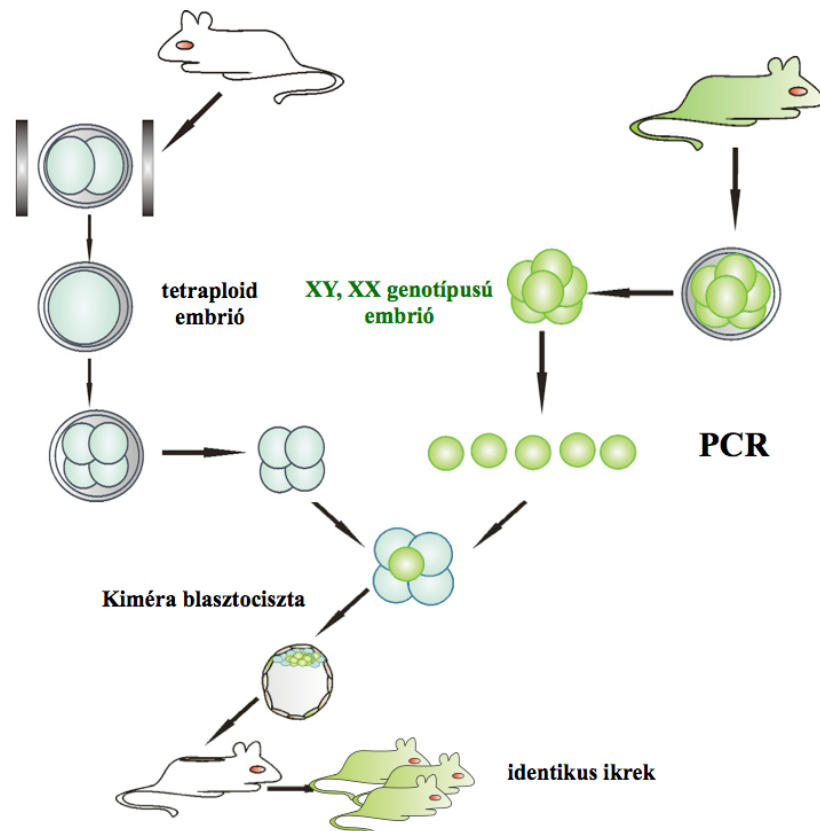
9. ábra: XY genotípusú EGFP-t expresszáló blasztomereket XX genotípusú diploid gazdaembrióval aggregáltatva az XX/XY kimérák embrionális fejlődés során képet nyerhetünk arról, hogy az XY blasztomerből származó utód sejtek milyen esetben képesek a fejlődő magzat ivarát átalakítani, milyen arányban, illetve milyen sejtípusokban kell jelen lennie az XY genotípusú sejteknek, hogy az ivarátfordítás megtörténhessen.

6.1.2. Identikus iker egerek létrehozása

Kísérletünk további részében egy-egy olyan blasztomert aggregáltattunk tetraploid gazdaembriókkal, amelyek ugyanabból az EGFP-t expresszáló, szexált embrióból származtak (**9. ábra**). A 12 beültetett $2n/4n$ aggregátumból, ahol egyetlen EGFP-t expresszáló 8-sejtes embrióból kivett blasztomert kombináltunk egy 4-sejtes tetraploid embrióval $2n$ (1 sejt) / $4n$ (4-sejt), kettő (16,7 %) élő újszülöttet, egy hím (M) és egy nőt (F) kaptunk. A 36 beültetett $2n$, XY (1-sejt)/ $4n$ (4-sejt) aggregátumból, ahol egyetlen XY, EGFP expresszáló blaszto mer lett kombinálva 4-sejtes tetraploid embrióval, öt (13,9 %) élő újszülöttet: két pár ikert (A1, A2 és B1, B2) és egy egyedüli hím (D1) kaptunk. A négy beültetett $2n$, XX (1-sejt)/ $4n$ (4-sejt) kiméra embrióból hármasicer nőstényeket (C1, C2, C3) kaptunk. Öt hím és a hármasicer is megérték a felnőtt kort, és a B1 hím és hármasicer nőstényeket CD1 egyedekkel pároztatva egészséges utódokat kaptunk (**11. ábra**). Ezzel, az úgynevezett tetraploid komplementációs módszerrel lehetségessé vált előre meghatározott nemmel

dc_512_12

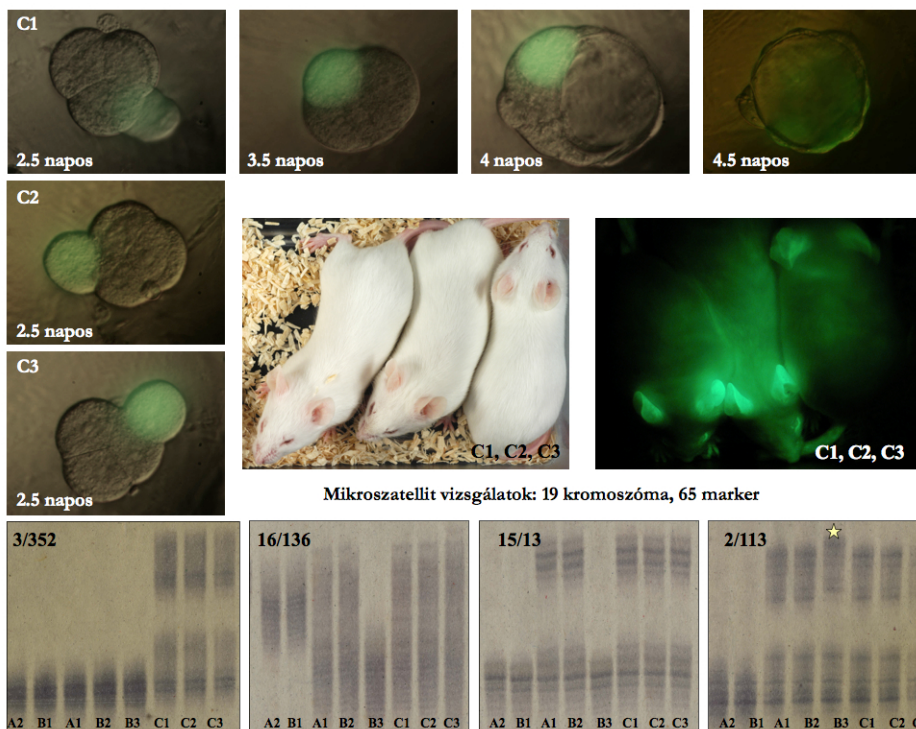
rendelkező, identikus iker egerek előállítására. Az ikrek klonális eredetét mikroszatellit analízissel igazoltuk. Az analízis négy csoportot tudott megkülönböztetni (G1-G2-G3-G4): A1 és A2 hím; B1 és B2 hím; D1 hím; C1, C2, C3 nőstények. A csoportokon belül minden tag uniform volt a mikroszatellit markerekre, de a csoportok eltértek egymástól (**12.ábra**). Tehát a mikroszatellit analízis is igazolta, hogy tetraploid komplementációs módszerrel sikerült identikus, előre meghatározott nemmel rendelkező iker egerek előállítására.



10. ábra: Egy tetraploid embriót ($4n$) aggregáltattunk egyetlen diploid ($2n$) blasztomerrel. Azonos embrióból származó, XX blasztomerek, és egy-egy tetraploid embrió felhasználásával létrehozott 4 kiméra embrióból három nőstény utód, identikus hármas ikrek születtek.

Kimérák típusa	[(2n)(1-sejt)] / [(4n)(4-sejt)]	[XY(2n)(1-sejt)] / [(4n)(4-sejt)]	[XX(2n)(1-sejt)] / [(4n)(4-sejt)]
Beültetett embriók száma	12	36	4
Felszívódások aránya (Felszívódás / beültetett %)	8 (66,7)	11 (30,6)	1 (25)
Újszülöttek aránya (Újszülöttek száma / beültetett %)	2 (16,7)	11 (30,6)	3 (75)
Élő egerek száma (Élő egerek / beültetett embriók %)	2 (16,7)	5 (13,9)	3 (75)
	M, F	A1, A2, B1, B2, B3	C1, C2, C3
Élő hímek száma (Hím / újszülött%)	1(50,0)	5 (100)	0
Élő nőtények száma (Hím / újszülött%)	1(50,0)	0	3 (100)
Utód analízis (Hím utód/utód%)	---	B1: 25 (48,0%)	C1: 18 (66,7)
			C2: 18 (50,0)
			C3: 23 (43,5)

11. ábra: A 12 beültetett 2n/4n aggregátumból, kettő élő újszülöttet, egy hím (M) és egy nőtényt (F) kaptunk. A 36 beültetett 2n, XY (1-sejt)/4n (4-sejt) aggregátumból öt élő újszülöttet: két pár ikret (A1, A2 és B1, B2) és egy egyedüli hím (D1) kaptunk. A négy beültetett 2n, XX (1-sejt)/4n (4-sejt) kiméra embrióból hármasker nőtényeket (C1, C2, C3) kaptunk. A B1 hím és hármasker nőtényeket CD1 egyedekkel pároztatva egészséges utódokat kaptunk.



12. ábra: Az ikrek klonális eredetét mikroszatellit analízis igazolta. Az analízis négy csoportot tudott megkülönböztetni (G1-G2-G3-G4): A1 és A2 hím; B1 és B2 hím; D1 hím; C1, C2, C3 nőstények.

EGFP-t expresszáló sejtek alkalmazásával lehetővé vált a fejlődő embrióban a bejuttatott sejtek vándorlásának követése. Ha az EGFP-t szövetspecifikus promóter segítségével expresszáltatjuk, az adott EGFP-t expresszáló sejtpopuláció megfigyelése a sejtek szöveti elköteleződésének feltérképezésében is hasznos információt nyújt.

XY genotípusú EGFP-t expresszáló blasztomereket XX genotípusú diploid gazdaembrióval aggregáltatva az XX/XY kimérák embrionális fejlődés során képet nyerhetünk arról, hogy az XY blasztomerből származó utód sejtek milyen esetben képesek a fejlődő magzat ivarát átalakítani, milyen arányban, illetve milyen sejttypusokban kell jelen lennie az XY genotípusú sejteknek, hogy az ivarátfordítás megtörténhessen.

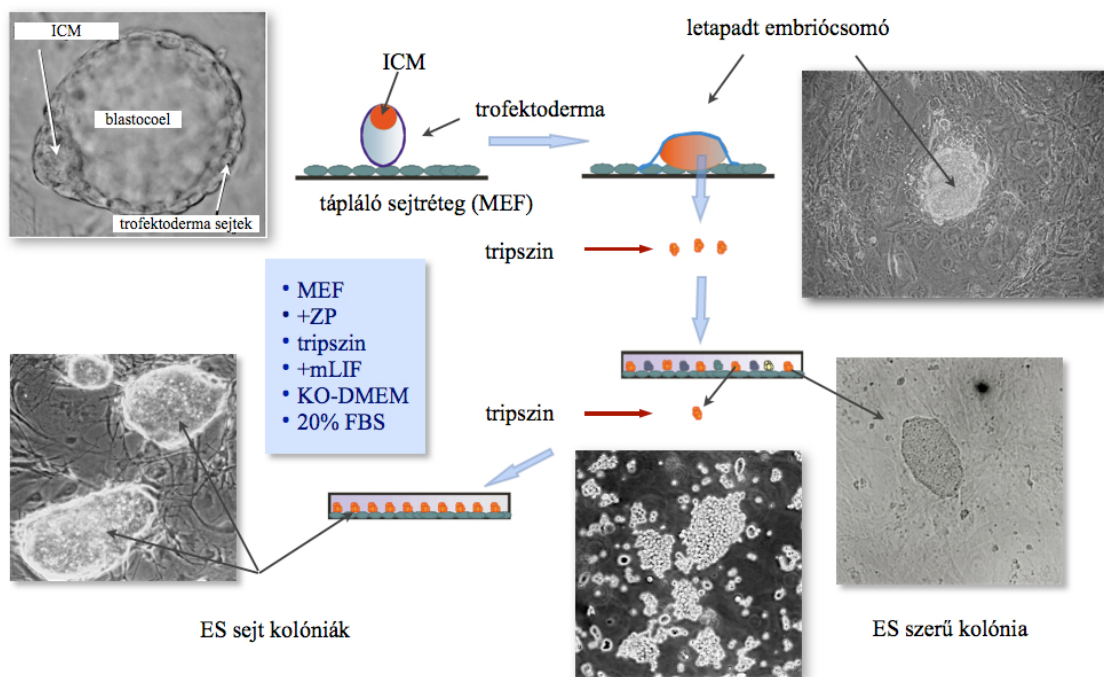
A molekuláris genetikai módszerek fejlődésével egyre több iker vizsgálatból származó eredmény látott napvilágot. Többek közt a szívbetegségek, koleszterol szintet befolyásoló faktorok örökölhetőségének vizsgálatát is ikerpárokon végezték.

Számos állatkísérletben is végeznek hasonló populáció genetikai felméréseken alapuló vizsgálatokat, azonban ezekhez, hogy statisztikailag is értékelhető mennyiségű adatot nyerjenek, nagyon nagy számú állatot kell tesztelni. Iker vizsgálatok esetében azonban ilyen felmérésekben az alkalmazott állatok mennyisége csökkenthető, mivel ebben az esetben homogén genetikai állományú egyedek összehasonlításáról van szó. Az általunk alkalmazott tetraploid komplementációs rendszerrel olyan kettes- és hármas ikrek hozhatók létre, amelyek genetikailag identikusak, így kevesebb állat is elegendő a környezeti hatások feltérképezésére.

6.2. NYÚL ES SEJTVONALAK LÉTREHOZÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ FAKTOROK VIZSGÁLATA

6.2.1. Egér és nyúl ES sejtvonalak alapításának összehasonlítása

Pluripotens (mind három embrionális csíralemez, így az embrionális ektoderma, mezoderma, endoderma sejteinek létrehozására is képes) egér embrionális őssejt vonalakat (mESC) egér embrionális fibroblasztból létrehozott tápláló sejtrétegen (MEF) hólyagsíra állapotú embrió (blasztociszta) embriócsomójából (ICM), magzati borjúsavót (FBS) tartalmazó tenyésztő médiumban először 1981-ben sikerült létrehozni (Evans and Kaufman, 1981) (Martin, 1981) (**13.ábra**) Az első pluripotens humán embrionális őssejtek (huESC) létrehozása 1998-ban valósult meg (Thomson et al., 1998). ES sejtvonalakat gazdasági haszonállatok embrióiból azonban, mind a mai napig nem sikerült létrehozni.

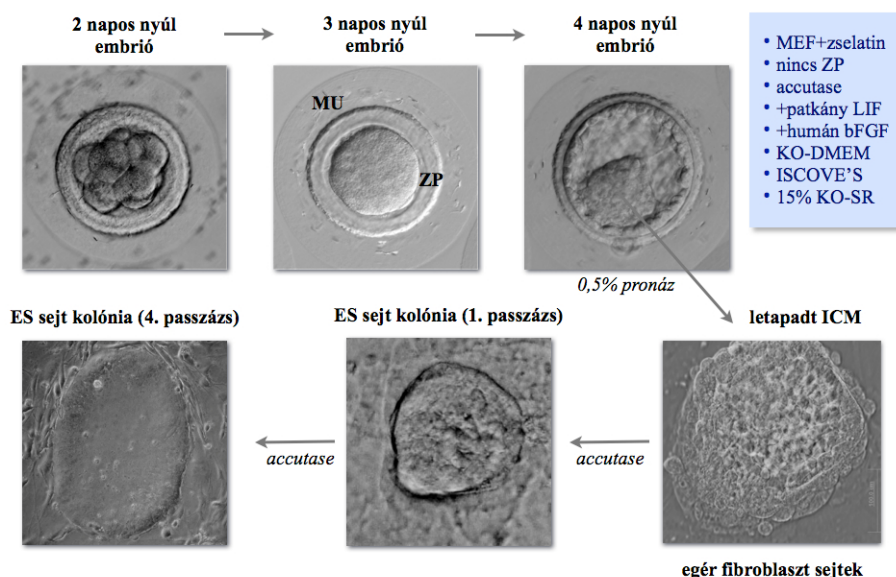


13. ábra: Pluripotens egér embrionális őssejt vonalakat (mESC) egér embrionális fibroblasztból létrehozott tápláló sejtrétegen (MEF) hólyagsíra állapotú embrió (blasztociszta) embriócsomójából (ICM), magzati borjúsavót (FBS) tartalmazó tenyésztő médiumban (KO-DMEM) lehet létrehozni. Az embriót körülvevő zona pellucidát (ZP) nem távolítjuk el, a tenyésztő médiumhoz egér leukémia inhibitor faktort (mLIF) adunk hozzá.

dc_512_12

A 4,5 napos nyúl blasztocisztákat borító mucin réteget és zona pellucidát 0,5 % pronázos emésztést alkalmazva távolítottuk el. Az embriókat ezt követően nyúl ES sejtenyésztő médiumba, mitomycin-C kezelt egér embrionális fibroblaszt rétegre helyeztük. Az embriók két napon belül letapadtak a tápláló sejtrétegre. A letapadást követően három-négy nap múlva üveg kapillárist alkalmazva izoláltuk az embriócsomót (ICM csomót, embrióblaszt). Az ICM csomót accutase oldatban disszociáltattuk, majd friss tápláló sejtrétegre helyeztük. A differenciálatlan sejteket egy hét múlva újra izoláltuk a tenyészetből, sejt-szuszpenziót készítettünk, majd friss tápláló sejtrétegre helyeztük az így kapott sejt-szuszpenziót. A kinőtt kolóniákat 5-6 naponként passzáztuk tovább.

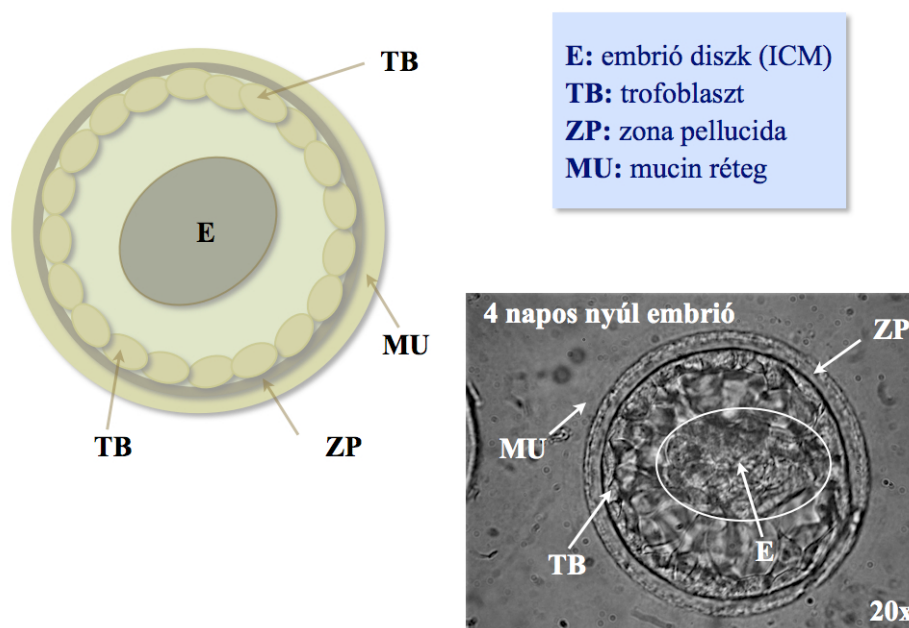
15% SRL-t tartalmazó, bFGF-el és rLIF-el kiegészített KO-DMEM médiumot használtunk a sejtvonalak alapításakor (**14.ábra**).



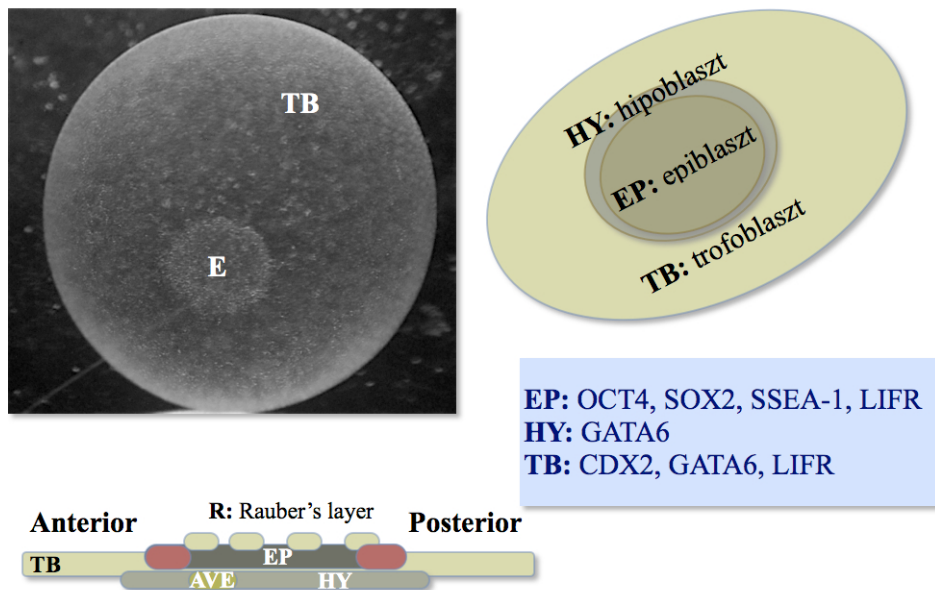
14. ábra: A 4 napos nyúl blasztocisztákat borító mucin réteget (MU) és zona pellucidát (ZP) 0,5 % pronázos emésztést alkalmazva távolítottuk el. Az embriókat ezt követően nyúl ES sejtenyésztő médiumba (KO-DMEM+ISCOVE'S), mitomycin-C kezelt egér embrionális fibroblaszt rétegre helyeztük. Az ICM csomót accutase oldatban néhány sejtet tartalmazó kis aggregátumokká disszociáltattuk, majd friss tápláló sejtrétegre helyeztük. 15% KO-SRL (FBS helyettesítő) oldatot, humán fibroblaszt növekedési faktor 2-t (FGF2, bFGF) tartalmazó, patkány leukémia inhibitor faktorról (rLIF) kiegészített médiumot használtunk a sejtek tenyésztése során.

6.2.2. A nyúl korai embrionális fejlődését befolyásoló transzkripciós faktorok expressziójának vizsgálata

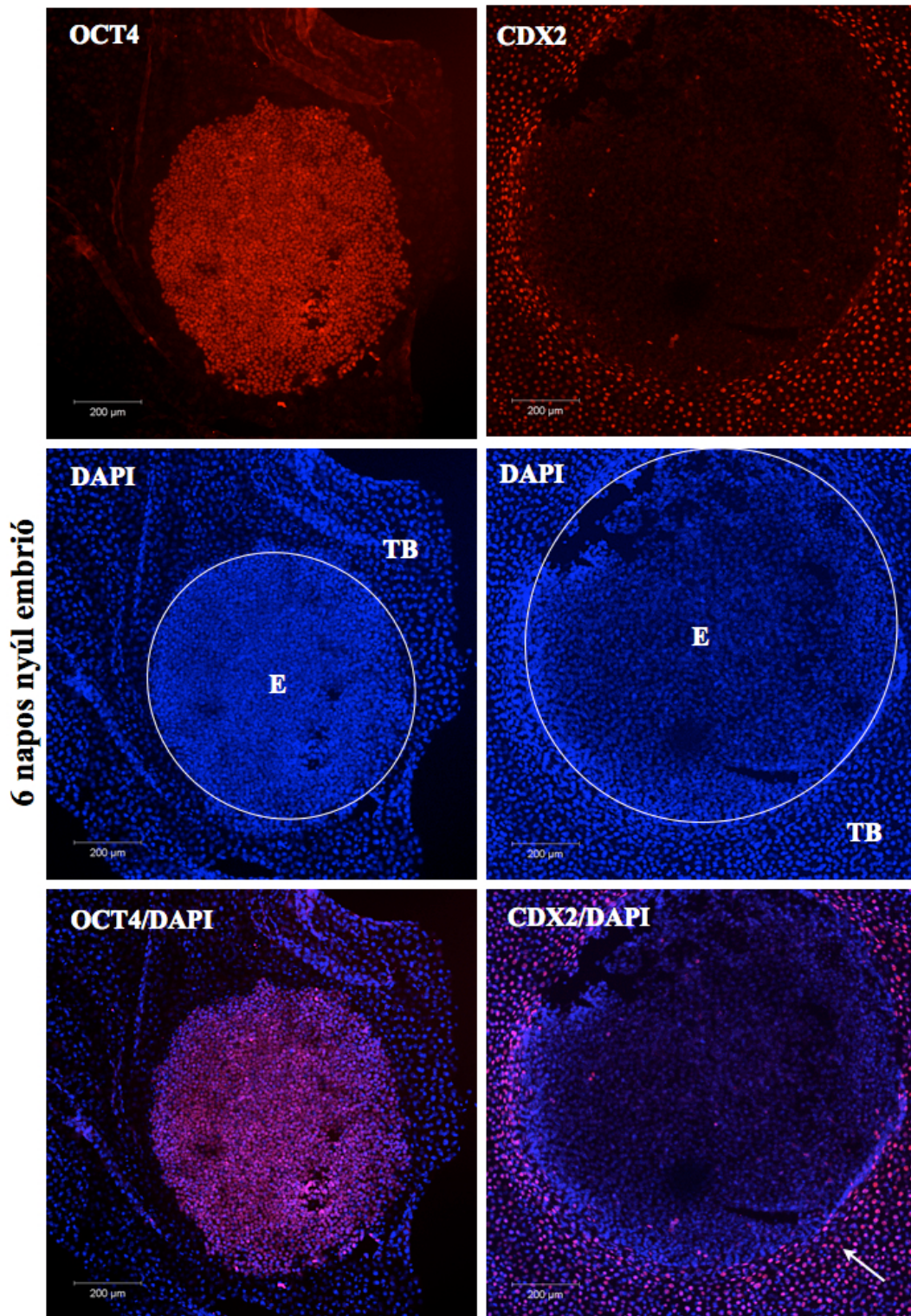
Munkánkat a nyúl pluripotens sejtek differenciálatlan állapotában való fenntartásához szükséges speciális faktorok keresésével folytattuk. 4 napos (**15. ábra**), illetve 6 napos (**16. ábra**) nyúl embriókban, embrionális őssejtekben expresszáló transzkripciós faktorokra, specifikus elsődleges ellenanyagokat kerestünk, amiket nyúl embriók esetében is alkalmazni tudtunk. A 6 napos nyúl embrióban háromféle sejttípus található: a külső sejtréteg, a trofoblaszt sejtek rétege (TB), és az embrió belsejében látható embrióblaszt sejtei (E). Az embrióblaszt két különböző sejtrétegre különül, a hipoblaszt (HY) és epiblaszt (EP) sejtek rétegére. Az epiblaszt OCT4, SOX2, SSEA-1, LIFR pozitív sejteket tartalmaz, a hipoblaszt GATA6 pozitív sejteket, míg a trofoblaszt sejtek közt CDX2-t, GATA6-ot és LIF receptort (LIFR) expresszáló sejtek találhatók.



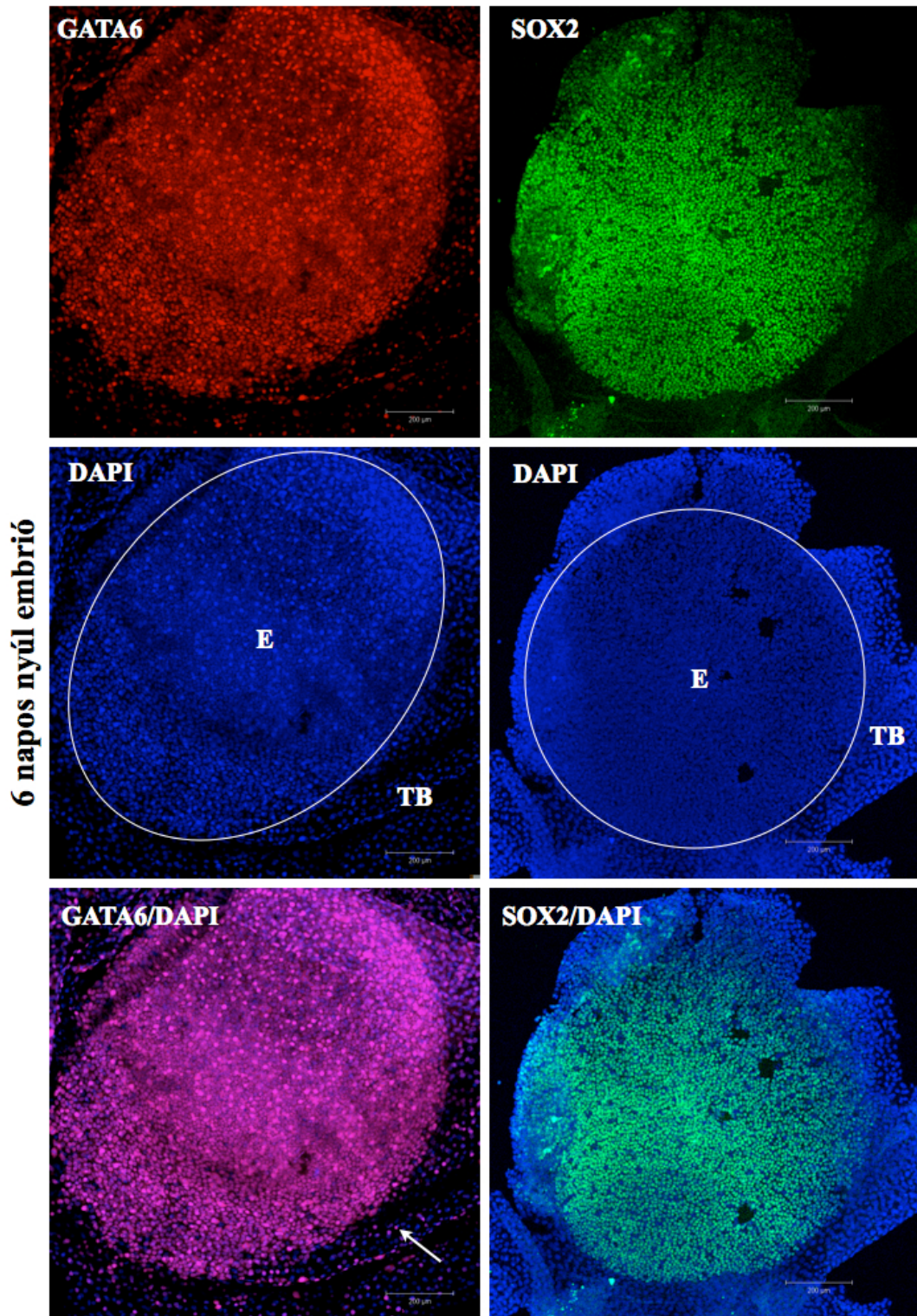
15. ábra: A négy napos nyúl blasztocisztákat mucin réteget (MU) és zona pellucidát (ZP) veszi körül. Az embrióban kétféle sejttípus található: a külső sejtréteg, a trofoblaszt sejtek rétege (TB), és az embrió belsejében látható embriódiszk sejtei (E), ami az egér embriócsomónak (ICM) feleltethető meg.



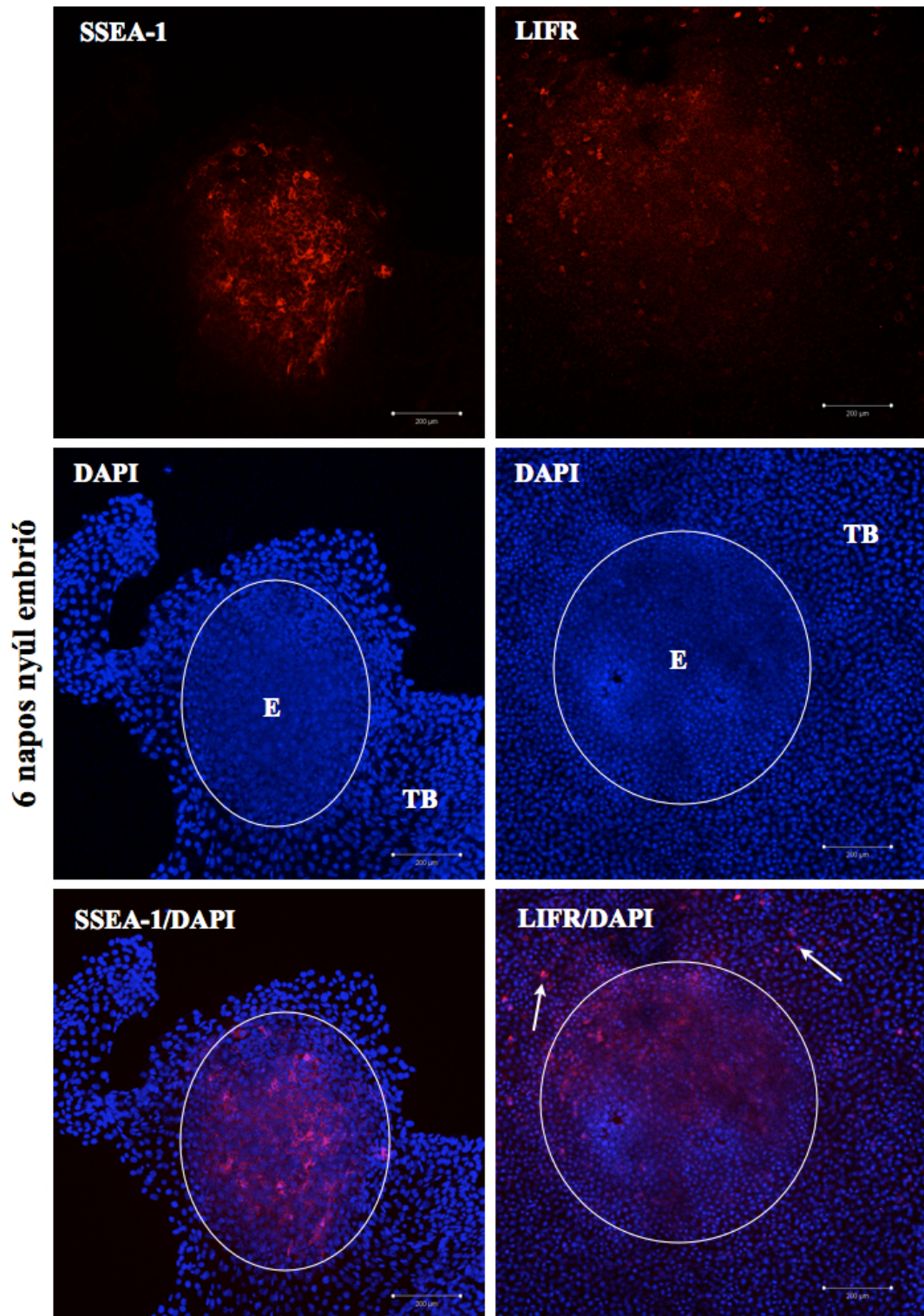
16. ábra: Hat napos nyúl blasztociszta. Az embrióban kétféle sejttípus található: a külső sejtréteg, a trofoblaszt sejtek rétege (TB), és az embrió belsejében látható embriódiszk sejtei (E). Az embrió diszk, más néven az embrióblaszt két különböző sejtrétegre különül, a hipoblaszt (HY) és epiblaszt (EP) sejtek rétegére. Az epiblaszt OCT4, SOX2, SSEA-1, LIFR pozitív sejteket tartalmaz, a hipoblaszt GATA6 pozitív sejteket, míg a trofoblaszt sejtek közt CDX2-t, GATA6-ot és LIF receptort (LIFR) expresszáló sejtek találhatók.



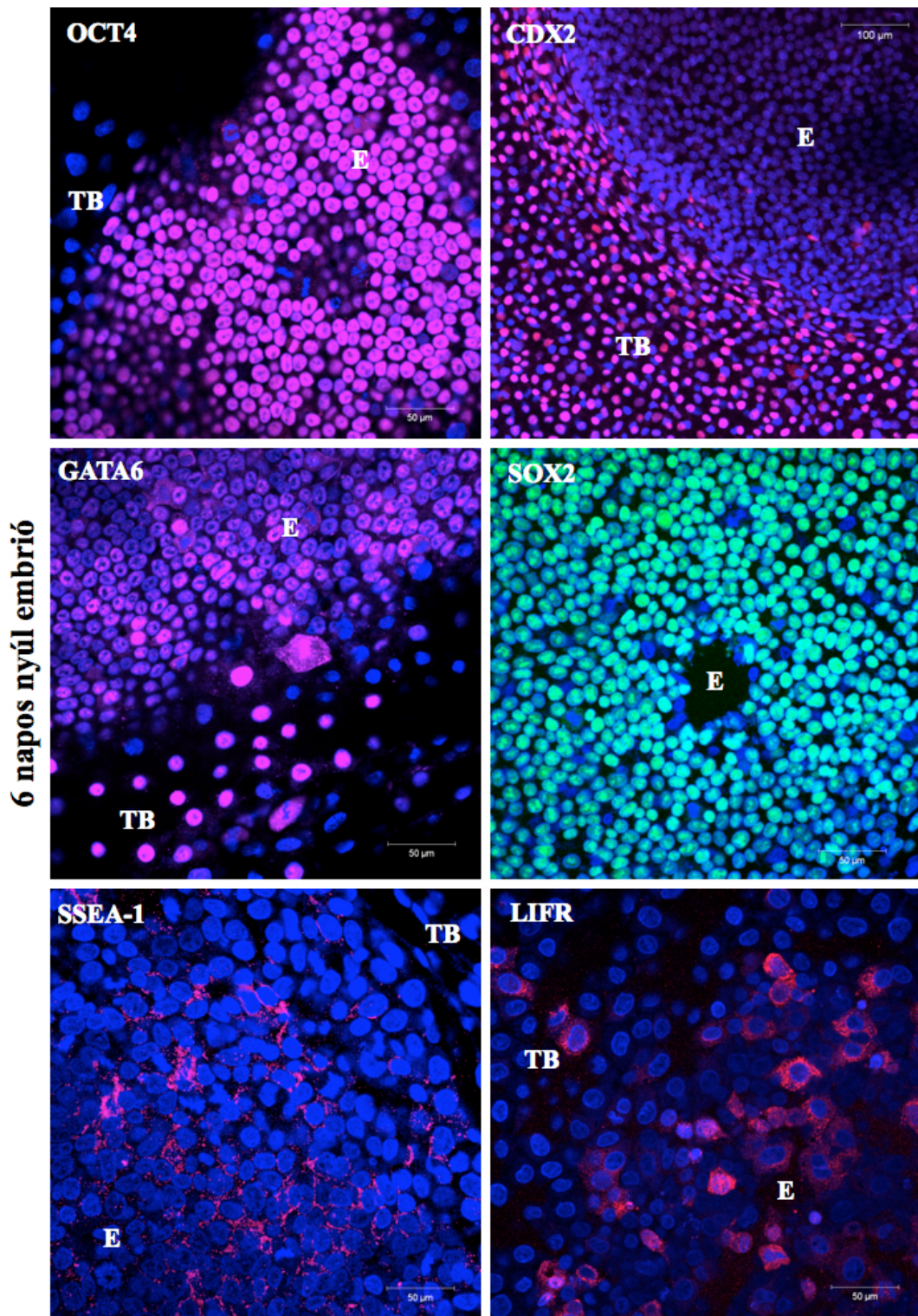
16A. ábra: Hat napos nyúl blasztociszta. Az embrióban kétféle sejtípus található: a külső sejtréteg, a trofoblaszt sejtek rétege (TB), és az embrió belsejében látható embriódiszk sejtei (E). Az epiblaszt OCT4 pozitív sejteket tartalmaz, míg a trofoblaszt sejtek közt CDX2-t, expresszáló sejtek találhatók (nyíllal jelezve).



16B. ábra: Hat napos nyúl blasztociszta. Az embrióban kétféle sejttípus található: a külső sejtréteg, a trofoblaszt sejtek rétege (TB), és az embrió belsejében látható embriódiszk sejtejei (E). Az embrió diszk, más néven az embrióblaszt, két különböző sejtrétegre különül, a hipoblaszt (HY) és epiblaszt (EP) sejtek rétegére. Az epiblaszt SOX2 pozitív sejteket a hipoblaszt GATA6 pozitív sejteket tartalmaz.



16C. ábra: Hat napos nyúl blasztociszta. Az embrióban kétféle sejttípus található: a külső sejtréteg, a trofoblaszt sejtek rétege (TB), és az embrió belsejében látható embriódiszk sejtei (E). Az embrió csomó SSEA-1 és LIFR pozitív sejteket tartalmaz, a trofoblaszt sejtek közt LIFR expresszáló sejtek is találhatók (a nyilak jelzik a LIFR pozitív sejteket a TB sejtek közt).

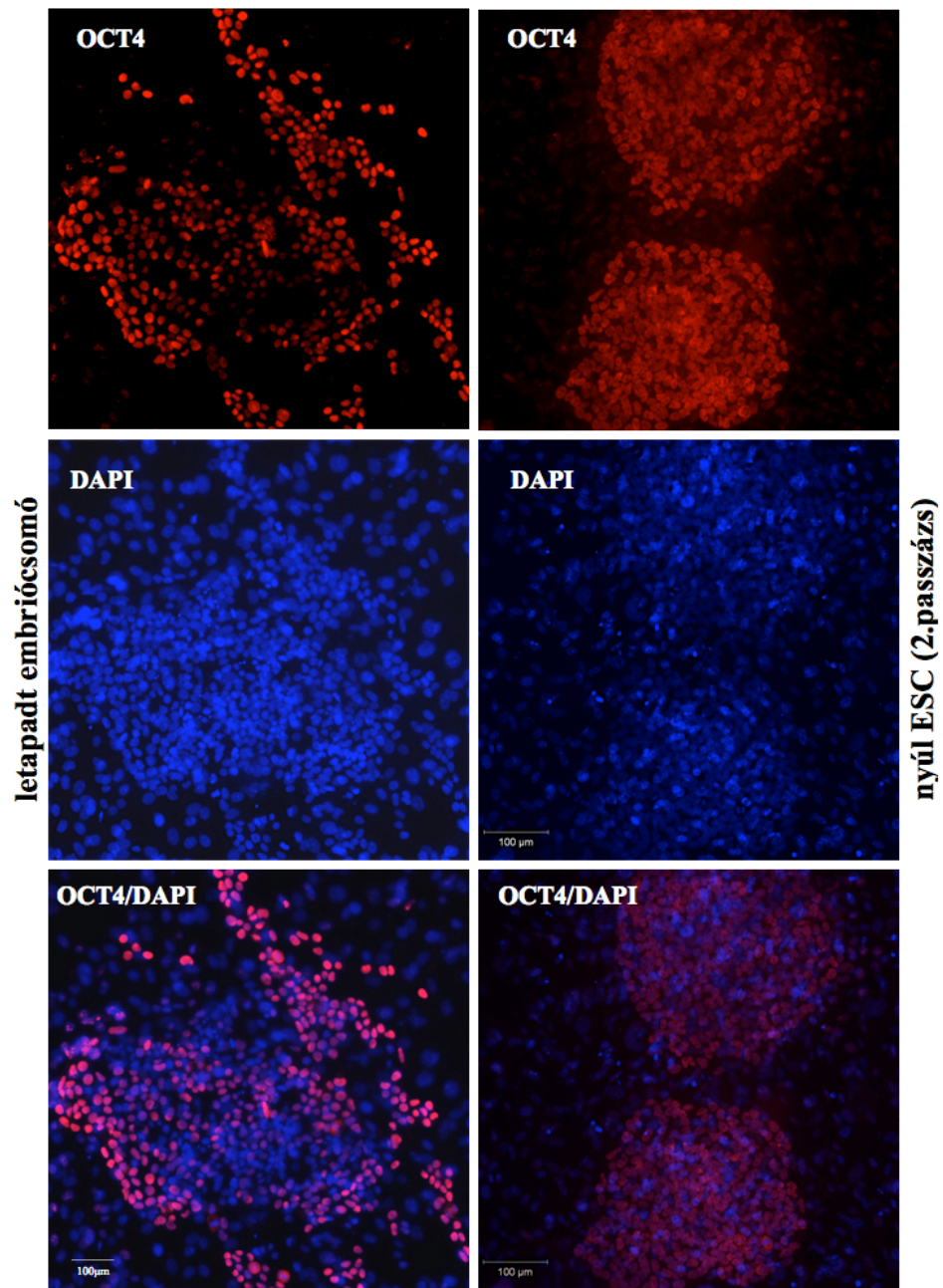


16D. ábra: Hat napos nyúl blasztociszta. Az embrióban kétféle sejttípus található: a külső sejtréteg, a trofoblaszt sejtek rétege (TB), és az embrió belsejében látható embriódiszk sejtei (E). Az embrió diszk, más néven az embrióblaszt két különböző sejtrétegre különül, a hipoblaszt (HY) és epiblaszt (EP) sejtek rétegeire. Az epiblaszt OCT4, SOX2, SSEA-1, LIFR pozitív sejteket tartalmaz, a hipoblaszt GATA6 pozitív sejteket, míg a trofoblaszt sejtek közt CDX2-t, GATA6-ot és LIF receptort (LIFR) expresszáló sejtek találhatók.

6.2.3.LIF hatásának vizsgálata a nyúl ES sejtek alapítása során

Korábbi kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy az általunk létrehozott nyúl ES-”like” sejttenyészeteket csak leukémia inhibitor faktor (LIF) jelenlétében lehetett hosszabb ideig fenntartani. Ha a médiumot nem egészítettük ki LIF-el, a sejtek differenciálódni kezdtek. Az egér embriók az egér LIF-el (mLIF) és 20% FCS-el (magzati borjú savó) kiegészített sejttenyésztő médiumban letapadtak a tápláló sejtréteg felületére, nem differenciálódott sejteket tartalmazó epiblaszt eredetű kolóniákat kaptunk (**13.ábra**).

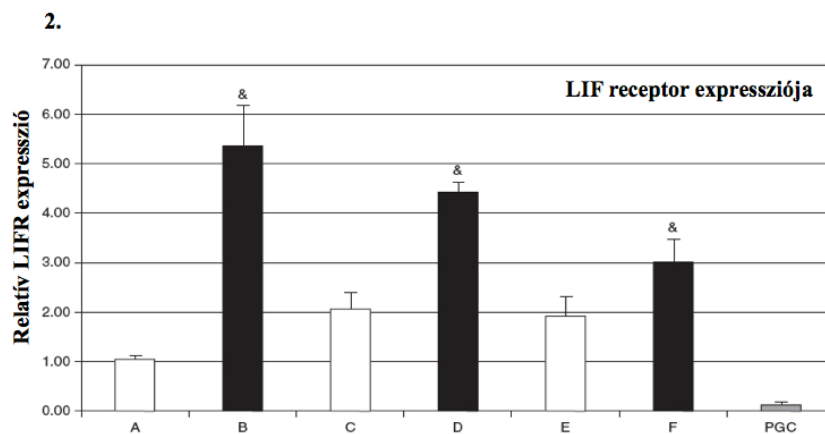
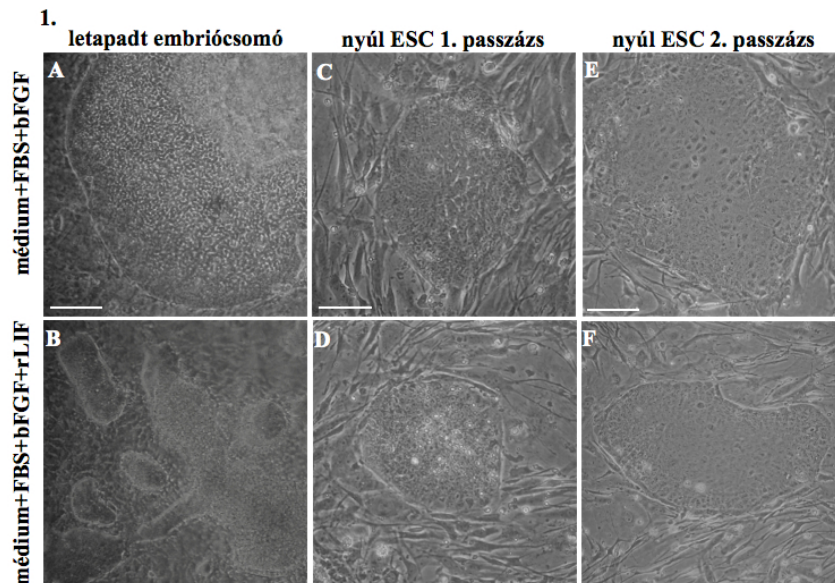
A nyúl epiblaszt sejteket patkány LIF-el (rLIF) és/vagy humán bFGF-el, 15% SRL-el (magzati szérum helyett gyárilag előállított kiegészítő oldat), vagy FCS-el kiegészített alap tenyésztő médiumba helyeztük, egér fibroblaszt rétegre. Nem találtunk lényeges különbséget a letapadt embriócsomók számában az eltérő összetételű médiumok között. Eltérés mutatkozott azonban a korai passzázsokat követően kapott ES-szerű morfológiát mutató kolóniák számában (**18.ábra**). A 3. passzázs után azonban már bFGF kiegészítést is tartalmazó médiumban kaptunk magasabb számban kolóniákat, ezek azonban az epiblaszt sejtekre jellemző morfológiát mutattak. A 6. passzázs után differenciálatlan sejteket tartalmazó kolóniákat, azonban már csak az SRL, bFGF és rLIF kiegészített médiumban találtunk. A KO-DMEM/ISCOV médiumban, amit rat LIF, humán bFGF-el, 15% SRL egészítettünk ki, nyolcadik passzázsig sikeresen fenn tudtuk tartani a nyúl ES sejttenyészeteket. 90% SRL és 10% DMSO oldatban lefagyasztott ES sejtek nagy része újra tenyészetbe volt vihető a felolvasztást követően.



17. ábra: Nyúl ES “like” kolóniák morfológiája az embrionális őssejt alapítás során.

A: Letapadt nyúl embriócsomó egér tápláló sejtrétegen, LIF-et tartalmazó tenyésztő médiumban. Az embrió csomó sejtei közt találhatóak OCT4 transzkripciós faktort expresszáló sejtek.

B: Nyúl ES “like” sejtkolóniák morfológiája LIF hozzáadása mellett a 2. passzálást követően. Az ES kolóniát alkotó sejtek nagy része expresszálja a pluripotens sejtekre jellemző OCT4 transzkripciós faktort.

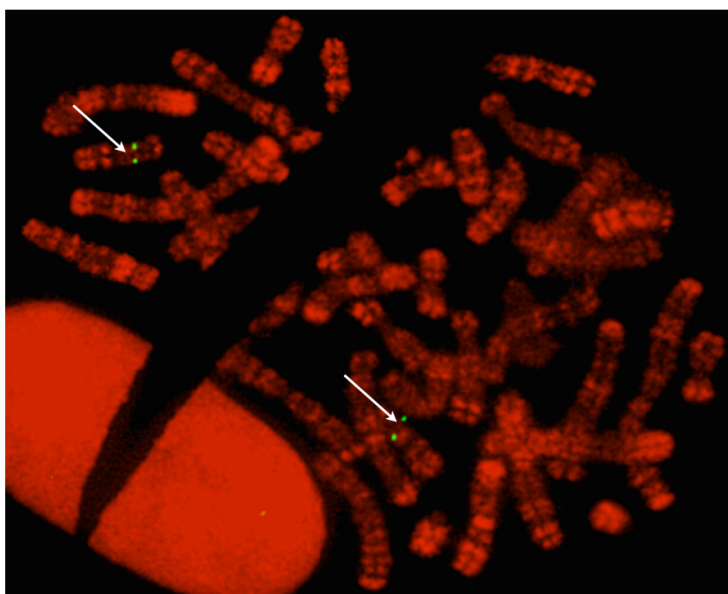


18. ábra: 1.: Nyúl ES “like” kolóniák morfológiája az embrionális őssejt alapítás során. **A, C, D** nyúl ES “like” sejtkolóniák morfológiája LIF hozzáadása nélkül. **B, D, F** nyúl ES kolónia alapítás LIF hozzáadását követően. **A, B:** letapadt ICM; **C, D:** ES “like” sejt kolóniák az 1. passzálás után; **E, F:** ES “like” kolóniák a második passzálás során. (Méret skála: 250um)

2: Relatív LIF receptor expresszió (qRT PCR) az ES kolóniákban LIF illetve LIF nélkül történő tenyésztés során. **A:** letapadt nyúl ICM, LIF nélkül, **B:** letapadt nyúl ICM, +LIF, **C:** 1. passzálás után a nyúl ES sejtek, LIF nélkül, **D:** 1. passzálás után a nyúl ES sejtek +LIF, **E:** 2. passzálás után a nyúl ES sejtek, LIF nélkül, **F:** 2. passzálás után a nyúl ES sejtek +LIF, **PGC:** nyúl 13,5 napos embrióból izolált primordiális őssejtek.

dc_512_12

A leukémia inhibitor faktor (LIF) és receptora (LIFR) olyan citokinek, melyek nélkülözhetetlen szerepet töltenek be a blasztociszta beágyazódása során, és emellett jelenlétük az embrionális őssejt (ES) pluripotens állapotának markere. Három faj – ember, egér és patkány - LIFR mRNS-ének összehasonlításával (CLUTALW) degenerált primereket terveztünk. RNS-t izoláltunk a 13,5 napos nyúl magzat éppen kialakulóban lévő ivarlécéből. A szekvencia specifikus cDNS felsokszorozására RT-PCR-t alkalmaztunk. Az izolált 526 bázispár hosszú fragment 85 százalékos homológiát mutatott az egér, 87 százalékosat az ember és 82 százalékosat a patkány LIFR szekvenciákkal. Az így szerzett információ alapján két nyúl LIFR gént hordozó BAC klónt sikerült izolálni. Ezek felhasználásával pedig, in situ hibridizációs metodikát alkalmazva sikerült igazolnunk, hogy nyúl LIF receptor gén az OCU11p11.1 régióba épült be. Ember esetében a LIFR gén az 5p13.1 régióban helyezkedik el, és ez a régió összehasonlító humán-nyúl térképezési adatok alapján homológnak tekinthető a nyúl 11-es kromoszómájával (Korstanje et al., 1999) (Chantry-Darmon et al., 2003)., ez az eredmény alátámasztja, hogy valóban a nyúl LIFR gén elhelyezkedését sikerült feltérképeznünk, s a LIFR gén expressziójáról kaptunk információt vizsgálataink során.



19. ábra: A FISH analízis négy különböző BAC klón felhasználásával történt. Az eredmények igazolták, hogy a nyúl LIF receptor gén a 11-es nyúl kromoszómán, az OCU11p11.1 régióban található.

6.2.4. Nyúl ES sejtek *in vitro* differenciáltatása

Az *in vitro* differenciáltatással lehet igazolni azt, hogy az „ES like” kolóniákban található sejtek képesek *in vitro* mind három csíralemez sejtjeinek a létrehozására. Ha eltávolítjuk a tenyésztés során alkalmazott, a sejtvonalatok tápláló sejtréteget és a differenciálódást gátló faktorokat, majd megakadályozzuk, hogy az embrionális őssejtek letapadjanak, akkor az embrionális őssejtek kis sejt-csomócskákat, úgynevezett EB-testeket (csomókat) formálnak. A csomóban megindul az embrionális őssejtek differenciálódása, és a legkülönbözőbb, már elkötelezett sejttypusok alakulnak ki. Az ES sejtek pluripotenciája jól jellemezhető azzal, hogy milyen differenciálódott sejttypusok alakulhatnak ki az élő szervezeten kívüli differenciálódás során. Függőcseppes technikát alkalmazva sikerült létrehozunk a nyúl ES sejtekből EB csomókat, amelyek zselatinnal kezelt petri-csésze felületére letapadtak, s belőlük differenciálódó sejtek vándoroltak ki. Szuszpenziós tenyészetből kiindulva, nyúl fibroblaszt kondicionált tenyésztő médiumot alkalmazva, a letapadt nyúl EB csomókban pulzáló szívizom sejteket lehetett megfigyelni.

Az immuncitokémia analízis és LIFR mRNS expressziós vizsgálat azt igazolja, hogy az általunk hosszabb ideig *in vitro* tenyészetben tartott „ES like” sejt kolóniák pluripotens sejteket tartalmaznak. *In vitro* differenciáltatás során igazoltuk, hogy a sejtekből EB csomók képződhetnek, s differenciálódott sejteket, így pulzáló szívizom-sejteket is képesek kialakítani. Ezeket a differenciálódott sejteket a továbbiakban jellemezni szeretnénk immuncitokémiai analízissel, hogy megállapítsuk milyen típusú sejteket képesek létrehozni, képesek-e az „ES like” kolóniákban található sejtek *in vitro* mind három csíralemez sejtjeinek létrehozására. Az *in vitro* vizsgálatokkal előzetes adatokat kaphatunk az *in vivo* kísérletek elvégzése előtt arról, hogy ezek az „ES like” sejtek valóban képesek-e arra, hogy a kiméra embriók minden szövetébe, így az ivarsejtek közé is beépüljenek.

6.3. KIMÉRA NYÚL EMBRIÓK LÉTREHOZÁS MÓDSZERÉNEK OPTIMALIZÁLÁSA

2003-ban a nyúl kimérák előállításához egy vad típusú nőstény és a humán VIII. véralvadási faktorra homozigóta transzgénikus bak pároztatásából nyert nyolcsejtes kompaktálódás előtti morula egyetlen blasztomerjét juttattuk be mikroinjektálással egy vad típusú 16 sejtes morula perivitellináris terébe. Az élve született állatok közül a PCR eredmények alapján négy kiméra volt (ezek kódja: 16, 334, 374 és 375) (**20.ábra**). A fenotípusos és kromoszóma-vizsgálatok szerint kimérák közül kettő XX/XX nősténynek (16, 374) egy XY/XY hímnek (334), illetve egy fiatalon hipogonádiás, de később normális XX/XY hímnek bizonyult (375). Mind a négy állat termékeny és kettő germinális (ivarsejt) kiméra is volt. A kimérák szöveti analízisét elvégezve Real Time PCR-rel, a 334-es hím spermiumainak 1,2 százaléka hordozta a markergént. A 374. nőstény kevés számú utódja közül egy transzgénikusnak bizonyult. Tehát a 374. nőstény is germinális kiméra, petefészek-sejtjeinek 3,4 százaléka tartalmazta a transzgént (**21.ábra**).

Mivel a nyúl-ES sejtek differenciálódni kezdenek zselatinos felszínen, az ES-sejteket a kiméra előállítás előtt GFP-t expresszálló zöld fibroblaszt sejteken növesztettük, így az ES-sejtek a fibroblaszt sejtektől elkülöníthetőek voltak. Az ES-sejteket transzgénikus nyúlból származó embrióból alapítottuk, így az ES-sejtekből származó utódsejtek a kimérákban is kimutathatók. A nyúl ES-kiméra embriók fejlődését először in vitro vizsgáltuk. A kiméra embriók nagy része tovább fejlődött, a 16-sejtes embrióba injektált sejtek nem befolyásolták a kiméra embriók fejlődését. A kísérletek következő részében a kiméra embriók recipiens anyába ültettük. 120 ES kiméra nyúl embrió recipiens anyába való beültetését követően 15 újszülött nyulat kaptunk, köztük kiméra utódokat nem találtunk (**20.ábra**).

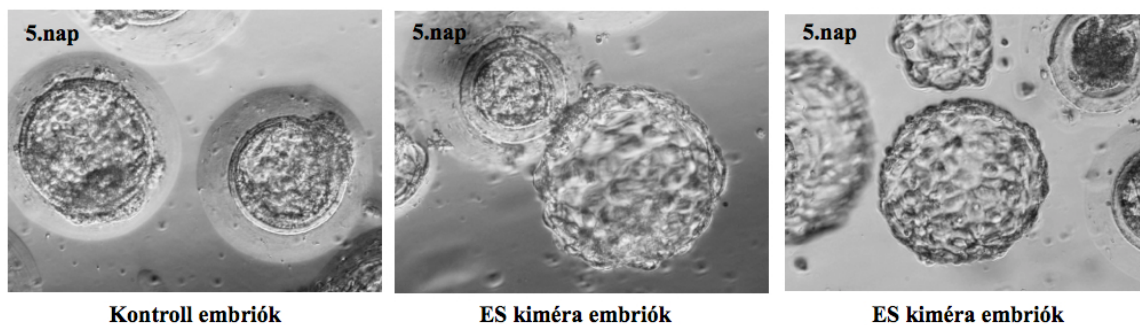
Az elmúlt két évben a laboratóriumunkban a hagyományos DNS mikroinjektációs transzgenezis mellett lenti vírus és transzpozon alapú transzgenezist is elkezdtük alkalmazni. Lentivírus alkalmazásakor, bár igen hatékony a transzgenezis, mozaikos beépülést kapunk, és a transzgént nem örökítette a transzgénikus alapító egyed (**22.ábra**).

A SleepingBeauty (SB) transzpozon-transzpozáz rendszerrel jó hatékonysággal sikerült transzgénikus egér és humán embrionális őssejt vonalakat létrehozni (Orban et al., 2009). Intézetünkben, a hiperaktív SB100X transzpozáz és CAGGS/Venus SB transzpozon alkalmazásával a Venus transzgént örökítő alapító nyulakat sikerült létrehozni. Ezek

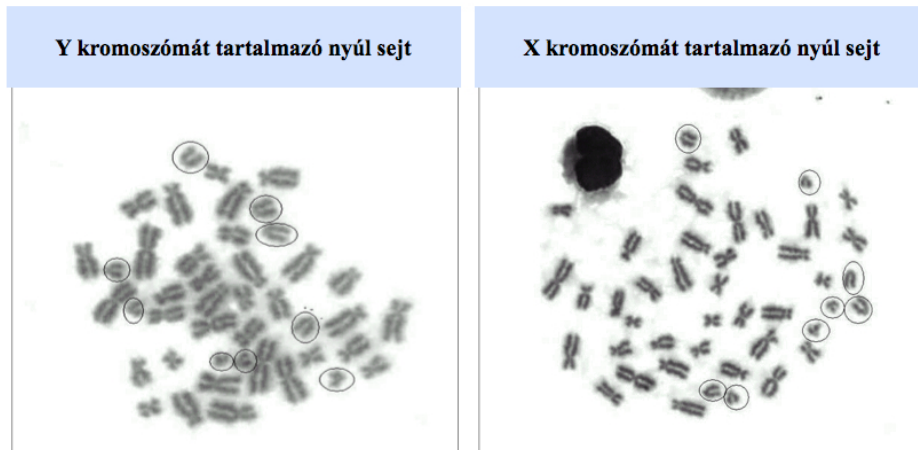
dc_512_12

embrióiban is kimutatható a Venus fehérje expressziója, aminek segítségével a nyúl ESC, sejtek beépülése a nyúl kiméra embriókba nyomon követhetővé válik (**23.ábra**). (Katter et al., 2012)

Embriók típusa	Beültetett embriók száma	Újszülöttek száma	Született/beültetett%	Élő új-szülöttek száma	Élő új-szülött/beültetett %	Kiméra állatok száma
Kontroll embriók	52	22	43,2	18	34,6	-
Blasztomera kiméra embriók	87	30	34,5	28	32,2	4
ES kiméra embriók	120	27	22,5	15	12,5	0

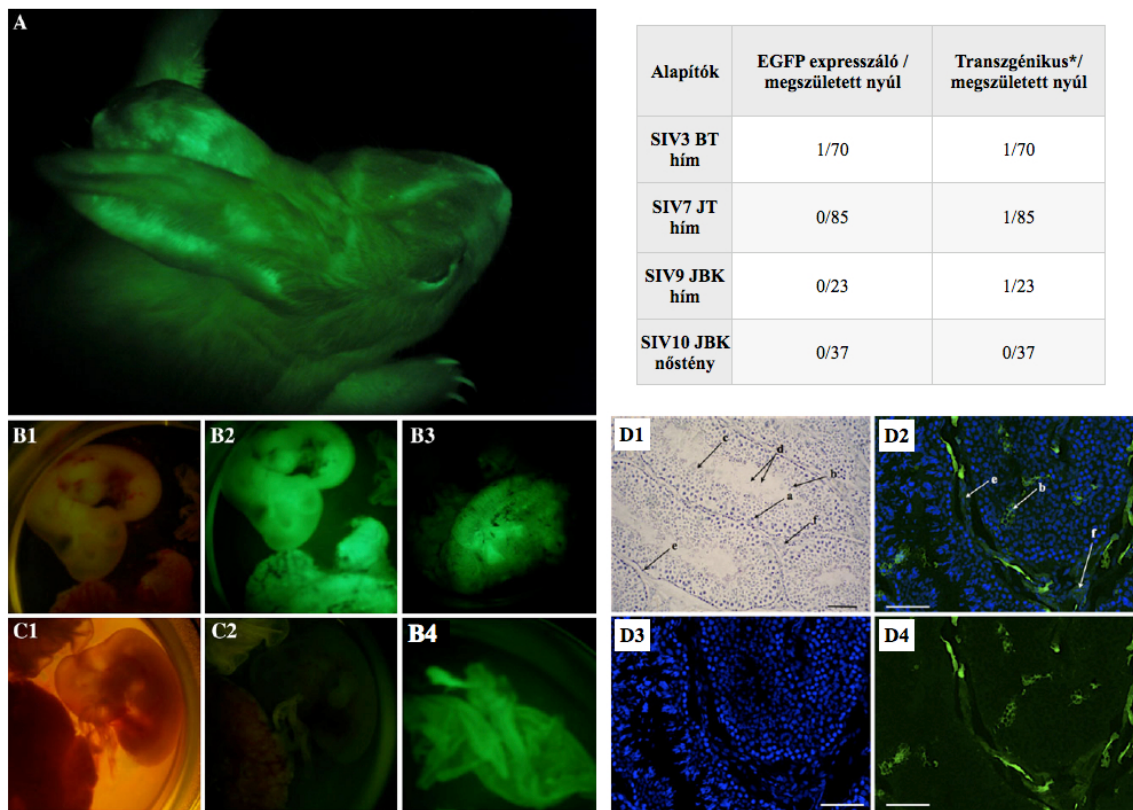


20. ábra: Összesen 87 embrió mikroinjektálása történt meg, ezek 32%-a született élve. Ez hasonló a nem injektált embriók születési arányához (34 %), ami azt jelenti, hogy a mikroinjektálással történő manipuláció adataink szerint nem rontja az embriók születési esélyeit, a kiméra embriók nagy része tovább fejlődött, a 16-sejtes embrióba injektált sejtek nem befolyásolták a kiméra embriók fejlődését. 120 ES kiméra nyúl embrió recipiens anyába való beültetését követően 15 újszülött nyulat kaptunk, köztük kiméra utódokat nem találtunk.



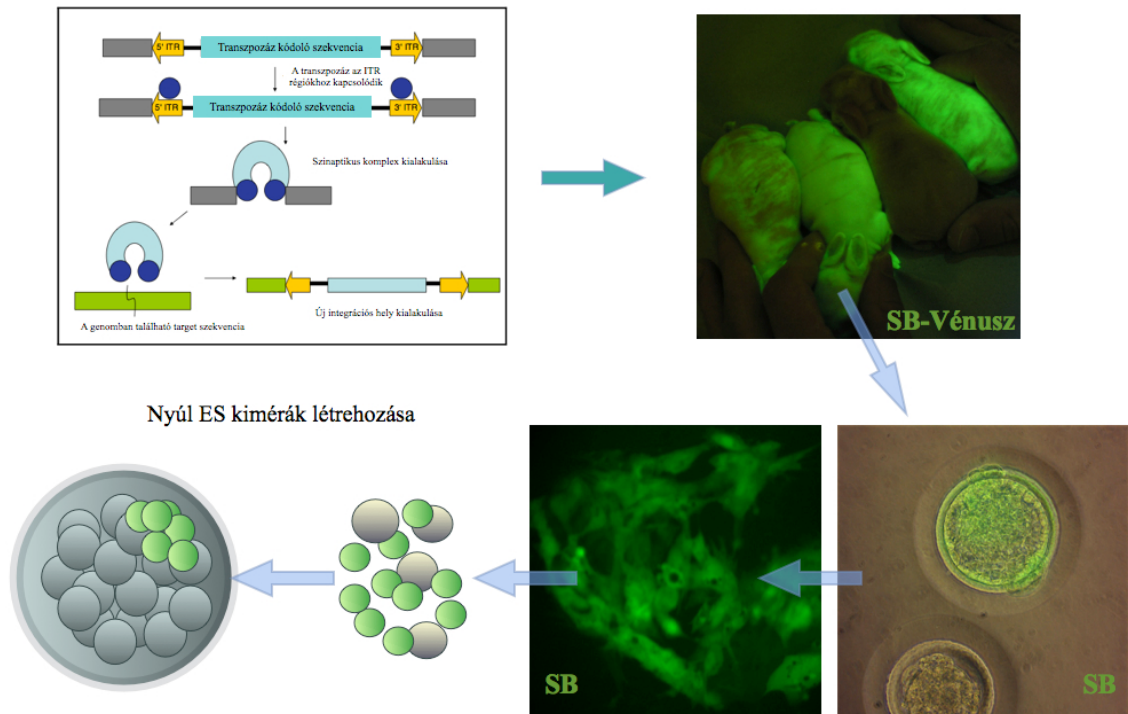
Kiméra jelölése	Anya	Apa	Neme	PCR eredmény			metafázisos kromoszóma alapján Y%	metafázisos kromoszóma alapján X%
				Fül	Vér	Sperma		
#16	16	Tr-VIIIF	nőstény	pozitív	negatív	--	0	100
#334	18	Tr-VIIIF	hím	pozitív	pozitív	pozitív	100	0
#374	23	Tr-VIIIF	nőstény	pozitív	negatív	--	0	100
#375	23	Tr-VIIIF	hipogonádiás	pozitív	pozitív	pozitív	20,5	79,5

21. ábra: Az élve született állatok közül a PCR eredmények alapján négy kiméra volt (kiméra állatok kódja: 16, 334, 374, 375.). A komplett mitózisokat ($2n=44$) analizálva meghatározható a legkisebb akrocentrikus kromoszómák száma. Kilenc kis akrocentrikus kromoszóma (egy-egy pár 18, 19, 20, 20, 21 és Y) esetében a sejt XY-, nyolc ilyen kromoszóma esetében pedig XX genotípusú. A vizsgált kiméra nyulak mindegyike, még a fiatalon hipogonádiás XX/XY bak is fertilis volt.



22. ábra: A.: EGFP expresszió detektálása a SIV BT hím transzgénikus nyúlban. B.: EGFP expresszió detektálása a SIV-EGFP transzgénikus 14 napos nyúl embriókban. B1-B2: SIV-EGFP transzgénikus embriók. B3: SIV-EGFP transzgénikus nyúl embrió placentája. B4: SIV-EGFP transzgénikus nyúl embrió szikzacskója. C1-C2: nem transzgénikus 14 napos nyúl embrió.

D.: Spermatogenezis vizsgálata a SIV BT hím transzgénikus nyúlban. D1: a here seminiferus tubulusok szaggitális metszete. D2: EGFP-t expresszáló spermatidák, Leydig sejtek, és sima izom sejtek (hematoxylin-eosin festés). a: spermatogonium b: spermatida c: spermatida érő fázisban d: sperma e: sima izomsejt f: Leydig sejt D2: EGFP és DAPI megjelenítése D3: DAPI magfestés D4: EGFP expresszió (Méret skála: 50 μ m)



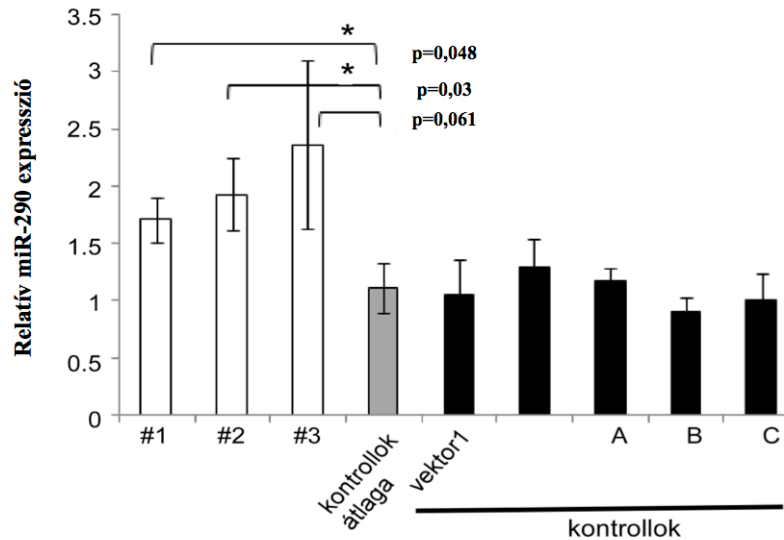
23. ábra: A SleepingBeauty (SB) hiperaktív SB100X transzpozáz és CAGGS/Venus SB transzpozon alkalmazásával a Venus transzgént örökítő alapító nyulakat sikerült létrehozni. Ezek embrióiban is kimutatható a Venus fehérje expressziója, aminek segítségével a nyúl ES sejtek beépülése a nyúl kiméra embriókban nyomon követhetővé válik.

6.4. AZ EGÉR ÉS NYÚL ES SEJTEK PLURIPOTENCIÁJÁT BEFOLYÁSOLÓ MIKRO RNS-EK HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA

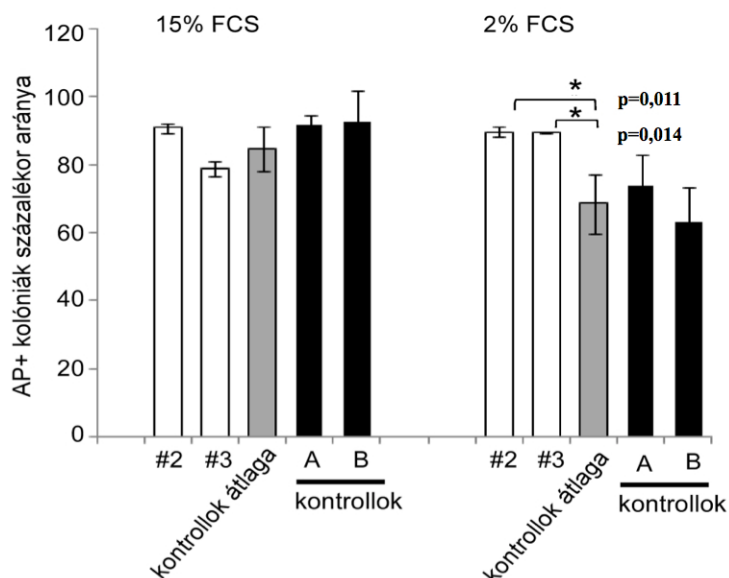
6.4.1. MiR 290-es klaszter túltermeltetésének hatása egér ES sejtek pluripotenciájára

A miR-290-295 klaszter miRNS kódoló részét klónoztuk, és a teljes miRNS klasztert konstitutivan és stabilan túltermelő egér ES sejt vonalakat hoztunk létre (#1, #2 és #3). A kiválasztott #1, #2 és #3 ES vonalakban a miR-290 expresszió 1,71- 1,93- és 2,37-szeres növekedését mértük a kontroll (üres vektorral és PBS-el transzfektált) ES sejtekkel összehasonlítva (**24.ábra**). #2 és #3 ES vonalak kolónia formálási képessége nem mutatott eltérést a kontroll A és B vonalakkal összehasonlítva, ha a sejteket a szokásos, 15% FBS-el (magzati borjú savó) és LIF-el (leukemia inhibitor faktor) kiegészített tápoldatban tenyésztettük, amit a sejtek magas endogén miR-290-295 szintjével magyarázhatunk. Második lépésként összevetettük, hogy a transzgénikus és a kontroll ES sejt vonalak hogyan reagálnak a hosszabb idejű szérumszegényedésre. A sejt vonalakat kolónia képzését AP festéssel követtük nyomon. A szérumszegényedés (FCS 2%) a miR-290-295 túl expresszáló sejt vonalak kolóniái erősebben festődtek az embrionális alkalikus foszfatázra specifikus festékkel (AP) mint az A és B kontroll sejt vonalak (**25.ábra**). A 15% FCS-el kiegészített tápoldatban a kontroll B ES sejt kolóniák elvesztették kerek, kompakt morfológiájukat, míg a miR-290-295 klasztert túl expresszáló #2 és #3 kolóniák továbbra is az embrionális őssejtekre jellemző tipikus morfológiát mutatták. Alacsony szérumszegényedés mellett tenyésztetve, öt nap elteltével a transzgénikus és a kontroll ES sejtek egyaránt nagy mértékű differenciálódást mutattak, ami azt jelzi, hogy a miR-290-295 klaszter ilyen kis mértékű túl expresszáltatása nem elegendő a differenciálódás meggátolásához (**26.ábra**).

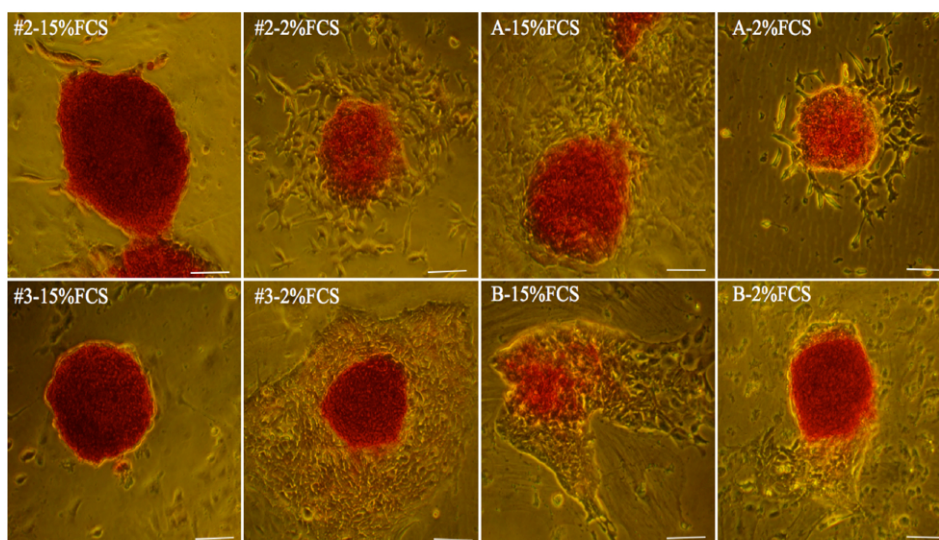
dc_512_12



24. ábra: Az #1, #2 és #3 jelű ES sejtvonalak miR-290 expressziója 1,71; 1,93; és 2,37-szer magasabb mint a vizsgált kontrollok átlaga. Kontrollként PBS-el elektroporálásból származó sejtvonalakokat (A,B,C) és üres vektorral elektroporált ES sejtvonalakokat (vektor1 és vektor2) használtunk. A p értékek számításánál az összes használt kontroll mérési eredményeinek átlagát vettük figyelembe.



25. ábra: A szérum szint csökkentésekor (FCS 2%) a miR-290-295 túl expresszáló sejtvonalak kolóniái erősebben festődtek az embrionális alkalikus foszfatázra specifikus festékkel (AP) mint az A és B kontroll sejtvonalak.

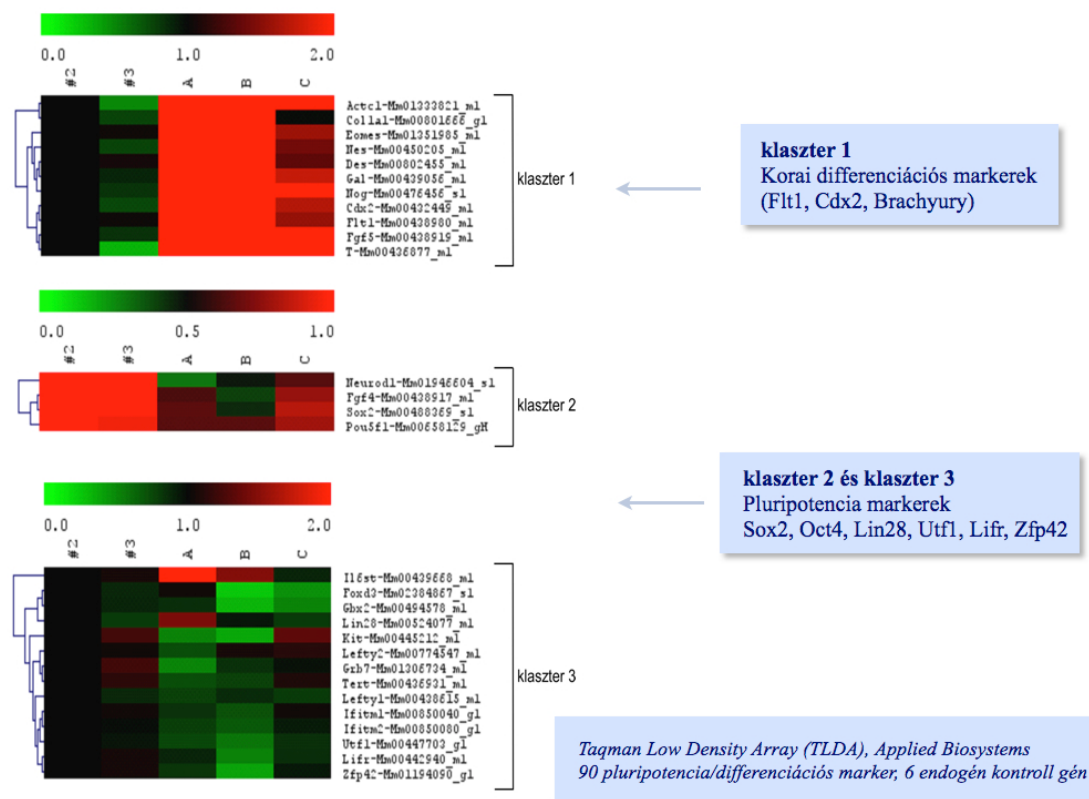


26. ábra: A miR-290-295 nem képes a differenciálódás megállítására, csak a folyamat lassítására. A miR-290-295 túltermelő ES sejtvonalak kolóniái szép kompaktak, kerek szélűek és AP festésre pozitívak, a 15% szérumban tartalmú tápoldatban, zselatinnal borított felszínen. Ezzel szemben az A és B kontroll ES sejtvonalak kolóniái sokszor differenciálódott sejteket tartalmaznak a kolóniák szélén. Szérumban minden vizsgált sejtvonal differenciálódni kezd. (Méret skála: 250µm)

A Taqman® Low-density Array (TLDA, Applied Biosystems) egyik kereskedelmi forgalomban lévő változata (egér 'Stem Cell Pluripotency Panel') 90 pluripotencia és korai differenciációs faktor valamint 6 belső kontroll gén mRNS expresszióját méri TaqMan alapú qPCR eljárással. Ez a technika alkalmas arra, hogy megközelítő képet kapjunk arról, hogyan hat a vizsgált miRNS klaszter túltermelése az őssejtek transzkriptomjára. Az eredmények alapján a kártyán található géneket két fő csoportba osztottuk. Az első kategóriába tartozó gének magas kifejeződést mutattak a kontrollként használt A, B és C ES vonalakban, míg expressziójuk jelentősen csökkent a miR-209-295 túltermelő #2 és #3 ES sejtvonalakban. Ebbe a csoportba főként a korai elköteleződésre jellemző gének tartoznak: Actc1, FoxA2, Desmin, Fgf5 (endoderma differenciálódás), Brachyury (T), Ftl1 (mezoderma differenciálódás), Gal, Noggin, Nestin (neuroektoderma, neurális progenitorok) valamint Cdx2, Eomes és Gcm1 (trofoblaszt markerek). A második csoportba soroltuk azokat a géneket, amelyeknek a kifejeződése nem szignifikánsan emelkedett, vagy nem változott miR-290-295 túltermelés hatására. Ide főként őssejt-specifikus gének

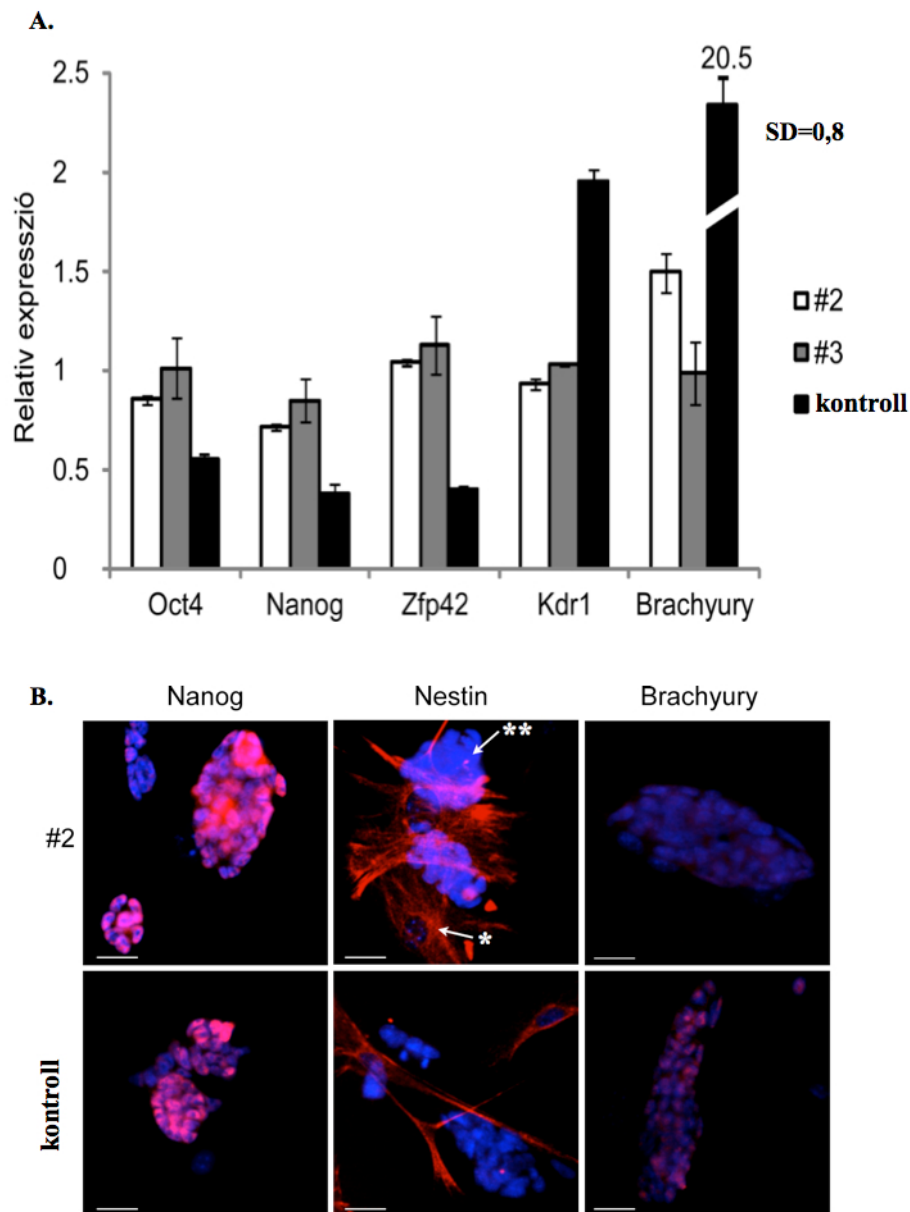
dc_512_12

tartoznak: Pou5f1, Sox2 és Fgf4, FoxD3, Lin28, Cd9, Utf1, Zfp42 és Lifr. A Brachyury expresszió eltérését fehérje szinten immunfestéssel igazoltuk (27.ábra) (28.ábra) .



27. ábra: Össejt- és korai differenciálódás specifikus gének expressziós analízise.

Az össejt specifikus és a korai differenciálódásra jellemző gének expresszióját TaqMan alapú qPCR-el mértük (TaqMan alacsony denzitású array). Az eredményt heatmap formájában mutatja be az ábra. 90 gén és 6 endogén kontroll expresszióját kvantifikáltuk. 'Klaszter 1'-be soroltuk azokat a géneket, melyeknek az expressziós szintje magasabb a kontroll ES sejtvonalakban, mint a transzgenikus #2 és #3 vonalakban. Ide tartozik számos korai differenciálódást jelző marker: Actc1, Colla1, Eomes, Nes, Des, Gal, Nog, Cdx2, Flt1, Fgf5 és Brachyury. 'Klaszter 2'-be soroltuk azokat a géneket, melyeknek az expressziója magasabb a miR-290-295 túltermelő sejtekben. Végül 'Klaszter 3'-ba kerültek azok a gének, melyek nem mutattak expressziós különbséget a kontroll és minta sejtvonalak között. Klaszter 2 és Klaszter 3 többnyire az össejtekre jellemző géneket foglalja magában.



28. ábra: Össejt- és korai differenciálódás specifikus gének expressziós analízise.

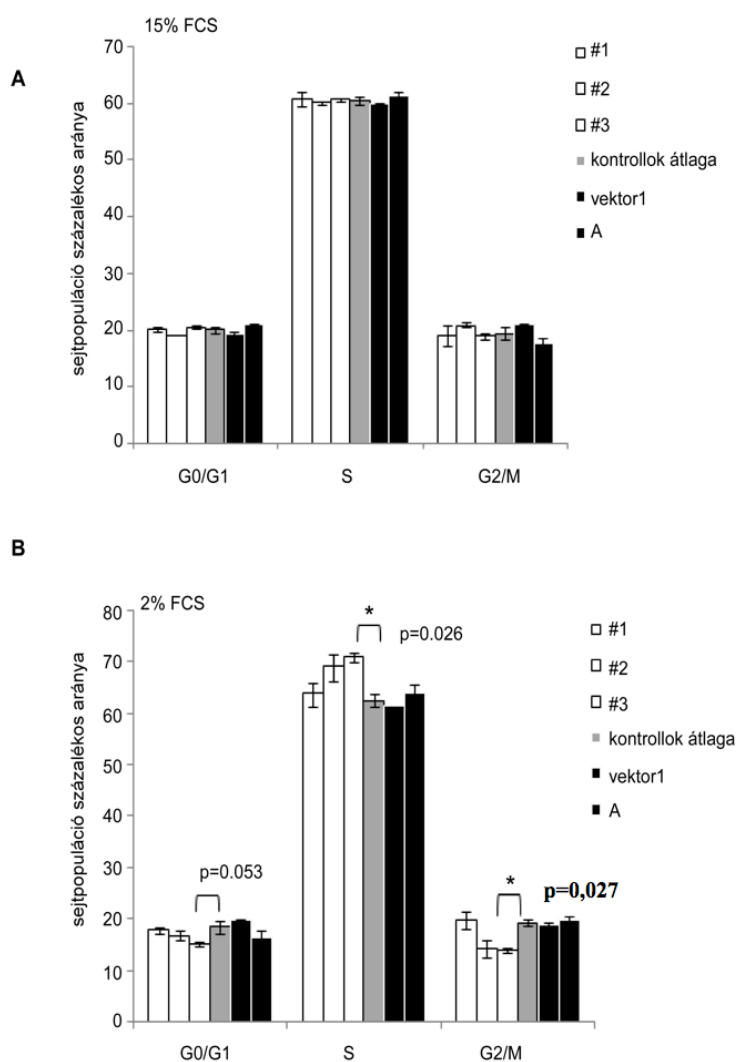
A: A transzgénikus ES vonalak kissé emelkedett mértékben fejezik ki az Oct4, a Nanog, a Zfp42 pluripotencia markereket, ezzel párhuzamosan Kdr1 és Brachyury differenciálódási markerek expressziója alacsonyabb.

B: A vizsgált össejtvonalak kolóniáit nanogra, nesztinre vagy brachyury-ra specifikus ellenanyaggal festettük. A qPCR eredmények alapján Nanog minden használt össejtvonalban egyformán expresszált, az immunfestés eredményei ezt fehérje szinten is igazolják. Ugyanakkor brachyury fehérje alacsonyabb mértékben van jelen a miR-290-295 túlexpresszálo össejt kolóniákban, ami alátámasztja a mRNS szintű mérés eredményeit. A kék festődés (DAPI) a sejtmagot mutatja, A nanog, nesztin és brachyury specifikus festés

dc_512_12

vörös színű. Az egy csillagos nyíl egy fibroblasztra mutat, ami expresszálja a nesztin fehérvét, szemben az összejt kolóniával, amely nem mutat nesztin expressziót. A két csillagos nyíl az ES kolóniára mutat, amelyen csak a sejtmagok látszanak DAPI festéssel. (Méret skála: 50um)

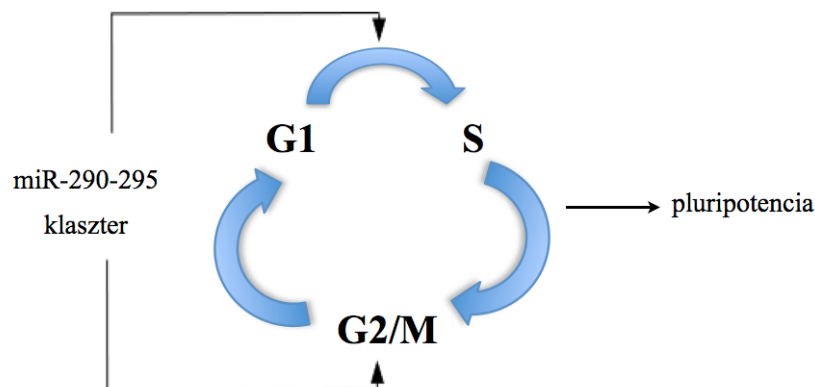
Abból a célból, hogy megállapítsuk, a miR-290-295 klaszter részt vesz-e a sejtciklus szabályozásában, propidium-jodidos festéssel megmértük a sejtciklus fázisok arányát a miR-290-295 túltermelő ES vonalakban (#1, #2 és #3) valamint a kontroll ES vonalakban (vektor1, és A). A szérumszint csökkentésekor a #3 ES vonal 8%-os növekedést mutatott a DNS szintézis (S) fázisban, 5% csökkenést a G0/G1 fázisban és 4% csökkenést a G2/M fázisban, ami összhangban áll a DGCR8 mutáns ES sejtek sejtciklus változásainak adataival. Az eredmények alapján miR-290-295 több ponton is befolyásolja a sejtciklust. A G1-S ellenőrzési pont gátlása mellett elősegítheti a G2-M átmenetet, ezáltal felgyorsítja a sejtciklust és ezzel együtt a sejtosztódást (**29.ábra**) (**30.ábra**)



29. ábra: A miR-290-295 klasztert túltermelő őssejtvonalak sejtciklusának eltérései.

A: miR-290-295 túltermelő #1, #2 és #3-as sejtvonalat, valamint az 'A' kontroll és az üres vektorral transzfektált 'vektor 1' kontroll őssejtvonalak sejtciklus fázis eloszlását hasonlítottuk össze. Nem találtunk különbséget, amikor a sejteket normál, 15% szérumban koncentráció mellett tenyésztettük.

B: Amikor a sejteket 2% szérumban koncentráció mellett tenyésztettük, a miR-290-295 túltermelő vonalakban az S fázisú sejtek szignifikáns felszaporodását figyeltük meg, míg a G2/M fázisú sejtek aránya csökkent. A #1 sejtvonala nem mutatja az említett változásokat, valószínűleg azért, mert miR-290-295 expressziója nem elég kifejezett.



30. ábra: A miR-290-295 és a pluripotencia szabályozás modellje egér embrionális őssejtekben.

A miR-290-295 klaszter miRNS-ei közvetlenül gátolják a sejtciklus egyes negatív szabályozóit. A sejtciklus ezáltal könnyebben átfut az ellenőrző pontokon (G1/S vagy G2/M), és a sejtciklus felgyorsul és a sejtek proliferációs ideje lerövidül. Mindez hozzájárul a pluripotens sejtekre jellemző rövid sejtciklus, amiben nincs jelen G1.

6.4.2. Egér és nyúl összejt specifikus miRNS-ek összehasonlítása

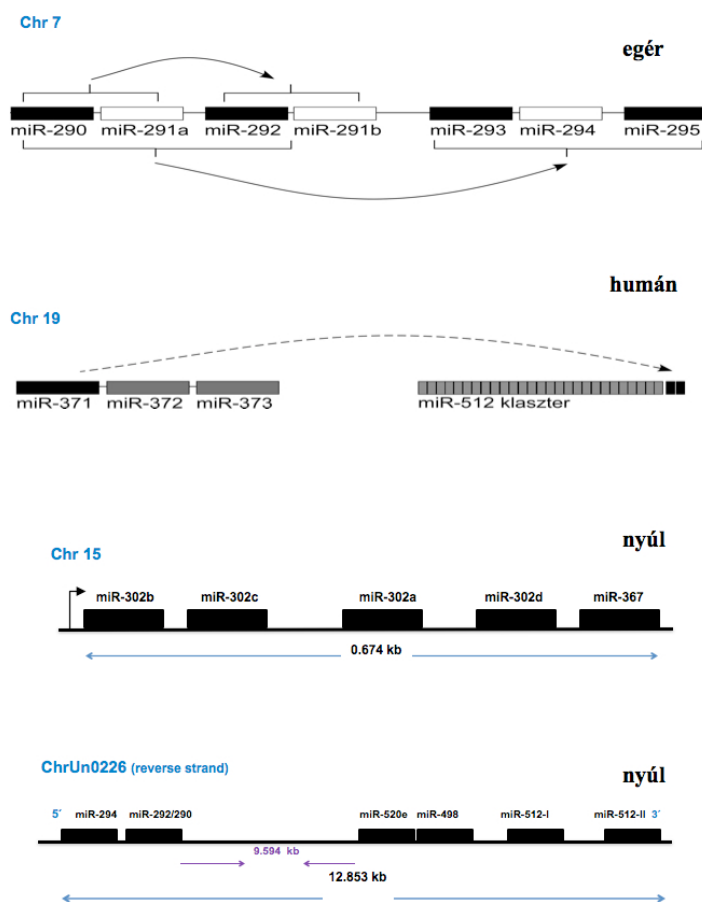
Az egér miR-290-295 klaszter hét prekurzort tartalmaz az Nlrp12 gén szomszédságában, ezek sorrendben: miR-290, miR-291a, miR-292, miR-291b, miR-293, miR-294 és miR-295. A humán klaszter pozíciója hasonló, de a klaszter rövidebb, csak három tagból áll, ezek: miR-371, miR-372 és miR-373 (miR-371-373 klaszter). A szekvenciát a Tandem Repeat Finder szoftver segítségével analizáltuk, valamint önmagával is összehasonlítottuk. A duplikált régió első része tartalmazza a miR-290, miR-291a, miR-291b és miR-292 prekurzorokat, míg az ismétlődés második szakaszáról miR-293, miR-294 és miR-295 keletkezik. Három különböző szekvenciaelemző program két, egymáshoz nagyon hasonló csoportot különített el a klaszteren belül. Az egyik csoportba a miR-290, a miR-292, a miR-293, a miR-295, a másik csoportba a miR-291a, a miR-291b, a miR-294 tartozik. Összegezve az ismétlődő elemek és a szekvenciaelemzés eredményeit, valószínűleg miR-290 és/vagy miR-291a lehet a miR-290-295 klaszter legősibb tagja. A miR-290-291a duplikációjával jöhetett létre miR-292 és miR-291b, majd ez a négy miRNS részlegesen megkettőződött, és létrehozta a miR-290-295 klasztert a mai ismert formában. Az egér miR-290-295 klaszter homológjai emberben két, egymáshoz közeli régióban lokalizálódnak: ezek közül az egyik a már ismert homológ miR-371-373 klaszter, a másik pedig az alacsonyabb szintű egyezést mutató miR-512 klaszter (**31.ábra**)

Nyúl embriókban és nyúl ES sejtekben vizsgáltuk az összejt specifikus miRNS-ek expresszióját. Nyúl ES sejtekben a miR302a, miR302b és a miR367 esetében magas, míg a miR294 esetében alacsony expressziót kaptunk. Egér specifikus miR290, miR295 primert, valamint humán specifikus miR371, miR373 primert alkalmazva, nem tudtunk kimutatni miRNS expressziót a nyúl összejtekben.

Mivel egyetlen bázisnyi eltérés az érett miRNS szekvenciájában befolyásolhatja, hogy ki tudjuk-e mutatni az ortológ gének alapján tervezett primerrel az adott fajban lévő miRNS expresszióját, szükségünk volt a specifikus nyúl miRNS szekvenciákra. SOLID alapú szekvenálást végeztünk különböző nyúl szövetekből, embriókból származó RNS mintákat felhasználva. Az így kapott SOLID szekvenciák alapján, szarvasmarha, humán és egér miRNS adatbázist felhasználva kerestünk homológ nyúl miRNS-eket. Megnéztük, hogy a SOLID szekvenciákat tartalmazó adatbázisban, hány ismert mikroRNS expresszióját lehet kimutatni az általunk vizsgált mintákban. Meghatároztuk, hogy a nyúl

dc_512_12

specifikus miRNS-el adott hasonlóság alapján milyen arányban lehet homológ szarvasmarha (bta-miR), humán (hsa-miR), illetve egér (mmu-miR) szekvenciát találni.



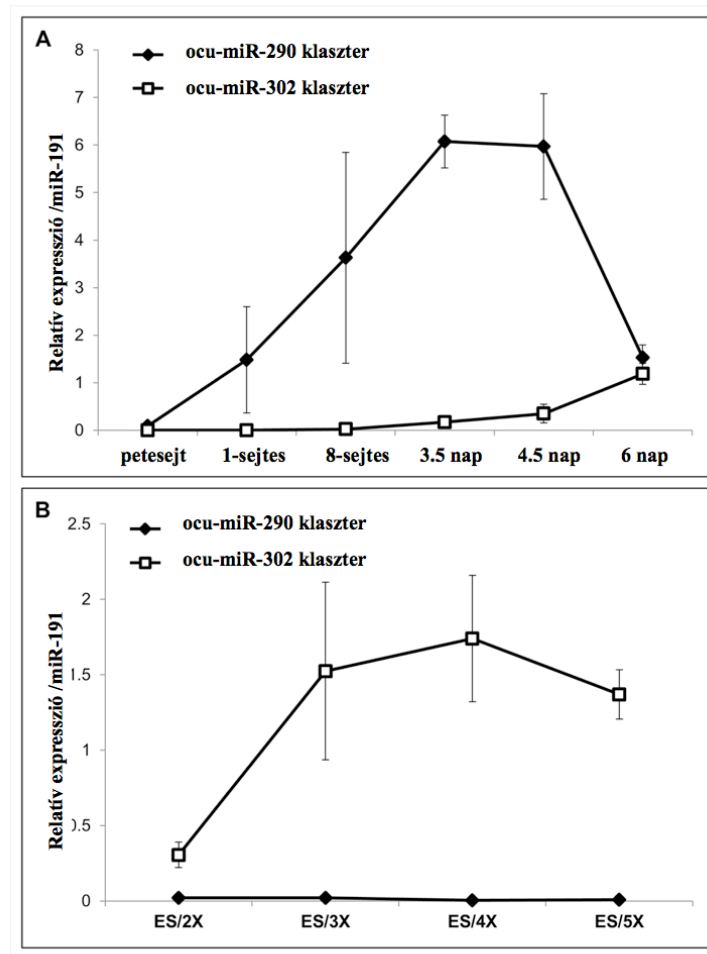
31. ábra: A hét miRNS prekurzorról tíz érett miRNS keletkezik, melyek egy miRNS családba tartoznak, és szekvenciájuk nagyon hasonló. Az ismétlődő genomi szakaszok szekvencia analízise alapján miR-290-291a lehetett a klaszter őse. Valószínűleg miR-290-291a megkettőződésével jött létre miR-292-291b. Egy második duplikációs esemény (miR-290, miR-291a és miR-292 részvételével) vezethetett miR-293, miR-294, és miR-295 kialakulásához, így létrejött a klaszter mai formája. A humán miR-371 valószínűleg miR-290-ból származik, míg a miR-512 őse a miR-371 lehet. A miR-512-516 klaszter nem más, mint egy hosszú tandem ismétlődő szekvencia, melyben megrövidült LTR szekvenciák választják el egymástól a miR-519 számos kópiát, valamint a miR-512 két ismétlődését. A fekete téglalapok azokat a prekurzorokat jelzik, melyek a miR-290-ból erednek, és a fehér téglalapok mutatják azokat a miRNS prekurzorokat, melyek a miR-291a-ból származnak. A miR-519 ismétlődések, a miR-372 és a miR-373 eredete homályos (szürke téglalapokkal jelezve). A nyúl genomban a miR-302-es klaszter összes elemét, illetve néhány miR-290

dc_512_12

klaszter elemet (ocu-miR-290-5p, ocu-miR-292-3p és ocu-miR-294-3p) és néhány a humán C19MC klaszterben található (ocu-miR-512, ocu-miR-498 and ocu-miR-520e) elemet találtunk. A nyúl miR 302-es klaszter nagy fokú homológiát mutat az egér és humán miR-302-es klaszterrel, mind az érett, mind pedig pre-mikroRNS szinten. A nyúl miR-290 klaszter az egér miR-290-es klaszterrel és humán miR-371-es klaszterrel mutat homológiát, és egyben megtalálható a humán C19MC klaszter néhány eleme is.

Meghatározható az is, hogy a szarvasmarha, humán, vagy az egér adatbázissal mutat-e nagyobb hasonlóságot a nyúl miRNS-eket tartalmazó SOLID adatbázisunk. Az összehasonlítás alapján elmondható, hogy a humán miRNS adatbázissal történő összehasonlítás során kaptuk a legnagyobb hasonlóságot a nyúl miRNS szekvenciákat tartalmazó SOLID adatbázisunkhoz.

A SOLID szekvencia adatbázisunkból meghatározható az is, hogy az expresszáló miRNS-ek milyen arányban találhatók a különböző mintákban. Ez alapján megadhatóak azok a miRNS-ek amik a korai embriókra, illetve nyúl ES sejtekre jellemző expressziót mutatnak. Számos embrionális és összejt specifikus nyúl miRNS pontos szekvenciáját meg tudtuk határozni (miR 302a, miR302b, miR302c, miR302d, miR290-5p, miR292-3p, miR-294, miR-371, miR-512). Megállapítható, hogy a miR302 klaszter tagjai mutatnak magasabb expressziós szintet a nyúl ES sejtekben, a miR 290 klaszter tagjai feltételezhetően a korai embrionális fejlődés során játszhatnak fontos szerepet. **(32.ábra)**



32. ábra: Az eredményeink validálására meghatároztuk az őssejtspecifikus nyúl miRNS-ek expressziós szintjét nyúl őssejtekben, eltérő passzázsszámoknál. Megállapítottuk, hogy a miR302 klaszter tagjai mutatnak magasabb expressziós szintet a nyúl ES sejtekben, a miR 290 klaszter tagjai feltételezhetően a korai embrionális fejlődés során játszhatnak fontos szerepet.

7. 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.

8. 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 átültetési 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 egypetűjű 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 töltnek be irányító szerepet, ezzel párhuzamosan a miR-302-es klaszter jelenlétét figyeltük meg a nyúl ES sejtekben.

9. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

9.1. ANGOL NYELVŰ TUDOMÁNYOS FOLYÓIRATOK

- Táncos, Zs., Nemes, Cs., Polgar, Zs., **Gócza, 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**

9.2. 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.

9.3. 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 mikroinjektációs 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.

9.4. MAGYAR NYELVŰ, ISMERETTERJESZTŐ FOLYÓIRATOK

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

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

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

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

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

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

10. EGYÉB SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

10.1. 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, Szabényi, 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**

dc_512_12

- 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): Vitriification of biopsied mouse embryos. Acta Veterinaria Hungarica 53/1, pp. 103-112. **IF: 0,53**

11. 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 Bogdának 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 Babettnak, Pouneh Maraghechinek, külön köszönet Gróf Mihályné, Marikának, mindenkori segítségéért, ami nélkül nem működhetett volna sejtenyésztő laboratóriumunk.

Nem tudtam volna munkám során újabb és újabb technológiákat megismerni más kutató intézetekben dolgozó magyar és külföldi barátaim segítségével, 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.

12. IRODALOMJEGYZÉK

- Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P.W., Beighton, G., Bello, P.A., Benvenisty, N., Berry, L.S., Bevan, S., Blum, B., Brooking, J., Chen, K.G., Choo, A.B., Churchill, G.A., Corbel, M., Damjanov, I., Draper, J.S., Dvorak, P., Emanuelsson, K., Fleck, R.A., Ford, A., Gertow, K., Gertsenstein, M., Gokhale, P.J., Hamilton, R.S., Hampl, A., Healy, L.E., Hovatta, O., Hyllner, J., Imreh, M.P., Itskovitz-Eldor, J., Jackson, J., Johnson, J.L., Jones, M., Kee, K., King, B.L., Knowles, B.B., Lako, M., Lebrin, F., Mallon, B.S., Manning, D., Mayshar, Y., McKay, R.D., Michalska, A.E., Mikkola, M., Mileikovsky, M., Minger, S.L., Moore, H.D., Mummery, C.L., Nagy, A., Nakatsuji, N., O'Brien, C.M., Oh, S.K., Olsson, C., Otonkoski, T., Park, K.Y., Passier, R., Patel, H., Patel, M., Pedersen, R., Pera, M.F., Piekarczyk, M.S., Pera, R.A., Reubinoff, B.E., Robins, A.J., Rossant, J., Rugg-Gunn, P., Schulz, T.C., Semb, H., Sherrer, E.S., Siemen, H., Stacey, G.N., Stojkovic, M., Suemori, H., Szatkiewicz, J., Turetsky, T., Tuuri, T., van den Brink, S., Vintersten, K., Vuoristo, S., Ward, D., Weaver, T.A., Young, L.A., Zhang, W., 2007. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nature biotechnology* 25, 803-816.
- Babiarz, J.E., Ruby, J.G., Wang, Y., Bartel, D.P., Blelloch, R., 2008. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes & development* 22, 2773-2785.
- Benetti, R., Gonzalo, S., Jaco, I., Munoz, P., Gonzalez, S., Schoeftner, S., Murchison, E., Andl, T., Chen, T., Klatt, P., Li, E., Serrano, M., Millar, S., Hannon, G., Blasco, M.A., 2008. A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. *Nature structural & molecular biology* 15, 268-279.
- Berg, D.K., Smith, C.S., Pearton, D.J., Wells, D.N., Broadhurst, R., Donnison, M., Pfeffer, P.L., 2011. Trophectoderm lineage determination in cattle. *Developmental cell* 20, 244-255.
- Besenfelder, U., Strouhal, C., Brem, G., 1998. A method for endoscopic embryo collection and transfer in the rabbit. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe A* 45, 577-579.

- Bodo, S., Gocza, E., Revay, T., Hiripi, L., Carstea, H., Kovacs, A., Bodrogi, L., Bosze, Z., 2004. Production of transgenic chimeric rabbits and transmission of the transgene, through the germline. *Molecular reproduction and development* 68, 435-440.
- Bosze, Z., Hiripi, L., Carnwath, J.W., Niemann, H., 2003. The transgenic rabbit as model for human diseases and as a source of biologically active recombinant proteins. *Transgenic research* 12, 541-553.
- Brem, G., Tenhumberg, H., Krausslich, H., 1984. Chimerism in cattle through microsurgical aggregation of morulae. *Theriogenology* 22, 609-613.
- Brons, I.G., Smithers, L.E., Trotter, M.W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R.A., Vallier, L., 2007. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448, 191-195.
- Cao, F., Li, X., Hiew, S., Brady, H., Liu, Y., Dou, Y., 2009. Dicer independent small RNAs associate with telomeric heterochromatin. *RNA* 15, 1274-1281.
- Carstea, B.V., Lemos, A.P.C., Ilie, E.D., Varga, L., Bodo, S., Kovacs, A., Bosze, Z., Gocza, E., 2007. Production of identical mouse twins and a triplet with predicted gender. *Cloning and stem cells* 9, 247-256.
- Chang, T.C., Zeitels, L.R., Hwang, H.W., Chivukula, R.R., Wentzel, E.A., Dews, M., Jung, J., Gao, P., Dang, C.V., Beer, M.A., Thomas-Tikhonenko, A., Mendell, J.T., 2009. Lin-28B transactivation is necessary for Myc-mediated let-7 repression and proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 3384-3389.
- Chantry-Darmon, C., Rogel-Gaillard, C., Bertaud, M., Urien, C., Perrocheau, M., Chardon, P., Hayes, H., 2003. 133 new gene localizations on the rabbit cytogenetic map. *Cytogenetic and genome research* 103, 192-201.
- Chiu, Y.L., Rana, T.M., 2002. RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Molecular cell* 10, 549-561.
- Cho, W.C., 2008. A future of cancer prevention and cures: highlights of the Centennial Meeting of the American Association for Cancer Research. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 19, 205-211.
- Choi, W.Y., Giraldez, A.J., Schier, A.F., 2007. Target protectors reveal dampening and balancing of Nodal agonist and antagonist by miR-430. *Science* 318, 271-274.

- Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F., Hannon, G.J., 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231-235.
- Duranthon, L.D., Grimberg, J., Vandenbussche, E., Mondoloni, B., Augereau, P., 2000. [Effectiveness of postoperative drainage after bipolar sealed endoprosthetic arthroplasty for femur neck fracture. Results of a prospective randomized study of 86 cases]. *Revue de chirurgie orthopedique et reparatrice de l'appareil moteur* 86, 370-372.
- Duranthon, V., Beaujean, N., Brunner, M., Odening, K.E., Santos, A.N., Kacs Kovics, I., Hiripi, L., Weinstein, E.J., Bosze, Z., 2012. On the emerging role of rabbit as human disease model and the instrumental role of novel transgenic tools. *Transgenic research* 21, 699-713.
- Ecker, J.R., Davis, R.W., 1986. Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 5372-5376.
- Evans, M.J., Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Gardner, R.L., Munro, A.J., 1974. Successful construction of chimaeric rabbit. *Nature* 250, 146-147.
- Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., Ruddle, F.H., 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 7380-7384.
- Hadjantonakis, A.K., Gertsenstein, M., Ikawa, M., Okabe, M., Nagy, A., 1998. Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mechanisms of development* 76, 79-90.
- Henderson, M.J., Russell, A.J., Hird, S., Munoz, M., Clancy, J.L., Lehrbach, G.M., Calanni, S.T., Jans, D.A., Sutherland, R.L., Watts, C.K., 2002. EDD, the human hyperplastic discs protein, has a role in progesterone receptor coactivation and potential involvement in DNA damage response. *The Journal of biological chemistry* 277, 26468-26478.

- Heo, I., Joo, C., Kim, Y.K., Ha, M., Yoon, M.J., Cho, J., Yeom, K.H., Han, J., Kim, V.N., 2009. TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell* 138, 696-708.
- Hiripi, L., Makovics, F., Halter, R., Baranyi, M., Paul, D., Carnwath, J.W., Bosze, Z., Niemann, H., 2003. Expression of active human blood clotting factor VIII in mammary gland of transgenic rabbits. *DNA and cell biology* 22, 41-45.
- Honda, A., Hirose, M., Hatori, M., Matoba, S., Miyoshi, H., Inoue, K., Ogura, A., 2010. Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine. *The Journal of biological chemistry* 285, 31362-31369.
- Honda, A., Hirose, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., Shimozawa, N., Hatori, M., Shimizu, N., Murata, T., Hirose, M., Katayama, K., Wakisaka, N., Miyoshi, H., Yokoyama, K.K., Sankai, T., Ogura, A., 2008. Stable embryonic stem cell lines in rabbits: potential small animal models for human research. *Reproductive biomedicine online* 17, 706-715.
- Honda, A., Hirose, M., Ogura, A., 2009. Basic FGF and Activin/Nodal but not LIF signaling sustain undifferentiated status of rabbit embryonic stem cells. *Experimental cell research* 315, 2033-2042.
- Jaenisch, R., Mintz, B., 1974. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71, 1250-1254.
- Jin, D.I., Kim, D.K., Im, K.S., Choi, W.S., 2000. Successful pregnancy after transfer of rabbit blastocysts grown in vitro from single-cell zygotes. *Theriogenology* 54, 1109-1116.
- Jing, Q., Huang, S., Guth, S., Zarubin, T., Motoyama, A., Chen, J., Di Padova, F., Lin, S.C., Gram, H., Han, J., 2005. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* 120, 623-634.
- Johnson, S.M., Lin, S.Y., Slack, F.J., 2003. The time of appearance of the *C. elegans* let-7 microRNA is transcriptionally controlled utilizing a temporal regulatory element in its promoter. *Developmental biology* 259, 364-379.
- Kanellopoulou, C., Muljo, S.A., Kung, A.L., Ganesan, S., Drapkin, R., Jenuwein, T., Livingston, D.M., Rajewsky, K., 2005. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells

- are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes & development* 19, 489-501.
- Katter, K., Geurts, A.M., Hoffmann, O., Mates, L., Landa, V., Hiripi, L., Moreno, C., Lazar, J., Bashir, S., Zidek, V., Popova, E., Jerchow, B., Becker, K., Devaraj, A., Walter, I., Grzybowksi, M., Corbett, M., Filho, A.R., Hodges, M.R., Bader, M., Ivics, Z., Jacob, H.J., Pravenec, M., Bosze, Z., Rulicke, T., Izsvak, Z., 2012. Transposon-mediated transgenesis, transgenic rescue, and tissue-specific gene expression in rodents and rabbits. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*.
- Korstanje, R., O'Brien, P.C., Yang, F., Rens, W., Bosma, A.A., van Lith, H.A., van Zutphen, L.F., Ferguson-Smith, M.A., 1999. Complete homology maps of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and human by reciprocal chromosome painting. *Cytogenetics and cell genetics* 86, 317-322.
- Li, P., Tong, C., Mehrian-Shai, R., Jia, L., Wu, N., Yan, Y., Maxson, R.E., Schulze, E.N., Song, H., Hsieh, C.L., Pera, M.F., Ying, Q.L., 2008. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* 135, 1299-1310.
- Liao, J., Cui, C., Chen, S., Ren, J., Chen, J., Gao, Y., Li, H., Jia, N., Cheng, L., Xiao, H., Xiao, L., 2009. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell stem cell* 4, 11-15.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engle, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., Johnson, J.M., 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769-773.
- Liu, H., Zhu, F., Yong, J., Zhang, P., Hou, P., Li, H., Jiang, W., Cai, J., Liu, M., Cui, K., Qu, X., Xiang, T., Lu, D., Chi, X., Gao, G., Ji, W., Ding, M., Deng, H., 2008. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell stem cell* 3, 587-590.
- Marson, A., Levine, S.S., Cole, M.F., Frampton, G.M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M.G., Johnston, W.K., Wernig, M., Newman, J., Calabrese, J.M., Dennis, L.M., Volkert, T.L., Gupta, S., Love, J., Hannett, N., Sharp, P.A., Bartel, D.P., Jaenisch, R., Young, R.A., 2008. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* 134, 521-533.

- Martin, G.R., 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 7634-7638.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R., Tuschl, T., 2002. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110, 563-574.
- Matsui, Y., Zsebo, K., Hogan, B.L., 1992. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70, 841-847.
- Mayer, J.F., Jr., Fritz, H.I., 1974. The culture of preimplantation rat embryos and the production of allophenic rats. *Journal of reproduction and fertility* 39, 1-9.
- Nagy, A., Gocza, E., Diaz, E.M., Prideaux, V.R., Ivanyi, E., Markkula, M., Rossant, J., 1990. Embryonic Stem-Cells Alone Are Able to Support Fetal Development in the Mouse. *Development* 110, 815-&.
- Nagy, A., Nagy, K., Gertsenstein, M., 2010. Production of mouse chimeras by aggregating pluripotent stem cells with embryos. *Methods in enzymology* 476, 123-149.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., Roder, J.C., 1993. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 8424-8428.
- Nichols, J., Silva, J., Roode, M., Smith, A., 2009. Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. *Development* 136, 3215-3222.
- Orban, T.I., Apati, A., Nemeth, A., Varga, N., Krizsik, V., Schamberger, A., Szebenyi, K., Erdei, Z., Varady, G., Karaszi, E., Homolya, L., Nemet, K., Gocza, E., Miskey, C., Mates, L., Ivics, Z., Izsvak, 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, 1077-1087.
- Rapp, U.R., Ceteci, F., Schreck, R., 2008. Oncogene-induced plasticity and cancer stem cells. *Cell Cycle* 7, 45-51.
- Rybak, A., Fuchs, H., Hadian, K., Smirnova, L., Wulczyn, E.A., Michel, G., Nitsch, R., Krappmann, D., Wulczyn, F.G., 2009. The let-7 target gene mouse lin-41 is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2. *Nature cell biology* 11, 1411-1420.
- Sagi, L., Gócsa, E., Kovács, K., 2011. Plain Facts about GMOs, Hungarian White paper. Barabás Zoltán Federation of Biotechnology, Szeged.

- Sengupta, S., Nie, J., Wagner, R.J., Yang, C., Stewart, R., Thomson, J.A., 2009. MicroRNA 92b controls the G1/S checkpoint gene p57 in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 27, 1524-1528.
- Senthil, V., Chen, S.N., Tsybouleva, N., Halder, T., Nagueh, S.F., Willerson, J.T., Roberts, R., Marian, A.J., 2005. Prevention of cardiac hypertrophy by atorvastatin in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation research* 97, 285-292.
- Sinkkonen, A., Strommer, R., Penttinen, O.P., 2008a. Low toxicant concentrations decrease the frequency of fast-growing seedlings at high densities of annual baby's breath (*Gypsophila elegans*). *Environ Pollut* 153, 523-525.
- Sinkkonen, L., Hugenschmidt, T., Berninger, P., Gaidatzis, D., Mohn, F., Artus-Revel, C.G., Zavolan, M., Svoboda, P., Filipowicz, W., 2008b. MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. *Nature structural & molecular biology* 15, 259-267.
- Suh, N., Baehner, L., Moltzahn, F., Melton, C., Shenoy, A., Chen, J., Billelloch, R., 2010. MicroRNA function is globally suppressed in mouse oocytes and early embryos. *Current biology : CB* 20, 271-277.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Tarkowski, A.K., Ozdzenski, W., Czolowska, R., 2001. Mouse singletons and twins developed from isolated diploid blastomeres supported with tetraploid blastomeres. *The International journal of developmental biology* 45, 591-596.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Vassilieva, S., Guan, K., Pich, U., Wobus, A.M., 2000. Establishment of SSEA-1- and Oct-4-expressing rat embryonic stem-like cell lines and effects of cytokines of the IL-6 family on clonal growth. *Experimental cell research* 258, 361-373.
- Voorhoeve, P.G., van Rossum, E.F., Te Velde, S.J., Koper, J.W., Kemper, H.C., Lamberts, S.W., de Waal, H.A., 2006. Association between an IGF-I gene polymorphism and

- body fatness: differences between generations. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 154, 379-388.
- Wang, Y., Baskerville, S., Shenoy, A., Babiarz, J.E., Baehner, L., Blelloch, R., 2008. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nature genetics* 40, 1478-1483.
- Wang, Y., Blelloch, R., 2011. Cell cycle regulation by microRNAs in stem cells. *Results and problems in cell differentiation* 53, 459-472.
- Wei, Z., Yang, Y., Zhang, P., Andrianakos, R., Hasegawa, K., Lyu, J., Chen, X., Bai, G., Liu, C., Pera, M., Lu, W., 2009. Klf4 interacts directly with Oct4 and Sox2 to promote reprogramming. *Stem Cells* 27, 2969-2978.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., Diederichs, S., 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology* 11, 228-234.
- Wobus, A.M., Boheler, K.R., 2005. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiological reviews* 85, 635-678.
- Ying, Q.L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., Smith, A., 2008. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453, 519-523.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, II, Thomson, J.A., 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.
- Zakhartchenko, V., Flisikowska, T., Li, S., Richter, T., Wieland, H., Durkovic, M., Rottmann, O., Kessler, B., Gungor, T., Brem, G., Kind, A., Wolf, E., Schnieke, A., 2011. Cell-mediated transgenesis in rabbits: chimeric and nuclear transfer animals. *Biology of reproduction* 84, 229-237.