

MTA Doktori értekezés tézisei

Össejtek *in vitro* felhasználási lehetőségei az  
állatbiotechnológia, a betegség modellezés és  
toxikológia területén

Dr. Kobolák Julianna Ilona

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

2024

Gödöllő



# 1 BEVEZETÉS

## 1.1 Állatmodellek és *in vitro* sejtes rendszerek a biológiai kutatásokban

Az állatokon végzett kísérletek immár hosszú évtizedek óta jelentős szerepet töltenek be az emberi és állati gyógyászatban, alkalmazásuk lehetővé teszi, hogy az egyes betegségeket, azok patomechanizmusát olyan módon vizsgálják, amely máskülönben nem lehetséges. Mára az állatmodellek használata drámaian megnőtt, miután bevett módszerré váltak a gének szerepének vizsgálatában is. A gerinces modellek felhasználása a farmakológiai, valamint környezettoxikológiai vizsgálatok során is jelentős. Az emlősök két családja, a rágcsálók (főként az egér és patkány), valamint a nyúl-félék közül a nyúl (*Oryctolagus cuniculus*) a leggyakrabban használt humán állatmodellek. A nagyállat modellek, mint a sertés, juh, kecske, ló vagy szarvasmarha, egyes betegségtípusok esetén nyertek nagyobb jelentőséget, azonban hosszú generációs idejük, tartási nehézségeik és költségeik miatt kevésbé kelhetnek versenyre a klasszikus kisállat modellekkel, a felhasznált állatlétszám messze elmarad a rágcsálókétól. Összességében, egy nemrégben megjelent tanulmány szerint 2019 és 2020 között az USA-ban közel 24 millió, az Európai Unióban mintegy 9,4 millió, míg a világ többi részén mintegy 55 millió állatot használtak fel kísérletekben. Általános egyetértés van abban, hogy a kísérleti állatok felhasználását a szükséges minimumra kell korlátozni, igazodva a már 1959-ben megfogalmazott ún. „3R: Reduction, Refinement, and Replacement” gondolatához. Vagyis, ha egy kísérletben mindenképpen szükséges az állatok használata, akkor mindent meg kell tenni annak érdekében, hogy

- helyettesítsük (*Replace*) azokat alternatív módszerekkel,
- csökkentsük (*Reduce*) a kísérletenként felhasznált állatok számát,
- finomítsuk (*Refine*) az alkalmazott kísérleti protokollokat annak érdekében, hogy a felhasznált kísérleti állatoknak ne, vagy csak minimális fájdalmat okozzunk.

Bár a kisállatmodellek, nyilvánvaló előnyöket kínálnak, a fajspecifikus különbségek az eredmények értékelésében problémákat okozhatnak, amely a más fajokra való extrapolálást gyakran megnehezíti. Ezért nem véletlen, hogy az állatkísérletek alternatív módszerei iránti igény az elmúlt évtizedekben egyre erőteljesebben jelentkezett. Másrészt, az állatvédelmi szempontok egyre komolyabb jelentőséget kaptak, nem

csak a szabályozások változása, de a társadalmi elvárás erősödése révén is a kutatások, különösképpen a kozmetikai ipar, a gyógyszerkutatások és a toxikológiai vizsgálatok terén.

Alternatív megközelítés az *in vitro* sejt kultúrák alkalmazása, amely megbízható betekintést nyújthat számos tulajdonság, vagy valamely anyag toxicitásának vizsgálatába. Az *in vitro* sejtes rendszerek új és egyre nagyobb teret hódító csoportja az összejttenyészetek alkalmazása. A pluripotens összejtek egyaránt értékes *in vitro* rendszert kínálnak a fejlődéssel kapcsolatos események, valamint a komplex, multifaktoriális tulajdonságok, betegségek molekuláris és sejt szintű tanulmányozására. Az összejt alapú rendszerek előnye, hogy nem csak egy, hanem többféle sejt típus is differenciálható egyazon sejt vonalból (vagyis genetikai háttérrel), lehetővé téve egy adott tulajdonság vagy éppen több szövettípust, szervet érintő betegség komplex vizsgálatát. Az áttörést a területen az embrionális összejtek (*Embryonic Stem Cells*, ESCs) mellett az ún. indukált pluripotens összejtek (*induced Pluripotent Stem Cells*, iPSC) előállítási technológiájának felfedezése jelentette. Ezzel embriók felhasználása nélkül, immár szöveti sejtek genetikai újraprogramozásával is lehetővé vált pluripotens összejtek létrehozása. A hatékony génmódosítási eljárások (pl: CRISPR/Cas9, TALEN rendszerek) révén pedig tovább szélesedett az alkalmazási lehetőségek köre.

Ugyanakkor, az állatokból létrehozott iPSC sejtek (pl. szarvasmarha, sertés, ló, juh, kecske, tyúk, kutya, macska) az állatgyógyászat, és a biológiai mechanizmusok megértésében továbbra is jelentős szerepet töltenek be, nem beszélve a háziállatok regeneratív gyógyászatáról, amely a várakozások szerint komoly fejlődésen mehet keresztül, de a humán betegségek új modelljeit is biztosíthatja. Ezen kívül jelentős a mezőgazdasági célokra történő alkalmazások köre, ahol az állati eredetű pluripotens összejtek (akár ESC akár iPSC) értékes géntechnológiai eszközként szolgálhatnak a gazdasági és betegségekkel szembeni ellenálló tulajdonságok szempontjából fontos és előnyös génekkel rendelkező állatállományok előállításában, vagy a funkcionális genomikai vizsgálatokban. Megemlíthető továbbá a xenotranszplantáció, vagy a gyógyszergyártás, gyógyszertermelés (pl. tejbe kiválasztott fehérjék) és farmakokinetikai vizsgálatok területe, de a regeneratív vizsgálatok (beleértve a termékenység helyreállítását is), továbbra is fontos területet képviselnek a haszonállatok és összejtjeik modellként való felhasználása területén.

## 1.2 Célkitűzések

Célkitűzéseim megfogalmazásakor az őssejteken alapuló *in vitro* modellrendszer alkalmazásának lehetőségeiből kiindulva igyekeztem új modellrendszereket létrehozni a különböző tulajdonságok, és betegségek vizsgálatára. Meg kívántam vizsgálni az alábbiakat:

1. Lehetséges-e egy alternatív sejtmagátültetési módszerrel, az ún. *zona pellucida*-mentes sejtmagátültetéssel különböző donorsejteket felhasználva előállított egér embriókból embrionális őssejtvonalakat létrehozni, a fertilizációval előállított embriókból létrehozott sejtvonallakkal megegyező pluripotenciával.
2. A sejtmagátültetési újraprogramozás során különböző sejtmagátültetési technológiákkal létrehozott egér embriókból előállított embrionális őssejtek pluripotenciájának, vagyis őssejt tulajdonságainak összehasonlító vizsgálata, annak tisztázására, hogy a sejtmagátültetett embriókból létrehozott őssejtek potenciája mutat-e jelentősebb eltérést a fertilizációval létrehozott embriókból izolált sejtvonalakhoz képest.
3. Mennyiben befolyásolja a sejtmagdonor sejt típusa, illetve a sejtmagátültetés módszere a klónozott embriókból alapított sejtvonalak pluripotenciáját, kimutatható-e különbség e tekintetben a sejtvonalak között.
4. A pluripotencia kialakításáért felelős egyik fő szabályozó faktor a POU5F1 transzkripciós faktor fehérjét kódoló gén vizsgálata nyúl fajban, annak érdekében, hogy az őssejt előállítás technológiája nagyobb hatékonyságot érjen el e fajban is.
5. A pluripotencia kialakításáért felelős gének expressziója mennyiben különbözik embrionális stádiumban a különböző fajok között, szarvasmarha, sertés és egér embriókat összehasonlítva. A génexpresszió vizsgálata révén a pluripotens sejttenyészetek előállítása hatékonyságának javítása, embriológiai és kutatási felhasználhatóságuk kiterjesztése.
6. A genetikai újraprogramozás más módszerével, az ún. indukált pluripotens őssejt (iPSC) előállítással létrehozott őssejtek betegségek *in vitro* modellezésében való alkalmazhatósága 2D sejt- és 3D szövettenyésztési technikák alkalmazásával milyen eredményre vezet.

Kérdéseim megválaszolása az *in vitro* őssejt modellek felhasználási lehetőségeit tágítja és pontosabb képet ad azok alkalmazhatóságáról a különböző területeken.

## 2 ANYAG ÉS MÓDSZER

### 2.1 Embrionális őssejtvonalak izolálása és jellemzése sejtmagátültetési genetikai újraprogramozással létrehozott egér embriókból

**Sejtmagátültetési genetikai újraprogramozás:** A sejtmagátültetési genetikai újraprogramozás módszertana (így a technológia részletes módszertani ismertetése) nem képezi részét a dolgozat eredményeinek. A dolgozatban a sejtmagátültetési genetikai újraprogramozással előállított és hólyagsíra fejlődési állapotba eljutott embriókból történő sejtvonal alapítás és az azokkal való kísérletes munka kerül bemutatásra.

**Sejtmagdonor sejtek hatásának vizsgálata:** Kísérleteink során több sejtmagdonor sejtípust használtunk: friss kumulusz sejtek (B6D2 F1 genotípusú egér petesejtekről izolálva); 13,5 napos B6D2 genotípusú egér embrionális fibroblaszt sejtek (*Mouse Embryonic Fibroblast*, MEF), és HM1 egér embrionális őssejtek (129Ola genotípus).

**Embrionális őssejtvonalak alapítása hólyagsíra stádiumú NT és fertilizált egér embriókból:** Kísérleteinkben a hagyományos embrionális őssejtvonal alapítás módszerét alkalmaztuk. A hólyagsíra állapotú embriókat osztódásban gátolt MEF tápláló sejtrétegre helyeztük egyenként, 24-lyukú tenyésztőedényben. A tápoldathoz nukleozid keveréket (100x) és inzulin-transzferrin-szelén kiegészítést (ITS, 100x) adtunk. A sejtmagátültetéssel létrehozott embriók esetén a módszert módosítottuk és az ICM csomó sejtjeit nem kezeltük tripszinnel, hanem közvetlenül a  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -mentes PBS oldattal feltöltött üvegapillárisal való mechanikus izolálást követően ültettük friss tápláló sejtrétegre. Amennyiben az első ES-szerű kolóniák megjelenésekor csak csekély számú kolóniát találtunk, akkor azok első izolálásakor szintén az előbb ismertetett mechanikus izolálást alkalmaztuk, enzimes kezelés nélkül.

**Egér embrionális őssejtvonalak pluripotencia jellemzése:** Az újonnan alapított sejtvonalak pluripotenciáját több módszerrel vizsgáltuk: a pluripotencia faktorok expresszióját immuncitokémiával, áramlási citometriával (FACS), és alkalikus foszfatáz (ALP) enzimaktivitás vizsgálattal fehérje szinten. Kromoszómaszám meghatározást és kariotípus elemzést is végeztünk, valamint növekedési hatékonyság vizsgálatot a populáció duplázódás meghatározásával. A sejtvonalak *in vitro* differenciációs képességét, mint a pluripotencia további fontos markerét, embriótest (EB) képződés, spontán, valamint irányított (szívizom és neurális) differenciáció során igazoltuk.

A génexpressziós szintű analízishez DNS-alapú microarray vizsgálatot végeztünk (21.000 próbával), amely eredményeit az NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) adatbázisban GPL3697 számon érhető el (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE7173>). Az expressziós adatokat a GEO adatbázisban GSE8424 azonosító számon publikáltuk (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi>). Az eltérően expresszáló gének validálása TaqMan macro-array és kvantitatív valós idejű PCR elemzéssel történt.

## 2.2 POU5F1 pluripotencia gén vizsgálata nyúl embrióban

**DNS fragmentumok klónozása és szekvenálása:** Az *nyúl* POU5F1 gén 5' szabályozó régiójának genomszekvenciája a GenBank adatbázisban **EF194086.1** számon publikáltuk (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EF194086>). A kapott PCR-fragmentumokat plazmid vektorba klónoztuk, majd szekvenáltuk sztenderd protokoll szerint. A szekvenciát a GeneBank adatbázisban az akkor fellelhető genomi (gDNS), kódoló (cDNS) szekvenciák alapján végeztük több faj adatait felhasználva (humán, egér, szarvasmarha, kutya). A vizsgálatokhoz a mintákat (gDNS, mRNS) különböző életkorban gyűjtött nyúl embriókból és felnőtt nyúl bőrszövetből nyertük.

**A POU5F1 promóter funkcionális elemzése:** A POU5F1 promóter konzervált régióit többszörös szekvencia-illesztéssel azonosítottuk, PCR-rel amplifikáltuk és szubklónoztuk GFP riportergént tartalmazó plazmidba, majd egér ESC sejtekbe nukleofektáltuk az expresszió vizsgálatának céljából. A transzfektált sejtek fluoreszcencia intenzitását spektrofotométerrel detektáltuk. Az egyes kísérletek közötti sejtszám eltérést a sejtfehérje-tartalom mérésével korrigáltuk. A génexpressziós vizsgálatokat kvantitatív valós idejű PCR elemzéssel végeztük.

## 2.3 Haszonállatok embrióinak összehasonlítása, a pluripotencia gének expressziójának vizsgálata

A kísérletek során különböző időpontban izolált preimplantációs stádiumú embriókat valamint implantálódott embriókat és embrionális epiblaszt szöveteket [a gasztruláció előtti stádiumban (ERSE stádium) és a gasztruláció közepén (APE stádium)] használtunk *in vivo* mintaként. *In vitro* mintaként ESC és EpiSC sejteket használtunk fel. A szarvasmarha és sertés embriók kinyerése nem laboratóriumunkban

történt, a minták előállítását és gyűjtését Bernardo et al. cikkünk ismerteti részletesen (Bernardo et al., 2018).

Az izolált minták (embriók, embrionális szövetek, sejtvonalak) mRNS-ét izoláltuk, a mintákból cDNS-t készítettünk és qPCR kísérletekben vizsgáltuk, vagy RNS-szekvenáltuk. Az RNS-szekvenálás (FASTQ és BedGraph fájlok) adatait az NCBI GEO SuperSeries adatbázisban (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE53387>) GSE53387 számon közzeltük. Az RNS szekvenálási adatok elsődleges bioinformatikai feldolgozását és elemzését Bernardo et al. cikkünk ismerteti részletesen (Bernardo et al., 2018).

## **2.4 Mukopoliszacharidózis II-es típusa (MPS II) betegségmodellezés iPSC sejtek felhasználásával**

**Felhasznált iPSC sejtvonalak:** Az alanyok, akik a mintáikat az iPSC sejtvonalak alapításához rendelkezésre bocsátották, írásbeli beleegyező nyilatkozatot adtak. A hiPSC-vonalak létrehozása és fenntartása az Egészségügyi Tudományos Tanács (ETT) etikai engedélye alapján történt (ETT-TUKEB 834/PI/09, 8-333/2009-1018EKU; 31203/1/2014/EKU) a BioTalentum Kft kutató laboratóriumában (ETT Humán Reprodukciós Bizottság ETT/HRB 22292-1/2010-1016EHR engedélyével), zárt rendszerben (OGYI/9788-13/2015). Az iPSC sejtvonalak létrehozása és a technológia részletes módszertani ismertetése nem képezi részét a dolgozatban bemutatott eredményeknek. A dolgozatban a genetikai újraprogramozással létrehozott iPSC vonalak betegség-modellként való alkalmazása kerül bemutatásra.

**Neuronális differenciálódás:** Az iPSC sejteket neuronális progenitor sejtekké (*Neuronal Progenitor Cells*, NPC), majd agykérgi típusú neuronokká differenciáltattuk *in vitro* és jellemeztük expressziós mintázatukat. A fehérjeszintű expressziós vizsgálatokhoz immuncitokémia és Western Blot analízis használtunk, a génexpressziós vizsgálatokat qPCR-el végeztük. A morfológiai változásokat konfokális mikroszkópia és elektronmikroszkópia módszerével vizsgáltuk.

## **2.5 Össejtekből differenciáltatott 3D neurosferoidok toxikológia alkalmazása**

A kísérletekben a Ctrl-2 jelzésű humán iPSC vonalat használtuk, amely a Biotalentum Kft laboratóriumában került előállításra korábban. Az iPSC sejtek neuronális indukcióját követően NPC sejteket hoztunk létre.



Az NPC sejtek szuszpenziós tenyésztésben, 96-lyukú tenyésztőedényben 3D szferoidokat formáltak amelyek a neuronális differenciálódást utánozva *in vitro* szövetszerű differenciációt mutattak, amelyeket a toxicitás vizsgálatokhoz használtunk fel.

**Toxicitási kezelések és ATP életképességi vizsgálat:** Tizenegy ismert toxicitási profilú vegyületet teszteltünk 7 különböző koncentrációban. A legmagasabb dózist a vegyületek oldhatósága alapján határoztuk meg. Minden mintából négy technikai ismétlést alkalmaztunk, és három biológiai ismétléses vizsgálatot végeztünk (n=3). A 3D sejt kultúrákat 72 órán keresztül kezeltük (expozíciós idő) a vizsgált anyagokkal, a vivőanyag kontroll (*vehicle*) 0,1% DMSO-val kiegészített normál tápoldat volt. ATP-életképességi vizsgálatot végeztünk a kezelést követően 3D szövettenyészetekre optimalizált KIT használatával. A lumineszcencia jelet lemezolvasóval rögzítettük. Az EC<sub>10</sub> és EC<sub>50</sub> hatásos koncentráció értékek meghatározásához négy paraméteres görbeillesztési módszert alkalmaztunk, és egyirányú ANOVA tesztet használtunk.

### 3 EREDMÉNYEK

#### 3.1 Embrionális őssejtvonalak alapítása genetikai újraprogramozással létrehozott egér embriókból

Az első célkitűzésem a különböző NT módszerek és sejtmagdonor sejt típusok összehasonlítása során a sejtmagátültetéssel (NT) létrehozott embriókból történő pluripotens őssejtvonalak (PSC) előállításának vizsgálata volt.

**Embrionális őssejtvonalak alapítása *zona pellucida*-mentes sejtmagátültetéssel (ZF-NT) létrehozott egér embriókból.** Elsőként az embriók osztódásban gátolt tápláló sejtrétegre (MEF) való letapadási képességét hasonlítottam össze (1. táblázat). Az NT-embriókban megfigyelt viszonylag kis méretű ICM-ek miatt az ESC-vonalak létrehozása során az ICM-csomók módosított mechanikai izolálása sikeresebb volt, mint az enzimikus izolálás. A legsikeresebb ESC alapítás a fertilizált csoportban tapasztaltam (35,4%), szemben az alacsonyabb parthenogenetikus (PGA) (1,3%) és a sejtmagátültetéssel előállított ZF-NT (5,3%) csoporttal.

**1. táblázat:** ESC-vonalak létrehozása ZF-NT módszerrel előállított embriókból

Hólyagsíra embrió típusa	Embriók száma (n)	Letapadt embriók (%)	Izolált ICM (%)	ESC-vonalak (%)
ZF-fertilizált embrió	48	42 (87,5) <sup>a</sup>	41 (85,4) <sup>a</sup>	17 (35,4) <sup>a</sup>
ZF-PGA embrió	307	159 (51,8) <sup>b</sup>	94 (30,6) <sup>b</sup>	4 (1,3) <sup>b</sup>
ZF-NT embrió	209	112 (53,6) <sup>b</sup>	84 (40,2) <sup>b</sup>	11 (5,3) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> statisztikailag szignifikáns különbség oszlopon belül ( $p < 0,05$ ). ZF, *zona pellucida* mentes embrió; PGA, partenogenetikus.

**Embrionális őssejtvonalak alapítása piezoelektromos sejtmagátültetéssel (PEM-NT) létrehozott egér embriókból.** A sejtmagátültetéssel előállított embriók letapadási és az ESC kolóniák megjelenési aránya e módszernél is elmaradt a fertilizációval létrehozott embrió csoporttól (53,8% vs 83,3% és 62,5% vs 15,4%). Az NT csoportban jellemzően ESC-szerű és differenciált sejtek vegyes populációi jelentek meg (2. táblázat). Ugyanakkor a PEM-NT sejtvonalak aránya összevetve a ZF-NT sejtvonalak arányával (15,4% vs 5,3%), szignifikánsan magasabb volt.

**2. táblázat:** ESC-vonalak létrehozása PEM-NT módszerrel előállított embriókból

Hólyagsíra embrió típusa	Embriók száma (n)	Letapadt embriók (%)	Izolált ICM (%)	ESC-vonalak (%)
Fertilizált kontroll <i>zona pellucida</i> -intakt	24	20 (83,3)	18 (75,0)	15 (62,5)
PGA embrió <i>zona pellucida</i> intakt	53	27 (50,9) <sup>a</sup>	27 (50,9) <sup>a</sup>	17 (32,1) <sup>a</sup>
PEM-NT embrió	26	14 (53,8) <sup>a</sup>	14 (53,8) <sup>a</sup>	4 (15,4) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> statisztikailag szignifikáns különbség egy oszlopon belül ( $p < 0,05$ ). PGA, partenogenetikus; PEM, piezoelektromos sejtmagátültetési eljárás.

**A sejtmagdonor sejtípus hatása a ZF-NT embriókból történő ESC alapításra.** Különböző sejtmagdonor sejtípusokat ESC, MEF és friss kumuluszsejtek hasonlítottam össze. Az ESC és a kumulusz sejtmagdonor sejtekből származó NT embriók szignifikánsan jobb eredményt produkáltak (20,6% és 28,6%), mint a MEF donorsejtek (1,2%) a sejtvonal alapítási kísérletekben. Az embriók letapadási aránya jelentősen különbözött a három sejtmagdonor csoport között (3. táblázat).

**3. táblázat:** A sejtmagdonor sejtípus hatása a ZF-NT embriókból történő ESC vonalak létrehozásának hatékonyságára

Sejtmagdonor sejt típusa	Embriók száma (n)	Letapadt embriók (%)	Iszolált ICM (%)	Sejtvonalak száma (%)
HM1 ESC sejt	34	26 (76,5)	23 (67,6)	7 (20,6)
egér MEF sejt	168	80 (47,6) <sup>a</sup>	56 (33,3) <sup>a</sup>	2 (1,2) <sup>a</sup>
friss kumulusz sejt	7	6 (85,7) <sup>b</sup>	5 (71,4)	2 (28,6)

<sup>a,b</sup> statisztikailag szignifikáns különbség egy oszlopon belül ( $p < 0,05$ ).

### A létrehozott ESC-vonalak pluripotenciájának elsődleges vizsgálata.

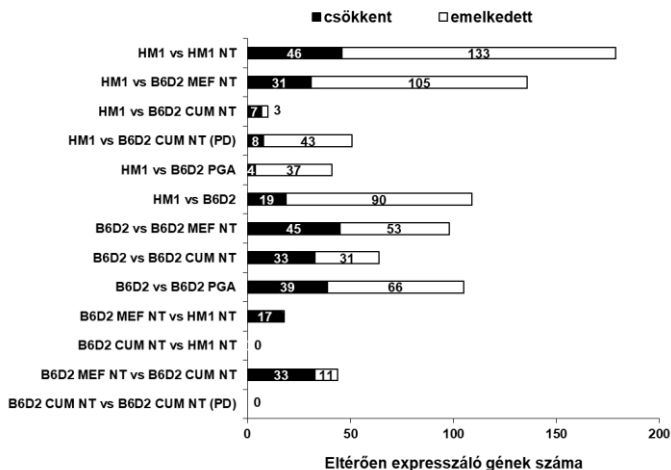
Vizsgálataimban az összes létrehozott ntESC sejtvonal (4 ZF-NT és 11 PEM-NT sejtvonal), pozitív expressziót mutatott a fő pluripotencia markerekre (POU5F1, NANOG, SSEA1) az immuncitokémiai, valamint az alkalikus foszfatáz (ALP) enzim aktivitás vizsgálatokban. E tekintetben nem volt szignifikáns eltérést a sejtvonalak között. A spontán differenciációs képességüket függőcsepp módszerrel összehasonlítva, az ntESC-ből származó aggregált sejtek szabályos és hasonló embriótest (*Embryoid body*, EB) morfológiát mutattak, nem figyeltem meg különbséget, sem a donorsejtek szerint, sem a kontroll és ntESC-k között. Az EB-k szuszpenziós kultúrába történő átvitele és további 4 napig tartó tenyésztése után egyszerű aggregátumok (*simple embryoid bodies*, SEB) alakultak ki, majd további 7-10 napos szuszpenziós tenyésztést követően az ntESC vonalak képesek voltak ún. cisztikus EB-eket (*cystic embryoid bodies*, CEB) is képezni. Az eredmények azt jelzik, hogy az összes létrehozott sejtvonal képes különböző szövetekké differenciálódni *in vitro*, amely pluripotenciájuk bizonyítéka.

### 3.2 A létrehozott egér ntESC-vonalak pluripotenciájának komplex vizsgálata

A két különböző sejtmagátültetési technikával, különböző genotípusokból, és különböző sejtmagdonor sejtek felhasználásával létrehozott NT sejtvonalak pluripotencia tulajdonságait kvantitatív módszerekkel fehérje expressziós (FACS, karyotípus) és génexpressziós szinten is összehasonlítottam. A vizsgálatok eredményeit összegezve az alábbi megfigyeléseket tettem:

- az egyes pluripotencia markerek expressziójának kvantitatív, fehérje szintű összehasonlítása nem mutatott szignifikáns eltérést a sejtvonalak között.

- Az egyes genotípusok (129Ola és B6D2) mutatták a legnagyobb eltérést.
- Többszörös jelölést végezve (kettős és hármas immunjelölés), a sejtek 60-80% közötti arányban mutattak pozitivitást minden markerre, több különböző expressziót mutató szubpopuláció is detektálható volt egy-egy sejtvonalonban.
- A különbségek azonban itt is az egyes genotípusok, semmint a sejtmagdonor sejtek között voltak megfigyelhetők.
- A növekedési hatékonyság vizsgálat nem eredményezett szignifikáns eltérést.
- A FISH analízis és kariotípus vizsgálat nem azonosított a sejtmagtranszfer folyamatához kapcsolható elváltozást.
- A macroarray génexpressziós vizsgálat (TaqMan® Mouse Stem Cell Pluripotency Array) szignifikáns különbségeket mutatott ki az azonos genotípusú sejtvonalak között (pl. B6D2 sejtvonalak), azonban a különböző genotípusok (129Ola és B6D2) között még jelentősebb eltérések voltak megfigyelhetőek, mint genotípuson belül, vagy a különböző sejtmagdonor sejtvonalak között.
- A microarray 13 minta összehasonlításából 11-ben mutatott ki szignifikánsan eltérő szinten expresszálo géneket A génexpressziós szintek változásait mindkét genetikai háttér sejtmagátültetéssel létrehozott és nem sejtmagátültetéssel előállított sejtvonalai között azonosíthatóak voltak (1 ábra), a sejtmagdonor sejtjei típusa szerint is. Az eredmények qPCR validálása megerősítette ezen eredményeket.
- Az eltérően expresszálo gének csoportjának (171 gén) az egér ntESC vonalakon végzett korábbi vizsgálatokból származó adatsorokkal való összevetése csupán 3 génegyezést mutatott.
- Az összehasonlítást más fajok ntESC sejtjeire és egér, szarvasmarha, sertés NT embriók adataira kiterjesztve, az eltérően expresszálo gének közös halmazát eredményezte: kötőfehérjék, extracelluláris mátrix fehérjék, ABC-transzporterek, translációs iniciátorok, Slc-transzporterek, riboszómális fehérjék, prokollagének, néhány hőszokkfehérje gén és citokeratinok voltak érintettek.
- Összességében, a vizsgált génszámokat figyelembe véve csekély átfedés volt kimutatható a saját adataink és a más adatsorokban vagy egér ntESC vagy egér NT embriókban eltérően expresszálo génként azonosított gének listái között. A sejtmagátültetéssel létrehozott embriók eltérően expresszálo génjeinek listája között nagyobb volt a hasonlóság a fajon belül vagy a fajok között, és az érintett gének száma is magasabb volt.

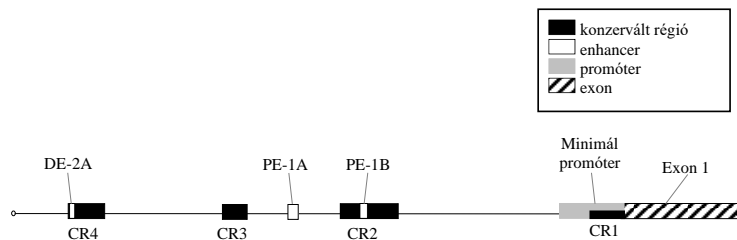


**1. ábra:** Az eltérően expresszálo gének száma a különböző ESC-vonalak páronkénti összehasonlításában (*saját ábra*).

### 3.3 A pluripotencia kialakításában szerepet játszó *POU5F1* szabályozó régió vizsgálata nyúlban

A nyúl *Pou5f1* gént tartalmazó BAC klón azonosítása és szekvencia analízisét követően a gén szabályozó, ún. upstream, a gén promóterét tartalmazó régióját elemeztem és hasonlítottam össze más fajok szekvenciáival. Azonosítottam négy ún. konzervált régiót (CR1-4) és három enhancer régiót. Ezek a CR régiók számos fajban ismertek, nagyfokú azonosságot mutattak az emberi, szarvasmarha, kutya és eger szekvenciákkal. Azonosítottam a nyúlban a TATA-box nélküli minimál promótert (MP), amely a CR1 régióban helyezkedik el és tartalmazza mind az Sp1/Sp3 átfedő kötőhelyeit mind a hormonreszponzív (HRE) elemet és három G/C gazdag régiót. Azonosítottam továbbá a proximális enhancer régiót (PE) amely két részre tagolódik és két konzervatív régiót is átfed: a PE-1B a CR2 régióban található, a PE-1A a CR2 régió kívül helyezkedik el. A CR3 régió a PE-1A szekvenciától upstream lokalizálódik. Azonosítottam a disztális enhancer régiót (DE-2A) amely a CR4 régióban található. A POU5F1/SOX2 transzkripció faktor (TF) kötőhely a disztális enhancerben, a CR4 régió belül található. Több G/C-gazdag motívum is azonosításra került, amelyek mind az öt összehasonlításként használt emlős szekvenciában jelen vannak; azonban a PE-1A enhancer közelében egy CCCACCC motívumot

detektáltam, amely csak a nyúlban van jelen. Ez a motívum részben átfedi a CCCTCCCC szekvenciát. A nyúl POU5F1 promóter régió szerveződésének sematikus rajza a 2. ábrán látható.



**2. ábra:** A nyúl POU5F1 gén promóter régiójának szerveződése sematikus ábrán (fragment mérete: 2641 bp). CR, konzervált régió; P, proximális; D, disztális; E, enhancer (saját ábra).

A nyúl és négy másik emlős *POU5F1* szabályozó régiójának páros összehasonlítása megmutatta, hogy az ember rendelkezik a nyúl *POU5F1* szabályozó régiójának legközelebbi potenciális evolúciós ortológjával. Ezt támasztja alá a nyúl és az ember között megfigyelhető legmagasabb homológia mind a négy konzervált régióban, valamint a PE-1B és DE-2A enhancerekben.

**A promóter régiók funkcionális elemzése.** Négy különböző riporterkonstrukciót egér ESC sejtekbe elektroporálva teszteltem a promóter szekvencia funkcionalitását. A kísérletek a következő eredményekre vezettek:

- a nyúl POU5F1 CR1 szabályozó régiója képes egér ESC sejtekben minimál promóterként kifejeződni;
- a CR2+CR3 régiók jelenléte nem növelte jelentősen az expresszió szintjét a CR1 fragmenthez képest;
- a CR4 régiót a minimál promóterrel (CR1) együtt az expresszió szintjét több mint megkétszerezte;
- a teljes promóter régió [CR1+(CR2 és CR3)+CR4] szintén magas expressziót eredményezett;
- összehasonlítva az egér POU5F1 minimál promótert (CR1) és disztális enhancert (CR4) tartalmazó konstrukcióval (Oct4-GiP), azok hasonló expressziós intenzitást mutattak.

POU5F1 expressziót preimplantációs stádiumú embriókban qPCR módszerrel elemezve, az mRNS minden vizsgált stádiumban, de

különböző intenzitással volt kimutatható az embriókban. Ezen túl, mind az izolált ICM és trofoblaszt mintákban is kimutatható volt, azonban expressziója szignifikánsan magasabb volt ( $p < 0,05$ ) az ICM-ben, mint a trofoblaszt sejtekben.

A szekvencia vizsgálatok során egy ún. pszeudogén is azonosításra került, amelyekből az intronok hiányoztak, de közvetlen ismétlődésekkel szegélyezett polyA farkok maradványokat tartalmaznak, amelyek mind a retrotranszpozált pszeudogének jellemzői. A POU5F1 gén cDNS-e és pszeudogénje 99%-os szekvenciaazonossággal rendelkezik, a pszeudogénben a kezdeti ATG-től számított 796 bp pozícióban nyolc nukleotid deléción van, amely a szekvenciában kereteltolódást, vagyis frameshift-et okoz. Ennek eredményeként a 360 aminosav hosszú funkcionális fehérje helyett egy 162 aminosav hosszú csonka fehérjék kódol a funkcionális POU-domén nélkül, de az aminosavak szintjén még mindig 92%-os hasonlóságot mutat a kereteltolódást okozó STOP-kodonig. A pszeudogén szekvenciáját EU191070.1 referenciaszámon került publikálásra (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EU191070>).

### **3.4 Haszonállatok embrióinak összehasonlítása, új pluripotencia gének azonosítása**

**A hasonló fejlődési stádiumok azonosítása a különböző fajokban a pluripotencia markerek alapján.** A nyúlön végzet *Pou5f1* génexpressziós kísérletek ráirányították a figyelmet az egyes haszonállatok embrióinak és az embrionális stádiumban a pluripotencia gének expressziós mintázatának különbségeire. Ezért célzott vizsgálatokat végeztünk két fontos haszonállatunk, a szarvasmarha (*Bos taurus*) és sertés (*Sus scrofa*) embrióin, referenciaként az egeret használva, a pluripotens sejtpopulációk és a pluripotencia fenntartásában szerepet játszó gének vizsgálatára. Előzetes vizsgálatokkal, valamint irodalmi adatokat is felhasználva *in situ* hibridizáció módszerét alkalmazva a főbb pluripotencia és fejlődési stádium-specifikus fehérjék használatával meghatároztuk azon ICM, ERSE és APE fejlődési stádiumok időpontját, amelyek a különböző fajok között egymásnak megfeleltethetők, egyenértékű embrionális stádiumokat jelölnek. A stádiumokat immuncitokémia és qPCR eljárással validáltuk vissza az izolált mintákból.

**Génexpressziós összehasonlító vizsgálatok számos gén konzervált expresszióját tárták fel a haszonállatok embrióiban.** A feltérképezett és meghatározott embrionális stádiumokból (ICM, ERSE és APE) mintákat gyűjtöttünk, RNS-t izoláltunk és génexpressziós összehasonlító

vizsgálatokat végeztünk RNS szekvenálással a 3 fajban (egér, szarvasmarha, sertés). Az eredményeink azt mutatták, hogy egy jól definiálható kis csoportja a géneknek az, amely a fajok között eltérést mutat az egyes fejlődési stádiumok közötti átmenet, így az ICM-ERSE és az ERSE-APE átmenet során, és eltérően expresszáló génként azonosítható. Az ICM-ERSE átmenet során 26 gént azonosítottunk, amelynek expressziója csökkenést mutatott, továbbá 47 megemelkedett expressziót mutató, mindhárom fajban azonos módon expresszáló gént azonosítottunk. Az ERSE-APE összehasonlításban csökkent expressziót mutató gént nem, azonban két megnövekedett expressziót mutató gént azonosítottunk a 3 faj között.

**Az *in vivo* és *in vitro* transzkripciós mintázatok összehasonlítása új, stádium-specifikus pluripotencia-asszociált géneket tárt fel.** Számos, fejlődés szempontjából fontos gén konzerválódott az evolúció során, így összehasonlítottuk *in vivo* embrió RNS-szekvenálási adathalmazunkat *in vitro* egér ESCs és egér EpiSCs esetében publikált adatokkal. A három faj mintáinak felhasználásával végzett elemzés a fejlődési állapot szerint összehasonlítva, egyértelműen megmutatta, hogy míg az ERSE/APE stádiumú embriók jól csoportosulnak a késői epiblasztból származó őssejtekkel (mEpiSC), az ICM stádiumú embriók nem csoportosulnak az ICM-ből származó őssejtek (2i-mESC vagy szérum-mESC) egyikével sem, bár közelebb állnak a 2i-mESC sejtekhez. Ezek az elemzések együttesen azt mutatták, hogy az ICM és az ICM-ből származó sejtvonalak közötti különbségek ellenére az *in vivo* korai és késői epiblaszt közötti átmenet *in vitro* is beazonosítható és ennek a háttérben a gének egy kis csoportja állhat.

**Az újonnan azonosított gének *in vivo* expressziójának validálása embriókban.** Valószínűsíthető, hogy azok a gének, amelyek mind *in vitro* (egér pluripotens sejtekben), mind *in vivo* (a három faj embrióiban) jelentős expressziós változásokat mutatnak, fontos konzervált szerepet játszhatnak a pluripotencia génexpressziós szintű szabályozásában. Annak validálására, hogy ezek a gének valóban kifejeződnek-e *in vivo*, kiválasztottunk egy sor gént, amelyek vagy a naiv/ICM állapothoz (*Klf4*, *Gjb5*, *Spic*, *Scpep1* és *Psap*), vagy a primed/ERSE/APE állapothoz (*Trip6*, *Dusp6*, *Jakmip2*, *Lin28b*) kapcsolódnak. Bevontuk továbbá a *Sema6A* gént, amely a 2i-mESC-mEpiSC átmenetben, valamint az ICM-ERSE átmenetben a szarvasmarhában és a sertésben is emelkedett expressziót mutatott.

Először összehasonlítottuk ezen gének kifejeződését az embrionális szövetekben, a három faj ICM, ERSE és APE stádiumú embrió mintáit



qPCR analízissal, majd immuncitokémiával. Az egér-, szarvasmarha- és sertésembriók qPCR-analízise megmutatta, hogy a *Spic*, *Gjb5*, *Scpep1* és *Psap* expressziós szintje szignifikánsan magasabb volt az ICM stádiumú embriókban, mint az ERSE vagy APE stádiumú embriókban. Az ellentétes tendencia, azaz az ERSE és APE mintákban való magasabb expresszió a *Trip6*, *Dusp6*, *Lin28b*, *Jakmip2* és *Sema6a* expresszió esetében is megerősítést nyert. A fehérje szintű immuncitokémiai embrió vizsgálatok megerősítették az eredményeket.

**Az újonnan azonosított gének a naiv/primed pluripotens állapot előrejelzőjeként használhatók.** A következő kérdésünk az volt, hogy ezek a gének felhasználhatók-e a naiv/primed pluripotens állapot megkülönböztetésére, vagyis jelzőgénként használhatóak-e. Valós idejű qPCR-t végeztünk mESCs és mEpiSCs, valamint további embrió eredetű őssejtvonalakban, azaz trofoblaszt (mTSCs) és primitív endoderma (mXENCs) őssejtekben. Az előrejelzésnek megfelelően a *Klf4*, a *Gjb5*, a *Scpep1* és a *Psap* szignifikánsan magasabb szinten fejeződött ki az mESCs, mint az mEpiSC sejtekben és így a **naiv állapot jelzőinek** tekinthetők. Érdekes módon a *Spic* volt az egyetlen olyan gén, amelynek expressziója a 2i-mESC sejtekre korlátozódott, így ez **az alapállapot új markere**. Ezzel szemben a *Lin28b*, a *Sema6a*, a *Jakmip2* és a *Car14* a mEpiSC sejtekben erősebben kifejeződött az mESC sejtekhez képest. A *Dusp6* expressziója emelkedett volt a szérum-mESC esetében és erőteljes expressziót mutatott az mEpiSC sejtekben is. Ezért ezeknek a **géneknek az alacsony expressziója az alapállapot jellemzőjének** tekinthető. Végül a *Trip6* expressziója minden őssejtben kimutatható volt, expressziója alig emelkedett, amely eredményeket *in vitro* őssejtekben immunfestéssel is megerősítettünk.

Összefoglalva elmondható, hogy a naiv és primed pluripotens sejteken végzett gén- és fehérje expressziós vizsgálatok igazolták az újonnan azonosított, pluripotencia-asszociált gének stádium-specifitását és alkalmasak a pluripotens állapot differenciálására.

### 3.5 iPSC sejtek alkalmazása betegségmodellelésben

Az iPSC sejtvonalak neuronális differenciálódási képességének igazolása a különböző differenciálódási stádiumokban génexpressziós (qPCR) és fehérje szinten (immuncitokémiai) történt. Az eredmények megmutatták, hogy minden sejtvonalból sikeresen differenciálódtak NPC sejtek, amelyek 5 hét alatt érett neuronokká, asztrogliá és oligodendroglia sejtekké fejlődtek mind az egészséges, mind a beteg sejtek esetén.

A vizsgált betegségre jellemző, az IDS enzimhiány kiváltotta glikozaminoglikánok (GAG) progresszív felhalmozódása a neuronális tenyészetekben detektálható volt. Azonban az NPC-kultúrák alacsonyabb teljes GAG-szintet mutattak ( $p < 0,05$ ) a kontrollokhöz képest. A lizoszóma-asszociált membrán glikoprotein 2 (LAMP2) immunfestéssel a lizoszómák felhalmozódása minden betegből származó neutrontenyészetben kimutatható volt. Sejt-típus-specifikus különbség is detektálható volt: az MPS II TD35 mintákban a GFAP+ asztrocitákban sokkal több LAMP2+ vakuólum volt, mint a MAP2+ neuronokban. A LAMP2 mennyiségét számszerűsítő Western-blot analízis az MPS II NPC-kben fokozott LAMP2-expressziót mutatott ki. A tároló vakuolumok felhalmozódását ultrastrukturális szinten elektronmikroszkópos vizsgálatokkal is igazolást nyert, és minden típusuk kimutatható volt. Emellett számos durva felszíni endoplazmatikus retikulum (RER), illetve Golgi morfológiai elváltozás is detektálásra került. Az eredményeket a TFEB (Transcription Factor EB) expressziójának és szubcelluláris lokalizációjának az MPS II sejtekben detektált fokozott sejt-magi lokalizációja is igazolta.

Az ER-stressz és autofágia aktiváció szerepét az MPS II fenotípusban a kontrollhoz képest megnövekedett XBP1(S) szint igazolta, a kalretikulín (CALR) expressziós szintjének egyidejű emelkedésével. Ugyanakkor a Western-blot kísérletekben differenciálsági stádiummal LC3-I/LC3-II arány eltérés volt kimutatható az MPS II-vel érintett sejt-kultúrákban.

### **3.6 Óssejt alapú 3D neuroszferoidok toxikológia alkalmazása**

Az iPSC eredetű NPC sejtek szuszpenziós kultúrában szabadon lebegő 3D neuroszferoidokká differenciáltatva dinamikus növekedését mutattak, míg az átmérő lineárisan nőtt, a fehérjetartalom a 4. hét után dinamikusabban emelkedett, ami hasonlít az *in vivo* differenciálódás során bekövetkező sejt- és szövetszintű változásokra. A génextpresszió heti vizsgálata a neuronális differenciálódás folyamatos előrehaladását és az érési markerek szintjének növekedését mutatta. A terminális differenciálódás neuronhálózatok és szinapszisok kialakulását eredményezte, valamint a neuronális altípusok (glutamaterg, GABAerg, kolinerg és dopaminerg neuronok), asztrogliá és oligodendroglia sejtek megjelenését, amely génextpressziós (qPCR) mind pedig fehérje expressziós (immuncitokémia) szinten igazolható volt. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a 3D neuroszferoid rendszer komplex neuronális sejt-kultúrát biztosít, amely a korai neuronális differenciálódás modelljeként szolgálhat.

**A 3D neuroszferoidok neurotoxiciási modellként való alkalmazása.** Tizenegy jól ismert hatású vegyületet (gyógyszerek, peszticidek és vegyi anyagok) kiválasztva, 7 különböző koncentrációban, akut (72 órás) expozícióval alkalmazva a szferoidokon D21, D28 vagy D42 stádiumban, koncentráció-válasz görbéket vettünk fel. A kísérletekben a különböző vegyületek koncentrációfüggő módon különböző mértékű citotoxicitást idéztek elő a 3D neuroszferoid kultúrákban. Az eredmények alapján a vizsgált anyagok koncentrációfüggő rangsorát lehetett felállítani az egyes differenciálódási szakaszokra.

**A 3D neuroszferoidok kezelése vegyület-specifikus választ eredményez sejt szinten.** Az ATP-alapú életképességi vizsgálat képes kimutatni a sejthalált, de nem alkalmas más specifikus sejt szintű események kimutatására. A 3D szövetekre validált tesztek hiánya miatt szubcelluláris szinten vizsgáltam a Rotenon (ROT) neurotoxikus vegyület hatását, amelyről ismert, hogy beavatkozik a mitokondriumokban lévő elektrontranszportláncba. Az eredmények azt mutatták, hogy a ROT szignifikánsan növelte a szferoidokban bekövetkező sejtpusztulást a kontrollhoz képest (TUNEL assay), összhangban az ATP-mérés eredményeivel. Az ultrastrukturális vizsgálat a mitokondriumok belső membrán redőzöttségében is változást mutatott: mind az alak, mind a komplexitás megváltozott a ROT-kezelt mintákban a kontrollokhoz képest. Összefoglalva elmondható, hogy a toxikus vegyületről ismert specifikus hatás volt kimutatható sejt szinten a 3D neuroszferoidokon, amely igazolja az őssejt alapú 3D sejtenyészetek érzékenységét és specifikusságát.

## 4 KÖVETKEZTETÉSEK

### 4.1 Embrionális őssejtvonalak létrehozása és jellemzése genetikailag újraprogramozott embriókból

Vizsgálataim célja a különböző sejtmagátültetési módszerrel előállított embriók őssejtek előállítására való alkalmazhatóságának, hatékonyságának és az előállított sejtvonalak őssejt tulajdonságainak értékelése volt. A sejtmagátültetési újraprogramozás (vagy a médiában elterjedt néven *klónozás*) ún. *zona pellucida*-mentes (ZF-NT) alternatív technikáját sikeresen alkalmazták korábban élő utódok előállítására. Vizsgálataimban a jobban elterjedt és több fajon is publikált piezoelektromos sejtmagátültetéssel (PEM) hasonlítottam össze annak érdekében, hogy meghatározzam a *zona pellucida*-mentes (ZF)

módszerrel létrehozott hólyagsíra stádiumú embriók pluripotens összejt létrehozási potenciálját.

A létrehozott ESC sejtvonalak teljes számát összehasonlítva jelentős különbség volt megfigyelhető a PEM és a *zona pellucida*-mentes NT-módszer között. A megfigyelt különbségek a sejtmagdonor sejtek típusának, és nem magának az NT-módszernek a hatására vezethetők vissza, mivel a PEM-NT kísérletekben csak kumulusz sejteket használtunk sejtmagdonor sejtneként, a ZF-NT kísérleteknél pedig három különböző sejtípust (kumulusz, embrionális fibroblaszt és embrionális összejt) amelyek hatékonysága sejtípusonként eltért.

Eredményeim szerint a ZF-NT hólyagsíra embriókból változó hatékonysággal (1,2%–28,6%) lehet ntESC sejtvonalakot létrehozni, és ez a folyamat szoros összefüggést mutat a sejtmagátültetés során használt sejtmagdonor sejtípussal. A kumulusz és ESC sejtmagdonor sejtekből származó ntESC sejtvonalak létrehozásának hatékonysága sokkal magasabb volt (28,6%, illetve 20,6%), mint a MEF sejtmagdonor sejteké (1,2%). Ez a HMI ESC és kumuluszsejtek sejtmagtranszfert követő jobb átprogramozásának köszönhető, amely a magzati eredetű fibroblaszt sejtekhez (MEF) képest hatékonyabban támogatja a későbbi összejt létrehozását. Eredményeimmel összhangban egy korábbi tanulmány az ntESC létrehozásának donor sejtípusában szignifikánsan jobb arányról számolt be, amikor frissen izolált kumulusz sejteket használtak donor sejtmagként, mint amikor felnőtt egyedekből izolált tenyésztett fibroblasztokat. Vizsgálataim megerősítik ezeket az eredményeket egy eltérő eredetű fibroblaszt (MEF) és egy eltérő sejtmagátültetési technika (ZF-NT) alkalmazásával.

A létrehozott ntESC sejtvonalak (4 ZF-NT és 11 PEM-NT sejtvonala) elsődleges jellemzése (fő ESC pluripotencia markerek expressziója, spontán, valamint szívizom és neurális differenciáltatás) nem eredményezett szignifikáns eltéréseket a vizsgált vonalak között, az ntESC vonalak nagyon hasonlóak voltak a hagyományos, fertilizált embriókból létrehozott ESC sejtvonalakhoz, amely összecseng mások PEM-NT módszerrel előállított embriókból alapított ESC vonalak vizsgálati eredményeivel.

Összefoglalva eredményeimet elmondható, hogy célkitűzésemnek megfelelően sikeresen hoztam létre ntESC sejtvonalakot sejtmagátültetéses újraprogramozással előállított egér hólyagsíra embriókból. Kimutattam, hogy az NT embriók sejtmagdonor sejtípusa befolyásolta az ntESC létrehozásának hatékonyságát. Bizonyítottam, hogy pluripotenciájuk nem tér el a fertilizált embriókból létrehozott ESC

vonalktól spontán differenciációs modellben. Tanulmányom volt az első, amely bizonyította, hogy a szomatikus és embrionális egér sejtek sejtmagjából zónamentes sejtmagátültetési (ZF-NT) technikával szövettanilag kompatibilis ntESC sejtvonalak nyerhetők, amelyek modellként szolgálhatnak a regeneratív gyógyászat számára.

## **4.2 Az ntESC vonalak pluripotenciájának részletes vizsgálata**

A pluripotenciáért illetve annak fenntartásáért felelős transzkripciós szabályozó rendszer pontos kifejeződése alapvető fontosságú az ESC sejtek megújulásának és differenciálódási potenciáljuk fenntartása szempontjából. Kísérleteimben nem figyeltem meg jelentős különbségeket a kontroll és az ntESC sejtvonalak között a fő szabályozó fehérjék tekintetében. Azonban a kumulusz- és MEF-sejtekből származó B6D2 ntESC és néhány esetben a B6D2 kontroll ESC jelentős különbségeket mutatott a HM1 kontrollhoz képest (129Ola genotípus) az áramlási citometriás vizsgálatokban. Továbbá a B6D2 háttérű ntESC sejtvonalak, függetlenül a sejtmagdonor sejt típusától, több összehasonlításban is jelentősen különbözött a HM1 NT-től. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a megfigyelt változások inkább az ntESC genetikai háttérével (B6D2 vs 129Ola), mint a felhasznált sejtmagdonor sejt típusával korrelálhatnak.

Amikor a sejtvonalkat tovább elemeztük egy következő tanulmányban az ún. iTRAQ proteom analízis módszerével (LC-MS/MS elemzés nanofolyadékromatográfiás rendszerrel) 1650 fehérjét kvantifikáltunk a sejtvonalak összehasonlításakor. Az elemzés megmutatta, hogy igen csekély a különbség, csupán 44 fehérjében találtunk eltérést a fertilizált egér embriókból létrehozott ESC sejtvonalak és sejtmagátültetési ESC vonalak között (Frölich et al., 2013). Ezek az eredmények igazolják korábbi megfigyeléseimet, amelyet további független vizsgálatok is alátámasztanak.

Az ESC sejtek sejtciklusa eltér a szomatikus sejtektől, rövid G1-fázis és hosszabb S-fázis jellemzi. Ez az egyedi sejtciklus-mintázat és a sejtciklus-szabályozás háttérében álló mechanizmusok arra utalnak, hogy a sejtciklus maga is fontos szerepet játszik az őssejt állapot fenntartásában. Tanulmányomban első alkalommal írtam le az ntESC sejtvonalak növekedési profilját. Míg a két összehasonlított genotípus enyhén különbözött, az ntESC-k között szinte nem volt különbség. Az igen hasonló profil a sejtek pluripotenciájára utal, sejtciklusuk felgyorsult, rövid sejtciklus jellemzi azokat.

**Nagy felbontású génexpressziós vizsgálatok ntESC sejtvonalakon.** A következőkben nagy felbontású transzkripciós profilalkotást (macro- és microarray) használtam az ntESC sejtvonalak és a megtermékenyített embrióból származó ESC sejtvonalak közötti génexpressziós különbség meghatározására. A vizsgálatok különbségeket mutattak ki az ntESC sejtvonalak és a referencia ESC (HM1) sejtvonal között. Más fajok és NT módszerek esetén az expressziós profilelemzés eredményei a különböző genetikai hátterek között szembetűnőbb különbségeket jelezhetnek, mint az NT-folyamat (PEM vagy ZF-NT). Megfigyelhető volt azonban, hogy a két genotípus (HM1 és B6D2) között mindkét genetikai háttérből származó NT folyamatot követően csökkent az eltérően expresszált gének száma (B6D2 MEF NT vs HM1 NT és B6D2 CUM NT vs HM1 NT), amely a genetikai újraprogramozás során bekövetkező epigenetikai változások fontosságára utal.

Összehasonlítva a szignifikánsan eltérő expressziót mutató géneket (171 gén) az egér ntESC vonalokról korábban publikált tanulmányokkal, és más fajokon publikált adatokkal nagyon kevés egyezés volt kimutatható. Kiszélesítve az elemzést a különböző fajok sejtmagátültetéssel létrehozott embrióin publikált adatsorokkal számos eltérően expresszált gént azonosítottam, amely a kötőfehérjék, a translációt indító fehérjék és a riboszómális fehérjék szerepét támasztotta alá, amelyek az NT során megváltozhatnak. Korábban publikált tanulmányok azt jelezték, hogy az NT-eljárás számos gén eltérő expresszióját eredményezheti NT-embriókban, ez azonban úgy tűnik, hogy az NT-embrióból származó ntESC sejtvonalak esetén lecsökken, amire a saját vizsgálataimból is következtetni lehet. Úgy tűnik tehát, hogy az egér sejtmagátültetés esetén az embriók megváltozott génexpressziós profilja erősen függ a felhasznált donorsejt típusától, ami az ntESC sejtvonalak esetében is megfigyelhető, de kisebb mértékben. Ez a jelenség azt mutatja, hogy az ntESCs teljes nukleáris átprogramozáson ment keresztül, és a különbségek csökkenhetnek, vagy akár el is tűnhetnek, ha az ntESCs és a megtermékenyített embrióból származó társaik közötti összehasonlítást nézzük. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az ntESC sejtvonalak olyan NT embriókból származhatnak, amelyekben a nukleáris átprogramozás sikerebb volt. Más szavakkal: lehet, hogy csak az embrionális fejlődés szempontjából kompetens NT embriók, amelyek "teljesebb" epigenetikai átprogramozáson mentek keresztül, lehetnek alkalmasak az ESC sejtvonalak létrehozásához. Ez a feltételezés fontos szempont az ntESC sejtek terápiás vagy fenotípus modellezésben való alkalmazásához.

### 4.3 Nyúl *Pou5fl* gén regulátor régió vizsgálata

**A nyúl *Pou5fl* promóter szekvencia nagyfokú hasonlóságot mutat humán ortológjával, erős domén konzerváció mellett.** Publikációm volt az első tanulmány, amely leírta a nyúl *Pou5fl* gén teljes szabályozó régiójának izolálását és elemzését. Kísérleteimben izoláltam a nyúl *Pou5fl* cDNS szekvenciáját, és elemeztem az expressziós mintázatot preimplantációs stádiumú nyúl embriókban. Ezenkívül azonosításra került egy pszeudogén, amely nagyfokú hasonlóságot mutat a teljes *Pou5fl* szekvenciával. Eredményeim megmutatták, hogy mind a *Pou5fl* génszerkezete, mind a szekvenciája rendkívül konzervált a különböző fajok között, nyúl, egér, ember, szarvasmarha és kutya DNS szekvenciákat összehasonlítva, amely igazolja rendkívül konzervált szerepét a korai gerincesek egyedfejlődésében.

Összehasonlítva a nyúl *Pou5fl* szekvencia 2,2 kb méretű 5' szabályozó régióját a humán, szarvasmarha, egér és kutya szekvenciáival, az összes funkcionálisan fontos régió nagy pontossággal meghatározható volt a transzkripció starthelytől upstream szakaszon. E mellett újonnan azonosítottam egy CCC(A/T)CCC motívumok, amely csak a nyúlban volt megtalálható és, jelentősége lehet a *Pou5fl* génszabályozás emlős fajokban tapasztalható különbségeinek vizsgálatakor. Elemzésem során kimutattam, hogy a vizsgált fajok közül a nyúl és a humán *Pou5fl* szabályozó régiója rendelkezik a legnagyobb homológiával, amely funkcionális hasonlóságot jelezhet előre.

Az egér ESC-ken végzett funkcionális vizsgálataim igazolták, hogy a nyúl *Pou5fl* promóter CR4 régiója mutatta a legmagasabb expressziós szintet. Ez arra utal, hogy a nyúl CR4 promóter régiója ugyanazt a transzkripció szabályozó aktivitást biztosítja, mint az egér CR4 szekvencia az egér ESC sejtekben.

**A nyúl *Pou5Fl* ICM és trofoblaszt sejtekben is expresszál.** A qPCR kimutatta, hogy az anyai eredetű *Pou5fl* mRNS szintje magas az oocitákban és a zigótákban, amely fokozatosan csökkent a 8-16 sejtes stádiumig. Az átmenetileg csökkent transzkriptum szintek az embrionális genom aktiválását követően folyamatosan emelkedtek, amely megfelel az egér génextpressziós mintázatának. Azonban egérben az expresszió a morula stádiumot követően az ICM-re korlátozódik, a primitív ektodermában fokozódik, és végül a primordiális csírasejtekben marad fenn. Nyúl embriókon végzett kísérleteim megmutatták, hogy a *Pou5fl* mind a trofoblasztban, mind az ICM-ben mRNS-szinten kifejeződik. Szarvasmarha, sertés, rézuszmajom és humán preimplantációs stádiumú

embriókban a POU5F1 fehérje szintén mindkét sejtípusban lokalizálható, amely vélhetően az extraembrionális vonal-specifikus génextpresszió szupresszoraként működhet a preimplantációs fejlődés során, lehetővé téve a trofoblaszt kiterjedt proliferációját az implantáció előtt *in vivo*. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az expresszió térbeli mintázata a hólyagsíra stádiumban fajspecifikus. Összefoglalva eredményeimet elmondható, hogy tanulmányom a nyúl *Pou5fl* szabályozó domének első átfogó elemzését nyújtotta. Az részletes szekvenciaelemzése magas szekvencia konzerváltságot mutatott, amely a génextpresszió szabályozásának fontosságát mutatja a korai emlősök fejlődésében. Kimutattam, hogy az enhancerek legnagyobb homológiája az ember és a nyúl között azonosítható, továbbá elsőként igazoltam a trofoblasztban megjelenő *Pou5fl* expressziót. Ez növelheti a nyúl összehasonlító funkcionális genomikai eszközként való felhasználásának fontosságát az állatorvosi-, orvosi kutatásokban.

#### **4.4 Pluripotencia szabályozás háziállatok korai embrióiban**

**Konzervált gének kis csoportja különbözteti meg a korai és a késői epiblaszt stádiumokat az emlősök fejlődésében.** Az előzőekben ismertetett nyúl kísérletek jól bizonyítják, hogy a fajok közötti génextpressziós, és gén szabályozási különbségek jelentősen befolyásolják egy-egy tulajdonság kialakulását. Habár az egerben az ESC vonalak létrehozása évtizedes gyakorlat, számos fajban komoly nehézségekbe ütközik a pluripotens őssejtek izolálása és fenntartása. Ezért következő vizsgálataim során további, olyan fajok embrióinak összehasonlításában vettem részt, ahol a pluripotens őssejtek előállításának nehézségekbe ütközött a vizsgálatok megkezdésekor. A választás a sertés és szarvasmarha embriókra esett, amelyeket eger embriókkal és őssejtekkel hasonlítottunk össze több megközelítéssel. Egyrészt összehasonlítottuk az eger sertés és szarvasmarha ICM, ERSE és APE stádiumban lévő, az extraembrionális szövetektől mentes embrió szövetekének transzkriptomját, amely konzervált génextpressziós mintázatok feltárására vezetett az eger és a patás fajok (*Ungulata*) között. Ezután az *in vivo* stádiumok között eltérően kifejeződő konzervált gének halmazát hasonlítottuk össze azokkal, amelyek az eger pluripotens sejtek *in vitro* naiv vagy primed állapotát jellemzik. Ez azért is fontos, mert a vizsgálatok megkezdésekor csak az egerben volt egyértelmű génextpressziós mintázat az *in vitro* naiv és primed állapothoz rendelve. Ez lehetővé tette számunkra, hogy azonosítsunk egy sor új gént, amelyek fontosak a naiv vagy a primed állapot fenntartása szempontjából, és



hozzájárulnak a két pluripotencia állapot fajok közötti eltérő szabályozásának megértéséhez.

Az egér, szarvasmarha és sertés ICM, ERSE és APE embriók összehasonlítása minden fajnál jelentős átfedést mutatott a génextpresszióban az egyes stádiumokban. Ugyanakkor csak kis számú olyan eltérően expresszálódó gént azonosítottunk, amely mindhárom fajban közös volt. Az elemzés azt is kimutatta, hogy az ICM/ERSE fejlődési átmenet a legkritikusabb, míg az ERSE és az APE stádium között végbemenő változások vagy kevésbé drámaiak, vagy kevésbé konzerváltak. Ez állhat annak háttérében, hogy - legalábbis az egérben - az ICM-ről az ERSE-re történő átmenetet egyszerre jellemzi a primitív endodermának az epiblasztból való elkülönülése és a naivból a primed pluripotenciális állapotba való átmenet. Az ilyen folyamatok emlősök közötti konzerválódását jelzi, hogy a leszabályozott, vagyis alacsony expressziót mutató, de nem teljesen elcsendesült (ICM-ERSE) gének között jelen van néhány naiv pluripotenciális gén, például a *Tfcp2l1*, *Klf4* és *Klf5*, vagy a primitív endodermában expresszálódó gének csoportja, például a *Pdgfra*, *Gata6* és *Sdc4*.

### **Új, naiv és primed pluripotenciával kapcsolatos gének azonosítása.**

Az *in vivo* adatok és az egér pluripotens őssejtvonalak expressziós adatait összehasonlítva új, a pluripotenciához kapcsolódó géneket azonosítottunk. Ezek között voltak olyan gének, amelyek expressziója feldúsult az ICM stádiumú embriókban és az egér ESC-kben, és voltak olyanok, amelyek mind az ERSE és APE stádiumú embriókban, mind az egér EpiSC sejtekben kifejeződtek. Az eltérően expresszálódó gének között a várakozásoknak megfelelően ismert pluripotenciával kapcsolatos gének, például a *Klf4* és a *Lin28b* is megtalálhatóak voltak.

Az elemzésünk által kiemelt egyéb géneket a pluripotenciával kapcsolatos génekként írták le korábban, azonban a pluripotencia kaszkádban betöltött szerepüket nem határozták meg. Ezek közé tartozik a *Dusp6*, egy olyan gén, amelynek expressziója feldúsult az ERSE/APE stádiumokban, valamint a szérum mellett tenyésztett mESCs-ben és a mEpiSCs-ben. Vizsgálataink során megmutattuk, hogy a *Dusp6* kiütésekor (*knock-down* kísérlet ESC sejtekben) a sejtek differenciálódásnak indulnak a pluripotencia kaszkádban szereplő gének expressziója lecsökken. Így a *Dusp6* a pluripotencia megőrzésében fontos szerepet tölt be. Megfigyeléseinket később mások is megerősítették őssejtek transzkriptomikai összehasonlító vizsgálatokor.

Olyan konzervált géneket is találtunk, amelyeket eddig nem hoztak összefüggésbe a pluripotenciával. A GJB5 egy ún. gap junction fehérje,

amelyről korábban kimutatták, hogy retinolsav hatására expressziója lecsökken. Ezzel szemben az SCPEP1 egy retinoid-indukálható szerin-karboxipeptidáz, amelyet először simaizomsejtekben fedeztek fel. A *Sema6a*, a *Jakmip2* és más ERSE/APE- és mEpiSC-asszociált gének fiziológiai funkciói még mindig nagyrészt ismeretlenek. Ezek az ún. primed pluripotencia állapothoz kapcsolódó gének olyan markerek lehetnek, amelyek segítségével meghatározható, hogy a nem rágszáló fajokból származó ICM tenyészetek a késői epiblaszt állapot felé sodródnak-e.

Az össejtvonalak és az *in vivo* minták összehasonlítása révén számos evolúciósan konzervált útvonalat figyelhetünk meg az ICM az ERSE és APE stádiumok fajok közötti összehasonlításával. Megerősítettük, hogy az általunk újonnan azonosított naiv és primed pluripotencia gének közül néhány *in vitro* is aktív a pluripotencia fenntartásában. Eredményeink hozzájárulhatnak az ESC sejtvonalak sikeres izolálásához azon fajokon, ahol ez eddig nem járt sikerrel.

#### 4.5 Betegségmodellezés iPSC sejtekkel

Az iPSC-k felfedezése lehetőséget nyitott az egyes betegségek kialakulásának tanulmányozására az érintett sejttípusok differenciálódásának vizsgálatával. Jelenleg 11 lizoszómális tárolási betegség esetén hoztak létre iPSC sejteket a betegekéből, ami kiemeli a ritka betegségek területén a technológia fontosságát és az abban rejlő lehetőségeket. MPS II betegségben csak egy beszámoló jelent meg tanulmányom elkészítéséig hiPSC izolálásáról, azonban sem a citopatológiát, sem a neurodegeneráció mechanizmusát nem vizsgálták a szerzők.

A lizoszómális tároló vakuólumok intracelluláris felhalmozódása a legtöbb LSD egyik citopatológiai jellemzője. Bár a neurodegeneráció citopatológiája az MPS II betegségben eddig ismeretlen volt, más LSD betegségekben csökkent IDS enzimaktivitás, GAG felhalmozódás, valamint az ELS, ER, Golgi és mitokondriumok diszfunkcióját írták le. Amikor a sejtek GAG szintjét vizsgáltam, fokozott GAG-akkumulációt és tároló vakuolum felhalmozódását találtam a beteg iPSC sejtekben és az azokból differenciáltatott neuronális sejtekben. Ezt ultrastrukturális elektronmikroszkópos vizsgálat és a lizoszóma-asszociált membrán glikoprotein 2 (LAMP2) fehérje expresszió immuncitokémiai kimutatása is igazolta.

Kísérleteimben az LC3-I szignifikánsan megnövekedett szintjét mutattam ki az összes MPS II-vel érintett TD35 kultúrában, ami

összhangban van az irodalommal, miszerint a fokozott autofágia a legtöbb LSD citopatológiájának része. A károsodott lizoszomális funkciók gyengítik az mTOR-aktivitást, ami a TFEB jelátvitel aktiválódásához (nukleáris lokalizáció megnövekedése) vezet, mind a lizoszomális útvonal, mint az autofágia tekintetében. Vizsgálataimban a TFEB fehérje hasonló lokalizációját figyeltem meg, egyértelmű dominanciával az MPS II betegek sejtjeinek sejtmagjában. A LAMP2 szintje minden MPS II érintett sejtvonalon megnövekedett, amely valószínűleg a lizoszomális rendszer részvételére utal az MPS II citopatológiájában.

A Golgi részvételét (Golgi membrán deformációk) az MPS betegségek citopatológiájában MPS IIIB (Sanfilippo szindróma) esetében egérmodellben írták le először. Nagyon hasonló deformációk voltak megfigyelhetőek az MPS II iPSC-ből származó modellben a neuronális sejtek Golgi membránjában. Az ER-stresszel kapcsolatos első megfigyelés a tágult ER-ciszterna gyakori előfordulása volt mind az MPS II NPC sejtekben, mind a TD35 kultúrákban elektronmikroszkópos vizsgálatokban. Vizsgálataimban az XBP1 splice-olt formájának szignifikánsan emelkedett szintjét mutattam ki MPS II neuronális progenitor sejtekben, amely az ER stressz MPS II citopatológiájában való részvételére utal.

Vizsgálataimban a betegek TD35 mintáiban a GFAP pozitív asztrocitákban fokozott LAMP2+ vakuolizációt figyeltem meg. Az MPS II neurontenyészetekben masszív tárolóvákuum-felhalmozódás volt megfigyelhető, fokozott sejthalállal, ami az asztrocitákban jobban érvényesült. Ez a sejttípus-specifikus különbség összefügghet az asztrocitáknak a központi idegrendszerben betöltött szerepével, mivel energiával látják el a neuronokat, többszörös dinamikus egyensúlyi változások és újrahasznosítás révén fenntartják az agyi homeosztázist, és védik a neuronokat az oxidatív stresszel szemben. Vagyis az MPS II asztroglia károsodás közvetlenül hat a neuronok életképességére és növeli a neurodegeneráció kockázatát.

Tudomásom szerint tanulmányom volt az első átfogó jellemzés az MPS II által érintett neuronális sejtekről *in vitro*. Létrehoztam és széleskörűen jellemeztem egy iPSC-alapú *in vitro* sejtmodellt az MPS II sejtszintű patológiájának tanulmányozására. Arra a következtetésre jutottam, hogy az NPC-kultúrák jó modellrendszert nyújthatnak az MPS II alapvető citopatológiai eseményeinek vizsgálatára, míg a TD35 kultúrák hatékony *in vitro* modellt biztosítanak a különböző sejttípusoknak a betegség citopatológiai jellemzőiben való részvételének

vizsgálatára. Eredményeim publikálása óta hasonló iPSC alapú rendszerben a differenciáltatott neuronális tenyészetekben hasonló fenotípust és citopatológiát írtak le más genetikai háttérű és független iPSC modellen, amely eredményeim és a levont következtetések helytállóságát bizonyítják. A differenciáltatott sejteken IDS enzimpótló terápiával és  $\delta$ -tokoferol kezeléssel jelentős javulás volt előidézhető, amely a modellrendszer alkalmasságát és felhasználási lehetőségeit támasztja alá.

#### 4.6 Össejtek felhasználása toxikológiai vizsgálatokban

A neurotoxikológiai szűrést lehetővé tévő *in vitro* platformok fejlesztését a vegyipar, az élelmiszeripar, a kozmetikai ipar és a gyógyszeripar sürgető igényei vezérik. A legtöbb neurotoxikológiai vizsgálatot rágszálakon vagy rágszálóból származó primer sejteken végzik, ami viszonylag magas költségeket és a faji különbségek miatt az eredmények alacsonyabb translációs értékét eredményezi. Számos nemzetközi kezdeményezés indult emlősök neurális szövetéből származó sejtek és emberi sejtek felhasználásával a kémiai veszélyek kimutatására és előrejelzésére, azonban csak korlátozott számú humán neuronális sejtvonal áll rendelkezésre ezen vizsgálatok számára. A humán iPSC-k alkalmazása azt az előnyt kínálja, hogy többféle, azonos egyéni genetikai háttérrel rendelkező sejt és szövettípus (pl. vese, máj, szív, idegsejtek, bél) is létrehozható specifikus differenciálási protokollok segítségével, megismételhető módon, amely nagyon hatékony *in vitro* eszközt jelenthet a toxikológusok számára. Az elmúlt években számos *in vitro* modellt hoztak létre, azonban a 3D neuronszöveteket használó neurotoxicitás és fejlődés-neurotoxicitás (*DNT*) területe mégsem fejlődött olyan gyorsan, mint a betegségek vagy a sejt- és szövetdifferenciálódás modellezés. Ennek oka, hogy nehéz kompromisszumot találni a biológiai komplexitás és a technikai reprodukálhatóság között, mely utóbbi a gyógyszer- vagy toxicitástesztekhez elengedhetetlen.

Kísérleteim során vizsgáltam differenciálódás komplexitását, a különböző sejttypusok megjelenését és az intenzív gliális-neuron kölcsönhatást a szferoidokban jelen lévő asztrociták és oligodendrociták révén. A komplex jellemzést az immuncitokémiai vizsgálatokkal összhangban lévő génexpressziós és fehérjeszintű elemzésekkel végeztem. Vizsgálataimban egy közepes áteresztőképességű, 96 minta/tenyésztőedény vizsgálatot végeztem 3D neuroszferoidokon, hogy kimutassam a kiválasztott vegyületek citotoxikus hatását. A neuronális

differenciálódás különböző szakaszaiban több különböző neurotoxikus vagy neurotoxikus hatással nem rendelkező vegyületet (gyógyszerek, növényvédő szerek, ismert hatású vegyi anyagok) vizsgáltam, mint teszt vegyületet a modell validálása céljából. Eredményeim rávilágítottak a vizsgált anyagok vegyület-specifikus és differenciálódási stádiumhoz kötött hatására, ami lehetőséget adott a vegyületek hatásos koncentráció értékeinek ( $EC_{50}$  és  $EC_{10}$ ) meghatározására.

Eredményeimet összefoglalva elmondható, hogy az ismert toxicitású vegyületek a korábban publikált hatásokat mutatták a 3D neuroszferoid rendszerben. Egy neurotoxikus vegyület, a Rotenone esetében apoptotikus aktivitást, ER-stressz vizsgálatot és ultrastrukturális vizsgálatot végezve a vegyület specifikus, sejtszintű hatását detektáltam. Az eredmények alapján a validált tesztrendszer lehetőséget biztosít arra, hogy hiPSC-eredetű sejtek felhasználásával új, CNS-releváns adatokat hozzunk létre más vegyületekről is.

Mindazonáltal a hiPSC sejtek pluripotens természete miatt ez a modell kiváló eszközt kínál a gyógyszer-teszteléshez, génterápiás vizsgálatokhoz és toxikológiai vizsgálatokhoz párhuzamosan ugyanazon a genotípuson, más sejt- vagy szövettípusok egyidejű felhasználásával. Ezenkívül a génmanipuláció új fejlesztései, mint például a CRISPR/Cas9 által közvetített génspecifikus módosítás lehetővé teszi, hogy specifikus útvonalakat célozzunk meg, és riporter sejt vonalakat hozzunk létre toxikológiai vagy egyéb alkalmazásokhoz. Ezen új megközelítések és a 3D sejt kultúra-alapú vizsgálatok kombinálása a közeljövőben forradalmasíthatja a toxikológia területét.

Habár az itt bemutatott tesztrendszer egy közös európai program részét képezte és humán toxikológiai vizsgálatokat célzott, alkalmas iPSC sejtek révén, bármely fajban előállítható hasonló 3D sejttenyészet toxikológiai célú vizsgálatokhoz – akár gyógyszerek, hatóanyagok, akár környezettoxikológiai vizsgálatok céljára. Ez a lehetőség új felhasználási lehetőségeket hordoz akár a nagyállatok, akár a laborállatok esetén a pluripotens őssejttenyészetek szélesebb körű felhasználására, mivel továbbra is olcsóbb alternatív emlős *in vitro* rendszereket jelentenek a humán őssejtek igen komoly forrásigényével szemben. Az elmúlt néhány évben e téren elindult változások remélhetőleg egy szélesebb körű és jobb predikciós hatékonysággal rendelkező környezettoxikológia alternatív tesztrendszer létrejöttét eredményezhetik.

## 5 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- 1) Kidolgoztam az ún. *zona pellucida*-mentes (zona-free) sejtmagátültetési genetikai újraprogramozással létrehozott egér embriókból történő embrionális őssejtvonalak előállításának módszertanát, különböző sejtmagdonor sejtípusok felhasználásával. Az előállított ntESC sejtvonalakat széleskörűen jellemeztem.
- 2) Bizonyítottam, hogy a sejtmagátültetési újraprogramozással létrehozott embriókból előállított embrionális őssejtvonalak (ntESC) összehasonlítva pluripotenciájukat, valamint a gének expressziójának microarray technikával történő vizsgálatát tekintve nem mutatnak jelentős eltérést a hagyományos, megtermékenyítéssel előállított embriókból létrehozott embrionális őssejtekhez képest.
- 3) Az őssejt állapot, más néven pluripotens stádium vizsgálata során, a POU5F1, mint fő pluripotencia szabályozó gén regulátor régiójának nyúl fajban való elemzésével megmutattam, hogy e gén regulációja fajspecifikus és elsőnek írtam le annak trofoblaszt specifikus expresszióját nyúl embrióban. Továbbá, az őssejt állapot vizsgálatával több állatfaj (egér, szarvasmarha, sertés) embrióinak és embrionális őssejtenyészetek összehasonlítása során új pluripotencia markergének expressziójának leírásában vettem részt.
- 4) Bizonyítottam, hogy egy genetikai eredetű betegség *in vitro* modellezése lehetséges a betegek sejtjeiből létrehozott indukált pluripotens őssejtek megfelelő szöveti irányú differenciáltatása révén, például egy lizoszomális tárolási betegség az MPS II neurológiai fenotípusa (neuropatológiája), a betegséget kódoló mutációt hordozó idegsejtekben a lizoszomális útvonal diszfunkcionalitása miatt következik be.
- 5) 3D szövettenyésztési módszer alkalmazásával több sejtípusból álló szövetszerű struktúrára jellemző neurális tenyészeteket differenciálttam iPSC sejtekből, amelyeket toxikológiai vizsgálatokban elemeztem és ismert teszt-vegyületekkel validáltam. Ezzel bizonyítottam, hogy az őssejt alapú *in vitro* 3D neurális szövettenyészetek alkalmas tesztrendszer biztosíthatnak mind toxikológiai mind pedig gyógyszerjelölt-vegyületek vizsgálatához.

## 6 A DOLGOZAT ELKÉSZÍTÉSÉHEZ FELHASZNÁLT SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

- Kobolák, J; Bodo, S; Rungsiwiwut, R; Meng, QG; Adorjan, M; Virutamasen, P; Techakumphu, M; Dinnyes, A. Generation of Mouse Embryonic Stem Cell Lines from Zona-Free Nuclear Transfer Embryos CELLULAR REPROGRAMMING 12: 1 pp. 105-113, 9 p. (2010) DOI: 10.1089/cell.2009.0040
- Kobolák, J; Mamo, S; Rungsiwiwut, R; Ujhelly, O; Csonka, E; Hadlaczky, G; Dinnyes, A. Comparative Analysis of Nuclear Transfer Embryo-Derived Mouse Embryonic Stem Cells. Part I: Cellular Characterization CELLULAR REPROGRAMMING 14: 1 pp. 56-67, 12p. (2012) DOI: 10.1089/cell.2011.0056
- Kobolák, J; Horsch, M; Geissler, S; Mamo, S; Beckers, J; Dinnyes, A. Comparative Analysis of Nuclear Transfer Embryo-Derived Mouse Embryonic Stem Cells. Part II: Gene Regulation CELLULAR REPROGRAMMING 14: 1 pp. 68-78, 11p. (2012) DOI: 10.1089/cell.2011.0057
- Kobolák, J; Kiss, K; Polgar, Z; Mamo, S; Rogel-Gaillard, C; Tancos, Z; Bock, I; Baji GA; Tar, K; Purity, MK; Dinnyes, A. Promoter analysis of the rabbit POU5F1 gene and its expression in preimplantation stage embryos. BMC Molecular Biol 10: 88, 12p (2009) DOI: 10.1186/1471-2199-10-88
- Bernardo AS, Jouneau A, Marks H, Kensche P, Kobolák J, Freude K, Hall V, Feher A, Polgar Z, Sartori C, Bock I, Louet C, Faial T, Kerstens H, Bouissou C, Parsonage G, Mashayekhi K, Smith JC, Lazzari G, Hyttel P, Stunnenberg HG, Huynen M, Pedersen RA, Dinnyés A. Mammalian embryo comparison identifies novel pluripotency genes associated with the naïve or primed state. BIOLOGY OPEN 7: 8 Paper: bio033282, 17p. (2018) DOI: 10.1242/bio.033282
- Kobolák, J; Molnár, K; Varga, E; Bock, I; Jezsó, B; Téglási, A; Zhou, S; Lo Giudice, M; Hoogeveen-Westerveld, M; Pijnappel, WWM P; Phanthong, P; Varga, N; Kitiyanant, N; Freude, K; Nakanishi, H; Laszlo, L; Hyttel, P; Dinnyes, A. Modelling the neuropathology of lysosomal storage disorders through disease-specific human induced pluripotent stem cells. EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 380: 2 pp. 216-233, 18p. (2019) DOI: 10.1016/j.yexcr.2019.04.021
- Kobolák, J; Teglas, A; Bellak, T; Janstova, Z; Molnar, K; Zana, M; Bock, I; Laszlo, L; Dinnyes, A. Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived 3D-Neurospheres are Suitable for Neurotoxicity Screening. CELLS 9: 1122. 28p (2020) DOI: 10.3390/cells9051122

**A dolgozatban fel nem használt, annak témájához kapcsolódó további saját publikációk:**

- Dirks, RAM; Van Mierlo, G; Kerstens, HHD; Bernardo, AS; Kobolák, J; Bock, I; Maruotti, J; Pedersen, RA; Dinnyés, A; Huynen, MA; Jouneau, A; Marks, H. Allele-specific RNA-seq expression profiling of imprinted genes in mouse isogenic pluripotent states. *EPIGENETICS & CHROMATIN* 12: 14. 21p (2019) DOI: 10.1186/s13072-019-0259-8
- Fröhlich, T; Kösters, M; Graf, A; Wolf, E; Kobolák, J; Brochard, V; Dinnyés, A; Jouneau A; Arnold, GJ. iTRAQ proteome analysis reflects a progressed differentiation state of epiblast derived versus inner cell mass derived murine embryonic stem cells. *JOURNAL OF PROTEOMICS* 90: 38-51 14p (2013) DOI: 10.1016/j.jprot.2013.03.015
- Krebs, A; van Vugt-Lussenburg, BMA; Waldmann, T; Albrecht, W; Boei, J; ter Braak, B; Brajnik, M; Braunbeck, T; Brecklinghaus, T; Busquet, F., et al. The EU-ToxRisk method documentation, data processing and chemical testing pipeline for the regulatory use of new approach methods. *ARCHIVES OF TOXICOLOGY* 94: 2435-2461, 27 p. (2020) DOI: 10.1007/s00204-020-02802-6
- Mamo, S; Bodo, S; Kobolák, J; Polgar, Z; Tolgyesi, G; Dinnyes, A. Gene expression profiles of vitrified in vivo derived 8-cell stage mouse embryos detected by high density oligonucleotide microarrays. *MOL REPROD DEV* 73: 1380-1392. 13p (2006) DOI: 10.1002/mrd.20588
- Molnár, K; Kobolák, J, Dinnyes, A. Golgi requires a new casting in the screenplay of mucopolysaccharidosis II cytopathology. *BIOLOGIA FUTURA* 73: 31-42 12 p. (2022) DOI: 10.1007/s42977-021-00107-y
- Pansri, P; Phanthong, P; Suthprasertporn, N; Kitiyanant, Y; Tubsuwan, A; Dinnyes, A; Kobolák, J; Kitiyanant, N. Brain-derived neurotrophic factor increases cell number of neural progenitor cells derived from human induced pluripotent stem cells. *PEERJ* 9: e11388, 9p. (2021)
- Snijders, KE; Fehér, A; Táncoş, Z; Bock, I; Téglási, A; van den Berk, L; Niemeijer, M; Bouwman, P; Le Dévédec, SE; Moné, MJ; Van Rossom, R; Kumar, M; Wilmes, A; Jennings, P; Verfaillie, CM; Kobolák, J; ter Braak, B; Dinnyés, A; van de Water, B. Fluorescent tagging of endogenous Heme oxygenase-1 in human induced pluripotent stem cells for high content imaging of oxidative stress in various differentiated lineages. *ARCH TOXICOL* 95, 3285–3302 (2021). DOI: 10.1007/s00204-021-03127-8
- Táncoş, Z; Bock, I; Nemes, C; Kobolák, J; Dinnyés, A. Cloning and characterization of rabbit POU5F1, SOX2, KLF4, C-MYC and NANOG pluripotency-associated genes. *GENE* 566(2): 148-157. 10p (2015) DOI: 10.1016/j.gene.2015.04.034.



## **Köszönetnyilvánítás**

Mindenekelőtt családomnak, szüleimnek, férjemnek és gyermekeimnek tartozom köszönettel. Az ő kitartásuk, ha türelmetlen, vagy elfoglalt voltam, vagy éppen nem voltam ott a számukra; végtelen támogatásuk, a bennem való hitük és mérhetetlen szeretetük nélkül nem tudtam volna megküzdeni az akadályokkal eddigi pályám során.

Köszönettel tartozom szakmai vezetőim, Dr. Orbán László, Dr. Müller Ferenc, Dr. Bósze Zsuzsanna, Dr. Gócza Elen és Dr. Dinnyés András irányításáért, szakmai tanácsaiért, amellyel munkámat kísérték. Úgy vélem, hogy az ő közreműködésük nélkül ma nem lehetnék az a kutató, akivé váltam.

Hálás vagyok, hogy megismerhettem azokat a kivételes és tehetséges PhD hallgatókat, akikkel az évek során együtt dolgoztam szakmai vezetőjüként vagy társ-témavezetőként irányítottam a munkájukat és barátomként tisztelhetem őket a mai napig: Dr. Polgár Zsuzsanna, Dr. Bock István, Dr. Varga Eszter, Dr. Tánco Zsuzsanna, Dr. Bellák Tamás, Dr. Rungsiwiwut Ruttachuk; Dr. Zhou Shuling, Dr. Chandrasekaran Abinaya, Dr. Ochalek Anna Dorota, Dr. Lo Giudice Maria és Dr. Francistiova Linda.

Köszönettel tartozom számos asszisztens kintartó és kiváló munkájáért, akik munkámat a hosszú évek alatt segítették: Kungl Györgyi, Tolnainé Csákány Hajnalka, Tóth Mariann, Téglási Annamária, Bódi-Jakus Mária, Rostásné Serbana Geta és Baráné Katalin. Köszönettel tartozom továbbá magyar és külföldi volt munkatársaimnak a BioTalentum Kft-től, akikkel az évek során együtt dolgoztam, inspiráltak és hozzájárultak e munka létrejöttéhez. Közülük csak néhányat emelnék ki – hiszen több mint 60 kollégával dolgozhattam együtt az ott eltöltött 7 év alatt – akik a dolgozat anyagát képező munkákban részt vettek: Dr. Fehér Anita, Dr. Nemes Csilla, Dr. Avci X. Hassan, Dr. Tarr Krisztina, Dr. Kiss Katalin, Dr. Filkor Kata, Dr. Mihalik Balázs.

Köszönettel tartozom a dolgozatban leírt kísérletekben nyújtott segítségért a Pécsi Tudományegyetem Gyermekgyógyászati Tanszékének és Dr. Nyúl Zoltánnak az MPS II betegek vérmintáinak gyűjtéséért és a klinikai adatok biztosításáért. Köszönöm Truszka Mónika (ELTE, Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék, Budapest), az elektronmikroszkópos minták előkészítésében; Dr. Lőrincz Péter (ELTE, Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék, Budapest), az elektronmikroszkópos vizsgálatban nyújtott módszertani tanácsait; Dr. Claudia Stancának a preimplantációs stádiumú nyülembrío manipulációkkal és vizsgálatokkal kapcsolatos tanácsait és segítségét.

Hálámat fejezem ki a MATE Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet minden kollégájának, akik az elmúlt időszakban támogattak és támogatnak új kutatási és tudományos munkám során. Köszönöm Dr. Urbányi Béla professzor támogatását, aki az intézetbe invitált és azóta is segíti munkámat. Külön köszönetemet fejezem ki az Intézet Igazgatójának Dr. Kriszt Baláznak, akik lehetőséget biztosított egy új tudományterület felé való váltásra, új lehetőségek

megtalálására az állatbiotechnológia területén. Külön köszönöm Dr. Kaszab Edit kitaró és fáradtságos munkáját a dolgozat szövegének javításáért.

## **Finanszírozás**

A közel két évtized alatt végzett, a dolgozatban bemutatott kutatások során az alábbi források kerültek felhasználásra:

A sejtmagátültetési genetikai újraprogramozás: Wellcome Trust (Grant No. 070246); EU FP6 (“TEAMOHOLIC” MEXT-CT-2003-509582; “MEDRAT” LSHG-CT-2005-518240; “CLONET” MRTN-CT-2006-035468); EU FP7 (“PartnErS” PIAP-GA-2008-218205; (“PLURISYS” HEALTH-2007-B-223485; “EpiHealth” FP7-HEALTH-2011-278418; “InduVir” PEOPLE-IRG-2009-245808); OTKA T046171, NKFP\_07\_1-ES2HEART-HU (OM-00202-2007), BONUS HU\_08/2-2009-0008; Thai Research Fund (Royal Golden Jubilee Ph.D. program; PHD 0111 12545 and CHE-TRF senior scholarship; RTA 5080010), National Research Council of Thailand (Grant No. GRB 03503001).

A nyúl POU5F1 promóter jellemzése: OTKA T046171; OMFB-01220/ 2006; NKTH-OTKA FP7 Mobility "HUMAN-MB08C-80205", Hungarian- Chinese NKTH TET (No. CN-56/2007) projektek; NKTH/ANR-TET Franco-Hungarian Bilateral Scientific and Technological Collaborative Project "Plurabit"; NKTH/KPI Kozma F. TUDAS-1-2006-0005; Wellcome Trust (Grant No. 070246); EU FP6 (“MEDRAT” LSHG-CT-2005-518240; “CLONET” MRTN-CT-2006-035468) projektek.

A szarvasmarha és sertés embriók pluripotencia szabályozás megismerése: EU FP7 projektek: „PluriSys”, HEALTH-2007-B-223485; „EPIHEALTH”, HEALTH-2012-F2-278418; „EpiHealthNet”, PITN-GA-2012-317146; „PartnErS”, PIAP-GA-2008-218205; „ANISTEM”, PIAPP-GA-2011-286264; „STEMMAD”, PIAPP-GA-2012-324451; „RabPStem”, PERG07-GA-2010-268422; Epiconcept, COST Action (FA1201) valamint az NKTH/KPI Bonus Plurisys projekt (OMFB-00236/2010).

Az MPS II iPSC modell létrehozása: Az EU FP7 („Anistem” PIAPP-GA-2011-286264; „STEMMAD” PIAPP-GA-2012-324451; „EpiHealthNet” PITN-GA-2012-317146), valamint a EU H2020 MSCA program "The CaSR Biomedicine Network" projektje (GA#675228).

Az iPSC sejteken végzett toxikológia vizsgálatokhoz az EU H2020 kutatási és innovációs keretprogramja nyújtott támogatást a 681002. számú támogatási megállapodás (EU-ToxRisk) keretében.