

MTA Doktori értekezés

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

Dr. Kobolák Julianna Ilona



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem,
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet

2024

Gödöllő

TARTALOMJEGYZÉK

1	Bevezetés.....	5
1.1	Állatmodellek és <i>in vitro</i> sejtes rendszerek a biológiai kutatásokban	5
1.2	Célkitűzések	8
2	Irodalmi áttekintés	9
2.1	Az őssejtek és tulajdonságai.....	9
2.2	A pluripotencia szabályozása	13
2.3	Pluripotens őssejtek használatokban	18
2.4	Genetikai újraprogramozás.....	19
2.5	A genetikai újraprogramozással előállított őssejtek alkalmazási lehetőségei.....	24
2.6	Új kutatási irányok az őssejtbiológiában	26
2.7	A pluripotens őssejtek alkalmazása a gyakorlatban	28
3	Anyag és Módszer	31
3.1	Embriónális őssejtvonalak izolálása és jellemzése sejtmagátültetési genetikai újraprogramozással létrehozott egér embriókból.....	31
3.2	<i>POU5F1</i> pluripotencia gén vizsgálata nyúl embrióban	36
3.3	Haszonállatok embrióinak összehasonlítása, a pluripotencia gének expressziójának vizsgálata	39
3.4	MPS II betegségmodellezés iPSC sejtek felhasználásával.....	41
3.5	Őssejtekből differenciáltott 3D neuroszferoidok toxikológia alkalmazása	45
4	Eredmények.....	49
4.1	Embriónális őssejtvonalak alapítása genetikai újraprogramozással létrehozott egér embriókból.....	49
4.2	A létrehozott egér ntESC-vonalak pluripotenciájának komplex vizsgálata	52
4.3	A pluripotencia kialakításában szerepet játszó <i>POU5F1</i> vizsgálata nyúlban.....	63
4.4	Haszonállatok embrióinak összehasonlítása, új pluripotencia gének azonosítása.....	68
4.5	iPSC sejtek alkalmazása betegségmodellezésben	73
4.6	Őssejt alapú 3D neuroszferoidok toxikológia alkalmazása	80
5	Következtetések.....	88
5.1	Embriónális őssejtvonalak genetikailag újraprogramozott embriókból	88
5.2	Az ntESC vonalak pluripotenciájának részletes vizsgálata.....	89
5.3	Nyúl <i>POU5F1</i> gén regulátor régiójának és expressziójának vizsgálatai.....	94
5.4	Pluripotencia szabályozás háziállatok korai embrióiban.....	97
5.5	Betegségmodellezés iPSC sejtekkel	100
5.6	Őssejtek felhasználása toxikológiai vizsgálatokban.....	103
6	Új tudományos eredmények	106
7	A dolgozat elkészítéséhez felhasznált saját közlemények jegyzéke	107
8	Köszönetnyilvánítás.....	109
9	Felhasznált irodalom.....	111
10	Mellékletek	137

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A	elülső (anterior)
AD	Alzheimer betegség (<i>Alzheimer's Disease</i>)
ALP	alkalikus foszfatáz (<i>Alkaline phosphatase</i>)
AO	káros hatás, vagy káros kimenetel (<i>Adverse Outcome</i>)
APE	aszimmetrikusan megnyúlt elülső - hátulsó (anterior - poszterior) epiblaszt (<i>Anterior to Posterior Epiblast</i>)
ASC	felnőtt őssejtek (<i>Adult Stem Cells</i>)
ASD	autizmus spektrum zavar (<i>Autism Spectrum Disorder</i>)
BAC	mesterséges bakteriális kromoszóma (<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>)
BBB	vér-agy gát (<i>Blood-Brain-Barrier</i>)
bp	bázispár
Cas9	CRISP- kapcsolt 9-es fehérje (<i>CRISPR-associated protein 9</i>)
cDNS	komplementer DNS (<i>Complementary DNA</i>)
CF	sejtfúzió (<i>Cell Fusion</i>)
CNS	központi idegrendszer (<i>Central Nervous System</i>)
CR	konzervatív régió (<i>Conservative Region</i>)
CRISPR	rendszeresen ismétlődő rövid palindrom szekvenciák (<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>)
Ctrl	kontroll (<i>Control</i>)
CZB	Chatot-Ziomek-Bavister embriótenyésztő tápoldat
CSF	agy-gerincvelői folyadék (<i>Cerebrospinal Fluid</i>)
DE	disztális enhancer (<i>Distal Enhancer</i>)
DMEM	Dulbecco módosított Eagle médium (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DNS	deoxiribonukleinsav
DNT	fejlődés neurotoxikológia (<i>Developmental Neurotoxicology</i>)
E	embrionális nap (<i>Embryonic day</i>)
EB	embriócsomó (<i>Embryoid Body</i>)
ECM	extracelluláris mátrix
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGC	embrionális csírasejt (<i>Embryonic germ cell</i>)
Epi	epiblaszt
EpiSC	epiblaszt őssejt (<i>Epiblast Stem Cell</i>)
ERSE	sugárirányban (radiálisan) szimmetrikus epiblaszt (<i>Epithelial Radially Symmetric Epiblast</i>)
ERT	enzimpótló terápia (<i>Enzyme Replacement Therapy</i>)
ESC	embrionális őssejt (<i>Embryonic Stem Cell</i>)
ExE	extraembrionális ektoderma (<i>Extraembryonic ectoderm</i>)
FACS	áramlási citométer (<i>Fluorescence-activated Cell Sorter</i>)
FBS	magzati szarvasmarha szérum (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FGF	fibroblaszt növekedési faktor (<i>Fibroblast growth Factor</i>)
FSC	magzati őssejt (<i>Foetal Stem Cell</i>)
GAG	glikozaminoglikán
GEO	Gene Expression Omnibus
GSK3	Glikogén szintáz kináz 3 (<i>Glycogen synthase kinase-3</i>)
h	ember (human)
HCA	nagy adattartalmú képelemzés (<i>High content analysis</i>)
hCG	humán korion-gonadotropin (<i>Human Chorionic Gonadotropin</i>)
HCL	hierarchikus klaszteranalízis
HEPES	(4-(2-hidroxyethyl)-1-piperazinétánsulfonsav)
HRE	hormonérzékeny elem (<i>Hormone Responsive Element</i>)
HSC	nagy adattartalmú elemzés (<i>High Content Screening</i>)
HSCT	vérképző őssejt-transzplantáció (<i>Hematopoietic Stem Cell Transplantation</i>)

HTS	nagy áteresztőképességű szűrővizsgálat (<i>High Throughput Screening</i>)
ICM	belső sejtcsoport (<i>Inner Cell Mass</i>)
IDS	iduronát-2-szulfatáz
iPSC	indukált pluripotens őssejt (<i>induced Pluripotent Stem Cell</i>)
IVG	<i>in vitro</i> gametogenezis
LIF	Leukémia inhibitor faktor (<i>Leukaemia Inhibitory Factor</i>)
LSD	lizoszomális tárolási betegség (<i>Lysosomal Storage Disorder</i>)
m	egér (mouse)
MEF	egér embrionális fibroblaszt (<i>Mouse Embryonic Fibroblast</i>)
miRNS	microRNS (<i>micro RNA</i>)
mp	másodperc (<i>second</i>)
MPSII	II. típusú mukopoliszacharidózis
mRNS	hírvivő RNS (<i>messenger RNA</i>)
MSC	multipotens őssejt (<i>Multipotent Stem Cell</i>)
NAM	új megközelítési módszerek (<i>New Approach Method</i>)
NEAA	nem esszenciális aminosavak
NMM	neurális fenntartó médium (<i>Neuronal Maintenance Medium</i>)
NPC	neurális progenitor sejt (<i>Neuronal Progenitor Cell</i>)
NSC	neurális őssejt (<i>Neural Stem Cell</i>)
NT	sejtmagátültetés genetikai újraprogramozás (<i>nuclear transfer</i>)
ntESC	sejtmagátültetéssel újraprogramozott embrióból izolált embrionális őssejt (<i>Nuclear Transfer Embryonic Stem Cell</i>)
OSC	oligopotens őssejt (<i>Oligopotent Stem Cell</i>)
P	hátsó (poszterior)
PA	parthenogenetikus aktiválás (<i>Parthenogenic Activation</i>)
PBMC	perifériális vér mononukleáris sejt (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>)
PBS	foszfát puffer (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	polimeráz láncreakció (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PE	proximális enhancer (<i>Proximal Enhancer</i>)
PEM	piezoelektromos mikroinjektálás (<i>Piezoelectric Microinjection</i>)
pESC	parthenogenetikus embrionális őssejt (<i>Parthenogenic Embryonic Stem Cell</i>)
PFA	paraformaldehid
PMSG	vemhes kanca szérum gonadotropin (<i>Pregnant Mare's Serum Gonadotropin</i>)
PrE	primitív endoderma
PSC	pluripotens őssejt (<i>Pluripotent Stem Cell</i>)
qPCR	kvantitatív valós idejű PCR (qPCR)
RNS	Ribonukleinsav
SCNT	szomatikus sejtmagátültetés (<i>Somatic Cell Nuclear Transfer</i>)
sEmbryo	szintetikus embrió (<i>Synthetic Embryo</i>)
TALEN	Transzkripcióaktivátor-szerű effektor nukleázok (<i>Transcription Activator-like Effector Nuclease</i>)
TD	terminális differenciáció (<i>Terminal Differentiation</i>)
TE	trophectoderma (<i>trophectoderm</i>)
Tm	olvadási hőmérséklet (<i>melting temperature</i>)
TSA	trichostatin A
TSC	trofoblaszt őssejt (<i>Trophoblast Stem Cell</i>)
UCBT	köldökszínórvér-transzplantáció (<i>Umbilical Cord Blood Transplantation</i>)
USC	unipotens őssejtek (<i>Unipotent Stem Cell</i>)
VE	viscerális endoderma (<i>Visceral Endoderm</i>)
vs	versus (szemben, ellentétben)
XEN	extraembrionális endodermális őssejtek (<i>Extra-embryonic Endoderm Stem Cell</i>)
ZF	zona pellucida mentes embrió (<i>zona-free</i>)

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, az egyes orvosi áttörések mögött számtalan esetben az állatokon végzett, előzetes kutatások eredményei állnak. Az állatmodellek alkalmazása lehetővé teszi a kutatók számára, hogy az egyes betegségeket, azok patomechanizmusát olyan módon vizsgálják, amely az ember számára máskülönben elérhetetlen. Bár az állatoknak az emberi anatómia és fiziológia modelljeként való felhasználása már az ókori Görögországban elkezdődött, mai szintjét a technológia fejlődésével csak a huszadik század elejére érte el. A kapcsolódó területek, mint a biotechnológia, a sejtbiológia, immunológia vagy molekuláris genetika és ezen területeken alkalmazott technológiák és eljárások (pl. mikroszkópia, elválasztási technikák, mikrofluidikai eljárások, sejt- és szövettenyésztési eljárások) fejlődése elengedhetetlen alapfeltétele volt a modellátok szélesebb körben való alkalmazhatóságának.

Mára az állatmodellek használata drámaian megnőtt, különösen a rágcsálók (egér és patkány) esetében, ahol a gének szerepének vizsgálatában is bevett módszerré váltak. A kutatók előszeretettel használják az egérmodellt az orvosi biológiában az emberhez való viszonylag szoros genetikai és fiziológiai hasonlósága, valamint a génállományának kontrollált környezetben való könnyű manipulálhatósága és vizsgálhatósága miatt. Korábban számos más állatmodellt is gyakran alkalmaztak, főként a genom kisebb mérete és az emberi genomhoz képest azok egyszerűsége miatt (például ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*), fonálféreg (*Caenorhabditis elegans*) (Pandey and Nichols 2011), amelyek azonban a DNS szekvenálási eljárások fejlődése és a humán genom projekt révén kissé háttérbe szorultak az elmúlt évtizedben. A zebradánió (*Danio rerio*), egy kedvelt akváriumfi halfaj, mint gerinces modell felhasználása a farmakológiai, valamint környezettetoxikológiai vizsgálatok során azonban továbbra is igen jelentős, nem is beszélve a korai embrionális fejlődés vizsgálatáról, melyet közel átlátszó lárvája tesz lehetővé (Santoriello and Zon 2012; Choi et al., 2021; Patton et al., 2021). A majomfélék alkalmazása az ún. magas prioritású humán betegségek, például fertőző betegségek, vagy idegrendszeri betegségek esetén elterjedt, azonban alkalmazásuk az állatvédelmi szempontok miatt folyamatosan csökken (Mukherjee et al., 2022; Dominguez-Oliva et al., 2023). E mellett, újabb és újabb modellek is publikálásra kerülnek egy-egy speciális terület vagy vizsgálat szempontjából (pl. tengerbiológiai kutatásokban a fejlábúak, kagylók, tengeri halfajok; idegrendszert érintő kutatásokban egyes halfajok, madarak vagy macskafélék; epigenetikai kutatásokban szivacsok, tengeri sünök, fejlábúak), ahol jelentős előnyt biztosítanak egy-egy fenotípus leírásában vagy biológiai probléma megválaszolásában (Dominguez-Oliva et al., 2023; Sadler 2023).

Az emlősök két családja, a rágcsálók közé tartozó egérfélék (*Muridae*) (főként az egér és patkány) (Bryda 2013; Chesselet 2023), valamint a nyúlfélék (*Leporidae*) közül a nyúl (*Oryctolagus cuniculus*) (Carneiro et al., 2011; Mapara et al., 2012) a leggyakrabban használt humán állatmodellek. A rágcsáló modellek kapcsán külön ki kell emelnünk, hogy jelentőségüket a genomika és molekuláris biológia fejlődése révén létrehozott ún. humanizált modellek megjelenése nagyban elősegítette, új utakat nyitva olyan immunrendszert érintő, vagy a rágcsálókétól nagyban eltérő génszabályozási útvonalak, komplex fehérjék esetén is, amelyek vizsgálatára korábban nem nyílt lehetőség (Shultz et al., 2012; Walsh et al., 2017; Agarwal et al., 2020). 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 felhasználható állatlétszám messze elmarad a rágcsálókétól (Forabosco et al., 2013; Mukherjee et al., 2022; Murray and Mitchell 2022).

Összességében, egy nemrégén megjelent tanulmány szerint 2019 és 2020 között az USA-ban közel 24 millió állatot használtak kutatási célokra, az Európai Unióban mintegy 9,4 milliót, míg a világ többi részén mintegy 55 millió állat került kísérleti célú felhasználásra (Dominguez-

Oliva et al., 2023). Bár az állatkísérletek egyre inkább létfontosságúak az orvosbiológiai kutatásban, általános egyetértés van abban, hogy a kísérleti állatok felhasználását a szükséges minimumra kell korlátozni. William Russell és Rex Burch már 1959-ben közzétette az ún. „3R - Reduction, Refinement, and Replacement” – gondolatát (Russell and Burch 1959). Javaslatuk szerint, ha egy kísérletben mindenképpen szükséges az állatok használata, akkor mindent meg kell tenni annak érdekében, hogy

- helyettesítsük (*Replace*) azokat alternatívákkal, például számítógépes modellezéssel (Lang et al., 2018), *in vitro* módszerekkel (pl. sejt és szövetkultúrák);
- csökkentjük (*Reduce*) a kísérletenként felhasznált állatok számát, például adatok és erőforrások megosztásával, továbbá
- finomítsuk (*Refine*) az alkalmazott kísérleti protokollokat annak érdekében, hogy a felhasznált kísérleti állatoknak ne, vagy csak minimális fájdalmat okozzunk, például nem invazív technikák alkalmazásával.

Napjainkban már a kutatásban használt állatok számának csökkentéséről, helyettesítéséről, a kísérleti eljárások finomításáról szóló állatjóléti jogszabályok segítik összehangolni a 3R-re vonatkozó legjobb gyakorlatokat mind az Európai Unió (Directive 2010), mind pedig a világ más országaiban (Prescott 2017; Hubrecht and Carter 2019).

Bár a kisállatmodellek nyilvánvaló előnyöket kínálnak, úgymint a magas szaporodási arány, az alacsony fenntartási költségek és a genetikai szempontból hasonló, beltenyésztett törzseken való kísérletek elvégzésének lehetősége, azonban a fajspecifikus különbségek és az embertől való lényeges eltérések az eredmények értékelésében problémákat okozhatnak (Mestas and Hughes 2004). Az eredmények emberi betegségekre való extrapolálása gyakran nem egyszerű, különösképpen az immunrendszer, vagy éppen a központi idegrendszer működésére vonatkozó területeken (pl. kognitív funkciók, viselkedést érintő betegségek), vagy kifejezetten humán betegségek modellezése esetében, még akkor sem, ha az előzőekben említett humanizált egérmodelleket is számításba vesszük.

A rágszálókból származó adatok klinikai átültetése néha jelentős kudarccal járt a gyógyszerfejlesztésben, nem csekély veszteségeket generálva az iparágban (McGonigle and Ruggeri 2014). 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 és a gyógyszerkutatások terén. Itt kell említést tennünk továbbá a toxikológiai vizsgálatok iránt egyre növekvő igényekről is az új anyagok fejlesztése kapcsán. Sem a humán toxikológia, sem a környezettoxikológiai igényeket nem képesek kielégíteni a jelenlegi kapacitások, az élőállat tesztek idő- és költségigénye pedig további nehézségeket jelent (Ball et al., 2022).

Alternatív megközelítésként az *in vitro* sejt-kultúrák alkalmazása jön szóba, amely megbízható betekintést nyújthat számos betegség patomechanizmusába, vagy valamely anyag toxicitásának vizsgálata során szolgáltathat lényeges adatokat anélkül, hogy kísérleti állatokat kellene felhasználni a vizsgálatokhoz. Az *in vitro* sejt-kultúra olyan technika, amelyben az élő szervezetből sejteket vagy szöveteket izolálnak, és mesterséges környezetben tenyésztik őket. Az izolálás gyakran egy esetben (egyetlen alkalommal) történik, majd az adott szövet vagy sejt szaporítása és hosszantartó tárolása (pl. szövet és sejtbankok) révén számos kísérletben felhasználható. Még a primer kultúrák esetén is - ahol az izolátumokat frissen kell készíteni -, csak kis számú egyedről van szó, így az állatlétszám jelentősen csökkenthető. Az *in vitro* tenyészet állhat akár egyetlen sejt-típusból (pl. szívizom sejtek), akár többféle sejt-populációból (pl. neuron és asztroglia sejtek vegyes tenyészet), akár egy szerv-részből (pl. hasnyálmirigy szervtenyészet) (Henle and Deinhardt 1957; Doke and Dhawale 2015; Lowa et al., 2018). Ez a technika kiváló modellrendszert kínál a metabolikus folyamatok, az öregedés, a mutagenézis és a karcinogenezis tanulmányozására egyaránt (Kirsch-Volders et al., 2011; de Sant'Anna et al., 2015). Az ún. halhatatlan (nem-szenesz-cens) sejt-vonalak létrehozása a primer sejttenyészetekből további lehetőségeket biztosít a sejt-vonalak korlátlan fenntarthatósága által.

Azonban ezek az általában vírus eredetű gén beépülések (virális inszerciók), vagy karcinogén mutációk következtében létrejövő sejtvonalak nem minden kérdés megválaszolására lehetnek alkalmasak, így felhasználhatóságuk a biológiai probléma függvénye. Az elmúlt két évtized új fejlesztései megmutatták, hogy az *in vitro* sejt- és szövettanok a betegségek modellezésében is hasznos és pontos modellrendszert biztosíthatnak (pl. rákkutatás), ha a kísérletek tervezésekor szem előtt tartjuk e rendszerek korlátait. Az állatmodellek azonban továbbra is fontos részét képezik a biológiai kutatásoknak, azonban újragondolásuk, alkalmazási korlátaik pontos megértése, okszerű és megfelelően kialakított modellek alkalmazása (pl. humanizált modellek, vagy betegségsspecifikus modellfaj választás) elengedhetetlenek az állatlétszámok és költségek csökkentése és a transzláció sikeressége szempontjából is. Mindemellett az állatmodellek számának csökkentése, az alternatív *in vitro* módszerekkel való helyettesítése vagy éppen ötvözése komoly lehetőségeket is hordoznak a fejlesztések sikerének növelése vagy éppen új kísérleti rendszerek kidolgozása szempontjából (McGonigle and Ruggeri 2014; Singh and Seed 2021).

Az *in vitro* sejtrendszerek új és egyre nagyobb teret hódító csoportja az őssejttenyészetek alkalmazásának területe. A pluripotens őssejtek értékes *in vitro* rendszert kínálnak a fejlődéssel kapcsolatos események, a komplex multifaktoriális tulajdonságok vagy éppen betegségek molekuláris és sejtszintű tanulmányozására egyaránt (Rowe and Daley 2019). Az őssejt alapú rendszerek előnye, hogy nem csak egy, hanem többféle sejt típus is differenciáltható egyazon sejtvonalból (vagyis genetikai háttérrel), lehetővé téve egy adott tulajdonság komplex vizsgálatát. Másrészt, amikor multifaktoriális tulajdonsággal vagy betegséggel van dolgunk és a genetikai ok, a mutációt hordozó gén(ek) ismeretlen(ek), a fenotípus alapján is létrehozható az adott fenotípust (vagy betegséget) mutató egyénből őssejttes modell. Erre példa a sporadikus Alzheimer betegség (*Alzheimer's Disease, AD*), vagy az autizmus spektrum zavar (*Autism Spectrum Disorder, ASD*) kutatás (Cheffer et al., 2020; Penney et al., 2020). Az áttörést a területen az embrionális őssejtek (*Embryonic Stem Cells, ESCs*) mellett az ún. indukált pluripotens őssejtek (*induced Pluripotent Stem Cells, iPSC*) előállítás technológiájának felfedezése jelentette (Takahashi and Yamanaka 2006; Takahashi et al., 2007), amelyet orvosi Nobel díjjal jutalmaztak 2012-ben. Ezzel embriók felhasználása nélkül, immár szöveti sejtek genetikai újraprogramozásával is lehetővé vált pluripotens őssejtek létrehozása. Az őssejt-alapú modellek óriási potenciált rejtnek az emberi betegségek tanulmányozásában, áthidalva az állati modelleken végzett vizsgálatok és a klinikai kutatások közötti szakadékot (Doss and Sachinidis 2019). A sejttenyésztési rendszerek fejlődése, ötvözve a pluripotens sejtek differenciációs potenciáljával a 3D szövettanok, az ún. organoid tenyészetek révén pedig a szöveti szintű (több sejt típusból álló), komplex rendszerek modellezését is lehetővé tette. A hatékony génmódosítási eljárások (pl. CRISPR/Cas9, TALEN rendszerek) révén tovább szélesedett az alkalmazási lehetőségek köre, ahol a kiindulási, akár a betegből létrehozott sejtvonal genetikai manipulációja is megoldható, közelebb hozva a személyre szabott orvoslás és terápia kidolgozásának lehetőségét (Rowe and Daley 2019). Ugyanakkor, az állatokból létrehozott iPSC sejtek (pl. szarvasmarha, sertés, ló, juh, kecske, tyúk, kutya, macska) az állatgyógyászat, és a biológiai mechanizmusok megértésében (pl. egyedfejlődés, toxikológiai modellek) töltnek be jelentős szerepet, nem beszélve a háziállatok regeneratív gyógyászatáról, amely a várakozások szerint komoly fejlődésen mehet keresztül, de a humán betegségek új modelljeit is biztosíthatja (Scarfone et al., 2020). Ezen kívül jelentős a mezőgazdasági célokra történő alkalmazások köre, ahol az állati eredetű pluripotens őssejtek (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 esetén) és farmakokinetikai vizsgálatok területe, de a regeneratív vizsgálatok, beleértve a termékenység helyreállítását is, szintén fontos szerepet játszanak a haszonállatok és

őssejtjeik modellként való felhasználása területén (Blomberg and Telugu 2012; Kumar et al., 2021).

Habár kísérleteim kezdetén még az elméleti lehetőség is csekélynek tűnt, ma már ún. szintetikus (mesterséges) embriók is létrehozhatók laboratóriumi körülmények között petesejt és hímvarsejt felhasználása nélkül, csupán egér (Amadei et al., 2022; Tarazi et al., 2022) vagy humán pluripotens őssejtek felhasználásával. Ezek az eredmények rávilágítanak az őssejtek hordozta lehetőségek széles tárházára, amely új utakat nyit a gyógyszerkutatás, betegség modellezés, fejlődésbiológia, biotechnológia és genetikai kutatások számára. Olyan új területek nyílhatnak meg, mint például a mesterséges ivarsejt differenciáció a meddőség gyógyításában, vagy akár új, alternatív, *in vitro* szövet- és szerv-előállítási rendszerek a regeneratív orvoslás területén. Veszélyeztetett fajok esetén pedig akár szaporodóképes populációk hiányában is lehetőség nyílna embriók és ez által ivadékok létrehozására, amely komoly jelentőséggel bír. Nem szabad azonban szem előtt téveszteni a célt és a közben felmerülő kockázatokat, az etikai kihívásokat. Az új eljárások biztonságosságáról, alkalmazhatóságuk lehetőségeiről és feltételeiről kísérletes úton, széleskörűen kell információt szereznünk, mielőtt azt a gyakorlat számára elérhetővé tesszük.

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. Egy alternatív sejtmagátültetési módszer, az ún. *zona pellucida*-mentes sejtmagátültetéssel előállított embriókból lehetséges-e embrionális őssejtvonalakat létrehozni, különböző donorsejteket felhasználva, a fertilizációval előállított embriókból létrehozott sejtvonalakkal megegyező pluripotenciával.
2. A sejtmagátültetési újraprogramozás során különböző sejtmagátültetési technológiákkal létrehozott 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 sejtenyészetek 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 tágtja és pontosabb képet ad azok alkalmazhatóságáról a különböző területeken, legyen szó mutációk feltérképezéséről, génexpressziós vagy fenotípus vizsgálatokról, fejlődésbiológiai vizsgálatokról, betegségek modellezéséről, gyógyszerjelöltek teszteléséről vagy éppen toxikológiai vizsgálatokról.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

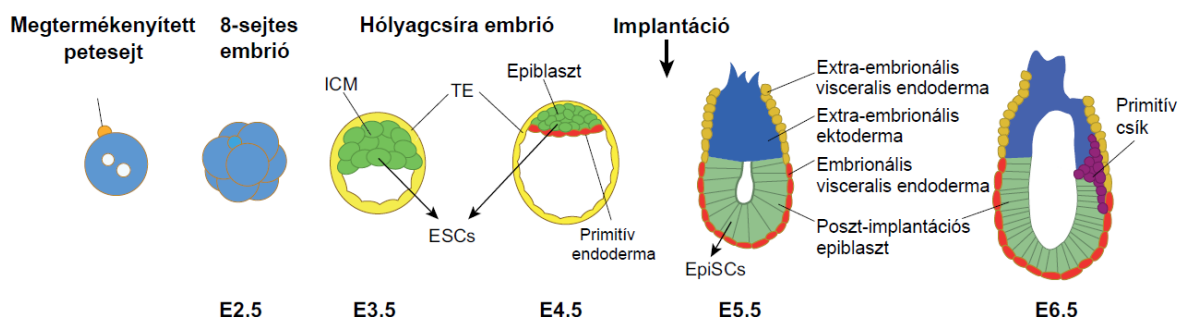
2.1 Az őssejtek és tulajdonságaik

Az őssejtek a többsejtű élőlényekben előforduló olyan differenciálatlan sejtek, amelyek megőrzik osztódási és differenciálódási képességeiket. Mindez azt jelenti, hogy képesek önmaguk másolására osztódás révén, vagyis a kiindulási sejttel azonos potenciállal rendelkező utódsejtek létrehozására korlátlan osztódásuk révén (angolul *self-renewal*, önmegújulás), megőrizve egyúttal differenciálódási képességüket. Valamint, képesek különböző sejttypussá differenciálódni, amely tulajdonságot „differenciálódási potencia” (vagy potenciál) néven illetünk. Az őssejtek az egyik legősibb, vagyis legkorábban kialakuló sejtpopuláció az egyedfejlődés során, már az embrionális fejlődés (embriogenezis) korai szakaszában megjelennek és fennmaradnak. Leszármazottaik, az ún. tranzit-populációk különböző differenciáltsági stádiumokban az egyes szövetekben/szervekben, így a felnőtt egyedekben is megtalálhatók (Lanza and Atala 2013).

A pluripotens őssejtek az őssejtek egy speciális populációja. Habár a pluripotens állapot *in vivo* csak átmeneti, vagyis az egyedfejlődés során az embrióban csak rövid ideig marad fenn (ha eltekintünk a csírvonal differenciálódásától, amely különbözik az egyéb testi szövetektől potenciája tekintetében), azonban *in vitro* körülmények között hosszan fenntartható. Ezért mindenképpen el kell különítenünk az *in vivo* az embrionális fejlődés során és *in vitro* sejtenyészetekben leírt és azonosított jellemzőket. Ennek megfelelően, elmondható, hogy a pluripotens őssejtek definíciója az évek során sokat változott. Míg korábban a differenciálódási képesség és önmegújulás volt a definíció lényege, ma már úgy gondoljuk, hogy a differenciáció az őssejtek által létrehozott utódsejtekre inkább jellemző. A ma leginkább elfogadott nézet szerint egy-egy őssejt populáció osztódása révén hozza létre az utód őssejteket, amelyek azután általában a különböző szövetekbe vándorolnak majd ott tovább specializálódnak, vagyis differenciálódnak, míg az eredeti őssejtpopuláció ún. fenntartó osztódások révén marad fenn. Ez a definíció tehát már nem tekinti pluripotens őssejteknek a vándorló ún. tranzit-őssejt populációkat, kizárólag a totipotens és pluripotens sejteket tekinti „valódi” pluripotens őssejtnak (Lanza and Atala 2013). A „potencia” fenntartása ún. aszinkron osztódások révén, illetve sztochasztikus differenciáció mechanizmusa által valósulhat meg. Aszinkron osztódáskor az őssejt egy az „anya-őssejttel” megegyező sejtet és egy leánysejtet hoz létre, amely már differenciáltabb, mint a kiindulási anyasejt volt. Ilyenkor a sejt sorsát meghatározó (determináns) faktorok, például transzkripciós faktor fehérjék, hírvivő RNS (mRNS, *messenger RNA*), vagy mikro-RNS-ek (*microRNA*, miRNA) különülnek el az egyik leánysejt citoplazmájában, vagy kötődhetnek a sejtmembránhoz valamely specifikus kötőfehérje, vagy membránfehérje által, a sejtközponthoz (centroszóma), vagy más, a leánysejtek között differenciáltan eloszló sejtalkotóhoz [lásd bővebben (Morrison and Kimble 2006)]. Az anyasejttel megegyező utódsejt az őssejt populáció fenntartásában vesz részt és „helyben” marad, míg a leánysejt a további differenciálódó populációk képzésében vesz részt. Míg a sztochasztikus modellben az egyik anyasejt differenciált utódsejteket hoz létre (leánysejtek), addig a másik anyasejt önmagával azonos sejteket hoz létre a mitózis során, vagyis itt a sztochasztikus szó az egyes anyasejtek osztódására vonatkozik, amely véletlenszerűen következik be. Ebben az esetben is, ugyan úgy, mint az aszinkron modellnél, a leánysejtek hozzák létre a tranzit populációkat (Morrison and Kimble 2006; Sunchu and Cabernard 2020). *In vitro* körülmények között az önmegújulás mesterséges, külső faktorokkal tartjuk fenn, amelyeket a későbbiekben részletesen ismertetek. A következőkben az egyes őssejtek definícióját és besorolásuk alapját mutatom be röviden (Ramalho-Santos et al., 2002; Lanza and Atala 2013; Zakrzewski et al., 2019). Miután az egyes őssejttípusok izolálása, felfedezése időben igen különbözött, így sokszor a későbbiekben a nevezéktan változott, amikor egy-egy populációról beigazolódott az újabb eredmények fényében, hogy korábbi besorolásuk nem volt megfelelő. Ezeket az eltéréseket igyekeztem minden esetben megadni az első alfejezetben az egér embrionális fejlődésének példáján.

2.1.1 Embriionális fejlődés korai szakasza egérben

Ahhoz, hogy az egyes őssejtek származását, tulajdonságaikat és létrehozásuk körülményeit jobban követni tudjuk, fontos az egér embrió korai fejlődési stádiumainak és a differenciálódás egyes szakaszainak rövid áttekintése. Az embriionális fejlődés a petesejt megtermékenyítésével kezdődik, így alakul ki a zigóta. A hólyagsíra fejlődési stádium az egérben körülbelül 3,5 nappal a megtermékenyülést követően (3.5 embriionális nap, E3.5) alakul ki. Ez alatt az időszak alatt drámai változások zajlanak le, az egysejtes zigótából több mint 100 sejt állapottá és egy komplex struktúra alakul ki, beindul a saját genom expresszió, az epigenetikai változások egy jelentős része is lezajlik. A hólyagsíra embrió ekkorra egy külső rétegből, a trophektoderma (TE), valamint egy belső sejtrétegből, a belső sejtcsomóból (*Inner Cell Mass*, ICM) áll. Az ICM tartalmazza azokat a sejteket, amelyek a primitív endoderma és pluripotens epiblaszt sejtekké differenciálódnak az implantációig (Cockburn and Rossant 2010; Mihajlovic and Bruce 2017) (1. ábra).



1. ábra: Pluripotens sejtek *in vivo* a korai egér embriófejlődés során. A nyolcsejtes stádiumig az egér embrió blasztomerei totipotensek. A differenciáció a sejtek között a morula stádiumban kezdődik. A megtermékenyítést követően mintegy 3,5 nappal (embriionális nap; E3.5) a belső sejtcsozó (ICM) sejtjei a hólyagsíra embrió állapotban mind pluripotencia, mind extraembriionális endoderma géneket expresszálnak. Ezt követően E4.5 stádiumban az epiblaszt és a primitív endoderma vonal szétválk; ebben a stádiumban az ICM epiblaszt rétege a pluripotencia „naív” állapotát képviseli. Az egér ESC sejtek általában az E4.5 epiblasztból származnak. Egérben röviddel az E4.5 után az embrió beágyazódása megkezdődik az anyaméhbe (implantáció). Az EpiSC sejtek, amelyek a „primed” pluripotencia állapotot képviselik a késői E6.5 epiblaszt sejtekhez hasonlítanak. (ICM, belső sejtcsozó, *Inner Cell Mass*; E, embriionális nap, *Embryonic day*; TE, trofoblaszt sejtek) Davidson és munkatársai alapján módosítva (Davidson et al., 2015)

Az E5.0 és E6.5 közötti fejlődési stádiumban, amikor az implantáció lezajlik, az egérembró egy epitheliális, sugárirányban (radiálisan) szimmetrikus epiblasztból (*Epithelial Radially Symmetric Epiblast*, ERSE) áll, amelyet az extraembriionális endoderma vesz körül. A gasztruláció előrehaladtával az epiblaszt sejtjei az epitheliális-mezenchymális átmenet (*Epithelial-mesenchymal transition*, EMT) során az embrióon belül vándorolnak és kialakítják a definitív endoderma és mezoderma csírárétegeket. Ez a sejtvándorlás az egérembró megnyúlását okozza, és egy aszimmetrikusan megnyúlt elülső-hátsó (anterior-poszterior) epiblasztot (*Anterior to Posterior Epiblast*, APE) hoz létre (Maddox-Hyttel et al., 2003; Degrelle et al., 2005; Grapin-Botton 2008). Az ERSE és APE stádiumban az epiblaszt pluripotens marad, amint azt az egéren végzett klonális vizsgálatok (Lawson et al., 1991), az ERSE és APE stádiumú egérembrókból származó egér epiblaszt őssejtek (*Epiblast Stem Cells*, EpiSCs) *in vitro* potenciálja és az azokkal végzett kiméra vizsgálatok is igazolják (Huang et al., 2012).

2.1.2 Az őssejtek besorolása potenciájuk alapján

Totipotens őssejtek (*Totipotent Stem Cells*): A totipotens őssejtek rendelkeznek a legnagyobb differenciációs képességgel az összes többi ősejtípus közül. Főként az emlősöknél, a megtermékenyített petesejt általában a 4-8 sejt stádiumig (ez azonban fajspecifikusan eltérő lehet), vagyis az embrió alkotó egyes sejtek, azaz blasztomerek totipotensnek tekinthetők, ami azt jelenti, hogy képesek egy teljes szervezetet létrehozni, beleértve az extraembriionális

szöveteket is. Ennek kísérletes bizonyítéka az embrió felezési kísérleteken alapul, ahol embrió darabolással (*embryo splitting*) identikus ikrek hozhatók létre a blasztomerekből (Illmensee and Levanduski 2010; Zakrzewski et al., 2019) (1. ábra). De itt említendő a preimplantációs genetikai tesztelés (PGT) során, általában 8-sejtes stádiumban alkalmazott blasztomer biopszia is, amelyet követően egészséges utód fejlődhet (Parikh et al., 2018).

Pluripotens őssejtek (*Pluripotent Stem Cells*, PSC): A pluripotens őssejtek legjobban ismert sejttypusa az embrionális őssejtek (*Embryonic Stem Cells*, ESCs) (Evans and Kaufman 1981; Thomson et al., 1998), amelyek a hólyagsíra állapotú embrió belső sejtcsoportjából (ICM) izolálható sejtek (1. ábra). Hosszú időn keresztül tartotta magát a nézet, hogy ezen sejtek csak az embriót felépítő embrionális szövetek, vagyis a szomatikus sejtek (a három csíralemez) és a csírasejtek létrehozására képesek. Azonban nem képesek extraembrionális szövetek (magzatburok és méhlepény (placenta) embrionális része) kialakítására. A legújabb szintetikus embrió kísérletek azonban bebizonyították, hogy az ESC és az iPSC sejtek is képesek extraembrionális szövetekké differenciálódni, amennyiben megfelelő *in vitro* tenyésztési paraméterek mellett tartják fenn azokat az ún. naív állapotban (Kagawa et al., 2022; Tarazi et al., 2022). A korábbi nomenklatúra szerint eredetük alapján további két sejttypus is ebbe a csoportba soroltak: az embrionális csírasejteket (EGCs) (Thomson and Odorico 2000), valamint az embrionális karcinóma sejteket (ECS) (Andrews et al., 2005). Ez a besorolás azonban a szintetikus embriók előállítása révén egyértelműen megváltozott és immár „csak” multipotens sejttypusként tekintünk erre a két őssejttypusra. A PSC-k sorába tartoznak továbbá az indukált pluripotens őssejtek az ún. iPSC sejtek (Takahashi and Yamanaka 2006; Takahashi et al., 2007), amelyeket később részletezek. Az embrióban belül *in vivo* a korai epiblasz sejtek azok, amelyek megőrzik pluripotens mivoltukat az embriogenezis során az implantáció során is és pluripotens sejttypusként tekintünk rájuk (1. ábra). Több állapotban, E4.5-E6.5 között izolálhatók az egér embrió epiblasz sejtrétegéből és az ún. primed pluripotens állapotot képviselik *in vitro* (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007), amelyet a későbbiekben ismertetek bővebben.

Multipotens őssejtek (*Multipotent Stem Cells*, MSC): A multipotens őssejteket szomatikus vagy felnőtt őssejteknek is nevezik a különböző szerzők, miután különböző szöveti forrásokban azonosították őket (pl. izom, csontvelő, zsírszövet, retina, hasnyálmirigy, központi idegrendszer, fogbél, bőr). Korábban úgy gondolták, hogy ezek a sejtek csak korlátozott szöveti differenciációs képességgel rendelkeznek és valószínűleg szöveti eredetűek. Az elmúlt évtized vizsgálatai azonban arra utalnak, hogy egyes szövetekből származó felnőtt őssejtek képesek lehetnek mindhárom csíralemezből (ekto-, mezo- és endoderma) származó sejttypusokká differenciálódni, amelyet transzdifferenciációnak neveztek el (Li et al., 2013; Strzyz 2016). Ez a tulajdonság a fentebb tárgyalt tranzit-populáció elméletet látszik alátámasztani, amely szerint a valódi pluripotens őssejtek leszármazottai vándorolnak a szövetekbe és ott a szöveti környezetnek megfelelő útvonalat követve differenciálódnak (Lanza and Atala 2013), azonban csíralemezek közötti differenciációs potenciáljuk fennmarad. Tipikus képviselőjük a mezenchimális őssejtek, amelyeket az irodalom szintén MSC néven rövidít.

Oligopotens őssejtek (*Oligopotent Stem Cells*, OSC): Az ún. oligopotens őssejtek szövetspecifikusan differenciálódnak. Ilyenek például limfoid (B-, T-, plazma-, és NK-immunsejtek előalakja) vagy mieloid sejtek (granulocita, vérlemezeke és vörös vérsajt előalakja) (Kondo 2010). Itt a szöveti specializáció már kifejezettebb, egy adott szövet vagy szerv megfelelő működéséhez van szükség a differenciálatlan populáció fenntartására. Azonban ezen sejtek transzdifferenciációs képességüket már részben elvesztették, nem képesek más csíralemezből származó szövetek sejtjeivé differenciálódni, csak az adott csíralemezen belül.

Unipotens őssejtek (*Unipotent Stem Cells*, USC): USC-k egyetlen érett sejttypussá differenciálódhatnak, de rendelkeznek azzal a tulajdonsággal, hogy önmegújulnak. Ilyenek például az izom őssejtek amelyek szintén a szöveti működés fenntartásában játszanak szerepet (Brack and Rando 2012).

2.1.3 Az őssejtek besorolása származásuk alapján

Embrionális őssejtek (*Embryonic Stem Cells*, ESC): Ahogy a nevük is mutatja, a preimplantációs stádiumú embriókból származnak, általában a hólyagsíra stádiumú embriók belső sejtesomójából (ICM) izolálhatóak (1. ábra). A korai embrionális fejlődés során a sejtek még differenciálatlanok maradnak, és rendelkeznek azzal a képességgel, hogy a szervezetben belül bármilyen szövettípussá differenciálódjanak, vagyis pluripotensek (Evans and Kaufman 1981) amelyet széles körben kihasználnak *in vitro* alkalmazásokban (Lanza and Atala 2013). Elsőként egér embrióból izoláltak ESC sejt vonalakat (Evans and Kaufman 1981), amelyet a humán ESC sejtek izolálása is követett (Thomson et al., 1998). Ma már számos állatfaj embrióiból létrehozta ESC vagy ESC-szerű sejt vonalakat, azonban azok pluripotenciája és a differenciáció mértéke eltérő az egér és humán sejtektől, amelyre a későbbiekben külön is kitérek. Itt kell még említést tennünk további **embrionális eredetű őssejtekről** is: Az **extraembrionális endodermális őssejtek** (*Extra-embryonic endoderm stem cells*, XEN) hasonlítanak a hólyagsíra embrió primitív endodermájához, amelyből *in vivo* normális esetben a parietális és a viscerális endoderma differenciálódik. Kiméra kísérletekben az embrióba injektálva a XEN sejtek endodermális differenciációt mutatnak (Kunath et al., 2005). Izolálásuk nem csak közvetlenül az embrióból lehetséges, hanem ESC sejt vonalakkal is a GATA6 transzkripciós faktor túlexpresszáltatása révén (Niakan et al., 2013). Hasonló módon, a trofoblaszt sejtekből is izoláltak már sejt vonalat, az ún. **trofoblaszt őssejteket** (*Trophoblast Stem Cells*, TSC) (Tanaka et al., 1998), amelyek a placenta differenciált sejtjeit adják a fejlődés során. Jelentőségük, hogy embrióba visszajuttatva a sejtek kizárólag extraembrionális-trofoblaszt differenciációt mutatnak. Az implantációt követően az egér embrió extraembrionális ektoderma (ExE) sejtjeiből is izolálhatóak, miután az ExE sejtek a trofoblaszt sejtek leszármazottai (Roberts and Fisher 2011). Kiváló modellt jelentenek a trofoblaszt differenciáció, az implantáció és a placenta differenciáció tanulmányozásához.

Epiblaszt őssejteket (*Epiblast Stem Cells*, EpiSC) embrionális őssejteknek tekintjük, azonban különböző stádiumú pre- és posztimplantációs embrió (E4.5 – E6.5 között) epiblasztból izolálhatóak, ahogy azt fentebb a pluripotens sejteknél már említettem (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Tényleges pluripotenciájuk megértéséhez azonban fontos a különböző pluripotencia állapotok megismerése is, amelyet a következő szakaszban ismertetek bővebben.

Magzati őssejtek (*Foetal Stem Cells*, FSC): Ezen sejtek a magzat szerveiben található embrionális sejt típusok. A magzati őssejtek izolálhatóak a magzati vérből és csontvelőből is; emellett a magzati májából és veséből is izoláltak már FSC sejteket (O'Donoghue and Fisk 2004). A magzati vér gazdag forrása a vérképző őssejteknek, amelyek gyorsabban szaporodnak, mint a köldökzsinórvérben vagy a felnőtt csontvelőben találhatóak (Guillot et al., 2006). Alapvetően a multipotens felnőtt őssejtekhez hasonlóak. Jelentőségük a köldökzsinórvér, placenta és más magzati sejtforrások regeneratív célra történő hosszú távú tárolása (pl. köldökzsinórvér-transzplantáció, *Umbilical Cord Blood Transplantation*, UCBT) kapcsán nőtt meg az elmúlt évtizedekben (Chou et al., 2010; Ballen et al., 2013).

Felnőtt őssejtek (*Adult Stem Cells*, ASC): Szöveti (szomatikus) őssejtekként is ismertek. Ezek olyan őssejtek, amelyek a felnőtt emlősök szöveteiben vagy szerveiben találhatóak. Feladatuk az élő szervezet szöveteinek fenntartása és javítása. A felnőtt őssejtek mai tudásunk szerint a pluripotens őssejtekből származó egyes tranzitpopulációk képviselői, így leginkább multipotens őssejtek, de az egyes publikációk különböző transzifferenciációs eredményei alapján OSC és USC sejtek is lehetnek az egyes izolátumokban, az alkalmazott eljárásoktól függően (pl. a felnőtt csontvelőből izolálható vérképző őssejtek (HSC) és mezenchimális őssejtek (MSC) is) (Oswald et al., 2004).

Indukált pluripotens őssejtek (*induced Pluripotent Stem Cells*, iPSC): Az iPSC-ket közvetlenül felnőtt sejtekből hozhatók létre, genetikai újraprogramozás módszerével. A sejteket ún. pluripotencia faktorok sejtekbe történő bevitele és túlexpresszáltatása révén lehet újraprogramozni és az ún. őssejt állapotba juttatni (Takahashi and Yamanaka 2006; Takahashi et al., 2007). A technológia az állatmodellek helyettesítésével fontos szerepet kapott a

betegségek modellezése és a gyógyszerjelöltek tesztelése területén. Az iPSC-k technológiáját és legfontosabb jellemzőit a későbbi szakaszokban ismertetem részletesen.

2.2 A pluripotencia szabályozása

2.2.1 A pluripotencia szabályozásában résztvevő főbb gének

A pluripotencia, vagyis az önmegújulás és differenciálódás korlátlan képessége a valódi, azaz pluripotens őssejtek és a totipotens embrionális sejtek tulajdonsága. Ahogy azt fentebb már részletezttem, két tulajdonság, egyrészt az önmegújulás, vagyis korlátlan osztódási képesség, valamint, a korlátlan differenciációs képesség jellemzi. Ahogy bármely más tulajdonság, a pluripotencia kialakításában is gének által kódolt fehérjék, RNS-ek és microRNS-ek vesznek részt elsősorban, amelyeket összefoglaló néven pluripotencia markerekként szokás nevezni. A következőkben a legfontosabb fehérjéket és az azokat kódoló géneket vettem sorra, a teljesség igénye nélkül, főként az egér és humán kísérletek eredményeire fókuszálva. A gének neveit *dőlt* betűvel különböztettem meg a fehérjéktől. A humán és háziasított fajok esetén mind a fehérjéket, mind a géneket nyomtatott betűvel jelöltem, míg az egér és patkány gének neveit nagy kezdőbetűvel *dőlt*en (pl. *Pou5f1*) a fehérjéket nagybetűvel jelöltem (pl. POU5F1) a nomenklátúra szerint (Blake et al., 2021). Eltérés esetén a hivatkozott faj nevét is megjelöltem az egyértelmű követhetőség miatt.

A ***Pou5f1*/POU5F1** gén/fehérje (korábbi nevén Oct3 és Oct4-ként ismert, új neve *POU Class 5 Homeobox 1*; mouse Gene ID: 18999), a POU (Pit-Oct-Unc) transzkripciós faktorok családjába tartozik (Scholer et al., 1990), először ESC-specifikus és csíravonal-specifikus transzkripciós faktorként azonosították (Zhang et al., 2007). Egérben a zigotikus gének aktiválódása előtt az aktív *Pou5f1* mRNS jelen van már a petesejtben. A zigotikus *Pou5f1* expresszió a 4-sejtes stádium körül indul, és később a belső sejtcsoport (ICM) pluripotens sejtjeire és az epiblasztra korlátozódik. Az implantációt követően az expresszió szintje tovább csökken, térben a primordiális csírasejtben (PGC) marad fenn, és minden szomatikus sejtben elnémul (Yeom et al., 1996). Szarvasmarha, sertés, rézusmajom és humán *in vitro* embrióvizsgálatok kimutatták, hogy a fehérje jelen van a hólyagcsíra stádiumú embriók trofoblaszt (TE) sejtjeiben, és nem korlátozódik a pluripotens ICM sejtekre (van Eijk et al., 1999; Kirchhof et al., 2000; Mitalipov et al., 2003; Cauffman et al., 2005), amely fajspecifikus szabályozási eltérésre utal.

A POU5F1 két SOX2 fehérjével trimer komplexet alkot a DNS-en, és számos, az embrionális fejlődésben szerepet játszó további fehérje, például a YES1, FGF4, UTF1 és ZFP206 kifejeződését szabályozzák. A *Pou5f1* gén eltávolítása (kiütése, *knock-out*) az egérembrióban az ICM életképességének és fejlődési potenciáljának hibájához vezet, letális hatású (Kehler et al., 2004). A POU5F1 fehérje *in vitro* mind a humán és egér ESC sejtekben az összejt állapotot indukáló és szabályozó transzkripciós faktorként erőteljesen expresszálódik, ugyanakkor az őssejtek differenciálódás során aktivitása markánsan és gyorsan csökken amikor a sejtek elveszítik pluripotenciájukat (Boiani and Scholer 2005; Cauffman et al., 2006). Alapvető és kulcsgén az iPSC sejtek előállításakor mind az egér, mind a humán szomatikus sejtek genetikai újraprogramozásakor (Takahashi and Yamanaka 2006; Takahashi et al., 2007; Kim et al., 2021). A *Pou5f1* gén kifejeződését cisz-szabályozó elemek szabályozzák, amelyek a transzkripció indulási helyétől 5' felfelé (upstream) helyezkednek el (Yeom et al., 1996; Pesce et al., 1999). Ez a szabályozó régió erősen konzervált a fajok között; és általában négy ún. konzervatív régiót (CR) tartalmaz a promóteren belül. A TATA nélküli minimál promóter (MP) régió mindig a gén upstream szekvenciájának első konzervatív régióján (CR1) belül található. Ez a minimál promóter további elsődleges szabályozó elemeket tartalmaz. Egérben végzett riportergén-expressziós kísérletek kimutatták, hogy két elem, a proximális enhancer (PE) és a disztális enhancer (DE) nélkülözhetetlen a *Pou5f1* expressziójának sejt-specifikus szabályozásában. A proximális enhancer (PE) feljebb, a második és harmadik konzervatív régió között (CR2 és CR3) helyezkedik el, és felelős a *Pou5f1* expressziójáért az embrionális ektodermában és az egér embrionális karcinóma (EC) sejtekben. Végül, a disztális enhancer (DE) körülbelül 2 kb-

al feljebb található, szintén egy konzervált régióban (CR4), és a *Pou5f1* expresszióját irányítja az egér morula, ICM, ESC, embrionális csíra (EG) és PGC sejtjeiben (Yeom et al., 1996; Ovitt and Scholer 1998; Nordhoff et al., 2001). Látható, hogy ez a többszintű szabályozás felelős a térbeli és időbeli expressziós mintázatért és annak fajok közötti szekvencia szintű eltérései állhatnak a megfigyelt eltérő időbeli és térbeli expressziós mintázat hátterében.

Sox2/SOX2: A SOX2 fehérje az ún. nagy mobilitású csoport (HMG) transzkripciós faktor családba tartozik (*SRY (sex determining region Y)-box 2*; mouse Gene ID: 20674), amelyről kimutatták, hogy központi szerepet játszik mind egér mind pedig humán sejtekben a pluripotenciát szabályozó transzkripciós hálózatban (Ginis et al., 2004). A SOX2 más őssejt transzkripciós faktorokkal, mint a POU5F1 és a NANOG egy kritikus szabályozási hálózatot alkot, amely más gének transzkripcióját szabályozza, és fontos az ICM és a TE kialakulásában a preimplantációs embrió fejlődés szakaszában (Niwa et al., 2005). Az *Fgf4* expressziójának szabályozásában is részt vesz mindkét fajban. Emberben a SOX2 helyettesíthető a SOX család közeli rokon tagjaival, a SOX1 és SOX3-mal az iPSC-k előállítása során (Takahashi et al., 2007), de nem helyettesíthető távolabbi tagokkal (Nakagawa et al., 2008), ugyanakkor a SOX2 vagy a SOX családba tartozó helyettesítője nem elhagyható az újraprogramozás során (Kim et al., 2021), amely kulcsszerepét bizonyítja a pluripotencia szabályozásában.

Klf4/KLF4: A KLF4 fehérje egy transzkripciós faktor (*Krueppel-like factor 4*; mouse Gene ID: 16600), amely mind az emberben, mind az egérben aktivátorként és/vagy represszorként is viselkedik bizonyos génexpressziós szabályozási folyamatokban. Például, szükséges a bőr barrier funkciójának kialakításához, a szemfelszín posztnatális éréséhez; részt vesz a hámsejtek differenciálódásában, és a csontváz és a vese fejlődésében; de represszorként hozzájárul a p53/TP53 transzkripció blokkolásához (Rowland and Peeper 2006). Ha a KLF4 túlreprezentált a pluripotens sejtekben, akkor az magasabb POU5F1 szintet eredményez, ami arra enged következtetni, hogy a KLF4 elősegíti az önmegújulást (Papapetrou et al., 2009). Az iPSC előállítás egyik nélkülözhetetlen faktora, nem helyettesíthető a genetikai újraprogramozásban (Takahashi and Yamanaka 2006; Kim et al., 2021).

Myc/MYC: A MYC fehérje (*myelocytomatosis oncogene*; mouse Gene ID: 17869) szerepet játszik az ESC-k fenntartásában a LIF/STAT3 útvonal mentén (Cartwright et al., 2005). Jelentős szerepe van a sejtnövekedésben, differenciálódásban, proliferációban és az őssejtek önmegújulásában mind az emberben, mind az egérben. Főként limfoid és leukémia daganatsejtekben gyakran túlexpresszálódik, amely a proliferációs szabályozási kaszkádban való szerepére utal. Az iPSC sejtek első létrehozásakor a 4 transzkripciós faktor egyike volt (Takahashi and Yamanaka 2006), amelyet onkogén szerepe miatt más kombinációkban igyekeztek kiváltani (Nakagawa et al., 2008; Wernig et al., 2008; Li et al., 2011).

Nanog/NANOG: A NANOG fehérje (*Nanog homeobox*, mouse Gene ID: 71950) fontos homeobox transzkripciós faktor, amely részt vesz az ESC-k önmegújulásában, és kritikus tényező a PSC-k differenciálatlan állapotának fenntartásában (Chambers et al., 2003). A NANOG specifikusan kifejeződik a pluripotens sejtekben (mind egér mind humán ESC és PSC sejtekben), és alapvető szerepet játszik a pluripotens egér ESC-k fenntartásában, a differenciált sejtekben nem expresszál (Mitsui et al., 2003; Silva et al., 2009). Magas expressziós szintje lehetővé teszi az egér ESC-k önmegújulását külső LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) forrás hiányában, és blokkolja a primitív endoderma differenciálódását, ami arra utal, hogy a LIF faktor egyik fő downstream effektora a kaszkádban (Chambers et al., 2003).

Fgf4/FGF4: A fibroblaszt növekedési faktor 4 fehérje (*Fibroblast growth factor 4*, mouse Gene ID: 14175) a fibroblaszt növekedési faktor (FGF) család tagja széleskörű mitogén és sejt-túlélési aktivitással rendelkezik, és számos biológiai folyamatban vesz részt, beleértve az embrionális fejlődést, a sejtnövekedést, a morfogenezist, a szövetek helyreállítását, a tumorok növekedését és invázióját. Az FGF4 aktiválja a foszfatidil-inozitol-3-OH-kináz/protein kináz B (PKB) és a RAS-MEK-ERK intracelluláris jelátviteli kaszkádokat. Fontos szerepet játszik az embrionális őssejtek fenntartásában és differenciálódásuk megakadályozásában, valamint *in vivo* az implantáció során (Kim et al., 2009).

Tbx3/TBX3: A T-box3 fehérje (mouse Gene ID: 21386) a T-box transzkripciós faktor család legkorábban kifejeződő tagja, részt vesz a pluripotencia fenntartásában és indukciójában. Expressziójának elvesztése (*knock-out*, *knock down*) a pluripotencia elvesztését eredményezi. A TBX3 nélkülözhetetlen a naiv pluripotencia indukciójához és fenntartásához, valamint a csírasejtek fejlődéséhez is (Russell et al., 2015). A WNT útvonal szabályozása, repressziója révén a mezoderma irányú differenciáció blokkolásáért felelős egérben (Waghray et al., 2015)

Lin28/LIN28: A LIN28 (*lin-28 homolog A*, mouse Gene ID: 83557) egy RNS-kötő fehérje, amely a mikroRNS let-7 szabályozásán keresztül a pluripotenciát elősegítő szerepéről ismert, a naiv és a primed pluripotencia állapotok közötti metabolikus váltásban játszik fontos szerepet. Egérben és emberben a LIN28 a fejlődés korai szakaszában és a differenciálatlan szövetekben expresszálódik (Faas et al., 2013). A LIN28 expressziót viszont a fibroblaszt növekedési faktor (FGF) -ERK jelátviteli útvonal szabályozza (Zhang et al., 2016).

Dppa3/DPPA3: A DPPA3 fehérje (*Developmental pluripotency-associated protein 3*; mouse Gene ID: 73708) egerekben a fejlődés preimplantációs szakaszában anyai faktorként működhet, míg humán ESC sejtekben a pluripotencia megőrzéséért felel. Fontos szerepet játszik az imprinting szabályozásában, az anyai DNS demetiláció megakadályozásában. Expresszál a gonádban, beleértve mindkét nem ivarsejtjeit (petesejt és a spermium sejt), a korai preimplantációs embrióban, ahol már anyai citoplazmatikus faktorként is jelen van. Megfelelő expressziója kulcsfontosságú a teljes genetikai újraprogramozás szempontjából. Az iPSC sejtek kiméra képző potenciálja a csökkent vagy nem megfelelő DPPA3 expresszió esetén blokkolt (Xu et al., 2015).

2.2.2 A pluripotencia szabályozása: Naiv, Primed és Rozetta állapot

A pluripotens őssejteket két különböző pluripotencia állapotba lehet sorolni: naiv és primed (Weinberger et al., 2016). A preimplantációs embriókban az ICM sejtjei *in vivo* pluripotens őssejtek, amelyek naiv állapotúak (alapállapot). Az egér ESC-kről kimutatták, hogy *in vitro* megtartják az ICM számos molekuláris jellemzőjét, vagyis naiv állapotúnak tekinthetők (Nichols and Smith 2009). Később a pluripotens sejtek egy másik típusát, az EpiSC sejteket az implantáció utáni rágszáló epiblasztokból izolálták, amelyekre más expressziós mintázat volt jellemző (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). A naiv ESC-khez képest az EpiSC-k egy „alternatív” pluripotencia-mintázatot mutatnak, az úgynevezett primed pluripotens állapotban vannak. A különböző pluripotens sejtek között jelentős molekuláris és funkcionális különbségek írhatók le, amelyek később befolyásolják jellemzőiket, működésüket és terápiás szempontból felhasználásuk lehetőségeit is (Li and Ding 2011; Huang et al., 2014). Bár a rágszáló pluripotens őssejtek mind primed, mind naiv pluripotens állapotban létezhetnek, a naiv állapotot emberi sejtekben hosszú időn át nehéz volt létrehozni (Nichols and Smith 2009; Gafni et al., 2013). Ez a két stádium különbözik egymástól a morfológia, a génexpressziós profil és a DNS-metilációs profil tekintetében, de mindkettő képes a három csíraréteg sejtjeivé differenciálódni. A naiv állapotú pluripotens őssejtek például az egér ESC-k és egér iPSC-k, míg az egér késői, implantációt követő fejlődési stádiumában izolált epiblaszt őssejtek (mEpiSC), a humán iPSC-k és ESC-k a primed állapotot képviselik (Davidson et al., 2015; Weinberger et al., 2016).

Az egér naiv ESC-eket és a primed EpiSC-eket mesterségesen, *in vitro* tenyésztési körülmények között exogén citokinek és/vagy kis molekulájú inhibitorok folyamatos adagolásával pluripotens állapotban lehet tartani. Ezek a faktorok olyan jelátviteli útvonalakat szabályoznak, amelyek pozitívan vagy negatívan befolyásolhatják a naiv és a primed pluripotencia stabilitását, amelyet transzkripciós faktorok hálózata szabályoz. A következő táblázat a naiv és primed állapot közötti legfőbb jellemzőket összegezi egér sejtútvonalak esetén (1. táblázat).

Egér ESC kísérletek során a klasszikus egér embrionális fibroblaszt és magzati szarvasmarha szérum (*Fetal Bovine Serum*, *FBS*) használatának kiküszöbölése volt a cél, amikor az ún. 2i sejttenyésztő oldat komponensei és a tenyésztési paraméterek meghatározásra kerültek. A STAT3/JAK útvonalat aktiváló Leukémia inhibitor faktor (*Leukaemia Inhibitory Factor*; *LIF*)

kulcsfontosságú összetevőnek bizonyult, amely lehetővé tette az egér ESC-k tápláló fibroblaszt sejtréteg (*Mouse Embryonic Fibroblast*, MEF) nélküli, de FBS/LIF körülmények között történő fenntartását és növesztését (Smith et al., 1988). A BMP4 alacsony dózisban való kombinálása LIF-el azonban már lehetővé tette a MEF sejtek kiküszöbölését is (Ying et al., 2003), míg a MEK útvonalat (MAP kináz/ERK kináz szignalizációs útvonal) blokkoló inhibitorok alkalmazása a szérumentes fenntartást biztosította. Ez utóbbi inhibitor kombinációt „2i”-nek nevezték [leggyakrabban: szelektív GSK3 inhibitor CHIR99021 (röviden CHIR), és MEK inhibitor PD325901 (röviden PD)], míg a fenntartás paramétereit 2i/LIF-ként hivatkozza az irodalom (Ying et al., 2008). Az egyes inhibitorok alkalmazásának különböző változatait is publikálták (Dutta et al., 2011; Shimizu et al., 2012), azonban a 2i/LIF paraméterek bizonyultak a leginkább a naiv állapotot sikeresen fenntartónak az egér ESC sejtek esetén (Weinberger et al., 2016).

1. táblázat: A naiv és a primed pluripotens összejt állapot főbb jellemzői egérben

Tulajdonság	Naiv állapot	Primed állapot
<i>In vivo</i> embrionális megfelelője:	korai epiblaszt (implantáció előtti)	epiblaszt (peri-/posztimplantációs)
Kolónia megjelenése:	kompakt, kupola forma	lapított
Expresszáló fő pluripotencia gének:	<i>Pou5f1, Nanog, Sox2, Klf2, Klf4, Klf5, Zfp42, Esrrb, Dppa3, Tfcp2l1, Fgf4, Tbx3</i>	<i>Pou5f1, Nanog, Sox2, Dmrt3b, Fgf5, Pou3f1, Meis1, Otx2, Sox11, Gdf3, Sox11</i>
<i>Pou5f1</i> enhanszer aktivitás:	disztális (DE)	proximális (PE)
Globális DNS-metiláció:	hipo-metilált	hiper-metilált
Női X-kromoszóma státusz:	két aktív X	egy inaktív X
Klonogenitás:	magas	alacsony
Géntargetálás:	alkalmas	alacsony hatékonyság
Kimérai képzés rágsálókban:	magas	alacsony
Növekedési faktor:	LIF	Aktivin A, FGF2

Ezzel szemben az EpiSC sejteket FGF2/Aktivin A sejtenyésztő oldathoz adásával sikerült izolálni, nem a LIF szignalizáció biztosításával. Expressziós mintázatuk mellett leginkább az különbözteti meg őket az ESC sejtektől, hogy késői epiblaszt eredetük miatt hólyagsíra állapotú embrióba injektálva nem képeznek kimérákat (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007), azonban mindhárom csíralemez sejteivé képesek differenciálódni, sőt ha *ex vivo* injektálják posztimplantációs embrióba, akkor alacsony százalékban de kiméra embriókat képezhetnek (Huang et al., 2012).

Az ember és az egér között azonban azonosítottak néhány további lényeges eltérést a naiv pluripotencia szabályozásában. Úgy tűnik, hogy az FGF2/Aktivin A és a BMP4 alacsony dózisai éppen ellentétes hatást gyakorolhatnak a különböző fajok összejtjeinek stabilitására *in vitro*. Az első humán ESC sejtek izolálásakor már nyilvánvaló volt a fajok közötti különbség: a LIF nem volt képes fenntartani a humán ESC sejtek pluripotenciáját, FGF2 és a TGFβ1/Aktivin A volt szükséges a sejtek pluripotens stádiumának fenntartásához (Thomson et al., 1998). Az egér ESC sejtvonalak ún. non-permisszív egértörzsekből való sikeres izolálása, a 2i médium kondíció meghatározása, valamint az EpiSC sejtek izolálása felvetette annak lehetőségét, hogy a humán ESC sejtek más körülmények között való fenntarthatósága nem feltétlenül csak fajok közötti eltéréssel magyarázható, inkább a primed stádium jellemzője. Ezt azután génexpresszió, és epigenetikai összehasonlító elemzések is alátámasztották (Weinberger et al., 2016). A fentiek ellenére fontos megjegyezni, hogy a humán hagyományos/primed ESC sejtek nem azonosak az egér EpiSC sejtekkel pluripotenciájukat tekintve. Összehasonlítva „kevésbé primed” sejteknek lehetne nevezni a humán ESC sejteket. Ezért a kutatások itt is a naiv humán állapot definiálására irányultak. Az első sikeres lépések transzgének expresszáltatása révén próbálták elérni a naiv stádiumot, így POU5F1/KLF4 vagy KLF2/KLF4 fehérjék folyamatos expressziója 2i/LIF kondíciók között is fenntarthatóvá tette a humán ESC

és iPSC sejteket (Hanna et al., 2010). Azonban a transzgenikus megközelítés, habár bizonyította, hogy lehetséges naiv állapotban is fenntartani humán őssejteket, mégis korlátozta azok jövőbeni felhasználhatóságát éppen a genetikai módosítás miatt. Ezért a kísérletek tovább folytak a humán őssejtek naiv stádiumának meghatározására, transzgén független tenyésztési kondíciók irányába. A 2i/LIF kondíciót további faktorokkal kiegészítve (P38 inhibitor, JNK inhibitor, aPKC inhibitor, ROCK inhibitor, alacsony dózisú FGF2 és TGFβ1/Activin A kiegészítés) sikerült az egér naiv ESC sejtekhez hasonló, de nem azonos, mégis naiv állapotúnak tekinthető humán ESC sejtenyészeteket létrehozni (Gafni et al., 2013). A különböző protokollok, amelyek ez után láttak napvilágot mind hasonló, teljes MEK inhibíciót próbáltak elérni, amely MEF-függő vagy éppen tápláló sejtréteg független tenyésztést tett lehetővé. A humán sejtek esetén az „5i/LA-MEF” tenyésztési paraméterek terjedtek el leginkább (Takashima et al., 2014; Theunissen et al., 2014). A kísérletek eredményei megmutatták, hogy humán preimplantációs embrionális sejtvonalak esetén is elérhető *in vitro* körülmények között a naiv stádium. **Azonban a fajok közötti különbségek miatt ezek nem egymás megfelelői.** A módszertan fejlődésével az RNS szekvenálás révén kiderült, hogy az egér embrió ICM sejtjei és a humán embrió ICM sejtjei számos eltérést mutatnak génexpressziós szinten a pluripotencia szabályozásában is. Például, a KLF2 (*Krüppel-like Factor 2*) és az ESRRB (*Estrogen Related Receptor Beta*) amelyek egérben fontos pluripotencia faktor fehérjék, a humán hólyagsíra stádiumú embrióban nem expresszálnak (Weinberger et al., 2016).

A legújabb kutatások a naiv és primed stádium közötti átmeneti stádiumot vizsgálva határozták meg annak jellemzőit egérben. Az átmeneti stádiumot a szerzők tanulmányukban „**rozetta**” pluripotens stádiumnak nevezték, ahol megállapításuk szerint, mind a WNT útvonal, amely a naiv stádium jellemzője, mind az FGF/ERK útvonal, amely pedig a primed stádium jellemzője blokkolva van. Ebben a stádiumban mind a KLF4 mind az OTX2 fehérjék kifejezett expressziója figyelhető meg, amelyek egyfajta egyensúlyt tartja fenn a rozetta állapotot. Ha a KLF4 túlsúlyba kerül és a WNT útvonal inhibíciója megszűnik a sejtek naiv állapotba kerülhetnek. Ellenkező esetben, ha a KLF4 szintje drámaian lecsökken és az OTX2 szint válik dominánsá, beindul az OCT6 fehérje expresszió és ez felszabadíthatja az FGF/ERK gátlást, amely a primed állapotba „löki” a sejteket (Neagu et al., 2020). Természetesen, ezen faktorok (fehérjék, kismolekulák, szérum) *in vitro* tenyésztő médiumhoz való adagolása (vagy éppen megvonása) az egyes sejtpopulációk adott állapotban való fenntartását vagy átalakulását eredményezi. Korábbi tanulmányok már feltételezték egy ilyen átmenetinek tekintett „alakuló” vagy „formálódó” (angolul *formative*) stádium létét, azonban sem a szignalizációs útvonalat, vagy annak irányításában szerepet játszó kulcs géneket nem írták le, sem stabil *in vitro* tenyészetben fenntartani nem tudták az „epiblaszt-szerű” sejteket (Buecker et al., 2010; Hayashi et al., 2011; Kalkan and Smith 2014), így az áttörésre a közelmúltig kellett várni, a rozetta stádium közelmúltban történt meghatározásáig (Neagu et al., 2020).

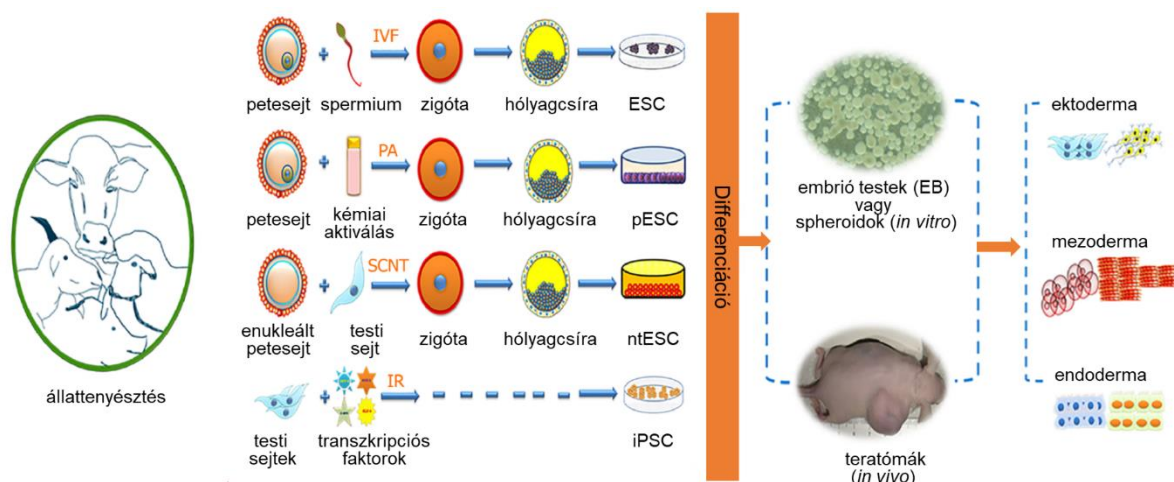
Ez utóbbi, a rozetta stádiumra jellemző génexpressziós mintázat meghatározása kutatásaim kezdetén nem volt elérhető, azonban az új eredmények tükrében várható, hogy humán embrionális sejtek és sejtvonalak hasonló vizsgálatai követik majd az egér vizsgálatokat, amelyek a pluripotencia szabályozásának jobb megértéséhez vihetnek közelebb. Ez pedig biztonságosabb és szélesebb körben alkalmazható őssejt vonalakat eredményezhet nem csak emberben, de a különböző fajokban egyaránt, amely a sejtherápiák elengedhetetlen feltétele.

Az RNS szekvenálás térhódítása és az egyre kisebb minta mennyiség, immár az egy-sejt szekvenálás lehetősége hihetetlen adathalmazt eredményezett az elmúlt néhány évben. Ennek köszönhetően mid a gasztruláció folyamatai (Lohoff et al., 2022; Qiu et al., 2022), mind pedig az egér embrió gasztrulációtól a magzat megszületésig zajló génexpressziós változásai (Qiu et al., 2024) térképezésre kerültek, kijelölve azokat a fő transzkripciós faktorokat, amelyek az egyes sejt- és szövetspecifikus differenciálódási lépések, a térbeni és időbeli expressziós változások irányításában szerepet játszanak. Ezen adatok révén nemsokára elérhetővé válhat a teljes embrionális fejlődés génszabályozási térképe, amely a fejlődésbiológiai folyamatok, de

leginkább az azokban bekövetkező deformitások, eltérések felismerésében lehet döntő. Mindez pedig komoly hatással lehet a fejlődésbiológiai rendellenességek okainak megértése és lehetséges terápiák kidolgozása terén.

2.3 Pluripotens őssejtek használatokban

Bár az első ESC-vonalakat több mint 30 évvel ezelőtt állították elő (Evans and Kaufman 1981; Martin 1981), a pluripotens tenyészetek létrehozása az egér- és főemlősökön kívül más fajok esetében kihívást jelentett. A siker hiánya annak tudható be, hogy sokáig nem ismertük eléggé a pluripotencia hátterében álló molekuláris mechanizmusokat azokban az embrionális szövetekben, amelyekből az ESC-ket általában származtatják az egyes fajokban. Hosszú ideig tartotta magát a nézet, hogy az ESC sejteket az implantáció előtti embrió belső sejtsomójából kell izolálni – figyelmen kívül hagyva a génexpressziós különbségeket, csak egy paramétert, az implantációt véve figyelembe, mint állapotjelző. Holott az egyes embriók komoly morfológiai, funkcionális és génexpressziós eltéréseket mutatnak már a preimplantációs embrió fejlődési szakaszban is. Igazából a naiv és primed állapot leírása, majd pedig az azt követő intenzív sejtenyésztési fejlesztések, valamint a génexpresszió nagy áteresztőképességű módszerekkel való vizsgálatának fejlődése vezetett ahhoz, hogy a háziállatok egy részében is sikerült pluripotens őssejteket létrehozni. Az iPSC sejtek sikeres létrehozásáról már több fajon beszámoltak az elmúlt évtizedben, így a háziállatok esetén is elérhető módszertanná vált a pluripotens sejtek alkalmazása az utóbbi néhány évben (Scarfone et al., 2020) (2. ábra). Az iPSC-k előállítására vonatkozó protokollokat sertés (Ezashi et al., 2009), ló (Nagy et al., 2011), kutya (Shimada et al., 2010), szarvasmarha (Bai et al., 2016), csirke (Yu et al., 2014), kecske (Song et al., 2013), juh (Bao et al., 2011) és macska (Zhou et al., 2019) fajokra dolgozták ki. A nyúl esetén az iPSC előállítás, habár sikeres, primed állapotú sejteket eredményezett, amelyet részben a médium összetétel módosításával lehetett részben módosítani (Honda et al., 2010; Honda et al., 2013). Az állatgyógyászati kórképek kezelésében betöltött jelentőségük mellett a sertés-, kutya- és lómodellek értékesnek bizonyultak a humán betegségek tanulmányozásában is (Smith et al., 2014; van Steenbeek et al., 2016; Uto et al., 2018).



2. ábra: Pluripotens őssejtek előállítása haszonállatokból és azok differenciáltatási lehetőségei. Az embrionális őssejtek (ESC) mellett kémiai aktiválást követően partenogenetikus embriók, majd azokból partenogenetikus őssejtek (pESC) izolálhatók *in vitro*. Míg a genetikai újraprogramozás két eljárását használva sejtmagátültetéssel létrehozott embriókból ntESC sejtvonalak, még a testi sejtek genetikai újraprogramozásával iPSC sejtek hozhatók létre. A négy pluripotens sejttípus azután *in vitro* sejtenyésztetben, vagy *in vivo* kiméra állatokban vizsgálható. (IVF: *In vitro* megtermékenyítés; PA, Parthenogenetikus aktiválás; SCNT: Szomatikus sejtmagtranszfer; IR, indukált újraprogramozás). Módosítva Kumar publikációja alapján (Kumar et al., 2021).

Azonban az embrionális őssejtek izolálása terén továbbra sem történt jelentős áttörés. Az ún. primed stádiumú sejtvonalak esetében néhány fajon a korábban ESC vagy ESC-szerű

sejtvonalak izolálásakor használt módszertan és sejtenyésző oldat kombinációk javításával sikerült némi előrehaladást elérni, de naiv stádiumú, az egérhez hasonlatos „valódi” pluripotens tulajdonságokat felmutató (úgy mint: EB képzés a 3 csíralemez irányában differenciálódott sejtekkel; teratóma képzés immundeficiens egérben; valamint kiméra képzés a gonádba való beépülés) nem sikerült továbbra sem létrehozni a háziállatok esetében (Blomberg and Telugu 2012). Az ún. primed stádiumú ESC-szerű sejteket szarvasmarha, sertés, juh, kecske, ló és bivaly fajokon izoláltak (Kumar et al., 2021). Patkányban sikerült először a 2i médium publikálását követően valódi ESC sejteket létrehozni (Li et al., 2008). Jelentős előrelépést értek el továbbá sertés (Vassiliev et al., 2011; Gao et al., 2019) nyúl (Honsho et al., 2015) és kutya (Vaags et al., 2009) ESC sejtekkel, azonban e sejtek sem tekinthetők továbbra sem naiv ESC sejteknek. A sikertelenségéhez több tényező is hozzájárulhat. Először is, a haszonállatok kezdeti embrionális fejlődése jelentősen eltér a rágsálókétól, másodszor, az ismert pluripotencia markerek a haszonállatok ESC sejtjei esetében kevésbé egyértelműek, valamint, a pluripotencia állapotok, a naiv és a primed állapotok, elég rosszul definiáltak a haszonállatoknál. Keveset tudunk tehát a korai embriófejlődés során *in vivo* a pluripotencia hátterében álló mechanizmusokról haszonállataink esetén. Ezért a pluripotens embrionális szövetek fajok közötti molekuláris összehasonlítása értékes betekintést nyújthat a naiv pluripotens őssejtek sikeres létrehozásába (2. ábra) (Kumar et al., 2021).

2.4 Genetikai újraprogramozás

A genetikai újraprogramozás fogalma nem más, mint az a folyamat, amikor egy adott sejt DNS-állománya a korábban az egyedfejlődés során kialakult és rögzült, ún. epigenetikai kódot teljes egészében vagy túlnyomó részben elveszíti. Ennek következtében pedig a létrejövő, ún. újraprogramozott sejt fejlődési potenciálja kitágul, és eredeti, az embrionális differenciáció során rögzült programjától eltérően más fejlődési irányba is képes átalakulni. Habár a megfogalmazás bonyolultnak tűnik, mégis egyszerűen meghatározza a folyamat legfontosabb ismértétét. E szerint az elsődleges genetikai kódon kívül (a DNS molekulában a nukleotidok sorrendje által kódolt információ, amely aminosavakat kódol), a DNS molekula többértékű információt is hordoz. Így a metilációs mintázat, a kromoszómákba rendeződés során a nukleoszómában található hisztonok acetilációs mintázata, vagyis a DNS és annak kromoszómává való felépülésében szerepet játszó faktorok is hordoznak egy ún. epigenetikai információt, amely az egyes gének kifejeződését (génexpresszió) szabályozza térben (pl. szöveti szinten) és időben (pl. az egyedfejlődés során). Ez a mintázat az, amely részben az egyedfejlődés során determinálódik (pl. az ún. imprintált gének metilációja a hólyagcsíra stádiumban alakul ki), részben viszont a teljes élethossz során, például környezeti tényezők befolyása alatt is (pl. dohányzás, táplálkozási szokások) megváltozhat. A laboratóriumban alkalmazott genetikai újraprogramozási eljárások az egyedfejlődési program „leradírozására” törekednek, vagyis már differenciálódott sejteket (pl. bőrsejt) készítetnek az embrionális fejlődés korai szakaszába való „visszalépésre” az epigenetikai mintázat, ebből eredően pedig a génexpressziós mintázat megváltoztatására.

A genetikai újraprogramozás ma ismert legtöbbet alkalmazott két fő módszere a sejtmagátültetés (*Nuclear Transfer, NT*) és az indukált pluripotens őssejt (*induced Pluripotent Stem Cell, iPSC*) előállítási technológia. Ismert azonban a sejtfúzió is mint genetikai újraprogramozási eljárás, azonban e módszer alkalmazása kevésbé elterjedt a korlátai miatt (Tada et al., 2001; Do et al., 2007), így ezzel a módszerrel részleteiben nem foglalkozom dolgozatomban. Mielőtt a technikai részleteket ismertetném a sejtmagátültetés és indukált pluripotens őssejtek előállítása kapcsán, néhány további fogalom tisztázása is szükséges.

Az első mindjárt a klón fogalma, amelyet Herbert J. Webber amerikai botanikus alkotott meg 1903-ban. Definíciója szerint klónnak tekintjük az ugyanazon egyedtől (őstől) származó, ivartalan szaporítás által létrehozott, genetikailag azonos élőlények összességét (populációját). Mindez azt jelenti, hogy több, a növénytermesztésben és növénytermesztésben már nagyon

régen ismert és alkalmazott szaporítási mód szintén klónozásnak tekintendő. A klónok létrehozása, mint eljárás tehát csak az állatvilágban és különösképpen a gerincesek, illetve emlősök esetén tekintendő új eljárásnak. Ebben az értelemben az identikus (egypetés, monozigotikus vagy embriófelezéssel létrehozott) ikrek szintén klónoknak tekinthetők, mivel genetikailag azonos egyedekről van szó.

Elsőként John B. Gurdon mutatta meg nukleáris átprogramozással, hogy a felnőtt szomatikus sejtek visszaalakulhatnak őssejteké. Egy ebihal szomatikus sejtjének magját ültette át egy enukleált petesejtbe, bizonyítva, hogy a petesejt citoplazmájában lévő faktorok képesek a szomatikus sejtmagokat pluripotens állapotba átprogramozni, így sikerült klónozott békát kapnia (Gurdon et al., 1958; Gurdon 1962), ugyanakkor csak 1975-ben sikerült igazolnia hogy terminálisan differenciálódott limfocita sejtek sejtmagját, nem embrionális sejteket használva is végbemegy a folyamat (Wabl et al., 1975). Ami azt jelenti, hogy a sejtek nem veszítették el az „információt” a differenciálódásuk során, a „nem használt” gének csak elnémultak, de megfelelő ingerekre újra aktiválhatók. Ez a felfedezés fontos lépés volt a sejtmagátültetési genetikai újraprogramozás és később az iPSC sejtek előállításának módszertana megalkotása tekintetében. Ugyanis, ha az információ minden sejtben megtalálható a differenciált állapotban is, akkor, ha módot találunk az egyes gének újra aktiválására a sejt sorsa megváltoztatható.

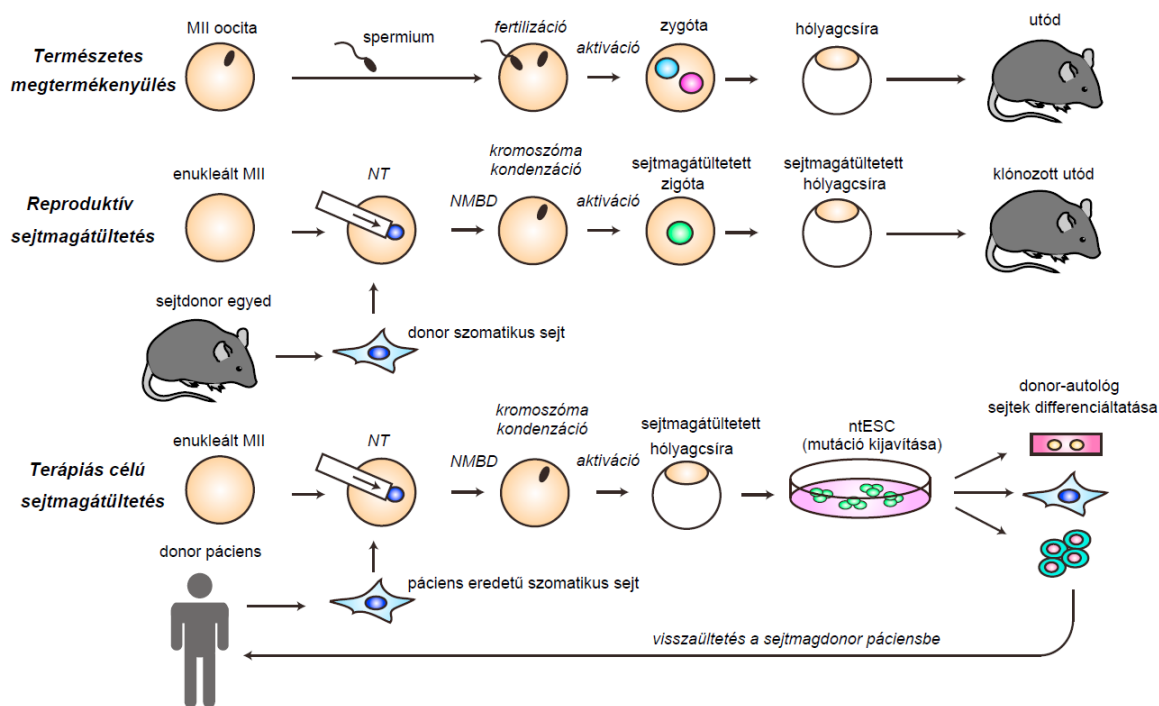
A következőkben a két legfontosabb és legelterjedtebb újraprogramozási módszert mutatom be.

2.4.1 Genetikai újraprogramozás sejtmagátültetéssel

A sejtmagátültetési újraprogramozás során egy testi – vagyis már differenciálódott – sejt sejtmagját helyezik egy olyan petesejt citoplazmájába, amelyet előzőleg saját sejtmagjától megfosztottak, vagyis enukleáltak. A befogadó petesejt citoplazmáját és sejtmagját azután fuzionáltatva és különböző kezeléseket alkalmazva „újraindítják”, és osztódó embriót hoznak létre. Amennyiben az embriókat recipiens nőtényekbe ültetik, egy már differenciálódott sejt újraprogramozása révén egy teljes embrionális fejlődési program zajlik le, és létrejön egy teljes élőlény, a kiindulási sejtmagdonor egyed klónja.

Emlősök esetén az első felnőtt egyed testi sejtjének sejtmagátültetéssel történő genetikai újraprogramozása sajtószenzáció lett 1996-ban: egy juh emlőszövetének tenyészetéből származott sejtmagot ültettek egy másik juh fajta enukleált petesejtjébe (Wilmut et al., 1997). Az eredmény Dolly bárány születése volt, amely igen komoly etikai vitákat váltott ki. Ezt követően alig két év leforgása alatt több független laboratórium egér, szarvasmarha és rézusmajom fajokon is igazolta a genetikai újraprogramozás sejtmagátültetési módszerének sikerességét, sőt mi több, genetikai módosításon átesett sejtmagdonor sejtek felhasználásával transzgenikus juh klónokat is létrehozta (Wilmut et al., 2015). Mára több mint 25 fajon számoltak be sikeres sejtmagátültetési genetikai újraprogramozásról (Wilmut et al., 2015; Matoba and Zhang 2018). Azonban az erőfeszítések ellenére egy technikai kihívásokkal is terhelt, továbbra is alacsony hatékonyságú eljárásról van szó, ha a megszületett, életképes utódok számát vesszük figyelembe (Beyhan et al., 2007). Ugyanakkor meg kell jegyeznünk, hogy a sejtmagátültetett hólyagcsíra állapotú embriók előállítása valamivel sikeresebb folyamat (Wilmut et al., 2015; Matoba and Zhang 2018; Gouveia et al., 2020).

A szomatikus klónozás felhasználható genetikailag módosított haszonállatok több példányának előállítására, transzgenikus állatok előállítására gyógyszeripari fehérjék előállításához vagy veszélyeztetett fajok megőrzésére tett erőfeszítések során. Ugyanakkor a génműködés tanulmányozásának alapvető eszközévé is vált különös tekintettel az epigenetikai szabályozás területén (Jaenisch et al., 2005; Beyhan et al., 2007; Dinnyes et al., 2008). A következő ábrán az emlős sejtmagátültetés lépéseit mutatom be (3. ábra).



3. ábra: Sejtmagátültetési genetikai újraprogramozás. A felső sor a hagyományos megtermékenyülés, a középső a reprodukció, utód létrehozására irányuló sejtmagátültetés, még az alsó sor a terápiás célú sejtmagátültetés fő lépéseinek sematikus bemutatása. Módosítva Matoba és Zang közleménye alapján (Matoba and Zhang 2018).

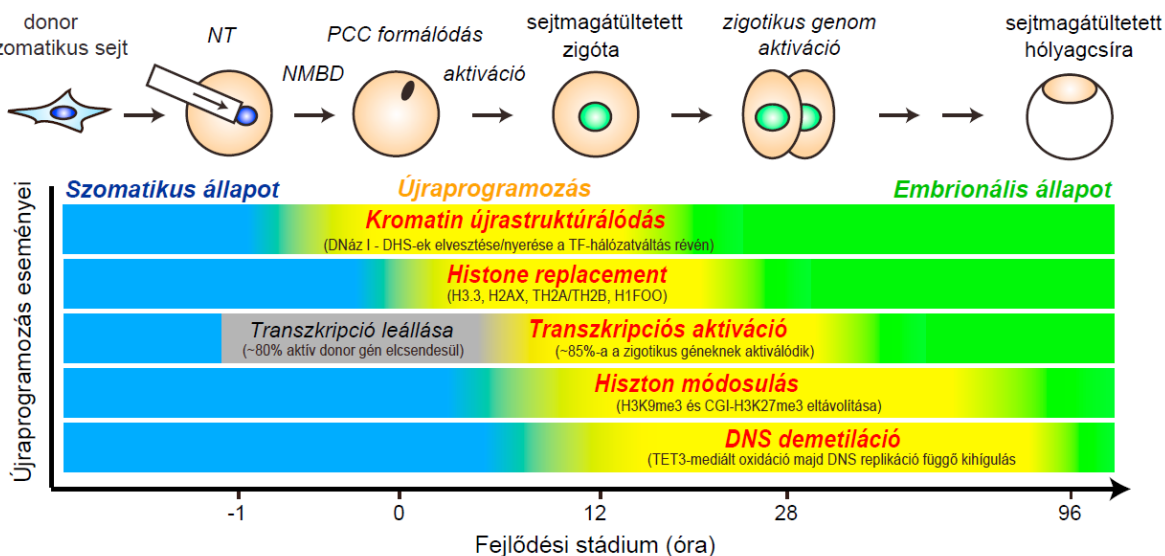
A pluripotens embrionális őssejtek (ESC) a regeneratív orvoslásban a sejt pótló terápiákban alkalmazható potenciális sejtforrást biztosíthatnak. A sejt pótlási kísérletek során a megtermékenyített embrió hólyagszóra állapotából származó hagyományos ESC-k immunreakciót okozhatnak, ha differenciált származékaikat beültetik. Azonban a páciens saját sejtjeivel genetikailag azonos ESC-k potenciális megoldást jelenthetnek a kilökődés problémájára (Smith 1998). A szomatikus sejtekből sejtmagátültetéssel (SCNT) nyert ESC-k jó modellt jelentenek a szövettanilag kompatibilis őssejtekre épülő új terápiák kifejlesztéséhez, akár transzgenikus sejt vonalak előállítására (például génhibák javítása, vagy fehérjék termelése) és alkalmazása révén is (Hipp and Atala 2008; Nishikawa et al., 2008).

Habár a mikromanipulációs technikák, illetve a sejtmagátültetési genetikai újraprogramozás módszertana nem képezi részét a dolgozatnak, mégis, a pontosabb megértés érdekében röviden bemutatom az alábbiakban a dolgozat szempontjából releváns információkat. Három fő mikromanipulációs módszer terjedt el egér hólyagszóra stádiumú NT embriók létrehozására: sejtfúzió (CF) (Ogura et al., 2000), piezoelektromos mikroinjektálás (PEM) (Wakayama et al., 1998) és az ún. *zona pellucida*-mentes (ZF) (Ribas et al., 2005) sejtmagátültetési eljárás. A piezoelektromos sejtmag transzfer közvetlen sejtmag injekciót biztosít a donorsejtből származó citoplazma minimális átvitelével, és megkerüli a fúzió szükségességét is. A legtöbb klónozott egér embrió, PEM-NT módszerrel hozták létre (Wakayama et al., 2005b; Wakayama et al., 2006), így az ntESC-k jelentős része is e módszerrel létrehozott embriókból származott.

A *zona pellucida*-mentes sejtmagtranszfer módszerét haszonállatokon (szarvasmarha, juh, sertés és ló) vizsgálták, és az eredmények a hagyományosnak tekinthető zárt zónás (PEM) rendszerrel szemben a *zona pellucida*-mentes módszert részesítették előnyben (Lagutina et al., 2007) számos esetben a háziállatok vastagabb vagy keményebb *zona pellucidája* és az NT embriók kikelési (*hatching*) nehézségeinek áthidalása miatt (Gouveia et al., 2020).

A sejtmagátültetés első lépését enukleációnak nevezik, és úgy írható le, mint a meiotikus orsókomplexet alkotó haploid (1n) kromoszómák eltávolítása a metafázis II (MII) stádiumú petesejtből. Az enukleációt ezután egy diploid (2n) szomatikus sejt (megfelelő donorból nyert) átvitele és fúziója követi az enukleált petesejtbe, amely utóbbit citoplasztnak nevezzük. A manipulált petesejtet ezután mesterségesen aktiválják elektromos impulzusokkal vagy kémiai

stimulációval, ami az embrió későbbi fejlődését indukálja. Habár számos kisebb módosítás ismert, akár a médium összetétel, védő faktorok (például C-vitamin adagolása, mint antioxidáns) vagy az epigenetikai változásokat segítő faktorok (pl. hiszton deacetiláz inhibitor kezelés) tekintetében, az egyes eljárások fő lépései nem változtak az évek alatt. A 4. ábra az újraprogramozás során zajló főbb események láncolatát mutatja be leegyszerűsített formában, a korai, preimplantációs fejlődés során.



4. ábra: A sejtmagátültetési genetikai újraprogramozás eseményei a létrehozott preimplantációs embrióban. Módosítva Matoba és Zang közleménye alapján (Matoba and Zhang 2018).

Az emlős embriók korai fejlődése során a genomiális DNS epigenetikai módosulása röviddel a zigóta kialakulása előtt és után már megfigyelhető. Az apai DNS aktívan és gyorsan demetilálódik, vagyis a metilációs mintázat törlődik a megtermékenyítést követően, míg az anyai DNS passzív demetiláción megy keresztül, ahogy azt több fajban is kimutatták (Mayer et al., 2000; Dean et al., 2001; Santos et al., 2002). Az embrionális DNS a kétsejtes és a hólyagsíra stádium között több lépésben újra metilálódik (remetiláció) (Dean et al., 2001), ami korrelál az embrionális genomból történő átírás fajszerifikus megindulásával (Reik et al., 2001). Ezek a mechanizmusok biztosítják, hogy a korai fejlődés kritikus lépéseit, például az első sejtosztódás, a kompaktizáció (morula stádium), a hólyagsíra kialakulása, az expanzió vagy a *zona pelucidából* való kikelés (*hatching*) időzítését a gének jól összehangolt expressziója szabályozza (Telford et al., 1990). A szomatikus sejtmagátültetés során drámai és széles körű epigenetikai változások következnek be a rekonstruált embrióban. Ezek a változások kiterjednek a génexpressziós mintázatokra (az aktív gének minőségében és mennyiségében), az imprintingre, az X-kromoszóma inaktiválódására és a telomer hosszára egyaránt (Yang et al., 2007; Niemann et al., 2008). Ezek a változások jól szervezett módon történnek az embrió fejlődése során (4. ábra).

A protokoll optimalizálások és eredmények ellenére a sejtmagátültetési genetikai újraprogramozás továbbra sem hatékony eljárás; a klónozott állatokban számos rendellenesség tapasztalható, a normális, életképes utódok létrehozásának általános hatékonysága változó, 5 és 10% között mozog, fajoként igen eltérő sikerességgel (Gouveia et al., 2020).

2.4.2 Genetikai újraprogramozás pluripotencia gének túlexpresszáltatásával – indukált pluripotens őssejt technológia

Az indukált pluripotens őssejtek előállításáról először Yamanaka kutatócsoportja számolt be (Takahashi and Yamanaka 2006; Takahashi et al., 2007). Munkájuk kezdetén a kutatócsoport kiválasztotta mindazokat a géneket, amelyekről ismert volt, hogy a pluripotencia szabályozását irányítják, és amelyek kapcsolatban állhatnak az őssejt stádiummal. Ezt követően a gének

különböző kombinációit túlexpresszáltatták egér fibroblaszt sejtekben, hogy kiválasszák azokat a kombinációkat, ahol az átprogramozás megtörtént, ezzel bizonyítva, hogy a fibroblasztok összejt stádiumba transzformálhatók. Módszerük lehetővé teszi a szomatikus sejtek pluripotens összejteké történő átprogramozását mindössze négy transzkripciós faktor, nevezetesen a *Pou5f1* (korábbi néven Oct3/4), *Sox2*, *c-Myc* és *Klf4* transzfekciójával és túlexpresszáltatásával. A létrehozott iPSC sejtek a sejt morfológia, a génexpressziós profil és a teratoma képzés alapján megkülönböztethetetlenek az embrionális összejtekétől. A folyamat azonban hosszadalmas, és olyan iPSC-ket hoz létre, amelyek fejlődési potenciáljukban nagymértékben eltérnek egymástól, klonálisan különböznek (Yamanaka and Blau 2010). Ez azzal áll összefüggésben, hogy az egyes sejtek a transzdukció vagy transzfekció során különböző számú konstrukciót jut, így azok expressziója is sejtenként eltérhet, amely eltérő genetikai konverziót, vagyis újraprogramozást, és eltérő utód klónokat eredményez. Az egyöntetű újraprogramozás eléréséhez a beépülő (integratív), és minden gént egy konstrukcióban tartalmazó (multigén) konstrukciók jelentenek megoldást. Ugyanakkor, az integrálódó konstrukcióknak vitathatatlan előnyük mellett számos hátrányuk van: egyrészt idegen DNS-t vagy RNS-t jelentenek az újraprogramozott sejtben, másrészt elcsendesítésük a létrehozott sejt vonalakban szükséges a differenciáltatás elindításához (Yamanaka and Blau 2010).

A módszer publikálását követően gyorsan szaporodott azon fajok száma, ahol az iPSC előállítását sikerrel alkalmazták, így olyan fajokon is, ahol az embrionális összejtek előállítása kihívást jelentett, iPSC sejteket sikerrel állítottak elő a kutatók (Scarfone et al., 2020; Kumar et al., 2021). A humán iPSC-k előállítása és felhasználása vonzó stratégiává vált a potenciális klinikai alkalmazások, például a betegségek modellezése, a sejt alapú terápia és a gyógyszer szűrés szempontjából, mivel képesek bármely sejt típusra differenciálódni mind *in vivo* és *in vitro* körülmények között (Yamanaka and Blau 2010).

Számos módszer került kidolgozásra a szomatikus sejtek iPSC sejtekké történő átprogramozására az elmúlt évtizedben, beleértve az integráción alapuló és a nem integráción alapuló módszereket. Az integráción alapuló módszerek közé tartoznak a retrovírusos, lentivírusos és indukálható lentivírusos módszerek. Előnyük, hogy az integrációs esemény visszaigazolható, az utódsejtek azonos genotípust, így azonos fenotípust képviselnek. Indukálható vagy szabályozható transzgén konstrukciók esetén az expresszió bizonyos keretek között szabályozható. Ugyanakkor ez egyben az integrációs módszerek hátránya is, terápiás alkalmazásoknál nem kívánatos idegen DNS (sokszor vírus eredetű) genomba integrálása történik. Másrészt, a transzgenézisnél megfigyelt transzgén beépüléssel kapcsolatos problémák is jelen vannak (pl. kópiaszám függő expresszió, kódoló régióba történő integráció, géncsendesülés, pozíció hatás), nem beszélve arról, hogy a differenciáltatáshoz a pluripotencia gének biztos elcsendesülése szükséges, vagyis az újraprogramozásra használt faktorok csak rövid ideig kell, hogy aktívak legyenek. Ezért az ún. integráció-mentes eljárások fejlesztése került a kutatások előterébe, amikor a genetikai újraprogramozásra használt faktorok nem integrálódnak a donorsejtbe. Ide tartoznak az adenovírusok (Zhou and Freed 2009), a Sendai-vírus által közvetített (Ban et al., 2011), episzomális plazmid (Okita et al., 2011), fehérje bevitelen alapuló (Kim et al., 2009), kis molekulákat használó (Hou et al., 2013) és miRNS alapú (Lin et al., 2008) módszerek. Mind a humán, mind egér stabil iPSC sejteket sikeresen generáltak genomális integráció nélkül (Jincho et al., 2010; Zhou and Zeng 2013).

Az iPSC-k fejlődési hatékonyságának értékelésére, vagyis a genetikai újraprogramozás sikerességének vizsgálatára számos - többek között molekuláris és funkcionális - vizsgálat létezik. Ezek közé tartozik a pluripotencia markerek expressziójának RNS és fehérje szintű kimutatása, a DNS-demetiláció, az osztódási képesség, kolónia morfológia vizsgálata. A funkcionális vizsgálatok közé tartozik a teratoma képzés, a kimérafejlődés, a tetraploid komplementáció, a csírvonal-átvitel (ivari kiméra képzés) és az *in vitro* differenciálódás igazolása (Aboul-Soud et al., 2021).

2.5 A genetikai újraprogramozással előállított őssejtek alkalmazási lehetőségei

2.5.1 Sejtmagátültetéssel előállított embriókból származó őssejtek és alkalmazásuk

Számos tanulmány bizonyította, hogy sejtmagátültetési genetikai újraprogramozással (NT) előállított embriókból is létre lehet hozni ESC sejt vonalakat egér (Kawase et al., 2000; Munsie et al., 2000), főemlősök (Byrne et al., 2007), szarvasmarha (Cibelli et al., 1998; Wang et al., 2005), nyúl (Fang et al., 2006) sertés (Vassiliev et al., 2011) és humán NT embriók esetén (Noggle et al., 2011), különböző nukleáris donorsejtek felhasználásával. Az ntESC előállításához használt nukleáris donorsejt típusok száma azonban alacsonyabb, mint az élő utódok előállításához használt sejtmagdonor sejt típusok száma (Wakayama et al., 2008a). Eddig az egér ntESC-ket főként frissen izolált sejtekből, pl. kumulusz sejtek (Munsie et al., 2000), farokcsúcs-fibroblaszt (Wakayama et al., 2001), magzati idegsejtek (Kawase et al., 2000), vagy fogpép sejtekből származó donorsejtek sejtmagátültetésben való alkalmazásával állították elő (Gurer et al., 2009). Ezen kívül *in vitro* tenyésztett sejtekre is találunk példát, mint például ESC sejtek (Wakayama et al., 2001; Wakayama et al., 2006), Sertoli sejtek (Wakayama et al., 2005b) vagy egér embrionális karcinóma sejt vonalak (Blelloch et al., 2006). Továbbá, ntESC sejt magdonor sejteket használtak az NT második fordulójában, azaz a sorozatos NT-ben, bár ez nem javította jelentősen az élő utódok előállításának hatékonyságát az ugyanabból az egyedből származó szomatikus sejtekhez képest (Wakayama et al., 2005a). Meglepő módon ntESC sejt előállítását sikerült elérni úgy is, hogy donor sejt forrásként különböző ideig ún. krioprotektáns (fagyás következményeitől védő anyag) nélkül fagyasztott egérszöveteket használtak. Ezek az ntESC sejtek képesek voltak „megmenteni” a szövetdonor nukleáris genomját az ntESC kimérák révén (Li and Mombaerts 2008), illetve sorozatos NT-vel egészséges klónozott egerek előállítására is alkalmasnak bizonyultak (Wakayama et al., 2008b). iPSC sejteket szintén használtak már sejtmagdonorként sejtmagátültetett utódok előállítására, ahol a hatékonyság hasonló volt, mint a normál megtermékenyítéssel nyert ESC-k használatakor (Kou et al., 2010). Sejtmagátültetett egér embriók, ntESC-k vagy a sejtmagátültetett embriókból fejlődő utódok előállításáról nagy számú publikáció érhető el, mégis, az eljárás igen változó sikerességi rátájáról számolnak be az egyes tanulmányok, az eredeti genomok epigenetikai és genetikai állapotától függően (Inoue et al., 2007; Obach and Wells 2007; Wakayama 2007). Az élő utódok sejtmagátültetési genetikai újraprogramozással történő előállításának sikerességét nagymértékben befolyásolja az egér genotípusa: különösen az F1 hibrid (pl. B6D2F1) és a 129SV bizonyultak a legfogékonyabbnak az átprogramozásra. Az új protokollok (például a hiszton-deacetiláz gátló, trichostatin A (TSA) kezelés) azonban azt mutatták, hogy a hibrid törzsekhez hasonló sikerrel használhatók sejtmagátültetésre a beltenyésztett (pl. ICR) törzsek és más korábban „nem-permiszív”-ként leírt törzsek is (C57Bl/6 vagy C3H/He) (Kishigami et al., 2006; Wakayama 2007).

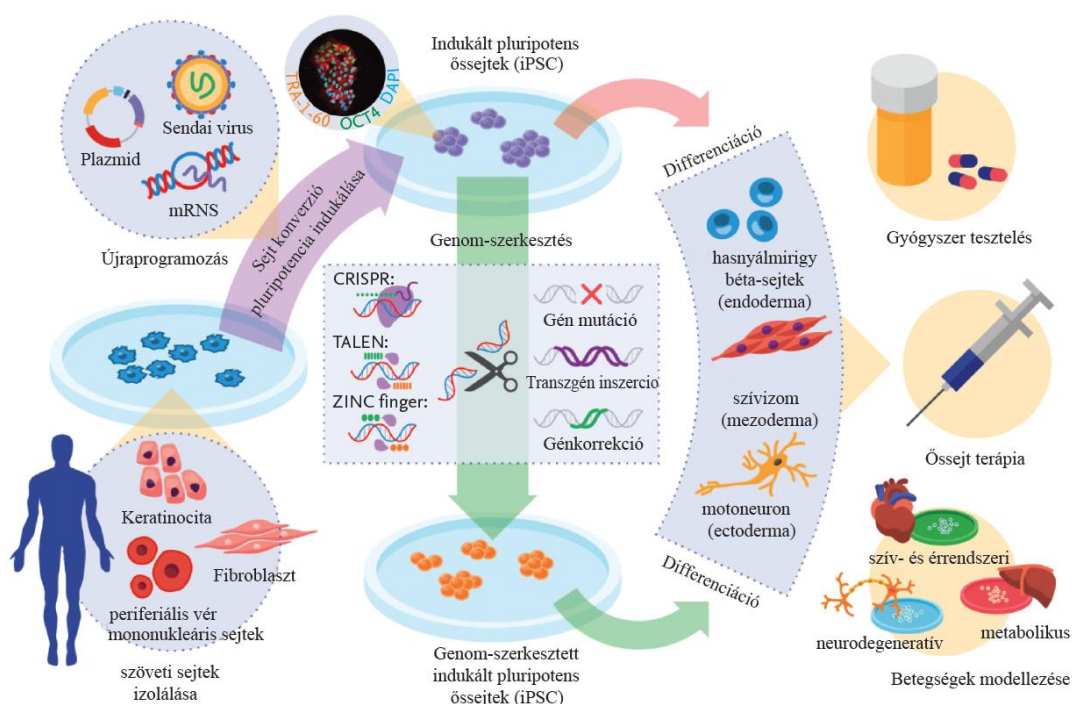
A különböző donorsejtekből származó egér ntESC vonalakról kimutatták, hogy pluripotens őssejt markereket expresszálnak és képesek egyszerű embriótestek (EB-k) kialakítására szuszpenziós kultúrában (Zhao et al., 2007). Ezek az ntESC sejtek képesek neurális- vagy izomsejttekké differenciálódni (Munsie et al., 2000) továbbá *in vitro* inzulintermelő sejteket is létrehoztak (Jiang et al., 2008). *In vivo* körülmények között a csíravonalon kívül mindhárom csíralemez (ecto- mezo- és endoderma) sejtjeivé differenciálódtak, hasonlóan a megtermékenyített embrióból származó sejtekhez (Kawase et al., 2000; Wakayama et al., 2001; Zhao et al., 2007). Beültetési kísérletekben az ntESC-ből differenciált dopaminerg neuronok javították az állatok állapotát és a tünetek csökkenését eredményezték Parkinson kóros egerekben (Barberi et al., 2003), amely az ntESC-k pluripotenciáját és a differenciálódott sejtek funkcionalitását is bizonyítja.

Bár több tanulmány is leírta az ntESC létrehozásának lehetőségét, és vizsgálta pluripotenciájukat (áttekintésért lásd (Yang et al., 2007) csak néhány tanulmány hasonlította össze őket átfogóan a megtermékenyített embrióból származó ESC sejt vonalakkal, mind

biológiai, mind molekuláris szinten. E tanulmányok azonban nagy hasonlóságot találtak a megtermékenyített embrióból származó ESC-k profiljával (Brambrink et al., 2006; Wakayama et al., 2006; Fan et al., 2008). Továbbá, poszttranszkripciósi profiljaik nagyon hasonló mikroRNS (miRNS) és fehérje-expressziós mintázatot mutattak a megtermékenyített embrióból származó vonalakhoz képest (Ding et al., 2009). Habár ismert, hogy az alkalmazott NT-módszertan (pl. aktiválási protokoll, nyugalmi vagy nem nyugalmi donorsejtek és a donorsejtek passzázsszáma) hatással van az NT-embriók mRNS-expressziós mintázatára (Wrenzycki et al., 2001) arról azonban keveset tudunk, hogy ez a hatás kimutatható-e az ntESC sejtvonalakban is.

2.5.2 iPSC sejtek és alkalmazási lehetőségeik

A humán szomatikus sejtmagátültetés, mint autológ őssejtforrás kutatási és klinikai kezelés céljából történő előállítása a mai napig etikai viták tárgyát képezi. Habár a sejtmagátültetéssel létrehozott humán hólyagsíra embriók előállításának mérföldkövét már sikerült elérni, valamint a sejtmagátültetéssel létrehozott embriókból NT-eredetű ESC-eket (ntESC) is előállítottak (Noggle et al., 2011; Tachibana et al., 2013), az etikai kérdések száma nemhogy csökkent, hanem nőtt (Grieshammer et al., 2011; Hyun 2011). Éppen ezért, az etikai szempontból jobban elfogadott, petesejteket vagy embriókat fel nem használó őssejt előállítási módszerek irányában nagy várakozásokkal tekint a kutatás és klinikum egyaránt, mint potenciális új sejtforrás a regeneratív orvostudomány területén. Ezek egyik legígéretesebb új módszere a szomatikus sejt kultúrákból származó indukált pluripotens őssejtek (iPSC) előállítása és alkalmazása lett (Okita et al., 2007; Takahashi et al., 2007; Park et al., 2008) (5. ábra). Ezen sejtek számos előnye közé tartozik a könnyű és egyszerű izolálás, a donorsejtek szélesebb köre, valamint az embriók használatának elkerülése (Hipp and Atala 2008; Nishikawa et al., 2008).



5. ábra: Az iPSC sejtek előállítása és felhasználási potenciálja a sejt- és szövetterápiás alkalmazásokban. Módosítva Diecke és munkatársai közleménye alapján (Diecke et al., 2014).

Kezdetben a technológiai korlátok azonosítása, majd kiküszöbölése volt az egyik fontos cél a kutatások során. Például Lanza és munkatársai leírták, hogy bár a humán iPSC sejtek képessége a különböző sejt típusokká történő differenciálódásra majdnem megegyezik a humán ESC sejtekével, az iPSC sejtekből differenciált sejtek fokozott apoptózist, és korlátozott növekedési és differenciációs képességet mutattak az ESC sejtvonalakból differenciáltatott sejtekhez képest

(Feng et al., 2010). A jelenség hátterében a részleges újraprogramozás és a klónok közötti variancia állt, azonban az új eljárások e hatást már megfelelően képesek kiküszöbölni. Ezenkívül a genetikai újraprogramozáshoz használt transzgenek, például a *cMyc* újra aktiválása korai embrió elhaláshoz és tumorképződéshez vezetett kiméra egerekben, ami további biztonsági aggályokat vet fel az ezen onkogén alkalmazásával létrehozott iPSC vonalakkal kapcsolatban (Wernig et al., 2007; Nakagawa et al., 2008; Okita et al., 2008). Módosított átprogramozási megközelítések, például a *cMyc* kizárása és az átprogramozás vírusvektormentes vagy genomintegráció-mentes indukciója azonban jelentősen csökkentette a tumorképződést az iPSC-eredetű kiméra egerekben (Nakagawa et al., 2008; Okita et al., 2008; Kaji et al., 2009). Más tanulmány az iPSC sejtek erőteljesebb immunogenitásáról számolt be ESC sejtekhez képest egerekben (Zhao et al., 2011) amely eredményeket mások később cáfoltak a tenyésztési körülmények megváltoztatása révén (Guha et al., 2013). Egyre több adat utal azonban arra, hogy bizonyos iPSC-eredetű sejtek immunogének lehetnek. A biztonságos és hatékony immuntolerancia-stratégia sikeres kifejlesztése azonban nagyban megkönnyítheti a hPSC-alapú sejterápia klinikai fejlesztését (Liu et al., 2017).

Említést kell még tennünk a 3D szövettenyésztési eljárások intenzív fejlődéséről, amely a szöveti komplexitás leképzésére törekszik *in vitro*, nem titkolt szándékkal az esetleges szövet és szervpótló terápiákat is megcélozva. A szövetnyomtatás a 3D nyomtatási technológiára alapozva immár nem önszerveződő rendszerekre épít, hanem egy teoretikus modellnek megfelelően az adott szövet struktúrájának megfelelően helyezi el a 3D modellben egy természetes vagy mesterséges állványzatra (ECM vagy más scaffold) az egyes sejt típusokat, ettől remélve a komplex és megfelelő működést mutató szervszerű tenyészetek kialakulását (Alle et al., 2021). Habár a legtöbb ún. organoid kultúra kísérleti modellnek tekinthető és inkább fejlődésbiológiai, betegségmodellezés, gyógyszerfejlesztés és toxikológiai vizsgálatok szempontjából van nagyobb jelentősége (Lancaster and Knoblich 2014; Kim et al., 2020), a technológia rohamos fejlődése a kevésbé komplex és kisebb 3D kiterjedésű szövetek (pl. bőrszövet) esetében komoly előrehaladást értek el a regeneratív terápia területén is (Clevers 2016; Lancaster and Huch 2019; Choudhury et al., 2021).

2.6 Új kutatási irányok az őssejtbiológiában

Az *in vitro* gametogenezis (IVG) az elmúlt években nagy érdeklődésre tart számot, nemcsak azért, mert lehetővé teszi a csírasejtek *in vivo* fejlődési mechanizmusainak további feltárását, hanem azért is, mert innovatív orvosi alkalmazásokra is ajtót nyithat, különösen a meddőség kezelésében. Bár korábbi tanulmányok az IVG módszereket nagyrészt embrionális eredetű pluripotens őssejtek felhasználásával hozták létre, az ilyen sejtek forrásainak szűkössége és a felhasználásukkal kapcsolatos etikai kérdések komoly korlátot jelentenek az IVG-kutatás előrehaladásának, különösen a humán kutatások területén (Hong et al., 2021). Az indukált pluripotens őssejtek (iPSC) megjelenésével azonban, az IVG-kutatás az elmúlt évtizedben jelentős előrelépést tett. Habár a kutatások jelentős része egér modellen zajlik és az ivarsejt differenciáció génszabályozási különbségei miatt nem transzlálhatóak egyenértékűen és azonnal humán sejtekre, mégis, komoly szerep jut számukra a differenciáció megértése és az optimális sejttenyésztési rendszerek kialakítása szempontjából (Hong et al., 2021; Luo and Yu 2021). Mindkét nem esetén ígéretes kutatások zajlanak mind hímvarsejt mind pedig petesejt prekursorok előállítására őssejtek differenciáltatása révén, azonban eddig az áttörés nem történt meg, utódok létrehozására alkalmas „mesterséges” ivarsejt prekursorokat eddig nem sikerült előállítani (Romualdez-Tan 2023).

Jelentős visszhangot kapott a közelmúlt egyik publikációja, amely poszt-implantációs embriófejlődést írt le egér modellen *ex utero*, őssejtekből kiindulva, vagyis ivarsejtek felhasználása nélkül (Tarazi et al., 2022). A létrejött embriókat úgynevezett szintetikus embrióknak (*Synthetic Embryo*, *sEmbryo*) nevezték a szerzők közleményükben. Az embrionális fejlődés korai stádiumának modellezése nem újkeletű, azonban mindeddig a korai, implantáció

előtti embrionális szakaszokra korlátozódott. Az ún. „blastoidok”, „organoidok”, vagy „assembloidok” létrehozása megmutatta, hogy akár őssejtek differenciálása (Lancaster et al., 2013; Beccari et al., 2018; Veenvliet et al., 2020), akár a különböző extraembrionális és embrionális őssejtek együtt tenyésztésével létrehozott struktúrák (Kunath et al., 2005; Harrison et al., 2017; Sozen et al., 2021) képesek a korai embrionális fejlődés egyes szakaszainak modellezésére. A poszt-gasztrulációs stádium elérése azonban, amikor az egyes szervek fejlődése megindul az embrióban (organogenezis), eddig nem volt lehetséges. Az áttöréshez az embriótenyésztés e szakaszának az ún. *ex utero* szakaszának a tökéletesítésére is szükség volt (Aguilera-Castrejon et al., 2021). A kutatócsoport céljai szerint az őssejtek szöveti differenciálódását kívánják jobban megérteni a kísérletekkel annak érdekében, hogy a későbbiekben minél tökéletesebb szerveket lehessen *in vitro* előállítani. Ugyanis az embrió fejlődés során a pluripotens sejtek ugyan azt az útvonalat járják be, mint amit mi a Petri csészében szeretnénk leutánozni. Vagyis, ha sikerülne pontosan megérteni, hogy a pluripotens embrionális sejtekből hogyan alakulnak ki az egyes szövetek, hogyan zajlik a szervek fejlődése, akkor mi is jobban tudnánk azt mesterséges körülmények között modellezni. A méhen belüli embrionális fejlődés, mint egy „fekete-doboz” eltakarja és bizonyos értelemben akadályozza a részletes vizsgálatot. Korábbi próbálkozások transzparens hal embriók vizsgálatára támaszkodtak (pl. zebradánió) azonban az eltérő, gyors fejlődési ütem és embrionális különbségek csak csekély mértékű transzlációt tesznek lehetővé az emlősökre nézve. A méhen kívüli *ex utero* fejlődés azt a lehetőséget teremthetné meg, hogy a kutatók további, részletes vizsgálatokat tudjanak végezni és feltárják az embriogenezis hiányzó láncszemeit is (Tarazi et al., 2022). Annak ellenére, hogy e kutatások modellállaton, méghozzá egéren történtek, mégis, nagyon súlyos etikai kérdéseket vetnek fel, még akkor is, ha tudjuk, hogy a humán embriókkal végzett kísérletekre nemzetközi irányelvek és szigorú kutatási szabályok vonatkoznak. A Nemzetközi Őssejtkutatási Társaság (ISSCR) irányelvei tizennégy napra korlátozták az emberi embriók laboratóriumi tenyésztését, mielőtt az idegrendszer első jelei megjelenének. Ezt követően az embriókat meg kell semmisíteni, bármely módszerrel is állították elő azokat. Sőt mi több, néhány ország ennél szigorúbb szabályozást alkalmaz és bizonyos kísérleteket egyáltalán nem engedélyez.

Több kutatócsoport is beszámolt arról, hogy felhasználtak ún. naív stádiumú pluripotens emberi őssejteket (mind embrionális, mind pedig iPSC), hogy létrehozzanak egy ún. "blastoidot", vagyis egy hólyagsíra stádiumú embriót hidrogél kultúrában, amely a valódi, vagyis ivarsejtek felhasználásával (petesejt és spermium), megtermékenyítéssel létrejött embrió kutatási alternatívájaként szolgálhat (Liu et al., 2021; Yu et al., 2021; Kagawa et al., 2022). A kísérlet biológiai jelentősége abban rejlik, hogy megmutatták, a különböző szignalizációs útvonalak modulálásával (aktiváció és inhibíció), molekuláris szignálokön keresztül lehetséges a különböző sejt differenciációs útvonalak párhuzamos szabályozása. A fejlődő embrió a fertilizációt követő 4 napon morulát képez, majd beindul az ún. kavitáció (blasztocöl kialakulása) és létrejön a hólyagsíra állapotú embrió. A hólyagsíra embrió fejlődése (5-7 embrionális napok) során három sejtréteg különül el az embrióban: az epiblaszt (Epi), amely embrionális (ez lesz az ún. belső sejtcsoomó; ICM); a trophektoderma (TE), vagyis trofoblaszt sejtek, amely extraembrionális (placenta), és a primitív endoderma (PrE), amely extraembrionális szöveteket képez az embrionális fejlődés során. Ezek a kísérletek megmutatták, hogy a valódi pluripotens emberi őssejtek képesek a teljes fejlődési útvonal leképezésére, vagyis akár extraembrionális, akár embrionális szövetek képzésére is *in vitro* körülmények között.

Korábban, különböző egér embrionális sejt vonalak, úgymint ICM eredetű embrionális őssejtek (ESC), trofoblaszt őssejt vonalak (TSC), és extraembrionális endoderma őssejtek (XEN) ko-kultúrájával már állítottak elő embrió-szerű morfológiát mutató struktúrákat (Zhang et al., 2019; Sozen et al., 2021). Genetikailag manipulált, transzgenikus ESC sejt vonal alkalmazásával, ahol a transzgen a különböző trofoblaszt és extraembrionális endoderma differenciálódás segített szintén előállítottak 3D gél alapú kultúrában őssejt eredetű egér

embriókat (Langkabel et al., 2021). A kialakult embriószerű struktúrákat morfológiai jellegzetességük alapján RtL-embrioidoknak (*Rosette-to-Lumen-embryoids*; *RtL-embryoids*) nevezték. Az *in vivo* egér embrió fejlődésben ez az E5.25 peri-implantációs stádium és E5.5 poszt-implantációs stádium morfológiai átalakulását jelezi az epiblasztban (Langkabel et al., 2021). Kagawa és kutatótársai azonban ettől tovább lépve megmutatták, hogy az így előállított hólyagcsíraszerű humán embriók képesek *in vitro* Petri csészében endometriális sejtekre letapadni, ahol a TE sejtréteg az implantációhoz hasonlóan növekedni kezd. Ezzel párhuzamosan a belső sejtsomó differenciálódása is megindul, ahol az első embrionális tengely (*axis*) formálódás is kezdetét vette (Kagawa et al., 2022). Eredményeik megmutatták, hogy az összejtekből létrehozott szintetikus embriók képesek lehetnek az implantációra megfelelő körülmények között, amely újabb és újabb etikai kérdéseket vet fel a számtalan biológiai kérdés mellett. A nyomás pedig a regeneratív orvoslás területéről óriási mind a szervdonorok alacsony száma, mind pedig a számos, ma még gyógyíthatatlan betegség kezelésének lehetősége miatt, nem beszélve a reprodukcióbíológiai, főként a meddőség kezelése kapcsán felvetődő kérdésekről. A kutatókra és a társadalomra tehát igen komoly kihívások várnak a terület robbanásszerű fejlődése és az összejtek úgy tűnik, valóban korlátlan differenciálódási potenciája miatt.

2.7 A pluripotens összejtek alkalmazása a gyakorlatban

Ahogy azt a korábbi fejezetekben bemutattam, az összejtek, és azok közül is a pluripotens összejtek komoly potenciált hordoznak a különböző *in vitro* alkalmazásokban. Ezek közül két konkrét területet választottam ki, a betegségmodellezést és a toxikológiai vizsgálatokat, ahol részletesen bemutatom az összejtekből létrehozott *in vitro* modellrendszert. A következőkben a két alkalmazás kapcsán a kiválasztott betegség, illetve a toxikológiai modell irodalmi hátterét ismertetem röviden.

2.7.1 Betegség modellezés: az MPS II lizoszomális tárolási rendellenesség

A jelenleg ismert 40 lizoszomális tárolási betegség (Lysosomal Storage Disorder, LSD) egyike, a II. típusú mukopoliszacharidózis (MPS II; más néven Hunter-szindróma; OMIM 309900). Az ORPHANET-en ritka betegségként szerepel (Muenzer 2011); előfordulási gyakorisága világszerte 1/100 000-re tehető (Meikle et al., 1999) és 1:166 000-hez Európában (Scarpa et al., 2011). Az MPS II egy X-kromoszómához kötött, recesszív rendellenesség, amely szinte kizárólag férfiaknál jelentkezik, míg a mutáns és a vad típusú alléllal rendelkező nők általában nem érintettek (Neufeld et al., 1977; Pinto et al., 2010). A betegséget az iduronát-2-szulfátáz (IDS), a heparán- és dermatán-szulfát-proteoglikánok lebontási útvonalának első lépésében részt vevő lizoszomális enzim hiányos aktivitása okozza (Wraith et al., 2008). Az IDS-aktivitás hiánya a glikozaminoglikánok (GAG-ok) felhalmozódását eredményezi, ami végül multiszisztémás betegség patológiához vezet, különösen a sejtek membránjában, az extracelluláris mátrix (ECM) létrehozásában betöltött központi szerepük miatt (Valayannopoulos and Wijburg 2011). Az alternatív útvonalakon keletkező GAG fragmentumok a vizelettel és más testnedvekkel ürülnek ki (McKusick 1975).

Az MPS II progresszív betegség, amelyet izom- és csontrendszeri rendellenességek (csontrendszeri elváltozások, szívbetegség, merevség és ízületi kontraktúrák), organomegália (megnagyobbodott lép és máj), tüdőbetegségek, halláskárosodás, szemproblémák és a betegek ~75%-ánál súlyos neurológiai diszfunkció jellemez (Pastores et al., 2007). A betegek születéskor egészségesnek tűnnek, a kezdeti tünetek 18 hónapos és 4 éves kor között jelentkeznek, és korai halálhoz vezetnek a legtöbb esetben. Az IDS mutáció patogenitásával kapcsolatban a betegség széles spektrumát írták le, különböző kezdetű és súlyosságú tünetekkel (Wraith et al., 2008; Muenzer et al., 2009; Vollebregt et al., 2017). A betegséget a vizeletben vagy vérben, illetve az agy-gerincvelői (cerebrospinalis) folyadékban (CSF) történő GAG-kiválasztás mennyiségi meghatározásával diagnosztizálják. Jelenleg nincs ismert gyógymód, és

a rendelkezésre álló kezelések többnyire palliatív jellegűek, bár két elsődleges kezelési lehetőség létezik. Az első, az allogén vérképző őssejt-transzplantáció (Hematopoietic Stem Cell Transplantation, HSCT) enyhítheti az MPS II tüneteit (de Ru et al., 2011; Tanaka et al., 2012), csökkentve a vizelet GAG-szintjét, stabilizálva a szív működést (a szívbillentyű regurgitáció csökkenhet) és javítja a hallást, de a kognitív funkciókra gyakorolt hatékonysága még vitatott, jelentősen függ a mutáció jellegétől és a HSCT életkori alkalmazásától. A második, az enzim pótló terápia (Enzyme Replacement Therapy, ERT) a rekombináns humán IDS enzim (Elaprase™; Shire Human Genetic Therapies, Inc.) heti intravénás beadásával jár, és javíthatja a növekedést, az ízületi mozgást, a légzésfunkciót, a látást, valamint csökkentheti a fájdalomérzetet és a máj-/lépmegnagyobbodást (Hoffmann et al., 2011). Az ERT egyik fő korlátja azonban az, hogy az enzim nem képes áthatolni a vér-agy gáton (BBB), és így nem tud védeni a központi idegrendszer (Central Nervous System, CNS) elváltozásai ellen, következésképpen a súlyos neurodegeneratív rendellenességekhez vezető pszichomotoros regresszió ellen sem (Muenzer et al., 2012; Rastall and Amalfitano 2015). Az enzimnek a liquorba intratekális beadással történő juttatásával és génterápiás megközelítésekkel kapcsolatos klinikai kísérletek jelenleg is folynak. Azonban az MPS II alternatív, hatékonyabb kezelési lehetőségeinek kifejlesztéséhez a neuronális szintű patofiziológia jobb megértése is szükséges.

Az IDS knock-out, MPS II egérmodellből származó neurális őssejtek (NSC) jelentős mitogén függést mutattak *in vitro* tenyészetben, ami arra utal, hogy az IDS hiánya akadályozhatja a normális differenciálódást. A differenciálódás során az IDS-hiányos NSC sejtek a lizoszomális organellumok növekvő és jelentős felhalmozódását mutatták, ami a kontroll sejtekben nem volt megfigyelhető (Muenzer et al., 2002). Érdekes módon az egészséges sejtekben mind az IDS expressziója, mind az aktivitás a progenitor stádiumban érte el a csúcspontját, ami arra enged következtetni, hogy az IDS előkészítheti az átmeneti progenitorok helyes elköteleződését és/vagy hozzájárulhat az érett neuronok funkcionális differenciálódásához és túléléséhez, a megfelelő extracelluláris környezet kialakításához. Továbbá, amikor különböző sejttypusokat elemeztek, kiderült, hogy a gliasejtek által közvetített neurodegeneráció az MPS II egyik lehetséges patomechanizmusa (Fusar Poli et al., 2013; Farhy Tselnick et al., 2014).

Bár ezek az MPS II egérmodellben elért eredmények fontosak, a központi idegrendszerben megjelenő tünetek modellezéséhez humán rendszerre lenne szükség, amely kísérleteim megkezdéséig nem állt rendelkezésre. Vizsgálataim során azt a kérdést tettem fel, hogy az MPS II betegség neuronális patomechanizmusa modellezhető-e *in vitro* rendszerben, betegből származó iPSC vonalak alkalmazásával. Céлом egy MPS II specifikus iPSC-alapú *in vitro* modell létrehozása volt, és annak vizsgálata, hogy ez reprezentálja-e a betegség fenotípusát, vagyis alkalmas-e pontos patomechanizmus sejt szintű meghatározására és ezáltal lehetséges gyógyszerjelöltek tesztelésére és újabbak fejlesztésére.

2.7.2 Pluripotens őssejtek alkalmazása *in vitro* toxikológiai vizsgálatokban

A környezeti stresszorok, például kémiai anyagok vagy gyógyszerek toxikus hatást gyakorolhatnak az emberre, ami az élet bármely szakaszában, a magzati fejlődés, a gyermekkor vagy a felnőttkor során is bekövetkezhet. A környezeti tényezők káros hatásai és az egyének öröklött fogékonysága megnehezíti a toxikológiai előrejelzést. A hagyományos, állatokon végzett toxicitási és biztonsági vizsgálatok magas költségekkel járnak, nagyszámú állatot (főként patkányokat) használnak, és gyakran nem adnak az emberre egyértelműen átvihető eredményeket (Hartung 2008; Krewski et al., 2010; Tsuji and Crofton 2012). Következésképpen egyre nagyobb szükség van olyan alternatív vizsgálati módszerek kidolgozására, amelyek több ezer gyógyszert vagy vegyi anyagot tudnak kezelni, megfizethető idő- és költségáfordítással, a laboratóriumi állatok felhasználásának csökkentése mellett, valamint humán vonatkozású neurotoxikológiai eredményekkel (Crofton et al., 2012; Westerink 2013; Bal-Price et al., 2015; Bal-Price et al., 2018a). Az új megközelítési módszerek (*New Approach Methods*, NAM) kifejlesztése fontos lenne mind az neurotoxikológiai, mind a

fejlődés-neurotoxikológiai (*Developmental Neurotoxicology*, DNT) vizsgálatok számára, mivel adatokat szolgáltatna a különböző kémiai anyagok hatásáról és a lehetséges káros hatásokról (*Adverse Outcome*, AO) (Bal-Price et al., 2008; Bal-Price et al., 2010; Alepee et al., 2014; Bal-Price et al., 2018a; Fritsche et al., 2018b; Harrill et al., 2018).

Egyre több vizsgálatban használnak primer sejt kultúrákat és újabban pluripotens őssejteket (PSC), hogy *in vitro* tesztrendszereket hozzanak létre a neurotoxikológiai és fejlődésneurológiai hatások szűrésére. Széles körben elfogadott elképzelés, hogy a 3D sejt kultúrák jobban utánozzák az eredeti szöveti környezetet, beleértve a szövetspecifikus architektúrát, a mechanikai és biokémiai jellemzőket, a sejtek közötti kommunikációt és jelátvitelt, valamint a differenciálódási képességet. Ezzel szemben a 2D sejt kultúra-rendszerek ebben az értelemben kevésbé összetettek és mesterségesebbek (Pampaloni et al., 2007; F-W Greiner et al., 2013; Edmondson et al., 2014; Pamies and Hartung 2017), bár az eddig elérhető 2D szövetenyészetek is alkalmas rendszert jelentenek, amennyiben korlátaikat figyelembe vesszük és megfelelően extrapoláljuk azt a bonyolult, szöveti szerveződés vagy idegi fejlődési folyamatokra vonatkozóan (Bal-Price et al., 2010; Bal-Price et al., 2018a; Harrill et al., 2018). Egyetlen *in vitro* vizsgálat nem lesz képes lefedni az *in vivo* fejlődés komplexitását; ezért a releváns folyamatok lefedésére vizsgálatok és a célnak megfelelő alkalmazások sorozatát kell alkalmazni (Bal-Price et al., 2018b; Fritsche et al., 2018b). A humán indukált pluripotens őssejtekből származó (hiPSC) 3D neuroszferoidok, képesek sejt-sejt kölcsönhatásokat létrehozni és modellezni bizonyos idegi fejlődési folyamatokat, ezért nemcsak a neurotoxikológiai, hanem a DNT-vizsgálatok vagy a gyógyszerfejlesztés *in vitro* szűresi platformjaként is felhasználhatók (Smirnova et al., 2014; Hofrichter et al., 2017; Schmidt et al., 2017).

A neurális őssejtek (NSC-k) az emlősök központi idegrendszerében (CNS) a sejtek multipotens és önmegújuló csoportja, amely *in vivo* a fejlődő embrionális idegszövetben már a neurális cső kialakulásakor megjelennek. Ezek a sejtek képesek valamennyi neuronális sejt típusra, valamint gliasejtekké differenciálódni. Ezért képesek egyes magzati idegi fejlődési folyamatok „utánzására” is *in vitro* körülmények között (Gage 2000; Breunig et al., 2011). Az NSC-k *in vitro* differenciálhatók pluripotens őssejtekből (PSC-k), így vonzó és szinte korlátlan *in vitro* eszközt biztosítanak a toxikológiai vizsgálatokhoz, beleértve a gyógyszerfejlesztést is (Thomson et al. 1998).

A komoly alkalmazási potenciál és a nagyléptékű fejlesztések ellenére még mindig korlátozott számú iPSC-ből származó 3D neuronális kultúrán alapuló tanulmányt publikáltak, amelyek neurotoxikológiai vagy DNT modellek fejlesztésére összpontosítottak volna (Hogberg et al., 2013; Qian et al., 2016; Hofrichter et al., 2017; Pamies et al., 2017; Schmuck et al., 2017; Pamies et al., 2018; Sirenko et al., 2019). Az ilyen vizsgálati módszerek továbbfejlesztésének korlátozó tényezője a 3D-s sejt kultúrákon végzett nagy áteresztőképességű szűrővizsgálatok (*High-throughput screening*, HTS) eredményeinek megfelelő képalkotókkal történő elemzésének hiánya (Pamies and Hartung 2017), annak ellenére, hogy a nagy adattartalmú képelemzés (*High-content analysis*, HCA vagy *High content screening*, HCS) terén komoly fejlesztések történtek az elmúlt időszakban (Schmuck et al., 2017). Mindazonáltal a komplex, több 10 mm tartományban a konfokális képalkotás is korlátokba ütközik.

Dolgozatomban egy közepes áteresztőképességű (96-lyukú tenyésztőedény), jól reprodukálható, megbízható modellrendszert mutatok be, amelyben hiPSC-eredetű NSC-k differenciálódnak neuronok, asztrociták és oligodendrocita sejt típusok felé, szabadon lebegő 3D neuroszferoidokat képezve.

3 ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 Embrionális őssejtvonalak izolálása és jellemzése sejtmagátültetési genetikai újraprogramozással létrehozott egér embriókból

3.1.1 Kísérletekben felhasznált állatok

Az állatkísérleteket az európai és a magyar állatvédelmi és állatkísérletekre vonatkozó törvényeknek és előírásoknak teljes mértékben megfelelően végeztük, és azokat a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ (MBK; engedély szám: 126/3/2005) (később Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ (NAIK-MBK, jelenleg MATE-NAIK) Állatkísérleti Etikai Bizottsága hagyta jóvá a kísérletek elvégzését megelőzően.

3.1.2 Sejtmagátültetési genetikai újraprogramozás

A sejtmagátültetési genetikai újraprogramozás módszertana nem képezi részét a dolgozat eredményeinek, így a technológia részletes módszertani ismertetése sem. A dolgozatban a sejtmagátültetési genetikai újraprogramozással előállított és hólyagsíra fejlődési állapotba eljutott embriókból történő sejtvonal alapítás és az azokkal való kísérletes munka kerül bemutatásra. A kísérletek megértéséhez szükséges módszertani háttér az irodalmi áttekintés tartalmazza. Röviden, a piezoelektromos mikroinjektálással történő sejtmagátültetést (PEM-NT) Wakayama módszertani leírását követve történt (Wakayama et al., 1998; Kishigami et al., 2006). Az ún. *zona pellucida*-mentes sejtmagátültetés (ZF-NT) módszerét a korábban leírt Ribas et al. protokoll szerint végeztük (Ribas et al., 2005), a korábban általunk közölt módosítások szerint (Kobolák et al., 2010). Kontrollként két csoportot használtunk: partenogenetikus aktiválással létrehozott embriókat (PGA embriók), amelyeket a petesejt donorral megegyező genotípusú petesejtekből hoztunk létre, a korábban közöltek szerint (Kobolák et al., 2010), illetve fertilizációval létrehozott B6D2 genotípusú embriókat (Kobolák et al., 2010). A sejtmagátültetési genetikai újraprogramozás mikromanipulációs lépését, a sejtmagátültetett embriók előállítását Dr. Bodó Szilárd és Dr. Qinggang Meng kutatók végezték (akkor: *Mikromanipulációs és genetikai újraprogramozási csoport, MBK, Gödöllő*).

3.1.3 Sejtmagdonor sejtek és *in vitro* tenyésztésük

Kísérleteink során több sejtmagdonor sejttípust használtunk az alábbiak szerint.

Kumulusz sejteket: A petevezetőből kimosott B6D2 F1 genotípusú egér petesejtekről a kumulusz sejteket 0,1%-os hialuronidáz enzim (Merck KGaA, Darmstadt, Germany; <https://www.merckgroup.com/en>) oldatával választottuk le gyenge átlomással, M2 médiumban (Merck). A sejteket minden kísérletben frissen izoláltuk, felhasználásig CZB-HEPES tápoldatban tartottuk (Merck).

Egér embrionális fibroblaszt (*Mouse Embryonic Fibroblast*, MEF) sejtek: A MEF sejteket B6D2 genotípusú, 13,5 napos magzatokból, sztenderd protokoll szerint izoláltuk, majd folyékony nitrogénben eltároltuk a kísérleteket megelőzően (Nagy 2003). A passzázs 2 MEF sejteket a kísérleteket megelőzően 4-5 nappal olvasztottuk ki és *in vitro* tenyésztetbe vettük fibroblaszt tenyésztő tápoldatban: magas glükóz tartalmú DMEM sejtenyésztő médium (4500 mg/L glükóz; Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA; <https://www.thermofisher.com/hu/en/home.html>; továbbiakban TFS Inc.), 10% magzati szarvasmarha szérum (FBS, HyClone-Cytiva; Global Life Sciences Solutions USA LLC, Marlborough, MA, USA; <https://www.cytivalifesciences.com/en/us>) kiegészítéssel. A kísérletekben passzázs 2-3 sejteket használtunk (p2-p3). A sejteket 0,25% Tripszin-EDTA oldattal (TFS Inc.) távolítottuk el a sejtenyésztő edényről (Nagy 2003), HEPES-pufferelt DMEM médiumban (TFS Inc.) tartva a sejtmagátültetésig.

A HM1 egér embrionális őssejtek (HM1-ESC): az ESC sejteket (129Ola genotípus) (Selfridge et al., 1992) tápláló sejtréteg nélkül, zselatinnal bevont (0.1% zselatin PBS oldatban; Merck) 6 cm-es sejtenyésztő edényben (Greiner Bio-One International GmbH; Kremsmünster, Austria, <https://www.gbo.com/hu-hu>; továbbiakban Greiner) tenyésztettük sztenderd protokoll

szerint, magas glükóz tartalmú DMEM tápoldatban (4500 mg/L glükóz; TFS Inc.), 2000 NE/ml rekombináns egér leukémia inhibitor faktor (ESGRO-LIF, Merck), 20% FBS (HyClone), 1x nem esszenciális aminosavak (NEAA), 0,2 mM 2-merkaptoetanol, 50 NE/ml penicillin, 50 mg/ml sztreptomycin (TFS Inc.) kiegészítéssel. A kísérletekben 22-26 passzázból (p22-p26) származó sejteket használtunk fel, 0,25% Tripszin-EDTA (TFS Inc.) oldattal távolítottuk el a sejtenyészítő edényről (Nagy 2003) majd HEPES-pufferelt magas glükóz tartalmú DMEM médiumban tartottuk a sejtmagátültetésig (TFS Inc.).

3.1.4 Embriónális őssejtvonalak alapítása hólyagsíra stádiumú egér embriókból

A folyamat során a hagyományos embrionális őssejtvonal alapítás módszerét (Evans and Kaufman 1981) alkalmaztuk több módosítással, az alábbiak szerint. Több kísérleti csoportból származó embriót azonos paraméterek között, azonos módszertant alkalmazva kezeltünk a sejtvonal alapítási kísérletekben. A hólyagsíra állapotú embriókat akár kontroll, akár az egyes sejtmagátültetési kísérletekből származtak, mitomicin-C (Merck) inaktivált MEF tápláló sejtrétegre (*feeder cells*) helyeztük (p2 MEF) egyenként, 24-lyukú tenyésztőedényben (Greiner). A HM1 sejtvonalnál ismertetett ESC tenyésztőoldathoz (lásd 3.1.3 alfejezet) további kiegészítésként nukleozid keveréket (100x) (Robertson 1987) (TFS Inc.) és inzulin-transzferrin-szelén kiegészítést (ITS, 100x; TFS Inc.) adtunk. Az embriókat a kiültetést követő harmadik napig háborítatlanul hagytuk, majd médiumcserét követően a kitapadt ICM csomót üvegapillárisal PBS oldatban (TFS Inc.) leválasztottuk a felületről. A sejteket 0,25% Tripszin-EDTA oldattal (TFS Inc.) nagyon rövid ideig kezeltük, hogy a sejtcsoport sejtszírei fellazuljanak és több kisebb sejtcsoportként friss mitomicin-C inaktivált MEF tápláló sejtrétegre ültettük. A tápoldatot 48 óra elteltével cseréltük. A tenyésztőedényeket 37°C-on, 5% CO₂ mellett termosztátban tartottuk. Az ES-szerű kolóniák megjelenését követően (általában 3-5 nap) a kolóniákat az ICM csomóval megegyező módon ültettük tovább, hogy a differenciálódó sejtektől megszabaduljunk. A médiumot ettől fogva 24 óránként cseréltük. Amikor a kolóniák száma lehetővé tette (körülbelül a 3. átültetésnél) 3 cm-es sejtenyészítő edényre, majd 6 cm-es tenyésztőedényre ültettük ki a sejteket (Greiner) és párhuzamosan folyékony nitrogénben tároltuk el az ESC sejtek egy részét (60% DMEM, 20% FBS; 20% DMSO fagyasztó oldat; Merck) (Nagy 2003). Az új sejtvonalakat morfológiai kritériumok és egységes növekedés, illetve a differenciáció hiánya alapján válogattuk ki és szaporítottuk fel a további vizsgálatok céljára.

A sejtmagátültetéssel létrehozott embriók esetén a módszert módosítottuk és az ICM csomó sejtszíreit nem kezeltük tripszinnel, hanem közvetlenül a Ca²⁺-Mg²⁺-mentes PBS oldattal (TFS Inc.) 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, enzimikus kezelés nélkül.

A kontrollok között az egyik csoport a megtermékenyített hólyagsíra stádiumú embriócsoport volt. Ezen embriókról a PEM-NT csoport kontrolljaként a *zona pellucida* nem került eltávolításra, a hólyagsíra embriók közvetlenül kerültek tápláló sejtrétegre a kimosást követően. Míg a ZF-NT kísérletekben a megtermékenyített embrió kontroll csoport esetén a *zona pellucida* eltávolítása savas Tyrode oldattal (Merck) történt mikroszkópos kontroll mellett (2-3 perc), majd CZB oldattal (Merck) átmosva az embriókat tápláló sejtrétegre helyeztük egyesével az ESC alapításhoz, a fent részletezett médiumba.

3.1.5 Egér embrionális őssejtvonalak pluripotencia jellemzése

3.1.5.1 Immunfestés, áramlási citometria (FACS), alkalikus foszfatáz kimutatás

Az előzetesen 1%-os zselatin oldattal (Merck) bevont vagy osztódásában gátolt MEF sejtekkel előkészített üveglemezre kiültetett ESC-kolóniákat 4%-os paraformaldehid oldatban (PFA; Merck) fixáltuk 15 percig szobahőmérsékleten, majd háromszor mostuk PBS oldattal (Merck) és 1 órán át blokkoló oldatban (1% BSA, 5% FBS, 0,1% TritonX tartalmú PBS; Merck)

kezeltük. A kolóniákat a kiválasztott primer ellenanyaggal (1. melléklet) egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk blokkoló oldatban, majd a nem kötődött ellenanyag blokkoló oldattal történő lemosását követően a sejteket a kiválasztott fluoreszcens szekunder ellenanyaggal (1. melléklet), (szintén blokkoló oldatban hígítva), 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk tovább. Kettős vagy hármas festés esetén a második vagy harmadik primer ellenanyagot az első után inkubáltuk, míg a másodlagos ellenanyagokat egyidejűleg, keverékben alkalmaztuk. A mintákat Vectashield-DAPI montírozó oldattal (Vector Laboratories; Newark, CA, USA; <https://vectorlabs.com/>) fedtük le, amely a sejtmagok jelölésére is szolgált egyben. Az immunfestéseket AxioObserver Z.1 inverz fluoreszcens mikroszkóppal és ApoTome rendszerrel, valamint AxioCam MRm kamerarendszerrel (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany; <https://www.zeiss.com/corporate/en/home.html>) vizualizáltuk és AxioVision 4.8 szoftverrel (Carl Zeiss AG) dolgoztuk fel, a többdimenziós felvételi opciót használva.

Az áramlási citometria (FACS) vizsgálatokhoz a sejteket jéghideg 0,1%-os Tripszin-EDTA (TFS Inc.) oldattal kezeltük rövid ideig (2-4 perc), majd PBS oldatban (Merck) szuszpendáltuk. A sejteket ezt követően fixáltuk 4% PFA (Merck) oldatban és az immunfestéssel megegyező oldatsorozatokban jelöltük. A felhasznált elsődleges és másodlagos antitesteket a melléklet tartalmazza (1. melléklet). Az elsődleges jelölést egy éjszakán át 4°C-on, a másodlagos jelölés 1 órán át szobahőmérsékleten végeztük. A másodlagos jelölés után a mintákat 1 ml jéghideg PBS-ben pelletáltuk, majd 12 órán belül FACS-CALIBUR (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA; <https://www.bd.com/en-us>) készülékkel elemeztük. Minden mintából három biológiai ismétlést (50,000 sejt/minta) elemeztünk, majd meghatároztuk a pozitív sejtek százalékos arányát (átlag $\pm$ SEM; $p < 0,05$).

Az ESC sejtek alkalikus foszfatáz (ALP) festését Nagy és munkatársai módszere szerint végeztük 4%-os PFA (Merck) oldattal fixált kolóniákon (Nagy 2003).

3.1.5.2 Kromoszómaszám meghatározás, kariotípus elemzés

A létrehozott ESC-vonalak kromoszómáit kolcemid kezeléssel (Merck), a korábban leírtak szerint végeztük (Nagy 2003). A kromoszómákat Giemsa vagy DAPI festékekkel (Merck) festettük meg tárgylemezeken. Az elemzéshez minden sejtvonalból legalább 50 metafázisú sejtmagot vizsgáltunk. A kariotípus-elemzéseket FISH fluoreszcens jelölésű StarFISH egérkromoszóma specifikus próbával (mXCy3; mYFITC; Cambio Ltd; Dry Drayton, Cambridge, UK <https://www.cambio.co.uk/>) végeztük. A tárgylemezek mikroszkópos vizsgálatát egy Olympus AH2 fotomikroszkóppal végeztük, amely Quips XL Genetics Workstation rendszerrel volt felszerelve (Olympus Corporation; Tokyo, Japan; <https://www.olympus-global.com/>), beleértve egy Photometrics KAF 1400G2 -CCD kamerát (Abbott Laboratories; Abbott Park, IL, USA; <https://www.abbott.com/>). A kariotípus elemzést Dr. Csonka Erika és Dr. Hadlaczký Gyula végezte (akkor: *Humán Molekuláris Genetika II. laboratórium, Genetikai Intézet, SZBK, Szeged*).

3.1.5.3 Növekedési hatékonyság meghatározása

A populáció duplázódás meghatározásához egysejtes sejtszuspenziót készítettünk, a passzálással azonos módon, 0,25% Tripszin-EDTA oldatos (TFS Inc.) kezeléssel. A sejtszuspenzióból 1×10^5 sejt/ml oldatot készítettünk és mitomicin-C inaktivált, MEF fedett 6-lyukú lemezekre (Greiner) ültettük a sejteket. Minden kísérletet két ismétlésben végeztünk, 3 párhuzamossal időpontonként. A populáció megduplázódási idejét (*population doubling time*, PDT) a 72 órás tenyésztési időszak alatt 12 óránként végzett tripszinizálás és hemocitóméteres sejtszámlálás után a '*Doubling Time -Several Time Points calculator*' (<http://www.doubling-time.com>) online szoftver segítségével határoztuk meg. Az értékeléshez egyirányú varianciaanalízist végeztünk Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) szoftverrel ($p < 0,05$) (ANOVA).

3.1.6 Egér embrionális őssejtvonalak *in vitro* differenciálása

Az ESC sejtvonalak *in vitro* differenciálódási képességének vizsgálatát függőcsepp módszerrel végeztük (Doetschman et al., 1985). A passzázs során használt tripszines kezeléssel előkészített sejtszuspenziót magas glükóz tartalmú DMEM tápoldatban (4500 mg/L glükóz; TFS Inc.), 10% FBS (HyClone), 1x nem esszenciális aminosavak (NEAA), 0,2 mM 2-merkaptotanol, 50 NE/ml penicillin, 50 mg/ml sztreptomycin (TFS Inc.) kiegészítéssel, de LIF-et nem tartalmazó (LIF mentes) médiumban szuszpendáltuk fel. A sejtekből 4×10^4 sejt/ml sejtszuspenziót készítettünk, majd 20 μ l/csepp függőcseppeket helyeztünk bakteriális tenyésztőedény fedelére (Greiner) (a Petri-csésze aljába steril PBS oldat került a cseppek kiszáradásának megelőzésére). A sejtek aggregációja embriócsomókká (*Embryoid Bodies*, EB) 2 nap alatt megtörtént, ezt követően az EB csomókat összegyűjtöttük és 10 cm-es bakteriális Petri-csészében (Greiner) szuszpenziós kultúrába helyeztük, ahol a tápoldatot naponta cseréltük. A tápoldat megegyezett a függőcsepp kultúra készítéséhez használt LIF-mentes tápoldattal. Az idegi differenciálódást a 4. naptól a 8. napig 10^{-6} M all-transz retinsav (RA; Merck) tenyésztőoldathoz adagolásával indukáltuk. A 8. nap után az EB-ket egyenként zselatinnal bevont 24-lyukú tenyésztőedényekbe (Greiner) helyeztük át, és RA-t nem tartalmazó médiumban tenyésztettük tovább (a sejtszuspenzió készítéssel megegyező médium). Szívizom differenciálás esetén a médiumot a 2. napon két napig (a 3. és 4. napon) 1% dimetil-szulfoxiddal (DMSO; Merck) egészítettük ki, ezt követően az EB-ket szuszpenzióban tenyésztettük tovább. A 10. napon az EB-ket egyenként zselatinnal bevont 24-lyukú tenyésztőedényekbe (Greiner) ültettük és tovább tenyésztettük. A pulzáló (összehúzódó) tenyészetek száma naponta került meghatározásra. A kísérletek 4 hétig zajlottak (28 nap) majd a minták immunfestésre vagy lizálásra kerültek a génexpressziós vizsgálatokhoz.

3.1.7 cDNS-alapú microarray

Az üveg cDNS-chipeket Horsch és munkatársai módszere szerint állítottuk elő (Horsch et al., 2008). A microarray mintegy 21.000 próbájának teljes leírása az NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) adatbázisban GPL3697 azonosító számon érhető el (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE7173>). A 7 ESC-vonal 13 különböző ESC-összehasonlításából származó expressziós adatokat (összesen 52 minta) a GEO adatbázisban GSE8424 azonosító számon publikáltuk (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi>). A nyers adatok jelentős mennyisége miatt azok online érhetőek el a megadott hivatkozásokon, a dolgozathoz nem kerülnek becsatolásra. Az egyes ESC-vonalak teljes sejt RNS-e a gyártó protokollja szerint került izolálásra az RNeasy Midi Kits (Qiagen, Hilden, Germany; <https://www.qiagen.com/>) alkalmazásával. A 13 RNS-minta összehasonlításánál négy független, kettős színű hibridizációt végeztünk (összesen n=52 minta). Minden kísérletet a módosított TIGR protokoll szerint végeztünk (Hegde et al., 2000; Horsch et al., 2008). A tárgylemezeket GenePix 4000A microarray szkennelvel szkenneltük, és a képeket a GenePix Pro 6.1 képfeldolgozó szoftverrel (Molecular Devices, San Jose, CA, USA <https://www.moleculardevices.com/>) elemeztük. A microarray hibridizációs kísérletek Dr. Marion Horsch és Dr. Sandra Geißler végezte Dr. Johannes Beckers irányításával (*Helmholtz Center Munich, German Research Center for Environmental Health, Institute of Experimental Genetics, Neuherberg, Germany*).

A statisztikai elemzést a TIGR Microarray Data Analysis System segítségével végeztük (Quackenbush 2002) a szignifikánsan eltérő szabályozású gének (SAM) azonosítására (Tusher et al., 2001). Az expressziós adatokat a TIGR szoftver MIDAS moduljával dolgoztuk fel teljes intenzitás normalizálását alkalmazva (Horsch et al., 2008). A klaszterelemzést hierarchikus klaszteranalízissel (HCL) (Eisen et al., 1998) végeztük. Először, ún. egyosztályos elemzést végeztünk a szignifikánsan eltérő expressziót mutató gének azonosítására mind a 13 mintában. Majd, a több sejtvonal összehasonlításában eltérően expresszáló gének kimutatására ún. többosztályos SAM-elemzést végeztünk. Összesen 13 kísérleti csoportot határoztunk meg: az egyes mintaösszehasonlítások négy chiphibridizációja külön csoportot alkotott. A gének

expresszió eltérését akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a 13 meghatározott csoportból legalább kettőben eltérően expresszáltak. A többosztályos elemzéssel azonosított gének HCL-je esetében az ún. átlagos kapcsolat módszerét alkalmaztuk, távolsági metrikaként pedig az euklideszi távolságot választottuk. Az eltérően expresszált gének *in silico* elemzéséhez a DAVID adatbázis EASE modulja (Dennis et al., 2003), amely a géneket a Gene Ontology (GO) funkcionális kategóriáihoz rendeli került alkalmazásra. Az EASE-elemzés az eltérően expresszált gének halmazát értékelte a biológiai folyamatok felülreprezentáltsága szempontjából.

3.1.8 Az eltérően expresszált gének validálása

A különböző hibridizációs csoportokban azonosított, eltérő expressziót mutató gének validálására kétféle megközelítés került alkalmazásra. Egyrészt a TaqMan Mouse Stem Cells Pluripotency Array panel (Applied Biosystems, TFS Inc.), ahol a microarray-elemzésből 14 eltérést mutató gén (*Actb*; *Cdh5*; *Colla1*; *Crabp2*; *Fnl1*; *Ifitm2*; *Igfbp2*; *Lefty1*; *Lefty2*; *Nanog*; *Podxl*; *Rest*; *Serpina1a*; *Utf1*) egyben az array 96 génje között is szerepel, másrészt az eltérést mutató gének listájából véletlenszerűen kiválasztott további 9 egyedi génre (*Tagln*; *Gas5*; *Ktn1*; *S100a6*; *S100a10*; *Sparc*; *Peg3*; *Feml*; *Dppa5*) vonatkozó kvantitatív valós idejű PCR (qPCR) módszer, amelyeket a következőkben ismertetek.

3.1.8.1 TaqMan array vizsgálat

A TaqMan Mouse Stem Cell Pluripotency Array panel (Applied Biosystems, TFS Inc.) összesen 96 génből áll, amelyek közül 40 gén ún. összejt és pluripotencia gén, 50 differenciálódási marker gén, valamint 6 kontroll gén (2. táblázat). A vizsgálathoz a cDNS mintát a cDNS chip módszerrel fentebb leírtakkal (3.1.7 alfejezet) megegyező módon került előállításra, 1 µg teljes RNS mintából kiindulva. A TaqMan array az Applied Biosystems mikrofluidikai technológiáját használja, amelyben 8 mintatöltő egységet tartalmaz a génexpressziós szintek egyidejű elemzésére kvantitatív PCR segítségével. A panel betöltése után a mintákat az Applied Biosystems 7900 HT Fast Real time PCR rendszeren (Applied Biosystems, TFS Inc.) kerültek elemzésre.

2. táblázat: A Mouse TaqMan Stem Cell Pluripotency Array génkészlete

Csoport	Gének száma	Egér gének szimbóluma
Differenciálatlan állapot	6	<i>Nanog</i> , <i>Pou5f1</i> , <i>Tdgf1</i> , <i>Dnmt3b</i> , <i>Gabrb3</i> , <i>Gdf3</i>
Pluripotencia fenntartása	3	<i>Nanog</i> , <i>Pou5f1</i> , <i>Sox2</i>
Össejt markerek	33	<i>Bxdc2</i> , <i>Cd9</i> , <i>Commd3</i> , <i>Crabp2</i> , <i>Lefty1</i> , <i>Fgf4</i> , <i>Fgf5</i> , <i>Foxd3</i> , <i>Gal</i> , <i>Gbx2</i> , <i>Grb7</i> , <i>Ifitm1</i> , <i>Ifitm2</i> , <i>Il6st</i> , <i>Igfbp2</i> , <i>Kit</i> , <i>Lefty2</i> , <i>Lifr</i> , <i>Lin28</i> , <i>Nodal</i> , <i>Nog</i> , <i>Nr5a2</i> , <i>Nr6a1</i> , <i>Podxl</i> , <i>Pten</i> , <i>Rest</i> , <i>Sema3a</i> , <i>Sfrp2</i> , <i>Tert</i> , <i>Tefcp2l1</i> , <i>Utf1</i> , <i>Xist</i> , <i>Zfp42</i> ,
Differenciációs markerek	49	<i>Actc1</i> , <i>Afp</i> , <i>Cd34</i> , <i>Cdh5</i> , <i>Cdx2</i> , <i>Colla1</i> , <i>Col2a1</i> , <i>Ddx4</i> , <i>Des</i> , <i>Eomes</i> , <i>Flt1</i> , <i>Fnl1</i> , <i>Foxa2</i> , <i>Gata4</i> , <i>Gata6</i> , <i>Gcg</i> , <i>Gcm1</i> , <i>Gfap</i> , <i>Hbb-b2</i> , <i>Hba-x</i> , <i>Hlx9</i> , <i>Iapp</i> , <i>Ins2</i> , <i>Pdx1</i> , <i>Isl1</i> , <i>Krt1</i> , <i>Lama1</i> , <i>Lamb1-1</i> , <i>Lamc1</i> , <i>Myf5</i> , <i>Myod1</i> , <i>Nes</i> , <i>Neurod1</i> , <i>Nppa</i> , <i>Olig2</i> , <i>Pax4</i> , <i>Pax6</i> , <i>Pecam1</i> , <i>Ptf1a</i> , <i>Runx2</i> , <i>Serpina1a</i> , <i>Sox17</i> , <i>Sst</i> , <i>Syp3</i> , <i>Syp</i> , <i>T</i> , <i>Tat</i> , <i>Th</i> , <i>Wt1</i>
Kontrollok	6	<i>18S</i> , <i>Eras</i> , <i>Actb</i> , <i>Raf1</i> , <i>Ctnnb1</i> , <i>Gapdh</i> , <i>Eef1a1</i>

3.1.8.2 Kvantitatív valós idejű PCR elemzés

A TaqMan array mellett kilenc véletlenszerűen kiválasztott gént és két ún. belső referencia gén került elemzésre kvantitatív valós idejű PCR (qPCR) segítségével, korábbi tanulmányunk módszertanát követve (Mamo et al., 2007; Mamo et al., 2008). A mintákat a TaqMan array-hez történő mintaelőkészítéssel együtt végeztük, azzal azonos módon. Röviden: a transzkriptumok mennyiségi meghatározása során a vizsgálat minden gén esetében az egyes ESC sejtvonalakból származó mintákból állt, öt ismétlésben, valamint negatív kontrollokból. A különböző génekre vonatkozó összes mennyiségi meghatározást megszakítás nélkül, egymás után került

elvégezésre. Egy menetben minden minta 50 ng egyenértékű cDNS-templátból, 200 nM saját tervezésű primerből (3. táblázat) és 50% SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Merck) keverékből állt, 15 µl reakcióterfogatban. A reakciókörülmények a következők voltak: a templát denaturálása és a polimeráz aktiválása 95°C-on 2 percig; majd 45 ciklus 95°C-os denaturálás 15 másodpercig, 56°C és 60°C közötti primer feltapadás (primerenként lásd a 3. táblázatban a specifikus hőmérsékletet) és lánchosszabbítás 45 másodpercig. Minden reakciót a Rotor-Gene™ 3000 valós idejű PCR berendezéssel (Corbett Research UK Ltd. Cambridge, UK; <https://www.corbettresearch.com/>) végeztünk, és az eredményeket az integrált Rotor-Gene szoftverrel (6.1-es verzió) elemeztük. A PCR-reakciók végén olvadási görbeelemzéseket (Tm) végeztünk valamennyi vizsgált génre.

3. táblázat: Egér primer szekvenciák és qPCR kondíciók

Gén szimbólum	Gén neve angolul (egér, <i>Mus musculus</i>)	Primer szekvencia (5'-3') F, forward; R, reverse	fragment mérete (bp)	Tm (°C)
<i>Tagln</i>	Transgelin	F-GATATGGCAGCAGTGCAGAG R-GCAGTTGGCTGTCTGTGAAG	142	56
<i>S100a6</i>	S100 calcium binding protein A6	F-TCCACAAGTACTCTGGCAAGG R-GGTCCAGATCATCCATCAGC	138	56
<i>S100a10</i>	S100 calcium binding protein A10	F-AGCTCTTCCAAGGACTGCTG R-TTTGTCAAGTGGTCTTTGTCG	138	60
<i>Gas5</i>	Growth arrest specific 5	F-GAGGACTCGTCAGGAAGCTG R-GTGTGGGTTGAGGGATCTTTAG	122	56
<i>Ktn1</i>	Kinectin	F-GGGAGGCTGGTGAGTGAAC R-AGCGCCTCTCAGCTTCTTG	124	56
<i>Sparc</i>	Secreted acidic cystein rich glycoprotein	F-ATCCCCATGGAACATTGCAC R-TCCTTGTTGATGTCCTGCTCC	122	60
<i>Peg3</i>	Paternally expressed 3	F-CACGAAGACGACACCAACAG R-AGGCTCCACATCTCTGCTTC	144	58
<i>Fem1b</i>	Feminization 1 homolog b	F-CTGTTAGAACACTACCGTGTGCAG R-GGCTCCATGGCTGACTAGAAG	144	58
<i>H2afz</i>	H2A histone family, member Z	F-ACAGCGCAGCCATCCTGGAGTA R-TTCCCAGATCAGCGATTTGTGGA	202	60
<i>Ppia</i>	Peptidylprolyl isomerase A	F-CGCGTCTCCTTCGAGCTGTTTG R-TGTAAGTACACCACCTGGCACAT	150	60
<i>Dppa5</i>	Developmental pluripotency associated 1	F-ACCCTCGTGACCCGTAAAG R-CCTGCTCGATGTGAGACATTC	142	56

3.2 POU5F1 pluripotencia gén vizsgálata nyúl embrióban

3.2.1 Nyúl BAC könyvtár

Nyúl genomiális BAC könyvtárból négy BAC-klón került izolálásra (LBAB-841A3; LBAB-85810; LBAB-304A07 és LBAB-779H10), amelyeket Dr. Claire Rogel-Gaillard (*Laboratoire INRA CEA de Radiobiologie et d'Etude du Genome, Departement INRA de Genetique Animale, Jouy-en-Josas, France*) biztosított a kísérletekhez. A könyvtárszűrést a korábban publikált módon végezték (Rogel-Gaillard et al., 2001). Az *Oryctolagus cuniculus* POU5F1 gén 5' szabályozó régiójának genomszekvenciája a GenBank adatbázisban **EF194086.1** számon publikáltuk (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EF194086>).

3.2.2 DNS fragmentumok klónozása és szekvenálása

A kapott PCR-fragmentumokat a pCR2.1-TOPO vektorba kerültek beillesztésre. A BAC-klónokat és a plazmid DNS-eket a QIAGEN Plasmid Maxi Kit és a QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) segítségével tisztítottuk. A szekvenálást a NAIK-MBK szekvenáló laboratóriumban végeztük (*jelenleg Eurofins BIOMI KFT.*), Applied Biosystems BigDye v3.1 Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems; TFS Inc.) felhasználásával, ABI PRISM 3100 Genetic Analyser automatizált nukleotid-szekvenálással. A cDNS-végek gyors

amplifikációja ún. RACE-PCR eljárással (RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends; TFS Inc.), a gyártó utasításai szerint végeztük. Külső primerként oct4-5UTR és oligo(dT) primereket, míg belső, génspecifikus primerként oct4-435 és oct4-186 primereket alkalmaztunk (4. táblázat).

4. táblázat: A nyúl genomialis BAC könyvtárak szűrésében, a promóter elemzésében és a való idejű PCR analízisben használt primerek.

Primer neve	Primer (5'-3') szekvencia	Pozíció	Primer mérete (bp)	T _m (°C)
oct4-435-F	AGCTTAGCTTCAAGAACATG	+3665	20	60,0
oct4-435-R	AGGAGTACAGTGCAGTGAAG	+4704	20	60,0
oct4-186-F	AGCAGAAACCTCGTGCAGG	+3759	20	60,0
oct4-186-R	TCTGGCGCGCCGGTTACAGAAC	+4181	20	60,0
*oct4-pseudo-F	GCTAAACAGAAAGAAAGAAGTTTGCC	* +420	22	57,0
*oct4-pseudo-R	GAACAGTCACTGCTTCTTGATCGTTT	* +870	23	58,1
oct4-cDNS-F	GCTCTACAGAAAGAAAGAACTCGAGCAG	+3640	24	57,9
oct4-cDNS-R	CGAGTACAGGGTAGCAAAGTGAG	+4869	23	60,0
CR1-ATGmut	TCTATGGGGGGGAAGGAGGAGGGCG	+5	20	60,0
CR1	AGGCTGGTGGGGCATAAACACAC	-558	20	60,0
CR1+(CR2+CR3)	GCCAGACTAGAGAGCCCAACAG	-1585	20	60,0
CR1+(CR2+CR3)+CR4	GGGAAATTGTGGAGGAGGAGGAC	-2030	20	60,7
CR4	TCTGTCTGCTGCTTGGTGGTGTGTC	-1670	20	59,9
Nyúl-oct4-RT-F	CGAGTGAGAGAGGCAACTTGG	+4418	19	55,5
Nyúl-oct4-RT-R	CGGTTACAGAACCACACACG	+4730	20	56,1
*Rabbit-oct4p-RT-F	CTAAACAGAAAGAAGTTTGCC	* +421	21	53,7
*Rabbit-oct4p-RT-R	CGCAGCTTACACATGTACT	* +594	19	52,3
Egér-oct4-RT-F	ATGCCGTGAAGTTGGAGAAG	+343	20	56,5
Egér-oct4-RT-R	GGTCTCTGGCTGAACACCTCTTTC	+3309	20	55,9

A kezdeti ATG +1-gyel van jelölve, a pozíciók a primer genomialis DNS-en való helyét mutatják. F, forward; R, reverse; * pszeudogén-specifikus primerek, ahol a pozíciók a primerek pszeudogénen való tapadási helyét mutatják.

3.2.3 Összehasonlító genomikai vizsgálatok

Az alábbi génbanki hivatkozási számú szekvenciák kerültek felhasználásra az analízishez: nyúl *POU5F1* cDNS: [EF062856](#), genomi szekvencia: [EF194086](#). A többszörös illesztésekhez a következő genomi, cDNS- és fehérjeszekvenciákat használtuk: humán: [NT_007592.14](#), [NM_002701.4](#), [NP_002692.2](#); egér: [MGI_101893](#), [NM_013633.2](#), [NP_038661.2](#); szarvasmarha: [NW_001494164.1](#), [NM_174580.1](#), [NP_777005.1](#). Az összehasonlító elemzéshez az egér [NT_039649.7](#), humán [NT_007592.14](#), szarvasmarha [AF022986](#) és kutya [NC_006594.2](#) *POU5F1* gén 5' upstream szekvenciáit a ClustalW2 program (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) segítségével illesztettük egymáshoz. A nukleotidszekvenciák páros összehasonlítását az EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms programmal (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) végeztük el.

3.2.4 Nyúl embrió minták

Az állatkísérleteket az európai és a magyar állatvédelmi és állatkísérletekre vonatkozó törvényeknek és előírásoknak teljes mértékben megfelelően végeztük, és azokat a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ (MBK; engedély szám: 126/3/2003) (jelenleg MATE-NAIK) Állatkísérleti Etikai Bizottsága hagyta jóvá a kísérleteket megelőzően. A vizsgálatban 18-22 hetes nőstény Hycol hibrid nyulakat (Charles River Laboratories Hungary Kft. <https://www.criver.com/>) használtunk. Az állatokat standard fény-sötét ciklusban (12 óra) egyedi ketrecekben, 19°C hőmérsékleten tartottuk, a táplálék és a víz *ad libitum* állt rendelkezésre. Az ovuláció elősegítésére 120 egység PMSG (Folligon®, Intervet, B.V.) intramuszkuláris, majd 72 órával később 170 egység hCG (Choragon®, Richter Gedeon Rt.) intraperitoneális beadással kezeltük a nőstényeket. A hCG kezelés után 16 órával a petesejteket

kimostuk az állatok petevezetékének ampulla részéből. Az állatokat ketamin/xilazin (Merck) adagolással túlaltattuk az embriómosás előtt. A kumulusz sejteket M2 tápoldatban (Merck) oldott 0,1%-os hialuronidáz enzim (Merck) kezeléssel távolítottuk el és a meiózis második szakaszában lévő érett petesejteket kiválogattuk mikroszkóp alatt, majd a mintákat RNáz mentes desztillált vízben (Merck) egyenként fagyasztva tároltuk felhasználásig -80°C-on.

A PMSG-vel és hCG-vel kezelt nőstény Hycote hibrid nyulak egy részét pároztattuk Hycote hím egyedekkel, majd a hCG kezelés után 20 órával a zigótákat kimostuk a nőstény állatok petevezetékéből M2 tápoldattal (Merck), túlaltatást követően. Morfológiájuk alapján minősítve mikroszkóp alatt válogattuk ki a két elősejtmaggal, két sarki testtel, tömör sejtplazmával rendelkezőket. A későbbi fejlődési stádiumú embriókat a hCG oltást követő 26 (kétsejtes), 44 (korai nyolcsejtes), 54 (késői nyolcsejtes), 68 (szedercsíra), 98 (hólyagszíra) órával gyűjtöttük embriómosással. A *zona pellucida* Pronase enzimmal (Merck) történő eltávolítása után a mintákat RNáz mentes desztillált vízben egyenként fagyasztva tároltuk -80°C-on.

A hólyagszíra állapotú embriókból származó ICM és trofoblaszt mintákat az XYClone lézerrendszerrel (Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA; <https://www.hamiltonthorne.com/>) választottuk szét mikroszkóp alatt (Tanaka et al., 2006). Röviden, a hólyagszíra embrió két ellentétes pólusánál, a trofoblaszt és az ICM régióknál két nagy furatú kapillárisal fogtuk be, majd óvatosan széthúztuk, miközben lézerimpulzusoknak tettük ki a trofoblaszt ICM-el szomszédos területét. Amikor a lézerimpulzusok átvágták a sejteket, a hólyagszíra két részét különválasztottuk, a mintákat RNáz mentes desztillált vízbe egyenként gyűjtöttük, majd -80°C-on fagyasztottuk. Az eljárás vizuálisan ellenőrzött jellege miatt a trofoblaszt minta ICM sejtektől mentes, azonban az ICM-minta kis számú trofoblaszt sejtet tartalmazhatott. A génexpressziós vizsgálatokban használt kontroll egér petesejteket és az *in vivo* embrió mintákat a korábban leírtak szerint gyűjtöttük (Mamo et al., 2007).

3.2.5 A *POU5F1* promóter funkcionális elemzése

A *POU5F1* promóter konzervált régióit többszörös szekvencia-illesztéssel azonosítottuk, PCR-rel amplifikáltuk (4. táblázat) és szubklónoztuk a GFP riportergént tartalmazó pGlow TOPO® TA Expression Kit (TFS Inc.) felhasználásával, a gyártó utasításait követve. A transzláció start kodonját PCR-alapú ATG-mutagenézissel mutáltuk (CR1-ATGmut primer; 4. táblázat).

A konstrukciókat az AMAXA Nucleofector System és a Mouse ES Cell Nucleofector Kit (Amaza Biosystems, Lonza; Basel, Switzerland; <https://bioscience.lonza.com>) segítségével nukleofektáltuk egér R1 ESC sejtekbe (Nagy et al., 1993). Az elektroporációt a gyártó protokollja alapján végeztük az A23 programon. Röviden, 5×10^6 sejtet használtunk a nukleofekcióhoz, és 5 µg plazmid DNS-t alkalmaztunk, a különböző konstrukciók kópiaszámának normalizálása után. A neomicin-szelekciót 24 órával a nukleofekciót követően kezdtük el 400 µg/ml G418 alkalmazásával (Merck) a tenyészeteken. A transzfekció ellenőrzésére az Amaza Nucleofector Kit pmaxGFP kontroll vektorát használtuk.

Az R1 ESC vonal (Nagy et al., 1993) (Dr. Nagy András; Samuel Lunenfeld Research Institute, Toronto, Kanada) standard protokollok szerint tenyésztettük (Nagy 2003). Az Oct4-GiP transzgenikus egér ESC vonalat, amely EGFP riportert gént expresszál az egér *POU5F1* [CR4+CR1] promóter régiójának irányítása alatt, Dr. Austin Smith (University of Edinburgh's Centre for Genome Research, UK, Edinburgh) bocsátotta rendelkezésünkre (Hubner et al., 2003). A transzgenikus ubikvitin promóter-GFP expresszáló ESC vonalat (B6U 3) C57BL/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J transzgenikus egerekből (Stock Number: 004353, <https://www.jax.org/strain/004353>; The Jackson Laboratory, Farmington, CT, USA; <https://www.jax.org/>) izoláltuk korábban laboratóriumunkban (nem publikált adat).

3.2.6 Fluorimetriás vizsgálat

A GFP-vizsgálatokhoz a nukleofektált ESC sejteket 72 órával a transzfekció után 0,25% Tripszin-EDTA (TFS Inc.) kezelést követően gyűjtöttük be a Petri csészéről, PBS oldatban szuszpendáltuk, majd a fluoreszcencia intenzitását a Perkin-Elmer LS-50B lumineszcens spektrofotométerrel (PerkinElmer Inc. Shelton, USA; <https://www.perkinelmer.com/>)

detektáltuk (gerjesztés: 375 nm, detektálás: 510 nm). A fluoreszcenciát korrigáltuk a csak pGlow-TOPO® vektorral transzfektált sejtek által mutatott háttéraktivitással. Az egyes kísérletek közötti sejtszám eltérést a sejtfehérje-tartalom mérésével korrigáltuk (Bio-Rad DC Protein Assay system, BioRad Laboratories Inc. Hercules, CA, USA; <https://www.bio-rad.com/>).

3.2.7 Kvantitatív valós idejű PCR elemzés

A petesejtekből és embriókból történő mRNS-izolálást Dynabeads® mRNA Direct Micro Kit (TFS Inc.) alkalmazásával történt a gyártó utasításai szerint. A cDNS-szintézist minden RNS-mintán DNáz-kezelés (Ambion, TFS Inc.) előzte meg. A komplementer DNS-szintézist MMLV reverz transzkriptázzal és oligodT primerek használatával, a gyártó protokollja szerint végeztük (TFS Inc.) (Gal et al., 2006). A qPCR mérés a 3.1.8.2 alfejezetben közöltek szerint került elvégzésre, az alábbi kivételekkel: A reakcióelegy 300 nM primert tartalmazott (4. táblázat) és 0,1 embrió-ekvivalens cDNS-ből állt 25 µl végső térfogatban. A reakció körülményei a következők voltak: a templát denaturálása és a polimeráz aktiválása 95°C-on 2 percig; majd 45 ciklus 95°C-os denaturálás 15 másodpercig, 60°C-os primer feltapadás és lánchosszabbítás 45 másodpercig, minden ciklusban egyszeri fluoreszcenciaméréssel. Az adatok a referenciagének (*H2afz*, *Hprt1* és *Ywhaz*) expresszió értékei alapján kerültek normalizálásra, a korábban általunk meghatározott eljárás szerint (Mamo et al., 2008). Hasonló normalizálási eljárásokat végeztünk az egér *Pou5f1* transzkriptumok mennyiségi meghatározása során egér referencia génkészletek felhasználásával, amelyeket korábban publikáltunk (Mamo et al., 2007).

3.2.8 Pszeudogén kimutatása

A *POU5F1* pszeudogén-specifikus primerek tervezését megelőzően BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) keresést végeztünk, hogy azonosítani tudjuk az eddigi nyúl *POU5F1* pszeudogén szekvenciákat. Az adatbázisban kizárólag egy szekvencia volt azonosítható EU191070 referencia számon. A cDNS és a pszeudogén szekvenciaillesztése alapján a kódoló gén amplifikációjának elkerülése érdekében a nyolc nukleotidból álló deléciós régióra kerültek tervezésre a primerek (4. táblázat). A genomiális DNS nyúl bőrszövet mintából DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) alkalmazásával, a gyártó utasításait követve került izolálásra.

3.3 Haszonállatok embrióinak összehasonlítása, a pluripotencia gének expressziójának vizsgálata

3.3.1 Egér sejtvonalak tenyésztése

Az egér ESC sejtvonalak tenyésztése megegyezett a korábban a 3.1.3 alfejezetben az egér ESC sejtvonalaknál ismertetett protokollal. A kísérletekben C57Bl/6xDBA/Ja (mESCs 1), 129S2/SvPas (mESCs 2), valamint HM1 (129Ola) sejtvonalakat használtunk fel. A „2i+LIF médium” összetétele a következő volt: knockout DMEM (Merck) 2 mM L-glutamin, 1000 NE/ml rekombináns egér leukémia inhibitor faktor (ESGRO-LIF, Merck), 15% magzati szarvasmarha szérum (FBS, HyClone), 1x nem esszenciális aminosavak (NEAA), 0,2 mM 2-merkaptotanol, 50 NE/ml penicillin, 50 mg/ml sztreptomycin (TFS Inc.), kiegészítve 0,2 µM PD0325901 és 3 µM CHIR99021 kismolekulákkal (STEMGENT, REPROCELL USA Inc. Beltsville, USA; <https://store.reprocell.com/>).

A C57Bl/6xDBA/Ja (mEpiSCs 1) és 129S2/SvPas (mEpiSCs 2) mEpiSC-eket osztódásában gátolt MEF tápláló sejtrétegen kerültek tenyésztésre 12 ng/ml FGF2-t (R&D systems, Minneapolis, USA; <https://www.rndsystems.com/>) tartalmazó kémiaiilag definiált tápoldatban (CDM), 20 ng/ml Activin A (R&D Systems) kiegészítéssel, 37°C-on, 5% CO₂ koncentráció mellett, termosztátban. A sejteket Kollagenáz II (Merck) segítségével kis csomókban kerültek átültetésre 3-4 naponta, friss MEF rétegre.

3.3.2 Felhasznált embriók és embrionális szövetek

A 6-8 hetes B6D2 (Charles River Laboratories Hungary Kft. Magyarország) F1 nőtény egerek szuperovuláltatásához 5 NE PMSG (Folligon[®], Intervet, B.V.) injekció (subcutan), majd 48 órával később 5 NE hCG (Choragon[®], Richter Gedeon Rt.) (subcutan) injekciót adtunk be. A **B6D2 F1 zigótákat** a hCG injekciót követő 20 órával a petevezeték ampullájából, míg a hólyagcsíra stádiumú embriókat a fertilizációt követő 3. napon a méhből gyűjtöttük M2 médiummal történő átöblítéssel. Az embriókat KSOM (KSOM+AA; EmbryoMax, Millipore, Merck) mikrocseppben, ásványi olaj (Merck) alatt tartottuk 37°C-on, 5% CO₂ mellett a további manipulációig.

A 3.2.4 alfejezetben ismertetett XYClone lézerrendszer alkalmazásával az ott ismertetett módszerrel választottuk szét az ICM/epiblaszt és trofoblaszt mintákat az egyes embriókban. A mintákat feldolgozásig TriZol oldatban gyűjtöttük (Merck) és fagyasztva tároltuk a génexpressziós vizsgálatokhoz (RNS izolálás), vagy 4%-os PFA oldatba (immuncitokémia) gyűjtöttük, majd analizáltuk (lásd 3.1.5.1 alfejezet). A felhasznált ellenanyagokat az 1. melléklet tartalmazza.

Az **implantálódott egér embriókat** a korábban leírtak szerint izoláltuk (Nagy 2003). Két időpontban izoláltunk epiblaszt mintákat: a gasztruláció előtti stádiumban (ERSE stádium) és a gasztruláció közepén (APE stádium). Az ERSE-mintákat F1 egerek esetében E6.25 időpontban, 129S2 egerek esetében pedig E6.75 stádiumban izoláltuk, míg az APE-mintákat F1 egerek esetében E6.75, 129S2 egerek esetében pedig E7.25 stádiumban. A vemhes nőtény állatokat nyaki diszlokációval elöltük. A méhszarkak sebészi eltávolítása után a méhet PBS oldatba (Merck) helyeztük. Az embriókat először a decíduából izoláltuk, majd a Reichart-membránt távolítottuk el csipesszel, és az ektoplacentáris kúp (trofoblaszt) szövetét kivágtuk. A zsigeri endodermát és más extraembrionális szöveteket mind az ERSE-, mind az APE-embriókból eltávolítottuk, és míg az ERSE-stádiumú epiblasztot tiszta epiblasztként, az APE-stádiumú epiblasztot a mezodermális szövettel együtt izoláltuk és TriZol oldatba (Merck) helyeztük vagy 4% PFA oldatban fixáltuk és immuncitokémiai analízisnek vetettük alá.

A szarvamarha és sertés embriók kinyerése nem laboratóriumunkban történt, a minták előállítását és gyűjtését Bernardo et al. cikke ismerteti részletesen (Bernardo et al., 2018).

3.3.3 Génexpressziós vizsgálatok

Az izolált mintákat (embriók, embrionális szövetek, sejtvonalak) TriZol oldatba (Merck) gyűjtöttük és lefagyasztottuk. Az RNS-t a PureLink[™] RNA Micro Kit (TFS Inc.) segítségével izoláltuk. Az RNS mintákból cDNS-t készítettünk RTq-PCR-hez SuperScript[™] III Reverse Transcriptase (TFS Inc.) segítségével; vagy szekvenáláshoz 100 pg RNS felhasználásával és a SMARTer[™] Ultra Low RNA Kit for Illumina Sequencing KIT (Clontech; Takara Bio Group, Mountain View, USA; <https://www.takarabio.com/>), segítségével készítettük elő (Kurimoto et al. 2006). A minták szekvenálása Illumina HiSeq2000 módszerrel történt. Az összes RNS-szekvencia (FASTQ és BedGraph fájlok) megtalálható az NCBI GEO SuperSeries GSE53387 adatbázisban (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE53387>). Az RNS szekvenálási adatok elsődleges bioinformatikai feldolgozását és elemzését Bernardo et al. cikke ismerteti részletesen (Bernardo et al., 2018).

A **qPCR vizsgálatokhoz** a kiválasztott génekre specifikus primereket a Primer3 (Rozen és Skaletsky, 1999) program segítségével terveztük. A primereket kétszeres sorozatos hígítású standard görbék segítségével optimalizáltuk, kontrollként a *Gapdh* referenciagént használtuk (5. táblázat). A cDNS mintákat a fentebb részletezett módon állítottuk elő, minden reakció cDNS-templátot, 200 nM saját tervezésű primert (5. táblázat) és 50% SYBR Green ReadyMix-et (Applied Biosystems, TFS Inc.) tartalmazott, összesen 10 µl térfogatban. A PCR-ek elvégzéséhez StepOne Plus (Applied Biosystems, TFS Inc.) rendszert használtunk. A ciklikus paraméterek a következők voltak: 95°C, 5 perc pre-denaturáció; majd 40 ciklus 95°C 10 mp denaturáció, 60°C 15 mp primer feltapadás, 72°C 30 mp lánchosszabbítás. A primerek

specifitását olvadási görbe elemzéssel erősítettük meg. Minden gén esetében három biológiai ismétlés adatait elemeztük.

5. táblázat: A vizsgálatban használt egér qPCR primer szekvenciák

Gén rövidítése	GenBank	Primer szekvencia (5' - 3') F, forward; R, reverse	Termék (bp)
<i>Pou5f1</i>	NM_013633.3	F: AGCCGACAACAATGAGAACC R: TCTCCAGACTCCACCTCACA	110
<i>Spic</i>	NM_011461.3	F: TGGAAATGTCACCCACAGAGA R: CTGTACGGATTGGTGAAGC	100
<i>Gj5b</i>	NM_010291.3	F: AGGAGCGGGTACTAAGGGA R: ACACGGAAGACGAAGACCA	163
<i>Klf4</i>	NM_010637.3	F: ACTCACACAGGCGAGAAACC R: AAGGCCCTGTCACACTTCTG	140
<i>Scpep1</i>	NM_029023.3	F: GATCTGTCTCGTGCGACTGTG R: CCCATACTTCCTTGCCTTCG	104
<i>Psap</i>	AF037437.1	F: AATCCCTTCCTTGCGACATA R: AGAGTCAACCACCTCCTTGC	161
<i>Trip6</i>	NM_011639.3	F: GCTGTTACAAGTGTGAGGAGTGT R: TGGTGACAGTGGCTGAGAG	138
<i>Jakmip2</i>	NM_001163637.1	F: TACGGAGGCTGATGGATGAAA R: CTCTCTCTTCGGACTGCTCA	176
<i>Dusp6</i>	NM_026268.3	F: ATGCGGGCGAGTTCAAATAC R: CTGATACCTGCCAAGCAATG	148
<i>Lin28b</i>	NM_001031772.2	F: CATGGGATTCCGGATTCATCT R: TGGCTCTCCTTCTTCAAGC	127
<i>Sema6a</i>	NM_018744.2	F: CACCTCTGCGTTCTCTTCCT R: GAATGTGACTGTGGCCTGTG	137
<i>Fst</i>	NM_008046.2	F: AAGTGTATCACAAAGTCCTGTGAA R: GGCGTATGTGGCATTGTC	162
<i>Car14</i>	NM_011797.2	F: CACCTCTGCGTTCTCTTCCT R: GAATGTGACTGTGGCCTGTG	125
<i>Lpar4</i>	NM_175271.4	F: GAAGTGCGAGTTGCCAGTTT R: GGAGGCAGACGATCAGAGAG	122
<i>Gapdh</i>	NM_008084.2	F: AATGTGTCCGTCGTGGATCT R: CCTGCTTCACCACCTTCTTG	79

3.4 MPS II betegségmodellezés iPSC sejtek felhasználásával

3.4.1 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; 314/2014 (31203/1/2014/EKU) „Indukált pluripotens őssejtek (iPS) előállítása humán szomatikus eredetű mintákból”) a BioTalentum Kft. kutató laboratóriumában (ETT Humán Reprodukciós Bizottság ETT/HRB 22292-1/2010-1016EHR engedély), zárt rendszerben (OGYI/9788-13/2015); a sejtvonalaknál hivatkozott publikációkban közöltek szerint.

A vizsgálatokban kontrollként (Ctrl) egy önkéntes, egészséges donor (32 éves kaukázusi nő) sejtjeiből előállított iPSC vonalat használtunk, amelyet ugyanolyan eljárással hoztunk létre, mint a betegség-specifikus iPSC vonalat. A jelen vizsgálat betegség-specifikus iPSC-vonalai a BioTalentum Kft. laboratóriumában kerültek létrehozásra, melyet korábban publikáltunk: MPSII-1.3 (Varga et al., 2016a), MPSII-2.5 (Varga et al., 2016b), MPSII-4.1 (Varga et al., 2016c), és Ctrl-M.1 (Varga et al., 2016d). Röviden, az MPSII-1.3 és MPSII-2.5 vonalat azonos mutációt (NM_000202.7(IDS):c.85C>T, p.Gln29Ter) hordozó (1 és 3 éves) fiú gyermek donor testvérek (Varga et al., 2016a; Varga et al., 2016b), míg a Ctrl-M.1 (MPSII-mother.1) az

édesanyjuk (39 éves) perifériális vér mononukleáris sejtjeiből (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) származott, aki a betegség által nem érintett, de mutációt hordozó (Varga et al., 2016d). Az MPSII-4.1 vonal egy nem rokon (7 éves), a betegségben szenvedő fiú gyermek betegből származik, aki egy másik pontmutációt (NM_000202.7(IDS):c.182C>T, p.Ser61Phe) hordoz (Varga et al., 2016c). Minden sejtvonal PBMC sejtek genetikai újraprogramozásával került előállításra, a fentebb hivatkozott publikációk szerint.

Az iPSC sejtvonalak létrehozása nem képezi részét a dolgozatban bemutatott eredményeknek, így a technológia részletes módszertani ismertetése sem. A dolgozatban a genetikai újraprogramozással létrehozott humán iPSC vonalak betegségmodellként való alkalmazása kerül bemutatásra. A kísérletek megértéséhez szükséges szintű módszertani háttér az irodalmi áttekintés tartalmazza.

3.4.2 Humán iPSC tenyésztés

Az iPSC sejtek Matrigel oldattal bevont sejttenyésztő edényeken (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), mTeSR-1 tápoldatban (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada; <https://www.stemcell.com/>), a gyártó utasításainak megfelelően, 37°C-on, 5% CO₂ mellett inkubátorban kerültek tenyésztésre. A sejtek passzálása 3-4 naponta történt, TrypLE™ Select Cell Dissociation Reagent (TFS Inc.) alkalmazásával, a gyártó utasításai szerint.

3.4.3 Neuronális differenciálódás és fenntartás

Az iPSC sejtek neuronális progenitor sejtekké (*Neuronal Progenitor Cells*, NPC) történő differenciáltatása az ún. kettős SMAD-gátlást (Chambers et al., 2009) alkalmazva, Shi és munkatársai részletes protokollját követve (Shi et al., 2012b) történt. Röviden, a differenciáltatás tizedik napjáig 10 µM SB431542, 500 ng/ml Noggin (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA; <https://www.rndsystems.com>) és 5 ng/ml bFGF tartalmú neurális indukciós közegben (NIM oldat: 50% DMEM/F12 és 50% Neurobasal tápoldat, kiegészítve 1xN2, 2xB27, 2 Mm glutamin, 1x nem esszenciális aminosav (NEAA), 100 µM β-merkaptopetanol, 5 µg/ml inzulin; TFS Inc.) tenyésztettük a sejteket a neuroektodermális differenciálódás indukálására. A szövettenyésztő lemezeket poli-L-ornitin és laminin oldattal (POL/L; 0,002%/1 µg/cm²) (Merck) vontuk be. A differenciáció során képződő neurális rozettaszerű struktúrákat steril mikroszkóp alatt (Olympus SZX2; Olympus Corporation) mikropipettával izoláltuk, és POL/L lemezekre ültettük át a 10. nap után. Az NPC-eket neurális fenntartó médiumban (NMM médium: 50% DMEM/F12 és 50% Neurobasal tápoldat, 1xN2, 2xB27, 2 Mm glutamin, 1xNEAA), 10 ng/ml bFGF és 10 ng/ml EGF hozzáadásával kiegészítve növesztettük. Az NPC-eket 100%-os konfluencia elérésekor Accutase enzim (TFS Inc.) segítségével passzáltuk, és 50.000 sejt/cm² sejtsűrűséggel ültettük ki a további szaporításhoz. Az NPC sejteket 4. és 8. passzázs között fagyasztottuk, további felhasználásra (fagyasztó médium: 20% DMSO; 20% FBS, 60% DMEM:F12).

Az NPC-eket agykérgi neuronokká terminálisan differenciáltattuk (TD) úgy, hogy a sejteket Accutase oldat alkalmazásával izoláltuk a sejttenyésztő edényekről, majd POL/L (0,002%/2 µg/cm²) lemezre ültettük őket 40.000 sejt/cm² sejtsűrűségben, NMM tápoldatban (Shi et al., 2012b), bFGF és EGF kiegészítés nélkül. A tápoldatot 3-4 naponta cseréltük 5 hétig (35 nap, TD35 jelöléssel) a megfelelő differenciáció eléréséig.

3.4.4 Immuncitokémiai (ICC) és FACS analízis

A neurális markerek expresszióját hagyományos ICC-festéssel elemeztük, a 3.1.5.1 alfejezetben ismertetett módszer szerint. A felhasznált antitesteket az 1. melléklet tartalmazza.

Az NPC sejteket 0,5% Tripszin-EDTA kezeléssel gyűjtöttük össze, hogy egysejtes sejtszuspenziót kapjunk, majd 4%-os PFA oldattal (20 perc, szobahőmérséklet) fixáltuk. A fixálás után a sejteket 0,2%-os Triton X-100 tartalmú PBS oldatban permeabilizáltuk (5 perc, szobahőmérséklet); majd 1%-os BSA-val (PBS oldatban) blokkoltuk (15 perc, szobahőmérséklet). Ezután a sejteket a megfelelő antitestekkel inkubáltuk 1 órán keresztül

szobahőmérsékleten. A nem konjugált primer antitestekhez izotípus-specifikus másodlagos antitesteket használtuk (1. melléklet).

3.4.5 GAG vizsgálat

A szulfatált proteoglikánok és glikozaminoglikánok (sGAG) mennyiségi meghatározása a Blyscan™ Glycosaminoglycan Assay (Biocolor Ltd., Carrickfergus, UK; <https://www.biocolor.co.uk/>) segítségével történt a gyártó utasításait követve. Az NPC-eket és a terminálisan differenciált neuronális kultúrákat 6-lyukú lemezekben növesztettük minden kísérlethez négy párhuzamos mintával. A mintákat a Varioskan Flash (TFS Inc) mikrolemez olvasóval mértük, és az eredményeket annak szoftverével (SkanIt Software V6.0) elemeztük.

3.4.6 Western Blot analízis

A sejt kultúrákat a Halt™ proteáz és foszfatáz inhibitor koktéllal és a Pierce™ Universal Nuclease for Cell Lysis (TFS Inc.) kiegészített RIPA lízis és extrakciós pufferrel (TFS Inc.) lizáltuk, szonikáltuk, és a teljes fehérjekoncentrációt a Pierce BCA Protein Assay Kit (TFS Inc.) segítségével határoztuk meg. A fehérjemintákat (5 µg/minta) 12%-os SDS-poliakrilamid géleken elválasztottuk és Immun-Blot® PVDF membránra (Bio-Rad, Hercules, CA, USA; <https://www.bio-rad.com/>) vittük át. A membránokat 5% alacsony zsírtartalmú tejporthoz tartalmazó TBST-vel (20 mM Tris-HCl pH:7,4 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20) blokkoltuk (1 óra, szobahőmérséklet), majd egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk elsődleges antitestekkel (6. táblázat). TBST-vel történő mosás után a membránokat torma peroxidázzal (HRP) konjugált másodlagos antitestekkel 1:2000 (Merck) inkubáltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. A jeleket SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (TFS Inc.) segítségével detektáltuk a KODAK Gel Logic 1500 képalkotó rendszerrel és a Kodak MI SE képalkotó szoftverrel. A fehérje sávok intenzitásának denzitometriás mérését Image Studio™ Lite szoftverrel (LI-COR; LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA) végeztük.

6. táblázat: A Western-blot kísérletekben használt elsődleges ellenanyagok

Ellenanyag neve	Hígítás	Gyártó (Katalógusszám)
Mouse anti-LAMP2	1:500	Abcam (ab25631)
Rabbit anti-GRP78/BIP	1:1000	Abcam (ab21685)
Rabbit anti-Calreticulin	1:5000	Abcam (ab92516)
Rabbit anti-MAP1LC3A/B	1:500	BioRad (AHP2167)
Rabbit anti-GAPDH	1:20000	Merck (G9545)
<i>Abcam, Cambridge, UK; https://corporate.abcam.com/</i>		

3.4.7 Elektronmikroszkópia

Az NPC-eket Dispase enzim kezeléssel (Merck) leválasztottuk a sejttenyésztő edény felszínéről és centrifugálással pelletáltuk a fixáláshoz, míg a 24-lyukú szövettényesztő edényben üveglemezekben növesztett, terminálisan differenciálódott agykérgi neuronokat 3,2% PFA-t, 0,2% glutaraldehydet, 1% szacharózt, 40 mM CaCl₂ tartalmazó oldattal közvetlenül fixáltuk 0,1 M kakodilát pufferben (pH 7,4) (Merck), 12 órán keresztül 4°C-on. Az ultrastrukturális elemzésre szánt mintákat 1% ferrocianiddal redukált ozmiumtetroxiddal (Merck) utófixáltuk (White et al., 1979), fokozatos etanol-sorozat segítségével dehidratáltuk, majd Spurr alacsony viszkozitású epoxigyanta (Merck) közegbe ágyaztuk. Az ultravékony metszeteket Formvar (Agar Scientific Ltd. London UK; <https://www.agarscientific.com>) bevonatú réz hálóra (*grid*) gyűjtöttük, uranil-acetáttal és Reynolds ólom-citráttal (Merck) kontrasztoltuk, majd Morada 11 megapixeles kamerával (Olympus) felszerelt JEOL JEM 1011 transzmissziós elektronmikroszkópon vizsgáltuk iTEM szoftver segítségével (JOEL Ltd., Akishima, Tokyo, Japan; <https://www.jeol.com/products/scientific/tem/>). Az elemzést Dr. Molnár Kinga és Dr.

László Lajos végezte (*Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest*).

3.4.8 qPCR génexpressziós elemzés

A teljes RNS-t az RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) segítségével izoláltuk NPC és neuronális kultúrákból (TD35). A reverz transzkripcióhoz 600 ng izolált RNS-t használtunk a Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR with dsDNase (TFS Inc.) KIT-tel, a gyártó utasításai szerint.

A primereket kétszeres sorozatos hígítású standard görbék segítségével optimalizáltuk. Referencia génként *GAPDH*-t használtunk (7. táblázat). Minden egyes valós idejű PCR-reakció 5 ng RNS-ekvivalens cDNS-templátot, 400 nM-t minden egyes saját tervezésű primerből és 50% SYBR Green JumpStart Taq ReadyMixet (Merck) tartalmazott, 15 µl össztérfogatban. A PCR-reakciókat a QIAgility folyadékkezelő robot segítségével állítottuk be, és egy Rotor-Gene Q készüléken (Qiagen) futtattuk le. A ciklikus paraméterek a következők voltak: pre-denaturáció 94°C 3 perc (1x); 40 ciklus denaturáció 95°C 5 mp, lánchosszabbítás 60°C 15 mp és lánchosszabbítás 72°C 30 mp. Minden gén esetében három ismétlés adatait elemeztük a Relative Expression Software Tool 2008 V2.0.7 segítségével (Pfaffl et al., 2002).

7. táblázat: Az qPCR és XBP1 kísérletekben használt primerek szekvenciája

Gén rövidítése	Azonosító szám (Gene Bank)	Primer Szekvencia (5'-3') F, forward; R, reverse	PCR termék (bp)
qPCR primerek			
<i>PAX6</i>	5080	F: GCCAGCAACACACCTAGTCA R: TGTGAGGGCTGTGTCTGTTC	138
<i>NES</i> (<i>NESTIN</i>)	10763	F: ACTGAAGTCTGCGGGACAAG R: CAGTGGTGCTTGAGTTTCTG	64
<i>TUBB3</i>	10381	F: AACGAGGCCTCTTCTCACAA R: GGCCTGAAGAGATGTCCAAA	107
<i>MAP2</i>	4133	F: TTGTCTCTAACCGAGGAAGCA R: TCGTTGTGTCGTGTTCTCAA	103
<i>RBFOX3</i> (<i>NEUN</i>)	146713	F: GGAGAAGCTGAATGGGACGA R: GCCGTGGCATTATTGACCT	60
<i>AQP4</i>	361	F: ATGGAGGTGGAGGACAACAG R: GGTCAACGTCAATCACATGC	85
<i>GAPDH</i>	2597	F: CTCTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC R: TGAGCGATGTGGCTCGGCT	69
XBP1-assay primerek			
<i>XBPI(S)*</i>	7494 (NM_001079539.1)	F: TGCTGAGTCCGCAGCAGGTG R: GCTGGCAGGCTCTGGGGAAG	169
<i>XBPI(S) /</i> <i>XBPI(U)</i>	7494 (NM_001079539.1; NM_005080.3)	F: GGGAAATGAAGTGAGGCCAGT R: GGAAGGGCATTGAAGAACA	183/209
Szekvenáló primerek			
<i>IDS (full CDS)</i>	3423 (NM_000202.7)	F: TTCCCGACGAGGAGGTCTCT R: TTCTCAGGCCAAATTGTTGA	1905
<i>IDS-int</i>	3423 (NM_000202.7)	F: GTCAGCCAGTCCTTTCTTCC R: CCAGGGTGATGTTCTCCAAG	-

* (van Schadewijk et al., 2012)

3.4.9 Az endoplazmatikus retikulum stressz XBP1-vizsgálata

Az endoplazmatikus retikulumban (ER) az ún. unfolded fehérjék (nem kialakult térszerkezetű fehérjék) felhalmozódásakor az X-box kötő fehérje 1 mRNS-ből (XBP1(U)) egy 26 nukleotidból álló fragmentum egy speciális splicing mechanizmus segítségével levágódik (Yoshida et al., 2001). Ez a rövidebb mRNS (XBP1(S)) az ER-stressz gyakran használt markere. Az XBP1(S) expressziójának vizsgálatához korábban leírt primert és saját tervezésű primereket egyaránt használtunk (7. táblázat) (van Schadewijk et al., 2012). Pozitív kontrollként a Ctrl iPSC sejteket 1 μ M tunikamicinnel (Merck) kezeltük az ER-stressz kiváltására. A PCR-reakciókat Phusion Hot Start II High-Fidelity DNS-polimeráz (TFS Inc.) és 20 ng cDNS felhasználásával végeztük. A PCR-termékeket 2%-os agaróz gélen tettük láthatóvá.

3.5 Össejtekből differenciáltatott 3D neuroszferoidok toxikológia alkalmazása

3.5.1 Humán iPSC sejtvonal és tenyésztése

A kísérletekben a Ctrl-2 jelzésű humán iPSC vonalat használtuk, amely egy egészséges önkéntes, középkorú kaukázusi nő perifériás vér mononukleáris sejtjeiből (PBMC) Sendai-vírus mediált genetikai újraprogramozással került előállításra a Biotalentum Kft laboratóriumában, korábbi közleményünk szerint (Zhou et al., 2016; Chandrasekaran et al., 2017). A sejteket BD Matrigel™ mátrixon (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) mTeSR™1 médiumban (Stem Cell Technologies), a passzázsokhoz Gentle Cell Dissociation Reagenst (Stem Cell Technologies) használva tenyésztettük, a gyártó utasításai szerint. A sejteket 37°C-on, 5% CO₂ mellett, párasított légkörben tenyésztettük; a vizsgálatokban a differenciáláshoz a 16. és 17. passzázsból származó tenyészeteket használtuk.

3.5.2 Neuronális differenciáltatás

A Ctrl-2 hiPSC vonalat a 3.4.3 alfejezetben ismertetett módon, a kettős SMAD gátlási eljárással differenciáltuk NPC sejtekké.

3.5.3 3D neuroszferoid tenyésztés

Az NPC sejteket POL/L (0,002%/1 μ g/cm²) bevonatú lemezekre (50.000 sejt/cm²) tenyésztettük. Amikor elérték a 100%-os konfluenciát, az NPC-eket Accutase kezeléssel távolítottuk el az aljzatról, és az egysejtes szuszpenziót alacsony adherenciájú 96-lyukú lemezre ültettük, 10.000 sejt/lyuk sejtszámmal, NMM médiumban. A neuroszferoidok a kiültetést követő 48 órán belül kialakultak, ezt követően 3 naponként cseréltük a sejtenyészti tápoldat felét. A mintákat a 0. napon (D0), a 2. napon (D2) és az 1. hét végétől (D7) a 6. hét végéig (D14, D21, D28, D35 és D42) heti rendszerességgel gyűjtöttük a vizsgálatokhoz.

3.5.4 Immuncitokémia (ICC)

A 3D neuroszferoidokat 4%-os paraformaldehiddel (PFA) fixáltuk (egy óra, szobahőmérséklet), majd háromszor mostuk PBS oldattal. A rögzített mintákat 0,01% nátrium-azidot tartalmazó PBS és 30% szacharóz oldatában helyeztük legalább 2 napra, 4°C-on a Shandon Cryomatrix gélbe (TFS Inc.) történő beágyazásig. A 16 μ m-es párhuzamos metszeteket kriosztát (Leica CM 1850 kriosztát, Leica GmbH) segítségével készítettük el, Superfrost™ Ultra Plus Adhesion Slides (TFS Inc.) lemezekre rögzítettük, és felhasználásig -20°C-on tároltuk. Immunfestésnél 10 perces légszárítás után a metszeteket egy órán át szobahőmérsékleten blokkoló oldattal (3% BSA, 0,2% TritonX-100 PBS-ben; Merck) kezeltük. Az immunjelölés további lépései megegyeztek a 3.1.5.1 alfejezetben ismertetett immunfestési eljárással. Az alkalmazott ellenanyagokat az 1. melléklet tartalmazza. Az immunreaktív metszeteket egy BX-41 epifluoreszcens mikroszkóp (objektívek: 20x 0,50 NA; 40x 0,75 NA; Olympus) segítségével elemeztük, amelyhez egy DP-74 digitális kamera és a CellSens szoftver (V1.18; Olympus) volt

felszerelve. Az Olympus Fv10i-W kompakt konfokális mikroszkópos rendszert (objektív: 60x 1,35 NA; Olympus) az Fv10i szoftverrel (V2.1; Olympus) alkalmaztuk a konfokális képalkotáshoz. Minden képet a GNU Image Manipulation Program (GIMP 2.10.0) és az NIH ImageJ elemző szoftver (<https://imagej.net/ij/>) segítségével dolgoztunk fel. A 3D neuroszferoidok metszését és immunhisztokémiai feldolgozását (konfokális mikroszkópia) Dr. Bellák Tamás végezte (*BioTalentum Kft*).

3.5.5 Apoptózis teszt

A 3D minták beágyazását és krioszekcionálását a fentiek szerint végeztük. Az apoptotikus aktivitás kimutatására a DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System (Promega Corporation, Madison, WI, USA; <https://worldwide.promega.com/>) rendszert használtuk a szferoidok középső (legnagyobb átmérőjű) metszetein, a gyártó utasításait követve. A mikrofotókat DP-74 digitális kamerával (Olympus) készítettük fénymikroszkóp (BX-41, objektívek: 20x 0,50 NA; 40x 0,75 NA; Olympus) és CellSens szoftver (V1.18; Olympus) segítségével. Az NIH ImageJ elemző szoftvert használtuk az apoptotikus és az összes (hematoxilinnel festett) sejtek számának megszámlálásához. Öt kontroll és öt kezelt szferoidot választottunk ki véletlenszerűen, három kísérletben (n=3) minden differenciálódási stádiumban (D21, D28 és D42), ahol minden mintából a középső (~legnagyobb átmérő) metszeteket elemeztünk.

3.5.6 Elektronmikroszkópia

A neuroszferoidokat (kezeletlen, hordozóanyaggal vagy vegyülettel kezelt) a különböző differenciálódási szakaszokban a 3.4.7 *alfejezetben* leírtak szerint kezeltük, a következő különbséggel: az ultrastrukturális elemzésre szánt mintákat 1,5%-os agarba ágyaztuk az utófixálás előtt. Minden más megegyezett a 3.4.7 *alfejezetben* leírtakkal. A szferoidok középső régiójából (legnagyobb átmérő) származó ultravékony metszeteket vizsgáltuk.

3.5.7 A szferoidok átmérőjének és összes fehérje tartalmának meghatározása

A 96-lyukú lemezben növesztett 3D szferoidokat az Olympus IX71 mikroszkóp 4x objektívjével (0,1 NA) és DP21 kamerával (Olympus) vettük fel. A képeket az Olympus CellSens Dimension szoftver (V1.11) segítségével a szferoidok átmérőjének mérésével elemeztük. Minden érték 3 kísérlet átlagát jelenti (n=3) a 96 mért szferoid mindegyikénél. A 3D szferoidokat egyenként lizáltuk a Halt™ proteáz és foszfatáz inhibitor koktéllal és Pierce™ Universal Nuclease for Cell Lysis pufferrel kiegészített RIPA lízis és extrakciós pufferrel, szonikáltuk, majd a teljes fehérjekoncentrációt a Pierce BCA Protein Assay Kit segítségével határoztuk meg a gyártó utasításai szerint. A D2, D7 és D14 minták kis szferoid mérete miatt három szferoidot együtt kezeltünk, és az egyedi értékeket ennek megfelelően számoltuk ki. Három kísérletet végeztünk (n=3), amelyekben minden egyes időpontban 24 szferoidot elemeztünk.

3.5.8 qPCR génexpressziós elemzés

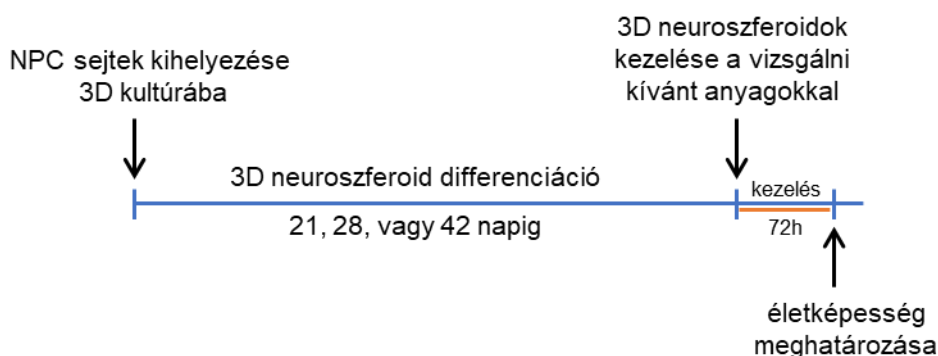
A használt metodika megegyezik a 3.4.8 *fejezetben* ismertetett protokollal. Minden mintához 12 szferoidot egyesítettünk, és három biológiai ismétlést végeztünk (n=3). A felhasznált saját tervezésű primereket a 7. és 8. táblázat tartalmazza.

8. táblázat: A qPCR kísérletekben használt primerek szekvenciája

Gén rövidítése	Azonosító szám (Gene Bank)	Primer Szekvencia (5'-3') F, forward; R, reverse	PCR termék (bp)
<i>SOX1</i>	6656	F: TAGTAAGGCAGGTCCAAGCA R: GGGTGGTGGTGGTAATCTCT	98
<i>SOX9</i>	6662	F: GTGCTCAAAGGCTACGACTG R: TTGACGTGCGGCTTGTTT	80
<i>MKI67</i>	4288	F: ACGGATTATACCTGGCCTTC R: AGGAAGCTGGATACGGATGT	180
<i>MAPT</i>	4137	F: TTGGAAGTCTGCCATGATT R: GGCACAAGTCCTTACAAAGAGAAC	82
<i>DLG4</i>	1742	F: ACAAGCGGATCACAGAGGAG R: AGTCTCTCTCGGGCTGGAAC	187
<i>RBFOX3</i>	146713	F: GGAGAAGCTGAATGGGACGA R: GCCGTGGCATTATTGACCT	60
<i>CLDN11</i>	5010	F: TTCCTGAAATCCTCAATTCATC R: ACATCATACAAACCTGAAATCAA	133
<i>GRIN1</i>	2902	F: GCAACACCAACATCTGGAAG R: ATCCGCATACTTGGAAGACA	68
<i>CHAT</i>	1103	F: GCCTGCTGCAATCAGTTCTT R: GTCCTCGTTGGAAGCCATT	114
<i>TH</i>	7054	F: TCCACGCTGTACTGGTTCAC R: GCACCATAGGCCTTCACCTC	71
<i>GAD1</i>	2571	F: GCACAGGTCATCCTCGATT R: TTGATGTCAGCCATTCTCCA	81
<i>SLC6A4</i>	6532	F: GTGAGGATGTGGATGGAGGT R: GCGAGATAGCATCCCTGTTC	191

3.5.9 Toxicitási kezelések és ATP életképességi vizsgálat

Tizenegy jól ismert toxicitási profilú vegyületet (5. melléklet) teszteltünk 7 különböző koncentrációban (9. táblázat) a 3D neuroszferoidokon. A legmagasabb dózist a vegyületek oldhatósága alapján határoztuk meg, és ügyeltünk arra, hogy a vegyületnek a táptalajban való hígítása után ne érjük el a 0,1%-os DMSO-szintet. Minden mintából négy technikai ismétlést alkalmaztunk minden mintán, és három biológiai ismétléses vizsgálatot végeztünk (n=3). A 3D sejt kultúrákat 72 órán keresztül kezeltük (expozíciós idő) a vizsgált testanyagokkal. A kezelési sémát a 6. ábra mutatja be. A vivőanyag kontroll (*vehicle*) 0,1% DMSO-val kiegészített normál tápoldat volt.



6. ábra: 3D neuroszferoidok expozíciós sémája. Az NPC sejtek kultúrába helyezését követően a szferoidokat 21, 28 vagy 42 napi tenyésztést követően a kiválasztott anyagok különböző koncentrációjával, egy koncentráció sor mentén kezeljük 72 órás expozíciós időtartamban, majd ezt követően a sejtek életképességét meghatározzuk és koncentráció-válasz görbéket veszünk fel. Ezáltal meghatározható az egyes anyagok neuronális sejtek életképességére gyakorolt hatása koncentrációjuk függvényében.

9. táblázat: A toxicitás tesztekben használt vegyületek és alkalmazott koncentrációi

Vegyület neve (CAS szám) [kémiai név]	Gyártó (Cat.N.)	Törzsoldat (mM)	Oldószer	Tesztelt koncentrációk (μ M)
Paraquat dichloride hydrate (75365-73-0) [1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride hydrate]	Carbosynth (FP40644)	100	dH ₂ O	1000; 600; 300; 100; 30; 10; 1;
Doxorubicin hydrochloride (25316-40-9)	Merck (D1515)	200	dH ₂ O	200; 100; 30; 10; 1; 0,1; 0,01;
Paracetamol (103-90-2) [4'-Hydroxy-acetanilide]	Merck (A7085)	100	DMSO	100; 50; 30; 10; 1; 0,1; 0,01;
Rotenone (83-79-4)	TCI Chemicals (R0090)	100	DMSO	100; 30; 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001;
Ibuprofen (15687-27-1) [α -Methyl-4-(isobutyl)phenylacetic acid]	TCI Chemicals (I0415)	100	DMSO	100; 30; 10; 1; 0,1; 0,3; 0,01;
Valproic acid (1069-66-5) [2-Propyl-pentanoic acid]	Merck (P4543)	400	dH ₂ O	400; 200; 100; 50; 30; 10; 1
Acrylamide (79-06-1) [2-Propen-amide]	Merck (A3553)	3500	dH ₂ O	3500; 2000; 1000; 600; 300; 100, 10;
Rifampicin (13292-46-1) [3-(4-Methyl-piperazinylimino- methyl)rifamycin]	Carbosynth (AR11351)	100	DMSO	100; 30; 10; 1; 0,1; 0,03; 0,01;
Mercury(II) chloride (7487-94-7)	Carbosynth (FM35310)	1000	DMSO	1000; 600; 100; 30; 10; 1; 0,1;
Hexachlorophene (70-30-4) [2,2'-Methylenebis(3,4,6- trichlorophenol)]	TCI Chemicals (M0219)	100	DMSO	100; 10; 1; 0,3; 0,1; 0,03; 0,01;
Colchicine (64-86-8) [(S)-N-(5,6,7,9-Tetrahydro-1,2,3,10- tetramethoxy-9-oxobenzo[a]heptalen-7- yl)acetamide]	Carbosynth (FC11732)	50	dH ₂ O	10; 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0003; 0,0001;

Az ATP-életképességi vizsgálatot a CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay használatával végeztük a gyártó protokollja szerint (Promega Corporation). A neuroszferoidokat 100 μ L CellTiter-Glo® 3D Reagenssel 60 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. A lumineszcencia jelet Thermo VarioScan Flash (TFS Inc.) lemezolvasóval rögzítettük.

Minden eredményt a Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) szoftverrel elemeztünk és a Microsoft Office 2010 Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) szoftverrel kezeltünk. A koncentráció-válasz normalizálásához a pozitív kontroll átlagos értékeit 0%-nak (az életképesség nulla, minden sejt elpusztul), a vivőanyag (*vehicle*) kezelés (0,1% DMSO normál tápoldatban) átlagos értékét pedig 100%-nak vettük (az életképesség 100%). Az EC₁₀ és EC₅₀ hatásos koncentráció értékek meghatározásához négy paraméteres görbeillesztési módszert alkalmaztunk, ahol a grafikonokon szereplő adatok három biológiai ismétlés átlagát jelentik. Az adatok elemzése átlag ($\pm$ SEM) értéként van feltüntetve. Az adatok szignifikanciáját egyirányú ANOVA teszttel határoztuk meg (*p<0,05; **p<0,01).

4 EREDMÉNYEK

4.1 Embrionális őssejtvonalak alapítása genetikai újraprogramozással létrehozott egér embriókból

Az első célkitűzés a sejtmagátültetéssel (NT) létrehozott embriókból történő pluripotens őssejtvonalak (PSC) előállításának vizsgálata volt a különböző NT módszerekkel és különböző sejtmagdonor sejtípusok alkalmazásakor. Értékeljük, hogy kimutathatóak-e különbségek az ntESCs és a hagyományos fertilizációval előállított embriókból létrehozott ESC sejtvonalak között, valamint az azonos sejtmagdonor sejtípus eredetű sejtvonalak között. Megvizsgáltuk a különböző sejtmagtranszfer módszerekkel előállított NT-embriók letapadási képességét, az ESC sejtvonal előállítás hatékonyságát, optimalizáltuk a sejtvonal alapítás módszerét, majd pedig összehasonlítottuk az egyes sejtvonalak főbb pluripotencia tulajdonságait.

4.1.1 Embrionális őssejtvonalak alapítása zona pellucida-mentes sejtmagátültetéssel (ZF-NT) létrehozott egér embriókból

Ismert, hogy a *zona pellucida* vagyis a petesejtet körülvevő burok eltávolítása miatt az ún. *zona pellucida*-mentes sejtmagátültetés (ZF-NT) során az embriók érzékenyebbek a mechanikai stresszre, valamint az aktiváció protokollja is eltér a piezoelektromos sejtmagátültetés (PEM-NT) módszerétől (Ribas et al., 2005). Elsőként az embriók osztódásban gátolt (Mitomicin C-kezelt) egér embrionális fibroblaszt (MEF) tápláló sejtrétegre való letapadási képességét hasonlítottuk össze. Megfigyeléseink szerint a 48 órán belül letapadt és rögzült embriók fejlettebb, nagyobb és kompaktabb ICM sejtcsoomóval rendelkeztek, mint azok, amelyek csak 48 és 96 óra között voltak képesek letapadni. A később rögzült hólyagsíra embriók gyakran csak trofoblaszt (TE) típusú sejtekkel rendelkeztek. Mind a ZF-NT, mind a ZF-PGA hólyagsíra embriók alacsony kötődési arányt mutattak (53,6%, illetve 51,8%) a ZF-fertilizált embriókhoz (kontroll) képest (87,5%) (10. 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 a Tripszin-EDTA enzimes izolálás. A ZF-NT embriókra módosított módszerünk lényege, hogy az ICM izoláláskor a mikropillárakat nem Tripszin-EDTA oldattal töltöttük fel, hanem HEPES puffert Ca²⁺-Mg²⁺ mentes PBS oldattal. Majd ezt az oldatot juttattuk az ICM csomóra és mechanikus úton távolítottuk el, majd ültettük tovább új tápláló sejtrétegre (Mitomicin-C kezelt MEF), a sejtcsoomó szétválasztása nélkül. A legsikeresebb ESC alapítás a ZF-fertilizált csoportban tapasztaltuk (35,4%), szemben az alacsonyabb ZF-PGA (1,3%) és a ZF-NT (5,3%) csoporttal (10. táblázat).

10. 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) ^a	41 (85,4) ^a	17 (35,4) ^a
ZF-PGA embrió	307	159 (51,8) ^b	94 (30,6) ^b	4 (1,3) ^b
ZF-NT embrió	209	112 (53,6) ^b	84 (40,2) ^b	11 (5,3) ^b

^{a,b} statisztikailag szignifikáns különbség oszlopon belül ($p < 0,05$). ZF, *zona pellucida* mentes embrió; PGA, partenogenetikai; NT, sejtmagátültetés; ICM, belső sejtcsoomó; ESC, embrionális őssejt.

4.1.2 Embrionális őssejtvonalak alapítása piezoelektromos sejtmagátültetéssel (PEM-NT) létrehozott egér embriókból

Az előző kísérlethez hasonlóan itt is megvizsgáltuk az embriók letapadási, majd az ICM növekedési képességét és a létrehozható sejtvonalak arányát. A *zona pellucida*-intakt, fertilizációval létrehozott hólyagsíra embriók mutatták a legmagasabb letapadási arányt

(83,3%) a PEM-NT és a *zona pellucida*-intakt PGA hólyagsíra embriókhoz képest (53,8% és 50,9%) (11. táblázat). Mindegyik esetben a tenyésztés 2. napjától kezdve megfigyelhető volt a tápláló sejtréteghez való rögzülés. A megtermékenyített embriók ICM sejtcsomója volt a legnagyobb és megfelelő ahhoz, hogy enzimes kezeléssel is izolálni lehessen azt, míg a sejtmagátültetéssel létrehozott embriók ICM csomója kis mérete miatt csak mechanikusan volt izolálható, a ZF-NT embrióknál megfigyeltékhez hasonló módon. Ebben a kísérleti csoportban is megfigyeltünk olyan NT embriókat, amelyek a letapadást követően csak a trofoblaszt sejtekből álltak.

Az ICM sejtek első átültetését követően az ESC-szerű kolóniák főként a megtermékenyített csoportban voltak megfigyelhetők. Az NT csoportban jellemzően ESC-szerű és differenciált sejtek vegyes populációi jelentek meg. A PEM-NT ESC-vonalak aránya jelentősen alacsonyabb volt (15,4%) a PGA (32,1%), és a megtermékenyített (62,5%) csoporthoz képest (11. táblázat).

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

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

^{a,b} statisztikailag szignifikáns különbség egy oszlopon belül ($p < 0,05$). PGA, partenogenetikus; NT, sejtmagátültetés; ICM, belső sejtcsoomó; PEM, piezoelektromos sejtmagátültetési eljárás; ESC, embrionális őssejt;

4.1.3 A sejtmagdonor sejt típus hatása a ZF-NT embriókból történő ESC alapításra

Korábban közzétett adatok alapján a sejtmagdonor sejtek típusának hatását a sejtmagátültetés, valamint az ESC alapítás hatékonyságára piezoelektromos NT módszer esetén már ismert volt (Wakayama et al., 2005b). Ezért megvizsgáltuk, hogy hasonló hatás tapasztalható-e a ZF-NT esetében is az ESC alapítás tekintetében. Különböző sejtmagdonor sejt típusokat (ESC, MEF és friss kumuluszsejtek) hasonlítottunk össze. Az ESC és a kumulusz sejtmagdonor sejtekből származó NT embriók szignifikánsan magasabb eredményt produkáltak (20,6% és 28,6%), mint a MEF donorsejtek (1,2%) a sejtvonal alapítási kísérletekben (12. táblázat). Az embriók letapadási aránya jelentősen különbözött a három sejtmagdonor csoport között: a kumulusból származó NT embriók letapadási aránya 85,7% volt, ezt követte az ESC (76,5%) majd a MEF-NT embriók aránya (47,6%). Megfigyelésünk szerint az MEF-NT embrióknak kis méretű ICM csomója volt, és sok esetben nem voltak képesek a tápláló sejtréteghez tapadni. Annak ellenére, hogy a MEF donorsejtből származó NT embriók számát megnöveltük a kísérletben, nem tudtuk javítani a csoport ESC-létrehozási hatékonyságát (12. táblázat).

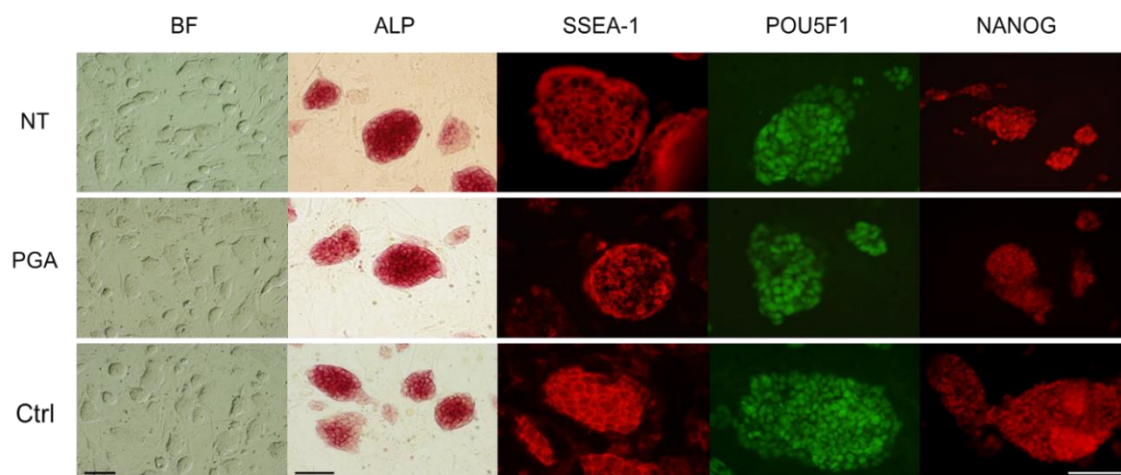
12. táblázat: A sejtmagdonor sejt típus hatása a ZF-NT embriókból történő ESC vonalak létrehozásának hatékonyságára

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

^{a,b} statisztikailag szignifikáns különbség egy oszlopon belül ($p < 0,05$). ICM, belső sejtcsoomó (*Inner Cell Mass*); ESC, embrionális őssejt; MEF, egér embrionális fibroblaszt (*Mouse embryonic fibroblast*);

4.1.4 A létrehozott ESC-vonalak pluripotenciájának elsődleges vizsgálata

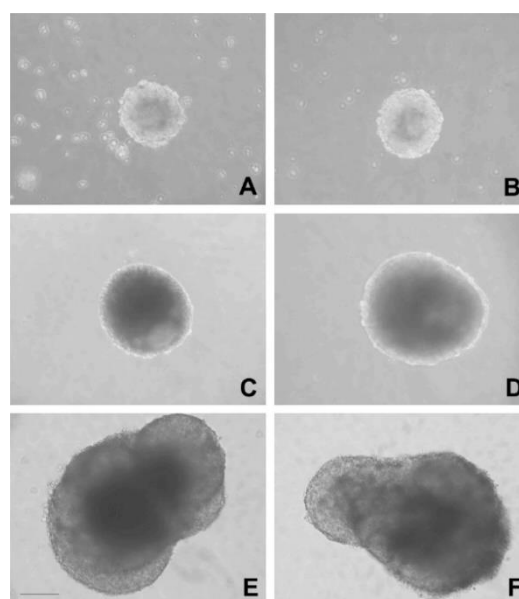
Az elsődleges vizsgálat és kiválasztási kritérium a sejtvonalak alapításakor a pluripotencia kialakításáért felelős főbb fehérjék expressziója volt. Vizsgálatainkban az összes létrehozott ntESC sejtvonal (4 ZF-NT és 11 PEM-NT vonal; lásd 10. és 11. táblázat), pozitív expressziót mutatott a fő pluripotencia markerekre, úgymint: POU5F1, NANOG (transzkripciós faktor fehérjék, sejtmagi lokalizáció) SSEA1 (membrán fehérje) az immuncitokémiai vizsgálatban, valamint pozitivitást mutattak alkalikus foszfatáz (ALP) enzim aktivitásra (7. ábra).



7. ábra: *Zona pellucida*-mentes sejtmagátültetéssel előállított (ZF-NT), parthenogenetikus (PGA) és fertilizációval létrehozott embriókból (Ctrl) származó ESC vonalak *in vitro* pluripotenciájának elemzése. A reprezentatív képek a kolóniák fénymikroszkópos képét (méretvonal = 200 μ m), az alkalikus foszfatáz (ALP) enzimaktivitás festés (méretvonal = 100 μ m), valamint a SSEA-1, POU5F1, és NANOG immunfestéseket mutatják be egy-egy sejtvonalon (méretvonal = 50 μ m). ZF-NT, *zona pellucida*-mentes sejtmagátültetés; PGA, parthenogenetikus; ALP, alkalikus foszfatáz; ESC, embrionális őssejt (Kobolák et al., 2010 alapján módosítva).

A következő lépésben spontán differenciációs képességüket hasonlítottuk össze függőcsepp módszert alkalmazva (Doetschman et al., 1985). Az ntESC-ből származó aggregált sejtek 2 napos függőcseppben történő tenyésztést követően szabályos és hasonló embriótest (*Embryoid body*, EB) morfológiát mutattak, nem figyeltünk 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 (8. ábra), majd további 7-10 napos szuszpenziós tenyésztést követően az ntESC vonalak képesek voltak ún. cisztikus EB-ket (*cystic embryoid bodies*, CEB) is képezni (8. ábra). Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az összes létrehozott sejtvonal képes különböző szövetekké differenciálódni *in vitro* és EB-ket (egyszerű és cisztikus) képezni, amely a pluripotencia egyik lényeges *in vitro* kritériuma.



8. ábra: Az NT és fertilizációval létrehozott (kontroll) embriókból származó ESC sejtvonalak *in vitro* spontán differenciálása. A reprezentatív fénymikroszkópos felvételek az EB-k differenciálódását mutatják be ntESC és kontroll ESC eredetű 2 napos EB (A és B), 7 napos SEB (C és D) és 10 napos CEB (E és F) aggregátumokat összehasonlítva. EB, embriótest; SEB, egyszerű EB; CEB, cisztikus EB; (méretvonal = 100 μ m) (Kobolák et al., 2010 alapján módosítva).

4.2 A létrehozott egér ntESC-vonalak pluripotenciájának komplex vizsgálata

4.2.1 Az elemzésbe bevont sejtvonalak

A továbbiakban egy-egy, az elsődleges pluripotencia teszteken pozitív, stabil ESC sejtvonalat válogattunk ki eljárásunként és hasonlítottuk össze azokat a részletes, komplex fehérje és génexpressziós vizsgálatokban. A vizsgálatainkban két genetikai háttérből (129/Ola és B6D2) származó, különböző sejtmagdonor sejt eredetű egér ntESC sejtvonalakat hasonlítottunk össze a genotípus-kontroll ESC sejtvonalakkal, amelyek megtermékenyített embriókból származtak, valamint egy parthenogenetikus ESC sejtvonallal, mint recipiens petesejt-kontroll. Ezenkívül két sejtmagátültetési (NT) módszer, az ún. *zona pellucida*-mentes (ZF) és a piezoelektromos (PEM) technológia is összehasonlításra került azonos sejtmagdonor sejtípusból származó ntESC sejtvonalak összehasonlítása révén, ahol két kumulusz donorsejt eredetű sejtvonalat vizsgáltunk. Ezért ezekre a sejtvonalakra a továbbiakban ZF-NT és PEM-NT néven hivatkozunk, hogy leírjuk az előállításukhoz használt technikát, illetve ennek megfelelően MEF NT vagy CUM NT néven, hogy leírjuk donorsejt-háttérüket. A könnyebb követhetőség érdekében a 13. táblázatban az elemzett sejtvonalak genotípusát, előállítási módszerüket és a sejtmagdonor sejt típusát foglaltam össze.

13. táblázat. A komplex pluripotencia vizsgálatban szereplő ESC vonalak főbb jellemzői

ESC sejtvonal elnevezése	típusa	NT módszere	sejtmagdonor sejtípus	genotípus	zigozítás
HM1	ESC	–	–	129Ola	homozigóta
HM1 NT	ntESC	ZF	HM1 ESC	129Ola	homozigóta
B6D2	ESC	–	–	B6D2 F1	heterozigóta
B6D2 MEF NT	ntESC	ZF	B6D2 MEF	B6D2 F1	heterozigóta
B6D2 CUM NT	ntESC	ZF	B6D2 kumulusz	B6D2 F1	heterozigóta
B6D2 CUM NT (PEM)	ntESC	PEM	B6D2 kumulusz	B6D2 F1	heterozigóta
B6D2 PGA	pESC	–	B6D2 petesejt	B6D2 F1	homozigóta

ESC, embrionális őssejt; NT/nt, sejtmagátültetés; MEF, egér embrionális fibroblaszt; CUM, kumulusz; ZF, *zona pellucida*-mentes sejtmagátültetési módszer; PEM, piezoelektromos mikromanipulációs sejtmagátültetési módszer; p, parthenogenetikus sejtvonal; PGA, parthenogenezis

4.2.2 Pluripotencia markerek expressziójának fehérje szintű összehasonlítása

Korábban már megvizsgáltuk a legfontosabb markerek expresszióját, a sejtvonalak elsődleges tesztelésekor, azonban a teljes és részletes összehasonlításhoz további markerek bevonására volt szükség a kiválasztott sejtvonalakon. A hagyományos markerek mellé, úgymint alkalikus foszfatáz (ALP) enzimaktivitás, POU5F1, SSEA1, (Nichols et al., 1998; Pesce et al., 1999), NANOG (Mitsui et al., 2003) immunfestés, a SOX2 (Avilion et al., 2003) és a korai embrionális differenciálódás egyik szabályozó fehérjéje az FGF4 (Ambrosetti et al., 1997; Avilion et al., 2003) markerek is bekerültek. Ezt követően kvantitatív módon, áramlási citometria (FACS) módszerével vizsgáltuk a pluripotencia marker fehérjék expresszióját. A sejtvonalakat összehasonlítva a HM1 és a HM1 NT nem különbözött a vizsgált markerek egyikében sem. A B6D2 ESC vonal (a genotípus-kontroll) sem a HM1-től, sem a HM1 NT-től nem különbözött jelentősen, kivéve a SOX2 expressziót (14. táblázat). Vizsgálatainkban a B6D2 PGA sejtvonal mutatta a legszignifikánsabb eltéréseket mind a kontrolloktól, mind az azonos genotípusú (B6D2) sejtvonalaktól (14. táblázat).

A POU5F1-pozitív sejtek százalékos aránya 64% ($\pm 3,1$) és 75% ($\pm 4,6$) között változott a vizsgált sejtvonalakban. Szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$) figyeltünk meg a HM1 (129Ola

genotípus) és a B6D2 genotípusú ntESC sejtek között: B6D2 MEF NT (66% $\pm$ 2,9), B6D2 CUM NT (67% $\pm$ 6,8) és B6D2 CUM NT (PEM) (64% $\pm$ 3,1) esetén (14. táblázat).

Az SSEA1 expressziójának értékelése azt mutatta, hogy a legmagasabb pozitív sejtarány a B6D2 MEF NT (71% $\pm$ 5,3) sejtvonalban volt kimutatható, ami nem különbözött jelentősen a HM1 sejtvonaltól (68% $\pm$ 5,9) (14. táblázat). A B6D2 CUM NT (PEM) (58% $\pm$ 3,6) és a parthenogenetikus sejtvonal, a B6D2 PGA (47% $\pm$ 7,5), szignifikánsan ($p < 0,05$) alacsonyabb expresszióval rendelkezett e marker tekintetében.

A NANOG a B6D2 CUM NT sejtvonalban magasabb expressziós szintet mutatott (73% $\pm$ 2,1), míg a B6D2 CUM NT (PEM) és a B6D2 PGA ntESCs alacsonyabb expressziós szintet (57% $\pm$ 4,3 és 41% $\pm$ 6,8) a HM1 sejtvonaltól. Továbbá mindkét CUM ntESC szignifikánsan különbözött a B6D2 MEF NT sejtvonaltól (14. táblázat).

Általában az FGF4 expressziója alacsony volt, összehasonlítva az összes többi vizsgált fehérjével a FACS a vizsgálatban (13. táblázat). A három B6D2 ntESC vonal szignifikánsan magasabb FGF4-szintet mutatott ($p < 0,05$), mint a HM1 kontroll vagy a HM1 NT sejtvonal. Azonban csak a B6D2 MEF NT (67% $\pm$ 5,3) különbözött jelentősen a B6D2 kontrolltól (52% $\pm$ 6,1) (14. táblázat).

A sejtvonalak között nagyobb eltérés volt megfigyelhető a SOX2 expressziójának szintjében: bár a HM1 NT sejtvonal mutatta a legmagasabb pozitivitást (87% $\pm$ 2,6), szignifikáns ($p < 0,05$) csökkenést a SOX2 expresszióban csak a B6D2 (65% $\pm$ 7,1) és a B6D2 PGA (72% $\pm$ 4,0) sejtvonalak esetében figyeltünk meg, ahol a B6D2 sejtvonal szignifikánsan különbözött ($p < 0,05$) az összes B6D2 ntESC sejtvonaltól (14. táblázat).

14. táblázat: Az ESC sejtvonalak pluripotencia marker expressziója FACS-analízissel – egyzseres jelölés

ESC sejtvonal	POU5F1	SSEA1	NANOG	FGF4	SOX2
HM1	75%($\pm$ 4,6)	68%($\pm$ 5,9)	67%($\pm$ 4,4)	47%($\pm$ 6,1)	81%($\pm$ 3,9)
HM1 NT	73%($\pm$ 3,2)	62%($\pm$ 4,0)	64%($\pm$ 3,6)	45%($\pm$ 5,5)	87%($\pm$ 3,6)
B6D2	72%($\pm$ 4,5)	65%($\pm$ 5,1)	61%($\pm$ 4,1)	52%($\pm$ 6,1)	65%($\pm$ 7,1) ^{a,b}
B6D2 MEF NT	66%($\pm$ 2,9) ^a	71%($\pm$ 5,3)	59%($\pm$ 6,8)	67%($\pm$ 5,3) ^{a,b,c}	77%($\pm$ 9,7) ^c
B6D2 CUM NT	67%($\pm$ 6,8) ^a	62%($\pm$ 6,6)	73%($\pm$ 2,1) ^{b,c,d}	64%($\pm$ 6,0) ^{a,b}	80%($\pm$ 8,6) ^c
B6D2 CUM NT (PEM)	64%($\pm$ 3,1) ^{a,b,c}	58%($\pm$ 3,6) ^{a,d}	57%($\pm$ 4,3) ^{a,d,f}	60%($\pm$ 9,7) ^{a,b}	78%($\pm$ 8,1) ^c
B6D2 PGA	74%($\pm$ 4,7) ^{d,f}	47%($\pm$ 7,5)*	41%($\pm$ 6,8)*	58%($\pm$ 8,5) ^b	72%($\pm$ 4,0) ^b

^a az adat szignifikánsan különbözött a HM1 átlagértékétől; ^b az adat szignifikánsan különbözött a HM1 NT átlagértékétől; ^c az adat szignifikánsan különbözött a B6D2 átlagértékétől; ^d az adat szignifikánsan különbözött a B6D2 MEF NT értékétől; ^e az adat szignifikánsan különbözött a B6D2 CUM NT értékétől; ^f az adat szignifikánsan különbözött a B6D2 CUM NT (PEM) értékétől; * az adat szignifikánsan különbözött az összes többi sejtvonaltól.

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a POU5F1 expressziójának csökkenése a pluripotencia elvesztéséhez vezet (Pesce and Scholer 2001), ezért más pluripotencia markerekkel kettős és hármas immunjelölést végeztünk. Megvizsgáltuk, hogy a POU5F1 pozitív sejtek más markerek, mint például az SSEA1, NANOG, SOX2, és a korai embrionális differenciálódási faktor, az FGF4 esetében is pozitívak, vagyis az egyes populációk egybeesést mutatnak-e. Ezekben a kísérletekben a POU5F1 pozitív sejteket 100%-nak tekintettük, és a mindkét markert expresszáló sejtpopuláció arányát a POU5F1 pozitív sejtek százalékos arányaként adtuk meg (15. táblázat).

A POU5F1/SSEA1 kettős jelölés azt mutatta, hogy a B6D2 PGA sejtvonalban szignifikánsan ($p < 0,05$) alacsonyabb volt a kettős pozitív sejtek aránya (61% $\pm$ 6,1), mint a HM1-ben (82% $\pm$ 5,1). Továbbá ez a sejtvonal jelentősen különbözött a többi sejtvonaltól is. A két CUM NT ESC szignifikáns különbséget mutatott (74% $\pm$ 3,2, illetve 77% $\pm$ 4,8) a B6D2 MEF NT sejtvonaltól (87% $\pm$ 3,6) (15. táblázat). A POU5F1/NANOG kettős jelölése azonban azt mutatta, hogy csak a B6D2 PGA sejtvonal tartalmazott szignifikánsan alacsonyabb százalékban kettős

pozitív sejteket ($55\% \pm 4,6$) a többi sejtvonallal képest. A POU5F1/FGF4 kettős pozitív sejtek mérésekor és összehasonlításakor a két genotípus eltérő képet mutatott: a két CUM NT sejtvonaltól, valamint a B6D2 PGA sejtvonaltól is szignifikánsan ($p < 0,05$) különbözött a HM1 sejtvonaltól. Továbbá, a B6D2 genotípusú sejtvonaltól is szignifikánsan ($p < 0,05$) különböztek a HM1 NT sejtvonaltól is (15. táblázat). A POU5F1/SOX2 kettős jelölés esetén egyik sejtvonaltól sem mutatott szignifikáns különbséget a kontrollokhoz (HM1 vagy B6D2) vagy egymáshoz képest (15. táblázat).

Ezenkívül két különböző hármas jelölés kombinációját is elvégeztük, a felhasznált ellenanyagok kompatibilitásának megfelelően. A POU5F1/SSEA1/NANOG hármas jelölésnél a HM1 NT ($64\% \pm 3,0$) és a B6D2 PGA ($49\% \pm 5,8$) sejtvonaltól találtuk a hármas pozitív sejtek arányát a legalacsonyabbnak, szemben a HM1 ($73\% \pm 6,1$) sejtvonallal. A POU5F1/FGF4/SOX2 hármas pozitív populációk összehasonlításakor azonban mind a CUM NT ESC-k, mind a B6D2 PGA vonal szignifikánsan magasabb ($p < 0,05$) százalékos arányt mutatott a HM1 kontrollhoz képest (15. táblázat). Továbbá az összes B6D2 genotípusú sejtvonaltól szignifikánsan különbözött a HM1 ntESC-től. Összefoglalva, a FACS-elemzés jelentős eltéréseket tárt fel a sejtvonaltól között, amelyek elsősorban a genetikai háttér különbségével mutattak korrelációt. A komplex festések megmutatták, hogy a sejtek 60-80% közötti arányban mutatnak pozitívítást minden markerre, vagyis a homogénnek tűnő mikroszkópos immunfestési felvételek ellenére jelentős eltérések figyelhetők meg a sejtvonaltólban és több különböző expressziót mutató szubpopuláció is megfigyelhető egy-egy sejtvonaltólban.

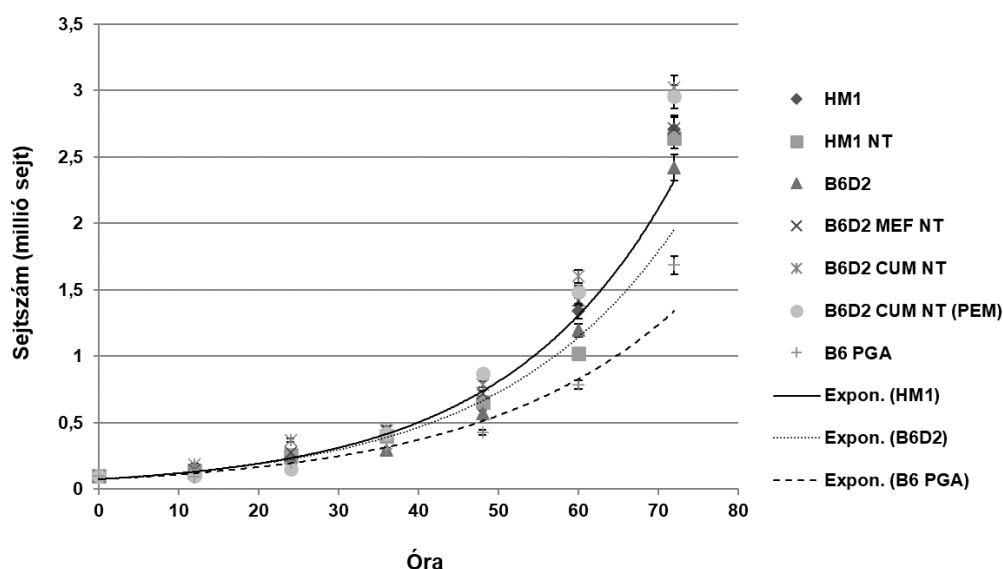
15. táblázat: Az ESC sejtvonaltól pluripotencia marker expressziója FACS-analízissel – kettős és hármas jelölés

ESC sejtvonaltól	POU5F1/ SSEA1	POU5F1/ NANOG	POU5F1/ FGF4	POU5F1/ SOX2	POU5F1/ SSEA1/ NANOG	POU5F1/ FGF4/ SOX2
HM1	82%($\pm 5,1$)	83%($\pm 4,8$)	70%($\pm 7,1$)	98%($\pm 1,8$)	73%($\pm 6,1$)	68%($\pm 3,8$)
HM1 NT	75%($\pm 4,9$)	80%($\pm 3,0$)	65%($\pm 5,2$)	96%($\pm 3,0$)	64%($\pm 3,0$)	62%($\pm 3,9$)
B6D2	81%($\pm 4,1$)	76%($\pm 7,1$)	79%($\pm 4,6$) ^b	97%($\pm 4,6$)	72%($\pm 4,9$)	75%($\pm 7,6$) ^b
B6D2 MEF NT	87%($\pm 3,6$) ^b	78%($\pm 5,3$)	78%($\pm 5,0$) ^b	87%($\pm 4,5$)	74%($\pm 4,8$) ^b	72%($\pm 5,3$) ^b
B6D2 CUM NT	74%($\pm 3,2$) ^d	76%($\pm 4,0$)	87%($\pm 4,9$) ^{a,b}	91%($\pm 7,6$)	71%($\pm 4,9$)	84%($\pm 3,8$) ^{a,b,c,d}
B6D2 CUM NT (PEM)	77%($\pm 4,8$) ^d	76%($\pm 2,2$)	83%($\pm 5,1$) ^{a,b}	89%($\pm 9,1$)	65%($\pm 7,7$)	79%($\pm 4,1$) ^{a,b}
B6D2 PGA	61%($\pm 6,1$) [*]	55%($\pm 4,6$) [*]	87%($\pm 3,5$) ^{a,b}	88%($\pm 3,2$)	49%($\pm 5,8$) [*]	81%($\pm 3,0$) ^{a,b,d}

^a az adat szignifikánsan különbözött a HM1 átlagértékétől; ^b az adat szignifikánsan különbözött a HM1 NT átlagértékétől; ^c az adat szignifikánsan különbözött a B6D2 átlagértékétől; ^d az adat szignifikánsan különbözött a B6D2 MEF NT értékétől; ^e az adat szignifikánsan különbözött a B6D2 CUM NT értékétől; ^f az adat szignifikánsan különbözött a B6D2 CUM NT (PEM) értékétől; ^{*} az adat szignifikánsan különbözött az összes többi sejtvonaltól.

4.2.3 Növekedési hatékonyság

A sejtvonaltól növekedési hatékonyságát a populáció duplázódási idejének (*population doubling time*, PDT) kiszámításával értékeltük. A sejtvonaltól nagyon hasonló növekedési görbéket és sebességet mutattak, a populáció duplázódási idő 12,07 ($\pm 0,41$) óra (B6D2) és 14,36 ($\pm 1,03$) óra (B6D2 PGA) között mozgott, szignifikáns különbséget sehol nem mutattunk ki. Érdekes, hogy a két genotípusú kontroll PDT-je nem különbözött jelentősen, a B6D2 duplázódási ideje rövidebbnek bizonyult, mint a HM1 sejtvonaltól (12,07 $\pm 0,41$; illetve 12,76 $\pm 0,29$). Az ntESCs PDT-je nagyon hasonló volt egymáshoz, a B6D2 MEF NT, a B6D2 CUM NT és a B6D2 PGA különbözött a genotípusos kontrolltól (9. ábra).



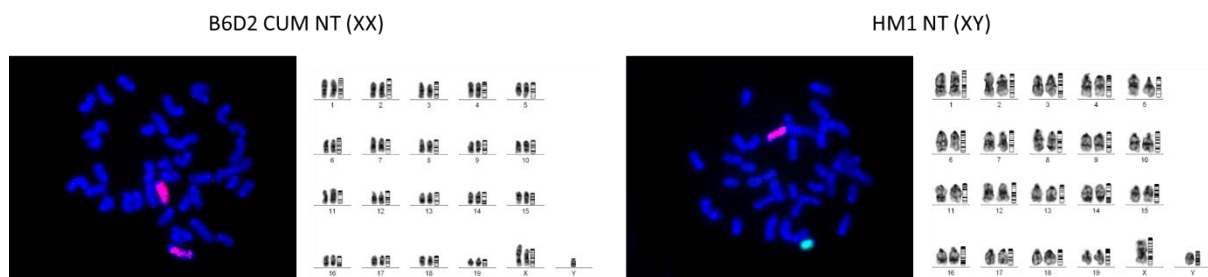
9. ábra: Az ntESCs és kontroll ESC sejtvonalak növekedési hatékonyságának összehasonlítása. A populáció megduplázódási idejét (PDT) a 72 órás tenyésztési időszak alatt 12 óránként elvégzett tripszinizálás és hemocitómétes számlálás után a Doubling Time -Several Time Points Calculator online szoftver segítségével határoztuk meg, exponenciális görbéket illesztve az adatokhoz (Expon jelölés az ábrán), hogy láthatóvá tegyük a növekedési hatékonyságot (Kobolak et al., 2012 alapján módosítva).

4.2.4 Kariotípus-elemzés

A sejteket FISH-analízis segítségével kariotipizáltuk, és kiszámítottuk az egyes sejtvonalak euploiditását (16. táblázat, 10. ábra). A kariotípus-elemzés kimutatta, hogy a parthenogenetikus és a kumulus sejtekből származó ntESC-k nőneműek (XX) voltak, míg az összes többi ESC vonal hímnemű (XY) volt. A B6D2 PGA ESC esetében alacsonyabb euploiditási szintet (44%) találtunk, szemben az összes többi vizsgált sejtvonallal. A legmagasabb értékeket a B6D2, a HM1 NT és a B6D2 CUM NT (PEM) sejtvonalak mutatták (76%, 73% és 72%). A FISH-analízis (10. ábra) gyakran azonosított olyan nem euploid sejteket, amelyek 40 helyett 39 vagy 41 kromoszómát tartalmaztak (16. táblázat). Gyakran vagy az Y kromoszóma, vagy az egyik X kromoszóma elveszett, és a kariogram XO genotípust mutatott. Az ntESCs vonalakban azonban nem mutattunk ki kromoszómaspecifikus deléciókat, transzlokációkat vagy fúziókat, amelyek potenciálisan a sejtmagtranszfer folyamatához lennének kapcsolhatóak.

16. táblázat: Az ntESC sejtvonalak kariotípus vizsgálatának eredményei

ESC sejtvonal	Passázsszám	Ivar	Euploidia (%)	Megjegyzés – főbb eltérések
HM1	p23	XY	68	—
HM1 NT	p4	XY	73	—
B6D2	p5	XY	76	—
B6D2 MEF NT	p5	XY	63	X0
B6D2 CUM NT	p9	XX	65	X0
B6D2 CUM NT (PEM)	p9	XX	72	deléció az X kromoszómán
B6D2 PGA	p3	XX	44	deléció az X kromoszómán



10. ábra: Két ntESC sejtvonaltól reprezentatív FISH analízise és kariogrammja. A kromoszómákat DAPI festéssel jelöltük (kék). A piros színű próba az X kromoszómát (mX-Cy3), míg a zöld az Y kromoszómát (mY-FITC) jelöli. A kariogrammok GIEMSA festést követően készültek.

4.2.5 *In vitro* irányított differenciáltság: idegsejt és szívizom differenciálódási útvonal

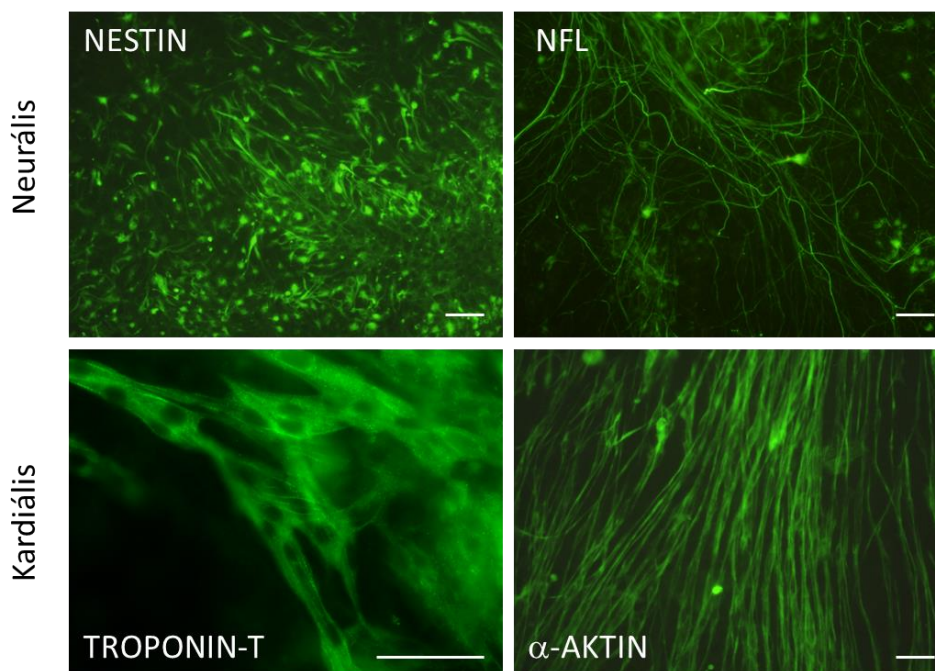
Az ntESCs és a kontroll ESCs fejlődési potenciáljának összehasonlítása érdekében *in vitro* vizsgálatot végeztünk a sejtvonalak szív- és idegi differenciálódásának összehasonlításával. Szívizom differenciáltság során a spontán összehúzódó (kontrakáló) területek első megjelenését, számát, illetve a pulzálás időtartamát hasonlítottuk össze. Az összehúzódó területek időbeli megjelenésében, sem azok számában nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget az ntESC vonalak és a kontrollok (HM1 és B6D2 ESC) között (17. táblázat). Az első összehúzódás az 5. és 7. nap között jelentkezett, és a kísérlet utolsó napján (30. nap) a legtöbb sejtvonaltban még megfigyelhető volt összehúzódó sejtkelet. Meghatároztuk az összehúzódást mutató periódus hosszát, amely a B6D2 PGA sejtvonaltól volt a legrövidebb (9 nap), míg átlagosan a többi sejtvonaltól 13-17. nap között mozgott (17. táblázat).

17. táblázat: Az ntESC szívsejt-keletek összehúzódási profiljának összehasonlítása

ESC sejtvonalt	Pulzáló sejtkeletkelet tartalmazó EB-k	pulzáló sejtkeletkelet megjelenésének		leggyakoribb kontrakciós időtartam
		első napja	utolsó napja	
HM1	43 ($\pm 4,2$)	6	30	17 nap
HM1 NT	38 ($\pm 8,4$)	5	26	14 nap
B6D2	44 ($\pm 3,6$)	5	30	17 nap
B6D2 MEF NT	40 ($\pm 5,5$)	6	30	13 nap
B6D2 CUM NT	42 ($\pm 3,2$)	5	30	16 nap
B6D2 CUM NT (PEM)	43 ($\pm 4,9$)	6	30	15 nap
B6D2 PGA	35 ($\pm 7,3$)	7	25	9 nap

A differenciálódás 10., 20., és 30. napján a mintákat immuncitokémiai vizsgálattal is elemeztük a GATA4 transzkripciós faktor, az alfa-szívizom aktin (ACTC1), a troponin T (TNNT2) és a Connexin 43 (GJA1) jelenlétének kimutatására, amelyek a késői fázisú szívizom differenciálódás reprezentatív markerei (11. ábra). Vizsgálatainkban valamennyi sejtvonalt pozitívnak bizonyult az összes kiválasztott markerre. A pozitívan festődő sejtek mennyisége a sejtvonaltokon belül és azok között is különbözött. Átlagosan a MEF-NT és a PGA sejtvonalt esetén tapasztaltuk a legalacsonyabb festődést, itt figyeztünk meg a legkisebb pulzáló területeket, és kisebb sejtkeletkelet adtak pozitív jeleket troponin-T vagy alfa-aktin festésre. A megfigyelés azonban nem kvantifikálható az eltérő ütemű differenciáció, sejtszám növekmény (sejtszétválás), a sejtek különböző differenciáltsági stádiuma miatt az alkalmazott metodikával. Az idegszövet differenciálódás indukálásához a klasszikus 4-/4+ retinsav (RA) indukciót alkalmaztuk. A kísérlet 25 napig tartott, és a mintákat a 10., 15., 20. és 25. napon gyűjtöttük. A vizsgált markerek fehérje szinten (NCAM, GFAP, NESTIN, FORSE-1 és NFL) immuncitokémia vizsgálatban minden sejtvonalt neurális irányban differenciálódó sejtjeiben kimutathatók voltak. A neurális prekursor sejtek megjelenésének nyomon követésére a

FORSE-1 festést végeztünk, ahol kis sejtpopulációkat mutattunk ki minden sejtvonalban a 10. napon, azonban ezen időpont után egyik sejtvonalban sem észleltünk pozitív sejteket. A HM1 NT ESC reprezentatív ICC festését a 11. ábra mutatja. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az irányított szív- és idegszövet differenciációs kísérletekben minden vizsgált egér ESC sejtvonal képes volt megfelelően differenciálódni és az adott csíralemez (ekto- és mezoderma) sejteket létrehozni. A fehérje expressziós vizsgálat alapján valószínűsíthető, hogy funkcionális sejtek jöhetnek létre mindkét szövetben, mivel nem csak korai, de késői érési markerek fehérje szintű expressziója is kimutatható volt. A vizsgálati módszerek jellegéből adódóan azonban a finomabb, génszabályozás szintű különbségek feltárására nem nyújtott lehetőséget, ugyanis egyik módszer sem eredményezett 100%-os szívizom vagy idegi irányú differenciációt, amely pontosabb összehasonlításra adna módot.



11. ábra: Az ntESC sejtvonalak irányított *in vitro* differenciálása, reprezentatív immuncitokémia a HM1 NT ESC sejtvonal neurális és szívizom differenciálódása során. A képek a differenciálódás 20. napján készültek. Neurális markerek: NESTIN, és NFL; szívizom markerek: Troponin T, α -AKTIN. Zöld, Alexa Fluor 488; (méretvonal = 50 μ m) (Kobolak et al., 2012 alapján módosítva).

4.2.6 Az ntESC-vonalak pluripotenciájának komplex vizsgálata génexpressziós szinten

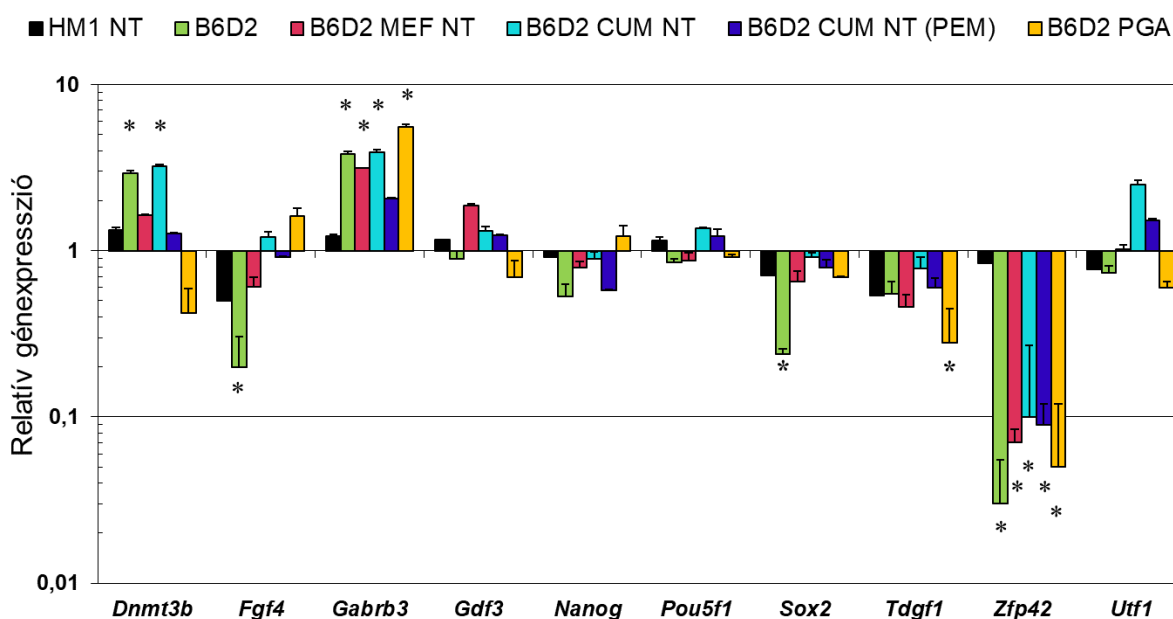
4.2.6.1 TaqMan® Array egér őssejt pluripotencia panel

Az eddigi vizsgálatok eredményei lényegi eltéréseket nem mutattak a pluripotencia gének expressziójában vagy a fehérjék megjelenésében. Ezért nagyobb felbontást lehetővé tévő módszerrel vizsgáltuk tovább a sejtvonalakat annak érdekében, hogy a sejtmagátültetéssel létrehozott embriókból izolált őssejtvonalakról a lehető legpontosabb képet kapjunk és felmérjük alkalmazhatóságuk lehetőségeit.

Elsőként a TaqMan® Mouse Stem Cell Pluripotency Array, génexpresszió vizsgálati módszert alkalmaztuk, amely összesen 96 gént (gének felsorolását lásd: 2. táblázat), pluripotencia, őssejt, és korai differenciálódási markereket tartalmaz (Ramalho-Santos et al., 2002), ezért kiválóan alkalmas a differenciált és differenciálatlan génexpressziós állapot elkülönítésére. Az elemzésben a HM1 ESC sejtvonalat használtuk referenciaként (1,0 érték), a génexpressziós különbségeket legalább 2,5-szeres változást elérve tekintettük szignifikánsnak.

Először azoknak a géneknek az mRNS-expressziós mintázatát elemeztük, amelyeket korábban fehérjeszinten vizsgáltunk az áramlási citometriás és immuncitokémiai (ICC) kísérleteinkben (*Pou5f1*, *Nanog*, *Fgf4* és *Sox2*). Ezen kívül számos más fontos, elsősorban a differenciálatlan

sejtekben kifejeződő markergént (többek között a *Tdgf1*, *Dnmt3b*, *Gabrb3*, *Gdf3*, *Utf1* és *Zfp42*) is vizsgáltunk. Elemzésünk szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$) azonosított a *Gabrb3* és a *Dnmt3b* expressziójában. A *Gabrb3* magas expressziós szintjét figyeltük meg az összes B6D2 genotípusú sejtvonalon a HM1 ESC-hez képest (12. ábra). Hasonlóképpen, a *Dnmt3b* expressziója jelentősen megnövekedett a B6D2 és B6D2 CUM NT sejtvonalakban. A *Pou5f1*, *Nanog*, *Utf1* és *Gdf3* génexpressziós szinten nem különbözött szignifikánsan ($p < 0,05$) a HM1 kontrollhoz képest. A *Zfp42* relatív génexpressziós szintje szignifikánsan alacsonyabb volt ($p < 0,05$) a B6D2 genotípusú ESC vonalakban, mind a kontrollban, mind az ntESC-kben, a HM1-hez képest (12. ábra). A *Sox2* mRNS szintje minden sejtvonalon viszonylag alacsony volt a HM1-hez képest, csak a B6D2 esetében tért el szignifikánsan. Az *Fgf4* expressziója szignifikánsan csökkent ($p < 0,05$) a B6D2 sejtvonalon. Amikor a HM1 és a HM1 NT ESC-ket hasonlítottuk össze, a gének ezen csoportja esetében nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) (12. ábra).



12. ábra: A pluripotencia fenntartásában szerepet játszó gének relatív génexpressziós szintjei az egyes sejtvonalakban. Az ábra a gének relatív génexpressziós értékeit ábrázolja. A HM1 mint abszolút kontroll génexpressziós szintjét 1,0-nek tekintettük (+SD). A génexpressziós különbségeket 2,5-szeres változás felett tekintettük szignifikánsnak. Az 1-nél kisebb értékek a HM1 expresszió szintjénél kisebb, még az 1-nél nagyobb a HM1 expressziós szintjénél magasabb expressziót jelentenek. * szignifikáns eltérés (Kobolák et al., 2012 alapján módosítva).

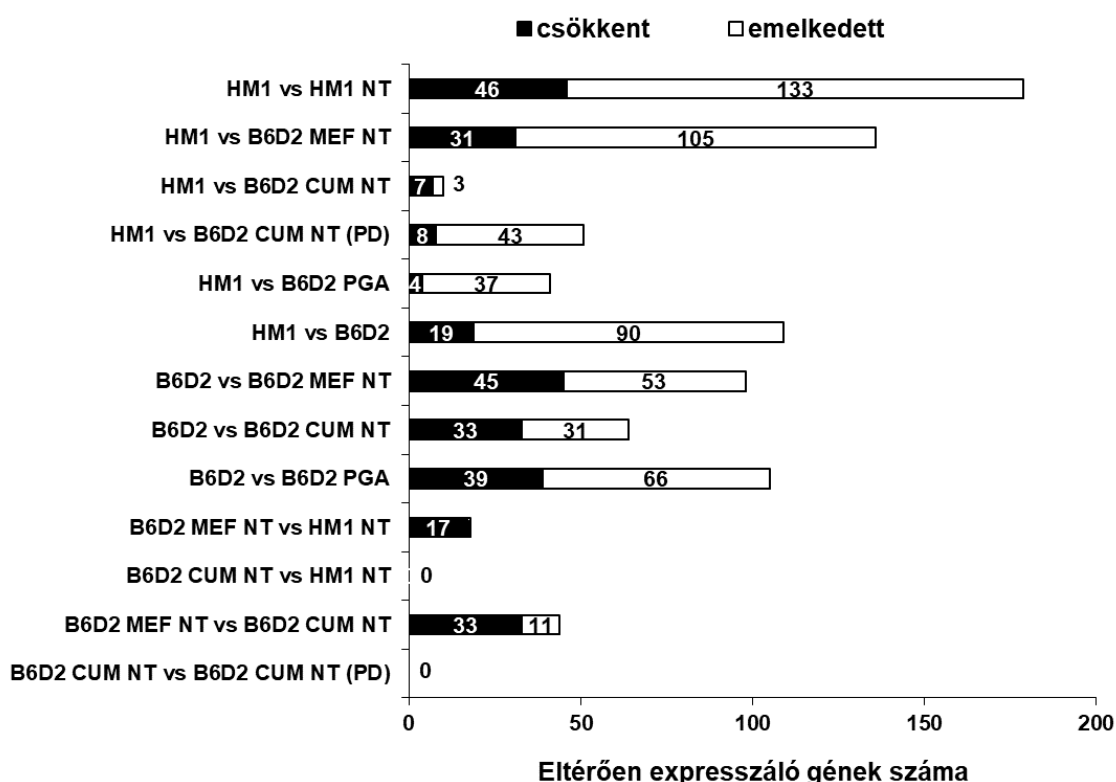
Amikor a pluripotenciával kapcsolatos géneket értékeltük, a jelek 86%-a több mint háromszorosan változott (akár csökkenést, akár emelkedést tekintjük) a HM1 expressziós szintjéhez képest, amelyet kontrollként tekintettünk. A *Xist* és a *Sema3a* transzkriptumok relatív expressziós szintje minden sejtvonalon szignifikánsan ($p < 0,05$) emelkedett a HM1 szintjéhez képest. Hasonlóképpen, a *Gal*, *Fgf5*, *Gbx2*, *Commd3* és *Crabp2* relatív expressziós szintje néhány sejtvonalon esetében szintén szignifikánsan ($p < 0,05$) különbözött a HM1-hez képest. A *Lefty1* és *Lefty2* két mintában, a B6D2 PGA és a B6D2 CUM NT (PEM) esetében szignifikánsan alacsonyabb expressziót mutatott a HM1 expressziós szintjéhez képest.

A differenciálódással kapcsolatos markerek összehasonlításakor a gének 76%-a több mint háromszoros eltérést mutatott a HM1 expressziójához képest. Szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$) figyeltünk meg a *Col2a1*, *Colla1*, *Cdx2*, *Flt1*, *Ins2*, *Nppa*, *Olig2* és *Runx2* relatív expressziójában. Hasonlóképpen, az *Afp*, *Cd34*, *Eomes*, *Gcm1*, *Hbz*, *Iapp*, *Nes*, *T* és *Wt1* relatív szintje is szignifikánsan különbözött több sejtvonalon esetében (2. melléklet). Összefoglalva, a TaqMan 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, a különböző sejtmagdonor sejtvonalak között.

4.2.6.2 Génexpressziós elemzés microarray technikával

A következőkben genomszintű expressziós profilalkotó megközelítést alkalmaztunk, microarray technika használatával az NT embrióból és a kontroll embrióból származó ESC-vonalak közötti génexpressziós különbségek elemzésére. A SAM egyosztályos elemzés az összesen 13 minta összehasonlításából 11-ben mutatott ki szignifikánsan eltérő szinten expresszáló géneket (a páronkénti összehasonlításokat a m olvashatjuk le). A szignifikanciát a $<10\%$ -os ún. hamis felfedezési arány (FDR) és a legalább másfélszeres ($>1,5x$) változási küszöbérték együttes alkalmazásával határoztuk meg. A génexpressziós szintek változásait mindkét genetikai háttér sejtmagátültetéssel létrehozott és nem sejtmagátültetéssel előállított sejtvonalaik között azonosítottuk (13. ábra: HM1 NT vs. HM1 és B6D2 MEF NT vs. B6D2). Emellett a parthenogenetikus embrióból származó (B6D2 PGA), valamint a kumulusból származó ntESC sejtvonalak (B6D2 CUM NT és B6D2 CUM NT (PEM)) nagyszámú, eltérően expresszáló gént mutattak a nem sejtmagátültetéssel létrehozott kontrollokhoz képest (13. ábra). A piezoelektromos (B6D2 CUM NT (PEM)) vagy a *zona pellucida*-mentes (B6D2 CUM NT) sejtmagátültetéses módszerrel előállított B6D2 törzsből származó kumulusz donorsejt felhasználásával előállított embriókból származó sejtvonalak között azonban nem észleltünk szignifikáns eltéréseket.



13. ábra: Az eltérően expresszáló gének száma a különböző ESC-vonalak páronkénti összehasonlításában. Hét ESC sejtvonala expressziós mintázatát elemeztük 13 összehasonlításában. A diagram a SAM egyosztályos elemzéssel azonosított, a különböző ESC sejtvonalak között szignifikánsan eltérően expresszáló gének számát és a változás irányát (csökkent vagy emelkedett) mutatja. A szignifikanciát FDR $<10\%$ és $>1,5x$ változás (expresszió növekedés vagy csökkenés) küszöbértékek alkalmazásával határoztuk meg (Kobolák et al., 2012 alapján módosítva).

A várakozásoknak megfelelően a különböző genetikai háttérű (HM1 és B6D2) kontroll embrióból származó ESC-k összehasonlítása nagyszámú (109) szignifikánsan eltérő módon expresszáló gént mutatott ki ($p < 0,05$; 13. ábra). Továbbá, szembevető változásokat találtunk a

4.2.6.3 Génexpressziós profilok hierarchikus klaszterelemzése

	Genetikai háttér	sejtmag donor
A	B6D2 129/Ola	MEF NT ESC NT
	B6D2	PGA NC
	B6D2	MEF NT NC
	B6D2	CUM NT NC
B	B6D2 129/Ola	PGA NC
	B6D2 129/Ola	CUM NT- PEM NC
	B6D2 129/Ola	MEF NT NC
	B6D2 129/Ola	CUM NT NC
C	B6D2	CUM NT MEF NT
	129/Ola	ESC NT NC
	B6D2 129/Ola	NC NC
	B6D2 129/Ola	CUM NT ESC NT
D	B6D2	CUM NT CUM NT-PEM

14. ábra: Az ESC sejtvonalak microarray módszerrel történő összehasonlításának hierarchikus klaszterezése (HCL). A dendrogram a mikroarray minták klaszterezéseinek folyamatát tükrözi a Pearson korrelációs együtthatóval mért génexpressziós profiljaik hasonlósága szerint. A minták klaszterei közötti távolságok az ábrázoláson közelítettek. Az ESC sejtvonalak összehasonlítása genetikai háttér (nyolcszögek) és a sejtmagdonor sejt típusa (négyzetek) szerint klaszterezve. NT: sejtmagátültetés; NC: nem sejtmagátültetett; MEF: egér embrionális fibroblaszt; CUM: kumulusz; PEM: piezoelektromos sejtmagátültetés; PGA: parthenogenetikuss; (Kobolak et al., 2012 alapján módosítva).

4.2.6.4 Az eredmények validálása kvantitatív valós idejű PCR-rel (qPCR)

A microarray eredmények ellenőrzése érdekében kilenc kiválasztott gént (*Tagln*, *Gas5*, *Ktn1*, *S100a6*, *S100a10*, *Sparc*, *Peg3*, *Feml1* és *Dppa5*) kvantitatív valós idejű PCR segítségével validáltunk. Az egyes qPCR-eredmények 3. mellékletben találhatók.

Számos, a microarray-kísérletek során a páronkénti összehasonlításokban azonosított eltérően expresszáló gén (akár magasabb akár alacsonyabb expressziós szinttel) a TaqMan-tesztben is eltérően fejeződött ki (pl. *Actc1*, *Cd34*, *Cdh5*, *Cdx2*, *Colla1*, *Crabp2*, *Flt1*, *Gabrb3*) (2. és 3. Melléklet). Továbbá ezek között öt (*Lefty2*, *Lin28*, *Nanog*, *Utf1* és *Zfp42*) a 171 eltérően expresszáló gén között is szerepelt, amelyek a TaqMan assay-ben is jelen voltak, és az expresszió változásában megegyező tendenciát mutattak. Összefoglalva, a microarray vizsgálatokban eltérően expresszáló géneket és expresszió változási tendenciákat két független módszerrel is igazoltuk.

4.2.6.5 Az eltérően expresszáló gének funkcionális osztályozása

Annak elemzésére, hogy a 171 eltérően expresszáló gén között a különböző minta-összehasonlítások során felülreprezentáltak-e bizonyos funkcionális annotációk, az Expression Analysis Systematic Explorer (EASE) használtuk, és a géneket a molekuláris funkciók és biológiai folyamatok alapján osztályoztuk.

Általában 15 biológiai folyamat, köztük a sejtnövekedés és kommunikáció, a differenciáció, a neurogenesis, a DNS-metiláció, valamint a fehérjék, lipidek, szteroidok és nukleotidok metabolizmusa volt felülreprezentált (18. táblázat). Az azonos Gene Ontology (GO) meghatározással annotált gének közül több gén hasonló expressziós mintázatot mutatott a mintaösszehasonlítások során (például *Anxa1*, *App*, *Colla2*, *Cd5* és *Igfbp3* a sejt-kommunikációval kapcsolatban). Más csoportokban viszont éppen eltérő mintázatot detektáltunk (például *Dnmt3a*, *Dnmt3l* és *Fos* a DNS-metilációval összefüggésben) (18. táblázat). Fontos megjegyezni, hogy az eltérő expressziót mutató gének közül több is egyszerre több GO csoportba is besorolható (pl. Annexin 1 (*Anxa1*), amely egy foszfolipid-kötő membránfehérje).

18. táblázat: Az eltérően expresszáló gének besorolása biológiai folyamatok szerint

GO meghatározás	Gén szimbólum
sejtnövekedés és/vagy fenntartás	<i>Apoc2</i> , <i>Apoe</i> , <i>App</i> , <i>Bet1</i> , <i>Cbx2</i> , <i>Cd5</i> , <i>Colec12</i> , <i>Crabp1</i> , <i>Fos</i> , <i>Fxyd6</i> , <i>G3bp2</i> , <i>Gabarapl2</i> , <i>Gria4</i> , <i>Hspd1</i> , <i>Igfbp3</i> , <i>Klf4</i> , <i>Ltbp2</i> , <i>Mid1</i> , <i>Myl6</i> , <i>Sept1</i> , <i>Sfn</i> , <i>Slc6a8</i> , <i>Smc1l2</i> , <i>Tmsb4x</i> .
differenciáció/morfogenezis	<i>Ahnak</i> , <i>Apoe</i> , <i>Cald1</i> , <i>Colla2</i> , <i>Col3a1</i> , <i>Crabp1</i> , <i>Dnmt3a</i> , <i>Dnmt3l</i> , <i>Fos</i> , <i>Itgb1</i> , <i>Klf4</i> , <i>Mid1</i> , <i>Myl6</i> , <i>Myef2</i> , <i>Nnat</i> , <i>Nr0b1</i> , <i>Pax1</i> , <i>Sema7a</i> , <i>Tbx3</i> , <i>Tmsb4x</i> , <i>Tpm1</i> , <i>Usp9x</i> , <i>Wnt11</i> .
sejtek közötti kommunikáció	<i>Anxa1</i> , <i>Apoe</i> , <i>App</i> , <i>Cd5</i> , <i>Colla2</i> , <i>Crabp1</i> , <i>Gria4</i> , <i>Igfbp3</i> , <i>Jam2</i> , <i>Lphn2</i> , <i>Map2k4</i> , <i>Ogt</i> , <i>Sfn</i> , <i>S100a10</i> , <i>Slc6a8</i> , <i>Tnc</i> , <i>Wnt11</i> .
nukleotid- és nukleinsav-anyagcsere	<i>Adssl1</i> , <i>Atr</i> , <i>Cbx2</i> , <i>Colec12</i> , <i>Dnmt3a</i> , <i>Dnmt3l</i> , <i>Egr1</i> , <i>Fos</i> , <i>Klf4</i> , <i>Mid1</i> , <i>Nr0b1</i> , <i>Nr1h3</i> , <i>Peg3</i> , <i>Prkcbp1</i> , <i>Tbx3</i> , <i>Ube2a</i> , <i>Utf1</i> .
fehérje anyagcsere	<i>Apoe</i> , <i>Casp9</i> , <i>Colec12</i> , <i>Eif2s2</i> , <i>Epha8</i> , <i>G3bp2</i> , <i>Hspb1</i> , <i>Hspd1</i> , <i>Lox</i> , <i>Map2k4</i> , <i>Nnat</i> , <i>Ogt</i> , <i>Pin4</i> , <i>Sfn</i> , <i>Tmsb4x</i> , <i>Ube2a</i> , <i>Usp9x</i> .
makromolekula bioszintézis	<i>Adssl1</i> , <i>Dhcr7</i> , <i>Eif2s2</i> , <i>Hmgcs1</i> , <i>Hspb1</i> , <i>Idi1</i> , <i>Nr0b1</i> , <i>Ogt</i> , <i>Nr0b1</i> , <i>Hspb1</i> .
alkohol metabolizmus	<i>Apoe</i> , <i>Dhcr7</i> , <i>Hmgcs1</i> , <i>Idi1</i> , <i>Ldha</i> , <i>Pecr</i> , <i>Pfkfb</i> , <i>Pecr</i> , <i>Pfkfb</i> .
lipid anyagcsere	<i>Anxa1</i> , <i>Apoc2</i> , <i>Apoe</i> , <i>Dhcr7</i> , <i>Hmgcs1</i> , <i>Idi1</i> , <i>Nr0b1</i> , <i>Idi1</i> , <i>Nr0b1</i> .
külső ingerre adott válasz	<i>Anxa1</i> , <i>Apoe</i> , <i>B2m</i> , <i>Colec12</i> , <i>Ephx2</i> , <i>Fos</i> , <i>Ifitm3</i> , <i>Itgb1</i> , <i>Ogt</i> , <i>Ppp1r13b</i> , <i>Sema7a</i> , <i>Timeless</i> , <i>Timp3</i> , <i>Tmsb4x</i> .
sejt motilitás	<i>Anxa1</i> , <i>Apoe</i> , <i>Cald1</i> , <i>Slc6a8</i> , <i>Tpm1</i> .
szteroid anyagcsere	<i>Apoe</i> , <i>Dhcr7</i> , <i>Hmgcs1</i> , <i>Idi1</i> , <i>Nr0b1</i> , <i>Nr0b1</i> .
sejtdhézis	<i>App</i> , <i>Cd5</i> , <i>Colla2</i> , <i>Jam2</i> .
neurogenesis	<i>Ahnak</i> , <i>Apoe</i> , <i>Nnat</i> , <i>Sema7a</i> .
apoptózis	<i>Apoe</i> , <i>App</i> , <i>Bnip3</i> , <i>Casp9</i> , <i>Pecr</i> , <i>Ppp1r13b</i> , <i>Ppp1r13b</i> .
DNS-metiláció	<i>Dnmt3a</i> , <i>Dnmt3l</i> , <i>Fos</i> .

A molekuláris funkciók közül a nukleinsavkötő, a citoskeletális fehérjék és a transzkripció faktorok voltak leginkább felülreprezentáltak a minta összehasonlítások között, ugyanakkor az eltérően expresszálo gének mintegy egyharmadát a "különféle" vagy "besorolhatatlan" kategóriába kerültek. Funkcionális szinten kevés átfedést találtunk: a 129Ola genetikai hátteret illetően az eltérően expresszálo gének sejtfolymatai közé tartozik az apoptózis, a neurogenesis és az immunválasz, míg a B6D2 háttér eltérően expresszálo génjei különböző jelátviteli útvonalakból állnak (pl. integrin és dopamin) (18. táblázat). Összefoglalva, az ntESC sejtfolymakban a génszabályozás változásai a biológiai folymatok széles skáláját befolyásolták, azonban egyetlen specifikus funkcionális csoportot sem lehetett összefüggésbe hozni a sejtmagátültetéssel.

4.2.6.6 Összehasonlítás a korábban közzétett microarray adatsorokkal

Összehasonlítottuk a vizsgálatunkban szereplő eltérően expresszálo gének csoportját (171 gén) az egér ntESC folymakon végzett korábbi vizsgálatokból származó, rendelkezésre álló adatsorokkal (Brambrink et al., 2006; Wakayama et al., 2006), egér NT embriókkal (Jincho et al., 2008; Fukuda et al., 2010), szarvasmarha NT embriókkal (Pfister-Genskow et al., 2005; Smith et al., 2005; Somers et al., 2006; Aston et al., 2009; Rodriguez-Osorio et al., 2009), sertés NT embriókkal (Tian et al., 2009) és rhesusmajom ntESC (Byrne 2011) elérhető adataival. Az egér ntESC sejtfolymakról közzétett adathalmazok összehasonlítása (Brambrink et al., 2006; Wakayama et al., 2006), csak három gén, a *Krt8* (*Keratin 8*), a *Myl6* (*Myosin light polypeptide 6*) és a *Zfp42* (korábban *Rex1*, *Zinc finger protein 42*) átfedését mutatta ki adatainkkal. További négy gént (*App*, *Dnmt3a*, *Eif2s2* és *Ube2a*) azonosítottunk, amikor adathalmazunkat összehasonlítottuk az egér NT embriókban differenciálisan expresszálo gének korábban közzétett eredményeivel (Jincho et al., 2008; Fukuda et al., 2010).

Az adataink fajközi összehasonlítása a rhesusmajom ntESC sejtfolymak adataival (Byrne 2011) három átfedő gént, a *Crabp1*, a *Lin28* és a *Nanog* azonosította, amelyek mindkét fajban eltérően expresszáltak a saját kontrolljaikhoz képest. Érdekes módon ebben a csoportban a *Dnmt3b*, de nem a *Dnmt3a* gén is eltérően fejeződött ki a rhesus ntESC sejtekben (Byrne 2011).

A szarvasmarhafélék további fajközi összehasonlításai (Pfister-Genskow et al., 2005; Smith et al., 2005; Somers et al., 2006; Aston et al., 2009; Rodriguez-Osorio et al., 2009) és sertés (Tian et al., 2009) NT embriókban az eltérően expresszálo gének közös halmazát azonosítottuk, ezek közé tartoztak: kötőfehérjék, extracelluláris mátrix fehérjék, ABC-transzporterek, transzlációs iniciátorok, Slc-transzporterek, riboszómális fehérjék, pro-kollagének, néhány hőszokkfehérje génnel és citokeratinokkal kapcsolatos gének. A transzkriptumok szintjén 21 gén esetében találtunk átfedést legalább két vizsgálatban (*Actb*, *Anxa1*, *App*, *Cald1*, *Cd81*, *Cdc42*, *Dnmt3a*, *Dnmt3L*, *Eif2s2*, *Igf2r*, *Krt2-8*, *Mapre1*, *Myl6*, *Nid2*, *Prps1*, *Ptgs2*, *Set*, *Tmsb4x*, *Tsr2*, *Ube2a*, *Vim* és *Zfp42*) (Pfister-Genskow et al., 2005; Smith et al., 2005; Somers et al., 2006; Aston et al., 2009; Rodriguez-Osorio et al., 2009; Tian et al., 2009). Saját ntESC-adatkészletünkkel összehasonlítva a korábbi lista 13 génje volt átfedésben (*Anxa1*, *App*, *Cald1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3L*, *Eif2s2*, *Krt2-8*, *Myl6*, *Tmsb4x*, *Tsr2*, *Ube2a*, *Vim* és *Zfp42*). Összességében csekély átfedés volt kimutatható a saját adataink és a más adatsorokban vagy egér ntESC vagy egér NT embriókban eltérően expresszálo géneként azonosított gének listái között. A sejtmagátültetéssel létrehozott embriók eltérően expresszálo géneinek listája között nagyobb volt a hasonlóság a fajon belül vagy a fajok között, és az érintett gének száma is magasabb volt.

4.3 A pluripotencia kialakításában szerepet játszó *POU5F1* vizsgálata nyúlban

4.3.1 A nyúl *POU5F1* gén upstream régiójának izolálása

A nyúl MHC régiójának feltérképezése során (Rogel-Gaillard et al., 2001) a *POU5F1*-szerű gén részleges szekvenálását is elvégezték és a szekvencia részlet hasonlósága alapján azonosították az LBAB-841A3 és LBAB-85810 BAC klónokon. Több faj szekvencia-összehasonlítása alapján (emberi, egér és szarvasmarha *POU5F1* gének) primereket terveztünk a konzervált régiókra (oct4-435 és oct4-186, 4. táblázat, 3.3.2 fejezet), majd többszörös szekvencia-összehasonlítással megerősítettük, és igazoltuk, hogy valóban a nyúl teljes *POU5F1* génjét (7,5 kb) tartalmazza a BAC klón. Öt erősen konzervált régiót találtunk, amelyek tökéletesen megfeleltek a referenciaszekvenciák (humán, egér) jól jellemzett öt exonjának. E konzervált, feltételezett exonikus régiók szekvenciáinak hossza meglehetősen hasonló, de nem volt azonos, ami nem konzervált intronikus régiók létezésére utal. Munkánkkal egy időben egy másik kutatócsoport tőlünk függetlenül szekvenálta és térképezte a nyúl *POU5F1* szekvenciát, amelyet EF194086 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EF194086>) számon hivatkozott, és az MHC régióra, a 12q1.1 kromoszómára térképezte a gén helyét BAC könyvtárklónokon (Shi et al., 2008).

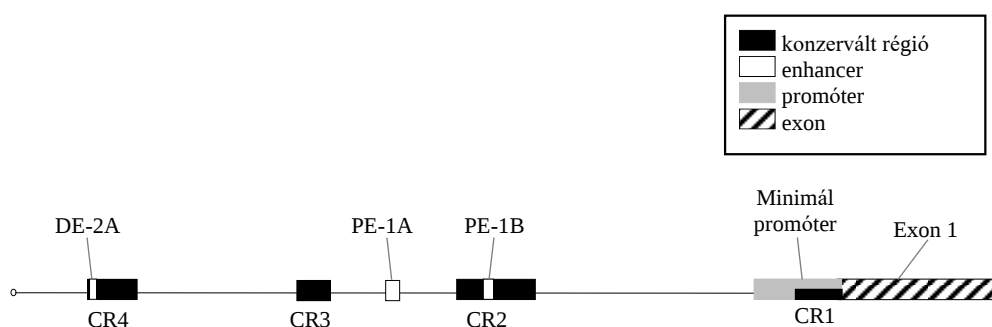
A *POU5F1* fehérje kódoló szekvenciájának megerősítésére RACE PCR-t alkalmaztunk nyúl hólyagszúra embrió mintákon. A génspecifikus belső primereket a gén konzervált régiójához kötöttük, míg a külső primereket az 5'UTR-hez és a polyA farokhoz kapcsoltuk. Az expresszált és kódoló régió 1083 bp hosszúságúnak bizonyult, ami pontosan megegyezett a korábban megjósolt exonokkal. A nyúl cDNS-szekvencia 84%-ban megegyezett a humán, 83%-ban az egér és 87%-ban a szarvasmarha szekvenciával. A cDNS-szekvenciát EF062856 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EF062856>) néven találjuk meg az adatbázisban (Shi et al., 2008).

4.3.2 A nyúl *POU5F1* promóter régiójának szekvenciaanalízise

Miután megerősítésre került a *POU5F1* nyúl kódoló szekvenciája, a *POU5F1* upstream régiójának 2,2 kb-os fragmentumát szekvenáltuk meg és ortológjaival összehasonlítottuk (16. ábra). Az illesztés bebizonyította, hogy a nyúl *POU5F1* 5' upstream szekvenciájában négy kiterjedten konzervált régió (CR1-4) és három enhancer régió található. Ezek a CR régiók számos fajban ismertek a *POU5F1* promóter funkcionális régióiként (Yeom et al., 1991; Nordhoff et al., 2001). A nyúl különböző régiói nagyfokú azonosságot mutattak az emberi, szarvasmarha, kutya és egér szekvenciákkal összehasonlítva (15. ábra). Nyúlban a TATA-box nélküli minimál promóter (MP), amely a CR1 régióban helyezkedik el, -221 bp-ig terjed, és tartalmazza mind az Sp1/Sp3 átfedő kötőhelyeit (-120/-110), mind a hormonreszponzív (HRE) elemet (-111/-94) és három G/C gazdag régiót (15. ábra). A nyúlban található E-box szekvencia (CACTTG), amely a bázikus helix-loop-helix (bHLH) transzkripciós faktorok kötésével szabályozó funkciót tölt be a génexpresszió szabályozásában, a proximális enhancer régió 1B (PE-1B; -945/-940) szakaszán található. A proximális enhancer régió 1B (-968/-940) a CR2 régióban (-1023/-824), míg a proximális enhancer régió 1A (PE-1A; -1232/-1192) a CR2 régióon kívül (-1480/-1376) helyezkedik el. Megjegyzendő, hogy a PE-1A régió kevesebb hasonlóságot mutat valamennyi referenciafajjal. A CR3 régió a PE-1A szekvenciától upstream lokalizálódik. A disztális enhancer régió (DE-2A) a CR4 régióban (-2450/-1901) található (-2025 és -2004 bp között). A *POU5F1*/SOX2 transzkripciós faktor (TF) kötőhely a disztális enhancerben, a CR4 régióon belül található (-1977/-1962). Több G/C-gazdag motívumot azonosítottunk, amelyek mind az öt összehasonlításként használt emlős szekvenciában jelen vannak; azonban a PE-1A enhancer közelében egy CCCACCC motívumot találtunk, amely csak a nyúlban van jelen. Ez a motívum részben átfedi a CCCTCCCCC szekvenciát. A nyúl *POU5F1* promóter régió szerveződésének sematikus rajza a 16. ábrán látható.

[illegible]

15. ábra: A nyúl (OC) *POU5F1* szabályozó régióinak illesztése az emlős ortológjaival. A disztális enhancer, 2A hely (DE-2A); a proximális enhancer, 1A és 1B helyek (PE-1A, PE-1B) és a minimál promóter (MP) régiója szürke színnel van árnyékolva. Az erősen konzervált GC-gazdag motívumok, mint a GGG(A/T)GGG, CCC(A/T)CCC és a feltételezett transzkripciós faktor-kötőhelyek fekete színnel vannak árnyékolva. A PE 1A közelében lévő, csak a nyúlban jelen lévő CCCACCC motívumot bekeretezéssel jelöltük; ez a motívum részben átfed egy CCCTCCC motívummal (félkövérrel szedve). A Sp család kötőhelyét aláhúzással jelöltük. A nukleotidokat a nyúl *POU5F1* gén translációs starthelyéhez viszonyítva számoztuk. OC, *Oryctolagus cuniculus*; MM, *Mus musculus*; HS, *Homo sapiens*; BT, *Bos taurus* és CF, *Canis familiaris* (Kobolak et al., 2009 alapján módosítva).



16. ábra: A nyúl *POU5F1* gén promóter régiójának szerveződése sematikus ábrán (fragment mérete: 2641 bp). CR, konzervált régió; P, proximális; D, disztális; E, enhancer (Kobolák et al., 2009 alapján módosítva).

A 18. táblázat a nyúl és négy másik emlős *POU5F1* szabályozó régiójának páros összehasonlítását mutatja. Az elemzés egyértelműen kimutatta, 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 teljes minimál promóter (0/-221 bp) és a PE-1A enhancer volt az a két kivételes régió, ahol a kutya szekvencia mutatta a legmagasabb homológiát a nyúl szekvenciával összehasonlítva (19. táblázat).

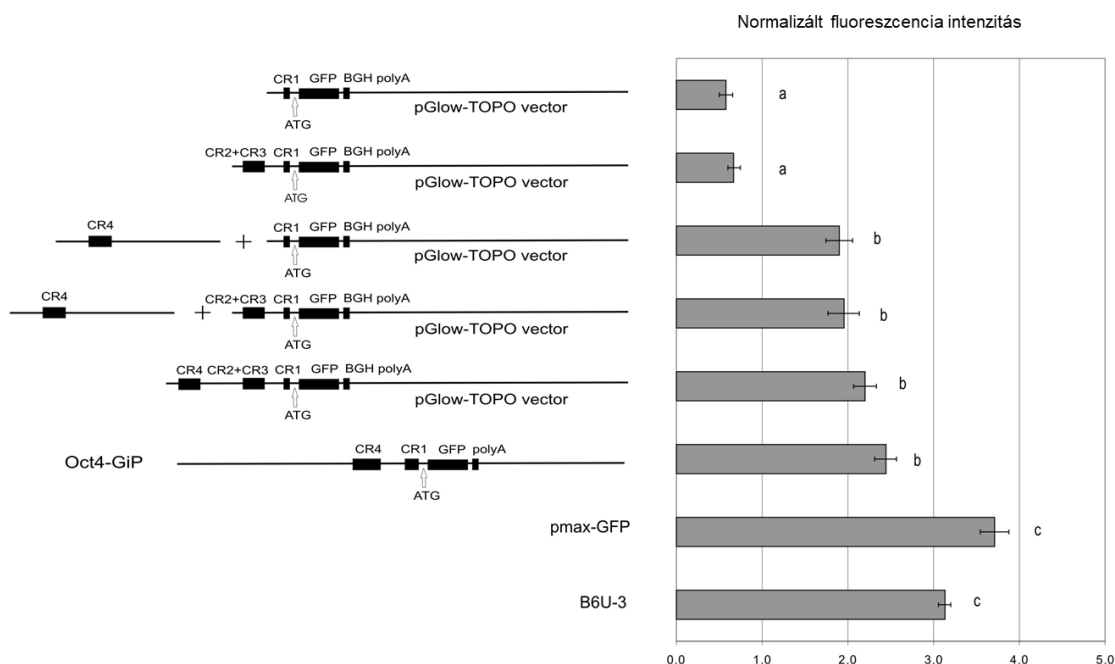
19. táblázat: A konzervált régiók nukleotid szekvenciái és a teljes upstream régió közötti homológia (%) fajok közötti összehasonlításban

nyúl (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) <i>Pou5F1</i> gén promóter régiók	egér <i>Mus musculus</i>	humán <i>Homo sapiens</i>	szarvasmarha <i>Bos taurus</i>	kutya <i>Canis familiaris</i>
CR1	82,3	88,4	86,8	84,8
CR2	92,0	93,9	90,7	—
CR3	79,6	80,9	73,8	68,2
CR4	67,6	83,6	78,0	67,1
PE 1A	76,5	73,2	77,8	83,3
PE 1B	96,0	96,4	96,4	—
DE 2A	87,5	95,0	90,0	85,7
MP	74,2	76,8	79,1	79,3
teljes 5' régió	52,5	57,7	57,0	51,9

4.3.3 A promóter régiók funkcionális elemzése

Négy különböző riporterkonstrukciót elektroporáltunk egér ESC sejtekbe, hogy teszteljük a *POU5F1* promóterében lévő konzervált régió működését (17. ábra). A minimál (proximális) promótert (CR1), a proximális promótert proximális enhancerrel (CR1+(CR2 és CR3)), a proximális promótert disztális enhancerrel (CR1+CR4) és a teljes promóter régiót (CR1+(CR2 és CR3)+CR4) vizsgáltuk, promóter nélküli fluoreszcens fehérjét (GFP) kódoló rendszer alkalmazásával. A minimál promóter (CR1) fluoreszcens aktivitása nagyon gyenge volt a kontroll ubikvitin promóterhez (B6U-3 sejt vonal) és a nem transzfektált kontroll R1 ESC sejt vonal alap autofluoreszcenciájához képest (17. ábra), azonban egyértelműen elmondható, hogy a nyúl *POU5F1* CR1 szabályozó régiója képes egér ESC sejtekben minimál promóterként kifejeződni. A CR2+CR3 régiók hozzáadása nem növelte jelentősen az expresszió szintjét a CR1 fragmenthez képest. Amikor azonban a CR4 régiót a minimál promóterrel (CR1) együtt transzfektáltuk, az expresszió szintje több mint kétszeresére nőtt. Hasonlóképpen, az expresszió szintén kétszer magasabb volt a CR1-hez képest, amikor a teljes promóter régiót [CR1+(CR2 és CR3)+CR4] transzfektáltuk, vagy a CR1+(CR2 és CR3) régiót a CR4-gyel együtt transzfektáltuk. Az expresszió intenzitása azonban jelentősen kisebb volt az ubikvitin promóter

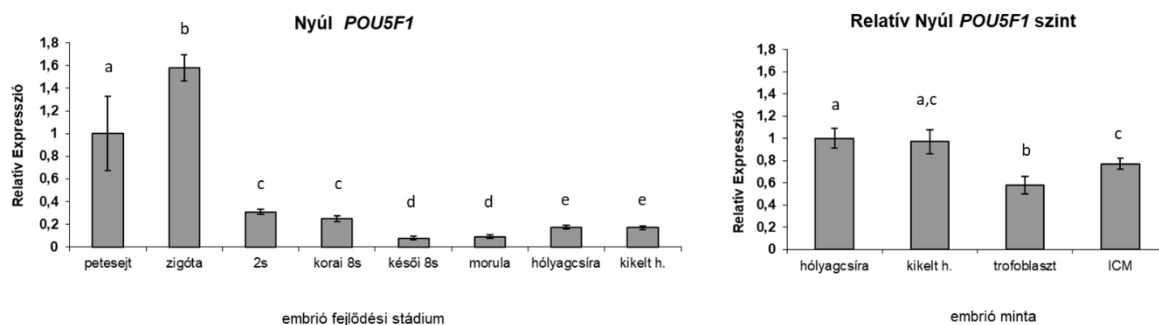
(transzgenikus B6U-3 ESC sejt vonal) vagy a kontroll pmax-GFP vektor expressziójához képest (17. ábra). Amikor az expresszióját összehasonlítottuk az egér *POU5F1* minimál promóter (CR1) és disztális enhancert (CR4) tartalmazó konstrukcióval (Oct4-GiP) (Hubner et al., 2003), az egér konstrukció a nyúl hasonló konstrukcióval összevethető, a pozitív kontrolloknál alacsonyabb expressziós intenzitást mutatott (17. ábra).



17. ábra: A nyúl *POU5F1* promóter régiójának expressziós elemzése egér ESC sejtekben. A vizsgálatban használt különböző konstrukciók sematikus ábrázolása az ábra bal oldalán látható. A fluoreszcens aktivitást 72 órával a nukleofekció után mértük. Az adatokat a kezletlen R1 egér ESC sejtek autofluoreszcenciájával normalizáltuk. A CR1, a minimál promóter gyenge alapszintű expressziót mutatott az egér ESC sejtekben. Amikor a proximális enhancer fragmentum (CR2 és CR3) a szabályozó régió része volt, az expresszió nem mutatott jelentős változást. Amikor azonban a disztális enhancer régiót (CR4) tartalmazó vektort vagy a minimál promóterrel (CR1), vagy a minimál promóterrel és a proximális enhancerrel (CR1+(CR2 és CR3) együtt transzfektáltuk, az expressziós szint jelentősen megnőtt. Míg a teljes, intakt szabályozó régió (CR1+(CR2 és CR3)+CR4) transzfektálásakor tapasztaltuk a legmagasabb expressziót. Ha az egér CR4+CR1 régiót tartalmazó Oct4-GiP sejtekkel hasonlítottuk össze, nem találtunk jelentős különbséget. Az oszlopdiagrammon a standard hiba (SE±) értékek kerültek feltüntetésre. ^{a, b, c} az értékek közötti szignifikáns különbségeket jelölik ($p < 0,05$) (Kobolák et al., 2009 alapján módosítva).

4.3.4 *POU5F1* expresszió preimplantációs stádiumú embriókban

A nyúl *POU5F1* gén expresszióját kvantitatív valós idejű RT-PCR segítségével elemeztük preimplantációs stádiumú nyúl embriókban. A *POU5F1* mRNS-e minden vizsgált stádiumban, de különböző intenzitással volt kimutatható az embriókban. Az mRNS magasabb mennyiségben volt jelen az petesejtekben és a zigótákban (18. ábra), de a szintek folyamatosan csökkentek az embrió genomjának aktiválásáig, amely a nyúl preimplantációs fejlődése során a késői 8-16 sejt stádiumok között következik be (Brunet-Simon et al., 2001; Mamo et al., 2008; Leandri et al., 2009). Az embrionális genom aktiválódását követően az expressziós szintek folyamatosan emelkedtek a hólyagsíra stádiumig (18. ábra). A *POU5F1* transzkriptumot a nyúl hólyagsíra embriók izolált ICM és trofoblaszt részeiben is számszerűsítettük, és a relatív szinteket a hólyagsíra embriók transzkriptumát kalibrátornak véve összehasonlítottuk. Az összehasonlítás kimutatta, hogy a *POU5F1* gén expressziója egyértelműen kimutatható mindkét sejt típusban, de expressziója szignifikánsan magasabb ($p < 0,05$) az ICM-ben, mint a trofoblaszt sejtekben (18. ábra).



18. ábra: *POU5F1* expresszió preimplantációs stádiumú nyúlembriókban. A *POU5F1* expressziójának kvantitatív valós idejű RT-PCR analízise nyúl preimplantációs stádiumú embriókban. Az ábrákon öt egyedi minta génexpressziójának átlagértékei ($\pm$ SEM) ($n=5$) kerültek feltüntetésre. A különböző betűk az értékek közötti szignifikáns különbségeket jelölik ($p<0,05$) (Kobolak et al., 2009 alapján módosítva).

4.3.5 Pszeudogének azonosítása

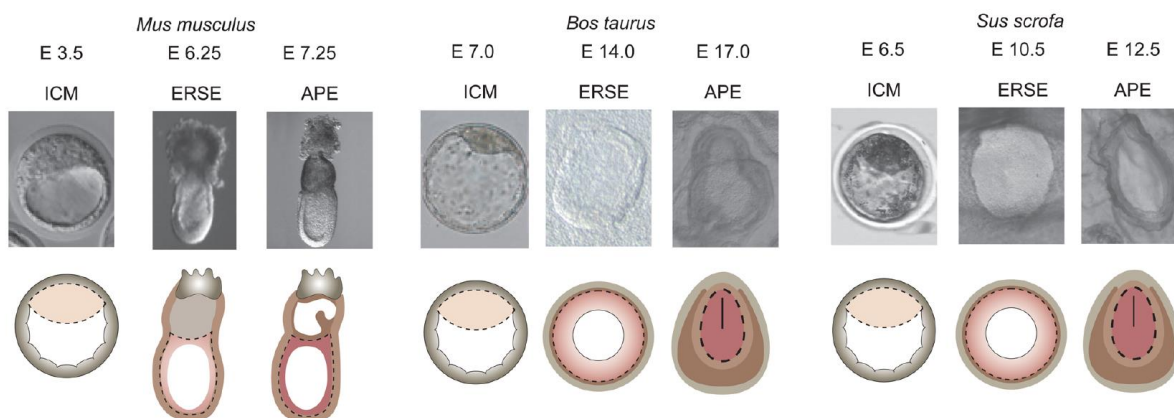
A BAC-könyvtár szűrését az oct4-435 és oct4-186 primerekkel végeztük (1. táblázat), és azonosítottuk az LBAB-304A07 és LBAB-779H10 BAC-klónokat. Mindkét klón *POU5F1*-szerű szekvenciát tartalmaz, és bár intronok hiányoznak belőlük, közvetlen ismétlődésekkel szegélyezett polyA farok maradványokat tartalmaznak, amelyek mind a retrotranszpozált pszeudogének jellemzői (Vanin 1985; Mighell et al., 2000). Az ún. határoló (*flanking*) régió szekvenálása alapján a két BAC-klón azonosnak bizonyult, ugyanazt a genomi régiót tartalmazta. Mégis, ezen BAC-klónok kromoszómális lokalizációja ismeretlen volt.

A *POU5F1* gén cDNS-e és pszeudogénje 99%-os szekvenciaazonossággal rendelkezik (4. melléklet). A szekvenciaelemzés kimutatta, hogy a pszeudogénben a kezdeti ATG-től számított 796 bp pozícióban nyolc nukleotid deléció van, amely a szekvenciában kereteltolódást, vagyis frameshift-et okoz. Ennek eredményeként a 360 aminosav hosszú funkcionális fehérje helyett egy 162 aminosav hosszú csonka fehérjét kódol. Ebből a csonka formából hiányzik a funkcionális POU-domén, de az aminosavak szintjén még mindig 92%-os hasonlóságot mutat a kereteltolódást okozó STOP-kodonig. A pszeudogén szekvenciáját EU191070.1 referenciaszámon publikáltuk a GeneBank adatbázisában (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EU191070>).

4.4 Haszonállatok embrióinak összehasonlítása, új pluripotencia gének azonosítása

4.4.1 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 fenntartásába szerepet játszó gének vizsgálatára. Előzetes vizsgálatokkal, valamint irodalmi adatokat is felhasználva *in situ* hibridizációt módszerét alkalmazva a főbb pluripotencia és fejlődési stádium specifikus fehérjék használatával (*POU5F1*, *NANOG*, *SOX2* és *BRACHYURY*) meghatároztuk azon fejlődési stádiumokat, amelyek a különböző fajok között egymásnak megfeleltethetők, egyenértékű embrionális stádiumokat jelölnek. Ez alapján az eger fejlődési stádiumát alapul véve az ICM, vagyis hólyagcsíra embrionális fejlődési stádiumnak (E3.5) leginkább megfelelő stádium az E6.5/E7 volt mind a sertés, mind a szarvasmarha esetében. Az ERSE stádiumnak (E6.25) a sertésnél E10.5 míg a szarvasmarhánál az E14 stádium felet leginkább meg, ahol a *POU5F1* expressziója radiálisan szimmetrikus epiblasztot határolt. A pregasztrulációs stádiumban az eger APE stádiumánál pedig (E7.25) a sertés E12.5 és a szarvasmarha E17 stádiumát határoztuk meg egy jellegzetes aszimmetrikus *BRACHYURY* expressziós vonal megjelenése mentén, miközben a *POU5F1* expressziója mindig erőteljesen kifejeződött az egész epiblasztban (Bernardo et al., 2018). A továbbiakban az így meghatározott stádiumokat és embrió mintákat használtuk fel a vizsgálatokban (19. ábra).



19. ábra: A szarvasmarha és sertés embriók eger embrió fejlődési stádiumianak való megfeleltetése az epiblaszt differenciáció során, a pluripotencia gének térbeli expressziója alapján. Míg a rágsálóknál az epiblaszt egy csészeszerű formát ölt, addig a párosujjú patások (*Ungulates*) esetén, így a szarvasmarha és sertés embrióknak is egy korongot (disc) formál, ezért morfológiai alapon nem lehetséges az azonosítás, csak a marker fehérjék térbeli expressziója alapján. ICM, belső sejtsomó (*Inner Cell Mass*); ERSE, radiálisan szimmetrikus epiblaszt (*epithelial radially symmetric epiblast*); APE, elülső-hátsó epiblaszt (*anterior-posterior epiblast*); E, embrionális fejlődési nap (*Embryonic day*) (Bernardo et al., 2018 alapján módosítva).

4.4.2 Génexpressziós összehasonlító vizsgálatok számos gén konzervált expresszióját tárták fel a haszonállatok embrióiban

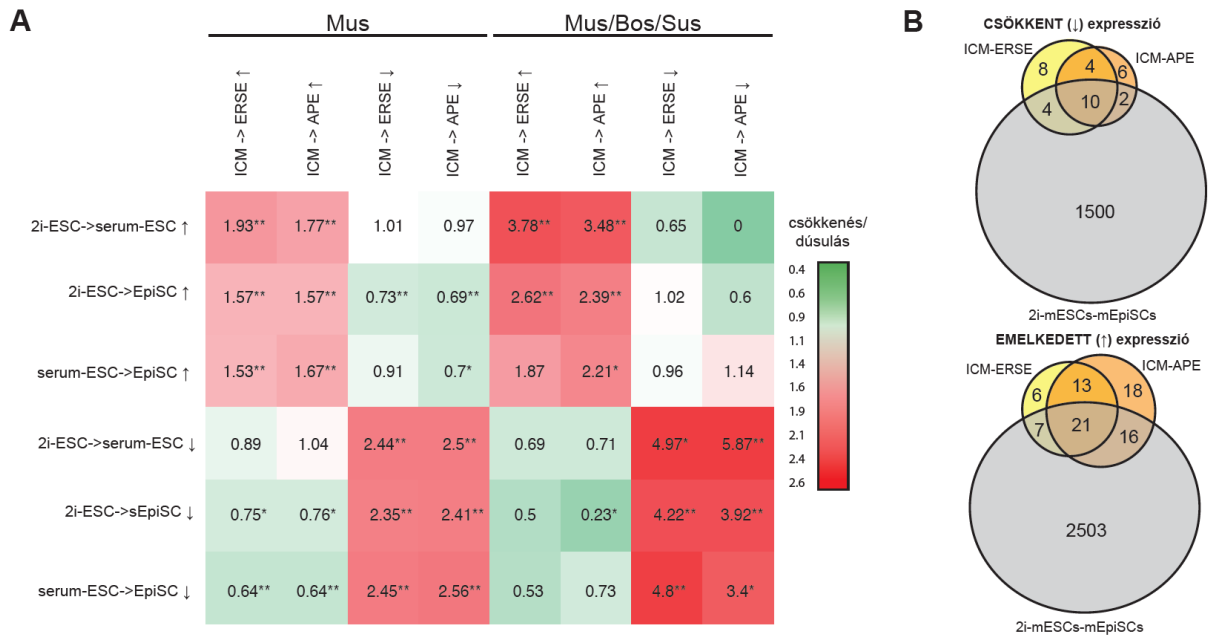
Az így feltérképezett és meghatározott embrionális stádiumokból mintákat gyűjtöttünk, RNS-t izoláltunk és génexpressziós összehasonlító vizsgálatokat végeztünk RNS szekvenálással. Először kizártuk a génexpresszió vizsgálatával az extraembrionális anyai szövetekkel való szennyeződést, hogy valóban csak az adott epiblaszt stádiumban, az adott epiblaszt sejtsoportra vonatkozó vizsgálatokat végezzük el (Bernardo et al., 2018). Az előzőekben

definiált 3 fejlődési stádiumot (ICM, ERSE, APE) a 3 fajban (egér, szarvasmarha, sertés) hasonlítottuk össze. Az eredményeink azt mutatták, hogy egy jól definiálható kis csoportja a géneknek, 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. Ez a konzervált géncsoport egy kis számú jelölt azonosítását tette lehetővé a számunkra. Az ICM-ERSE átmenet során 26 gént azonosítottunk, amelynek expressziója csökkenést mutatott, míg 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 (Bernardo et al., 2018).

4.4.3 Az *in vivo* és *in vitro* transzkripciók mintázatok összehasonlítása új, stádium-specifikus pluripotencia-asszociált géneket tárt fel

Számos, a fejlődés szempontjából fontos gén konzerválódott az evolúció során. Az előzőekben azt találtuk, hogy a konzervált gének egy kis csoportjának expressziója jellemzően megváltozik az ICM és a késői epiblaszt (ERSE és APE) közötti átmenet során. Mivel e gének némelyikét korábban nem ismertük a pluripotenciával összefüggésbe hozhatónak, felmerült, hogy e gének vajon az egér pluripotens sejtvonalak naiv és primed pluripotencia állapotában is eltérően expresszálódnak-e. Ebből a célból összehasonlítottuk RNS-szekvenálási adataimazunkat a mESCs (Marks et al., 2012) és mEpiSCs (Veillard et al., 2014) esetében publikált adatokkal. Két különböző körülmények között, szérum+LIF, illetve 2i+LIF médiumbandf tenyésztett ESC sejtekre vonatkozó adatokat használtunk, ahol a sejtek a pluripotencia "naiv alapállapotában" maradnak (Beccari et al., 2018).

Az egér *in vivo* és *in vitro* minták korrelációs elemzése azt mutatta, hogy az ICM stádium nem korrelált jól egyetlen pluripotens sejttel sem, míg mind az ERSE, mind az APE mutatott némi hasonlóságot a szérum kiegészítéssel tenyésztett mESC sejtekkel és az mEpiSC sejtekkel (20. ábra). A három faj mintáinak felhasználásával végzett főkomponens-elemzés tovább erősítette ezeket az eredményeket (20. ábra B panel), azaz a fejlődési állapot szerint összehasonlítva egyértelmű, 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 kissé közelebb állnak a 2i-mESC sejtekhez (20. ábra). Az *in vivo* és *in vitro* egérminták között az eltérően expresszálódó gének átfedése arra utal, hogy a 2i-ről szérum-mESC átmenet jobban tükrözi az ICM-ERSE átmenetet, mint a szérum-mESC-ről mEpiSC-re történő átmenetet, különösen a csökkent expressziót (*down regulated*) mutató gének esetében (20. ábra A panel). A stádiumspecifikus konzervált gének és az *in vitro* minták metszete továbbá azt mutatta, hogy csak néhány gén szabályozódik fel- (*up regulated*) vagy le (*down regulated*) mind *in vivo*, mind *in vitro* (20. ábra B panel). Az összehasonlítás megmutatta továbbá, hogy a szérum-mESCs a naiv és a primed pluripotencia közötti átmeneti stádiumnak tekinthető leginkább. 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 átmenetet *in vitro* is megtalálhatóak és a gének egy kis csoportja állhat a háttérben. Meglepő módon ezek közül csak néhányat hoztak korábban összefüggésbe a pluripotenciával.

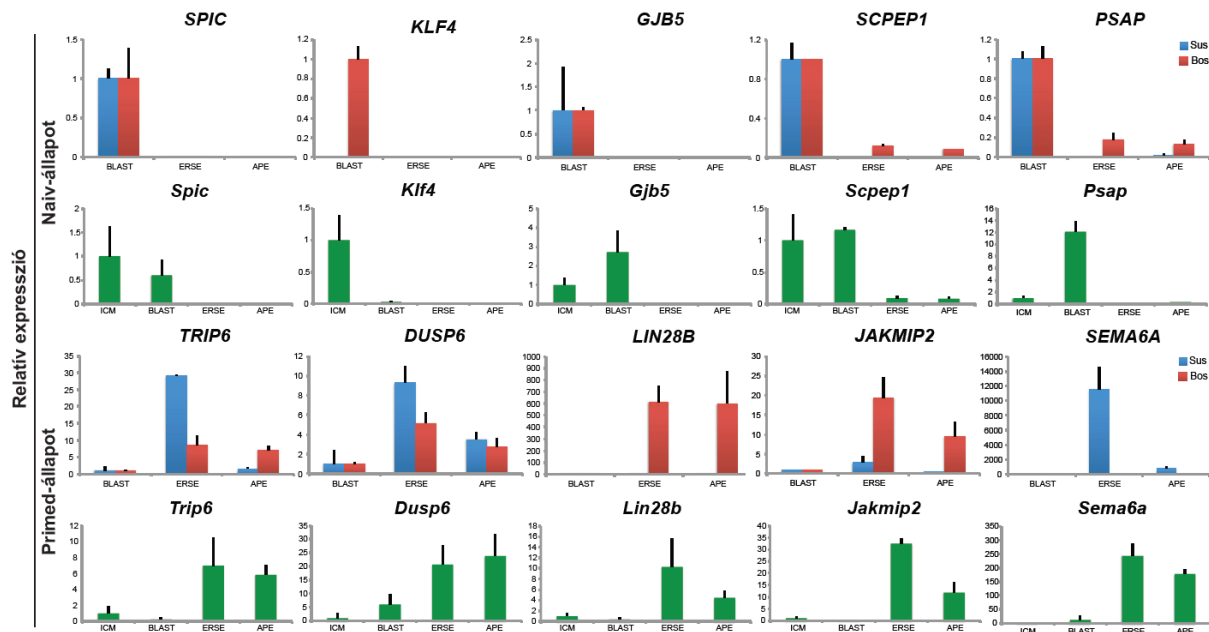


20. ábra: *In vivo* embrió minták génexpressziós mintázatának összehasonlítása *in vitro* egér őssejtekkel, a releváns naiv és primed pluripotenciával kapcsolatos gének esetén. **A)** Az *in vivo* és *in vitro* minták között az eltérően expresszálódó gének konzerválódását bemutató hőtérkép. Az átfedés az egérben eltérően kifejeződő génekre (balra: Mus jelöléssel) valamint azokra a génekre vonatkozik, amelyek a három faj között eltérően fejeződnek ki (jobbra: Mus/Bos/Sus jelöléssel). ** $p < 0,001$, * $p < 0,01$. **B)** Venn-diagrammok, amelyek a 2i-mESC és mEpiSC sejtvonalakban eltérően expresszált gének halmazai (egér naiv sejtek) és a fajok között közös eltérően expresszált génekre vonatkozó halmazuk (ICM vs. ERSE vagy APE) közötti átfedést (metszeteket) mutatják (Bernardo et al., 2018 alapján módosítva).

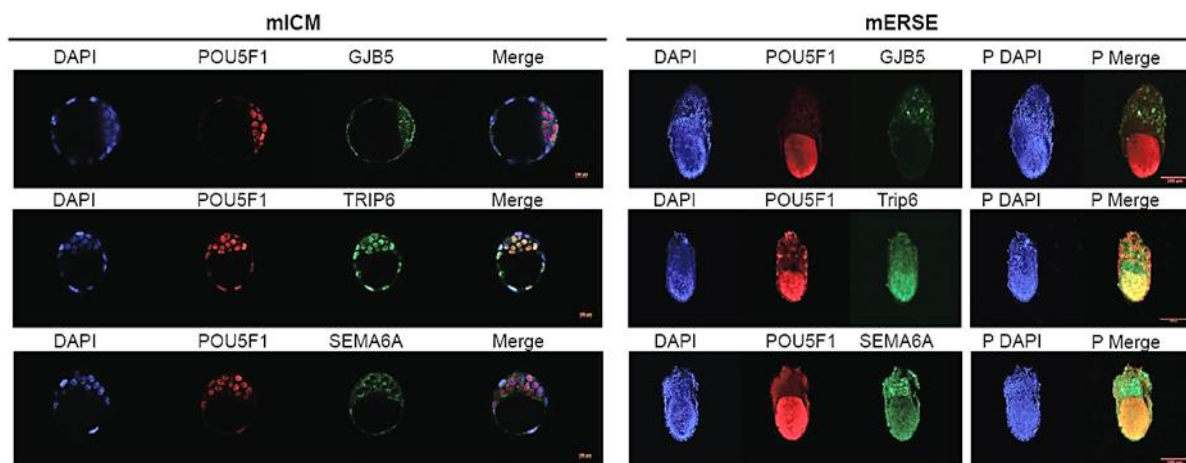
4.4.4 Az újonnan azonosított gének *in vivo* expressziójának validálása embriókban

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, mivel az irodalom alapján a *Sema6A* fontos a hESC sejtek önmegújulása során (Dowell et al., 2014).

Először összehasonlítottuk ezen gének kifejeződését az embrionális szövetekben, a három faj ICM, ERSE és APE stádiumú embrióit mintáit. 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 (21. ábra). Ugyanez volt igaz a *Klf4*-re az egér és a szarvasmarha esetében, azonban nem volt kimutatható a sertésembriókban, annak ellenére, hogy jelen volt a kapcsolódó RNS szekvenálási adatokban (21. ábra). Az ellentétes tendencia, azaz az ERSE és APE mintákban való magasabb expresszió a *Trip6*, *Dusp6*, *Lin28b*, *Jakmip2* és *Sema6A* expresszió esetében is megerősítést nyert (21. ábra). Ezután a KLF4, GJB5, TRIP6 és SEMA6A immunfestését végeztük el az ICM és ERSE stádiumú egér embriókon. A KLF4 és a TRIP6 nukleáris fehérjék, míg a GJB5 és a SEMA6A transzmembrán fehérjék. Az ICM sejtek egyértelműen kifejezték mind a GJB5, mind a KLF4 fehérjéket, míg az ERSE stádiumban az epiblasztban nem voltak kimutathatók (22. ábra). Ezzel szemben a SEMA6A expressziója gyenge volt az ICM sejtekben, és magas az ERSE stádiumú epiblasztban (22. ábra). Továbbá a TRIP6 mindkét stádiumban jelen volt (22. ábra), ahogy az a qPCR-adatok alapján várható volt. Összefoglalva, *in vivo* megerősítettük a transzkriptom-elemzés által kiemelt expressziós tendenciákat az elemzett géncsoportok esetében.



21. ábra: Újonnan azonosított pluripotencia-asszociált gének expressziójának vizsgálata qPCR-el szarvasmarha- (piros oszlopok), sertés- (kék oszlopok) és egérembriókban (zöld oszlopok): izolált ICM (csak egér esetében), teljes hólyagsíra (BLAST), ERSE és APE mintákon. Az expressziós értékeket a *Gapdh* expresszióhoz normalizáltuk (kék, Sus; piros, Bos; zöld, Mus). A hibasávok a standard eltérést jelentik (n=3) (Bernardo et al., 2018 alapján módosítva).

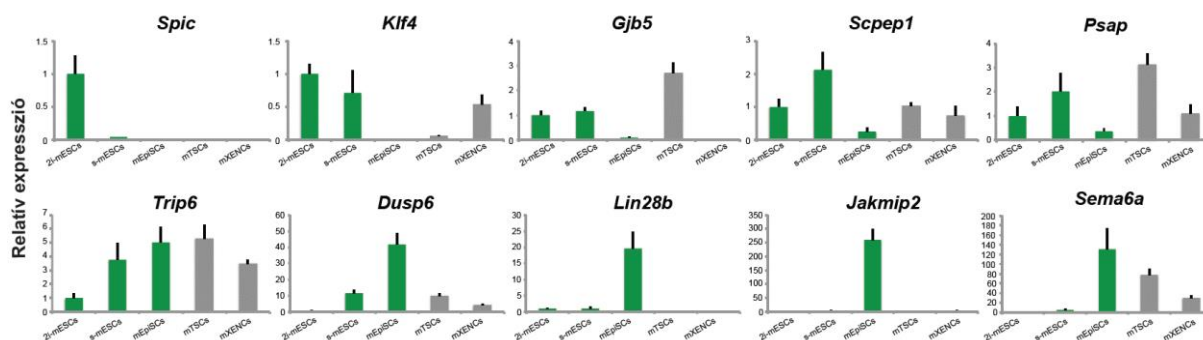


22. ábra: A GJB5, TRIP6 és SEMA6A immunfestése az POU5F1 (piros) pluripotencia markerrel együtt egér hólyagsíra és ERSE stádiumú reprezentatív embriókban. A DAPI sejtmagfestés kék színnel látható. A "P"-vel indexelt jobb oldali panelek az ERSE-embriók teljes vetületét mutatják. m, egér; ICM, belső sejtesomó; ERSE, radiálisan szimmetrikus epiblaszt (Bernardo et al., 2018 alapján módosítva).

4.4.5 Az újonnan azonosított gének a naiv/primed pluripotens állapot jelzőjeként használhatók

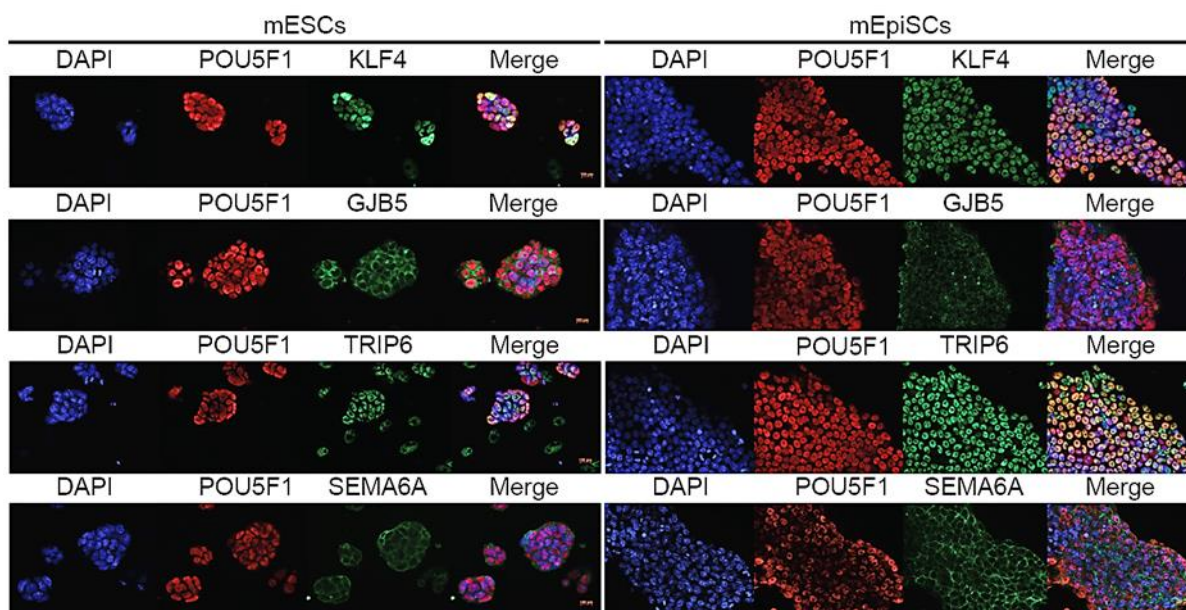
A következő kérdésünk az volt, hogy ezek a gének felhasználhatók-e a naiv/primed pluripotens állapot megkülönböztetésére, vagyis jelzőgénként használhatóak-e. Valós idejű qPCR-t végeztünk mESCs (2i médiumban vagy szérumban tenyésztett), mEpiSCs és további embrió eredetű őssejtvonalakban, azaz trofoblaszt (mTSCs) és primitív endoderma (mXENCs) őssejtekben (23. és 24. ábrák). 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. Ezek a gének az mTSCs és/vagy mXENCs esetében is jelentősen magas szinten expresszáldottak. Érdekes módon a *Spic* volt az egyetlen olyan gén,

amelynek expressziója a 2i-mESC sejtekre korlátozódott, így az 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 melkedett volt a szérum-mESC és erőteljes expressziót mutatott az mEpiSC sejtekben is. Ezért ezeknek a géneknek az alacsony expressziója az alapállapot jellemzőjének tekinthető. Végül a *Trip6* expressziója minden össejtben kimutatható volt, expressziója alig emelkedett (23. ábra).



23. ábra: Az újonnan azonosított pluripotencia-asszociált gének expressziós szintje qPCR vizsgálattal egér össejtben. Minták sorrendje: 2i-mESCs, szérum-mESCs (s-mESC); mEpiSCs; mTSCs; mXENCs. Az expressziós értékeket a *Gapdh* expressziójához normalizáltuk. A hibasávok a standard eltérést jelzik (n=3) (Bernardo et al., 2018 alapján módosítva).

Az immunfestés (24. ábra) megerősítette, hogy mind a GJB5, mind a KLF4 kifejeződik az egér ESC sejtekben, míg expressziójuk lecsökkent az mEpiSC sejtekben. Ezzel szemben a SEMA6A expressziója éppen az mEpiSC sejtekben magasabb. A TRIP6 viszont mindkét pluripotens ESC-stádiumban kifejeződik. Ezek az eredmények megerősítik a sejtvonalak qPCR elemzésének eredményeit. 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.



24. ábra: A KLF4, GJB5, TRIP6 és SEMA6A immunfestése a POU5F1 (piros) pluripotencia markerrel együtt 2i-mESC és mEpiSC sejtekben. A sejtmagokat DAPI festéssel tüntettük fel (kék szín). m, egér; ESC, embrionális össejt; EpiSC, epiblaszt össejt (Bernardo et al., 2018 alapján módosítva).

4.5 iPSC sejtek alkalmazása betegségmodellezésben

4.5.1 A betegségmodell genetikai háttere, a felhasznált iPSC vonalak

Ebben a vizsgálatban két olyan család került kiválasztásra, ahol a gyermekeknél MPS II rendellenességet diagnosztizáltak. Az egyik családban két fiú testvér (MPSII-1.3 és MPSII-2.5) és tünetmentes édesanyjuk (Ctrl-M.1) volt érintett, akik mindannyian az iduronát-2-szulfatáz gén patogén mutációját hordozták (NM_000202.7(IDS):c.85C>T). Ez az egy-nukleotid-variáció (SNV) egy korai terminációs (stop) kodont eredményez az iduronát-2-szulfatáz génben. Egy másik családból egy fiú gyermek (MPSII-4.1) volt érintett, akinél egy missense mutáció (NM_000202.7(IDS):c.182C>T) okozott MPS II tüneteket. Ezen kívül egy egészséges női önkéntes donor mintáját független kontrollként (Ctrl) használtuk. Az iPSC-vonalak előállítását (mintavételét, genetikai újraprogramozás) és pluripotencia jellemzését részletesen ismertettük és korábban publikáltuk (Varga et al., 2016a; Varga et al., 2016b; Varga et al., 2016c; Varga et al., 2016d).

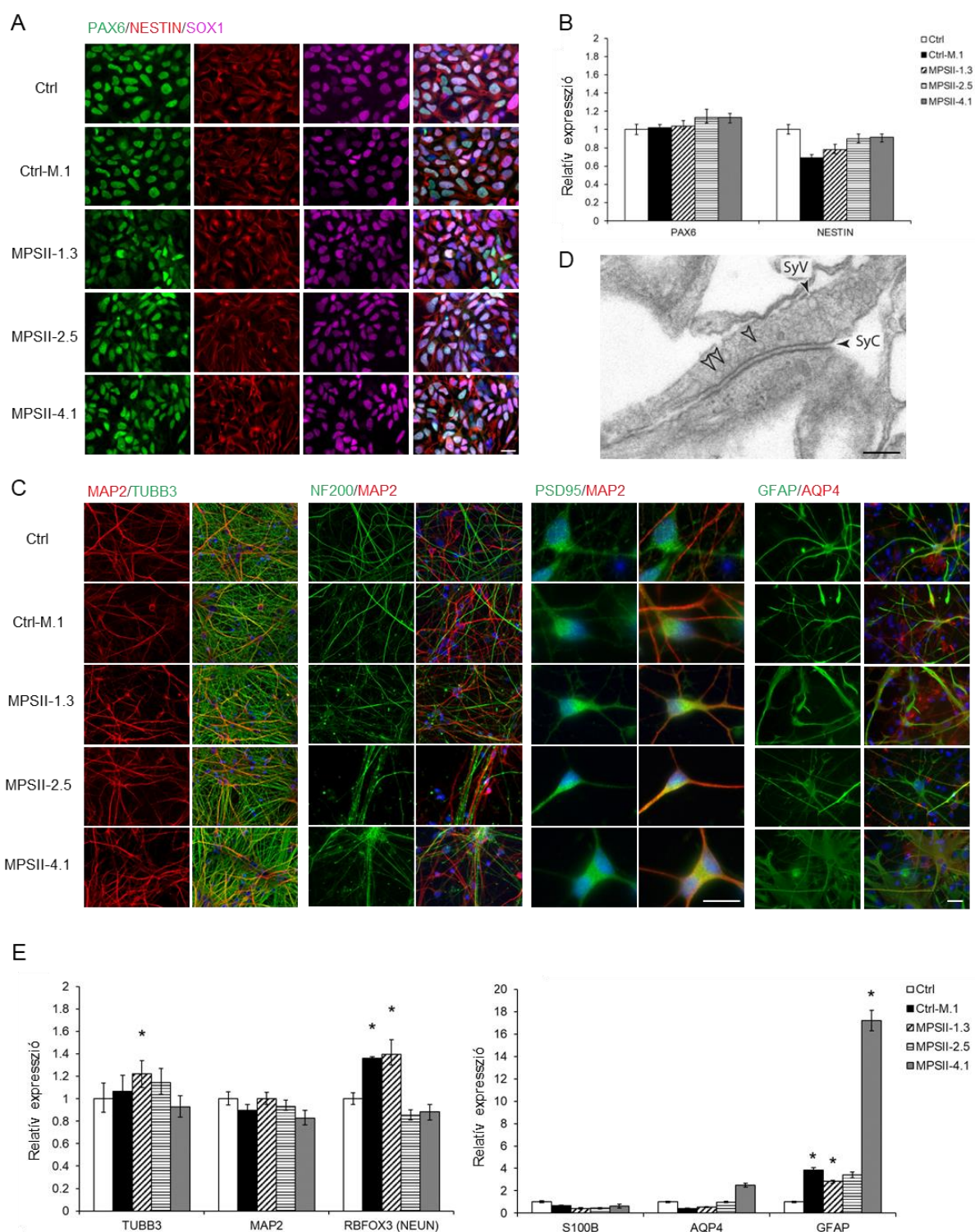
4.5.2 Az iPSC sejtvonalak neuronális differenciálódásának vizsgálata

A vizsgálatok legfőbb célja az MPS II betegség neuronális fenotípusának és patomechanizmusának *in vitro* vizsgálata volt egy összejtalapú modellben. Ezért első lépésként a sejtvonalak neuronális differenciálódási képességének igazolása volt szükséges, hogy vajon alkalmas modellrendszert biztosítanak-e a tervezett vizsgálatokhoz. Minden iPSC vonalat neuronális irányba differenciáltunk, és a különböző differenciálódási stádiumokat értékeltük. Először az NPC-stádiumot elemeztük a fő NPC-markerek (NESTIN, SOX1 (SRY-Box 1), PAX6 (Paired Box 6) expressziója alapján immuncitokémiával. A vizsgálat a korai passzázsookban (a 4-6 passzázsig) nem mutatott jelentős különbséget a kontroll és a betegséget hordozó sejtvonalak NPC populációi között (25. ábra A panel). Ezzel párhuzamosan qPCR kísérleteket végeztünk, amelyek a PAX6 és a NESTIN hasonló expressziós szintjét igazolták (25. ábra B panel).

Ezután az NPC-ket érett neuronokká differenciáltuk 5 hetes tenyésztés (TD35) során, majd elemeztük azokat. A terminális differenciálódás neuronhálózatok kialakulását eredményezte, ahol mind az egészséges, mind a beteg sejtek pozitívak voltak a Tubulin 3 (*Tubulin Beta 3 Class III*, TUBB3), a dendritikus marker MAP2 (*Microtubule-associated protein 2*, MAP2) és a 200kDa Neurofilament fehérje (*Neurofilament 200 kDa*, NF200) expressziójára. A neuronok expresszálták a posztzinaptikus denzitás fehérje 95-öt (PSD95), ami szinapszisok kialakulását jelezte (25. ábra C panel) minden sejtvonaltban. Ezt elektronmikroszkópiával is megerősítettük, ahol aktív szinapszisokat (dokkoló vezikulák a szinaptikus részben) azonosítottunk (25. ábra D panel). A neuronális differenciálódás során asztrociták is megjelentek, amelyek Gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP) és Aquaporin-4 (AQP4) expressziót mutattak (25. ábra C panel), függetlenül a sejtvonaltól.

A transzkriptomikai elemzés megmutatta, hogy a TUBB3 és a MAP2 neuronális markergének igen erőteljesen fejeződtek ki minden TD35 neuronális kultúrában. A terminális marker RNS-kötő Fox-1 Homolog 3 (*RBFOX3*, korábban *NEUN* néven is ismert), az asztrocitákban expresszálódó AQP4, az S100 kalciumkötő fehérje β (*S100\beta*) és a GFAP intenzíven expresszált a TD35 mintákban, ami alátámasztja a gliális vonal jelenlétét a neuronális kultúrákban (25. ábra E panel). A legmagasabb GFAP-expressziót az MPSII-4.1 mintában figyeltük meg, ami korrelált az ICC-kísérletekben kimutatott GFAP+ asztroglia sejtek magas arányával.

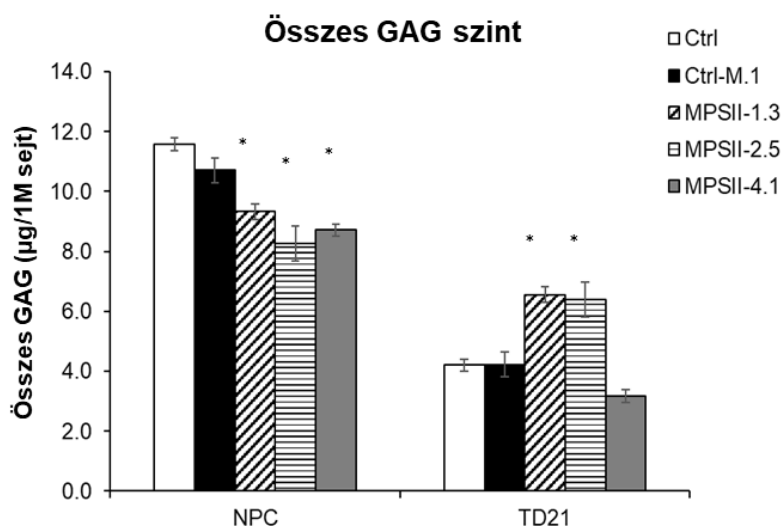
Összefoglalva, a kettős SMAD-gátlás által indukált neuronális indukció MPS II NPC-populációk kialakulását eredményezte, amelyek a kontrollal összehasonlítva normális proliferatív kapacitással rendelkeztek a korai passzázsookban, és lehetővé tették a neuronális és asztroglia differenciálódást, a kontroll vonalhoz hasonló transzkript- és fehérje-expressziós mintázattal. A TD35 stádiumig minden genotípusból sikeresen differenciálódott érett, szinaptikusan aktív neuronális populáció, amely a létrehozott modellrendszer alkalmasságát igazolta.



25. ábra: Kontroll és MPS II iPSC sejtekből származó NPC és TD35 neuronális kultúrák összehasonlítása. **A)** NPC sejtek immuncitokémiai jelölése, PAX6 (zöld) NESTIN (piros) és SOX1 (magenta) fehérjékre. A sejtmagokat DAPI festés jelöli (kék) (méretvonal = 20 μ m). **B)** A *PAX6* és *NESTIN* expresszió qPCR vizsgálata hasonló eredményt mutatott a korai passzázsú NPC-kben. Az értékeket a Ctrl sejtvonalhoz normalizált (1,0) relatív expresszióban ($\pm$ SEM) fejezzük ki (n=3); *p<0,05. **C)** A TD35 neurontenyészetek immuncitokémiai jelölése TUBB3 (zöld)/MAP2 (piros), NF200 (zöld)/MAP2 (piros), PSD95 (zöld)/MAP2 (piros) és GFAP (zöld)/AQP4 (piros) fehérjék expressziójára. A sejtmagokat DAPI-val jelöltük (kék) (méretvonal = 20 μ m). **D)** Reprezentatív ultrastrukturális morfológiai kép egy aktív szinapszisoról Ctrl TD35 neuronokban. Szimmetrikus szinapszis, felhalmozódó szinaptikus vezikulákkal (SyV) a preszinaptikus terminálban és elektronsűrű anyaggal a szinaptikus résben (SyC). Az aktív zónát a dokkoló szinaptikus vezikulák jelzik (fehér nyílhegyek) (méretvonal = 100 nm). **E)** Neuronális markergének expressziója a beteg és kontroll iPSCs-eredetű TD35 neuronális kultúrákban, qPCR vizsgálattal. Az értékek a Ctrl-hoz normalizált (1,0) relatív expresszióban ($\pm$ SEM) fejezzük ki (n=3), azonban az y-tengely értékei eltérőek! *p<0,05 (Kobolák et al., 2019 alapján módosítva).

4.5.3 A GAG felhalmozódás és LAMP2 expresszió Az MPS II neuronális sejtekben

Az IDS enzimhiány a glikozaminoglikánok (GAG) progresszív felhalmozódását okozza az MPS II betegek sejtjeiben (Platt et al., 2012). Ezért megvizsgáltuk, hogy ez a fenotípus megfigyelhető-e *in vitro* őssejt modellünkben is. Mind az NPC-k, mind a terminálisan differenciálódott neuronok teljes GAG-szintjét megmértük, és mindhárom MPS II NPC-kultúra alacsonyabb teljes GAG-szintet mutatott ($p < 0,05$) a kontroll és a hordozó (Ctrl-M.1) sejtvonalakhoz képest (26. ábra). Ezzel szemben jelentős GAG-felhalmozódást észleltünk az MPSII-1.3 és MPSII-2.5 betegek neuronjaiban ($p < 0,05$), míg az MPSII-4.1 és Ctrl-M.1 neuronok nem különböztek szignifikánsan a Ctrl-sejtvonaltól ($p < 0,05$) (27. ábra).

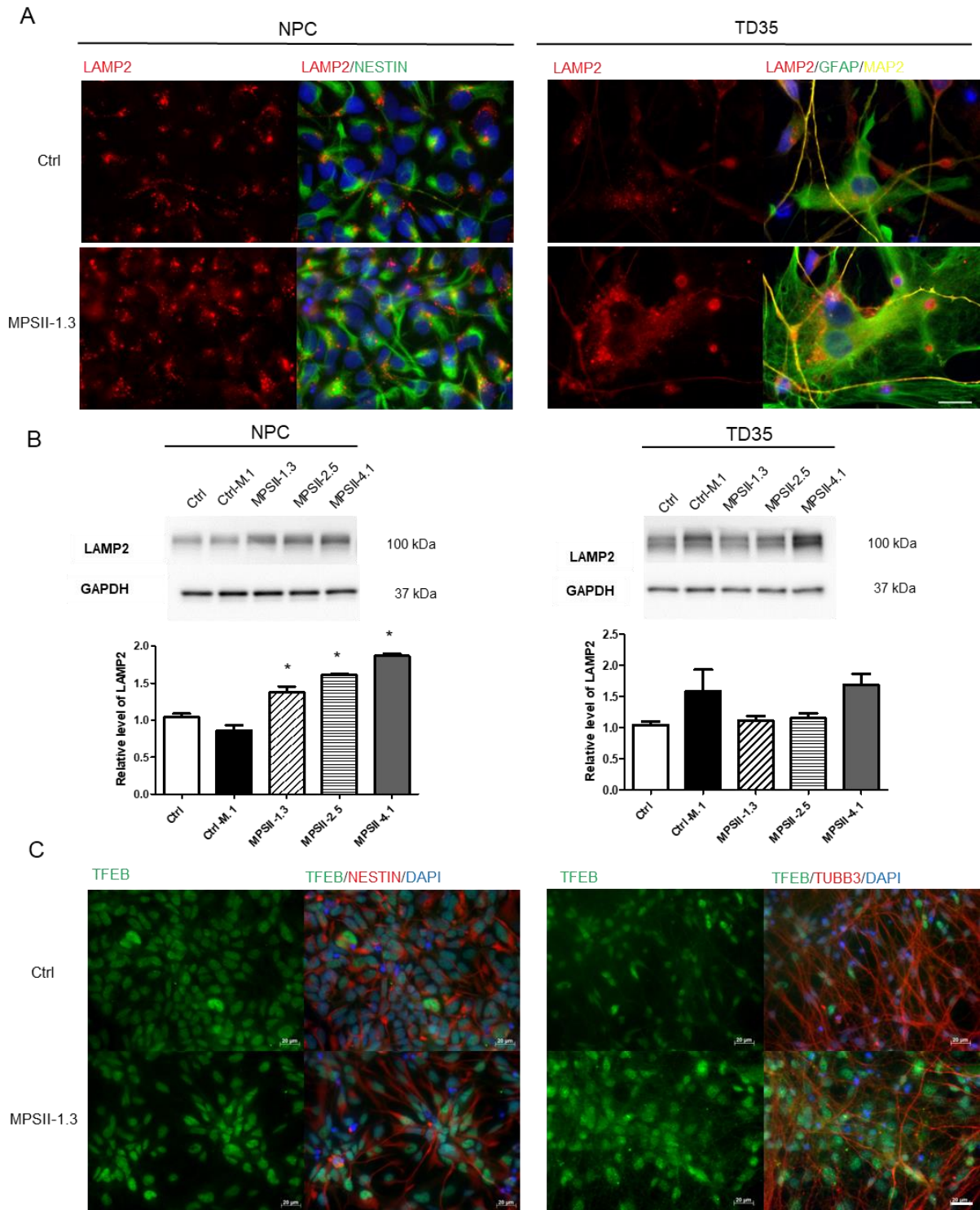


26. ábra: Az összes GAG mennyisége az NPC- és neurontenyészetekben (TD21) a beteg és kontroll mintákban. Az ábrán az összes GAG-szintet ábrázoltuk μg -ban, 1×10^6 sejtre normalizálva. Az adatokat átlag ($\pm$ SEM) értéként adtuk meg ($n=4$). * $p < 0,05$; NPC, neurális prekursor sejt; TD, terminális differenciáció (Kobolák et al., 2019 alapján módosítva).

A lizoszómák felhalmozódása kimutatható volt, amikor a lizoszóma-asszociált membrán glikoprotein 2 (LAMP2) immunfestést végeztünk a neurontenyészeteken (27. ábra A panel). Sejttípus-specifikus különbséget észleltünk a TD35 betegek mintáiban, a GFAP+ asztrocitákban sokkal több LAMP2+ vakuolumot találtunk, mint a MAP2+ neuronokban (27. ábra A panel). A LAMP2 mennyiségét számszerűsítő Western-blot analízis az MPS II NPC-kben fokozott LAMP2-expressziót mutatott ki (27. ábra B panel). A TD35 neurontenyészetekben azonban csak az MPSII-4.1 sejtvonalonban észleltünk szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$), ahol a GFAP expresszióját találtuk a legerősebbnek qPCR és immuncitokémiai vizsgálatokban (27. ábra C és E panel).

Ezután megvizsgáltuk, hogy az TFEB (Transcription Factor EB) expressziója és szubcelluláris lokalizációja megváltozik-e az érintett sejtekben. Amikor TFEB immunfestést végeztünk NPC-ken, a betegből származó NPC-k gyakrabban mutattak fokozott TFEB jelet a sejtmagjukban, mint a kontrollok (Ctrl, Ctrl-M.1), ami a fehérje nukleáris transzportjának jele (27. ábra C panel). A TD35 neuronális kultúrák a TFEB lokalizációjának vizsgálatakor hasonló eredményeket adtak, mint korábban az NPC-kultúrák (27. ábra C panel).

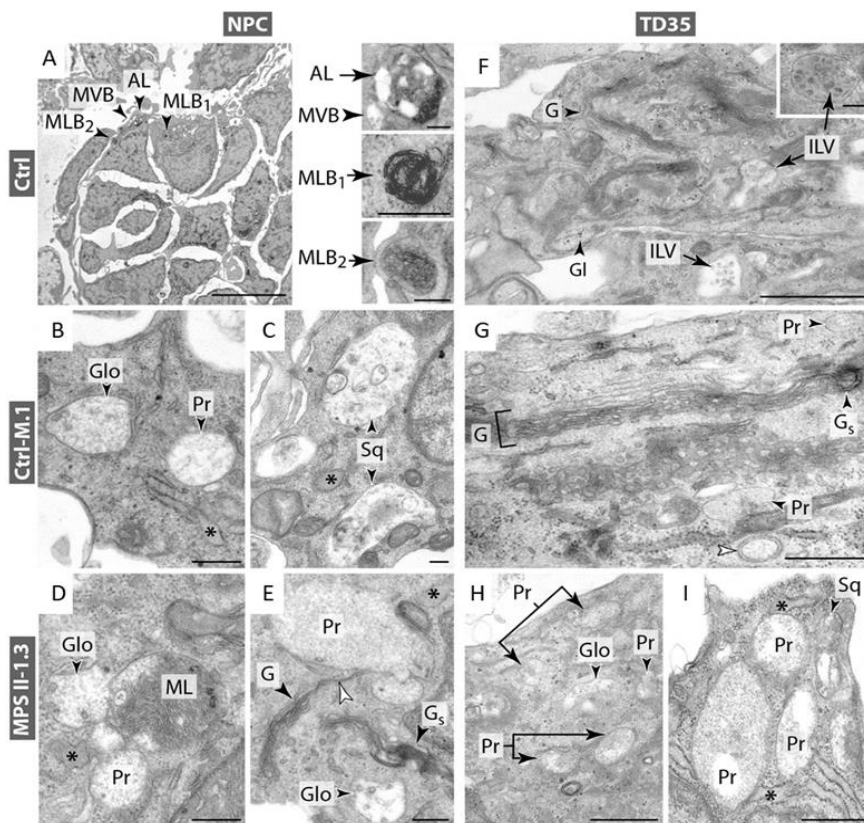
Ezek az adatok együttesen abba az irányba mutatnak, hogy mind a GAG-ok, mind a LAMP2+ vakuolumok felhalmozódnak az MPS II iPSC sejtekből differenciáltatott neuronális sejtekben, ahol mennyiségüket tekintve különbségek mutathatók ki az osztódó NPC-k és a terminálisan differenciált, már posztmitotikus neuronális kultúrák, különösen a GFAP+ asztrociták között.



27. ábra: LAMP2 és TFEB expresszió az MPS II neuronális sejtekben. **A)** Az NPC-k és TD35 neuronális kultúrák reprezentatív LAMP2 (piros) immunfestése NESTIN-nel (zöld) vagy MAP2-vel (sárga), illetve GFAP-val (zöld) kombinálva, az MPS II beteg (MPSII-1.3) neuronális sejteiben fokozott LAMP2 pozitív vakuolum-felhalmozódást mutatott, a GFAP pozitív asztrocitákban pedig szembetűnő felhalmozódást detektáltunk. A sejtmagokat DAPI-val (kék) jelöltük (méretvonal = 10 μ m). **B)** A Western blot elemzés megerősítette a LAMP2 fehérjeexpresszióját az NPC és TD35 sejtlizátumokban. A jeleket a GAPDH-ra normalizáltuk, az adatokat átlag ($\pm$ SEM) értékben adtuk meg (n=3). * $p < 0,05$). **C)** NESTIN-nel (piros) együtt jelölt NPC-k és TUBB3-mal (piros) együtt jelölt TD35 neuronális kultúrák reprezentatív TFEB immunfestése (zöld), amely a TFEB domináns nukleáris lokalizációját mutatja az MPS II sejtekben (MPSII-1.3 sejtvonal) (méretvonal = 20 μ m). A sejtmagokat DAPI-val (kék) jelöltük (Kobolák et al., 2019 alapján módosítva).

4.5.4 A tároló vakuolumok felhalmozódása és ultrastrukturális deformációk az MPS II neuronális sejtekben

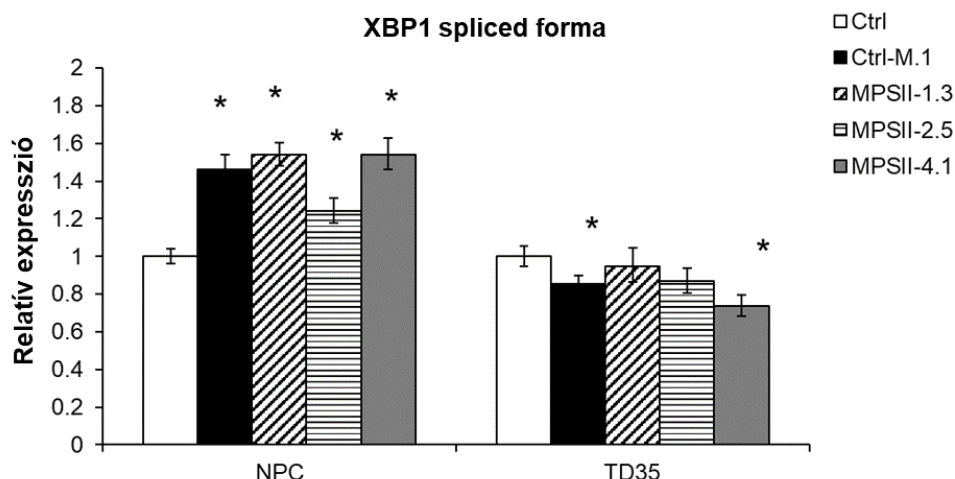
Ezután az MPS II-ben érintett sejtek citopatológiai jellemzője, a tároló vakuolumok felhalmozódása került analízisre ultrastrukturális szinten az MPS II iPSC sejtekből differenciáltatott neuronális sejtekben. Az elektronmikroszkópos technikák a tároló vakuolumok erőteljes felhalmozódását mutatták ki minden MPS II NPC-kultúrában (28. ábra A-E panelek). Váratlanul az egészséges hordozó Ctrl-M.1 mintában is kimutathatóak voltak tárolási vakuolumok (28. ábra B és C panel), bár az érintett sejtek száma sokkal alacsonyabb volt, mint a beteg mintákban (28. ábra D és E panel). A tároló vakuolumok minden típusa kimutatható volt a hordozó Ctrl-M.1 és MPS II betegek TD35 neurontenyészetében is (28. ábra G-I panelek). Emellett számos durva felszínű endoplazmatikus retikulumot (RER), illetve Golgi morfológiai elváltozást is észleltünk (RER: tágult ciszternák, riboszómamentes, duzzadt, globuláris végződésű ciszternák; Golgi: töredezett ciszternákat, nyársszerű motívumokat, hagymás halmokat, vakuolizáció). Tudomásunk szerint a mi vizsgálatunk az első, amely dokumentálja mind az ER-, mind a Golgi-stressz morfológiai jellemzőit az MPS II betegekből származó neuronális sejtekben.



28. ábra: NPC és TD35 neurontenyészetek ultrastrukturája MPS II betegségben. **A)** Egymáshoz kapcsolódó Ctrl NPC sejtek ultrastrukturája. Az „A” panel beillesztései: autoliszoszóma (AL), multivezikuláris test (MVB) és kétféle multilamelláris test (MLB1, MLB2) látható a sejtekben. **B-E)** Raktározó vakuolumok a Ctrl-M.1 és MPSII-1.3 NPC-kben: primer (Pr, B panel, D, E panel), globuláris (Glo, B panel, D, E panel), multilamelláris (ML, D panel) és szekvesztrált (Sq, C panel) típusok. Rövid ciszternákkal (G) és nyársszerű deformációval (Gs) rendelkező Golgi-halmok és primer vakuólum (fehér nyílhegyek) láthatók az E panelben. **F)** Az egészséges Ctrl TD35 kultúrában lévő asztrogliaon glikogén granulák (Gl), három Golgi-halomból (G) álló Golgi-szalaggal rendelkező Golgi-terület és belső vezikulákat (ILV) körülvevő endoszómális elemek láthatók. A mellékelt képen sűrű intraluminális vezikulákkal (ILV) teli multivezikuláris test látható. **G)** A Ctrl-M.1 TD35 kultúra neuronja jól fejlett Golgi szalagnál (G) primer vezikulákat (Pr) tartalmaz. A jobb oldali Golgi-köteg nyársszerű deformációt mutat (Gs). A fehér nyílhegy fagosomát jelez. **H-I)** MPSII-1.3 TD35 kultúra tároló vakuolumai. Elsődleges (Pr, H, I panel), globuláris (Glo, H panel) és szekvesztrált (Sq, I panel) tároló vakuolumok mutathatók ki asztrogliaiban (H panel) és egy neuronban (I panel). Az érintett NPC- és TD-sejtekben gyakran láthatóak megduzzadt RER-ciszternák (fekete csillag A, B, C, D, E, I panelben) (méretvonal: A: 10 μ m, F: 2 μ m, H és I: 1 μ m, B, C, D, E, G, az A paneleken lévő betétek: 500 nm, az F panel betéte: 200 nm) (Kobalak et al., 2019 alapján módosítva).

4.5.5 Az ER-stressz és autofágia aktiváció szerepe az MPS II fenotípusban

Ezután azt vizsgáltuk, hogy kimutatható-e a beteg és kontroll NPC és TD sejtekben az endoplazmatikus retikulum (ER) stressz XBP1-próbával. Ez a próba azon a megfigyelésen alapul, hogy az ER-ben felhalmozódott, ki nem csomgolt fehérjék felhalmozódása esetén az X-box binding protein 1 mRNS-ből egy 26 nukleotidból álló fragmentum ((XBP1(U)) egy speciális splicing-mechanizmus révén eltávolításra kerül (Yoshida et al., 2001). Ez a rövidebb mRNS ((XBP1(S)) az ER-stressz gyakran használt markere. Először az XBP1(S) qPCR vizsgálatát végeztük el a korábban leírt eljárás szerint (van Schadewijk et al., 2012). Érdekes módon az összes MPS II és a hordozó NPC a kontrollhoz képest megnövekedett XBP1(S) szintet mutattak ($p < 0,05$), míg a TD35 neuronokon eltérő expressziós mintázat volt megfigyelhető (29. ábra).

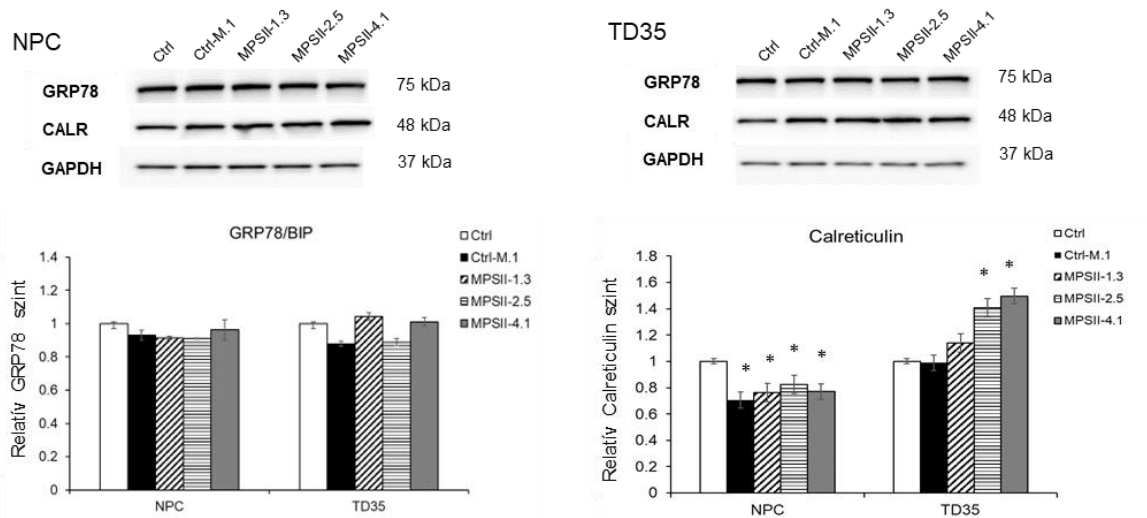


29. ábra: Az XBP1(S) qPCR vizsgálata iPSC sejtekből differenciált NPC és TD35 mintákban. Az értékeket az NPC-kontrollhoz (Ctrl sejt vonal) normalizált relatív expresszió (*relative expression*) átlagában ($\pm$ SEM, $n=4$) fejeztük ki. NPC, neuronális prekursor sejt; TD, terminális differenciáció; Dunnett-tesztet végeztünk a csoportok szignifikanciájának értékelésére a kontrollhoz képest (* $p < 0,05$) (Kobolák et al., 2019 alapján módosítva).

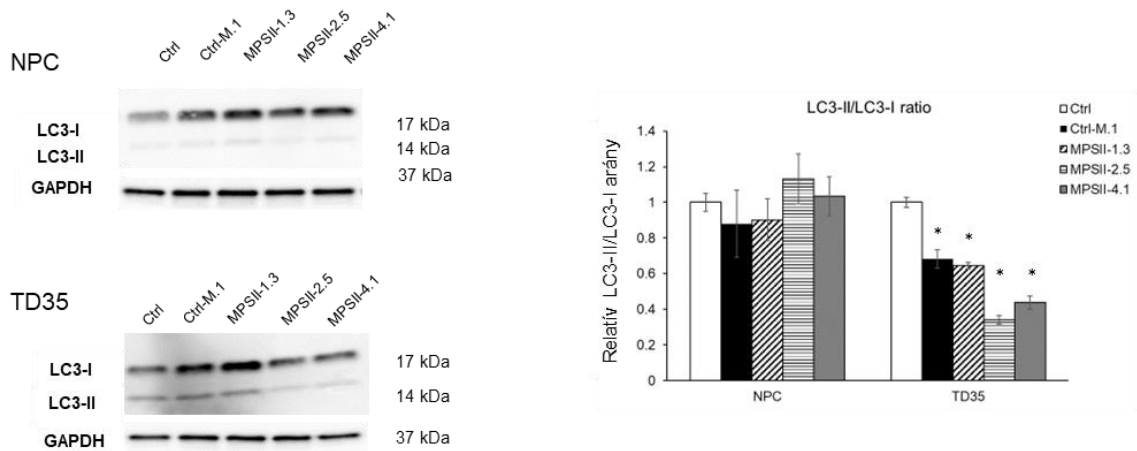
Amikor a sejtliázumokat Western-blot segítségével vizsgáltuk, a kalretikulín (CALR) expressziós szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollhoz képest ($p < 0,05$) az összes MPS II által érintett NPC mintában. Ezzel szemben, szintje szignifikánsan megnövekedett két MPS II TD35 neurontenyészetben is (30. ábra A panel). A GRP78/BIP fehérje expressziós mintázatában azonban nem volt szignifikáns különbség sem az NPC minták, sem a TD35 minták egyikében sem (30. ábra A panel). Összefoglalva, az XBP1 megfigyelt betegségspecifikus splicing mintázata az NPC stádiumban és az emelkedett kalretikulín expresszió az ER-stressz részvételére utal az MPS II citopatológiában, vélhetően stádium specifikus módon.

Ezután az autofágoszóma-markerek aktiválódását vizsgáltuk, hogy vajon a felhalmozódott tároló vakuolumok és a deformált Golgi-struktúrák képesek-e autofágiát indukálni a sérült sejtorganellek eltávolítására. A Western-blot mind az LC3-I, mind az LC3-II állandó, alacsony szintjét mutatta ki az NPC sejtekben (osztódó prekursor sejtek), a sejt vonalak között nem volt szignifikáns különbség (30. ábra B panel). Ezzel szemben a TD35 neurontenyészetekben a Ctrl-M.1 és az MPS II beteg mintákban szignifikánsan magasabb LC3-I expressziót mutattak, mint a Ctrl tenyészetek. Az LC3-II forma szintje azonban szignifikánsan magasabb volt a hordozó sejt vonalban és az MPSII-1.3 beteg mintájában, míg az MPSII-2.5 és az MPSII-4.1 TD35 kultúrákban megegyezett a Ctrl mintával (30. ábra A panel). Megállapítottuk, hogy az LC3-I/LC3-II arány szignifikánsan alacsonyabb volt az MPS II-vel érintett TD35 sejt kultúrákban, mint a Ctrl-ban (30. ábra A panel). Ezek az adatok együttesen azt jelzik, hogy MPS II betegség vizsgált IDS mutációi befolyásolták az autofágiát a neuronális sejt típusokban, a differenciáltsági állapottól függően, eltérő mértékben.

A



B



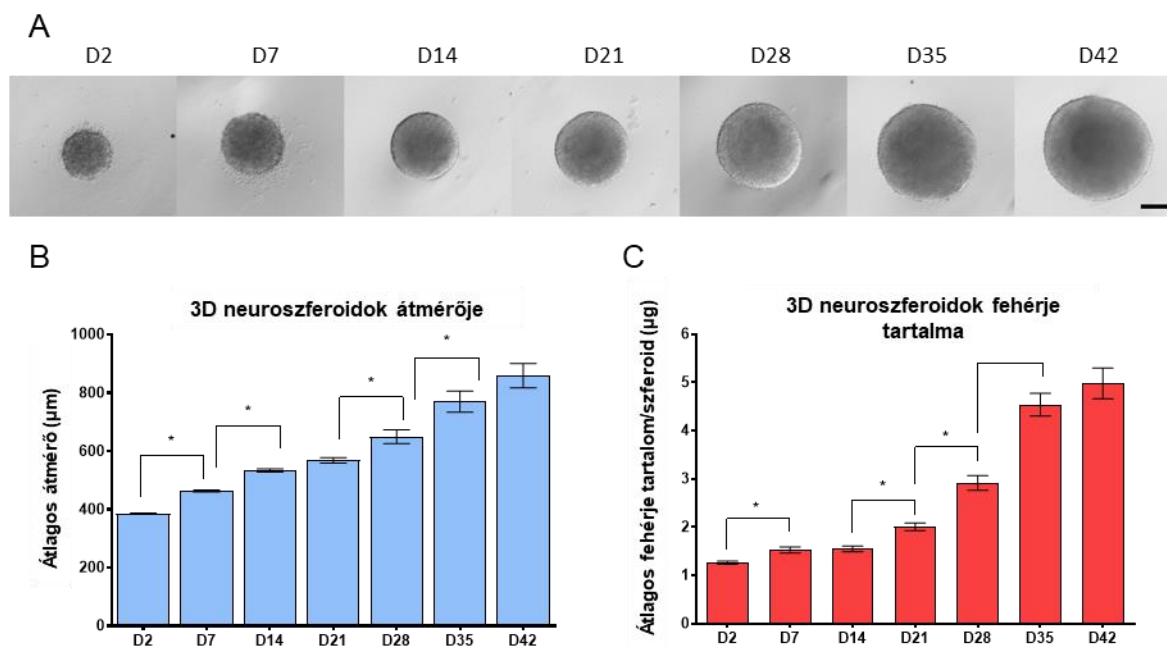
30. ábra: Endoplazmatikus retikulum (ER) stressz és autofágia MPS II neuronális kultúrákban. A) Western-blot elemzés a GRP78, Calreticulin, B) LC3-I és LC3-II fehérjékről NPC és TD35 mintákban. Az LC3-II/LC3-I arányt oszlopdiagrammon mutatjuk be. A jeleket a GAPDH-ra normalizáltuk, a Ctrl értékét 1-nek vettük, az adatokat átlag ($\pm$ SEM; $n=3$) értékben mutatjuk be (* $p<0,05$) (Kobolák et al., 2019 alapján módosítva).

4.6 Össejt alapú 3D neuroszferoidok toxikológia alkalmazása

4.6.1 Az össejt-eredetű 3D neuroszferoid differenciálódás jellemzése

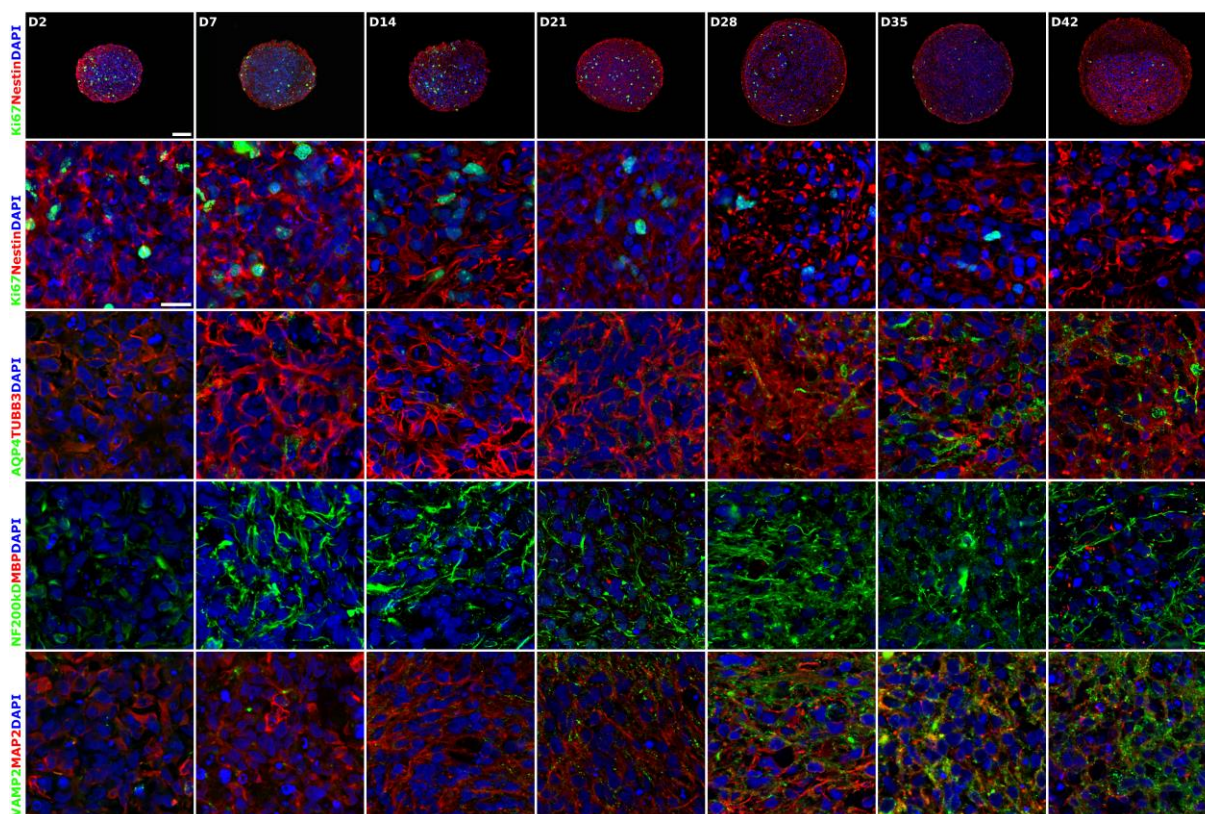
Első célkitűzésem a hiPS-eredetű, szuszpenziós kultúrában tenyésztett, szabadon lebegő 3D neuroszferoidok időbeli differenciálódásának részletes jellemzése volt. A kiindulási neuronális progenitor (NPC) populáció, amelyet hiPSC sejtek neuronális indukciója során nyerhetünk, 2D hagyományos sejtenyésztésben történő neuronális differenciálódási képességét korábban laboratóriumunk átfogóan jellemezte és megmutatta, hogy képesek agykérgi neuronokká és gliasejtekké differenciálódni és neuronális hálózatot alkotnak (Zhou et al., 2016; Chandrasekaran et al., 2017). Jelen kísérletben a differenciálódást 3D tenyésztési rendszerben vizsgáltam 6 hét (42 nap) differenciálódási időtartam alatt.

Szuszpenziós kultúrában a két mitogén, az EGF és a bFGF megvonásával az NPC-k 48 órán belül kompakt 3D aggregátumokat, úgynevezett neuroszferoidokat képeznek (31. ábra A panel). A struktúrák növekedését az egyes szferoidok átmérőjének és teljes fehérjetartalmának mérésével vizsgáltam. Az eredmények a szferoidok folyamatos növekedését mutatták a hathetes tenyésztési időszak alatt, az átmérő és a fehérjetartalom növekedése tekintetében (31. ábra B és C panelek). 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 (31. ábra B és C panelek).



31. ábra. A 3D neuroszferoidok növekedése a hathetes differenciáltatás során. A) 3D neuroszferoidok reprezentatív mikroszkópos képe a 6 hét alatt (4x, méretvonal = 200 μm). B) 3D szferoidok átlagos átmérője μm-ben (n=3). C) A szferoidok átlagos összfehérje tartalma μg-ban kifejezve (n=3). A grafikonokon átlag (±SEM) értékek szerepelnek (*p<0.05) (Kobolák et al., 2020 alapján módosítva).

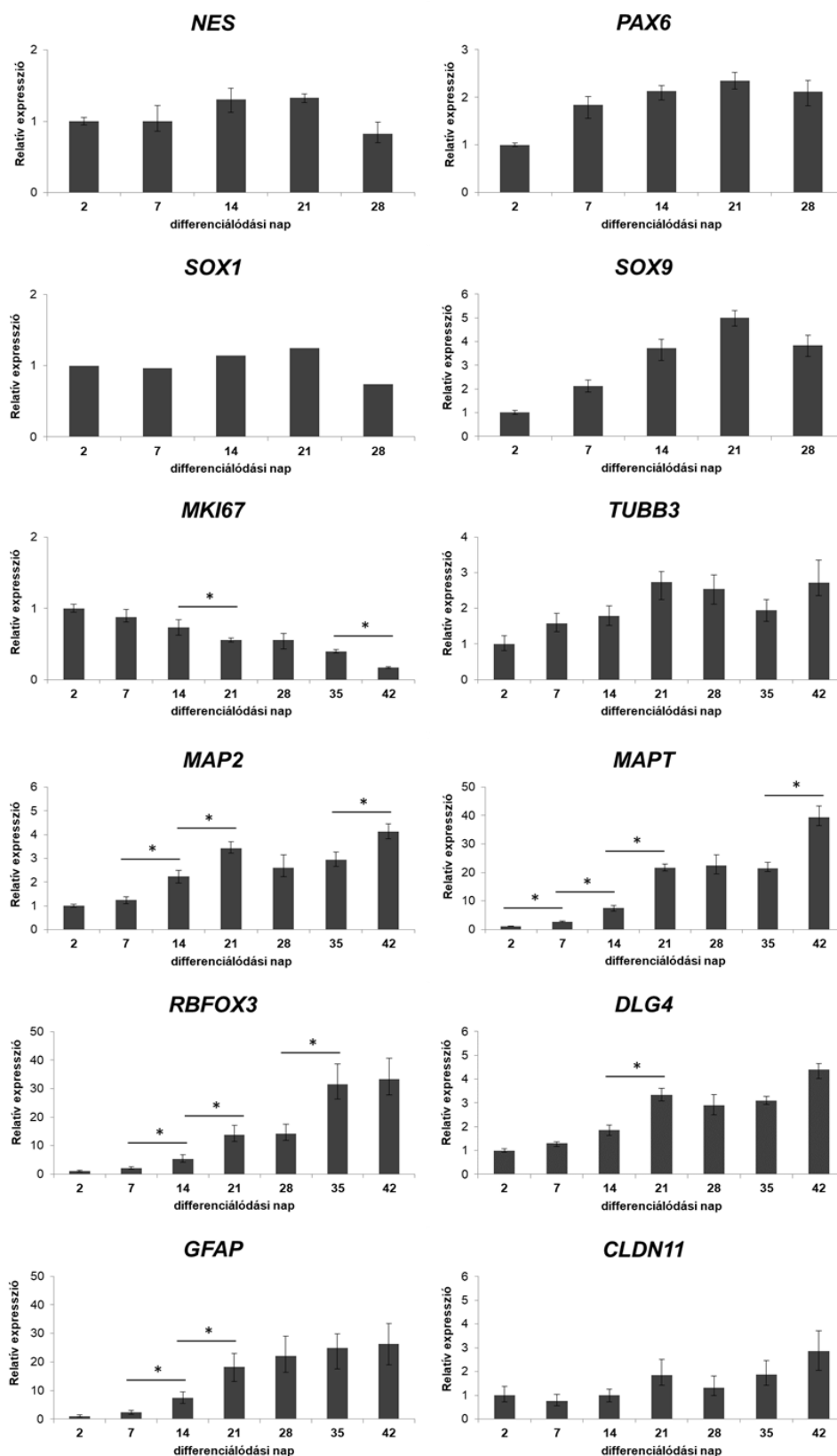
Ez a megfigyelés összhangban volt az osztódó sejtek arányát jelző Ki-67 (MKI67) sejtproliferációs marker expressziójával, amelyet fehérjeszinten immuncitokémiával (32. ábra felső két sor), vagy transzkripció szinten qPCR-rel (33. ábra) került elemzésre. A Ki-67 expressziója és a Ki-67-pozitív sejtek száma a D2 és D7 mintákban volt a legmagasabb, amely a differenciálódási időszak során folyamatos csökkenést mutatott (32. és 33. ábra). A kialakuló 3D sejtaggregátumok elsősorban a korai neuronális markereket, mint a PAX6, NESTIN és SOX1 expresszálták, amelyek expressziója az érés során az idő előrehaladtával csökkent (qPCR, 33. ábra). Fontos megjegyezni, hogy sem a szferoidok közepén, sem más területeken nekrotikus régiók nem jelentek meg; még a szferoidok legnagyobb átmérője sem érte el átlagosan a 800 μm-t a 6 hetes (D42) mintákban (31. ábra).



32. ábra: A 3D szferoidok immuncitokémiai elemzése. A szferoidokat rögzítettük és krioszekcionáltuk, majd hetente immunfestettük D2-től D42 stádiumig. Az első sor a krioszekcionált szferoidok áttekintését mutatja, míg a panel többi része nagyobb nagyításokat mutat. A proliferáció (Ki-67), a neurális őssejtek (NESTIN), a neuronális differenciálódás (TUBB3 és MAP2), a dendritok és axonok köztes filamentuma (NF200), a neuronok szinaptikus vezikulái (VAMP2), az asztrocita (AQP4) és oligodendrocita (MBP) specifikus fehérjék releváns markereit festettük. A fehérjék nevének azonosítóit a másodlagos ellenanyaghoz kötött fluorofór színét jelölő színekkel jelöltük (zöld, Alexa-488; piros, Alexa-594). A sejtmagokat DAPI-val festettük (kék). (méretvonal = 100 μ m (első sor) és 25 μ m) (Kobolák et al., 2020 alapján módosítva).

A génexpresszió heti vizsgálata a neuronális differenciálódás folyamatos előrehaladását és az érési markerek, mint például a Mikrotubulus-asszociált protein 2 (MAP2), a Mikrotubulus-asszociált protein tau (MAPT), vagy az RNS-kötő Fox-1 Homolog 3 (RBFOX1, más néven NeuN) szintjének növekedését mutatta (34. ábra), amelyek összhangban voltak a 3D szferoidok immuncitokémiai vizsgálataival (MAP2 és Neurofilament 200 kDa; NF200) (33. ábra), valamint az intenzív fehérje növekedési adatokkal (32. ábra).

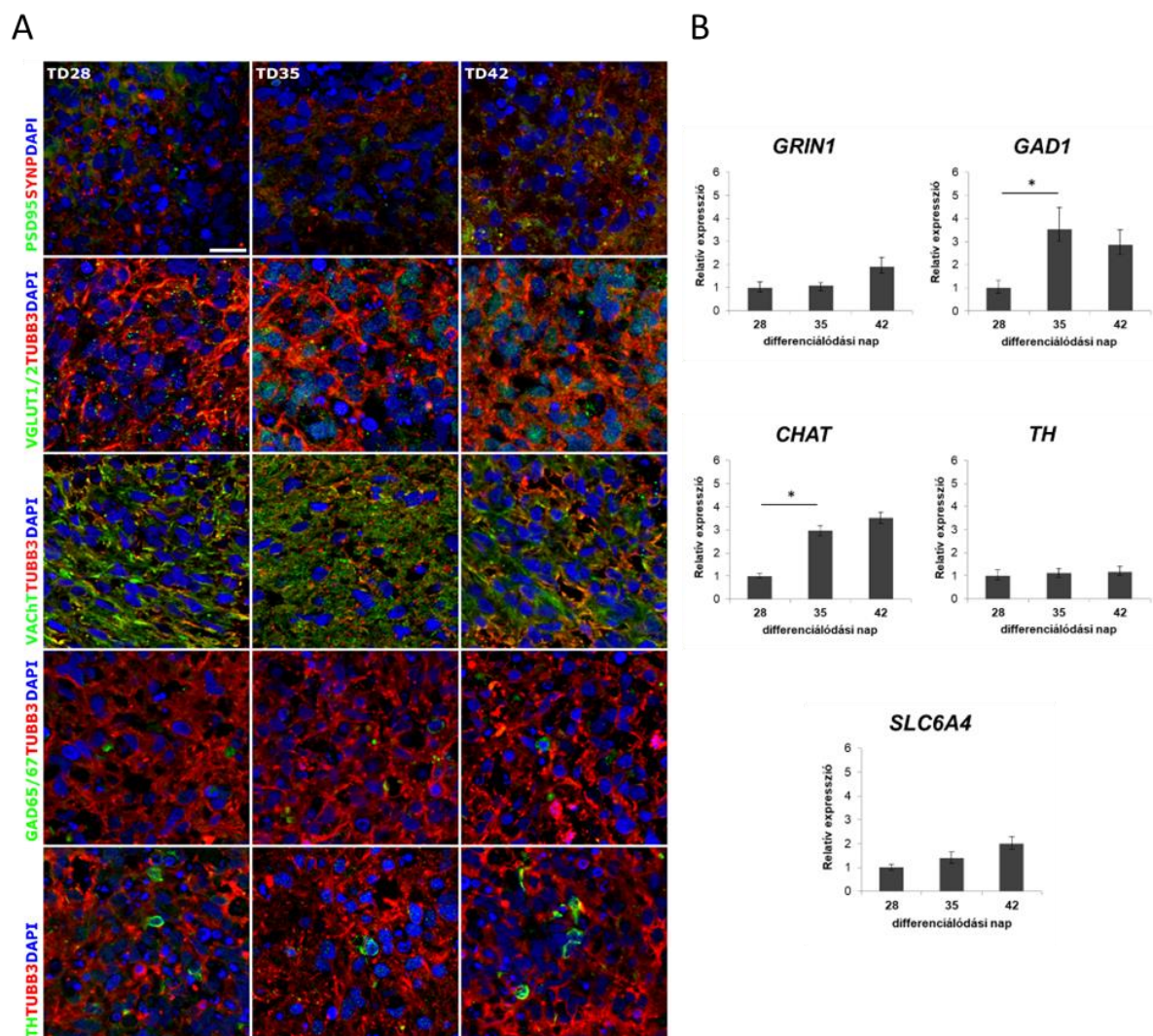
A terminális differenciálódás neuronhálózatok és szinapszisok kialakulását eredményezte a D28-as stádiumtól kezdve, a posztzinaptikus marker PSD95 (új nevén DLG4, Discs Large MAGUK Scaffold Protein 4) (34. és 35. ábra), valamint a fő szinaptikus vezikuláris fehérje p38, a szinaptofizin (SYNP) és a Vesicle-associated membrane protein 2 (VAMP2) (33. és 34. ábra) expressziója megjelent az érő neuronokban.



33. ábra: A releváns markerek valós idejű PCR-mérései a szferoidok neuronális differenciálódása során. A grafikonok az egyes génekre vonatkozó normalizált relatív expressziós értékeket átlagát ($\pm$ SEM) mutatják a D2 minta expresszióját 1-nek tekintve ($n=3$) (* $p<0,01$). Az y-tengely skálái eltérőek (Kobolák et al., 2020 alapján módosítva).

A neuronális altípusokat a glutamaterg (VGLUT1/2), GABAerg (GAD65/67), kolinerg (VACHT) és dopaminerg (TH) neuronok expressziójának megjelenése igazolta mind génexpressziós (qPCR) mind pedig fehérje expressziós szinten (immuncitokémia) (vizsgált

gének/fehérjék: GRIN1: Glutamát ionotróp receptor NMDA típusú alegység 1; GAD1: Glutamátdekarboxiláz 1; CHAT: kolin O-acetiltranszferáz; TH: tirozin-hidroxiláz; SLC6A4: Solute Carrier Family 6 Member 4) (34. ábra). Ezen markerek expressziója főként a D28 stádiumtól volt kimutatható, és fokozatosan növekedett a differenciálódás utolsó vizsgált időpontjáig (D42), összhangban az érési folyamattal. Fontos megjegyezni, hogy a dopaminerg neuronok spontán differenciálódása ritka volt a tenyészetekben; csak néhány TH-pozitív sejtet sikerült azonosítani (34. ábra).



34. ábra. A neuronális altípusok immuncitokémiai és qPCR kimutatása 3D neuroszferoidokban. **A)** A szinapszisok jelenlétét a PSD95 posztszinaptikus marker és a szinaptikus fehérje, a szinaptofizin (SYNP) kettős festése jelöli. A fejlődő 3D neuroszferoidokban D28-tól kezdve glutamaterg (VGLUT1/2), GABAerg (GAD65/67), kolinerg (VACHT) és dopaminerg (TH) neuronokat mutattunk ki. Minden mintát TUBB3-mal festettünk a neuritok jelölésére. A fehérjék nevének azonosítóit a másodlagos ellenanyaghoz kötött fluorofór színét jelölő színekkel jelöltük (zöld, Alexa-488; piros, Alexa-594). A sejtmagokat DAPI-val festettük (kék). (méretvonal = 25 μm). **B)** A grafikonok az egyes génekre vonatkozó normalizált relatív expressziós értékeket átlagát (±SEM) mutatják a D28 minta expresszióját 1-nek tekintve (n=3) (*p<0,01). Az y-tengely skálái eltérőek (Kobolak et al., 2020 alapján módosítva).

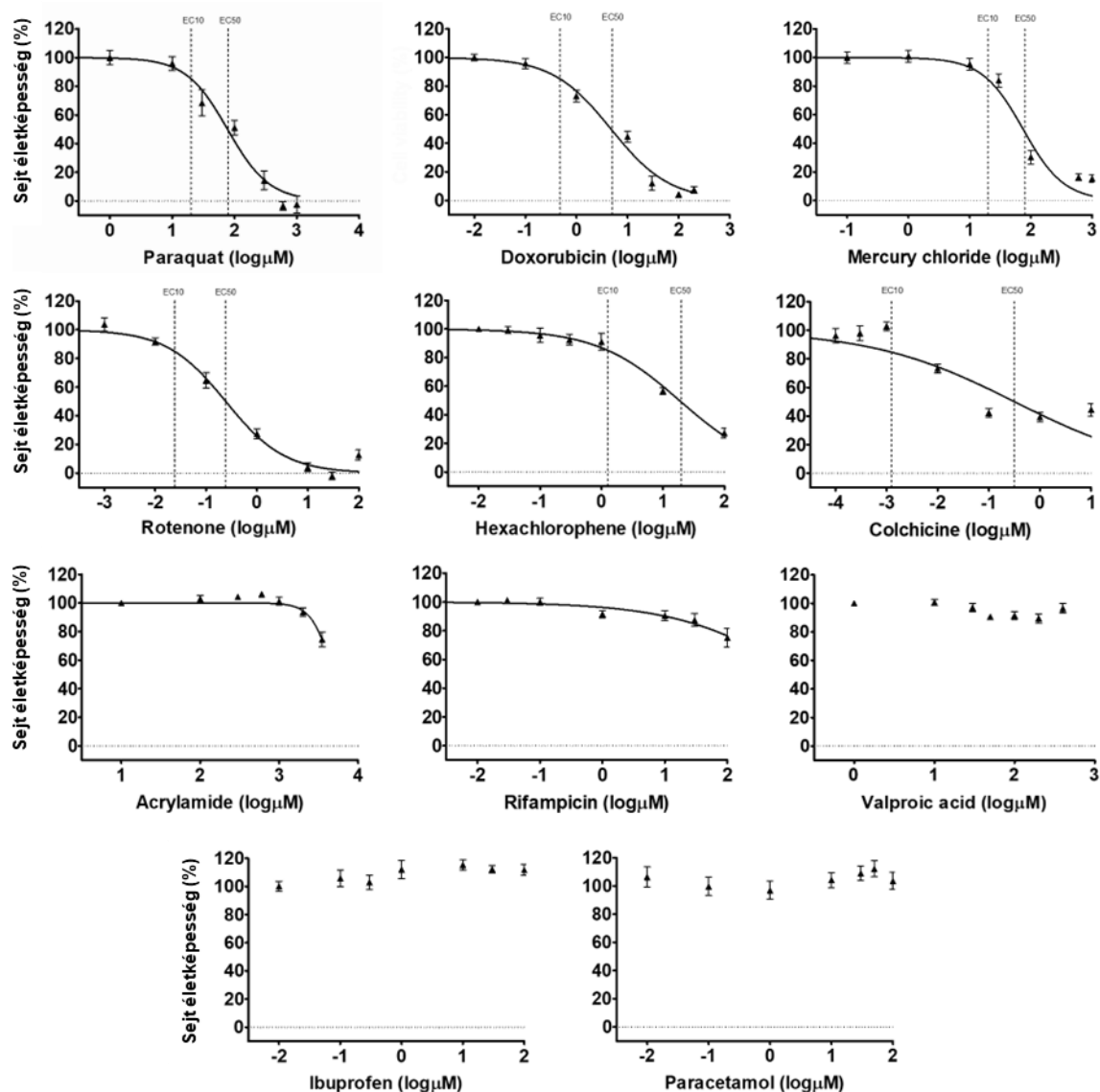
A neuronális differenciálódás során az asztrociták a 2. hét után kezdtek kialakulni, az Aquaporin-4 (AQP4) vagy a gliafibrilláris savas fehérje (GFAP) mRNS- és fehérjeszintű expressziója alapján (33. és 34. ábra). Az oligodendrociták differenciálódása hasonló sort követett, D21-től mind transzkript (Claudin 11, CLDN11, korábbi nevén Oligodendrocita marker 4; 32. ábra), mind fehérje szinten (Myelin basic protein, MBP; 32. ábra) kimutatható volt, ami D35-től a sejtek érésével fokozatosan növekedett, összességében azonban továbbra is alacsony expressziós szinten maradt (33. és 34. ábra). Immuncitokémiai eredményeink egyértelműen azt mutatják, hogy az érett neuronális és gliális markerek expressziója, valamint a neuron-neuron és neuron-glia kölcsönhatások fokozatosan növekedtek a differenciálódási időszak alatt, így utánozva az embrionális idegszövet fejlődését.

Összességében a transzkripciós vizsgálatok eredményei összhangban voltak az immuncitokémiai vizsgálatok során kimutatott fehérjékkel, ami megerősítette a hiPSC-eredetű NSC-k hatékony idegi irányú differenciálódását. A 3D szferoidok neuronszövet-szerű differenciálódást mutattak, neuronokat, asztrocitákat és oligodendrocitákat tartalmazva, ami transzkript-, fehérje- és ultrastrukturális szinten is megmutatkozott. Megállapíthatjuk, hogy a 3D szferoid rendszer komplex neuronális sejt kultúrát biztosít, amely a korai neuronális differenciálódás modelljeként szolgálhat.

4.6.2 A 3D neuroszferoidok neurotoxicitási modellként való alkalmazása

A 3D szferoid alapú modellünket citotoxicitási tesztekkel vizsgáltuk, amelyek során a neuroszferoidok sejtjeinek életképességét figyeltük. Tizenegy jól ismert hatású vegyületet (gyógyszerek, peszticidek és vegyi anyagok; 5. melléklet) választottunk ki, és 7 különböző koncentrációban (8. táblázat) alkalmaztuk a szferoidokon D21, D28 vagy D42 stádiumban akut (72 órás) expozícióval. Koncentráció-válasz görbéket vettünk fel és értékeltünk (az expozíciós séma a 7. Ábrán látható).

Az eredmények szerint a Paraquat (PQ; EC_{50} : 1,89 log μ M), a Rotenone (ROT; EC_{50} : -0,61 log μ M), a higany(II)-klorid (Mercury(II)-chloride, $HgCl_2$; EC_{50} : 1,87 log μ M) és Doxorubicin (DOX; EC_{50} : 0.67 log μ M) teljes sejtpusztulást okozott a legnagyobb koncentrációknál. A Hexachlorophene és a Colchicine erős hatást gyakoroltak az életképességre, de nem pusztították el az összes sejtet a vizsgált koncentrációtartományban (18. táblázat; 35. ábra). Az Akrilamid és a Rifampicin szintén csökkentette az életképességet, míg a Valproic acid (VPA) és a Paracetamol minimális hatással volt a 3D neuroszferoidok életképességére a D21 stádiumban (18. táblázat). Negatív kontrollként az Ibuprofent (IBU; EC_{50} : >2 log μ M), mint nem neurotoxikus szert alkalmaztuk, amely nem csökkentette a D21-es 3D neuroszferoidok életképességét (35. ábra). Összességében a különböző vegyületek koncentrációfüggő módon különböző mértékű citotoxicitást idéztek elő a 3D neuroszferoid kultúrákban.



35. ábra. A sejtek életképességének mérése a D21 3D neuroszferoidok 72 órás expozícióját követően. A vegyületek 7 különböző koncentrációban kerültek tesztelésre. A koncentráció-válaszgörbék a kezelt D21 3D neuroszferoidok (n=3) sejtéletképességét (%) mutatják. A koncentrációs értékek log μM ($\pm\text{SEM}$) vannak feltüntetve. Ahol meghatározható volt, az EC_{10} és EC_{50} értékek a grafikonokon szaggatott vonallal jelölve szerepelnek (Kobolák et al., 2020 alapján módosítva).

4.6.3 A 3D neuroszferoidok különböző differenciálódási stádiumainak vizsgálata

Ezután megvizsgáltuk a különböző differenciálódási stádiumban levő 3D neuroszferoidok toxicitás tesztekben adott válaszát. A D28 és D42 mintákat a D21 mintákéhoz hasonló expozíciós sémákban elemeztük (20. táblázat) az összes korábban vizsgált vegyület esetében. Amint azt fentebb részleteztük, a D28-as mintákban a GFAP és az AQP4 expresszáló differenciált asztrociták nagy számban vannak jelen, az axonális kinövés dominál, és a neuronális altípus-specifikus fehérjék kezdenek megjelenni. A D42 minták egy érettebb sejt kultúrát képviselnek, ahol a neuronok altípusai elkülönültek (glutamaterg, GABAerg, kolinerg), szinapszisai kialakultak, érett és érés alatt lévő asztrociták és néhány oligodendrocita is már jelen van. A kísérletek azt mutatták, hogy mind a D28, mind a D42 stádium alkalmas az életképességi vizsgálatokra a tenyésztési rendszer módosítása nélkül, 96-lyukú tenyésztőedény formátumú elemzéssel. A D28 és D42 minták EC_{50} és EC_{10} értékeit az egyes vegyületek esetében a D21 minták esetében fent leírtak szerint határoztuk meg. Egyes vegyületek kevésbé toxikus hatást mutattak az érettebb mintákon (pl. ACR: EC_{50} D21 = 4,1 μM vs. EC_{50} D42

=3,6 μM), míg más vegyületek esetében ez a hatás éppen ellenkező volt (pl. HgCl_2 : EC_{50} D21 =1,7 μM vs. EC_{50} D42 =1,9 μM). A 20. táblázat a három különböző fejlődési stádium esetén meghatározott hatásos koncentráció értékeket EC_{10} , EC_{25} és EC_{50} adja meg log μM koncentrációban, a vizsgált koncentrációtartomány függvényében. A kapott adatok alapján a toxikus anyagok koncentrációfüggő rangsorát lehetett felállítani az egyes differenciálódási szakaszokra (36. ábra).

20. táblázat: Hatásos koncentráció értékek D21, D28 és D42 stádiumú 3D neuroszferoidok toxicitás vizsgálatában.

Vizsgált vegyület (rövidített név)	D21 (log μM)			D28 (log μM)			D42 (log μM)		
	EC_{50} $\pm\text{SD}$	EC_{25} $\pm\text{SD}$	EC_{10} $\pm\text{SD}$	EC_{50} $\pm\text{SD}$	EC_{25} $\pm\text{SD}$	EC_{10} $\pm\text{SD}$	EC_{50} $\pm\text{SD}$	EC_{25} $\pm\text{SD}$	EC_{10} $\pm\text{SD}$
Colchicine (COL)	-0,49 $\pm 0,17$	-2,04 $\pm 0,21$	-3,59 $\pm 0,37$	-0,64 $\pm 0,11$	-1,89 $\pm 0,15$	-3,16 $\pm 0,24$	-0,92 $\pm 0,14$	-2,24 $\pm 0,18$	-3,55 $\pm 0,29$
Rotenone (ROT)	-0,61 $\pm 0,08$	-1,25 $\pm 0,10$	-1,89 $\pm 0,16$	-0,74 $\pm 0,08$	-1,46 $\pm 0,12$	-2,19 $\pm 0,18$	-0,62 $\pm 0,13$	-1,48 $\pm 0,18$	-2,35 $\pm 0,27$
Doxorubicin (DOX)	0,67 $\pm 0,07$	0,04 $\pm 0,10$	-0,58 $\pm 0,15$	1,11 $\pm 0,06$	0,72 $\pm 0,11$	0,33 $\pm 0,17$	1,32 $\pm 0,07$	0,9 $\pm 0,11$	0,49 $\pm 0,18$
Hexachlorophene (HE)	1,26 $\pm 0,08$	0,53 $\pm 0,10$	-0,2 $\pm 0,16$	1,01 $\pm 0,05$	0,21 $\pm 0,06$	-0,59 $\pm 0,09$	0,5 $\pm 0,09$	-0,34 $\pm 0,10$	-1,18 $\pm 0,16$
Paraquat (PQ)	1,89 $\pm 0,07$	1,52 $\pm 0,10$	1,15 $\pm 0,15$	1,98 $\pm 0,05$	1,67 $\pm 0,08$	1,35 $\pm 0,12$	1,79 $\pm 0,08$	1,44 $\pm 0,11$	1,09 $\pm 0,18$
Higany(II)-klorid (HgCl_2)	1,87 $\pm 0,05$	1,5 $\pm 0,06$	1,1 $\pm 0,10$	1,83 $\pm 0,03$	1,60 $\pm 0,05$	1,4 $\pm 0,07$	1,74 $\pm 0,03$	1,54 $\pm 0,04$	1,34 $\pm 0,05$
Paracetamol (PAR)	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2
Ibuprofen (IBU)	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2
Rifampicin (RIF)	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2
Valproic acid (VPA)	>2,6	>2,6	>2,6	>2,6	>2,6	>2,6	>2,6	>2,6	>2,6
Akrilamid (ACR)	>3,5	>3,5	>3,5	>3,5	>3,5	>3,5	>3,5	>3,5	>3,5

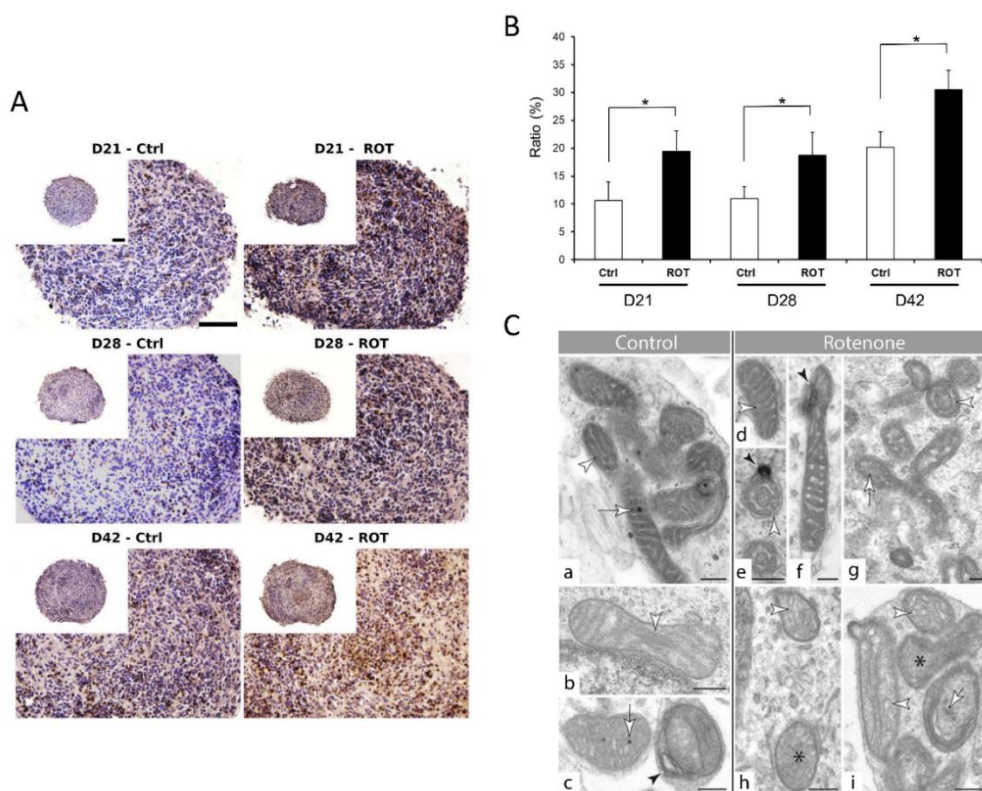
EC ₅₀ érték alapján meghatározott rangsor			
Rangsor	D21	D28	D42
1	Colchicine	Colchicine	Colchicine
2	Rotenone	Rotenone	Rotenone
3	Doxorubicin	Doxorubicin	Hexachlorophene
4	Hexachlorophene	Hexachlorophene	Doxorubicin
5	Paraquate	Higany(II)-klorid	Paraquate
6	Higany(II)-klorid	Paraquate	Higany(II)-klorid
7	Akrilamid	Akrilamid	Akrilamid
8	Paracetamol	Paracetamol	Paracetamol
9	Rifampicin	Rifampicin	Rifampicin
10	Valproic acid	Valproic acid	Valproic acid
11	Ibuprofen	Ibuprofen	Ibuprofen

36. ábra: A vegyületek toxikus hatásának összehasonlítása. A vegyületek rangsorolása a különböző differenciálódási szakaszokban az EC_{50} -értékek alapján. A sötétebb háttérszín a nagyobb toxicitást, míg a fehér szín a kísérletben nem neurotoxikus vegyületeket jelöli.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy minden szakaszban kimutattunk vegyület-specifikus koncentrációválaszt. Ugyanakkor a differenciálódási stádiumok szerinti különbségek arra utalnak, hogy az *in vitro* rendszer képes utánozni a fejlődő embrionális neuronszövet különböző toxikus anyagok által okozott hatásokra adott válaszait.

4.6.4 A 3D neuroszferidok kezelése vegyület-specifikus választ eredményez sejtszinten

Az ATP-alapú életképességi vizsgálat képes kimutatni a sejthalált, de nem alkalmas más specifikus sejtszintű események kimutatására. A 3D szövetekre validált tesztek hiánya miatt úgy döntöttünk, hogy szubcelluláris szinten vizsgáljuk a toxikus vegyület hatását. A Rotenont (ROT), egy jól tanulmányozott neurotoxikus vegyületet választottuk, amelyről ismert, hogy beavatkozik a mitokondriumokban lévő elektrontranszportláncba. Ezért a sejteket ultrastrukturális szinten elektronmikroszkópiával, valamint TUNEL-tesztel vizsgáltuk. A korábban meghatározott EC_{50} értékek alapján a 3D szferoidokat $0,5 \mu\text{M}$ ROT-tal kezeltük 72 órán keresztül, és a mintákat a három differenciálódási szakaszban elemeztük. Az adatok azt mutatták, hogy a ROT szignifikánsan növelte a szferoidokban bekövetkező sejtpusztulást (37. ábra A és B panel) a kontrollhoz képest, összhangban az ATP-mérés eredményeivel. Az ultrastrukturális vizsgálat a mitokondriumok belső membrán redőzöttségében detektált eltérést. Kétféle mitokondriumtípust észleltünk: a sötétebb mátrixú organellek általában keskenyek és hosszúkasak voltak, míg a világosabbak kerekebbek. A sötétebb mitokondriumokban a mátrixszemcsék gyakoribbak voltak (37. ábra C panel), a kezelés hatására a belső membrán redői (kriszták) megduzzadtak és örvényeket alkottak. A világosabb mitokondriumokban ezzel szemben a belső membrán redői szétestek és gyakran felismerhetetlenné váltak, a mátrixszemcsék eltűntek (37. ábra C panel). Összefoglalva elmondható, hogy a toxikus vegyületről ismert specifikus hatást mutattuk ki sejtszinten a 3D neuroszferidokon, amely igazolja az összejt alapú 3D sejtenyészetek érzékenységét és specifitását.



37. ábra. A Rotenone-expozíció hatása a 3D neuroszferoidokra. **A)** A 3D neuroszferoidokat három különböző időpontban (D21, D28 és D42) 72 órán keresztül $0,5 \mu\text{M}$ Rotenone (ROT) koncentrációval kezeltük, majd elemeztük a sejtekre gyakorolt hatását TUNEL-próbával (méretvonal = $100 \mu\text{m}$). **B)** A ROT-kezelés átlagosan 15%-os növekedést indukált az apoptotikus sejtek számában minden stádiumban a kontrollhoz képest ($n=3$) (* $p<0,05$). **C)** A mitokondriumok ultrastrukturája a kontroll (a, b, c panel) és a ROT kezelt (d-i) neuronokban. A belső membrán (kriszta) morfológiájának megváltozása (fehér nyílhegyek) a ROT kezelt sejtekben (d, e, h, i). Fekete csillag: azonosíthatatlan kriszta-morfológia a világosabb mitokondriumokban (h, i); fehér nyílak: mátrix szemcsékkal és anélkül (kontroll sejtek: a, c; kezelt sejtek: g, i) Jól látható a szemcsék sűrűségének különbségét a kontroll (c) és a ROT kezelt mitokondriumokban (i panel) (D21: a, d, f, h; D28: i; D42: b, c, g) (méretvonal = 250 nm) (Kobolák et al., 2020 alapján módosítva).

5 KÖVETKEZTETÉSEK

5.1 Embrionális őssejtvonalak genetikailag újraprogramozott embriókból

Vizsgálataim egyik fő célja a különböző sejtmagátültetési módszerrel előállított embriók őssejt előállítására való alkalmazhatóságának, hatékonyságának és az előállított sejtvonalak őssejt tulajdonságainak értékelése volt. A sejtmagátültetési újraprogramozás (vagy a *médiában elterjedt nevén klónozás*) ún. *zona pellucida*-mentes (ZF-NT) alternatív technikáját sikeresen alkalmazták korábban élő utódok előállítására egérben (Ribas et al., 2005). Vizsgálataimban a jobban elterjedt és több fajon is publikált piezoelektromos sejtmagátültetéssel (PEM) hasonlítottam össze annak érdekében, hogy meghatározzam az ún. *zona pellucida*-mentes (ZF) módszerrel létrehozott hólyagsíra stádiumú embriók pluripotens őssejt létrehozási potenciálját. Az első fontos paraméter a hólyagsíra embriók letapadási képessége a tápláló sejtréteghez, amely a méhbe történő implantációt utánozza *in vitro* embriótenyésztési feltételek között. A megtermékenyített embriócsoport szignifikánsan magasabb eredményeket adott a letapadás és az izolált ICM kinövés számát összehasonlítva, míg a PGA és NT embriók statisztikailag nem különböztek egymástól. A ZF-módszert alkalmazó PGA-embriócsoportban (30,6% vs. 50,9%) az ICM izoláció sikere sokkal kisebb volt a piezo módszerhez (PEM-NT) képest. A megfigyelt különbség a két módszer (PEM NT vs ZF-NT) parthenogenetikus aktivációjának különbségével magyarázható, ahol a *zona pellucida* eltávolítása eredményeként bekövetkező mechanikai stressz valóban okozója lehet az észlelt különbségnek a PGA embriók két csoportja között, még azonos genotípus mellett is (Fulka et al., 2004; Sayaka et al., 2008).

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 sejtek kerültek felhasználásra sejtmagdonor sejtként, míg a ZF-NT kísérleteknél pedig három különböző sejtípus (kumulusz, embrionális fibroblaszt és embrionális őssejt), amelyek hatékonysága sejtípusonként eltérést mutatott.

Eredményeim szerint a ZF-NT hólyagsíra embriókból változó hatékonysággal (1,2%-28,6%) lehet ntESC sejtvonalakat 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 HM1 ESC és kumuluszsejtek sejtmagtranszfert követő jobb átprogramozásának köszönhető, amely a magzati eredetű fibroblaszt sejtekhez (MEF) képest hatékonyabban támogatja a későbbi őssejt létrehozását (Wakayama et al., 2006). Az eltérés egyik lehetséges oka, hogy a MEF sejtek a manipuláció előtt hosszabban vannak *in vitro* tenyészetben és egy fagyasztási/olvasztási cikluson, majd letapadó (adherens) sejtekként tripszines kezelésemnek át, míg a kumulusz sejtek frissen, enyhe manipuláció után kerülnek felhasználásra. Habár mindkét sejt szomatikus sejtípus, azonban a kumulusz sejtek feltételezhetően betöltött szerepüknél fogva (a granulóza sejtekből differenciálódnak, körül veszik a petesejtet és alapvető szerepet játszanak a petesejt metabolikus és táplálkozási támogatásában, az oocita meióziséban, az ovulációban, a petesejt fejlődési kompetenciájában és a megtermékenyülésnek a szabályozásában) elképzelhető, hogy jobban képesek alkalmazkodni a sejtmagátültetés során a petesejt környezethez. Eredményeimmel összhangban egy korábbi tanulmány az ntESC létrehozásának szignifikánsan magasabb arányról számolt be, amikor frissen izolált kumulusz sejteket használtak donor sejtmagként, mint felnőtt egyedekből izolált tenyésztett fibroblasztokat (Wakayama et al., 2005b). Vizsgálataim megerősítik ezeket az eredményeket egy eltérő eredetű fibroblaszt (MEF) és egy eltérő sejtmagátültetési technika (ZF-NT) alkalmazásával. Egyes fajoknál a kumulusz sejtek sejtmagdonorként való használata lényegesen magasabb megszületett utód arányt eredményezett a fibroblasztokhoz képest (Meng et al., 2009). Megjegyzendő, hogy a kumulusz

sejtek több mint 80%-a a sejtciklus G0/G1 fázisában megáll, így alkalmas donorsejtek, amelyek szelekciós kritériumok nélkül felhasználhatók, és nem igényelnek további *in vitro* tenyésztést a sejtciklus szinkronizációjához a genetikai újraprogramozás során (Kishigami et al., 2006). További tanulmányok az ESC sejtek sejtmagdonorként való alkalmazása esetén is magasabb sikerességi arányt publikáltak a megszületett klónozott egerek számát tekintve a fibroblasztokhoz képest (Wakayama et al., 1999; Rideout et al., 2000), ami arra utal, hogy az ESC sejtmagok differenciálatlan stádiuma és a szomatikus sejtektől eltérő sejtciklus szabályozása kedvezhet az átprogramozásnak és növelheti az NT hatékonyságát.

A létrehozott sejtvonalak elsődleges jellemzése a fő ESC pluripotencia markerek (ALP, SSEA-1, POU5F1, NANOG) tekintetében azt mutatta, hogy az ntESC sejtvonalak (4 ZF-NT és 11 PEM-NT sejtvonal) nagyon hasonlóak voltak a hagyományos, fertilizált embriókból létrehozott ESC sejtvonalakhoz az immuncitokémiai vizsgálatokban. A spontán differenciálódási vizsgálatok során képesek voltak embriótesteket (EB) létrehozni, ahol spontán összehúzódó szívizom irányú differenciációt, neuronális rozettákat és cisztikus EB csomókat egyaránt megfigyeltem. Az ESC-k azon képessége, hogy egyszerű és összetett EB-ket képezzenek, a pluripotencia fontos ismérve. Azon ESC sejtvonalak, amelyek csak egyszerű EB-ket képesek létrehozni, korlátozott pluripotenciával rendelkeznek (Sukoyan et al., 2002) és nem tekinthetők pluripotensnek. Eredményeim az ntESC sejtvonalak pluripotens mivoltát erősítik, amelyek nem mutattak eltérést azonos körülmények között a kontroll ESC sejtvonalaktól. Korábban hasonló eredményekről számoltak be más laboratóriumok is a PEM-NT módszerrel előállított embriókból alapított ESC vonalak vizsgálata során (Wakayama et al., 2001; Wakayama et al., 2006).

Összefoglalva eredményeimet elmondható, hogy célkitűzésemnek megfelelően sikeresen hoztam létre ntESC sejtvonalakat sejtmagátültetési újraprogramozással előállított egér hólyagsíra embriókból. Kimutattam, hogy az NT embriók sejtmagdonor sejt típusa befolyásolta az ntESC létrehozásának hatékonyságát. Bizonyítottam, hogy pluripotenciájuk nem tér el a fertilizált embriókból létrehozott ESC vonalaktól spontán differenciációs modellben. Tanulmányom volt az első, amely bizonyította, hogy a szomatikus és embrionális egér sejtek sejtmagjából *zona pellucida*-mentes sejtmagátültetési (ZF-NT) technikával pluripotens ntESC sejtvonalak nyerhetők.

5.2 Az ntESC vonalak pluripotenciájának részletes vizsgálata

Annak ellenére, hogy az ESC sejtvonalakat szövetjavításra, szövet pótlásra lehetne használni, ezek a sejtek transzplantáció esetén differenciálódásuk vagy neoplasztikus transzformációjuk során valószínűleg immunválaszt és kilökődési reakciót válthatnának ki. A testi sejt sejtmagátültetési újraprogramozás (*somatic cell nuclear transfer*, SCNT) részben áthidalhatja ezt a nehézséget azáltal, hogy donor-specifikus, szövettanilag kompatibilis sejtforrást biztosít sejterápiás célokra (Lanza et al., 1999; Yang et al., 2007; Loi et al., 2016; Wolf et al., 2017). Ekkor nem az embrió beültetése és élő utód létrehozása a sejtmagátültetés célja, hanem az embriókat pluripotens őssejt vonalak előállításához használják. Munkám megkezdésekor keveset tudtunk az ntESC sejtvonalak viselkedéséről, tulajdonságaikról, kompetenciájukról. A korábbi publikációk csak néhány genetikai háttérből származó sejtmagdonor sejt típust használtak egérben és vizsgálták a létrehozott ntESC-k differenciálódási képességét (Brambrink et al., 2006; Wakayama et al., 2006). Az általam előállított egér ntESC sejtvonalakat ezért tovább vizsgáltam, hogy meghatározzam az ntESCs és a kontroll ESC vonalak közötti különbségeket sejtes és molekuláris szinten, és további betekintést nyerhessünk a sejtvonalak közötti funkcionális különbségekbe. Vizsgálataim a korábban létrehozott ntESC vonalak nagy felbontású génexpressziós és *in vitro* differenciálódási potenciáljának felderítésére egyaránt irányultak.

5.2.1 Fehérje expressziós vizsgálatok

A pluripotenciáért illetve annak fenntartásáért felelős transzkripciós szabályozó rendszer pontos kifejeződése alapvető fontosságú az ESC sejtek megújulásának és differenciálódási potenciáljuk fenntartása szempontjából. Ahogy azt az irodalmi áttekintésben bemutattam, a pluripotencia kialakításáért, a differenciációs képesség fenntartásáért több szabályozási útvonal is felelős egyszerre, amely a különböző fajok között számos ponton eltérést mutat. Azonban három fő transzkripciós faktor fehérje kritikus szerepet játszik az egér ESC sejtek pluripotenciájának fenntartásában: a POU5F1, a NANOG és a SOX2. A POU5F1-SOX2 fehérjekomplex a *Pou5f1* gén expresszióját is szabályozza egy visszacsatolási mechanizmus révén, ugyanakkor a POU5F1 szabályozza a *Sox2* gén expresszióját is, így szintje kritikus a pluripotencia szempontjából (Okumura-Nakanishi et al., 2005). A NANOG fehérjével együtt (Mitsui et al., 2003) alapvető szerepet játszanak a korai fejlődésben, és szükségesek a differenciálatlan ESC sejtek proliferációjához is (Niwa et al., 2000). Ugyanakkor számos más fontos gén (mint például a *Tdgf1*, *Dnmt3b*, *Gabrb3*, *Gdf3*, *Utf1* és *Zfp42*) is kifejeződik a differenciálatlan ESC sejtekben, bár a pluripotencia és az önmegújulás fenntartásában betöltött szerepük nem minden esetben volt egyértelmű vizsgálataim kezdetén (Ivanova et al., 2002; Ramalho-Santos et al., 2002; Tanaka et al., 2002).

Kezdeti elemzéseim során a legfontosabb *in vitro* pluripotencia markereket (POU5F1, NANOG, SSEA1-, SOX2 és ALP) és a korai embrionális differenciálódás egyik szabályozó faktorát, az FGF4-et sejtszinten vizsgáltam immuncitokémiai és áramlási citometria módszerével. Kísérleteimben nem figyeltem meg jelentős különbségeket a kontroll és az ntESC sejtvonalak között. 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. Az egyetlen kivétel a HM1 ESC-ből származó ntESC vonal volt, ahol erős korreláció volt megfigyelhető a szülői HM1 ESC és annak NT származéka között: a vizsgált pluripotencia markerek egyikében sem mutattam ki szignifikáns különbséget, sem egyszeres, sem többszörös jelöléssel fehérjeszinten. Ez a megfigyelés arra utalhat, hogy az embrionális őssejtek hatékonyabban átprogramozhatók, mint a szomatikus sejtek (Azuara et al., 2006), amely nyitottabb kromatin struktúrájukkal és epigenetikai státuszukkal is összefüggésbe hozható (Long et al., 2014; Srirattana et al., 2022).

A két NT-módszer összehasonlítása kumulusz sejtmagdonor eredetű sejtvonalak felhasználásával nagyon hasonló eredményeket mutatott az áramlási citometria és az immuncitokémiai vizsgálatok során, ami arra utalhat, hogy a két sejtvonal (B6D2 CUM NT és B6D2 CUM NT (PEM)) között kisebb a távolság, mint az azonos genotípusú ESC vonalak (HM1 vs HM1 NT) között (Wakayama et al., 2006; Tong et al., 2007; Srirattana et al., 2022).

Amikor a sejtvonalakat tovább elemeztük egy következő tanulmányban az ún. iTRAQ proteom analízis módszerével (LC-MS/MS elemzés nano-folyadékkromatográfiás rendszerrel) 1650 fehérjét kvantifikáltunk a sejtvonalak összehasonlításakor. Az elemzés megmutatta, hogy igen csekély a különbség, csupán 44 fehérjében találtunk eltérést a fertilizált egér embriókból származó ESC sejtvonalak és az ntESC vonalak között. Ráadásul, az eltérés nem érintett pluripotencia gént (Fröhlich et al., 2013). Ezek az eredmények igazolják korábbi megfigyeléseimet, amelyet további, független vizsgálatok is alátámasztottak (Ding et al., 2009). 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. Első alkalommal írtam le az ntESCs sejtvonalak növekedési sebességét tanulmányomban. A sejtvonalak populáció duplázódási ideje (PDT) leginkább a két genotípus 129Ola (HM1 és HM1 NT) és B6D2 között különbözött, az ntESC-k között azonban szinte nem

volt különbség. A minimális eltérések és az igen hasonló profil a sejtek pluripotenciájára utal, sejtciklusuk felgyorsult, rövid sejtciklus jellemzi azokat.

Az ESC sejtvonalak kariotípusának elemzése lehetővé tette számomra, hogy megállapítsam a sejtvonalak nemét, és megfigyeljem, hogy ezek a vonalak tartalmazzak-e kromoszóma-rendellenességeket. A FISH-analízisek alapján a legtöbb sejtvonalban eltérések voltak azonosíthatók, azonban ezek az eltérések random jelentkeztek a sejtvonalakban és a mintákban, nem korreláltak sem a sejtmagdonorral, sem az alkalmazott NT technikával. Az ESC sejtvonalak euploidia arányainak további elemzése és összehasonlítása megerősítette a FISH-eredmények megfigyeléseit. Az irodalom alapján az 50%-nál nagyobb euploiditású ESC sejtvonalak képesek részt venni az *in vivo* embrió fejlődésben (pl. az ESC sejtek kiméra embrió létrehozása hólyagsíra állapotú embrió blasztocoelbe történő injektáláskor) és sikeresen kolonizálhatják a csíravonalat is (Longo et al., 1997). Eredményeim alapján elmondható tehát, hogy az ntESC sejtvonalak kariotípus és ploiditás vizsgálatának eredményei összhangban vannak a megtermékenyített embrióból származó ESC sejtvonalakról közzétett korábbi adatokkal (Suzuki et al., 1997; Nagy 2003). Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy a tenyésztés során tapasztalható kromoszóma veszteségek (X0) és kromoszóma aberrációk a terápiás alkalmazási lehetőség értékelésekor fontos figyelembe venni, a laboratóriumi sejtenyésztési gyakorlatban pedig rendszeres vizsgálat alá vetni a sejtvonalakat a kromoszóma aberrációk kiszűrése érdekében. Ez azonban minden őssejtvonal esetén igaz, az ntESC vonalak e tekintetben sem különböztek a fertilizált embriókból előállított vonalaktól.

5.2.2 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. Ahogyan azt mások korábban már leírták (Brambrink et al., 2006; Wakayama et al., 2006) az expressziós profilelemzés eredményei a különböző genetikai hátterek között szembetűnőbb különbségeket jelezhetnek, mint az NT-folyamat (PEM vagy ZF-NT). Továbbá, a fertilizált embrióból létrehozott őssejtvonalak összehasonlításakor a különböző forrásokból származó pluripotens vonalak (ESC vs. EGC) közötti különbségek kisebbek voltak, mint a különböző egértörzsekből származó sejtvonalak (129 vs. C57BL/6) közötti különbségek (Ibanez et al., 2005; Sharova et al., 2007). Az irodalmi adatok alapján levonható következtetések összhangban vannak a saját eredményeimmel. 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).

A továbbiakban a szignifikánsan eltérő expressziót mutató géneket (171 gén) összehasonlítva az egér ntESC vonalakról korábban publikált tanulmányokkal (Brambrink et al., 2006; Wakayama et al., 2006) csupán három gén fedett át a tanulmányok között. További fajok közötti összehasonlítás a rézuszmajom ntESC sejtekkel (Byrne 2011) további három olyan gént azonosított, amelyek mindkét fajban eltérően fejeződtek ki. A közzétett microarray adathalmazok hiánya azonban megnehezítette az eredmények további elemzését, a publikációkhoz sokszor nem volt elérhető az eredeti adatforrás, így csak a már feldolgozott adatokra támaszkodva végeztem az összehasonlítást. Ezért kiszélesítve az elemzést, saját ntESC sejtvonalainkon meghatározott eltérően expresszált géneket különböző fajok sejtmagátültetéssel létrehozott embrióin publikált adatsorokkal is összehasonlítottam. Felhasználtam az akkor elérhető egér NT embriókra vonatkozó publikált adatsorokat (Jincho et al., 2008; Fukuda et al., 2010), a szarvasmarha (Pfister-Genskow et al., 2005; Smith et al., 2005; Somers et al., 2006; Aston et al., 2009; Rodriguez-Orsorio et al., 2009) valamint a sertés (Tian et al., 2009) NT embriók adatait egyaránt. A fajok közötti különbségek miatt az eltérő expressziót mutató gének összehasonlítása változatosabb képet mutatott. A fajok közötti

összehasonlításokban közös génkészletet azonosítottam, amely a kötőfehérjék, a transzlációt indító fehérjék és a riboszómális fehérjék fontosságát mutatta a sejtek szabályozásában és a pluripotenciában, amelyek az NT során megváltozhatnak (Laurincik and Maddox-Hyttel 2007; Sanges and Cosma 2010). A publikációk és adatok összehasonlításakor a sejtmagátültetéshez használt protokollok (Wrenzycki et al., 2001), a genetikai háttérbeli különbségek, valamint a microarray elemzési módszerek is jelentősen befolyásolták a génexpressziós vizsgálatok eredményét. Ez a tény különösen megnehezítette, hogy a fajok közötti összehasonlításokból pontos listát adjak az eltérően szabályozott NT-specifikus génekről. Korábban publikált tanulmányok azt jelezték, hogy az NT-eljárás számos gén eltérő expresszióját eredményezheti NT-embriókban (Pfister-Genskow et al., 2005; Smith et al., 2005; Somers et al., 2006; Jincho et al., 2008; Aston et al., 2009; Rodriguez-Osorio et al., 2009; Fukuda et al., 2010), ez azonban úgy tűnik, hogy az NT-embrióból származó ntESC sejtvonalak esetén lecsökken (Brambrink et al., 2006; Wakayama et al., 2006; Byrne 2011) amire a saját vizsgálataimból is következtetni lehet. Úgy tűnik, hogy az egér sejtmagátültetés esetén az embriók megváltozott génexpressziós profilja erősen függ a felhasznált donorsejt típustól (Gao et al., 2003; Smith et al., 2005), ami az ntESC sejtvonalak esetében is megfigyelhető, de kisebb mértékben (Smith et al., 2005). 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. Továbbá, a DNS-mikroarray-profilok és a HiCEP-kísérletek azt mutatták, hogy ez a "távolság" sokkal szembetűnőbb a megtermékenyített embrióból származó ESC-k között, mint más ntESC sejtvonalak esetében (Smith et al., 2005; Brambrink et al., 2006; Wakayama et al., 2006). Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az ntESC sejtvonalak olyan NT embriókból származhatnak, amelyekben a nukleáris átprogramozás sikeresebb volt (Brambrink et al., 2006; Wakayama et al., 2006; Whitworth and Prather 2010; Byrne 2011; Wilmot et al., 2015; Gouveia et al., 2020). Más szavakkal, lehet, hogy csak az embrionális fejlődés szempontjából kompetens NT embriók, amelyek "teljesebb" epigenetikai átprogramozáson mentek keresztül, lehetnek alkalmasak az ESC sejtvonalak létrehozásához. A MEF NT embrióknál tapasztalt ESC alapítási nehézségek (lásd 4.1.3 fejezet) szintén ezt a narratívát látszanak alátámasztani. Ennek bizonyítására azonban a különböző embrionális stádiumokban embrió szekvenálási adatok és összehasonlítás lenne szükséges, a sejtmagátültetési és kontroll embriók között, amely szintén komoly forrásigénnyel rendelkezik, figyelembe véve a sejtmagátültetés továbbra is igen alacsony hatékonyságát. Nem beszélve a génexpressziós profil mellé szükséges epigenetikai mintázat összevetéséről is, amely technikai szempontból is több nehézséget jelent. Itt kell megjegyezni, hogy az iPSC technika térhódításával a sejtmagátültetésen alapuló genetikai újraprogramozás kutatása kissé háttérbe szorult, így az eredményeim publikálása óta eltelt időben az e témájú publikációk száma jelentősen lecsökkent. Ez a tény tovább hátráltatja a felvetett kérdések egyértelmű, kísérletes tisztázását.

A korábban közzétett, differenciálisan expresszálo gének listáján az egyetlen kivétel a DNS-metiltranszferáz 3a (*Dnmt3a*) és szabályozó faktorának, a DNS-metiltranszferáz 3-like protein (*Dnmt3L*) génje volt. Mindkét gén szükséges az imprintált gének *de novo* DNS metilációjához a korai egér embrionális fejlődés során (Hu et al., 2008) és az ESC-k differenciálódásának elindításához (Jackson et al., 2004). E két gént gyakran írják le a különböző fajok NT embrióiban eltérően kifejeződő génekként (Wrenzycki et al., 2001; Chung et al., 2003; Kumar et al., 2007; Giraldo et al., 2008; Ju et al., 2010). Vizsgálataimban mindkét gén emelkedett szintet mutatott a B6D2 ntESC mintákban, összehasonlítva a 129Ola genotípusú ESC-kkel vagy a B6D2 kontrollal a microarray expressziós kísérletek során. Arról is beszámoltak, hogy az imprintált gének DNS metilációs mintázata változó az ESC-kben (Humpherys et al., 2001; Chang et al., 2009). Az imprintált gének a vizsgálatomban azonosított eltérően expresszálo gének között is jelen voltak (*Dcn*, *Nnat* és *Peg3*), azonban alacsony számuk az ntESC-k sikeres átprogramozásának jele lehet a donor NT embriókban. Ezek a megfigyelések megerősítik a

korábbi feltételezést, miszerint az ESC alapításhoz az NT embriók teljes epigenetikai átprogramozása szükséges (Whitworth and Prather 2010; Wilmot et al., 2015).

Saját későbbi vizsgálataink, amelyeket az imprintált gének tekintetében allél-specifikus RNS szekvenálással végeztünk pluripotens stádiumban, megmutatták, hogy az ESC sejtek hajlamosabbak az imprinting mintázat elvesztésére az *in vitro* tenyésztés során. Ez egyértelműen bizonyítja, hogy az ESC sejtek sejtmagdonorként való alkalmazásakor a késői, passzázs 20 feletti sejtekben már jelentősen csökkent az epigenetikai mintázat, amely összefüggésben állhat a sejtmagátültetés sikerességével. Az ESC-k differenciálása, valamint az ESC-k pluripotens alapállapotba (naív) való visszafordítása nem állítja vissza az imprintált gének monoallelikus expresszióját, ami arra utal, hogy az ESC-kben az imprinting elvesztése visszafordíthatatlan. Ennek fontos következményei vannak a sejtek további alkalmazására, mivel a helyes imprinting kritikus fontosságú a teljes fejlődési potenciál megőrzéséhez. Elemzéseink együttesen átfogó képet nyújtanak a pluripotencia fenntartásában szerepet játszó imprintált gének kifejeződéséről, és viszonyítási alapot biztosítanak az imprintált génexpressziót fenntartó pluripotens sejtvonalak azonosításához (Dirks et al., 2019).

Az ESC-vonalakat *in vitro* spontán vagy irányított differenciáltatási protokollal szívizom- és idegsejteké differenciáltattam. Bár az expressziós profilelemzés számos eltérően expresszáló gént azonosított az elemzett ESC-vonalak között, beleértve a fejlődő magzati szívben (*Col1a3*, *Col1a2*, *Tpm1* és *Tbx3*) vagy a központi idegrendszerben (*Dhcr7*, *Gria4*, *App*, *Casp9*, *Nnat* és *Crabp1*) aktív géneket, az irányított *in vitro* differenciálódási vizsgálatok nem mutattak ki jelentős különbségeket az ntESC-vonalak között. Korábbi az ntESC sejteken végzett *in vitro* differenciálódási vizsgálatok (Munsie et al., 2000) alátámasztják a megállapításaimat a neurális vagy a szívizom differenciációban megfigyelt különbségek hiányával kapcsolatban. Továbbá, saját későbbi proteomikai vizsgálataink is ezt támasztották alá, csupán kis számú fehérje esetében találtunk expressziós eltérést az ntESC és kontroll ESC vonalak között (Fröhlich et al., 2013).

5.2.3 Kitekintés

Vizsgálataim publikálása óta napvilágot látott tanulmányok hasonló eredményeket közöltek. Mind az alkalmazott sejtmagátültetési protokoll, mind az alkalmazott sejtmagdonor sejt típusa és genetikai háttere okozhat jelentős eltéréseket. Azonban a sikeresen újraprogramozott és fejlődésnek indult NT-embriókból alapított sejtvonalak összehasonlításakor a sejtvonalak komoly egyezést mutatnak, ami az újraprogramozás során lezajló epigenetikai változások számlájára írnak többen is (Whitworth and Prather 2010; Long et al., 2014; Wilmot et al., 2015; Gouveia et al., 2020). Mindazonáltal fajok közötti különbségek is megfigyelhetők a transzkripció és epigenetikai újraprogramozás folyamatában, ezek azonban inkább az embrióbeültetési kísérletekből vonhatóak le. Így például a szarvasmarha-klónok hajlamosabbak az elhízásra, míg a sertés-klónok alulfejlettek és fejletlen placentával rendelkeznek (Estrada et al., 2007; Whitworth and Prather 2010). Az egerek klónjai viszont a vemhesség korai szakaszában alulfejlett placentával (Jouneau et al., 2006; Wakisaka-Saito et al., 2006), vagy a vemhesség közepétől a születésig a placenta hiperpláziával társultak (Wakayama and Yanagimachi 1999; Tanaka et al., 2001). Egerekben a klónozott embriókban abnormális epigenetikai módosításokat, köztük rendellenes DNS-metilációt és hiszton módosulásokat mutattak ki (Dean et al., 2001; Kang et al., 2001; Ohgane et al., 2001). Továbbá, a rendellenes placentán kívül (Wakayama and Yanagimachi 1999; Tanaka et al., 2001), számos rendellenességet találtak a kifejlett egér utódokban, amelyek légzési elégtelenség vagy más deformitások (Renard et al., 1999; Wakayama et al., 1999), elhízás (Tamashiro et al., 2002), májnekrózis, tumorok és tüdőgyulladás (Ogonuki et al., 2002) miatti korai elhalálozáshoz vezettek.

Következtetésként elmondható, hogy vizsgálataim több szinten is feltártak különbségeket az ntESC vonal és a megtermékenyített embriókból származó ESC vonalak génexpressziós mintázatában, i) a sejtmagátültetett és a megtermékenyített embrióból származó ESC-k közötti

különbségeket, ii) a genetikai háttérrel kapcsolatos különbségeket, valamint iii) a különböző sejtmagdonor sejtekkel összefüggésbe hozható különbségeket. Mindazonáltal a feltárt génexpressziós különbségek nem voltak lényegi befolyással a pluripotencia fenntartásában és a differenciációs képesség megőrzésében szerepet játszó kaszkádokban, minden vizsgált sejtvonal fehérje expressziós mintázata és *in vitro* spontán és indukált szív- és idegrendszeri differenciálódási potenciálja nagyon hasonló volt. Későbbi proteomikai (Fröhlich et al., 2013) majd epigenetikai (Dirks et al., 2019) vizsgálataink tovább erősítették a levont konklúziók helyességét. Eredményeim hozzájárultak annak megerősítéséhez, hogy a sejtmagátültetési genetikai újraprogramozással előállított embriók fontos forrásai lehetnek a donor-specifikus, szövetazonos (hisztokompatibilis) őssejtvonal előállításnak (*somatic cell nuclear transfer*, SCNT), amely a regenerációs medicina fontos eleme lehet. Humán kísérletekben az SCNT az adott egyén szomatikus sejtjeiből specifikus ESC-ket létrehozó technika, végső soron a betegség mechanizmusának megértéséhez vezethet, valamint javíthatja a degeneratív betegségek kezelésére szolgáló sejtalapú terápiák hatékonyságát, az immunrejekció alacsony kockázata mellett (Lanza et al., 1999; Yang et al., 2007; Loi et al., 2016; Wolf et al., 2017). Biztonságos terápiás sejtforrásként való alkalmazásuk azonban további vizsgálatokat és a protokollok intenzív fejlesztését követeli meg.

A nagyállatokat célzó SCNT kísérletek egyik célja, amikor nem a haszonállat genotípusának megőrzése a cél az NT révén, hanem őssejtek létrehozása, a humán betegségek modellezése lehetne. Korlátja azonban továbbra is az alacsony hatékonyság, amely a háziállatok genetikailag módosított sejtjei esetén alig 0,5%-1,0% között tehető (Tan et al., 2016). A dolgozatomban bemutatott másik genetikai újraprogramozási eljárás, az iPSC sejtek létrehozása és alkalmazási lehetőségei azonban új kontextusba helyezik az SCNT eljárást és annak megítélését, amelyet a későbbi fejezetekben értékelek.

5.3 Nyúl *POU5F1* gén regulátor régiójának és expressziójának vizsgálatai

5.3.1 *A promóter szekvencia nagyfokú hasonlóságot mutat humán ortológjával, erős domén konzerváció mellett*

Publikációm volt az első tanulmány, amely leírta a nyúl *POU5F1* gén teljes szabályozó régiójának izolálását és elemzését. Kísérleteimben izoláltam a nyúl *POU5F1* cDNS szekvenciáját, és elemeztem az expressziós mintázatot preimplantációs stádiumú nyúl embriókban. Ezenkívül azonosításra került egy pszeudogén, amely nagyfokú hasonlóságot mutat a teljes *POU5F1* szekvenciával. Eredményeim megmutatták, hogy mind a *POU5F1* génszerkezete, mind a szekvenciája rendkívül konzervált a különböző fajok között, nyúl, egér, ember, szarvasmarha és kutya DNS szekvenciákat összehasonlítva. Más fajokhoz hasonlóan a *POU5F1* az MHC régióhoz közel térképeződik a nyúl kromoszómán az ún. határoló DNS régiók elemzése révén. A gén 5 exont tartalmaz, hosszabb első intronnal és 3' UTR régióval. A feltételezett fehérje szekvenciája (a DNS szekvencia alapján prediktálva) szinte teljesen megegyezik más fajkéval. A vizsgálatok tehát igazolták, hogy a *POU5F1* rendkívül konzervált szerepet játszik a korai gerincesek fejlődésében, amely kulcs szerepét tovább hangsúlyozza a korai nyúl egyedfejlődésben.

Összehasonlítva a nyúl *POU5F1* 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 starthelyétől upstream szakaszon. Az egérrel összehasonlítva a nyúl szekvenciájából hiányoznak a CR1 és CR2 régiók közötti hosszabb szakaszok, de a funkcionális régiók mind a négy vizsgált fajban majdnem azonosak voltak szekvencia szinten. Több konzervált ismétlődő szekvencia, E-boxok, a *Pem*, *Pax3* és *Sp1* transzkripció faktorok kötőhelye (Pugh and Tjian 1991) azonosíthatóak voltak. Továbbá azonosítható volt az ún. HRE kötőhely is, amelyről korábban kimutatták, hogy fontos szerepet játszik a retinolsav (*all-trans-retinoic acid*, RA; CAS: 302-79-4) által indukált *POU5F1*

expresszió szabályozásban, az expresszió csökkentése (*downregulation*) révén. Ugyanakkor az újonnan azonosított CCC(A/T)CCC motívumok, amelyeket csak a nyúlban volt megtalálható, jelentősége tehet szert a *Pou5f1* génszabályozás emlős fajokban tapasztalható különbségeinek vizsgálatakor.

A CR4 régió különösen érdekes a pluripotens őssejtek kutatása szempontjából (Hubner et al., 2003), mivel ez a régió felelős a *Pou5f1* expressziójáért az egér ESC sejtekben (Yeom et al., 1996). Korábban más emlősök (sertés, kutya, patkány) összehasonlító szekvenciaelemzése egyértelműen kimutatta, hogy a CR4 régióban három konzervatív szakasz található (Chew et al., 2005). A nyúlban mindhárom szekvencia azonos; ez a funkcionális jelentőségre és az emlősökben erősen konzervált szabályozó szerepre utal. Összehasonlító szekvenciaelemzéssel megfigyeltem, hogy a vizsgált négy faj közül a nyúl és a humán *POU5F1* szabályozó régiója rendelkezik a legnagyobb homológiával, amely funkcionális hasonlóságot jelezhet előre.

Az egér ESC-ken végzett funkcionális vizsgálataim igazolták a szekvenciaelemzés eredményeit. Kísérleteimben a nyúl *POU5F1* promóter CR4 régiója mutatta a legmagasabb expressziós szintet egér ESC sejtekben. Ez arra utal, hogy a nyúl CR4 promóter régiója ugyanazt a transzkripció szabályozó aktivitást biztosítja, mint az egér CR4 szekvencia az egér ESC sejtekben. Emellett a nyúl konstrukció nem mutatott szignifikáns különbséget kísérleteimben az egér *Pou5f1* promóterét tartalmazó konstrukció expressziójához képest, ami szintén ezt a megállapítást erősíti.

5.3.2 A nyúl *POU5F1* ICM és trofoblaszt sejtekben is expresszál

A qPCR kimutatta, hogy az anyai eredetű *POU5F1* mRNS szintje magas az oocitákban és a zigótákban, amely fokozatosan csökkent a 8-16 sejt stádiumig. Az átmenetileg csökkent transzkriptum szintek az embrionális genom aktiválását követően folyamatosan emelkedtek. Ezek az adatok összhangban vannak a korábban publikált egér génexpressziós mintázatokkal (Pan et al., 2002). Mivel azonban a nyúlban az embrionális genom aktiválása később kezdődik, mint az egérben, az endogén *POU5F1* expresszió időzítésében eltérés volt észlelhető az egér és a nyúl között. Egérben az expresszió a morula stádiumot követően az ICM-re korlátozódik, a primitív ektodermában fokozódik, és végül a primordiális csírasejtekre korlátozódik (Yeom et al., 1996). Nyúl embriókon végzett kísérleteim megmutatták, hogy a *POU5F1* mind a trofoblasztban, mind az ICM-ben mRNS-szinten kifejeződött. Szarvasmarha, sertés, rézuszmajom és humán preimplantációs stádiumú embriókban a *POU5F1* fehérje szintén mindkét sejtípusban lokalizálható az irodalmi adatok alapján (van Eijk et al., 1999; Kirchhof et al., 2000; Mitalipov et al., 2003; Cauffman et al., 2005). Szarvasmarhában a *POU5F1* fehérje jelenléte a trofoblaszt sejtekben az extraembrionális vonal-specifikus génexpresszió szupresszoraként működhet a preimplantációs fejlődés során, ami lehetővé teszi a trofoblaszt kiterjedt proliferációját az implantáció előtt *in vivo* (van Eijk et al., 1999; Kurosaka et al., 2004). Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az expresszió térbeli mintázata a hólyagcsíra stádiumban fajspecifikus (Kirchhof et al., 2000).

5.3.3 Pszeudogén azonosítása

A vizsgálatok során azonosításra került a nyúl *POU5F1* egy retrotranszponált pszeudogénje. A retrotranszponált gének mRNS-ből keletkeznek, és a reverz transzkripciót követően visszaintegrálódnak a genomba. Ennek a folyamatnak köszönhetően az ilyen típusú pszeudogéneknek általában nincs működő promóterük, vagy valamilyen módosításon esnek át, ami miatt nem képesek a funkcionális vagy teljes hosszúságú fehérjék kódolására. További vizsgálatokra lesz szükség annak tisztázására, hogy a további fejlődési szakaszokban és differenciált szövetekben kifejeződik-e a pszeudogén, mivel egyes pszeudogénekről ismert, hogy bizonyos szabályozó szereppel rendelkezhetnek (Korneev et al., 1999; Bellingham et al., 2003; Hirotsune et al., 2003). A bioinformatikai elemzés kimutatta, hogy az őssejt specifikus gének retrotranszpozíciós gyakorisága messze meghaladja a nem őssejt specifikus génekét, és valószínűleg több, nagymértékben homológ pszeudogén létezik az összes őssejt specifikus gén esetén a genomban (Pain et al., 2005; Elliman et al., 2006). Ez jellemző az emberi (Takeda et

al., 1992) és az egér pszeudogénekre is (Okamoto et al., 1990; Scholer et al., 1990; Okazawa et al., 1991). Még nem világos, hogy a pluripotencia pszeudogének egerekben és emberekben való nagyszámú jelenléte ismeretlen funkciókra is utal-e. Emberben a *POU5F1-P1* pszeudogén a *POU5F1* 1-es izoformához hasonló feltételezett fehérjét kódol, amely számos humán malignus betegségben az amplifikált régió közelében lokalizálódik (Panagopoulos et al., 2008). A humán *POU5F1* pszeudogénekéről szóló közlemények azt sugallták - különösen szomatikus sejtekben, szövetspecifikus őssejtekben és nem csírasejtes daganatokban -, hogy a *POU5F1* expressziós adatainak bizonyos mértékű újraértékelésére lehet szükség, mivel olyan primereket használnak, amelyek nem tudják megkülönböztetni a pszeudogéneket a kódoló géntől (Liedtke et al., 2007; Liedtke et al., 2008; Monk et al., 2008). Más fajokban - többek között az egérben és a nyúlban - a *POU5F1* pszeudogének funkcionális szerepe még mindig feltáratlan.

Összefoglalva eredményeimet elmondható, hogy tanulmányom a nyúl *POU5F1* szabályozó domének első átfogó elemzését nyújtotta. Az izolált nyúl *POU5F1* promóter részletes szekvenciaelemzése magas szekvencia konzerváltságot mutatott ki az azonosított enhancer doménekben. A szabályozó domén szekvenciák erős konzerváltsága a *POU5F1* expresszió szabályozásának fontosságát mutatja a korai emlősök fejlődésében. Kimutattam, hogy az enhancerek legnagyobb homológiája az ember és a nyúl között azonosítható. Ez növelheti a nyúl összehasonlító funkcionális genomikai eszközként való felhasználásának fontosságát a humán orvosi kutatásokban. A nyúl embriológiai kutatások területén, a pluripotens embrionális őssejtek létrehozására tett erőfeszítéseket pedig közvetlenül segíti, megmutatva, hogy a hasonló szabályozás révén a humán őssejteknel alkalmazott, nem pedig az egérre jellemző módszertan követése javasolt.

5.3.4 Kitekintés

Eredményeimre építve a nyúl *POU5F1* promóter alapú zöld fluoreszcens fehérjét (EGFP) expresszáló transzgenikus nyúl magzati fibroblasztokat állítottak elő, majd azokat donorsejtként használták szomatikus sejtmagátültetéshez (SCNT). Az EGFP-expressziót kimutatták az SCNT-magzatokban, neurális őssejteket izoláltak, illetve őssejttenyészeteket hoztak létre a fibroblasztok iPSC sejtekké történő átprogramozásával, habár élő utódot nem sikerült előállítani az SCNT során. A kifejlesztett nyúl riporterrendszer azonban a sejtek differenciálódási állapotának nyomon követésére jól használható (Yin et al., 2013; Quan et al., 2014). Eredményeimet további génexpressziós és embriológiai vizsgálatokban is felhasználták mind nyúl (Chen et al., 2012; Henderson et al., 2014), rézuszmajom (Mtango et al., 2011), mind szarvasmarha (Madeja et al., 2013; Simmet et al., 2018) vizsgálatokban, amely további bizonyíték az általam is megerősített fajok közötti konzervált szerepet illetően a korai preimplantációs embrió fejlődés majd az epiblaszt determináció és a pluripotencia fenntartása során. Eredeti célkitűzésem, amelyet munkám kezdetén fogalmaztam meg, hogy a nyúl pluripotens őssejtek létrehozásának hatékonyságát növelni tudjam és valóban pluripotens, utód létrehozására is alkalmas sejtvonalat lehessen előállítani részben közelebb jutottunk. A nyúl embriók trofoblaszt sejtjeiben kimutatott *POU5F1* expresszió bizonyította, hogy a nyúl a humán embrionális expressziós mintázathoz áll közelebb, és nem az egérnél alkalmazott módszerek és médium kiegészítések alkalmazása szükséges (Tancos et al., 2012). Másrészt, ezekre a vizsgálatokra építve Osteil és munkatársai nyúl ESC és iPSC sejtek összehasonlításakor, megmutatták, hogy a *POU5F1* promóter metilációs állapota és a CR4 enhanszer régió különbözőképpen expresszál nyúl ESC és iPSC sejtekben (Osteil et al., 2013). Publikációjuk másik nagyon fontos eredménye, hogy átfogó analízist adtak annak lehetséges okairól, hogy a korábbi nyúl ESC-szerű sejtvonalak miért nem tekinthetők valódi pluripotens sejtvonalaknak, a nyúl iPSC sejtvonaltól miben térnek el. Ez lehetőséget biztosított a kutatások és a protokollok új irányba történő fejlesztéséhez (Osteil et al., 2013; Phusa and Piliszek 2020; Bou et al., 2022).

5.4 Pluripotencia szabályozás háziállatok korai embrióiban

5.4.1 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 génexpressziós, és gén szabályozási különbségek jelentősen befolyásolják egy-egy tulajdonság kialakulását. Így a pluripotencia kialakításában szerepet játszó gének kaszkádja és azok expresszió szabályozása is jelentősen eltér. Habár az egérben az ESC vonalak létrehozása évtizedes gyakorlat, számos fajban komoly nehézségekbe ütközik a pluripotens őssejtek izolálása és fenntartása. Ezért következő vizsgálataimban további, olyan fajok embrióinak összehasonlításában vettem részt, ahol a pluripotens őssejtek előállítása nehézségekbe ütközött a vizsgálatok megkezdésekor. A választás a sertés és szarvasmarha embriókra esett, amelyeket egér embriókkal és őssejtekkel hasonlítottunk össze több megközelítéssel. Egyrészt összehasonlítottuk az egér sertés és szarvasmarha ICM, ERSE és APE stádiumban lévő, az extraembrionális szövetektől mentes embrió szöveteinek transzkriptomját. A három faj génortológjaira összpontosítva konzervált és nem konzervált génexpressziós mintázatok kerültek feltárára az egér és a patás fajok (*Ungulata*) között. Ezután az *in vivo* stádiumok között eltérően kifejeződő konzervált gének halmazát hasonlítottuk össze azokkal, amelyek az egér pluripotens sejtek *in vitro* naiv vagy primed állapotát jellemzik. Ez azért is fontos, mert a vizsgálatok megkezdésekor csak az egérben volt egyértelmű génexpressziós mintázat az *in vitro* naiv és primed állapotokhoz 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 génexpresszióban az egyes stádiumokban. Ugyanakkor csak kis számú olyan eltérően expresszáldó 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 (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007; Nichols and Smith 2009). 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 expresszáldó gének csoportja, például a *Pdgfra*, *Gata6* és *Sdc4* (Nichols and Smith 2009).

5.4.2 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 a naiv egér ESC-kben (szérum+LIF-ben vagy 2i+LIF tápoldatban tenyésztett), és voltak olyanok, amelyek mind az ERSE és APE stádiumú embriókban, mind az egér EpiSC sejtekben kifejeződtek. Az eltérően expresszáldó gének között a várokozásoknak megfelelően ismert pluripotenciával kapcsolatos gének, például a *Klf4* és a *Lin28b* is megtalálható volt. Korábban kimutatták, hogy a *Klf4* a LIF/STAT útvonalon aktiválódása az ESC-k önmegújulásához (*self-renewal*), az EpiSC-k naiv pluripotenciájának helyreállításához (Guo et al., 2009; Hall et al., 2009), valamint az egér iPSC sejtek újraprogramozáshoz (Wei et al., 2009) is elengedhetetlen. A LIN28B-t szintén használták újraprogramozásra, de a KLF4-gyel ellentétben hiPSC-k átprogramozására (Yu et al., 2007), amelyek jobban hasonlítanak a mEpiSC-kre expressziós profiljuk tekintetében (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Továbbá a LIN28B negatív regulátora a differenciálódást elősegítő *Let7* miRNS-eknek, amelyek a mEpiSC-kben erőteljesen expresszálnak (Viswanathan et al.,

2008; Jouneau et al., 2012). Érdekes módon a *Lin28b* expresszióját *in vivo* csak preimplantációs egérembriókban írták le (Vogt et al., 2012). Vizsgálataink megerősítették kifejeződését egér hólyagcsíra embriók sejtjeiben, de azonosítottuk azt is, hogy egér, szarvasmarha és sertés ERSE és APE stádiumú epiblasztokban is aktívan expresszál.

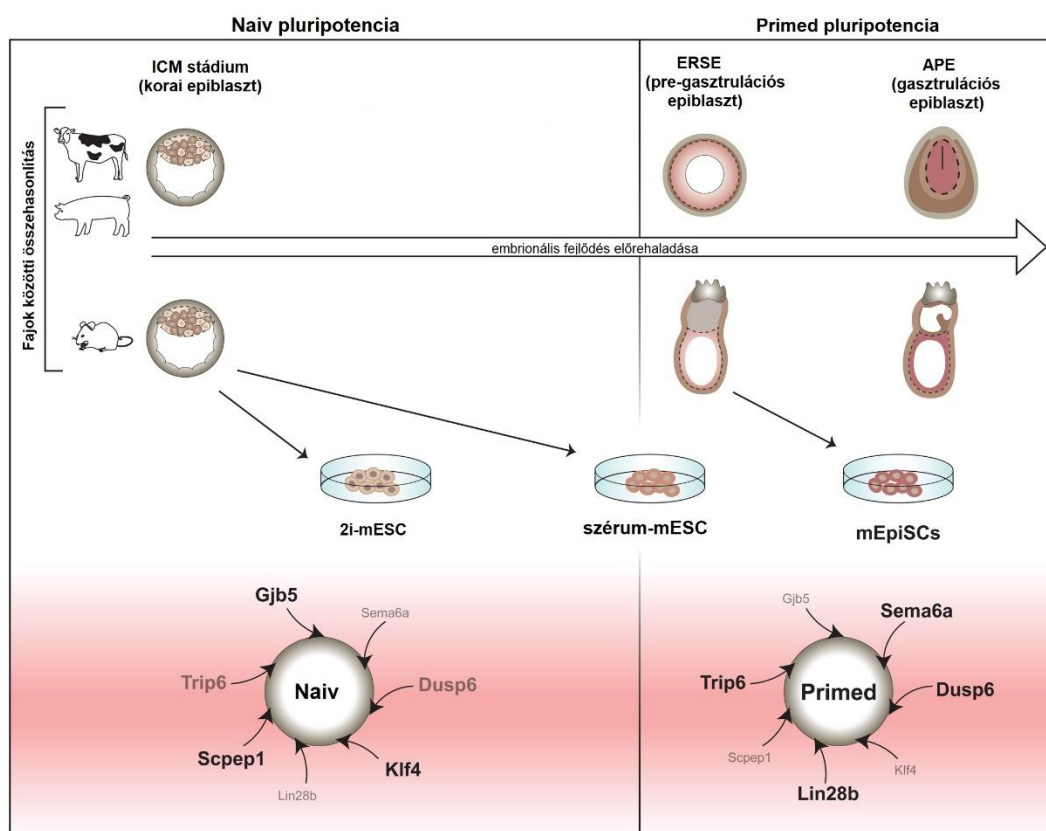
Az elemzésünk által kiemelt egyéb géneket a pluripotenciával kapcsolatos génekként írták le korábban, azonban a pluripotencia kaszkádban betöltött szerepüket nem határozták meg. Ezek közé tartozik a *Dusp6*, egy olyan gén, amelynek expressziója feldúsult az ERSE/APE stádiumokban, valamint a szérum mellett tenyésztett mESC-ben és a mEpiSC-ben. A DUSP6 fehérje a MAP-kináz foszfatáz családba tartozik, és kimutatták, hogy a differenciálódás korai szakaszában visszafogja (*represszálja*) az ERK-jelátvitel aktivitását (Yang et al., 2012). Továbbá, promóteréről kimutatták, hogy egy pluripotencia-függő enhancert tartalmaz (Zhang et al., 2009). Vizsgálataink során megmutattuk, hogy a *Dusp6* kiütésekor (*knock-down* kísérlete ESC sejtekben) a sejtek differenciálódásnak indulnak a pluripotencia kaszkádban szereplő gének expressziója lecsökken (Bernardo et al., 2018). Így a *Dusp6* a pluripotencia megőrzésében fontos szerepet tölt be. Megfigyeléseinket később mások is megerősítették őssejtek transzkriptomikai összehasonlító vizsgálatakor (Ghimire et al., 2018; Taei et al., 2020; Yoo et al., 2023).

Olyan konzervált géneket is találtunk, amelyeket eddig nem hoztak összefüggésbe a pluripotenciával. Érdekes módon néhány ICM-hez és mESC-hez kapcsolódó gént a retinolsav anyagszere útjával hoztak összefüggésbe. A GJB5 egy ún. gap junction fehérje, amelyről korábban kimutatták, hogy retinolsav hatására expressziója lecsökken (Hatakeyama et al., 2011). Ezzel szemben az SCPEP1 egy retinoid-indukálható szerin-karboxipeptidáz, amelyet először simaizomsejtekben fedeztek fel (Chen et al., 2001). Továbbá a *Klf4* expresszióját szintén retinolsav indukálja simaizomsejtekben (Shi et al., 2012a). Ezért ésszerű a feltételezés, hogy a retinolsav konzervált szerepet játszhat az ICM-ben a *Klf4* és a *Scpep1* gének indukálásával és a *Gjb5* gén expressziójának szabályozásával. Érdekes módon az *in vitro knock-down* kísérleteink azt mutatják, hogy mind a *Scpep1*, mind a *Gjb5* elcsendesítése *knock-down* kísérletben sejt differenciálódáshoz vezet, így szerepet játszik a pluripotencia fenntartásában (Bernardo et al., 2018). Azonban a kapcsolódó útvonalak tisztázásához további kísérletek szükségesek.

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 sodródhatnak-e. Ezért nagyon érdekes lehetne az O'Leary és munkatársai által leírtakhoz hasonló elemzést végezni több állatfaj embrióin, ahol a szerzők az emberi embrió ICM sejtjeinek változását követték nyomon az embrionális őssejtek izolálása során, és a naiv és primed pluripotenciához társuló gének expresszióját vizsgálták nagy felbontással (O'Leary et al., 2012). Ehhez azonban arra lenne szükség, hogy az adott állatfaj esetén is ismert legyen a naiv és primed pluripotencia állapot és annak *in vitro* tenyészetben való fenntartása, ami jelenleg csak egéren adott.

Az őssejt vonalak és az *in vivo* minták összehasonlítása révén számos evolúciósan konzervált útvonalat figyelhattunk meg az ICM az ERS és APE stádiumok fajok közötti összehasonlításával. Eredményeink arra utalnak, hogy a 2i-mESCs vagyis naiv ESC "pluripotencia státusza" az ICM és az ERSE stádiumú epiblaszt között van, míg a szérumban tartott ESC az ERSE stádiumú epiblaszthoz hasonlít, ami összhangban van a mások által leírtakkal (Boroviak et al., 2014). Az mEpiSC-k státusza kevésbé volt egyértelmű, mivel ezek a sejtek korrelációt mutattak mind a gasztruláció előtti (ERSE), mind a korai gasztrula epiblaszt sejtjeivel (APE). Megfigyeltük azonban, hogy a mEpiSC-kben több olyan gén mutatott erőteljes expressziót, amelyek kizárólag az APE stádiumú embriókban voltak aktívak (de az ERSE stádiumú embriókban nem), ami arra utal, hogy ezen sejtek fejlődési szempontból jobban hasonlítanak a gasztrula stádiumú embriókhoz, amely feltevést más laboratóriumok vizsgálatai is megerősítenek (Kojima et al., 2014).

A naiv pluripotenciát *in vitro* szabályozó sejtjelek-kaszádok két kulcsfontosságú "centrikus" modult aktiválnak az egér ESCs-ben, köztük a POU5F1 és a MYC modulokat (Ng and Surani 2011). Ezeket a modulokat szérumban kiegészített médiumban tenyésztett mESC sejtekben mi is meghatároztuk, és megfigyeltük, hogy *in vivo* mindkét modul teljesebb az egér ERSE-ben, mint az ICM-ben. Ugyanakkor a sertés és szarvasmarha ICM-ben is közel teljes a modulokban résztvevő gének expressziója. Ez összhangban van azzal a ténnyel, hogy az egér ICM más fajok ICM-jétől távolabb klasztereződik, és hogy az ERSE-stádium a pluripotencia szabályozását tekintve közelebb áll a szérumban-ESC sejtekhez. Ezzel szemben, a patás fajokban a pluripotencia szabályozása az ICM-ben közelebb áll az ERSE-stádiumhoz (más szavakkal a génexpressziós mintázat jobban hasonlít a két stádium között) (Bernardo et al., 2018). A naiv stádiumhoz kapcsolódó kulcsgeének, mint például az *Esrrb*, *Tfcp2l1* és *Klf4* a későbbi ERSE- és APE-stádiumban fajoként elcsendesültek, expressziójuk nem volt detektálható, ami egyértelmű naiv jellegzetességet jelez a három faj ICM sejtjeiben. A fentebb részletezett irodalmi adatokat és saját eredményeinket összevetve a két pluripotencia állapotot fenntartó génexpressziós kaszkád két fő modulját a következő ábrán szemléltetem (38. ábra).



38. ábra: A naiv és primed pluripotencia állapot fenntartásában szerepet játszó transzkripciós modulok. A fajok között konzervált géneket, amelyek mindhárom vizsgált faj ICM-ERSE átmenetben szerepet játszanak **vastagított** betűvel emeltem ki (Bernardo et al., 2018 közleménye alapján módosítva).

Az embrióadatokban megfigyelt molekuláris változások együttesen lehetővé tették számunkra, hogy azonosítsunk: 1) konzervált új markereket mind a naiv, mind a primed pluripotenciát illetően; 2) különböző különbségeket az egér- és patás fajok között a pluripotencia-markerek és a jelátvitelben szerepet játszó gének expressziója tekintetében, valamint 3) a jelenlegi ESC-rendszerek számos olyan jellemzőjét, amelyek *in vivo* megfelelőikben nincsenek jelen. Ami még fontosabb, 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.

5.5 Betegségmodellezés iPSC sejtekkel

A definíció szerint az egyes ritka betegségek a népességnek csak egy kis hányadát érintik, de együttesen a világ népességének több mint 6%-át teszik ki. Az egyes betegségekben érintett betegek kis száma és széles fenotípusos heterogenitásuk miatt nagyon kevés tanulmány derítette fel egy-egy ritka betegség patofiziológiai mechanizmusait, így még mindig nincs elérhető kezelés a ritka betegségek több mint 60%-ára. A lizoszomális tárolási rendellenességek (LSD) a ritka betegségek egyik olyan csoportja, ahol fontos lenne a patofiziológiai vizsgálatok intenzívebbé tétele a lehetséges gyógymódok fejlesztése érdekében.

Az emberi iPSC-k felfedezése (Takahashi and Yamanaka 2006; Takahashi et al., 2007) lehetőséget nyitott az egyes betegségek kialakulásának tanulmányozására az érintett sejttípusok differenciálódásának vizsgálata által, betegségspecifikus iPSC sejtek előállítása révén. Jelenleg 11 LSD esetén hoztak létre iPSC sejteket a betegekből, ami kiemeli a terület fontosságát és a technológiában rejlő lehetőségeket (Borger et al., 2017). Tolar és munkatársai Hurler-szindróma (MPS IH) specifikus hiPSC-eket hoztak létre, és demonstrálták a génkorrigált autológ vérképző őssejtek előállításának lehetőségét (Tolar et al., 2011). MPS II betegségben csak egy beszámoló jelent meg tanulmányom elkészítéséig hiPSC izolálásáról, azonban sem a citopatológiát, sem a neurodegeneráció mechanizmusát nem vizsgálták a szerzők (Reboun et al., 2016).

Munkánk során az új terápiás utak és a pathomechanizmus pontosabb feltárása érdekében egy új iPSC-alapú sejtmodellt hoztunk létre különböző mutációkat hordozó betegekből származó vérsejtek genetikai újraprogramozása révén (Varga et al., 2016a; Varga et al., 2016c; Varga et al., 2016b; Varga et al., 2016d).

5.5.1 Az iPSC alapú MPS II betegség modell GAG és tároló vakuolumok felhalmozódását rekonstruálja neuronális sejtekben

A lizoszomális tároló vakuolumok intracelluláris felhalmozódása a legtöbb LSD egyik citopatológiai jellemzője. A vakuolumok ultrastrukturális morfológiája néhány LSD-ben az érintett sejttípusokban is kimutatható, valamint a GAG-felhalmozódás és a tároló vezikulák jelenléte közötti korreláció is ismert (Platt et al., 2012). Bár a neurodegeneráció citopatológiája az MPS II betegségben ismeretlen, más LSD betegségekben csökkent IDS enzimaktivitás, GAG felhalmozódás, valamint az ELS, ER, Golgi és mitokondriumok diszfunkciója közötti kapcsolatot dokumentáltak korábban (Platt et al., 2012). Amikor a sejtek GAG szintjét vizsgáltam, fokozott GAG-akkumulációt találtam az MPS II iPSC sejtekben és az azokból differenciáltatott neuronális sejtekben. Ezen túlmenően a beteg sejtekben fokozott tároló vakuolum felhalmozódást észleltem. Ezek az adatok együttesen azt mutatták, hogy az iPSC-alapú *in vitro* sejtrendszer megfelelően modellezi az MPS II citopatológiáját, és így felhasználható az MPS II további tanulmányozására.

Az MPS II mutációt hordozó NPC-kultúrákban az elsődleges tároló vezikulák emelkedett szintje volt megfigyelhető, amint azt az elektronmikroszkópos vizsgálatok és a lizoszóma-asszociált membrán glikoprotein 2 (LAMP2) fehérje expresszió is igazolta. Ugyanakkor nem volt kimutatható szignifikáns GAG-felhalmozódás az NPC-stádiumban, a kontrollokhoz képest. Több lizoszomális tárolási betegségben leírtak a betegek fibroblasztjaiban alacsonyabb endocitózis arányt (Cardone et al., 2008; Rappaport et al., 2016). Ismert, hogy mind az endocitotikus, mind az autofág útvonalak anyagokat szállítanak a lizoszomális kompartmentbe. Továbbá, a proliferáció és a sejthalál megfelelő lehetőséget biztosíthat az intracelluláris GAG molekulák és a sérült sejtorganellek szöveti szintű felhalmozódásának kezelésére, ezért ez egy adaptív válasz lehet a lizoszomális tárolási betegségekben, még akkor is, ha ez idő előtti differenciálódáshoz vezet egyes sejttípusokban. Vélhetően az alacsonyabb GAG szint az NPC sejtek azon képességével függhet össze, hogy képesek az intracelluláris GAG-ok exocitálására. Ismert, hogy mind a késői endoszómák (multivezikuláris testek), mind a lizoszómák képesek a plazmamembránnal fuzionálni, hogy tartalmukat az extracelluláris térbe juttassák. Bár a szekréciónak ez a nem hagyományos módja kevésbé ismert, ennek az útvonalnak az aktivitását jelzi a transzkripciós faktor EB (TFEB) megemelkedett expressziója. Irodalmi adatok alapján

megemelkedett TFEB expressziót írtak le a Pompe-kór egérmodelljében (Spampanato et al., 2013), az MPS IIIA (Sanfilippo szindróma) egérmodelljében és egy multiplex szulfatázhiányos (MSD) modellben is (Medina et al., 2011), ami összhangban volt a TFEB immunlokalizációs eredményeimmel. Ez a mechanizmus egyben magyarázatot adhat arra, hogy a CNS-ben a gerincvelői folyadék hogyan koncentrálhatja a GAG-okat és a GAG-fragmentumokat, amely kórjelző a betegekben. Tudomásom szerint tanulmányom az első, amely a neuronális szövetekben a betegség fejlődési aspektusaira mutat rá, feltárva egy lehetséges patomechanizmus kialakulási útvonalat.

5.5.2 Autofagoszóma-képződés szerepe az MPS II neuropatológiájában

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 (Samie and Xu 2014). Az mTORC1 (*mammalian target of rapamycin*) szerin-treonin kináz szerepe az autofágia szabályozásában jól dokumentált. A károsodott lizoszomális funkciók gyengítik az mTOR-aktivitást, ami a TFEB jelátvitel aktiválódásához vezet, mind a lizoszomális útvonal (Sardiello et al., 2009; Settembre et al., 2011), mint az autofágia tekintetében (Settembre et al., 2011). Mások a TFEB túlnyomóan nukleáris lokalizációját mutatták ki tenyésztett sejtekben (Schultz et al., 2011) és egy MPS II egérmodellben is (Sardiello et al., 2009; Biever et al., 2015). Vizsgálataimban a TFEB fehérje hasonló lokalizációját figyeltem meg, egyértelmű dominanciával az MPS II betegek sejtjeinek sejtmagjában. Az autofágia részvétele a neurális progenitor sejtek önmegújulásában és differenciálódásában jól ismert (Chen et al., 2018). A megnövekedett LC3-I szint alapján feltételezhető, hogy mind az AMPK, mind a TFEB útvonalak aktiválódhattak az MPS II neuronokban és asztrocitákban, ahol az autofagoszóma képződés indukálódott.

A LAMP2 szintje minden MPS II érintett sejtvonalon megnövekedett. A LAMP2 kompartment növekedése minden bizonnyal a lizoszomális rendszer részvételét feltételezi az MPS II citopatológiájában, amely az IDS-hiány miatt felhalmozódott, meg nem emésztett GAG-okra utal. Ez a következtetés együtt a LAMP2 pozitív kompartmentek azon tulajdonságával, hogy exocitózison keresztül képesek kiüríteni a raktározott anyagot, alátámasztja Spampanato és munkatársai eredményeit, akik Pompe-kórban az exocitált vezikulák LAMP1- és LC3-pozitív voltát azonosították (Spampanato et al., 2013).

5.5.3 Golgi deformációk és ER-stressz is része az MPS II citopatológiájának

A Golgi részvételét az MPS betegségek citopatológiájában az N-acetil-alfa-glükózaminidáz (NAG) mutációja által okozott MPS IIIB (Sanfilippo szindróma) esetében Vitry és munkatársai írták le egérmodellben (Vitry et al., 2010). Golgi membrán deformációkat figyeltek meg, beleértve a szélesebb ciszternákat, belső bulbusokat és kitágult öblöket az MPS IIIB agykérgi neuronokban, és a Golgi-komplex dezorganizáció hatását feltételezték a citopatológia kialakulásában (Vitry et al., 2010). Nagyon hasonló deformációk voltak megfigyelhetők az iPSC-ből származó MPS II modellben a Golgi membránban. Annak megállapítása, hogy a Golgi stressznek van-e szerepe a tároló vakuolumok kialakulásának elindításában, vagy ez a lizoszomális és/vagy ER kompartment zavarainak következménye, további részletes vizsgálatot igényel.

Az ER stresszel kapcsolatos, tágult ER-ciszternák gyakori előfordulása volt megfigyelhető mind az MPS II NPC sejtekben, mind a TD35 kultúrákban elektronmikroszkópos vizsgálatokban. Stresszhelyzetekre, mint például a hibás fehérjék felhalmozódása vagy a Ca^{2+} raktárak kimerülése az ER ciszternákban az XBP1 (*X-box binding protein 1*) mRNS (XBP1(U)) transzkripció faktor alternatív splicingjához vezet. Vizsgálataimban az XBP1 splice-olt formájának szignifikánsan emelkedett szintjét mutattam ki MPS II NPC-kben, amely az ER stressz MPS II citopatológiájában való részvételére utal. Ez megegyezik más LSD betegségekben leírtakkal, habár más sejtípusok esetében (Platt et al., 2012).

5.5.4 Az MPS II neuronális kultúrákban az asztrociták az elsődlegesen érintett sejtek

Az egyik LSD-ben, a multiplex szulfatáz deficiencia (MSD), amelyet a szulfatáz módosító faktor 1 (SUMF1) gén mutációi okoznak (Di Malta et al., 2012) a *Sumf1* mutáns egerek agyában a GFAP-pozitív asztrociták masszív vakuolizációjáról számoltak be. A vakuolumok ubikvitin pozitív aggregátumokkal együtt lokalizálódtak mind a neuronokban, mind a mikroglia sejtekben, ami megfelel a P62/SQSTM1 citoplazmatikus növekedésének (Di Malta et al., 2012). Vizsgálataimban a betegek TD35 mintáiban a GFAP pozitív asztrocitákban fokozott LAMP2+ vakuolizációt figyeltem meg. Érdekes módon ez a fenotípus megfigyelhető volt a mutációt hordozó anya (Ctrl-M.1) néhány neuronális mintájában is, ami arra utal, hogy őt is érintette a betegség sejt szinten, azonban fenotípusos jeleket nem mutatott a mintavétel időpontjáig. Az MPS II neurontenyészetekben masszív tárolóvákuum-felhalmozódás volt megfigyelhető, fokozott sejthalállal, ami az asztrocitákban jobban érvényesült. Ez a sejt típus-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 (Chandrasekaran et al., 2016). Az asztrociták diszfunkciója számos LSD-ben megfigyelhető, és feltételezhető, hogy hatással van a neurodegenerációra (Rama Rao and Kielian 2016), akárcsak számos más neurodegeneratív rendellenességben (Chandrasekaran et al., 2016). Ezek alapján kézenfekvő a következtetés, hogy ha az asztrociták károsodnak a kerge neuronok differenciálódásának és túlélésének támogatásában, az szöveti szinten sejthalálhoz és neurodegenerációhoz vezethet. Vagyis az MPS II asztrogliában károsodás közvetlenül hat a neuronok életképességére és növeli a neurodegeneráció kockázatát. Abban az esetben, ha a neuronok metabolizmusa és energia háztartása a mutáció következtében sérül – vakuolumok felhalmozódása, sérült ECM metabolizmus, Golgi- és ER-stressz – a két hatás, vagyis a sérült asztrogliában funkcióval együtt exponenciális hatást eredményezhet szöveti szinten, amely jelentős degenerációt és diszfunkciót okoz.

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 sejt szintű patológiájának tanulmányozására. Arra a következtetésre jutottam, hogy az NPC-kultúrák jó modellrendszert nyújthatnak az MPS II alapvető citopatológiai eseményeinek vizsgálatára. Ezzel szemben a TD35 kultúrák hatékony *in vitro* modellt biztosítanak a különböző sejt típusoknak (pl. különböző neuron típusok, asztrociták, oligodendrociták) a betegség citopatológiai jellemzőiben való részvételének vizsgálatára. Bár a létrehozott modellrendszert a betegség neuropatológiájának megfigyelésére használtam, az iPSC sejtek pluripotens jellege azt jelenti, hogy eszközként szolgálhat a gyógyszerkísérletekhez, génterápiás vizsgálatokhoz és a betegség sejtek szintjén történő megértésének további tanulmányozásához, számos olyan sejt típusban, amelyeket súlyosan érint ez a betegség (például porcszövet), amelynek jelenleg nincs hatékony kezelése. Tanulmányom újszerű információkkal szolgál a betegség előrehaladásáról, ami megnyitja a betegség minél korábbi felismerését segítő biomarkerek megtalálásának lehetőségét is.

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 enzim-pótló terápiával és δ -tokoferol kezeléssel jelentős javulás volt előidézhető, amely a modellrendszer alkalmasságát és felhasználási lehetőségeit támasztja alá (Hong et al., 2022). A patomechanizmus kapcsán feltárt ER- és Golgi stresszt több tanulmány is kiemeli és a lehetséges terápiás fejlesztések során figyelembeveendőként említi (Matsuhisa and Imaizumi 2021; Leal et al., 2023; Carvalho et al., 2024).

5.6 Össejtek felhasználása toxikológiai vizsgálatokban

5.6.1 Neurotoxikológiai alkalmazások: 2D és 3D *in vitro* sejtrendszerek

A neurotoxikológiai szűrést lehetővé tévő *in vitro* platformok fejlesztését a vegyipar, az élelmiszeripar, a kozmetikai ipar és a gyógyszeripar sürgető igényei vezérlik. A legtöbb neurotoxikológiai vizsgálatot rácsalókon vagy rácsalóból származó primer sejteken végzik, ami viszonylag magas költségeket és a faji különbségek miatt az eredmények alacsonyabb transzlációs értékét eredményezi (Hartung 2008; Baumann et al., 2016), valamint komoly költség és időbeli igénnyel rendelkezik. Jelentős nemzetközi kezdeményezések indultak a hagyományos, állatokon végzett neurotoxicitási vizsgálatok *in vitro* vizsgálatokra való átállítására, amelyekben emlősök neurális szövetéből származó sejteket és emberi sejteket használnak a kémiai veszélyek kimutatására és előrejelzésére (Tukker et al., 2016; Tukker et al., 2018). Azonban csak korlátozott számú humán neuronális sejtvonal áll rendelkezésre (pl. karcinóma sejtvonalak, mint az SH-SY5Y; BE2-M17 vagy immortalizált sejtvonalak, mint a LUHMES), ugyanakkor a neurotoxikológiai vizsgálatokhoz primer központi idegrendszeri sejtek beszerzése erősen limitált, a *post-mortem* sejtforrás minősége sokszor kérdéses, nem megfelelően az etikai kérdésekről. A különböző iPSC-k áthidalhatják ezt a problémát, és azt az előnyt kínálják, hogy többféle, de azonos 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 (Fritsche et al., 2018a). Így például a 2D neurotoxicitási szűrés során dinamikusan növekszik az iPSC-kból származó neurontenyészetek, különösen a kereskedelmi forgalomban kapható QC-ellenőrzött neuron- és asztrocitakultúrák használata, ahol már az iPSC-k differenciálása nem szükséges a "felhasználók" számára, így kisebb költség és egyszerűbb felhasználás társul hozzájuk (Tukker et al., 2018).

Az elmúlt években számos *in vitro* modellt hoztak létre a CNS fiziológiai vizsgálatára. 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, amelyek a gyógyszer- vagy toxicitásszűréshez elengedhetetlenek (Pamies et al., 2017). A neuronális betegségek modellezésében például jelentős, új távlatokat nyitó lépés volt az agykérgi rétegek szerveződéséhez hasonlatos elrendeződést mutató 3D agyi mikroszövetek kifejlesztése, amely humán PSC-kból *in vitro* körülmények között kialakuló komplex rendszert biztosít (Kadoshima et al., 2013; Lancaster et al., 2013). A toxikológiai vizsgálatokhoz azonban jelenleg az ilyen komplex rendszerek nagyon alacsony áteresztőképessége és a minták közötti jelentős variancia komoly korlátozó tényező.

A közelmúltban iPSC-ből származó agykérgi neuronokat és asztrocitákat 3D szövettenyészetben együtt tenyésztettek (kokultúra), hogy kimutassák egy kémiai vegyület hatását a Ca-homeosztázisra, a kalcium-oszcilláció mérésével (Sirenko et al., 2019). Egy másik tanulmány egy új 3D heterotipikus modellt mutatott be új glioblasztóma-ellenes szerek szűrésére (Plummer et al., 2019). Ez az új alkalmazás rávilágított az iPSC-ből származó platformok rugalmasságára a betegségmodellezés, a gyógyszerkísérletek és a toxikológia területén.

Az eddig felsorakoztatott irodalmi adatok megmutatják, hogy milyen széleskörű felhasználási lehetőségek rejlenek az iPSC technológia toxikológiai alkalmazásaiban. Ezért kézenfekvő választás volt, hogy tanulmányomban elemezzem a hiPSC-eredetű 3D neuroszferoidok neurotoxikológiai alkalmazásának lehetőségét. 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. Eredményeimet értékelve elmondható, hogy a létrehozott differenciálódási rendszer hasonló morfológiát és érési tulajdonságokat mutatott, mint egy

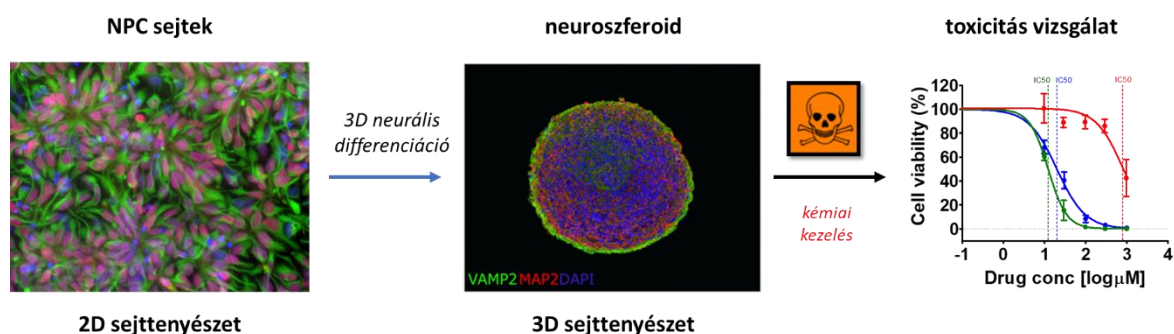
korábbi tanulmány, amelyben 3D organoidokat hoztak létre és jellemeztek nyolc héten keresztül (Pamies et al., 2017). Az általam felállított rendszerben azonban nem volt szükség BDNF, GDNF vagy speciális elektrofiziológiai érést elősegítő közeg használatára; egy alapközeg elegendő volt a komplex szferoidok differenciálódásának elősegítéséhez hathetes tenyésztésen belül. Bár a szferoidok folyamatos növekedést és fejlődést/érést mutattak, a 96-lyukú tenyésztőedények egyes mintái között mind a szferoidok átmérője, mind a teljes fehérjetartalom nagyon alacsony eltérést mutatott egy adott időpontban. A minták alacsony variabilitása és a magas homogenitás döntő fontosságú, ha a cél egy megbízható HTS kifejlesztése a fejlődés neurológiai toxicitás vizsgálatokhoz.

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 vegyület a modell validálása céljából. Eredményeim rávilágítottak a vizsgált anyagok vegyület-specifikus és differenciálódási stádiumhoz kötött hatására, ami lehetőséget adott a vegyületek hatásos EC₅₀ és EC₁₀ értékeinek meghatározására. A Colchicine például erős toxikus hatást fejtett ki a neuroszferoidokra és az EC₅₀-értékek nagyon hasonlóak voltak minden differenciálódási stádiumban. A vegyület egyszerre gátolja az alapvető sejt- (fehérje-összeszerelődés, endocitózis, exocitózis, sejtmozgás stb.) és neuronális funkciókat (tubulin filamentumok összeszerelődése a neuritok mikrotubulusaiban), ami feltételezhetően minden differenciálódási szakaszban megtörténik a neuronális sejtekben. Hasonló neurotoxikus hatást írtak le NSC-k, neuronok és asztrociták iPSC-ből származó 2D kultúráin (Pei és mtsai. 2016) és LUHMES-sejteken is (Delp et al., 2018). Az EC₁₀ és EC₅₀ értékek összehasonlításával egy másik példa a doxorubicin, ahol a D42 minták voltak a legérzékenyebbek a kezelésre, amikor intenzív fehérjeszintézis történhetett mind a neuronokban, mind a gliasejtekben (pl. neurotranszmitter szintézis, axonális növekedés, oligodendrocyta érés), ezért a transzkripció gépezet esetleges blokkolása jelentős hatással lehet a sejtek életképességére. Folytatva a sort az elektron szállító láncot gátló Hexachlorophene vegyületével, a GLUD1-re hatva befolyásolja egy neurotranszmitter, a glutamát forgalmát. Ez a hatás magyarázatot adhat a neuroszferoidok differenciálódási stádiumhoz kapcsolódó, megfigyelt érzékenységi különbségeire, még akut expozíciós séma mellett is (72 órás expozíciós idő).

A valproát DNT toxikus vegyületként ismert. A sejtek életképességét vizsgáló tesztben azonban nincs kimutatható hatása a vizsgált koncentrációtartományban, ami összefügghet a kezelt sejtek érettségével. Ugyanis a 3D neuroszferoidok nem a korai idegfejlődés (idegcső stádium), hanem az érő neuronokat és asztrocitákat tartalmaznak főként. Meg kell jegyezni, hogy a citotoxicitási értékek önmagukban nem alkalmasak a DNT előrejelzésére, bár alkalmasak a vegyületek neurotoxikus hatásának előrejelzésére vagy a nekrosis kimutatására differenciálódó kultúrákban, egy vegyület DNT-hatásának értékeléséhez relevánsabb végpontokat (pl. proliferáció, migráció, apoptózis, hálózatképződés, szinaptogenezis, neuritok növekedése) szükséges vizsgálni (Bal-Price et al., 2018b).

A Rotenone egy peszticid, amely gátolja az elektrontranszportlánc mitokondriális komplex I-et, jelentős sejtpusztulást eredményez, az expozíció hatását széles körben vizsgálták. Az iPSC-ből származó neuron-asztrogliá 2D sejt kultúrákban a Rotenone által kiváltott oxidatív stressz hatására az Nrf2/ARE útvonal aktiválódását dokumentálták, ami az asztrociták aktiválódásához és a neuronok sejthalálához vezetett (Pei et al., 2016; Pistollato et al., 2017; Zagoura et al., 2017). Kísérleteimben a Rotenonnak kitett 3D neuroszferoidokban fokozott sejthalált és mitokondriális diszfunkciót észleltem, hasonlóan mások eredményeihez (Pamies et al., 2018), amely tovább erősíti a létrehozott tesztrendszer helytállóságát. Ezzel szemben az ibuprofennek nem volt hatása a neuronális sejtek életképességére a vizsgált koncentrációtartományban, ahogy az ismert *in vitro* és *in vivo* adatok alapján várható volt.

Eredményeimet összefoglalva elmondható, hogy létrehoztam és értékeltem egy hiPSC-alapú 3D *in vitro* sejtmódellet különböző vegyületek neurotoxikus hatásának vizsgálatára. A különböző differenciálódási stádiumokban meghatároztam a vegyületek sejtek életképességére gyakorolt koncentráció-függő hatását. Az eredmények alapján elmondható, hogy az ismert toxicitású vegyületek a korábban publikált hatásokat mutatták a 3D neuroszferoid rendszerben. Egy neurotoxikus vegyület, a Rotenone esetében apoptózis, ER-stressz és ultrastrukturális vizsgálatot végezve a vegyület sejtszintű hatását detektáltam, hogy bizonyítsam a vegyület-specifikus hatást, ezzel a modellrendszer toxicitás tesztelésre való alkalmasságát. A jól ismert vegyülethatások vizsgálata, az iPSC-alapú tesztrendszer validálásának feltétele. A validált tesztrendszer lehetőséget biztosít arra, hogy hiPSC-eredetű sejtek felhasználásával új, CNS-releváns adatokat hozzunk létre más vegyületekről is. A továbbiakban egy DNT-releváns gyakorló vegyületkészlet alkalmazásával a 3D neuroszferoidok DNT-szűrésre való alkalmasságának értékelését szükséges majd elvégezni, hogy a vizsgálati rendszer kiterjeszhető legyen. A létrehozott tesztrendszer elemeit a 39. Ábrán mutatom be.



39. ábra: Neurotoxikológiai modellezés 3D pluripotens őssejt alapú sejttenyészetekben. A hagyományos 2D sejttenyészetben iPSC sejtekből differenciáltatott NPC-k 3D sejttenyészetben aggregáltatva különböző időpontokban eltérő fejlődési stádiumoknak feleltethetők meg és alkalmasak az adott stádium modellezésére, kémiai anyagok hatásának tesztelésére. A különböző molekuláris vizsgálatok révén eltérő read-out készlettel (pl dózishatás, génexpresszió, fehérje expresszió, jelzőgén aktivizálódása) különböző következtetések vonhatóak le a vizsgált anyagok tekintetében, amely fontos, alternatív toxikológiai vizsgálati rendszert biztosít (kibolák et al., 2020 alapján módosítva).

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 teszik, 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, beleértve a DNT-vizsgálatokat is.

Habár a tesztrendszer létrehozása 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 őssejttenyészetek 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. Az alternatív toxikológiai rendszerek az ún. NAM-ok (*new approach methods*) térhódítása is ebbe az irányba mutat, így, ha a különböző eredetű és fajokból származó őssejt-alapú tesztrendszerek protokolljai elfogadottá válhatnak, az komoly előrelépést eredményezhet a toxikológiai kutatások és alkalmazások terén.

6 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 őssejtvonalakat (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 őssejttenyészetek 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 út vonal diszfunkcionalitása miatt következik be.
5. 3D szövettenyésztési módszer alkalmazásával több sejtípusból álló szövetszerű struktúrára jellemző neurális tenyészeteket differenciáltattam 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.

7 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; Pirtity, 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; Teglassi, 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; Dinnyes, A; Dokler, J; Dolde, X; Exner, TE; Fisher, C; Fluri, D; Forsby, A; Hengstler, JG; Holzer, A-K; Janstova, Z; Jennings, P; Kisitu, J; Kobolák, J; Kumar, M; Limonciel, A; Lundqvist, J; Mihalik, B; Moritz, W; Pallocca, G; Ulloa, APC; Pastor, M; Rovida, C; Sarkans, U; Schimming, JP; Schmidt, BZ; Stöber, R; Strassfeld, T; van de Water, B; Wilmes, A; van der Burg, B; Verfaillie, CM; von Hellfeld, R; Vrieling, H; Vrijenhoek, NG; Leist, M. 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; Tancos, 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
- Tancos, 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.

8 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 Ferencz, Dr. Bősze 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 vezetőjükként vagy társ-témavezetőként irányítottam a munkájukat és barátomként tisztelhetem őket a mai napig: Dr. Polgár Zsuzsanna, Dr. Bock István, Dr. Varga Eszter, Dr. Táncos 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 áldozatos és kitartó 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 számos kollégának és közreműködőnek. Szeretnék köszönetet mondani 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 nyúlembrió manipulációkkal és expressziós 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 Balázsnak, akik lehetőséget biztosított egy új tudományterület felé való váltásra, új lehetőségek megtalálására az állatbiotechnológia területén. Külön köszönöm Dr. Kaszab Edit kitartó 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 újraprogramozással létrehozott sejtvonalak és jellemzésük: 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 Plurisy projekt (OMFB-00236/2010).

Az MPS II iPSC modell létrehozásához: Az EU FP7 („Anistem” PIAPP-GA-2011-286264; „STEMMAD” PIAPP-GA-2012-324451; „EpiHealthNet” PITN-GA-2012-317146), valamint az Európai Unió Horizont 2020 programjának Marie Skłodowska-Curie "The CaSR Biomedicine Network" projektje (675228 számú REA támogatási megállapodás).

Az iPSC sejteken végzett toxikológia vizsgálatokhoz az Európai Unió Horizont 2020 kutatási és innovációs keretprogramja nyújtott támogatást a 681002. számú támogatási megállapodás (EU-ToxRisk) keretében.

9 FELHASZNÁLT IRODALOM

- Aboul-Soud, M. A. M., A. J. Alzahrani and A. Mahmoud (2021). "Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)-Roles in Regenerative Therapies, Disease Modelling and Drug Screening." *Cells* **10**(9) DOI: 10.3390/cells10092319
- Agarwal, Y., C. Beatty, S. Biradar, I. Castronova, S. Ho, K. Melody and M. T. Bility (2020). "Moving beyond the mousetrap: current and emerging humanized mouse and rat models for investigating prevention and cure strategies against HIV infection and associated pathologies." *Retrovirology* **17**(1): 8 DOI: 10.1186/s12977-020-00515-3
- Aguilera-Castrejon, A., B. Oldak, T. Shani, N. Ghanem, C. Itzkovich, S. Slomovich, S. Tarazi, J. Bayerl, V. Chugaeva, M. Ayyash, S. Ashoukhi, D. Sheban, N. Livnat, L. Lasman, S. Viukov, M. Zerbib, Y. Addadi, Y. Rais, S. Cheng, Y. Stelzer, H. Keren-Shaul, R. Shlomo, R. Massarwa, N. Novershtern, I. Maza and J. H. Hanna (2021). "Ex utero mouse embryogenesis from pre-gastrulation to late organogenesis." *Nature* **593**(7857): 119-124 DOI: 10.1038/s41586-021-03416-3
- Alepee, N., A. Bahinski, M. Daneshian, B. De Wever, E. Fritsche, A. Goldberg, J. Hansmann, T. Hartung, J. Haycock, H. Hogberg, L. Hoelting, J. M. Kelm, S. Kadereit, E. McVey, R. Landsiedel, M. Leist, M. Lubberstedt, F. Noor, C. Pellevoisin, D. Petersohn, U. Pfannenbecker, K. Reisinger, T. Ramirez, B. Rothen-Rutishauser, M. Schafer-Korting, K. Zeilinger and M. G. Zurich (2014). "State-of-the-art of 3D cultures (organs-on-a-chip) in safety testing and pathophysiology." *ALTEX* **31**(4): 441-477 DOI: 10.14573/altex.1406111
- Alle, Q., E. Le Borgne, O. Milhavet and J. M. Lemaître (2021). "Reprogramming: Emerging Strategies to Rejuvenate Aging Cells and Tissues." *Int J Mol Sci* **22**(8) DOI: 10.3390/ijms22083990
- Amadei, G., C. E. Handford, C. Qiu, J. De Jonghe, H. Greenfield, M. Tran, B. K. Martin, D. Y. Chen, A. Aguilera-Castrejon, J. H. Hanna, M. B. Elowitz, F. Hollfelder, J. Shendure, D. M. Glover and M. Zernicka-Goetz (2022). "Embryo model completes gastrulation to neurulation and organogenesis." *Nature* **610**(7930): 143-153 DOI: 10.1038/s41586-022-05246-3
- Ambrosetti, D. C., C. Basilico and L. Dailey (1997). "Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites." *Mol Cell Biol* **17**(11): 6321-6329 DOI: 10.1128/MCB.17.11.6321
- Andrews, P. W., M. M. Matin, A. R. Bahrami, I. Damjanov, P. Gokhale and J. S. Draper (2005). "Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin." *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 6): 1526-1530 DOI: 10.1042/BST0331526
- Aston, K. I., G. P. Li, B. A. Hicks, B. R. Sessions, A. P. Davis, Q. A. Winger, L. F. Rickords, J. R. Stevens and K. L. White (2009). "Global gene expression analysis of bovine somatic cell nuclear transfer blastocysts and cotyledons." *Mol Reprod Dev* **76**(5): 471-482 DOI: 10.1002/mrd.20962
- Avilion, A. A., S. K. Nicolis, L. H. Pevny, L. Perez, N. Vivian and R. Lovell-Badge (2003). "Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function." *Genes Dev* **17**(1): 126-140 DOI: 10.1101/gad.224503
- Azuara, V., P. Perry, S. Sauer, M. Spivakov, H. F. Jorgensen, R. M. John, M. Gouti, M. Casanova, G. Warnes, M. Merkenschlager and A. G. Fisher (2006). "Chromatin signatures of pluripotent cell lines." *Nat Cell Biol* **8**(5): 532-538 DOI: 10.1038/ncb1403
- Bai, C., X. Li, Y. Gao, Z. Yuan, P. Hu, H. Wang, C. Liu, W. Guan and Y. Ma (2016). "Melatonin improves reprogramming efficiency and proliferation of bovine-induced pluripotent stem cells." *J Pineal Res* **61**(2): 154-167 DOI: 10.1111/jpi.12334
- Bal-Price, A., K. M. Crofton, M. Leist, S. Allen, M. Arand, T. Buetler, N. Delrue, R. E. FitzGerald, T. Hartung, T. Heinonen, H. Hogberg, S. H. Bennekou, W. Lichtensteiger, D. Oggier, M. Paparella, M. Axelstad, A. Piersma, E. Rached, B. Schilter, G. Schmuck, L. Stoppini, E. Tongiorgi, M. Tiramani, F. Monnet-Tschudi, M. F. Wilks, T. Ylikomi and E. Fritsche (2015). "International STakeholder NETwork (ISTNET): creating a developmental neurotoxicity (DNT) testing road map for regulatory purposes." *Arch Toxicol* **89**(2): 269-287 DOI: 10.1007/s00204-015-1464-2
- Bal-Price, A., H. T. Hogberg, K. M. Crofton, M. Daneshian, R. E. FitzGerald, E. Fritsche, T. Heinonen, S. Hougaard Bennekou, S. Klima, A. H. Piersma, M. Sachana, T. J. Shafer, A. Terron, F. Monnet-Tschudi, B. Viviani, T. Waldmann, R. H. S. Westerink, M. F. Wilks, H. Witters, M. G. Zurich and M. Leist (2018a).

- "Recommendation on test readiness criteria for new approach methods in toxicology: Exemplified for developmental neurotoxicity." *ALTEX* **35**(3): 306-352 DOI: 10.14573/altex.1712081
- Bal-Price, A., F. Pistollato, M. Sachana, S. K. Bopp, S. Munn and A. Worth (2018b). "Strategies to improve the regulatory assessment of developmental neurotoxicity (DNT) using in vitro methods." *Toxicol Appl Pharmacol* **354**: 7-18 DOI: 10.1016/j.taap.2018.02.008
- Bal-Price, A. K., H. T. Hogberg, L. Buzanska, P. Lenas, E. van Vliet and T. Hartung (2010). "In vitro developmental neurotoxicity (DNT) testing: relevant models and endpoints." *Neurotoxicology* **31**(5): 545-554 DOI: 10.1016/j.neuro.2009.11.006
- Bal-Price, A. K., C. Sunol, D. G. Weiss, E. van Vliet, R. H. Westerink and L. G. Costa (2008). "Application of in vitro neurotoxicity testing for regulatory purposes: Symposium III summary and research needs." *Neurotoxicology* **29**(3): 520-531 DOI: 10.1016/j.neuro.2008.02.008
- Ball, N., R. Bars, P. A. Botham, A. Cuciureanu, M. T. D. Cronin, J. E. Doe, T. Dudzina, T. W. Gant, M. Leist and B. Van Ravenzwaay (2022). "A framework for chemical safety assessment incorporating new approach methodologies within REACH." *Archives of Toxicology* **96**(3): 743-766 DOI: 10.1007/s00204-021-03215-9
- Ballen, K. K., E. Gluckman and H. E. Broxmeyer (2013). "Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond." *Blood* **122**(4): 491-498 DOI: 10.1182/blood-2013-02-453175
- Ban, H., N. Nishishita, N. Fusaki, T. Tabata, K. Saeki, M. Shikamura, N. Takada, M. Inoue, M. Hasegawa, S. Kawamata and S. Nishikawa (2011). "Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(34): 14234-14239 DOI: 10.1073/pnas.1103509108
- Bao, L., L. He, J. Chen, Z. Wu, J. Liao, L. Rao, J. Ren, H. Li, H. Zhu, L. Qian, Y. Gu, H. Dai, X. Xu, J. Zhou, W. Wang, C. Cui and L. Xiao (2011). "Reprogramming of ovine adult fibroblasts to pluripotency via drug-inducible expression of defined factors." *Cell Res* **21**(4): 600-608 DOI: 10.1038/cr.2011.6
- Barberi, T., P. Klivenyi, N. Y. Calingasan, H. Lee, H. Kawamata, K. Loonam, A. L. Perrier, J. Bruses, M. E. Rubio, N. Topf, V. Tabar, N. L. Harrison, M. F. Beal, M. A. Moore and L. Studer (2003). "Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice." *Nat Biotechnol* **21**(10): 1200-1207 DOI: 10.1038/nbt870
- Baumann, J., K. Gassmann, S. Masjosthusmann, D. DeBoer, F. Bendt, S. Giersiefer and E. Fritsche (2016). "Comparative human and rat neurospheres reveal species differences in chemical effects on neurodevelopmental key events." *Arch Toxicol* **90**(6): 1415-1427 DOI: 10.1007/s00204-015-1568-8
- Beccari, L., N. Moris, M. Girgin, D. A. Turner, P. Baillie-Johnson, A. C. Cossy, M. P. Lutolf, D. Duboule and A. M. Arias (2018). "Multi-axial self-organization properties of mouse embryonic stem cells into gastruloids." *Nature* **562**(7726): 272-276 DOI: 10.1038/s41586-018-0578-0
- Bellingham, J., K. Gregory-Evans, M. F. Fox and C. Y. Gregory-Evans (2003). "Gene structure and tissue expression of human selenoprotein W, SEPW1, and identification of a retroprocessed pseudogene, SEPW1P." *Biochim Biophys Acta* **1627**(2-3): 140-146 DOI: 10.1016/s0167-4781(03)00078-2
- Bernardo, A. S., A. Jouneau, H. Marks, P. Kensche, J. Kobolak, K. Freude, V. Hall, A. Feher, Z. Polgar, C. Sartori, I. Bock, C. Louet, T. Faial, H. H. D. Kerstens, C. Bouissou, G. Parsonage, K. Mashayekhi, J. C. Smith, G. Lazzari, P. Hyttel, H. G. Stunnenberg, M. Huynen, R. A. Pedersen and A. Dinnyes (2018). "Mammalian embryo comparison identifies novel pluripotency genes associated with the naive or primed state." *Biol Open* **7**(8) DOI: 10.1242/bio.033282
- Betarbet, R., T. B. Sherer, G. MacKenzie, M. Garcia-Osuna, A. V. Panov and J. T. Greenamyre (2000). "Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease." *Nat Neurosci* **3**(12): 1301-1306 DOI: 10.1038/81834
- Beyhan, Z., A. E. Iager and J. B. Cibelli (2007). "Interspecies nuclear transfer: implications for embryonic stem cell biology." *Cell Stem Cell* **1**(5): 502-512 DOI: 10.1016/j.stem.2007.10.009
- Biever, A., E. Valjent and E. Puighermanal (2015). "Ribosomal Protein S6 Phosphorylation in the Nervous System: From Regulation to Function." *Front Mol Neurosci* **8**: 75 DOI: 10.3389/fnmol.2015.00075
- Blake, J. A., R. Baldarelli, J. A. Kadin, J. E. Richardson, C. L. Smith, C. J. Bult and G. Mouse Genome Database (2021). "Mouse Genome Database (MGD): Knowledgebase for mouse-human comparative biology." *Nucleic Acids Res* **49**(D1): D981-D987 DOI: 10.1093/nar/gkaa1083

- Blelloch, R., Z. Wang, A. Meissner, S. Pollard, A. Smith and R. Jaenisch (2006). "Reprogramming Efficiency Following Somatic Cell Nuclear Transfer Is Influenced by the Differentiation and Methylation State of the Donor Nucleus." *24*(9): 2007-2013
- Blomberg, L. A. and B. P. Telugu (2012). "Twenty years of embryonic stem cell research in farm animals." *Reprod Domest Anim* **47 Suppl 4**(s4): 80-85 DOI: 10.1111/j.1439-0531.2012.02059.x
- Boiani, M. and H. R. Scholer (2005). "Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(11): 872-884 DOI: 10.1038/nrm1744
- Borger, D. K., B. McMahon, T. Roshan Lal, J. Serra-Vinardell, E. Aflaki and E. Sidransky (2017). "Induced pluripotent stem cell models of lysosomal storage disorders." *Dis Model Mech* **10**(6): 691-704 DOI: 10.1242/dmm.029009
- Boroviak, T., R. Loos, P. Bertone, A. Smith and J. Nichols (2014). "The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification." *Nature Cell Biology* **16**(6): 513-525 DOI: 10.1038/ncb2965
- Bou, G., J. Guo, S. Liu, S. Guo, G. Davaakhuu, Q. Lv, B. Xue, S. Qiao, J. Lv, X. Weng, J. Zhao, Y. Zhang, Y. He, H. Zhang, Z. Chai, Y. Liu, Y. Yu, B. Qu, R. Sun, X. Shen, L. Lei and Z. Liu (2022). "OCT4 expression transactivated by GATA protein is essential for non-rodent trophectoderm early development." *Cell Reports* **41**(8): 111644 DOI: 10.1016/j.celrep.2022.111644
- Brack, A. S. and T. A. Rando (2012). "Tissue-specific stem cells: lessons from the skeletal muscle satellite cell." *Cell Stem Cell* **10**(5): 504-514 DOI: 10.1016/j.stem.2012.04.001
- Brambrink, T., K. Hochedlinger, G. Bell and R. Jaenisch (2006). "ES cells derived from cloned and fertilized blastocysts are transcriptionally and functionally indistinguishable." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(4): 933-938 DOI: 10.1073/pnas.0510485103
- Breunig, J. J., T. F. Haydar and P. Rakic (2011). "Neural stem cells: historical perspective and future prospects." *Neuron* **70**(4): 614-625 DOI: 10.1016/j.neuron.2011.05.005
- Brons, I. G., L. E. Smithers, M. W. Trotter, P. Rugg-Gunn, B. Sun, S. M. Chuva de Sousa Lopes, S. K. Howlett, A. Clarkson, L. Ahrlund-Richter, R. A. Pedersen and L. Vallier (2007). "Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos." *Nature* **448**(7150): 191-195
- Brunet-Simon, A., G. Henrion, J. P. Renard and V. Duranthon (2001). "Onset of zygotic transcription and maternal transcript legacy in the rabbit embryo." *Mol Reprod Dev* **58**(2): 127-136 DOI: 10.1002/1098-2795(200102)58:2<127::AID-MRD1>3.0.CO;2-A
- Bryda, E. C. (2013). "The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research." *Mo Med* **110**(3): 207-211
- Buecker, C., H.-H. Chen, J. M. Polo, L. Daheron, L. Bu, T. S. Barakat, P. Okwieka, A. Porter, J. Gribnau, K. Hochedlinger and N. Geijsen (2010). "A Murine ESC-like State Facilitates Transgenesis and Homologous Recombination in Human Pluripotent Stem Cells." *Cell Stem Cell* **6**(6): 535-546 DOI: 10.1016/j.stem.2010.05.003
- Byrne, J. (2011). "Global transcriptional analysis of oocyte-based and factor-based nuclear reprogramming in the nonhuman primate." *Cell Reprogram* **13**(6): 473-481 DOI: 10.1089/cell.2011.0033
- Byrne, J. A., D. A. Pedersen, L. L. Clepper, M. Nelson, W. G. Sanger, S. Gokhale, D. P. Wolf and S. M. Mitalipov (2007). "Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer." *Nature* **450**(7169): 497-502 DOI: 10.1038/nature06357
- Cardone, M., C. Porto, A. Tarallo, M. Vicinanza, B. Rossi, E. Polishchuk, F. Donaudy, G. Andria, M. A. De Matteis and G. Parenti (2008). "Abnormal mannose-6-phosphate receptor trafficking impairs recombinant alpha-glucosidase uptake in Pompe disease fibroblasts." *Pathogenetics* **1**(1): 6 DOI: 10.1186/1755-8417-1-6
- Carneiro, M., S. Afonso, A. Geraldès, H. Garreau, G. Bolet, S. Boucher, A. Tircazes, G. Queney, M. W. Nachman and N. Ferrand (2011). "The genetic structure of domestic rabbits." *Mol Biol Evol* **28**(6): 1801-1816 DOI: 10.1093/molbev/msr003
- Cartwright, P., C. McLean, A. Sheppard, D. Rivett, K. Jones and S. Dalton (2005). "LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism." *Development* **132**(5): 885-896 DOI: 10.1242/dev.01670
- Carvalho, S., J. I. Santos, L. Moreira, A. J. Duarte, P. Gaspar, H. Rocha, M. Encarnação, D. Ribeiro, M. Barbosa Almeida, M. Gonçalves, H. David, L. Matos, O. Amaral, L. Diogo, S. Ferreira, C. Santos, E. Martins, M. J. Prata, L. Pereira de Almeida, S. Alves and M. F. Coutinho (2024). "Modeling Lysosomal Storage

- Disorders in an Innovative Way: Establishment and Characterization of Stem Cell Lines from Human Exfoliated Deciduous Teeth of Mucopolysaccharidosis Type II Patients." International Journal of Molecular Sciences **25**(6): 3546
- Cauffman, G., I. Liebaers, A. Van Steirteghem and H. Van de Velde (2006). "POU5F1 isoforms show different expression patterns in human embryonic stem cells and preimplantation embryos." Stem Cells **24**(12): 2685-2691 DOI: 10.1634/stemcells.2005-0611
- Cauffman, G., H. Van de Velde, I. Liebaers and A. Van Steirteghem (2005). "Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development." Mol Hum Reprod **11**(3): 173-181 DOI: 10.1093/molehr/gah155
- Chambers, I., D. Colby, M. Robertson, J. Nichols, S. Lee, S. Tweedie and A. Smith (2003). "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." Cell **113**(5): 643-655 DOI: 10.1016/s0092-8674(03)00392-1
- Chambers, S. M., C. A. Fasano, E. P. Papapetrou, M. Tomishima, M. Sadelain and L. Studer (2009). "Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling." Nat Biotechnol **27**(3): 275-280 DOI: 10.1038/nbt.1529
- Chandrasekaran, A., H. X. Avci, M. Leist, J. Kobolak and A. Dinnyes (2016). "Astrocyte Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells: New Tools for Neurological Disorder Research." Front Cell Neurosci **10**: 215 DOI: 10.3389/fncel.2016.00215
- Chandrasekaran, A., H. X. Avci, A. Ochalek, L. N. Rosingh, K. Molnar, L. Laszlo, T. Bellak, A. Teglassi, K. Pesti, A. Mike, P. Phanthong, O. Biro, V. Hall, N. Kitiyanant, K. H. Krause, J. Kobolak and A. Dinnyes (2017). "Comparison of 2D and 3D neural induction methods for the generation of neural progenitor cells from human induced pluripotent stem cells." Stem Cell Res **25**: 139-151 DOI: 10.1016/j.scr.2017.10.010
- Chang, G., S. Liu, F. Wang, Y. Zhang, Z. Kou, D. Chen and S. Gao (2009). "Differential methylation status of imprinted genes in nuclear transfer derived ES (NT-ES) cells." Genomics **93**(2): 112-119 DOI: 10.1016/j.ygeno.2008.09.011
- Cheffer, A., L. J. Flitsch, T. Krutenko, P. Roderer, L. Sokhranyaeva, V. Iefremova, M. Hajo, M. Peitz, M. K. Schwarz and O. Brustle (2020). "Human stem cell-based models for studying autism spectrum disorder-related neuronal dysfunction." Mol Autism **11**(1): 99 DOI: 10.1186/s13229-020-00383-w
- Chen, C.-H., W.-F. Chang, C.-C. Liu, H.-Y. Su, S.-K. Shyue, W. T. K. Cheng, Y. E. Chen, S.-C. Wu, F. Du, L.-Y. Sung and J. Xu (2012). "Spatial and temporal distribution of Oct-4 and acetylated H4K5 in rabbit embryos." Reproductive BioMedicine Online **24**(4): 433-442 DOI: 10.1016/j.rbmo.2012.01.001
- Chen, J., J. W. Streb, K. M. Maltby, C. M. Kitchen and J. M. Miano (2001). "Cloning of a novel retinoid-inducible serine carboxypeptidase from vascular smooth muscle cells." J Biol Chem **276**(36): 34175-34181 DOI: 10.1074/jbc.M104162200
- Chen, X., Y. He and F. Lu (2018). "Autophagy in Stem Cell Biology: A Perspective on Stem Cell Self-Renewal and Differentiation." Stem Cells Int **2018**: 9131397 DOI: 10.1155/2018/9131397
- Chesselet, M. F. (2023). "A New Look at Animal Models of Neurological Disorders." Neurotherapeutics **20**(1): 1-2 DOI: 10.1007/s13311-023-01366-4
- Chew, J. L., Y. H. Loh, W. Zhang, X. Chen, W. L. Tam, L. S. Yeap, P. Li, Y. S. Ang, B. Lim, P. Robson and H. H. Ng (2005). "Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells." Mol Cell Biol **25**(14): 6031-6046 DOI: 10.1128/MCB.25.14.6031-6046.2005
- Choi, T. Y., T. I. Choi, Y. R. Lee, S. K. Choe and C. H. Kim (2021). "Zebrafish as an animal model for biomedical research." Exp Mol Med **53**(3): 310-317 DOI: 10.1038/s12276-021-00571-5
- Chou, S., P. Chu, W. Hwang and H. Lodish (2010). "Expansion of human cord blood hematopoietic stem cells for transplantation." Cell Stem Cell **7**(4): 427-428 DOI: 10.1016/j.stem.2010.09.001
- Choudhury, S., N. Surendran and A. Das (2021). "Recent advances in the induced pluripotent stem cell-based skin regeneration." Wound Repair Regen **29**(5): 697-710 DOI: 10.1111/wrr.12925
- Chung, Y. G., S. Ratnam, J. R. Chaillet and K. E. Latham (2003). "Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression in cloned mouse embryos." Biol Reprod **69**(1): 146-153 DOI: 10.1095/biolreprod.102.014076
- Cibelli, J. B., S. L. Stice, P. J. Golueke, J. J. Kane, J. Jerry, C. Blackwell, F. A. Ponce de Leon and J. M. Robl (1998). "Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells." Nat Biotechnol **16**(7): 642-646 DOI: 10.1038/nbt0798-642

- Clevers, H. (2016). "Modeling Development and Disease with Organoids." *Cell* **165**(7): 1586-1597 DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.082
- Cockburn, K. and J. Rossant (2010). "Making the blastocyst: lessons from the mouse." *The Journal of Clinical Investigation* **120**(4): 995-1003 DOI: 10.1172/JCI41229
- Crofton, K. M., W. R. Mundy and T. J. Shafer (2012). "Developmental neurotoxicity testing: a path forward." *Congenit Anom (Kyoto)* **52**(3): 140-146 DOI: 10.1111/j.1741-4520.2012.00377.x
- Davidson, K. C., E. A. Mason and M. F. Pera (2015). "The pluripotent state in mouse and human." *Development* **142**(18): 3090-3099 DOI: 10.1242/dev.116061
- de Ru, M. H., J. J. Boelens, A. M. Das, S. A. Jones, J. H. van der Lee, N. Mahlaoui, E. Mengel, M. Offringa, A. O'Meara, R. Parini, A. Rovelli, K. W. Sykora, V. Valayannopoulos, A. Vellodi, R. F. Wynn and F. A. Wijburg (2011). "Enzyme replacement therapy and/or hematopoietic stem cell transplantation at diagnosis in patients with mucopolysaccharidosis type I: results of a European consensus procedure." *Orphanet J Rare Dis* **6**: 55 DOI: 10.1186/1750-1172-6-55
- de Sant'Anna, J. R., C. C. Franco, P. C. Mathias and M. A. de Castro-Prado (2015). "Assessment of in vivo and in vitro genotoxicity of glibenclamide in eukaryotic cells." *PLoS One* **10**(3): e0120675 DOI: 10.1371/journal.pone.0120675
- Dean, W., F. Santos, M. Stojkovic, V. Zakhartchenko, J. Walter, E. Wolf and W. Reik (2001). "Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24): 13734-13738 DOI: 10.1073/pnas.241522698
- Degrelle, S. A., E. Campion, C. Cabau, F. Piumi, P. Reinaud, C. Richard, J.-P. Renard and I. Hue (2005). "Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts." *Developmental Biology* **288**(2): 448-460 DOI: 10.1016/j.ydbio.2005.09.043
- Delp, J., S. Guthier, S. Klima, L. Hoelting, K. Pinto-Gil, J. H. Hsieh, M. Aichem, K. Klein, F. Schreiber, R. R. Tice, M. Pastor, M. Behl and M. Leist (2018). "A high-throughput approach to identify specific neurotoxicants/ developmental toxicants in human neuronal cell function assays." *ALTEX* **35**(2): 235-253 DOI: 10.14573/altex.1712182
- Dennis, G., Jr., B. T. Sherman, D. A. Hosack, J. Yang, W. Gao, H. C. Lane and R. A. Lempicki (2003). "DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery." *Genome Biol* **4**(5): P3
- Di Malta, C., J. D. Fryer, C. Settembre and A. Ballabio (2012). "Astrocyte dysfunction triggers neurodegeneration in a lysosomal storage disorder." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(35): E2334-2342 DOI: 10.1073/pnas.1209577109
- Diecke, S., S. M. Jung, J. Lee and J. H. Ju (2014). "Recent technological updates and clinical applications of induced pluripotent stem cells." *Korean J Intern Med* **29**(5): 547-557 DOI: 10.3904/kjim.2014.29.5.547
- Ding, J., Y. Guo, S. Liu, Y. Yan, G. Chang, Z. Kou, Y. Zhang, Y. Jiang, F. He, S. Gao and J. Sang (2009). "Embryonic stem cells derived from somatic cloned and fertilized blastocysts are post-transcriptionally indistinguishable: a MicroRNA and protein profile comparison." *Proteomics* **9**(10): 2711-2721 DOI: 10.1002/pmic.200800824
- Dinnyes, A., X. C. Tian and X. Yang (2008). "Epigenetic regulation of foetal development in nuclear transfer animal models." *Reprod Domest Anim* **43** Suppl 2: 302-309 DOI: 10.1111/j.1439-0531.2008.01178.x
- Directive, E. (2010). "63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes." *Off. J. Eur. Union* **276**: 33-79
- Dirks, R. A. M., G. Van Mierlo, H. H. D. Kerstens, A. S. Bernardo, J. Kobolák, I. Bock, J. Maruotti, R. A. Pedersen, A. Dinnyés, M. A. Huynen, A. Jouneau and H. Marks (2019). "Allele-specific RNA-seq expression profiling of imprinted genes in mouse isogenic pluripotent states." *Epigenetics & Chromatin* **12**(1) DOI: 10.1186/s13072-019-0259-8
- Do, J. T., D. W. Han, L. Gentile, I. Sobek-Klocke, M. Stehling, H. T. Lee and H. R. Schöler (2007). "Erasure of cellular memory by fusion with pluripotent cells." *Stem Cells* **25**(4): 1013-1020 DOI: 10.1634/stemcells.2006-0691
- Doetschman, T. C., H. Eistetter, M. Katz, W. Schmidt and R. Kemler (1985). "The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium." *J Embryol Exp Morphol* **87**: 27-45
- Doke, S. K. and S. C. Dhawale (2015). "Alternatives to animal testing: A review." *Saudi Pharm J* **23**(3): 223-229 DOI: 10.1016/j.jsps.2013.11.002

- Dominguez-Oliva, A., I. Hernandez-Avalos, J. Martinez-Burnes, A. Olmos-Hernandez, A. Verduzco-Mendoza and D. Mota-Rojas (2023). "The Importance of Animal Models in Biomedical Research: Current Insights and Applications." Animals (Basel) **13**(7): 1223 DOI: 10.3390/ani13071223
- Doss, M. X. and A. Sachinidis (2019). "Current Challenges of iPSC-Based Disease Modeling and Therapeutic Implications." Cells **8**(5) DOI: 10.3390/cells8050403
- Dutta, D., S. Ray, P. Home, M. Larson, M. W. Wolfe and S. Paul (2011). "Self-renewal versus lineage commitment of embryonic stem cells: protein kinase C signaling shifts the balance." Stem Cells **29**(4): 618-628 DOI: 10.1002/stem.605
- Edmondson, R., J. J. Broglie, A. F. Adcock and L. Yang (2014). "Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors." Assay Drug Dev Technol **12**(4): 207-218 DOI: 10.1089/adt.2014.573
- Eisen, M. B., P. T. Spellman, P. O. Brown and D. Botstein (1998). "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(25): 14863-14868 DOI: 10.1073/pnas.95.25.14863
- Elliman, S. J., I. Wu and D. M. Kemp (2006). "Adult tissue-specific expression of a Dppa3-derived retrogene represents a postnatal transcript of pluripotent cell origin." J Biol Chem **281**(1): 16-19 DOI: 10.1074/jbc.C500415200
- Estrada, J., J. Sommer, B. Collins, B. Mir, A. Martin, A. York, R. M. Petters and J. A. Piedrahita (2007). "Swine generated by somatic cell nuclear transfer have increased incidence of intrauterine growth restriction (IUGR)." Cloning Stem Cells **9**(2): 229-236 DOI: 10.1089/clo.2006.0079
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature **292**(5819): 154-156 DOI: 10.1038/292154a0
- Ezashi, T., B. P. V. L. Telugu, A. P. Alexenko, S. Sachdev, S. Sinha and R. M. Roberts (2009). "Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(27): 10993-10998 DOI: doi:10.1073/pnas.0905284106
- F-W Greiner, J., B. Kaltschmidt, C. Kaltschmidt and D. Widera (2013). "Going 3D - Cell Culture Approaches for Stem Cell Research and Therapy." Current Tissue Engineering **2**(1): 8-19
- Faas, L., F. C. Warrander, R. Maguire, S. A. Ramsbottom, D. Quinn, P. Genever and H. V. Isaacs (2013). "Lin28 proteins are required for germ layer specification in *Xenopus*." Development **140**(5): 976-986 DOI: 10.1242/dev.089797
- Fan, Y., M. Tong, C. Zhao, C. Ding, J. Hao, Z. Lv, X. Dai, T. Hai, X. Li, R. Yao, Y. Yu, Z. Li, L. Wang, J. Alice and Q. Zhou (2008). Comparative pluripotency analysis of mouse embryonic stem cells derived from wild-type and infertile hermaphrodite somatic cell nuclear transfer blastocysts. Chinese Science Bulletin, Science China Press, co-published with Springer. **53**: 3648-3655
- Fang, Z. F., H. Gai, Y. Z. Huang, S. G. Li, X. J. Chen, J. J. Shi, L. Wu, A. Liu, P. Xu and H. Z. Sheng (2006). "Rabbit embryonic stem cell lines derived from fertilized, parthenogenetic or somatic cell nuclear transfer embryos." Exp Cell Res **312**(18): 3669-3682 DOI: 10.1016/j.yexcr.2006.08.013
- Farhy Tselnicker, I., M. M. Boisvert and N. J. Allen (2014). "The role of neuronal versus astrocyte-derived heparan sulfate proteoglycans in brain development and injury." Biochem Soc Trans **42**(5): 1263-1269 DOI: 10.1042/BST20140166
- Feng, Q., S. J. Lu, I. Klimanskaya, I. Gomes, D. Kim, Y. Chung, G. R. Honig, K. S. Kim and R. Lanza (2010). "Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence." Stem Cells **28**(4): 704-712 DOI: 10.1002/stem.321
- Forabosco, F., M. Löhms, L. Rydhmer and L. F. Sundström (2013). "Genetically modified farm animals and fish in agriculture: A review." Livestock Science **153**(1-3): 1-9 DOI: 10.1016/j.livsci.2013.01.002
- Fritsche, E., M. Barenys, J. Klose, S. Masjosthusmann, L. Nimtz, M. Schmuck, S. Wuttke and J. Tigges (2018a). "Current Availability of Stem Cell-Based In Vitro Methods for Developmental Neurotoxicity (DNT) Testing." Toxicol Sci **165**(1): 21-30 DOI: 10.1093/toxsci/kfy178
- Fritsche, E., P. Grandjean, K. M. Crofton, M. Aschner, A. Goldberg, T. Heinonen, E. V. S. Hessel, H. T. Hogberg, S. H. Bennekou, P. J. Lein, M. Leist, W. R. Mundy, M. Paparella, A. H. Piersma, M. Sachana, G. Schmuck, R. Solecki, A. Terron, F. Monnet-Tschudi, M. F. Wilks, H. Witters, M. G. Zurich and A. Bal-Price (2018b). "Consensus statement on the need for innovation, transition and implementation of developmental neurotoxicity (DNT) testing for regulatory purposes." Toxicol Appl Pharmacol **354**: 3-6 DOI: 10.1016/j.taap.2018.02.004

- Fröhlich, T., M. Kösters, A. Graf, E. Wolf, J. Kobolak, V. Brochard, A. Dinnyés, A. Jouneau and G. J. Arnold (2013). "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 DOI: 10.1016/j.jprot.2013.03.015
- Fukuda, A., F. Cao, S. Morita, K. Yamada, Y. Jincho, S. Tane, Y. Sotomaru and T. Kono (2010). "Identification of inappropriately reprogrammed genes by large-scale transcriptome analysis of individual cloned mouse blastocysts." *PLoS One* **5**(6): e11274 DOI: 10.1371/journal.pone.0011274
- Fulka, J., Jr., P. Loi, H. Fulka, G. Ptak and T. Nagai (2004). "Nucleus transfer in mammals: noninvasive approaches for the preparation of cytoplasts." *Trends Biotechnol* **22**(6): 279-283 DOI: 10.1016/j.tibtech.2004.04.002
- Fusar Poli, E., C. Zalfa, F. D'Avanzo, R. Tomanin, L. Carlessi, M. Bossi, L. R. Nodari, E. Binda, P. Marmiroli, M. Scarpa, D. Delia, A. L. Vescovi and L. De Filippis (2013). "Murine neural stem cells model Hunter disease in vitro: glial cell-mediated neurodegeneration as a possible mechanism involved." *Cell Death Dis* **4**(11): e906 DOI: 10.1038/cddis.2013.430
- Gafni, O., L. Weinberger, A. A. Mansour, Y. S. Manor, E. Chomsky, D. Ben-Yosef, Y. Kalma, S. Viukov, I. Maza, A. Zviran, Y. Rais, Z. Shipony, Z. Mukamel, V. Krupalnik, M. Zerbib, S. Geula, I. Caspi, D. Schneir, T. Schwartz, S. Gilad, D. Amann-Zalcenstein, S. Benjamin, I. Amit, A. Tanay, R. Massarwa, N. Novershtern and J. H. Hanna (2013). "Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells." *Nature* **504**(7479): 282-286 DOI: 10.1038/nature12745
- Gage, F. H. (2000). "Mammalian neural stem cells." *Science* **287**(5457): 1433-1438 DOI: 10.1126/science.287.5457.1433
- Gal, A. B., J. W. Carnwath, A. Dinnyes, D. Herrmann, H. Niemann and C. Wrenzycki (2006). "Comparison of real-time polymerase chain reaction and end-point polymerase chain reaction for the analysis of gene expression in preimplantation embryos." *Reprod Fertil Dev* **18**(3): 365-371 DOI: 10.1071/rd05012
- Gao, S., Y. G. Chung, J. W. Williams, J. Riley, K. Moley and K. E. Latham (2003). "Somatic cell-like features of cloned mouse embryos prepared with cultured myoblast nuclei." *Biol Reprod* **69**(1): 48-56 DOI: 10.1095/biolreprod.102.014522
- Gao, X., M. Nowak-Imialek, X. Chen, D. Chen, D. Herrmann, D. Ruan, A. C. H. Chen, M. A. Eckersley-Maslin, S. Ahmad, Y. L. Lee, T. Kobayashi, D. Ryan, J. Zhong, J. Zhu, J. Wu, G. Lan, S. Petkov, J. Yang, L. Antunes, L. S. Campos, B. Fu, S. Wang, Y. Yong, X. Wang, S. G. Xue, L. Ge, Z. Liu, Y. Huang, T. Nie, P. Li, D. Wu, D. Pei, Y. Zhang, L. Lu, F. Yang, S. J. Kimber, W. Reik, X. Zou, Z. Shang, L. Lai, A. Surani, P. P. L. Tam, A. Ahmed, W. S. B. Yeung, S. A. Teichmann, H. Niemann and P. Liu (2019). "Establishment of porcine and human expanded potential stem cells." *Nat Cell Biol* **21**(6): 687-699 DOI: 10.1038/s41556-019-0333-2
- Ghimire, S., M. Van der Jeught, J. Neupane, M. S. Roost, J. Anckaert, M. Popovic, F. Van Nieuwerburgh, P. Mestdagh, J. Vandesompele, D. Deforce, B. Menten, S. Chuva de Sousa Lopes, P. De Sutter and B. Heindryckx (2018). "Comparative analysis of naive, primed and ground state pluripotency in mouse embryonic stem cells originating from the same genetic background." *Scientific Reports* **8**(1): 5884 DOI: 10.1038/s41598-018-24051-5
- Ginis, I., Y. Luo, T. Miura, S. Thies, R. Brandenberger, S. Gerecht-Nir, M. Amit, A. Hoke, M. K. Carpenter, J. Itskovitz-Eldor and M. S. Rao (2004). "Differences between human and mouse embryonic stem cells." *Dev Biol* **269**(2): 360-380 DOI: 10.1016/j.ydbio.2003.12.034
- Giraldo, A. M., D. A. Hylan, C. B. Ballard, M. N. Purpera, T. D. Vaught, J. W. Lynn, R. A. Godke and K. R. Bondioli (2008). "Effect of epigenetic modifications of donor somatic cells on the subsequent chromatin remodeling of cloned bovine embryos." *Biol Reprod* **78**(5): 832-840 DOI: 10.1095/biolreprod.107.066662
- Goldschmidt, R. B. and O. Steward (1989). "Comparison of the neurotoxic effects of colchicine, the vinca alkaloids, and other microtubule poisons." *Brain Res* **486**(1): 133-140 DOI: 10.1016/0006-8993(89)91285-7
- Gouveia, C., C. Huyser, D. Egli and M. S. Pepper (2020). "Lessons Learned from Somatic Cell Nuclear Transfer." *Int J Mol Sci* **21**(7) DOI: 10.3390/ijms21072314
- Grapin-Botton, A. (2008). Endoderm specification. *StemBook*. Cambridge (MA).
- Grieshammer, U., K. A. Shepard, E. A. Nigh and A. Trounson (2011). "Finding the niche for human somatic cell nuclear transfer." *Nat Biotechnol* **29**(8): 701-705 DOI: 10.1038/nbt.1933

- Guha, P., J. W. Morgan, G. Mostoslavsky, N. P. Rodrigues and A. S. Boyd (2013). "Lack of immune response to differentiated cells derived from syngeneic induced pluripotent stem cells." Cell Stem Cell **12**(4): 407-412 DOI: 10.1016/j.stem.2013.01.006
- Guillot, P. V., K. O'Donoghue, H. Kurata and N. M. Fisk (2006). "Fetal stem cells: betwixt and between." Semin Reprod Med **24**(5): 340-347 DOI: 10.1055/s-2006-952149
- Guo, G., J. Yang, J. Nichols, J. S. Hall, I. Eyres, W. Mansfield and A. Smith (2009). "Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency." Development **136**(7): 1063-1069 DOI: 10.1242/dev.030957
- Gurdon, J. B. (1962). "Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells." Dev Biol **4**: 256-273 DOI: 10.1016/0012-1606(62)90043-x
- Gurdon, J. B., T. R. Eldsdale and M. Fischberg (1958). "Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei." Nature **182**(4627): 64-65 DOI: 10.1038/182064a0
- Gurer, F., H. Ozden, H. Muslumanoglu, C. Baycu, O. Cilingir and H. Hassa (2009). "Therapeutic Use of Cloning: Osmangazi Turk Identical Embryonic Stem Cells and Embryonic Stem Cell Transfer to Diabetic Mice." J Health Sci **55**(4): 503-515
- Hall, J., G. Guo, J. Wray, I. Eyres, J. Nichols, L. Grotewold, S. Morfopoulou, P. Humphreys, W. Mansfield, R. Walker, S. Tomlinson and A. Smith (2009). "Oct4 and LIF/Stat3 additively induce Kruppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal." Cell Stem Cell **5**(6): 597-609 DOI: 10.1016/j.stem.2009.11.003
- Hanna, J., A. W. Cheng, K. Saha, J. Kim, C. J. Lengner, F. Soldner, J. P. Cassady, J. Muffat, B. W. Carey and R. Jaenisch (2010). "Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(20): 9222-9227 DOI: 10.1073/pnas.1004584107
- Harrill, J. A., T. Freudenrich, K. Wallace, K. Ball, T. J. Shafer and W. R. Mundy (2018). "Testing for developmental neurotoxicity using a battery of in vitro assays for key cellular events in neurodevelopment." Toxicol Appl Pharmacol **354**: 24-39 DOI: 10.1016/j.taap.2018.04.001
- Harrison, S. E., B. Sozen, N. Christodoulou, C. Kyprianou and M. Zernicka-Goetz (2017). "Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro." Science **356**(6334) DOI: 10.1126/science.aal1810
- Hartung, T. (2008). "Thoughts on limitations of animal models." Parkinsonism Relat Disord **14 Suppl 2**: S81-83 DOI: 10.1016/j.parkreldis.2008.04.003
- Hatakeyama, S., T. Mikami, W. Habano and Y. Takeda (2011). "Expression of connexins and the effect of retinoic acid in oral keratinocytes." Journal of Oral Science **53**(3): 327-332 DOI: 10.2334/josnusd.53.327
- Hayashi, K., H. Ohta, K. Kurimoto, S. Aramaki and M. Saitou (2011). "Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells." Cell **146**(4): 519-532 DOI: 10.1016/j.cell.2011.06.052
- Hegde, P., R. Qi, K. Abernathy, C. Gay, S. Dharap, R. Gaspard, J. E. Hughes, E. Snesrud, N. Lee and J. Quackenbush (2000). "A concise guide to cDNA microarray analysis." Biotechniques **29**(3): 548-550, 552-544, 556 passim DOI: 10.2144/00293bi01
- Henderson, G. R. W., S. R. Brahmasani, U. M. Yelisetti, S. Konijeti, V. C. Katari and S. Sisinthy (2014). "Candidate gene expression patterns in rabbit preimplantation embryos developed in vivo and in vitro." Journal of Assisted Reproduction and Genetics **31**(7): 899-911 DOI: 10.1007/s10815-014-0233-0
- Henle, G. and F. Deinhardt (1957). "The establishment of strains of human cells in tissue culture." J Immunol **79**(1): 54-59
- Hipp, J. and A. Atala (2008). "Sources of stem cells for regenerative medicine." Stem Cell Rev **4**(1): 3-11 DOI: 10.1007/s12015-008-9010-8
- Hirotsune, S., N. Yoshida, A. Chen, L. Garrett, F. Sugiyama, S. Takahashi, K. Yagami, A. Wynshaw-Boris and A. Yoshiki (2003). "An expressed pseudogene regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene." Nature **423**(6935): 91-96 DOI: 10.1038/nature01535
- Hoffmann, B., G. Schulze-Frenking, S. Al-Sawaf, M. Beck and E. Mayatepek (2011). "Hunter disease before and during enzyme replacement therapy." Pediatr Neurol **45**(3): 181-184 DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2011.05.010
- Hofrichter, M., L. Nimtz, J. Tigges, Y. Kabiri, F. Schroter, B. Royer-Pokora, B. Hildebrandt, M. Schmuck, A. Epanchintsev, S. Theiss, J. Adjaye, J. M. Egly, J. Krutmann and E. Fritsche (2017). "Comparative

- performance analysis of human iPSC-derived and primary neural progenitor cells (NPC) grown as neurospheres in vitro." *Stem Cell Res* **25**: 72-82 DOI: 10.1016/j.scr.2017.10.013
- Hogberg, H. T., J. Bressler, K. M. Christian, G. Harris, G. Makri, C. O'Driscoll, D. Pamies, L. Smirnova, Z. Wen and T. Hartung (2013). "Toward a 3D model of human brain development for studying gene/environment interactions." *Stem Cell Res Ther* **4 Suppl 1**(Suppl 1): S4 DOI: 10.1186/scrt365
- Honda, A., M. Hatori, M. Hirose, C. Honda, H. Izu, K. Inoue, R. Hirasawa, S. Matoba, S. Togayachi, H. Miyoshi and A. Ogura (2013). "Naive-like conversion overcomes the limited differentiation capacity of induced pluripotent stem cells." *J Biol Chem* **288**(36): 26157-26166 DOI: 10.1074/jbc.M113.502492
- Honda, A., M. Hirose, M. Hatori, S. Matoba, H. Miyoshi, K. Inoue and A. Ogura (2010). "Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine." *J Biol Chem* **285**(41): 31362-31369 DOI: 10.1074/jbc.M110.150540
- Hong, J., Y.-S. Cheng, S. Yang, M. Swaroop, M. Xu, J. Beers, J. Zou, W. Huang, J. J. Marugan, X. Cai and W. Zheng (2022). "iPS-derived neural stem cells for disease modeling and evaluation of therapeutics for mucopolysaccharidosis type II." *Experimental Cell Research* **412**(1): 113007 DOI: 10.1016/j.yexcr.2021.113007
- Hong, T. K., J. H. Song, S. B. Lee and J. T. Do (2021). "Germ Cell Derivation from Pluripotent Stem Cells for Understanding In Vitro Gametogenesis." *Cells* **10**(8) DOI: 10.3390/cells10081889
- Honsho, K., M. Hirose, M. Hatori, L. Yasmin, H. Izu, S. Matoba, S. Togayachi, H. Miyoshi, T. Sankai, A. Ogura and A. Honda (2015). "Naïve-like conversion enhances the difference in innate in vitro differentiation capacity between rabbit ES cells and iPS cells." *J Reprod Dev* **61**(1): 13-19 DOI: 10.1262/jrd.2014-098
- Horsch, M., S. Schadler, V. Gailus-Durner, H. Fuchs, H. Meyer, M. H. de Angelis and J. Beckers (2008). "Systematic gene expression profiling of mouse model series reveals coexpressed genes." *Proteomics* **8**(6): 1248-1256 DOI: 10.1002/pmic.200700725
- Hou, P., Y. Li, X. Zhang, C. Liu, J. Guan, H. Li, T. Zhao, J. Ye, W. Yang, K. Liu, J. Ge, J. Xu, Q. Zhang, Y. Zhao and H. Deng (2013). "Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds." *Science* **341**(6146): 651-654 DOI: 10.1126/science.1239278
- Hu, Y. G., R. Hirasawa, J. L. Hu, K. Hata, C. L. Li, Y. Jin, T. Chen, E. Li, M. Rigolet, E. Viegas-Pequignot, H. Sasaki and G. L. Xu (2008). "Regulation of DNA methylation activity through Dnmt3L promoter methylation by Dnmt3 enzymes in embryonic development." *Hum Mol Genet* **17**(17): 2654-2664 DOI: 10.1093/hmg/ddn165
- Huang, K., T. Maruyama and G. Fan (2014). "The naive state of human pluripotent stem cells: a synthesis of stem cell and preimplantation embryo transcriptome analyses." *Cell Stem Cell* **15**(4): 410-415 DOI: 10.1016/j.stem.2014.09.014
- Huang, Y., R. Osorno, A. Tsakiridis and V. Wilson (2012). "In Vivo differentiation potential of epiblast stem cells revealed by chimeric embryo formation." *Cell Rep* **2**(6): 1571-1578 DOI: 10.1016/j.celrep.2012.10.022
- Hubner, K., G. Fuhrmann, L. K. Christenson, J. Kehler, R. Reinbold, R. De La Fuente, J. Wood, J. F. Strauss, 3rd, M. Boiani and H. R. Scholer (2003). "Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells." *Science* **300**(5623): 1251-1256 DOI: 10.1126/science.1083452
- Hubrecht, R. C. and E. Carter (2019). "The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change." *Animals (Basel)* **9**(10): 754 DOI: 10.3390/ani9100754
- Humpherys, D., K. Eggan, H. Akutsu, K. Hochedlinger, W. M. Rideout, 3rd, D. Biniszkiewicz, R. Yanagimachi and R. Jaenisch (2001). "Epigenetic instability in ES cells and cloned mice." *Science* **293**(5527): 95-97 DOI: 10.1126/science.1061402
- Hyun, I. (2011). "Moving human SCNT research forward ethically." *Cell Stem Cell* **9**(4): 295-297 DOI: 10.1016/j.stem.2011.08.001
- Ibanez, E., D. F. Albertini and E. W. Overstrom (2005). "Effect of genetic background and activating stimulus on the timing of meiotic cell cycle progression in parthenogenetically activated mouse oocytes." *Reproduction* **129**(1): 27-38 DOI: 10.1530/rep.1.00452
- Illmensee, K. and M. Levanduski (2010). "Embryo splitting." *Middle East Fertility Society Journal* **15**(2): 57-63 DOI: 10.1016/j.mefs.2010.05.001
- Inoue, K., S. Noda, N. Ogonuki, H. Miki, S. Inoue, K. Katayama, K. Mekada, H. Miyoshi and A. Ogura (2007). "Differential developmental ability of embryos cloned from tissue-specific stem cells." *Stem Cells* **25**(5): 1279-1285 DOI: 10.1634/stemcells.2006-0747

- Ivanova, N. B., J. T. Dimos, C. Schaniel, J. A. Hackney, K. A. Moore and I. R. Lemischka (2002). "A stem cell molecular signature." *Science* **298**(5593): 601-604 DOI: 10.1126/science.1073823
- Jackson, M., A. Krassowska, N. Gilbert, T. Chevassut, L. Forrester, J. Ansell and B. Ramsahoye (2004). "Severe global DNA hypomethylation blocks differentiation and induces histone hyperacetylation in embryonic stem cells." *Mol Cell Biol* **24**(20): 8862-8871 DOI: 10.1128/MCB.24.20.8862-8871.2004
- Jaenisch, R., K. Hochedlinger and K. Eggan (2005). "Nuclear cloning, epigenetic reprogramming and cellular differentiation." *Novartis Found Symp* **265**: 107-118; discussion 118-128
- Jiang, W., Z. Bai, D. Zhang, Y. Shi, J. Yong, S. Chen, M. Ding and H. Deng (2008). "Differentiation of mouse nuclear transfer embryonic stem cells into functional pancreatic beta cells." *Diabetologia* **51**(9): 1671-1679 DOI: 10.1007/s00125-008-1065-1
- Jincho, Y., R. Araki, Y. Hoki, C. Tamura, M. Nakamura, S. Ando, Y. Kasama and M. Abe (2010). "Generation of genome integration-free induced pluripotent stem cells from fibroblasts of C57BL/6 mice without c-Myc transduction." *J Biol Chem* **285**(34): 26384-26389 DOI: 10.1074/jbc.M110.115915
- Jincho, Y., Y. Sotomaru, M. Kawahara, Y. Ono, H. Ogawa, Y. Obata and T. Kono (2008). "Identification of genes aberrantly expressed in mouse embryonic stem cell-cloned blastocysts." *Biol Reprod* **78**(4): 568-576 DOI: 10.1095/biolreprod.107.064634
- Jouneau, A., C. Ciaudo, O. Sismeiro, V. Brochard, L. Jouneau, S. Vandormael-Pournin, J. Y. Coppee, Q. Zhou, E. Heard, C. Antoniewski and M. Cohen-Tannoudji (2012). "Naive and primed murine pluripotent stem cells have distinct miRNA expression profiles." *RNA* **18**(2): 253-264 DOI: 10.1261/rna.028878.111
- Jouneau, A., Q. Zhou, A. Camus, V. Brochard, L. Maulny, J. Collignon and J. P. Renard (2006). "Developmental abnormalities of NT mouse embryos appear early after implantation." *Development* **133**(8): 1597-1607 DOI: 10.1242/dev.02317
- Ju, S., R. Rui, Q. Lu, P. Lin and H. Guo (2010). "Analysis of apoptosis and methyltransferase mRNA expression in porcine cloned embryos cultured in vitro." *J Assist Reprod Genet* **27**(1): 49-59 DOI: 10.1007/s10815-009-9378-7
- Kadoshima, T., H. Sakaguchi, T. Nakano, M. Soen, S. Ando, M. Eiraku and Y. Sasai (2013). "Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(50): 20284-20289 DOI: 10.1073/pnas.1315710110
- Kagawa, H., A. Javali, H. H. Khoei, T. M. Sommer, G. Sestini, M. Novatchkova, Y. Scholte Op Reimer, G. Castel, A. Bruneau, N. Maenhoudt, J. Lammers, S. Loubersac, T. Freour, H. Vankelecom, L. David and N. Rivron (2022). "Human blastoids model blastocyst development and implantation." *Nature* **601**(7894): 600-605 DOI: 10.1038/s41586-021-04267-8
- Kaji, K., K. Norrby, A. Paca, M. Mileikovsky, P. Mohseni and K. Woltjen (2009). "Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors." *Nature* **458**(7239): 771-775 DOI: 10.1038/nature07864
- Kalkan, T. and A. Smith (2014). "Mapping the route from naive pluripotency to lineage specification." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **369**(1657): 20130540 DOI: doi:10.1098/rstb.2013.0540
- Kang, Y. K., D. B. Koo, J. S. Park, Y. H. Choi, A. S. Chung, K. K. Lee and Y. M. Han (2001). "Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos." *Nat Genet* **28**(2): 173-177 DOI: 10.1038/88903
- Kanthasamy, A., H. Jin, A. Charli, A. Vellareddy and A. Kanthasamy (2019). "Environmental neurotoxicant-induced dopaminergic neurodegeneration: a potential link to impaired neuroinflammatory mechanisms." *Pharmacol Ther* **197**: 61-82 DOI: 10.1016/j.pharmthera.2019.01.001
- Kawase, E., Y. Yamazaki, T. Yagi, R. Yanagimachi and R. A. Pedersen (2000). "Mouse embryonic stem (ES) cell lines established from neuronal cell-derived cloned blastocysts." *Genesis* **28**(3-4): 156-163
- Kehler, J., E. Tolkunova, B. Koschorz, M. Pesce, L. Gentile, M. Boiani, H. Lomeli, A. Nagy, K. J. McLaughlin, H. R. Scholer and A. Tomilin (2004). "Oct4 is required for primordial germ cell survival." *EMBO Rep* **5**(11): 1078-1083 DOI: 10.1038/sj.embor.7400279
- Kim, D., C. H. Kim, J. I. Moon, Y. G. Chung, M. Y. Chang, B. S. Han, S. Ko, E. Yang, K. Y. Cha, R. Lanza and K. S. Kim (2009). "Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins." *Cell Stem Cell* **4**(6): 472-476 DOI: 10.1016/j.stem.2009.05.005
- Kim, J., B.-K. Koo and J. A. Knoblich (2020). "Human organoids: model systems for human biology and medicine." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **21**(10): 571-584 DOI: 10.1038/s41580-020-0259-3

- Kim, K.-P., D. W. Han, J. Kim and H. R. Schöler (2021). "Biological importance of OCT transcription factors in reprogramming and development." Experimental & Molecular Medicine **53**(6): 1018-1028 DOI: 10.1038/s12276-021-00637-4
- Kirchhof, N., J. W. Carnwath, E. Lemme, K. Anastassiadis, H. Scholer and H. Niemann (2000). "Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species." Biol Reprod **63**(6): 1698-1705 DOI: 10.1095/biolreprod63.6.1698
- Kirsch-Volders, M., G. Plas, A. Elhajouji, M. Lukamowicz, L. Gonzalez, K. Vande Loock and I. Decordier (2011). "The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance." Arch Toxicol **85**(8): 873-899 DOI: 10.1007/s00204-011-0691-4
- Kishigami, S., S. Wakayama, N. V. Thuan, H. Ohta, E. Mizutani, T. Hikichi, H. T. Bui, S. Balbach, A. Ogura, M. Boiani and T. Wakayama (2006). "Production of cloned mice by somatic cell nuclear transfer." Nat Protoc **1**(1): 125-138 DOI: 10.1038/nprot.2006.21
- Kobolak, J., S. Bodo, R. Rungsiwut, Q. Meng, M. Adorjan, P. Virutamasen, M. Techakumphu and A. Dinnyes (2010). "Generation of mouse embryonic stem cell lines from zona-free nuclear transfer embryos." Cell Reprogram **12**(1): 105-113 DOI: 10.1089/cell.2009.0040
- Kojima, Y., K. Kaufman-Francis, J. B. Studdert, K. A. Steiner, M. D. Power, D. A. Loebel, V. Jones, A. Hor, G. de Alencastro, G. J. Logan, E. T. Teber, O. H. Tam, M. D. Stutz, I. E. Alexander, H. A. Pickett and P. P. Tam (2014). "The transcriptional and functional properties of mouse epiblast stem cells resemble the anterior primitive streak." Cell Stem Cell **14**(1): 107-120 DOI: 10.1016/j.stem.2013.09.014
- Kondo, M. (2010). "Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors." Immunol Rev **238**(1): 37-46 DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00963.x
- Korneev, S. A., J. H. Park and M. O'Shea (1999). "Neuronal expression of neural nitric oxide synthase (nNOS) protein is suppressed by an antisense RNA transcribed from an NOS pseudogene." J Neurosci **19**(18): 7711-7720 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.19-18-07711.1999
- Kou, Z., L. Kang, Y. Yuan, Y. Tao, Y. Zhang, T. Wu, J. He, J. Wang, Z. Liu and S. Gao (2010). "Mice cloned from induced pluripotent stem cells (iPSCs)." Biol Reprod **83**(2): 238-243 DOI: 10.1095/biolreprod.110.084731
- Krewski, D., D. Acosta, Jr., M. Andersen, H. Anderson, J. C. Bailar, 3rd, K. Boekelheide, R. Brent, G. Charnley, V. G. Cheung, S. Green, Jr., K. T. Kelsey, N. I. Kerkvliet, A. A. Li, L. McCray, O. Meyer, R. D. Patterson, W. Pennie, R. A. Scala, G. M. Solomon, M. Stephens, J. Yager and L. Zeise (2010). "Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy." J Toxicol Environ Health B Crit Rev **13**(2-4): 51-138 DOI: 10.1080/10937404.2010.483176
- Kumar, B. M., H. F. Jin, J. G. Kim, S. A. Ock, Y. Hong, S. Balasubramanian, S. Y. Choe and G. J. Rho (2007). "Differential gene expression patterns in porcine nuclear transfer embryos reconstructed with fetal fibroblasts and mesenchymal stem cells." Dev Dyn **236**(2): 435-446 DOI: 10.1002/dvdy.21042
- Kumar, D., T. R. Talluri, N. L. Selokar, I. Hyder and W. A. Kues (2021). "Perspectives of pluripotent stem cells in livestock." World J Stem Cells **13**(1): 1-29 DOI: 10.4252/wjsc.v13.i1.1
- Kunath, T., D. Arnaud, G. D. Uy, I. Okamoto, C. Chureau, Y. Yamanaka, E. Heard, R. L. Gardner, P. Avner and J. Rossant (2005). "Imprinted X-inactivation in extra-embryonic endoderm cell lines from mouse blastocysts." Development **132**(7): 1649-1661 DOI: 10.1242/dev.01715
- Kurosaka, S., S. Eckardt and K. J. McLaughlin (2004). "Pluripotent lineage definition in bovine embryos by Oct4 transcript localization." Biol Reprod **71**(5): 1578-1582 DOI: 10.1095/biolreprod.104.029322
- Lagutina, I., G. Lazzari, R. Duchi, P. Turini, I. Tessaro, D. Brunetti, S. Colleoni, G. Crotti and C. Galli (2007). "Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona-free method in cattle, horse, pig and sheep." Theriogenology **67**(1): 90-98 DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.09.011
- Lancaster, M. A. and M. Huch (2019). "Disease modelling in human organoids." Dis Model Mech **12**(7) DOI: 10.1242/dmm.039347
- Lancaster, M. A. and J. A. Knoblich (2014). "Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies." Science **345**(6194): 1247125 DOI: doi:10.1126/science.1247125
- Lancaster, M. A., M. Renner, C. A. Martin, D. Wenzel, L. S. Bicknell, M. E. Hurles, T. Homfray, J. M. Penninger, A. P. Jackson and J. A. Knoblich (2013). "Cerebral organoids model human brain development and microcephaly." Nature **501**(7467): 373-379 DOI: 10.1038/nature12517

- Lang, A., A. Volkamer, L. Behm, S. Roblitz, R. Ehrig, M. Schneider, L. Geris, J. Wichard and F. Buttgerit (2018). "In silico methods - Computational alternatives to animal testing." ALTEX **35**(1): 124-126 DOI: 10.14573/altex.1712031
- Langkabel, J., A. Horne, L. Bonaguro, L. Holsten, T. Hesse, A. Knaus, Y. Riedel, M. Becker, K. Händler, T. Elmzzahi, K. Bassler, N. Reusch, L. H. Yeghiazarian, T. Pecht, A. Saglam, T. Ulas, A. C. Aschenbrenner, F. Kaiser, C. Kubaczka, J. L. Schultze and H. Schorle (2021). "Induction of Rosette-to-Lumen stage embryoids using reprogramming paradigms in ESCs." Nature Communications **12**(1): 7322 DOI: 10.1038/s41467-021-27586-w
- Lanza, R. and A. Atala (2013). Handbook of stem cells. London, Academic Press.
- Lanza, R. P., J. B. Cibelli and M. D. West (1999). "Prospects for the use of nuclear transfer in human transplantation." Nat Biotechnol **17**(12): 1171-1174 DOI: 10.1038/70709
- Laurincik, J. and P. Maddox-Hyttel (2007). "Nucleolar remodeling in nuclear transfer embryos." Adv Exp Med Biol **591**: 84-92 DOI: 10.1007/978-0-387-37754-4_6
- Lawson, K. A., J. J. Meneses and R. A. Pedersen (1991). "Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo." Development **113**(3): 891-911 DOI: 10.1242/dev.113.3.891
- Leal, A. F., E. Benincore-Flórez, E. Rintz, A. M. Herreño-Pachón, B. Celik, Y. Ago, C. J. Alméciga-Díaz and S. Tomatsu (2023). "Mucopolysaccharidoses: Cellular Consequences of Glycosaminoglycans Accumulation and Potential Targets." International Journal of Molecular Sciences **24**(1): 477
- Leandri, R. D., C. Archilla, L. C. Bui, N. Peynot, Z. Liu, C. Cabau, A. Chastellier, J. P. Renard and V. Duranthon (2009). "Revealing the dynamics of gene expression during embryonic genome activation and first differentiation in the rabbit embryo with a dedicated array screening." Physiol Genomics **36**(2): 98-113 DOI: 10.1152/physiolgenomics.90310.2008
- Li, H. Y., Y. Chien, Y. J. Chen, S. F. Chen, Y. L. Chang, C. H. Chiang, S. Y. Jeng, C. M. Chang, M. L. Wang, L. K. Chen, S. I. Hung, T. I. Huo, S. D. Lee and S. H. Chiou (2011). "Reprogramming induced pluripotent stem cells in the absence of c-Myc for differentiation into hepatocyte-like cells." Biomaterials **32**(26): 5994-6005 DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.009
- Li, J. and P. Mombaerts (2008). "Nuclear transfer-mediated rescue of the nuclear genome of nonviable mouse cells frozen without cryoprotectant." Biol Reprod **79**(4): 588-593 DOI: 10.1095/biolreprod.108.069583
- Li, P., C. Tong, R. Mehrian-Shai, L. Jia, N. Wu, Y. Yan, R. E. Maxson, E. N. Schulze, H. Song, C. L. Hsieh, M. F. Pera and Q. L. Ying (2008). "Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts." Cell **135**(7): 1299-1310 DOI: 10.1016/j.cell.2008.12.006
- Li, T., M. Lewallen, S. Chen, W. Yu, N. Zhang and T. Xie (2013). "Multipotent stem cells isolated from the adult mouse retina are capable of producing functional photoreceptor cells." Cell Res **23**(6): 788-802 DOI: 10.1038/cr.2013.48
- Li, W. and S. Ding (2011). "Human pluripotent stem cells: decoding the naive state." Sci Transl Med **3**(76): 76ps10 DOI: 10.1126/scitranslmed.3000996
- Liedtke, S., J. Enczmann, S. Waclawczyk, P. Wernet and G. Kogler (2007). "Oct4 and its pseudogenes confuse stem cell research." Cell Stem Cell **1**(4): 364-366 DOI: 10.1016/j.stem.2007.09.003
- Liedtke, S., M. Stephan and G. Kogler (2008). "Oct4 expression revisited: potential pitfalls for data misinterpretation in stem cell research." Biol Chem **389**(7): 845-850 DOI: 10.1515/BC.2008.098
- Lin, S. L., D. C. Chang, S. Chang-Lin, C. H. Lin, D. T. Wu, D. T. Chen and S. Y. Ying (2008). "Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state." RNA **14**(10): 2115-2124 DOI: 10.1261/rna.1162708
- Liu, X., W. Li, X. Fu and Y. Xu (2017). "The Immunogenicity and Immune Tolerance of Pluripotent Stem Cell Derivatives." Front Immunol **8**: 645 DOI: 10.3389/fimmu.2017.00645
- Liu, X., J. P. Tan, J. Schroder, A. Aberkane, J. F. Ouyang, M. Mohenska, S. M. Lim, Y. B. Y. Sun, J. Chen, G. Sun, Y. Zhou, D. Poppe, R. Lister, A. T. Clark, O. J. L. Rackham, J. Zenker and J. M. Polo (2021). "Modelling human blastocysts by reprogramming fibroblasts into iBlastoids." Nature **591**(7851): 627-632 DOI: 10.1038/s41586-021-03372-y
- Lohoff, T., S. Ghazanfar, A. Missarova, N. Koulana, N. Pierson, J. A. Griffiths, E. S. Bardot, C. H. L. Eng, R. C. V. Tyser, R. Argelaguet, C. Guibentif, S. Srinivas, J. Briscoe, B. D. Simons, A. K. Hadjantonakis, B. Göttgens, W. Reik, J. Nichols, L. Cai and J. C. Marioni (2022). "Integration of spatial and single-cell

- transcriptomic data elucidates mouse organogenesis." Nature Biotechnology **40**(1): 74-85 DOI: 10.1038/s41587-021-01006-2
- Loi, P., D. Iuso, M. Czernik and A. Ogura (2016). "A New, Dynamic Era for Somatic Cell Nuclear Transfer?" Trends Biotechnol **34**(10): 791-797 DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.03.008
- Long, C. R., M. E. Westhusin and M. C. Golding (2014). "Reshaping the transcriptional frontier: epigenetics and somatic cell nuclear transfer." Mol Reprod Dev **81**(2): 183-193 DOI: 10.1002/mrd.22271
- Longo, L., A. Bygrave, F. G. Grosveld and P. P. Pandolfi (1997). "The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimaerism." Transgenic Res **6**(5): 321-328 DOI: 10.1023/a:1018418914106
- Lowa, A., M. Jevtic, F. Gorreja and S. Hedtrich (2018). "Alternatives to animal testing in basic and preclinical research of atopic dermatitis." Exp Dermatol **27**(5): 476-483 DOI: 10.1111/exd.13498
- Luo, Y. and Y. Yu (2021). "Research Advances in Gametogenesis and Embryogenesis Using Pluripotent Stem Cells." Front Cell Dev Biol **9**: 801468 DOI: 10.3389/fcell.2021.801468
- Maddox-Hyttel, P., N. Alexopoulos, G. Vajta, I. Lewis, P. Rogers, L. Cann, H. Callesen, P. Tveden-Nyborg and A. Trounson (2003). "Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos." Reproduction **125**(4): 607-623 DOI: 10.1530/rep.0.1250607
- Madeja, Z. E., J. Sosnowski, K. Hryniewicz, E. Warzych, P. Pawlak, N. Rozwadowska, B. Plusa and D. Lechniak (2013). "Changes in sub-cellular localisation of trophoblast and inner cell mass specific transcription factors during bovine preimplantation development." BMC Developmental Biology **13**(1): 32 DOI: 10.1186/1471-213x-13-32
- Mamo, S., A. B. Gal, S. Bodo and A. Dinnyes (2007). "Quantitative evaluation and selection of reference genes in mouse oocytes and embryos cultured in vivo and in vitro." BMC Dev Biol **7**: 14 DOI: 10.1186/1471-213X-7-14
- Mamo, S., A. B. Gal, Z. Polgar and A. Dinnyes (2008). "Expression profiles of the pluripotency marker gene POU5F1 and validation of reference genes in rabbit oocytes and preimplantation stage embryos." BMC Mol Biol **9**: 67 DOI: 10.1186/1471-2199-9-67
- Mapara, M., B. S. Thomas and K. M. Bhat (2012). "Rabbit as an animal model for experimental research." Dent Res J (Isfahan) **9**(1): 111-118 DOI: 10.4103/1735-3327.92960
- Marks, H., T. Kalkan, R. Menafr, S. Denissov, K. Jones, H. Hofemeister, J. Nichols, A. Kranz, A. A. Smith and Hendrik (2012). "The Transcriptional and Epigenomic Foundations of Ground State Pluripotency." Cell **149**(3): 590-604 DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.026
- Martin, G. R. (1981). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7634-7638 DOI: 10.1073/pnas.78.12.7634
- Matoba, S. and Y. Zhang (2018). "Somatic Cell Nuclear Transfer Reprogramming: Mechanisms and Applications." Cell Stem Cell **23**(4): 471-485 DOI: 10.1016/j.stem.2018.06.018
- Matsuhisa, K. and K. Imaizumi (2021). "Loss of Function of Mutant IDS Due to Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation: New Therapeutic Opportunities for Mucopolysaccharidosis Type II." International Journal of Molecular Sciences **22**(22): 12227
- Mayer, W., A. Niveleau, J. Walter, R. Fundele and T. Haaf (2000). "Demethylation of the zygotic paternal genome." Nature **403**: 501-502
- McGonigle, P. and B. Ruggeri (2014). "Animal models of human disease: challenges in enabling translation." Biochem Pharmacol **87**(1): 162-171 DOI: 10.1016/j.bcp.2013.08.006
- McKusick, V. A. (1975). "The classification of heritable disorders of connective tissue." Birth Defects Orig Artic Ser **11**(6): 1-9
- Medina, D. L., A. Fraldi, V. Bouche, F. Annunziata, G. Mansueto, C. Spampanato, C. Puri, A. Pignata, J. A. Martina, M. Sardiello, M. Palmieri, R. Polishchuk, R. Puertollano and A. Ballabio (2011). "Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance." Dev Cell **21**(3): 421-430 DOI: 10.1016/j.devcel.2011.07.016
- Meikle, P. J., J. J. Hopwood, A. E. Clague and W. F. Carey (1999). "Prevalence of lysosomal storage disorders." JAMA **281**(3): 249-254 DOI: 10.1001/jama.281.3.249

- Meng, Q., Z. Polgar, J. Liu and A. Dinnyes (2009). "Live birth of somatic cell-cloned rabbits following trichostatin A treatment and cotransfer of parthenogenetic embryos." Cloning Stem Cells **11**(1): 203-208 DOI: 10.1089/clo.2008.0072
- Mestas, J. and C. C. Hughes (2004). "Of mice and not men: differences between mouse and human immunology." J Immunol **172**(5): 2731-2738 DOI: 10.4049/jimmunol.172.5.2731
- Mighell, A. J., N. R. Smith, P. A. Robinson and A. F. Markham (2000). "Vertebrate pseudogenes." FEBS Lett **468**(2-3): 109-114 DOI: 10.1016/s0014-5793(00)01199-6
- Mihajlovic, A. I. and A. W. Bruce (2017). "The first cell-fate decision of mouse preimplantation embryo development: integrating cell position and polarity." Open Biol **7**(11): 170210 DOI: 10.1098/rsob.170210
- Mitalipov, S. M., H. C. Kuo, J. D. Hennebold and D. P. Wolf (2003). "Oct-4 expression in pluripotent cells of the rhesus monkey." Biol Reprod **69**(6): 1785-1792 DOI: 10.1095/biolreprod.103.019455
- Mitsui, K., Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami, K. Takahashi, M. Maruyama, M. Maeda and S. Yamanaka (2003). "The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells." Cell **113**(5): 631-642 DOI: 10.1016/s0092-8674(03)00393-3
- Monk, M., M. Hitchins and S. Hawes (2008). "Differential expression of the embryo/cancer gene ECSA(DPPA2), the cancer/testis gene BORIS and the pluripotency structural gene OCT4, in human preimplantation development." Mol Hum Reprod **14**(6): 347-355 DOI: 10.1093/molehr/gan025
- Morrison, S. J. and J. Kimble (2006). "Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer." Nature **441**(7097): 1068-1074 DOI: 10.1038/nature04956
- Mottram, D. S., B. L. Wedzicha and A. T. Dodson (2002). "Acrylamide is formed in the Maillard reaction." Nature **419**(6906): 448-449 DOI: 10.1038/419448a
- Mtango, N. R., C. A. Vandevoort and K. E. Latham (2011). "Ontological aspects of pluripotency and stemness gene expression pattern in the rhesus monkey." Gene Expression Patterns **11**(3-4): 285-298 DOI: 10.1016/j.gep.2011.02.001
- Muenzer, J. (2011). "Overview of the mucopolysaccharidoses." Rheumatology (Oxford) **50 Suppl 5**: v4-12 DOI: 10.1093/rheumatology/ker394
- Muenzer, J., M. Beck, C. M. Eng, M. L. Escolar, R. Giugliani, N. H. Guffon, P. Harmatz, W. Kamin, C. Kampmann, S. T. Koseoglu, B. Link, R. A. Martin, D. W. Molter, M. V. Munoz Rojas, J. W. Ogilvie, R. Parini, U. Ramaswami, M. Scarpa, I. V. Schwartz, R. E. Wood and E. Wraith (2009). "Multidisciplinary management of Hunter syndrome." Pediatrics **124**(6): e1228-1239 DOI: 10.1542/peds.2008-0999
- Muenzer, J., O. Bodamer, B. Burton, L. Clarke, G. S. Frenking, R. Giugliani, S. Jones, M. V. Rojas, M. Scarpa, M. Beck and P. Harmatz (2012). "The role of enzyme replacement therapy in severe Hunter syndrome-an expert panel consensus." Eur J Pediatr **171**(1): 181-188 DOI: 10.1007/s00431-011-1606-3
- Muenzer, J., J. C. Lamsa, A. Garcia, J. Dacosta, J. Garcia and D. A. Treco (2002). "Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a preliminary report." Acta Paediatr Suppl **91**(439): 98-99 DOI: 10.1111/j.1651-2227.2002.tb03115.x
- Mukherjee, P., S. Roy, D. Ghosh and S. K. Nandi (2022). "Role of animal models in biomedical research: a review." Lab Anim Res **38**(1): 18 DOI: 10.1186/s42826-022-00128-1
- Mundy, W. R. and H. A. Tilson (1990). "Neurotoxic effects of colchicine." Neurotoxicology **11**(3): 539-547
- Munsie, M. J., A. E. Michalska, C. M. O'Brien, A. O. Trounson, M. F. Pera and P. S. Mountford (2000). "Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei." Curr Biol **10**(16): 989-992 DOI: 10.1016/s0960-9822(00)00648-5
- Murray, S. J. and N. L. Mitchell (2022). "The Translational Benefits of Sheep as Large Animal Models of Human Neurological Disorders." Front Vet Sci **9**: 831838 DOI: 10.3389/fvets.2022.831838
- Nagy, A. (2003). Manipulating the mouse embryo : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Nagy, A., J. Rossant, R. Nagy, W. Abramow-Newerly and J. C. Roder (1993). "Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(18): 8424-8428 DOI: 10.1073/pnas.90.18.8424
- Nagy, K., H. K. Sung, P. Zhang, S. Laflamme, P. Vincent, S. Agha-Mohammadi, K. Woltjen, C. Monetti, I. P. Michael, L. C. Smith and A. Nagy (2011). "Induced pluripotent stem cell lines derived from equine fibroblasts." Stem Cell Rev Rep **7**(3): 693-702 DOI: 10.1007/s12015-011-9239-5

- Nakagawa, M., M. Koyanagi, K. Tanabe, K. Takahashi, T. Ichisaka, T. Aoi, K. Okita, Y. Mochiduki, N. Takizawa and S. Yamanaka (2008). "Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts." Nat Biotechnol **26**(1): 101-106 DOI: 10.1038/nbt1374
- Neagu, A., E. van Genderen, I. Escudero, L. Verwegen, D. Kurek, J. Lehmann, J. Stel, R. A. M. Dirks, G. van Mierlo, A. Maas, C. Eleveld, Y. Ge, A. T. den Dekker, R. W. W. Brouwer, W. F. J. van Ijcken, M. Modic, M. Drukker, J. H. Jansen, N. C. Rivron, E. B. Baart, H. Marks and D. ten Berge (2020). "In vitro capture and characterization of embryonic rosette-stage pluripotency between naive and primed states." Nature Cell Biology **22**(5): 534-545 DOI: 10.1038/s41556-020-0508-x
- Neufeld, E. F., I. Liebaers, C. J. Epstein, S. Yatziv, A. Milunsky and B. R. Migeon (1977). "The Hunter syndrome in females: is there an autosomal recessive form of iduronate sulfatase deficiency?" Am J Hum Genet **29**(5): 455-461
- Ng, H.-H. and M. A. Surani (2011). "The transcriptional and signalling networks of pluripotency." Nature Cell Biology **13**(5): 490-496 DOI: 10.1038/ncb0511-490
- Niakan, K. K., N. Schrode, L. T. Cho and A. K. Hadjantonakis (2013). "Derivation of extraembryonic endoderm stem (XEN) cells from mouse embryos and embryonic stem cells." Nat Protoc **8**(6): 1028-1041 DOI: 10.1038/nprot.2013.049
- Nichols, J. and A. Smith (2009). "Naive and primed pluripotent states." Cell Stem Cell **4**(6): 487-492 DOI: 10.1016/j.stem.2009.05.015
- Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastassiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Scholer and A. Smith (1998). "Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4." Cell **95**(3): 379-391 DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81769-9
- Niemann, H., X. C. Tian, W. A. King and R. S. Lee (2008). "Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning." Reproduction **135**(2): 151-163 DOI: 10.1530/REP-07-0397
- Nishikawa, S., R. A. Goldstein and C. R. Nierras (2008). "The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(9): 725-729 DOI: 10.1038/nrm2466
- Niwa, H., J. Miyazaki and A. G. Smith (2000). "Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells." Nat Genet **24**(4): 372-376 DOI: 10.1038/74199
- Niwa, H., Y. Toyooka, D. Shimosato, D. Strumpf, K. Takahashi, R. Yagi and J. Rossant (2005). "Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation." Cell **123**(5): 917-929 DOI: 10.1016/j.cell.2005.08.040
- Noggle, S., H. L. Fung, A. Gore, H. Martinez, K. C. Satriani, R. Prosser, K. Oum, D. Paull, S. Druckenmiller, M. Freeby, E. Greenberg, K. Zhang, R. Golland, M. V. Sauer, R. L. Leibel and D. Egli (2011). "Human oocytes reprogram somatic cells to a pluripotent state." Nature **478**(7367): 70-75 DOI: 10.1038/nature10397
- Nordhoff, V., K. Hubner, A. Bauer, I. Orlova, A. Malapetsa and H. R. Scholer (2001). "Comparative analysis of human, bovine, and murine Oct-4 upstream promoter sequences." Mamm Genome **12**(4): 309-317 DOI: 10.1007/s003350010279
- O'Donoghue, K. and N. M. Fisk (2004). "Fetal stem cells." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **18**(6): 853-875 DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2004.06.010
- O'Leary, T., B. Heindryckx, S. Lierman, D. van Bruggen, J. J. Goeman, M. Vandewoestyne, D. Deforce, S. M. C. de Sousa Lopes and P. De Sutter (2012). "Tracking the progression of the human inner cell mass during embryonic stem cell derivation." Nature Biotechnology **30**(3): 278-282 DOI: 10.1038/nbt.2135
- Oback, B. and D. N. Wells (2007). "Donor cell differentiation, reprogramming, and cloning efficiency: elusive or illusive correlation?" Mol Reprod Dev **74**(5): 646-654 DOI: 10.1002/mrd.20654
- Ogonuki, N., K. Inoue, Y. Yamamoto, Y. Noguchi, K. Tanemura, O. Suzuki, H. Nakayama, K. Doi, Y. Ohtomo, M. Satoh, A. Nishida and A. Ogura (2002). "Early death of mice cloned from somatic cells." Nat Genet **30**(3): 253-254 DOI: 10.1038/ng841
- Ogura, A., K. Inoue, K. Takano, T. Wakayama and R. Yanagimachi (2000). "Birth of mice after nuclear transfer by electrofusion using tail tip cells." Mol Reprod Dev **57**(1): 55-59 DOI: 10.1002/1098-2795(200009)57:1<55::AID-MRD8>3.0.CO;2-W
- Ohgane, J., T. Wakayama, Y. Kogo, S. Senda, N. Hattori, S. Tanaka, R. Yanagimachi and K. Shiota (2001). "DNA methylation variation in cloned mice." Genesis **30**(2): 45-50 DOI: 10.1002/gene.1031

- Okamoto, K., H. Okazawa, A. Okuda, M. Sakai, M. Muramatsu and H. Hamada (1990). "A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells." *Cell* **60**(3): 461-472 DOI: 10.1016/0092-8674(90)90597-8
- Okazawa, H., K. Okamoto, F. Ishino, T. Ishino-Kaneko, S. Takeda, Y. Toyoda, M. Muramatsu and H. Hamada (1991). "The oct3 gene, a gene for an embryonic transcription factor, is controlled by a retinoic acid repressible enhancer." *EMBO J* **10**(10): 2997-3005 DOI: 10.1002/j.1460-2075.1991.tb07850.x
- Okita, K., T. Ichisaka and S. Yamanaka (2007). "Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells." *448*(7151): 313-317
- Okita, K., Y. Matsumura, Y. Sato, A. Okada, A. Morizane, S. Okamoto, H. Hong, M. Nakagawa, K. Tanabe, K. Tezuka, T. Shibata, T. Kunisada, M. Takahashi, J. Takahashi, H. Saji and S. Yamanaka (2011). "A more efficient method to generate integration-free human iPS cells." *Nat Methods* **8**(5): 409-412 DOI: 10.1038/nmeth.1591
- Okita, K., M. Nakagawa, H. Hyenjong, T. Ichisaka and S. Yamanaka (2008). "Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors." *Science* **322**(5903): 949-953 DOI: 10.1126/science.1164270
- Okumura-Nakanishi, S., M. Saito, H. Niwa and F. Ishikawa (2005). "Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells." *J Biol Chem* **280**(7): 5307-5317 DOI: 10.1074/jbc.M410015200
- Osteil, P., Y. Taponnier, S. Markossian, M. Godet, B. Schmaltz-Panneau, L. Jouneau, C. Cabau, T. Joly, T. Blachère, E. Góczy, A. Bernat, M. Yerle, H. Acloque, S. Hidot, Z. Bosze, V. Duranthon, P. Savatier and M. Afanassieff (2013). "Induced pluripotent stem cells derived from rabbits exhibit some characteristics of naïve pluripotency." *Biology Open* **2**(6): 613-628 DOI: 10.1242/bio.20134242
- Oswald, J., S. Boxberger, B. Jorgensen, S. Feldmann, G. Ehninger, M. Bornhauser and C. Werner (2004). "Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro." *Stem Cells* **22**(3): 377-384 DOI: 10.1634/stemcells.22-3-377
- Ovitt, C. E. and H. R. Scholer (1998). "The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo." *Mol Hum Reprod* **4**(11): 1021-1031 DOI: 10.1093/molehr/4.11.1021
- Pain, D., G. W. Chirn, C. Strassel and D. M. Kemp (2005). "Multiple retropseudogenes from pluripotent cell-specific gene expression indicates a potential signature for novel gene identification." *J Biol Chem* **280**(8): 6265-6268 DOI: 10.1074/jbc.C400587200
- Pamies, D., P. Barreras, K. Block, G. Makri, A. Kumar, D. Wiersma, L. Smirnova, C. Zang, J. Bressler, K. M. Christian, G. Harris, G. L. Ming, C. J. Berlinicke, K. Kyro, H. Song, C. A. Pardo, T. Hartung and H. T. Hogberg (2017). "A human brain microphysiological system derived from induced pluripotent stem cells to study neurological diseases and toxicity." *ALTEX* **34**(3): 362-376 DOI: 10.14573/altex.1609122
- Pamies, D., K. Block, P. Lau, L. Gribaldo, C. A. Pardo, P. Barreras, L. Smirnova, D. Wiersma, L. Zhao, G. Harris, T. Hartung and H. T. Hogberg (2018). "Rotenone exerts developmental neurotoxicity in a human brain spheroid model." *Toxicol Appl Pharmacol* **354**: 101-114 DOI: 10.1016/j.taap.2018.02.003
- Pamies, D. and T. Hartung (2017). "21st Century Cell Culture for 21st Century Toxicology." *Chem Res Toxicol* **30**(1): 43-52 DOI: 10.1021/acs.chemrestox.6b00269
- Pampaloni, F., E. G. Reynaud and E. H. Stelzer (2007). "The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(10): 839-845 DOI: 10.1038/nrm2236
- Pan, G. J., Z. Y. Chang, H. R. Scholer and D. Pei (2002). "Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4." *Cell Res* **12**(5-6): 321-329 DOI: 10.1038/sj.cr.7290134
- Panagopoulos, I., E. Moller, A. Collin and F. Mertens (2008). "The POU5F1P1 pseudogene encodes a putative protein similar to POU5F1 isoform 1." *Oncol Rep* **20**(5): 1029-1033
- Pandey, U. B. and C. D. Nichols (2011). "Human disease models in Drosophila melanogaster and the role of the fly in therapeutic drug discovery." *Pharmacol Rev* **63**(2): 411-436 DOI: 10.1124/pr.110.003293
- Papapetrou, E. P., M. J. Tomishima, S. M. Chambers, Y. Mica, E. Reed, J. Menon, V. Tabar, Q. Mo, L. Studer and M. Sadelain (2009). "Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(31): 12759-12764 DOI: 10.1073/pnas.0904825106
- Parikh, F. R., A. S. Athalye, N. J. Naik, D. J. Naik, R. R. Sanap and P. F. Madon (2018). "Preimplantation Genetic Testing: Its Evolution, Where Are We Today?" *J Hum Reprod Sci* **11**(4): 306-314 DOI: 10.4103/jhrs.JHRS_132_18

- Park, I. H., R. Zhao, J. A. West, A. Yabuuchi, H. Huo, T. A. Ince, P. H. Lerou, M. W. Lensch and G. Q. Daley (2008). "Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors." Nature **451**(7175): 141-146 DOI: 10.1038/nature06534
- Pastores, G. M., P. Arn, M. Beck, J. T. Clarke, N. Guffon, P. Kaplan, J. Muenzer, D. Y. Norato, E. Shapiro, J. Thomas, D. Viskochil and J. E. Wraith (2007). "The MPS I registry: design, methodology, and early findings of a global disease registry for monitoring patients with Mucopolysaccharidosis Type I." Mol Genet Metab **91**(1): 37-47 DOI: 10.1016/j.ymgme.2007.01.011
- Patton, E. E., L. I. Zon and D. M. Langenau (2021). "Zebrafish disease models in drug discovery: from preclinical modelling to clinical trials." Nat Rev Drug Discov **20**(8): 611-628 DOI: 10.1038/s41573-021-00210-8
- Pei, Y., J. Peng, M. Behl, N. S. Sipes, K. R. Shockley, M. S. Rao, R. R. Tice and X. Zeng (2016). "Comparative neurotoxicity screening in human iPSC-derived neural stem cells, neurons and astrocytes." Brain Res **1638**(Pt A): 57-73 DOI: 10.1016/j.brainres.2015.07.048
- Penney, J., W. T. Ralvenius and L. H. Tsai (2020). "Modeling Alzheimer's disease with iPSC-derived brain cells." Mol Psychiatry **25**(1): 148-167 DOI: 10.1038/s41380-019-0468-3
- Pesce, M., K. Anastassiadis and H. R. Scholer (1999). "Oct-4: lessons of totipotency from embryonic stem cells." Cells Tissues Organs **165**(3-4): 144-152 DOI: 10.1159/000016694
- Pesce, M. and H. R. Scholer (2001). "Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development." Stem Cells **19**(4): 271-278 DOI: 10.1634/stemcells.19-4-271
- Pfaffl, M. W., G. W. Horgan and L. Dempfle (2002). "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." Nucleic Acids Res **30**(9): e36 DOI: 10.1093/nar/30.9.e36
- Pfister-Genskow, M., C. Myers, L. A. Childs, J. C. Lacson, T. Patterson, J. M. Betthausen, P. J. Goueleke, R. W. Koppang, G. Lange, P. Fisher, S. R. Watt, E. J. Forsberg, Y. Zheng, G. H. Leno, R. M. Schultz, B. Liu, C. Chetia, X. Yang, I. Hoeschele and K. J. Eilertsen (2005). "Identification of differentially expressed genes in individual bovine preimplantation embryos produced by nuclear transfer: improper reprogramming of genes required for development." Biol Reprod **72**(3): 546-555 DOI: 10.1095/biolreprod.104.031799
- Pinto, L. L., T. A. Vieira, R. Giugliani and I. V. Schwartz (2010). "Expression of the disease on female carriers of X-linked lysosomal disorders: a brief review." Orphanet J Rare Dis **5**: 14 DOI: 10.1186/1750-1172-5-14
- Pistollato, F., D. Canovas-Jorda, D. Zagoura and A. Bal-Price (2017). "Nrf2 pathway activation upon rotenone treatment in human iPSC-derived neural stem cells undergoing differentiation towards neurons and astrocytes." Neurochem Int **108**: 457-471 DOI: 10.1016/j.neuint.2017.06.006
- Platt, F. M., B. Boland and A. C. van der Spoel (2012). "The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction." J Cell Biol **199**(5): 723-734 DOI: 10.1083/jcb.201208152
- Plummer, S., S. Wallace, G. Ball, R. Lloyd, P. Schiapparelli, A. Quinones-Hinojosa, T. Hartung and D. Pamies (2019). "A Human iPSC-derived 3D platform using primary brain cancer cells to study drug development and personalized medicine." Sci Rep **9**(1): 1407 DOI: 10.1038/s41598-018-38130-0
- Plusa, B. and A. Piliszek (2020). "Common principles of early mammalian embryo self-organisation." Development **147**(14): dev183079 DOI: 10.1242/dev.183079
- Prescott, M. J. (2017). The Three Rs. The International Encyclopedia of Primatology: 1-5.
- Pugh, B. F. and R. Tjian (1991). "Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex." Genes Dev **5**(11): 1935-1945 DOI: 10.1101/gad.5.11.1935
- Qian, X., H. N. Nguyen, M. M. Song, C. Hadiono, S. C. Ogden, C. Hammack, B. Yao, G. R. Hamersky, F. Jacob, C. Zhong, K. J. Yoon, W. Jeang, L. Lin, Y. Li, J. Thakor, D. A. Berg, C. Zhang, E. Kang, M. Chickering, D. Nauen, C. Y. Ho, Z. Wen, K. M. Christian, P. Y. Shi, B. J. Maher, H. Wu, P. Jin, H. Tang, H. Song and G. L. Ming (2016). "Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure." Cell **165**(5): 1238-1254 DOI: 10.1016/j.cell.2016.04.032
- Qiu, C., J. Cao, B. K. Martin, T. Li, I. C. Welsh, S. Srivatsan, X. Huang, D. Calderon, W. S. Noble, C. M. Disteche, S. A. Murray, M. Spielmann, C. B. Moens, C. Trapnell and J. Shendure (2022). "Systematic reconstruction of cellular trajectories across mouse embryogenesis." Nat Genet **54**(3): 328-341 DOI: 10.1038/s41588-022-01018-x
- Qiu, C., B. K. Martin, I. C. Welsh, R. M. Daza, T.-M. Le, X. Huang, E. K. Nichols, M. L. Taylor, O. Fulton, D. R. O'Day, A. R. Gomes, S. Ilcisin, S. Srivatsan, X. Deng, C. M. Disteche, W. S. Noble, N. Hamazaki, C. B. Moens, D. Kimelman, J. Cao, A. F. Schier, M. Spielmann, S. A. Murray, C. Trapnell and J. Shendure

- (2024). "A single-cell time-lapse of mouse prenatal development from gastrula to birth." *Nature* **626**(8001): 1084-1093 DOI: 10.1038/s41586-024-07069-w
- Quackenbush, J. (2002). "Microarray data normalization and transformation." *Nat Genet* **32 Suppl**: 496-501 DOI: 10.1038/ng1032
- Quan, L., Y. Chen, J. Song, Q. Yan, Q. Zhang, S. Lai, N. Fan, J. Xin, Q. Zou and L. Lai (2014). "Establishment of a Rabbit Oct4 Promoter-Based EGFP Reporter System." *PLoS ONE* **9**(10): e109728 DOI: 10.1371/journal.pone.0109728
- Rama Rao, K. V. and T. Kielian (2016). "Astrocytes and lysosomal storage diseases." *Neuroscience* **323**: 195-206 DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.05.061
- Ramalho-Santos, M., S. Yoon, Y. Matsuzaki, R. C. Mulligan and D. A. Melton (2002). "'Stemness': transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells." *Science* **298**(5593): 597-600 DOI: 10.1126/science.1072530
- Rappaport, J., R. L. Manthe, M. Solomon, C. Garnacho and S. Muro (2016). "A Comparative Study on the Alterations of Endocytic Pathways in Multiple Lysosomal Storage Disorders." *Mol Pharm* **13**(2): 357-368 DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00542
- Rappold, P. M., M. Cui, A. S. Chesser, J. Tibbett, J. C. Grima, L. Duan, N. Sen, J. A. Javitch and K. Tieu (2011). "Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(51): 20766-20771 DOI: 10.1073/pnas.1115141108
- Rastall, D. P. and A. Amalfitano (2015). "Recent advances in gene therapy for lysosomal storage disorders." *Appl Clin Genet* **8**: 157-169 DOI: 10.2147/TACG.S57682
- Reboun, M., J. Rybova, R. Dobrovolny, J. Vcelak, T. Veselkova, G. Storkanova, D. Musalkova, M. Hrebicek, J. Ledvinova, M. Magner, J. Zeman, K. Peskova and L. Dvorakova (2016). "X-Chromosome Inactivation Analysis in Different Cell Types and Induced Pluripotent Stem Cells Elucidates the Disease Mechanism in a Rare Case of Mucopolysaccharidosis Type II in a Female." *Folia Biol (Praha)* **62**(2): 82-89
- Reik, W., W. Dean and J. Walter (2001). "Epigenetic reprogramming in mammalian development." *Science* **293**: 1089-1093
- Renard, J. P., S. Chastant, P. Chesne, C. Richard, J. Marchal, N. Cordonnier, P. Chavatte and X. Vignon (1999). "Lymphoid hypoplasia and somatic cloning." *Lancet* **353**(9163): 1489-1491 DOI: 10.1016/S0140-6736(98)12173-6
- Ribas, R., B. Oback, W. Ritchie, T. Chebotareva, P. Ferrier, C. Clarke, J. Taylor, E. J. Gallagher, A. C. Mauricio, M. Sousa and I. Wilmut (2005). "Development of a zona-free method of nuclear transfer in the mouse." *Cloning Stem Cells* **7**(2): 126-138 DOI: 10.1089/clo.2005.7.126
- Rideout, W. M., 3rd, T. Wakayama, A. Wutz, K. Eggan, L. Jackson-Grusby, J. Dausman, R. Yanagimachi and R. Jaenisch (2000). "Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning." *Nat Genet* **24**(2): 109-110 DOI: 10.1038/72753
- Roberts, R. M. and S. J. Fisher (2011). "Trophoblast stem cells." *Biol Reprod* **84**(3): 412-421 DOI: 10.1095/biolreprod.110.088724
- Robertson, E. J. (1987). *Teratocarcinomas and embryonic stem cells : a practical approach*. Oxford, Irl.
- Rodriguez-Orsorio, N., Z. Wang, P. Kasinathan, G. P. Page, J. M. Robl and E. Memili (2009). "Transcriptional reprogramming of gene expression in bovine somatic cell chromatin transfer embryos." *BMC Genomics* **10**: 190 DOI: 10.1186/1471-2164-10-190
- Rogel-Gaillard, C., F. Piumi, A. Billault, N. Bourgeaux, J. C. Save, C. Urien, J. Salmon and P. Chardon (2001). "Construction of a rabbit bacterial artificial chromosome (BAC) library: application to the mapping of the major histocompatibility complex to position 12q.1.1." *Mamm Genome* **12**(3): 253-255 DOI: 10.1007/s003350010260
- Romualdez-Tan, M. V. (2023). "Modelling in vitro gametogenesis using induced pluripotent stem cells: a review." *Cell Regen* **12**(1): 33 DOI: 10.1186/s13619-023-00176-5
- Rowe, R. G. and G. Q. Daley (2019). "Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery." *Nat Rev Genet* **20**(7): 377-388 DOI: 10.1038/s41576-019-0100-z
- Rowland, B. D. and D. S. Peeper (2006). "KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer." *Nat Rev Cancer* **6**(1): 11-23 DOI: 10.1038/nrc1780
- Russell, R., M. Ilg, Q. Lin, G. Wu, A. Lechel, W. Bergmann, T. Eiseler, L. Linta, P. P. Kumar, M. Klingenstein, K. Adachi, M. Hohwieler, O. Sakk, S. Raab, A. Moon, M. Zenke, T. Seufferlein, H. R. Schöler, A. Illing, S.

- Liebau and A. Kleger (2015). "A Dynamic Role of TBX3 in the Pluripotency Circuitry." Stem Cell Reports **5**(6): 1155-1170 DOI: 10.1016/j.stemcr.2015.11.003
- Russell, W. M. S. and R. L. Burch (1959). The principles of humane experimental technique, Methuen.
- Sadler, K. C. (2023). "Epigenetics across the evolutionary tree: New paradigms from non-model animals." Bioessays **45**(1): e2200036 DOI: 10.1002/bies.202200036
- Samie, M. A. and H. Xu (2014). "Lysosomal exocytosis and lipid storage disorders." J Lipid Res **55**(6): 995-1009 DOI: 10.1194/jlr.R046896
- Sanges, D. and M. P. Cosma (2010). "Reprogramming cell fate to pluripotency: the decision-making signalling pathways." Int J Dev Biol **54**(11-12): 1575-1587 DOI: 10.1387/ijdb.103190ds
- Santoriello, C. and L. I. Zon (2012). "Hooked! Modeling human disease in zebrafish." J Clin Invest **122**(7): 2337-2343 DOI: 10.1172/JCI60434
- Santos, F., B. Hendrich, W. Reik and W. Dean (2002). "Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo." Developmental Biology **241**: 172-182
- Sardiello, M., M. Palmieri, A. di Ronza, D. L. Medina, M. Valenza, V. A. Gennarino, C. Di Malta, F. Donaudo, V. Embrione, R. S. Polishchuk, S. Banfi, G. Parenti, E. Cattaneo and A. Ballabio (2009). "A gene network regulating lysosomal biogenesis and function." Science **325**(5939): 473-477 DOI: 10.1126/science.1174447
- Sayaka, W., K. Satoshi, N. Van Thuan, O. Hiroshi, H. Takafusa, M. Eiji, B. H. Thuy, M. Masashi and W. Teruhiko (2008). "Effect of volume of oocyte cytoplasm on embryo development after parthenogenetic activation, intracytoplasmic sperm injection, or somatic cell nuclear transfer." Zygote **16**(3): 211-222 DOI: 10.1017/S0967199408004620
- Scarfone, R. A., S. M. Pena, K. A. Russell, D. H. Betts and T. G. Koch (2020). "The use of induced pluripotent stem cells in domestic animals: a narrative review." BMC Vet Res **16**(1): 477 DOI: 10.1186/s12917-020-02696-7
- Scarpa, M., Z. Almasy, M. Beck, O. Bodamer, I. A. Bruce, L. De Meirleir, N. Guffon, E. Guillen-Navarro, P. Hensman, S. Jones, W. Kamin, C. Kampmann, C. Lampe, C. A. Lavery, E. L. Teles, B. Link, A. M. Lund, G. Malm, S. Pitz, M. Rothera, C. Stewart, A. Tytki-Szymanska, A. van der Ploeg, R. Walker, J. Zeman, J. E. Wraith and C. Hunter Syndrome Europea Expert (2011). "Mucopolysaccharidosis type II: European recommendations for the diagnosis and multidisciplinary management of a rare disease." Orphanet J Rare Dis **6**: 72 DOI: 10.1186/1750-1172-6-72
- Schmidt, B. Z., M. Lehmann, S. Gutbier, E. Nembo, S. Noel, L. Smirnova, A. Forsby, J. Hescheler, H. X. Avci, T. Hartung, M. Leist, J. Kobolak and A. Dinnyes (2017). "In vitro acute and developmental neurotoxicity screening: an overview of cellular platforms and high-throughput technical possibilities." Arch Toxicol **91**(1): 1-33 DOI: 10.1007/s00204-016-1805-9
- Schmuck, M. R., T. Temme, K. Dach, D. de Boer, M. Barenys, F. Bendt, A. Mosig and E. Fritsche (2017). "Omnisphero: a high-content image analysis (HCA) approach for phenotypic developmental neurotoxicity (DNT) screenings of organoid neurosphere cultures in vitro." Arch Toxicol **91**(4): 2017-2028 DOI: 10.1007/s00204-016-1852-2
- Scholer, H. R., S. Ruppert, N. Suzuki, K. Chowdhury and P. Gruss (1990). "New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4." Nature **344**(6265): 435-439 DOI: 10.1038/344435a0
- Schultz, M. L., L. Tecedor, M. Chang and B. L. Davidson (2011). "Clarifying lysosomal storage diseases." Trends Neurosci **34**(8): 401-410 DOI: 10.1016/j.tins.2011.05.006
- Selfridge, J., A. M. Pow, J. McWhir, T. M. Magin and D. W. Melton (1992). "Gene targeting using a mouse HPRT minigene/HPRT-deficient embryonic stem cell system: inactivation of the mouse ERCC-1 gene." Somat Cell Mol Genet **18**(4): 325-336 DOI: 10.1007/BF01235756
- Settembre, C., C. Di Malta, V. A. Polito, M. Garcia Arencibia, F. Vetrini, S. Erdin, S. U. Erdin, T. Huynh, D. Medina, P. Colella, M. Sardiello, D. C. Rubinshtein and A. Ballabio (2011). "TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis." Science **332**(6036): 1429-1433 DOI: 10.1126/science.1204592
- Sharova, L. V., A. A. Sharov, Y. Piao, N. Shaik, T. Sullivan, C. L. Stewart, B. L. Hogan and M. S. Ko (2007). "Global gene expression profiling reveals similarities and differences among mouse pluripotent stem cells of different origins and strains." Dev Biol **307**(2): 446-459 DOI: 10.1016/j.ydbio.2007.05.004

- Shi, J. H., B. Zheng, S. Chen, G. Y. Ma and J. K. Wen (2012a). "Retinoic acid receptor alpha mediates all-trans-retinoic acid-induced Klf4 gene expression by regulating Klf4 promoter activity in vascular smooth muscle cells." *J Biol Chem* **287**(14): 10799-10811 DOI: 10.1074/jbc.M111.321836
- Shi, J. J., D. H. Cai, X. J. Chen and H. Z. Sheng (2008). "Cloning and characterization of the rabbit POU5F1 gene." *DNA Seq* **19**(1): 56-61 DOI: 10.1080/10425170701388834
- Shi, Y., P. Kirwan and F. J. Livesey (2012b). "Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks." *Nat Protoc* **7**(10): 1836-1846 DOI: 10.1038/nprot.2012.116
- Shimada, H., A. Nakada, Y. Hashimoto, K. Shigeno, Y. Shionoya and T. Nakamura (2010). "Generation of canine induced pluripotent stem cells by retroviral transduction and chemical inhibitors." *Mol Reprod Dev* **77**(1): 2 DOI: 10.1002/mrd.21117
- Shimizu, T., J. Ueda, J. C. Ho, K. Iwasaki, L. Poellinger, I. Harada and Y. Sawada (2012). "Dual inhibition of Src and GSK3 maintains mouse embryonic stem cells, whose differentiation is mechanically regulated by Src signaling." *Stem Cells* **30**(7): 1394-1404 DOI: 10.1002/stem.1119
- Shultz, L. D., M. A. Brehm, J. V. Garcia-Martinez and D. L. Greiner (2012). "Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges." *Nat Rev Immunol* **12**(11): 786-798 DOI: 10.1038/nri3311
- Silva, J., J. Nichols, T. W. Theunissen, G. Guo, A. L. van Oosten, O. Barrandon, J. Wray, S. Yamanaka, I. Chambers and A. Smith (2009). "Nanog is the gateway to the pluripotent ground state." *Cell* **138**(4): 722-737 DOI: 10.1016/j.cell.2009.07.039
- Simmet, K., V. Zakhartchenko, J. Philippou-Massier, H. Blum, N. Klymiuk and E. Wolf (2018). "OCT4/POU5F1 is required for NANOG expression in bovine blastocysts." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**(11): 2770-2775 DOI: 10.1073/pnas.1718833115
- Singh, V. K. and T. M. Seed (2021). "How necessary are animal models for modern drug discovery?" *Expert Opin Drug Discov* **16**(12): 1391-1397 DOI: 10.1080/17460441.2021.1972255
- Sirenko, O., F. Parham, S. Dea, N. Sodhi, S. Biesmans, S. Mora-Castilla, K. Ryan, M. Behl, G. Chandy, C. Crittenden, S. Vargas-Hurlston, O. Guicherit, R. Gordon, F. Zanella and C. Carroumeu (2019). "Functional and Mechanistic Neurotoxicity Profiling Using Human iPSC-Derived Neural 3D Cultures." *Toxicol Sci* **167**(1): 58-76 DOI: 10.1093/toxsci/kfy218
- Smirnova, L., H. T. Hogberg, M. Leist and T. Hartung (2014). "Developmental neurotoxicity - challenges in the 21st century and in vitro opportunities." *ALTEX* **31**(2): 129-156 DOI: 10.14573/altex.1403271
- Smith, A. (1998). "Cell therapy: in search of pluripotency." *Curr Biol* **8**(22): R802-804 DOI: 10.1016/s0960-9822(07)00504-0
- Smith, A. G., J. K. Heath, D. D. Donaldson, G. G. Wong, J. Moreau, M. Stahl and D. Rogers (1988). "Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides." *Nature* **336**(6200): 688-690 DOI: 10.1038/336688a0
- Smith, R. K., E. R. Garvican and L. A. Fortier (2014). "The current 'state of play' of regenerative medicine in horses: what the horse can tell the human." *Regen Med* **9**(5): 673-685 DOI: 10.2217/rme.14.42
- Smith, S. L., R. E. Everts, X. C. Tian, F. Du, L. Y. Sung, S. L. Rodriguez-Zas, B. S. Jeong, J. P. Renard, H. A. Lewin and X. Yang (2005). "Global gene expression profiles reveal significant nuclear reprogramming by the blastocyst stage after cloning." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(49): 17582-17587 DOI: 10.1073/pnas.0508952102
- Somers, J., C. Smith, M. Donnison, D. N. Wells, H. Henderson, L. McLeay and P. L. Pfeffer (2006). "Gene expression profiling of individual bovine nuclear transfer blastocysts." *Reproduction* **131**(6): 1073-1084 DOI: 10.1530/rep.1.00967
- Song, H., H. Li, M. Huang, D. Xu, C. Gu, Z. Wang, F. Dong and F. Wang (2013). "Induced pluripotent stem cells from goat fibroblasts." *Mol Reprod Dev* **80**(12): 1009-1017 DOI: 10.1002/mrd.22266
- Sorgel, F., R. Weissenbacher, M. Kinzig-Schippers, A. Hofmann, M. Illauer, A. Skott and C. Landersdorfer (2002). "Acrylamide: increased concentrations in homemade food and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans." *Chemotherapy* **48**(6): 267-274 DOI: 10.1159/000069715
- Sozen, B., V. Jorgensen, B. A. T. Weatherbee, S. Chen, M. Zhu and M. Zernicka-Goetz (2021). "Reconstructing aspects of human embryogenesis with pluripotent stem cells." *Nat Commun* **12**(1): 5550 DOI: 10.1038/s41467-021-25853-4

- Spampanato, C., E. Feeney, L. Li, M. Cardone, J. A. Lim, F. Annunziata, H. Zare, R. Polishchuk, R. Puertollano, G. Parenti, A. Ballabio and N. Raben (2013). "Transcription factor EB (TFEB) is a new therapeutic target for Pompe disease." *EMBO Mol Med* **5**(5): 691-706 DOI: 10.1002/emmm.201202176
- Srirattana, K., M. Kaneda and R. Parnpai (2022). "Strategies to Improve the Efficiency of Somatic Cell Nuclear Transfer." *Int J Mol Sci* **23**(4) DOI: 10.3390/ijms23041969
- Strzyz, P. (2016). "Adult stem cells: Hair stem cells born without a home." *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**(3): 133 DOI: 10.1038/nrm.2016.9
- Sukoyan, M. A., A. Y. Kerkis, M. R. Mello, I. E. Kerkis, J. A. Visintin and L. V. Pereira (2002). "Establishment of new murine embryonic stem cell lines for the generation of mouse models of human genetic diseases." *Braz J Med Biol Res* **35**(5): 535-542 DOI: 10.1590/s0100-879x2002000500004
- Sunchu, B. and C. Cabernard (2020). "Principles and mechanisms of asymmetric cell division." *Development* **147**(13) DOI: 10.1242/dev.167650
- Suzuki, H., N. Kamada, O. Ueda, K. Jishage, Y. Kurihara, H. Kurihara, Y. Terauchi, S. Azuma, T. Kadowaki, T. Kodama, Y. Yazaki and Y. Toyoda (1997). "Germ-line contribution of embryonic stem cells in chimeric mice: influence of karyotype and in vitro differentiation ability." *Exp Anim* **46**(1): 17-23 DOI: 10.1538/expanim.46.17
- Tachibana, M., P. Amato, M. Sparman, Nuria M. Gutierrez, R. Tippner-Hedges, H. Ma, E. Kang, A. Fulati, H.-S. Lee, H. Sritanaudomchai, K. Masterson, J. Larson, D. Eaton, K. Sadler-Fredd, D. Battaglia, D. Lee, D. Wu, J. Jensen, P. Patton, S. Gokhale, Richard L. Stouffer, D. Wolf and S. Mitalipov (2013). "Human Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer." *Cell* **153**(6): 1228-1238 DOI: 10.1016/j.cell.2013.05.006
- Tada, M., Y. Takahama, K. Abe, N. Nakatsuji and T. Tada (2001). "Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells." *Curr Biol* **11**(19): 1553-1558 DOI: 10.1016/s0960-9822(01)00459-6
- Taei, A., P. Rasooli, T. Braun, S.-N. Hassani and H. Baharvand (2020). "Signal regulators of human naïve pluripotency." *Experimental Cell Research* **389**(2): 111924 DOI: 10.1016/j.yexcr.2020.111924
- Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." *Cell* **131**(5): 861-872 DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." *Cell* **126**(4): 663-676 DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024
- Takashima, Y., G. Guo, R. Loos, J. Nichols, G. Ficz, F. Krueger, D. Oxley, F. Santos, J. Clarke, W. Mansfield, W. Reik, P. Bertone and A. Smith (2014). "Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human." *Cell* **158**(6): 1254-1269 DOI: 10.1016/j.cell.2014.08.029
- Takeda, J., S. Seino and G. I. Bell (1992). "Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues." *Nucleic Acids Res* **20**(17): 4613-4620 DOI: 10.1093/nar/20.17.4613
- Tamashiro, K. L., T. Wakayama, H. Akutsu, Y. Yamazaki, J. L. Lachey, M. D. Wortman, R. J. Seeley, D. A. D'Alessio, S. C. Woods, R. Yanagimachi and R. R. Sakai (2002). "Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring." *Nat Med* **8**(3): 262-267 DOI: 10.1038/nm0302-262
- Tan, W., C. Proudfoot, S. G. Lillico and C. B. Whitelaw (2016). "Gene targeting, genome editing: from Dolly to editors." *Transgenic Res* **25**(3): 273-287 DOI: 10.1007/s11248-016-9932-x
- Tanaka, A., T. Okuyama, Y. Suzuki, N. Sakai, H. Takakura, T. Sawada, T. Tanaka, T. Otomo, T. Ohashi, M. Ishige-Wada, H. Yabe, T. Ohura, N. Suzuki, K. Kato, S. Adachi, R. Kobayashi, H. Mugishima and S. Kato (2012). "Long-term efficacy of hematopoietic stem cell transplantation on brain involvement in patients with mucopolysaccharidosis type II: a nationwide survey in Japan." *Mol Genet Metab* **107**(3): 513-520 DOI: 10.1016/j.ymgme.2012.09.004
- Tanaka, N., T. Takeuchi, Q. V. Neri, E. S. Sills and G. D. Palermo (2006). "Laser-assisted blastocyst dissection and subsequent cultivation of embryonic stem cells in a serum/cell free culture system: applications and preliminary results in a murine model." *J Transl Med* **4**: 20 DOI: 10.1186/1479-5876-4-20
- Tanaka, S., T. Kunath, A. K. Hadjantonakis, A. Nagy and J. Rossant (1998). "Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4." *Science* **282**(5396): 2072-2075 DOI: 10.1126/science.282.5396.2072

- Tanaka, S., M. Oda, Y. Toyoshima, T. Wakayama, M. Tanaka, N. Yoshida, N. Hattori, J. Ohgane, R. Yanagimachi and K. Shiota (2001). "Placentomegaly in cloned mouse concepti caused by expansion of the spongiotrophoblast layer." Biol Reprod **65**(6): 1813-1821 DOI: 10.1095/biolreprod65.6.1813
- Tanaka, T. S., T. Kunath, W. L. Kimber, S. A. Jaradat, C. A. Stagg, M. Usuda, T. Yokota, H. Niwa, J. Rossant and M. S. Ko (2002). "Gene expression profiling of embryo-derived stem cells reveals candidate genes associated with pluripotency and lineage specificity." Genome Res **12**(12): 1921-1928 DOI: 10.1101/gr.670002
- Tancos, Z., C. Nemes, Z. Polgar, E. Gocza, N. Daniel, T. A. E. Stout, P. Maraghechi, M. K. Pirtty, P. Osteil, Y. Taponnier, S. Markossian, M. Godet, M. Afanassieff, Z. Bosze, V. Duranthon, P. Savatier and A. Dinnyes (2012). "Generation of rabbit pluripotent stem cell lines." Theriogenology **78**(8): 1774-1786 DOI: 10.1016/j.theriogenology.2012.06.017
- Tanner, C. M., F. Kamel, G. W. Ross, J. A. Hoppin, S. M. Goldman, M. Korell, C. Marras, G. S. Bhudhikanok, M. Kasten, A. R. Chade, K. Comyns, M. B. Richards, C. Meng, B. Priestley, H. H. Fernandez, F. Cambi, D. M. Umbach, A. Blair, D. P. Sandler and J. W. Langston (2011). "Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease." Environ Health Perspect **119**(6): 866-872 DOI: 10.1289/ehp.1002839
- Tarazi, S., A. Aguilera-Castrejon, C. Joubran, N. Ghanem, S. Ashoukhi, F. Roncato, E. Wildschutz, M. Haddad, B. Oldak, E. Gomez-Cesar, N. Livnat, S. Viukov, D. Lokshtanov, S. Naveh-Tassa, M. Rose, S. Hanna, C. Raanan, O. Brenner, M. Kedmi, H. Keren-Shaul, T. Lapidot, I. Maza, N. Novershtern and J. H. Hanna (2022). "Post-gastrulation synthetic embryos generated ex utero from mouse naive ESCs." Cell **185**(18): 3290-3306 e3225 DOI: 10.1016/j.cell.2022.07.028
- Telford, N., A. Watson and G. Schultz (1990). "Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species." Molecular Reproduction and Development **26**: 90-100
- Tesar, P. J., J. G. Chenoweth, F. A. Brook, T. J. Davies, E. P. Evans, D. L. Mack, R. L. Gardner and R. D. G. McKay (2007). "New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells." Nature **448**(7150): 196-199 DOI: 10.1038/nature05972
- Theunissen, T. W., B. E. Powell, H. Wang, M. Mitalipova, D. A. Faddah, J. Reddy, Z. P. Fan, D. Maetzel, K. Ganz, L. Shi, T. Lungjangwa, S. Imsoonthornruksa, Y. Stelzer, S. Rangarajan, A. D'Alessio, J. Zhang, Q. Gao, M. M. Dawlaty, R. A. Young, N. S. Gray and R. Jaenisch (2014). "Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency." Cell Stem Cell **15**(4): 471-487 DOI: 10.1016/j.stem.2014.07.002
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall and J. M. Jones (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science **282**(5391): 1145-1147 DOI: 10.1126/science.282.5391.1145
- Thomson, J. A. and J. S. Odorico (2000). "Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines." Trends Biotechnol **18**(2): 53-57 DOI: 10.1016/s0167-7799(99)01410-9
- Tian, X. C., J. Park, R. Bruno, R. French, L. Jiang and R. S. Prather (2009). "Altered gene expression in cloned piglets." Reprod Fertil Dev **21**(1): 60-66 DOI: 10.1071/rd08214
- Tolar, J., I. H. Park, L. Xia, C. J. Lees, B. Peacock, B. Webber, R. T. McElmurry, C. R. Eide, P. J. Orchard, M. Kyba, M. J. Osborn, T. C. Lund, J. E. Wagner, G. Q. Daley and B. R. Blazar (2011). "Hematopoietic differentiation of induced pluripotent stem cells from patients with mucopolysaccharidosis type I (Hurler syndrome)." Blood **117**(3): 839-847 DOI: 10.1182/blood-2010-05-287607
- Tong, G. Q., B. C. Heng and S. C. Ng (2007). "Cumulus-specific genes are transcriptionally silent following somatic cell nuclear transfer in a mouse model." J Zhejiang Univ Sci B **8**(8): 533-539 DOI: 10.1631/jzus.2007.B0533
- Tsuji, R. and K. M. Crofton (2012). "Developmental neurotoxicity guideline study: issues with methodology, evaluation and regulation." Congenit Anom (Kyoto) **52**(3): 122-128 DOI: 10.1111/j.1741-4520.2012.00374.x
- Tukker, A. M., M. W. de Groot, F. M. Wijnolts, E. E. Kasteel, L. Hondebrink and R. H. Westerink (2016). "Is the time right for in vitro neurotoxicity testing using human iPSC-derived neurons?" ALTEX **33**(3): 261-271 DOI: 10.14573/altex.1510091
- Tukker, A. M., F. M. J. Wijnolts, A. de Groot and R. H. S. Westerink (2018). "Human iPSC-derived neuronal models for in vitro neurotoxicity assessment." Neurotoxicology **67**: 215-225 DOI: 10.1016/j.neuro.2018.06.007
- Tusher, V. G., R. Tibshirani and G. Chu (2001). "Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(9): 5116-5121 DOI: 10.1073/pnas.091062498

- Uto, S., S. Nishizawa, A. Hikita, T. Takato and K. Hoshi (2018). "Application of induced pluripotent stem cells for cartilage regeneration in CLAWN miniature pig osteochondral replacement model." Regen Ther **9**: 58-70 DOI: 10.1016/j.reth.2018.06.003
- Vaags, A. K., S. Rosic-Kablar, C. J. Gartley, Y. Z. Zheng, A. Chesney, D. A. Villagómez, S. A. Kruth and M. R. Hough (2009). "Derivation and characterization of canine embryonic stem cell lines with in vitro and in vivo differentiation potential." Stem Cells **27**(2): 329-340 DOI: 10.1634/stemcells.2008-0433
- Valayannopoulos, V. and F. A. Wijburg (2011). "Therapy for the mucopolysaccharidoses." Rheumatology (Oxford) **50 Suppl 5**: v49-59 DOI: 10.1093/rheumatology/ker396
- van Eijk, M. J., M. A. van Rooijen, S. Modina, L. Scesi, G. Folkers, H. T. van Tol, M. M. Bevers, S. R. Fisher, H. A. Lewin, D. Rakacolli, C. Galli, C. de Vaureix, A. O. Trounson, C. L. Mummery and F. Gandolfi (1999). "Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of bovine POU5F1." Biol Reprod **60**(5): 1093-1103 DOI: 10.1095/biolreprod60.5.1093
- van Schadewijk, A., E. F. van't Wout, J. Stolk and P. S. Hiemstra (2012). "A quantitative method for detection of spliced X-box binding protein-1 (XBP1) mRNA as a measure of endoplasmic reticulum (ER) stress." Cell Stress Chaperones **17**(2): 275-279 DOI: 10.1007/s12192-011-0306-2
- van Steenbeek, F. G., M. K. Hytönen, P. A. Leegwater and H. Lohi (2016). "The canine era: the rise of a biomedical model." Anim Genet **47**(5): 519-527 DOI: 10.1111/age.12460
- Vanin, E. F. (1985). "Processed pseudogenes: characteristics and evolution." Annu Rev Genet **19**: 253-272 DOI: 10.1146/annurev.ge.19.120185.001345
- Varga, E., C. Nemes, I. Bock, N. Varga, A. Feher, A. Dinnyes and J. Kobolak (2016a). "Generation of Mucopolysaccharidosis type II (MPS II) human induced pluripotent stem cell (iPSC) line from a 1-year-old male with pathogenic IDS mutation." Stem Cell Res **17**(3): 482-484 DOI: 10.1016/j.scr.2016.09.033
- Varga, E., C. Nemes, I. Bock, N. Varga, A. Feher, J. Kobolak and A. Dinnyes (2016b). "Generation of Mucopolysaccharidosis type II (MPS II) human induced pluripotent stem cell (iPSC) line from a 3-year-old male with pathogenic IDS mutation." Stem Cell Res **17**(3): 479-481 DOI: 10.1016/j.scr.2016.09.032
- Varga, E., C. Nemes, I. Bock, N. Varga, A. Feher, J. Kobolak and A. Dinnyes (2016c). "Generation of Mucopolysaccharidosis type II (MPS II) human induced pluripotent stem cell (iPSC) line from a 7-year-old male with pathogenic IDS mutation." Stem Cell Res **17**(3): 463-465 DOI: 10.1016/j.scr.2016.09.034
- Varga, E., C. Nemes, E. Kovacs, I. Bock, N. Varga, A. Feher, A. Dinnyes and J. Kobolak (2016d). "Generation of human induced pluripotent stem cell (iPSC) line from an unaffected female carrier of Mucopolysaccharidosis type II (MPS II) disorder." Stem Cell Res **17**(3): 514-516 DOI: 10.1016/j.scr.2016.09.035
- Vassiliev, I., S. Vassilieva, K. P. Truong, L. F. Beebe, S. M. McIlfratrick, S. J. Harrison and M. B. Nottle (2011). "Isolation and in vitro characterization of putative porcine embryonic stem cells from cloned embryos treated with trichostatin A." Cell Reprogram **13**(3): 205-213 DOI: 10.1089/cell.2010.0102
- Veenvliet, J. V., A. Bolondi, H. Kretzmer, L. Haut, M. Scholze-Wittler, D. Schifferl, F. Koch, L. Guignard, A. S. Kumar, M. Pustet, S. Heimann, R. Buschow, L. Wittler, B. Timmermann, A. Meissner and B. G. Herrmann (2020). "Mouse embryonic stem cells self-organize into trunk-like structures with neural tube and somites." Science **370**(6522) DOI: 10.1126/science.aba4937
- Veillard, A.-C., H. Marks, A. S. Bernardo, L. Jouneau, D. Laloë, L. Boulanger, A. Kaan, V. Brochard, M. Tosolini, R. Pedersen, H. Stunnenberg and A. Jouneau (2014). "Stable Methylation at Promoters Distinguishes Epiblast Stem Cells from Embryonic Stem Cells and the In Vivo Epiblasts." Stem Cells and Development **23**(17): 2014-2029 DOI: 10.1089/scd.2013.0639
- Viswanathan, S. R., G. Q. Daley and R. I. Gregory (2008). "Selective Blockade of MicroRNA Processing by Lin28." Science **320**(5872): 97-100 DOI: doi:10.1126/science.1154040
- Vitry, S., J. Bruyere, M. Hocquemiller, S. Bigou, J. Ausseil, M. A. Colle, M. C. Prevost and J. M. Heard (2010). "Storage vesicles in neurons are related to Golgi complex alterations in mucopolysaccharidosis IIIB." Am J Pathol **177**(6): 2984-2999 DOI: 10.2353/ajpath.2010.100447
- Vogt, E. J., M. Meglicki, K. I. Hartung, E. Borsuk and R. Behr (2012). "Importance of the pluripotency factor LIN28 in the mammalian nucleolus during early embryonic development." Development **139**(24): 4514-4523 DOI: 10.1242/dev.083279
- Vollebregt, A. A. M., M. Hoogeveen-Westerveld, M. A. Kroos, E. Oussoren, I. Plug, G. J. Ruijter, A. T. van der Ploeg and W. Pijnappel (2017). "Genotype-phenotype relationship in mucopolysaccharidosis II:

- predictive power of IDS variants for the neuronopathic phenotype." *Dev Med Child Neurol* **59**(10): 1063-1070 DOI: 10.1111/dmcn.13467
- Wabl, M. R., R. B. Brun and L. Du Pasquier (1975). "Lymphocytes of the toad *Xenopus laevis* have the gene set for promoting tadpole development." *Science* **190**(4221): 1310-1312 DOI: 10.1126/science.1198115
- Waghray, A., N. Saiz, A. D. Jayaprakash, A. G. Freire, D. Papatsenko, C. F. Pereira, D. F. Lee, R. Brosh, B. Chang, H. Darr, J. Gingold, K. Kelley, C. Schaniel, A. K. Hadjantonakis and I. R. Lemischka (2015). "Tbx3 Controls Dppa3 Levels and Exit from Pluripotency toward Mesoderm." *Stem Cell Reports* **5**(1): 97-110 DOI: 10.1016/j.stemcr.2015.05.009
- Wakayama, S., J. M. Cummins and T. Wakayama (2008a). "Nuclear reprogramming to produce cloned mice and embryonic stem cells from somatic cells." *Reprod Biomed Online* **16**(4): 545-552 DOI: 10.1016/s1472-6483(10)60462-2
- Wakayama, S., M. L. Jakt, M. Suzuki, R. Araki, T. Hikichi, S. Kishigami, H. Ohta, N. Van Thuan, E. Mizutani, Y. Sakaide, S. Senda, S. Tanaka, M. Okada, M. Miyake, M. Abe, S. Nishikawa, K. Shiota and T. Wakayama (2006). "Equivalency of nuclear transfer-derived embryonic stem cells to those derived from fertilized mouse blastocysts." *Stem Cells* **24**(9): 2023-2033 DOI: 10.1634/stemcells.2005-0537
- Wakayama, S., E. Mizutani, S. Kishigami, N. V. Thuan, H. Ohta, T. Hikichi, H. T. Bui, M. Miyake and T. Wakayama (2005a). "Mice cloned by nuclear transfer from somatic and ntES cells derived from the same individuals." *J Reprod Dev* **51**(6): 765-772 DOI: 10.1262/jrd.17061
- Wakayama, S., H. Ohta, T. Hikichi, E. Mizutani, T. Iwaki, O. Kanagawa and T. Wakayama (2008b). "Production of healthy cloned mice from bodies frozen at -20 °C for 16 years." *105*(45): 17318-17322
- Wakayama, S., H. Ohta, S. Kishigami, N. V. Thuan, T. Hikichi, E. Mizutani, M. Miyake and T. Wakayama (2005b). "Establishment of male and female nuclear transfer embryonic stem cell lines from different mouse strains and tissues." *Biol Reprod* **72**(4): 932-936 DOI: 10.1095/biolreprod.104.035105
- Wakayama, T. (2007). "Production of cloned mice and ES cells from adult somatic cells by nuclear transfer: how to improve cloning efficiency?" *J Reprod Dev* **53**(1): 13-26 DOI: 10.1262/jrd.18120
- Wakayama, T., A. C. Perry, M. Zuccotti, K. R. Johnson and R. Yanagimachi (1998). "Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei." *Nature* **394**(6691): 369-374 DOI: 10.1038/28615
- Wakayama, T., I. Rodriguez, A. C. Perry, R. Yanagimachi and P. Mombaerts (1999). "Mice cloned from embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(26): 14984-14989 DOI: 10.1073/pnas.96.26.14984
- Wakayama, T., V. Tabar, I. Rodriguez, A. C. Perry, L. Studer and P. Mombaerts (2001). "Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer." *Science* **292**(5517): 740-743 DOI: 10.1126/science.1059399
- Wakayama, T. and R. Yanagimachi (1999). "Cloning of male mice from adult tail-tip cells." *Nat Genet* **22**(2): 127-128 DOI: 10.1038/9632
- Wakisaka-Saito, N., T. Kohda, K. Inoue, N. Ogonuki, H. Miki, T. Hikichi, E. Mizutani, T. Wakayama, T. Kaneko-Ishino, A. Ogura and F. Ishino (2006). "Chorioallantoic placenta defects in cloned mice." *Biochem Biophys Res Commun* **349**(1): 106-114 DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.08.057
- Walsh, N. C., L. L. Kenney, S. Jangalwe, K. E. Aryee, D. L. Greiner, M. A. Brehm and L. D. Shultz (2017). "Humanized Mouse Models of Clinical Disease." *Annu Rev Pathol* **12**: 187-215 DOI: 10.1146/annurev-pathol-052016-100332
- Wang, L., E. Duan, L. Y. Sung, B. S. Jeong, X. Yang and X. C. Tian (2005). "Generation and characterization of pluripotent stem cells from cloned bovine embryos." *Biol Reprod* **73**(1): 149-155 DOI: 10.1095/biolreprod.104.037150
- Wei, Z., Y. Yang, P. Zhang, R. Andrianakos, K. Hasegawa, J. Lyu, X. Chen, G. Bai, C. Liu, M. Pera and W. Lu (2009). "Klf4 Interacts Directly with Oct4 and Sox2 to Promote Reprogramming." *Stem Cells* **27**(12): 2969-2978 DOI: 10.1002/stem.231
- Weinberger, L., M. Ayyash, N. Novershtern and J. H. Hanna (2016). "Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans." *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**(3): 155-169 DOI: 10.1038/nrm.2015.28
- Wernig, M., A. Meissner, J. P. Cassady and R. Jaenisch (2008). "c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts." *Cell Stem Cell* **2**(1): 10-12 DOI: 10.1016/j.stem.2007.12.001
- Wernig, M., A. Meissner, R. Foreman, T. Brambrink, M. Ku, K. Hochedlinger, B. E. Bernstein and R. Jaenisch (2007). "In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state." *448*(7151): 318-324

- Westerink, R. H. (2013). "Do we really want to REACH out to in vitro?" *Neurotoxicology* **39**: 169-172 DOI: 10.1016/j.neuro.2013.10.001
- White, D. L., J. E. Mazurkiewicz and R. J. Barnett (1979). "A chemical mechanism for tissue staining by osmium tetroxide-ferrocyanide mixtures." *J Histochem Cytochem* **27**(7): 1084-1091 DOI: 10.1177/27.7.89155
- Whitworth, K. M. and R. S. Prather (2010). "Somatic cell nuclear transfer efficiency: how can it be improved through nuclear remodeling and reprogramming?" *Mol Reprod Dev* **77**(12): 1001-1015 DOI: 10.1002/mrd.21242
- Wilmot, I., Y. Bai and J. Taylor (2015). "Somatic cell nuclear transfer: origins, the present position and future opportunities." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **370**(1680): 20140366 DOI: 10.1098/rstb.2014.0366
- Wilmot, I., A. Schnieke, J. McWhir, A. Kind and K. Campbell (1997). "Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells." *Nature* **385**: 810-813
- Wolf, D. P., R. Morey, E. Kang, H. Ma, T. Hayama, L. C. Laurent and S. Mitalipov (2017). "Concise Review: Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer: A Horse in the Race?" *Stem Cells* **35**(1): 26-34 DOI: 10.1002/stem.2496
- Wraith, J. E., M. Scarpa, M. Beck, O. A. Bodamer, L. De Meirleir, N. Guffon, A. Meldgaard Lund, G. Malm, A. T. Van der Ploeg and J. Zeman (2008). "Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy." *Eur J Pediatr* **167**(3): 267-277 DOI: 10.1007/s00431-007-0635-4
- Wrenzycki, C., D. Wells, D. Herrmann, A. Miller, J. Oliver, R. Tervit and H. Niemann (2001). "Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts." *Biol Reprod* **65**(1): 309-317 DOI: 10.1095/biolreprod65.1.309
- Xu, X., L. Smorag, T. Nakamura, T. Kimura, R. Dressel, A. Fitzner, X. Tan, M. Linke, U. Zechner, W. Engel and D. V. Pantakani (2015). "Dppa3 expression is critical for generation of fully reprogrammed iPS cells and maintenance of Dlk1-Dio3 imprinting." *Nat Commun* **6**: 6008 DOI: 10.1038/ncomms7008
- Yamanaka, S. and H. M. Blau (2010). "Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches." *Nature* **465**(7299): 704-712 DOI: 10.1038/nature09229
- Yang, S.-H., T. Kalkan, C. Morrisroe, A. Smith and A. D. Sharrocks (2012). "A Genome-Wide RNAi Screen Reveals MAP Kinase Phosphatases as Key ERK Pathway Regulators during Embryonic Stem Cell Differentiation." *PLOS Genetics* **8**(12): e1003112 DOI: 10.1371/journal.pgen.1003112
- Yang, X., S. L. Smith, X. C. Tian, H. A. Lewin, J. P. Renard and T. Wakayama (2007). "Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning." *Nat Genet* **39**(3): 295-302 DOI: 10.1038/ng1973
- Yeom, Y. I., G. Fuhrmann, C. E. Ovitt, A. Brehm, K. Ohbo, M. Gross, K. Hubner and H. R. Scholer (1996). "Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells." *Development* **122**(3): 881-894 DOI: 10.1242/dev.122.3.881
- Yeom, Y. I., H. S. Ha, R. Balling, H. R. Scholer and K. Artzt (1991). "Structure, expression and chromosomal location of the Oct-4 gene." *Mech Dev* **35**(3): 171-179 DOI: 10.1016/0925-4773(91)90016-y
- Yin, M., Z. Fang, W. Jiang, F. Xing, M. Jiang, P. Kong, Y. Li, X. Zhou, L. Tang, S. Li and X. Chen (2013). "The Oct4 promoter-EGFP transgenic rabbit: a new model for monitoring the pluripotency of rabbit stem cells." *The International Journal of Developmental Biology* **57**(11-12): 845-852 DOI: 10.1387/ijdb.130128sl
- Ying, Q. L., J. Nichols, I. Chambers and A. Smith (2003). "BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3." *Cell* **115**(3): 281-292 DOI: 10.1016/s0092-8674(03)00847-x
- Ying, Q. L., J. Wray, J. Nichols, L. Batlle-Morera, B. Doble, J. Woodgett, P. Cohen and A. Smith (2008). "The ground state of embryonic stem cell self-renewal." *Nature* **453**(7194): 519-523 DOI: 10.1038/nature06968
- Yoo, D. H., Y. S. Im, J. Y. Oh, D. Gil and Y. O. Kim (2023). "DUSP6 is a memory retention feedback regulator of ERK signaling for cellular resilience of human pluripotent stem cells in response to dissociation." *Sci Rep* **13**(1): 5683 DOI: 10.1038/s41598-023-32567-8
- Yoshida, H., T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada and K. Mori (2001). "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor." *Cell* **107**(7): 881-891 DOI: 10.1016/s0092-8674(01)00611-0

- Yu, J., M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, I. I. Slukvin and J. A. Thomson (2007). "Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells." Science **318**(5858): 1917-1920 DOI: doi:10.1126/science.1151526
- Yu, L., Y. Wei, J. Duan, D. A. Schmitz, M. Sakurai, L. Wang, K. Wang, S. Zhao, G. C. Hon and J. Wu (2021). "Blastocyst-like structures generated from human pluripotent stem cells." Nature **591**(7851): 620-626 DOI: 10.1038/s41586-021-03356-y
- Yu, P., Y. Lu, B. J. Jordan, Y. Liu, J. Y. Yang, J. M. Hutcheson, C. L. Ethridge, J. L. Mumaw, H. A. Kinder, R. B. Beckstead, S. L. Stice and F. D. West (2014). "Nonviral minicircle generation of induced pluripotent stem cells compatible with production of chimeric chickens." Cell Reprogram **16**(5): 366-378 DOI: 10.1089/cell.2014.0028
- Zagoura, D., D. Canovas-Jorda, F. Pistollato, S. Bremer-Hoffmann and A. Bal-Price (2017). "Evaluation of the rotenone-induced activation of the Nrf2 pathway in a neuronal model derived from human induced pluripotent stem cells." Neurochem Int **106**: 62-73 DOI: 10.1016/j.neuint.2016.09.004
- Zakrzewski, W., M. Dobrzynski, M. Szymonowicz and Z. Rybak (2019). "Stem cells: past, present, and future." Stem Cell Res Ther **10**(1): 68 DOI: 10.1186/s13287-019-1165-5
- Zhang, J., J. Nomura, M. Maruyama, M. Nishimoto, M. Muramatsu and A. Okuda (2009). "Identification of an ES cell pluripotent state-specific DUSP6 enhancer." Biochemical and Biophysical Research Communications **378**(2): 319-323 DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.11.068
- Zhang, J., S. Ratanasirintrao, S. Chandrasekaran, Z. Wu, S. B. Ficarro, C. Yu, C. A. Ross, D. Cacchiarelli, Q. Xia, M. Seligson, G. Shinoda, W. Xie, P. Cahan, L. Wang, S. C. Ng, S. Tintara, C. Trapnell, T. Onder, Y. H. Loh, T. Mikkelsen, P. Sliz, M. A. Teitell, J. M. Asara, J. A. Marto, H. Li, J. J. Collins and G. Q. Daley (2016). "LIN28 Regulates Stem Cell Metabolism and Conversion to Primed Pluripotency." Cell Stem Cell **19**(1): 66-80 DOI: 10.1016/j.stem.2016.05.009
- Zhang, S., T. Chen, N. Chen, D. Gao, B. Shi, S. Kong, R. C. West, Y. Yuan, M. Zhi, Q. Wei, J. Xiang, H. Mu, L. Yue, X. Lei, X. Wang, L. Zhong, H. Liang, S. Cao, J. C. I. Belmonte, H. Wang and J. Han (2019). "Implantation initiation of self-assembled embryo-like structures generated using three types of mouse blastocyst-derived stem cells." Nat Commun **10**(1): 496 DOI: 10.1038/s41467-019-08378-9
- Zhang, Z., B. Liao, M. Xu and Y. Jin (2007). "Post-translational modification of POU domain transcription factor Oct-4 by SUMO-1." FASEB J **21**(12): 3042-3051 DOI: 10.1096/fj.06-6914com
- Zhao, C., R. Yao, J. Hao, C. Ding, Y. Fan, X. Dai, W. Li, T. Hai, Z. Liu, Y. Yu, Y. Wang, X. Hou, W. Ji, Q. Zhou, A. Jouneau, F. Zeng and L. Wang (2007). "Establishment of customized mouse stem cell lines by sequential nuclear transfer." Cell Res **17**(1): 80-87 DOI: 10.1038/sj.cr.7310139
- Zhao, T., Z. N. Zhang, Z. Rong and Y. Xu (2011). "Immunogenicity of induced pluripotent stem cells." Nature **474**(7350): 212-215 DOI: 10.1038/nature10135
- Zhou, R., P. Comizzoli and C. L. Keefer (2019). "Endogenous pluripotent factor expression after reprogramming cat fetal fibroblasts using inducible transcription factors." Mol Reprod Dev **86**(11): 1671-1681 DOI: 10.1002/mrd.23257
- Zhou, S., K. Szczesna, A. Ochalek, J. Kobolak, E. Varga, C. Nemes, A. Chandrasekaran, M. Rasmussen, S. Cirera, P. Hyttel, A. Dinnyes, K. K. Freude and H. X. Avci (2016). "Neurosphere Based Differentiation of Human iPSC Improves Astrocyte Differentiation." Stem Cells Int **2016**: 4937689 DOI: 10.1155/2016/4937689
- Zhou, W. and C. R. Freed (2009). "Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells." Stem Cells **27**(11): 2667-2674 DOI: 10.1002/stem.201
- Zhou, Y. Y. and F. Zeng (2013). "Integration-free methods for generating induced pluripotent stem cells." Genomics Proteomics Bioinformatics **11**(5): 284-287 DOI: 10.1016/j.gpb.2013.09.008

10 MELLÉKLETEK

1. melléklet: A vizsgálatban használt elsődleges és másodlagos antitestek

Markerek	Ellenanyag neve	Használt hígítás	Gyártó (Katalógusszám)
Pluripotencia	Mouse anti-E-CADHERIN	1:1000	TFS Inc. (13-1700)
	Goat anti-hNANOG	1:50	R&D (AF1997)
	Goat anti-NANOG	1:100	Santa Cruz (sc-30328)
	Mouse anti-SSEA-1	1:100	Hybridoma Bank (MC-480)
	Rabbit anti-POU5F1	1:200	Santa Cruz (sc-9081)
	Goat anti-FGF4	1:200	Santa Cruz (sc-1361)
	Mouse anti-SOX2	1:100	Merck (S1451)
Új naiv/primed pluripotencia marker jelöltek	Goat anti-Oct-3/4 (N19)	1:400	Santa Cruz (sc-8628)
	Rabbit anti-Klf4	1:500	Merck (09-821)
	Rabbit anti-Scp1 (N3C3)	1:300	GeneTex (GTX103381)
	Rabbit anti-Trip6	1:500	GeneTex (GTX111504)
	Rabbit anti-Lin28	1:500	Abcam (ab63740)
	Goat anti-Sema6a	1:200	R&D Systems (AF 1615)
	Rabbit anti-Follistatin	1:200	Santa Cruz (sc-30194)
Csíralemezek	Rabbit anti-β-III-TUBULIN	1:2000	Covance (PRB-435P)
	Rabbit anti-BRACHYURY T	1:50	Santa Cruz (sc-20109)
	Mouse anti-GATA4	1:50	Santa Cruz (sc-25310)
Kardiális differenciáció	Mouse anti-Troponin T	1:200	Hybridoma Bank (CT3)
	Rabbit anti-alfa-aktinin	1:100	Merck (A7811)
Neuronális differenciáció	Mouse anti-NESTIN	1:1000	Merck (MAB5326)
	Rabbit anti-NESTIN	1:50	Abcam (ab105389)
	Rabbit anti-PAX6	1:250	Covance (PRB278P)
	Goat anti-SOX1	1:50	R&D (AF3369)
	Rabbit anti-MAP2	1:1000	Merck (MAB3418)
	Chicken anti-MAP2	1:2500	Abcam (ab5392)
	Anti-NF200-KD	1:1500	Abcam (ab8135)
	Mouse anti-TUBB3	1:500	Santa Cruz (sc-58888)
	Rabbit anti-SYNAPTOPHYSIN	1:100	Abcam (ab8049)
	Rabbit anti-VAMP2	1:250	Cell Signalling (13508)
	Rabbit anti-Vglut1/2	1:500	Synaptic Sytem (135 503)
	Rabbit anti-GFAP	1:1000	Abcam (ab7260)
	Goat anti-GFAP	1:50	Santa Cruz (sc-6170)
	Rabbit anti-AQP4	1:100	Santa Cruz (sc-20812)
Egyéb	Rabbit anti-Ki-67	1:200	Abcam (ab16667)
	Mouse anti-LAPM2	1:100	Abcam (ab25631)
	Rabbit anti-RAB5	1:200	Cell signalling (C8B1)
	Rabbit anti-GRP78	1:400	Abcam (ab21685)
	Mouse anti-GM130	1:200	BD Biosciences (610823)
	Rabbit anti-Calreticulin	1:400	Abcam (ab92516)
	Rabbit anti-TFEB	1:250	Abcam (ab220695)
Másodlagos ellenanyagok	Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG	1:2000	TFS Inc. (A-11055)
	Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG	1:2000	TFS Inc. (A-21202)
	Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG	1:2000	TFS Inc. (A-21206)
	Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgM	1:2000	TFS Inc. (A-21042)
	Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG	1:3000	TFS Inc. (A11008)
	Alexa Fluor 594 donkey anti-mouse IgG	1:2000	TFS Inc. (A21203)
	Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG	1:3000	TFS Inc. (A10039)
	Alexa Fluor 594 donkey anti-goat IgG	1:3000	TFS Inc. (A11058)
	Alexa Fluor 594 goat anti-chicken IgG	1:2000	TFS Inc. (A11042)
	Alexa Fluor 647 goat anti-chicken IgG	1:2000	TFS Inc. (A21449)
	Alexa Fluor 647 donkey anti-goat IgG	1:2000	TFS Inc. (A21447)
	Alexa Fluor 647 donkey anti-mouse IgG	1:2000	TFS Inc. (A31571)
	Alexa Fluor 350 donkey anti-mouse IgG	1:3000	TFS Inc. (A21203)
Konjugált ellenanyagok	Anti-Ki-67-FITC	1:20	Miltenyi Biotec (130-100-340)
	PE mouse anti-human PAX6	1:20	BD Bioscience (561552)
	AF-647 mouse anti- NESTIN	1:50	BD Bioscience (560393)

2. melléklet: TaqMan Mouse Stem Cell Pluripotency Array relatív génexpressziós ($\pm$ SEM) értékei

	Relatív génexpresszió												
Sejtvonal	HM1	HM1 NT		B6D2		B6D2 MEF NT		B6D2 CUM NT		B6D2 CUM NT (PEM)		B6D2 PGA	
Gén	SEM	SEM		SEM		SEM		SEM		SEM		SEM	
Actb	1 0,10	2,00	0,11	2,13	0,08	1,90	0,07	1,76	0,17	1,35	0,01	1,05	0,07
Actc1	1 0,42	0,15	0,26	0,19	0,07	0,19	0,00	0,25	0,61	0,19	0,00	0,64	0,34
Afp	1 0,10	1,00	0,09	0,94	0,00	15,74	0,00	0,84	0,17	0,96	0,00	1,06	0,05
Bxdc2	1 0,11	1,16	0,09	0,91	0,01	1,09	0,01	1,28	0,17	1,00	0,03	0,73	0,05
Cd34	1 0,16	0,64	0,13	2,09	0,02	9,64	0,01	5,34	0,17	6,40	0,03	1,10	0,1
Cd9	1 0,12	1,28	0,09	0,74	0,02	1,04	0,01	1,28	0,17	1,30	0,01	0,90	0,05
Cdh5	1 0,25	4,20	0,25	1,17	0,24	2,85	0,11	0,71	0,26	2,88	0,05	0,67	0,05
Cdx2	1 0,10	16,96	0,13	36,08	0,14	7,47	0,20	3,51	0,72	8,82	0,47	6,33	0,47
Col1a1	1 0,11	14,98	0,09	20,58	0,01	30,72	0,01	20,59	0,17	13,27	0,02	4,17	0,07
Col2a1	1 0,61	5,56	0,26	18,46	0,00	5,65	0,08	2,66	0,17	1,79	0,29	12,75	0,15
Commf3	1 0,12	1,50	0,09	2,29	0,00	3,46	0,01	2,37	0,17	1,51	0,03	1,06	0,06
Crabp2	1 0,10	0,96	0,12	2,98	0,02	3,40	0,06	1,27	0,17	0,72	0,03	1,15	0,06
Ddx4	1 0,10	1,03	0,10	0,84	0,03	0,67	0,07	0,86	0,17	0,59	0,09	0,72	0,13
Des	1 0,10	0,84	0,11	1,70	0,10	1,46	0,10	1,59	0,24	0,93	0,08	0,97	0,05
Eef1a1	1 0,10	1,00	0,13	0,78	0,00	0,87	0,01	1,02	0,17	0,72	0,02	0,77	0,06
Fgf4	1 0,11	0,50	0,09	0,20	0,08	0,61	0,01	1,21	0,18	0,92	0,00	1,62	0,05
Flt1	1 0,10	24,22	0,09	55,40	0,01	22,32	0,00	34,06	0,17	13,28	0,04	3,28	0,15
Fn1	1 0,10	1,80	0,13	1,97	0,05	2,16	0,04	2,00	0,18	1,02	0,06	0,96	0,05
Foxd3	1 0,10	2,24	0,19	1,12	0,16	2,19	0,05	0,74	0,19	1,84	0,13	0,30	0,33
Gabrb3	1 0,13	1,22	0,11	3,81	0,00	3,14	0,03	3,93	0,19	2,05	0,02	5,56	0,11
Gal	1 0,48	9,33	0,13	5,31	0,10	1,50	0,10	1,36	0,20	1,94	0,18	4,79	0,11
Gapdh	1 0,10	1,03	0,09	0,79	0,05	0,83	0,03	0,94	0,17	0,77	0,08	0,55	0,05
Gata6	1 0,13	0,32	0,12	0,65	0,02	0,43	0,21	0,52	0,20	0,79	0,05	0,38	0,11
Gcg	1 0,10	1,00	0,09	0,94	0,00	1,04	0,00	0,84	0,17	0,95	0,00	17,14	0,05
Gdf3	1 0,10	1,16	0,09	0,89	0,04	1,88	0,01	1,31	0,18	1,24	0,02	0,69	0,05
Gfap	1 0,24	0,45	0,23	0,43	0,38	0,33	0,01	0,65	0,17	0,23	0,21	0,48	0,44
Grb7	1 0,10	1,00	0,09	0,92	0,02	0,65	0,03	1,45	0,17	0,97	0,00	0,39	0,08
Hbb-b2	1 0,10	1,00	0,09	0,94	0,00	1,04	0,00	0,84	0,17	0,95	0,00	1,06	0,05
Ifitm1	1 0,13	0,82	0,09	0,34	0,04	0,55	0,03	0,44	0,17	0,26	0,03	0,42	0,05
Ifitm2	1 0,11	1,23	0,09	0,70	0,02	1,10	0,03	1,32	0,18	1,19	0,02	1,26	0,07
Igfbp2	1 0,10	0,75	0,09	0,72	0,00	0,66	0,05	0,90	0,17	0,63	0,02	0,99	0,08
Il6st	1 0,10	1,52	0,09	1,20	0,01	1,59	0,02	1,67	0,17	1,05	0,04	0,50	0,09
Krt1	1 0,49	2,32	0,21	3,72	0,45	1,16	0,12	3,32	0,27	1,22	0,00	4,27	0,33
Lama1	1 0,14	0,97	0,12	56,45	0,03	62,83	0,01	0,51	0,17	317,77	0,08	0,42	0,06
Lamb1-1	1 0,12	1,68	0,09	1,88	0,04	1,81	0,05	2,26	0,18	0,90	0,04	1,11	0,09
Lamc1	1 0,10	0,09	0,09	0,51	0,03	0,54	0,06	0,85	0,17	0,97	0,04	0,56	0,05
Lefty1	1 0,10	0,39	0,10	0,58	0,03	0,53	0,12	0,37	0,17	0,15	0,01	0,12	0,05
Lefty2	1 0,11	0,62	0,10	0,43	0,06	1,83	0,03	0,30	0,17	0,34	0,02	0,17	0,05
Lin28	1 0,11	1,88	0,09	2,01	0,02	1,14	0,00	2,02	0,17	1,14	0,04	0,82	0,06
Myod1	1 0,10	0,57	0,16	0,72	0,08	0,64	0,70	0,53	0,81	0,26	0,34	3,56	0,05
Nanog	1 0,10	0,91	0,09	0,53	0,07	0,79	0,03	0,89	0,18	0,58	0,01	1,23	0,12
Nes	1 0,10	8,62	0,10	22,33	0,01	5,54	0,05	3,53	0,17	1,73	0,01	1,63	0,09
Nppa	1 0,10	26,63	0,10	26,47	0,42	45,35	0,00	13,70	0,18	0,95	0,00	53,71	0,05
Nr5a2	1 0,10	1,93	0,09	0,35	0,10	1,25	0,02	0,91	0,19	1,29	0,05	0,27	0,06
Nr6a1	1 0,08	1,02	0,05	1,54	0,10	0,93	0,08	1,34	0,05	0,59	0,16	0,86	0,08
Olig2	1 0,14	0,05	0,06	609,26	0,10	256,68	0,63	1517,86	0,03	1191,11	0,09	3,91	0,11
Pax6	1 0,07	1,06	0,03	0,40	0,22	1,13	0,17	1,40	0,07	0,18	0,10	0,31	0,07

<i>Pecam1</i>	1	0,00	0,40	0,02	0,09	0,10	0,42	0,06	0,51	0,07	0,29	0,09	0,82	0,07
<i>Podxl</i>	1	0,10	1,32	0,05	2,28	0,11	0,98	0,05	1,64	0,01	1,12	0,09	0,90	0,08
<i>Pou5f1</i>	1	0,04	1,15	0,03	0,85	0,10	0,87	0,06	1,36	0,02	1,22	0,12	0,92	0,09
<i>Pten</i>	1	0,03	1,42	0,00	1,74	0,10	1,83	0,05	1,73	0,01	1,08	0,09	0,68	0,10
<i>Raf1</i>	1	0,03	1,30	0,03	1,06	0,11	1,45	0,08	1,37	0,01	1,13	0,13	0,66	0,07
<i>Rest</i>	1	0,03	0,96	0,11	0,59	0,14	0,87	0,05	1,50	0,04	0,89	0,09	0,61	0,07
<i>Runx2</i>	1	0,03	5,97	0,40	7,80	0,10	17,21	0,12	7,39	0,34	5,48	0,09	0,94	0,08
<i>Serpina1a</i>	1	0,00	0,27	0,00	0,00	0,13	0,07	0,05	0,00	0,00	0,00	0,19	0,00	0,15
<i>Sfrp2</i>	1	0,01	0,95	0,06	0,93	0,10	0,55	0,07	1,34	0,03	0,45	0,09	0,80	0,90
<i>Sox17</i>	1	0,41	0,59	0,11	0,69	0,11	0,08	0,17	0,12	0,01	0,82	0,21	0,50	0,08
<i>Sox2</i>	1	0,02	0,71	0,06	0,24	0,11	0,65	0,06	0,92	0,01	0,79	0,09	0,69	0,20
<i>Sst</i>	1	0,00	1,00	0,00	15,91	0,10	1,04	0,05	0,84	0,00	0,95	0,09	1,06	0,07
<i>Syp</i>	1	0,30	0,56	0,01	1,65	0,14	0,34	0,22	0,65	0,20	0,20	0,17	1,04	0,07
<i>Tat</i>	1	0,10	0,07	0,10	0,07	0,07	1,27	0,04	0,06	0,17	1,39	0,07	1,83	0,06
<i>Utf1</i>	1	0,12	0,77	0,11	0,74	0,07	1,02	0,07	2,49	0,18	1,53	0,02	0,60	0,05
<i>Wt1</i>	1	0,13	0,71	0,09	1,52	0,02	2,63	0,05	5,32	0,17	3,21	0,05	0,38	0,06
<i>Zfp42</i>	1	0,11	0,84	0,09	0,03	0,03	0,07	0,01	0,10	0,17	0,09	0,03	0,05	0,07
<i>Ctnnb1</i>	1	0,11	1,18	0,09	0,94	0,05	1,19	0,04	1,24	0,17	0,97	0,09	0,59	0,05
<i>Dnmt3b</i>	1	0,10	1,34	0,09	2,93	0,01	1,64	0,05	3,23	0,17	1,27	0,01	0,42	0,05
<i>Eomes</i>	1	0,10	12,27	0,13	46,88	0,03	2,25	0,11	1,72	0,17	1,70	0,02	0,89	0,14
<i>Eras</i>	1	0,10	0,48	0,10	0,60	0,08	1,38	0,03	1,18	0,17	0,74	0,06	0,69	0,05
<i>Fgf5</i>	1	0,20	35,22	0,14	87,10	0,02	9,78	0,13	6,90	0,18	0,44	0,13	0,31	0,37
<i>Foxa2</i>	1	0,24	2,79	0,09	14,78	0,02	0,07	0,07	0,04	0,38	0,41	0,27	0,07	0,29
<i>Gata4</i>	1	0,11	0,40	0,09	0,25	0,12	0,10	0,19	0,46	0,18	1,10	0,05	0,77	0,11
<i>Gbx2</i>	1	0,10	1,50	0,09	0,29	0,07	0,60	0,02	1,88	0,18	3,91	0,02	0,10	0,06
<i>Gcm1</i>	1	0,35	3,46	0,15	5,81	0,06	9,49	0,06	2,40	0,17	0,33	0,15	2,35	0,46
<i>Hbz</i>	1	0,10	1,49	0,13	29,24	0,58	152,77	0,03	38,97	0,17	0,12	0,00	70,87	0,10
<i>Hlxb9</i>	1	0,15	0,90	0,11	0,90	0,09	0,36	0,23	2,80	0,17	1,77	0,16	3,96	0,06
<i>lapp</i>	1	0,10	1,00	0,09	0,94	0,00	8,65	0,00	0,84	0,17	0,95	0,00	1,06	0,05
<i>Ins2</i>	1	0,10	31,83	0,12	0,12	0,00	0,13	0,00	0,11	0,17	17,97	0,00	0,13	0,05
<i>lpf1</i>	1	0,27	0,63	0,09	0,19	1,10	0,55	0,19	0,43	0,27	2,13	0,15	0,96	0,06
<i>Isl1</i>	1	0,10	0,99	0,09	0,50	0,50	0,61	0,19	2,75	0,17	1,72	0,05	0,84	0,16
<i>Kit</i>	1	0,11	2,44	0,10	0,28	0,01	0,33	0,05	0,48	0,17	0,25	0,01	0,60	0,06
<i>Lifr</i>	1	0,10	0,91	0,10	0,38	0,04	0,67	0,01	1,16	0,17	0,73	0,01	0,44	0,07
<i>Myf5</i>	1	0,10	0,36	0,09	0,66	0,09	0,24	0,33	1,01	0,31	0,24	0,26	0,15	0,35
<i>Neurod1</i>	1	0,10	0,28	0,10	0,13	0,05	0,20	0,07	0,69	0,18	0,40	0,02	0,65	0,07
<i>Nodal</i>	1	0,10	1,04	0,09	1,19	0,03	1,11	0,04	1,09	0,17	0,53	0,05	0,87	0,06
<i>Nog</i>	1	0,33	2,29	0,12	1,79	0,09	0,76	0,23	0,60	0,27	0,51	0,34	1,13	0,17
<i>Pax4</i>	1	0,00	1,00	0,00	7,83	0,10	1,04	0,05	37,03	0,00	0,95	0,09	1,06	0,07
<i>Ptf1a</i>	1	0,00	0,03	0,00	0,58	0,10	0,62	0,26	0,03	0,00	0,49	0,09	1,74	0,07
<i>Sema3a</i>	1	0,07	3,47	0,12	8,62	0,15	36,49	0,12	23,33	0,02	16,06	0,11	4,76	0,07
<i>Sycp3</i>	1	0,02	1,35	0,06	0,07	0,10	0,02	0,06	0,11	0,03	0,04	0,09	0,26	0,07
<i>T</i>	1	0,00	151,80	0,09	513,84	0,00	1,37	0,05	2,43	0,17	0,47	0,00	2,04	0,08
<i>Tcfcp2l1</i>	1	0,11	2,94	0,09	0,24	0,01	0,73	0,02	0,69	0,17	1,20	0,01	0,88	0,06
<i>Tdgf1</i>	1	0,10	0,54	0,13	0,55	0,08	0,46	0,04	0,78	0,17	0,60	0,08	0,28	0,06
<i>Tert</i>	1	0,10	1,03	0,09	0,63	0,00	0,58	0,00	1,61	0,21	1,02	0,00	1,22	0,44
<i>Th</i>	1	0,10	0,02	0,10	0,02	0,09	0,42	0,09	0,78	0,18	0,02	0,00	0,65	0,40
<i>Xist</i>	1	0,10	7,34	0,09	11,26	0,03	47,18	0,00	24,56	0,17	10,26	0,01	12,19	0,10

A szignifikánsan eltérő értékek, amelyek a kontrollhoz (HM1) képest 2,5-szeres relatív expressziós különbséget mutattak, félkövér betűvel vannak szedve. A kék háttérrel jelölt gének nincsenek jelen a microarray-en.

3. melléklet: Microarray eredmények validálása qPCR kísérletben

<i>Sejtvonal</i>	<i>Gén</i>	<i>Tagln</i>	<i>Gas5</i>	<i>Ktn1</i>	<i>S100a6</i>	<i>S100a10</i>	<i>Sparc</i>	<i>Peg3</i>	<i>Fem1b</i>	<i>Dppa5</i>
HM-1	Mean	0.49	0.80	1.64	0.73	0.62	1.45	1.96	4.49	0.96
	SE	0.04	0.07	0.13	0.06	0.06	0.13	0.17	0.34	0.09
HM-1 NT	Mean	5.64	2.21	1.89	3.26	2.58	5.23	4.84	3.51	0.51
	SE	0.46	0.08	0.17	0.18	0.12	0.31	0.22	0.21	0.01
B6D2	Mean	21.72	1.30	1.35	9.26	4.11	8.37	12.10	5.00	0.23
	SE	1.29	0.03	0.02	0.39	0.13	0.43	0.20	0.39	0.03
B6D2 MEF NT	Mean	3.81	0.65	0.76	8.01	2.39	6.72	14.99	2.15	0.40
	SE	0.17	0.05	0.05	0.64	0.09	0.40	0.37	0.04	0.03
B6D2 CUM NT	Mean	2.56	1.00	0.68	6.15	1.91	5.39	20.42	3.50	0.57
	SE	0.16	0.08	0.04	0.32	0.20	0.46	1.30	0.20	0.03
B6D2 CUM NT (PEM)	Mean	1.37	1.13	0.61	6.03	1.58	5.63	11.53	3.52	0.60
	SE	0.11	0.11	0.06	0.45	0.17	0.55	0.94	0.28	0.04
B6D2 PGA	Mean	5.15	1.27	1.32	7.22	3.40	6.33	24.03	6.52	1.82
	SE	0.12	0.04	0.10	0.09	0.13	0.16	0.63	0.48	0.26

A microarray-eredmények megerősítése érdekében kilenc véletlenszerűen kiválasztott gént valós idejű qPCR módszerrel vizsgáltunk. A kísérletek átlagértékei (Mean) $\pm$ SE szerepelnek a táblázatban.

4. melléklet: A nyúl cDNS és a pszeudogén szekvencia illesztése

pseudo	cagat ttt aaaaa aac tct tct cga t t a t t t c a c c a g g e c c c c g g t g c g g g g c a c c c t c c t t c c c c - a t g g g g g	74
coding	----- t a t t t c a c c a g g e c c c c g g t g c g g g g c g c c c t c c t t c c c c a t g g c g g	49
pseudo	g a c a c c t g g c c t c a g a c t t a c c t t c t c g c c c c c g c g g g c g g t g g t g g c g a t g g g c c t g g a g g c c g g a g c c a g	149
coding	G A C A C C T G G C C T C A G A C T T C G C C T T C T C G C C C C G C C G G G C G G C G G C G G C A T G G G C C T G G A G G C C G G A G C C A G	124
pseudo	g c t g g g t g g a c c c c t g g a c c t g g e t g a g e t t c c a a g g e c c t c c c g g t g g g c c c g c c a t c g g g c c c g g g t t g c a c	224
coding	G C T G G G T G G A C C C C G G A C C T G G C T G A G C T T C C A A G G C C C T C C C G G T G G G C C C G C C A T C G G G C C C G G G T T G C A C	199
pseudo	c g g g c g c c g a g g t g t g g g g a t t c c c c c g t g t c e g c c g c g t a t g a c t t c t g t g g a g c a t g g c g c a c t g c a c c c	299
coding	C G G E C G C C G A G G T G T G G G G A T T C C C C G T G C C G C C G C C G T A T G A C T T C T G C G G A G C A T G G C G C A C T G C G C C C	274
pseudo	a a c a g c t t g c c g t g g g c c t c g t g c c t c a g g g c g g c c t g g a g a c c t c t c a g c c g g a g g g c a a g g t a g g g g c c g g c g	374
coding	A G C A G C T C G C C G T G G G C C T C G T G C C T C A G G G C G G C C T G G A G A C C T C T C A G C C G G A G G G C G A G G C A G G G G C C G G C G	349
pseudo	c g g g g g c c c t g t c g g a g g g c c c t c c c c t g a g c c c t g c g c t g c g c c t c t t g g t g c c g t g a a g c t g g a g a a g g a g a	449
coding	C G G G G A G C C T G T C G G A G G G C C C T C C C C T G A G C C C T G C G C T G C G C C T C T T G G T G C C G T G A A G C T G G A G A A G G A G A	424
pseudo	a g c t g g a g c a a a c c c c a a g g a g t c c c a g g a c a t g a a a g c t a a c a g a a a g a a - - - - - g t t t g c c a a g c t c c	516
coding	A G C T G G A G C A A A C C C C G A G G A G T C C C A G G A C A T G A A A G C T C T A C A G A A A G A A C T G A G C A G T T T G C C A A G C T C C	499
pseudo	t g a a g c a g a a g a g g a t c a c t c t g g g e t a c a c t c a g g e t g a c g t g g g g c t c a c c c t g g g g g t t c t c t t g g a a a g g	591
coding	T G A A G C A G A A G A G G A T C A C T C T G G G C T A C A C T A G G C T G A C T T G G G G C T A C C C T G G G G G T T C T C T T G G A A A G G	574
pseudo	t g t t c a g c c a a a c c a c c a t c t g c c g a t t c g a g g c c c t a c a a c t c a g t t t c a a g t a c a t g t g t a a g c t g c g g c c c c	666
coding	T G T T C A G C C A A A C C A C C A T C T G C C G A T T C G A G G C C C T A C A A C T A G T T T C A A G A A C A T G T G T A A G C T G C G G C C C C	649
pseudo	t g c t g c a g a a a t g g g t g g a g g a g g c c g a c a a c a t g a g a a c c t t c a g g a g a t t t g c a a a g c g g a g a c c a c g t g c	741
coding	T G C T G C A G A A A T G G G T G G A G G A G G C C G A C A A C A A T G A G A A C C T T C A G G A G A T T T G C A A A G C G G A G A C C C T C G T G C	724
pseudo	a g g c c c g g a a g a g a a a g c g a a c g a t a t c g a g a a c t g a g t g a g a g g c a a c t t g g a g a a c a t g t t c t t g c a g t g c c	816
coding	A G G C C C G G A A G A G A A A G C G A A C G A T A T T G A G A A C C G A G T G A G A G G C A A C T T G G A G A A C A T G T T C C T G C A G T G C C	799
pseudo	c g a a c c c a c g c t g c a g c a g a t c a g c c a c a t c g c c c a g c a g c t g g g g c t c g a g a a a g a c g t g g t c c g t g t g t g g t	891
coding	C G A A A C C C A C G C T G C A G C A G A T C A G C C A C A T C G C C C A G C A G C T G G G G C T C G A G A A A G A C G T G G T C C C T G T G T G G T	874
pseudo	t c t g t a a c c g g c g c c a g a a g g g c a a a c g a t c a a g c a g t g a c t g t t c c c a g t g a g a g g a t t t g a g g c a g c c g g c t	966
coding	T C T G T A A C C G G C G C C A G A A G G G C A A A C G A T C A A G C A G T A C T G T T C C C A A C G A G A G G A T T T G A G G C C A C C G G C T	949
pseudo	c t c c c t t c g c a g a g a g g c c t a t g t c t t t c c t c t g g c a c c g g g t c c c a t t t a g t a c c c c a g g c t a t g g c a g c c	1041
coding	C T C C C T T C G C A G G G G G C C T A T G T C T T T C C T C T G G C A C C A G G C C C C A T T T C G G T A C C C C A G G C T A T G G C A G C C	1024
pseudo	c t c a c t t c g c t a c c c t g t a c t c t c c a a t g c c c t t c c c t g a g g g g g a a g c c t t c c c c t c t g t g c c t g t c c c t g c t c	1116
coding	C T C A C T T T G C T A C C C T G T A C T C G C C A A T G C C C T T C C C T G A G G G G G A A G C C T T C C C C T C T G T G C C T G T C C C T G C T C	1099
pseudo	t g g g c t c c c c c a t g c a t t c a a a c t g a g c t g c c t g t c c t t c c c a g g a a c c c g g g g t g g g a c a g a g g t a g g g g g t a	1191
coding	T G G G C T C C C C C A T G C A T T C A A A C T G A G C T G C C T G C C T T C C C A G G A A C C C G G G G T G G A G G C A G A G G T A G G G G - A	1173
pseudo	a a c g c t a g g g a g a g a g a a c c t g g a g t c a g g g c t t t g g g g a t t c a g t t c t t a t t t c a c t a t g g a a g g c a t t g g a a a	1266
coding	a a c g c t a g g g a g a g a g a a c c t g g a g t c a g g g c t t t g g g g a t t c a g - - - t t a t t t c a c t a t g g a a g g c a t t g g a a a	1245
pseudo	c a c a a a g g g t g g g g c a a g g g t t t t t g g a a a c t g g t t g g c g g g a a g g t g a a g t t c a a t g a t g c t c t t g a t t t t a a t	1341
coding	c a c a a a g g g t g g g g c a a g g g t t t t t g g a a a c t g g t t g g t g g g a a g g t g a a g t t c a a t g a t g c t c t t g a t t t t a a t	1320
pseudo	c c c c a c a t c a c t t t g t t t t t a a a t a a a g a a g c c t g a g a c a c a a t g a a a a a a a t a a c t c t t t t	1404
coding	c c c c a c a t c a c t t t g t t t t t a a a t a a a g a a g c c t g a g a c a c a a c g g - - - - -	1366

A cDNS kódoló szekvenciája nagybetűvel, míg az UTR régió kisbetűvel van jelölve, az iniciációs helyet nyíl jelzi. A pszeudogént 5' és 3' irányban is közvetlen ismétlődések szegélyezik (aláhúzott kisbetűs). A pszeudogén szekvenciában lévő deléció bekeretezés jelöli.

5. melléklet: A toxikológiai vizsgálatokban felhasznált vegyületek és ismert hatásai

Vegyület neve (CAS-szám)	A vegyület ismert toxikológiai hatása
Akrilamid 79-06-1	vízben oldódó kristályos amid, amely gyorsan polimerizálódik; széles körben használják a vegyiparban (pl. vízkezelő ipar, papíripar, textilkezelő ipar) és a kozmetikai iparban, az élelmiszerekben hőkezeléskor - mind az otthoni főzés, mind az élelmiszerek ipari feldolgozása során - jelentkezik (Mottram et al., 2002); neurotoxikus: foglalkozási expozíció; átjuthat a placentán és megjelenhet az anyatejben is (Sorgel et al., 2002). LD ₅₀ : 50-500 mg/kg (humán)
Colchicine 64-86-8	kötődhet a tubulinhoz és gátolhatja a tubulin polimerizációját, ami a mitózis gátlásához vezet, kölcsönhatásba lép a P-glikoprotein transzporterrel (MDR1/ABCB1) és a CYP3A4 enzimmel (mindkettő részt vesz a toxin metabolizmusában) (Goldschmidt and Steward 1989; Mundy and Tilson 1990); köszvény és Behçet-kór kezelésére használt gyógyszer. LD ₅₀ : 5 mg/kg (humán, szájon át); <i>in vitro</i> citotoxicitási határérték: 0,02 µM
Doxorubicin 25316-40-9	interkaláló kemoterápiás gyógyszer; gátolja a topoizomeráz II mozgását, ami a replikáció és a transzkripció blokkolásához vezet. LD ₅₀ : 21,8 mg/kg (patkány, bőr alá)
Hexaklórfen 70-30-4	fertőtlenítőszer; blokkolja az elektrontranszportláncot a szukcinát-dehidrogenáz (SDHD) és a glutamát-dehidrogenáz 1, mitokondriális (GLUD1) membránhorgonyzó alegységén keresztül. a valószínűsíthető halálos orális dózis emberben nem meghatározott; LD ₅₀ : 66 mg/kg (patkány, szájon át). <i>in vitro</i> citotoxicitási határérték: 1,86 µM
Ibuprofen 15687-27-1	gyógyszer (fájdalomcsillapító); hatékonyan csökkenti a lázat, mivel nem-szteroid gyulladáscsökkentő (NSAID), a ciklooxygenáz (COX) enzimek (COX-1 és 2) gátlásán keresztül hat. a túladagolás tünetei 99 mg/kg-nál nagyobb mennyiségben fogyasztott egyéneknél jelentkeznek; LD ₅₀ : 636 mg/kg (patkány, szájon át)
Higany(II)- klorid 7487-94-7	a peszticidek összetevője, maró, mérgező; felhalmozódhat a vesében. a valószínűsíthető halálos orális dózis 5-50 mg/kg. <i>in vitro</i> citotoxicitási határérték: 1,37 µM
Paracetamol 103-90-2	gyógyszer (fájdalomcsillapító); a túladagolás májtoxicitást okozhat. májtoxicitás emberekben 10 g-nál nagyobb akut túladagolás esetén fordult elő; LD ₅₀ : 2400 mg/kg (patkány, orális)
Paraquat 75365-73-0	gyomirtó szer; neurotoxikus: a Parkinson-kórhoz vezető foglalkozási expozíciók (Tanner et al., 2011) széles körben vizsgált neurotoxikus mechanizmus (Rappold et al., 2011; Kanthasamy et al., 2019). LD ₅₀ : 35 mg/kg (humán, szájon át)
Rifampicin 13292-46-1	antibiotikum; leállítja az RNS-szintézist a baktériumokban, májtoxicitást okozhat. valószínűsíthető halálos orális dózis emberben 14-60 g LD ₅₀ : 1570 mg/kg (patkány); <i>in vitro</i> citotoxicitási határérték: 4,37 µM
Rotenone 83-79-4	rovarirtó; gátolja az elektrontranszportlánc mitokondriális I. komplexét; patkányokban Parkinson-kórhoz hasonló tünetek alakultak ki, → a Parkinson-kór környezeti kockázati tényezőjének tekintik. (Betarbet et al., 2000). LD ₅₀ : 0,3-0,5 g/kg (humán, szájon át); <i>in vitro</i> citotoxicitási határérték: 0,22 µM
Valproinsav 1069-66-5	epilepsziában, bipoláris zavarokban és a rohamok megelőzésére használt gyógyszer, ismert, hogy blokkolja a feszültségkapcsolt nátriumcsatornákat és növeli a gamma-aminovajsav (GABA) agyi szintjét; a jól ismert teratogén különböző veleszületett rendellenességeket és neurális defektusokat okoz. LD ₅₀ : 670 mg/kg (patkány, szájon át)

Megjegyzés: az ún. medián halálos adag (*lethal dose*, LD₅₀) vonatkozó adatokat a PubChem adatbázisából (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), az *in vitro* multicelluláris citotoxicitásra vonatkozó adatokat az EPA Chemical dashboard adatbázisából (<https://comptox.epa.gov/dashboard>) gyűjtöttem.