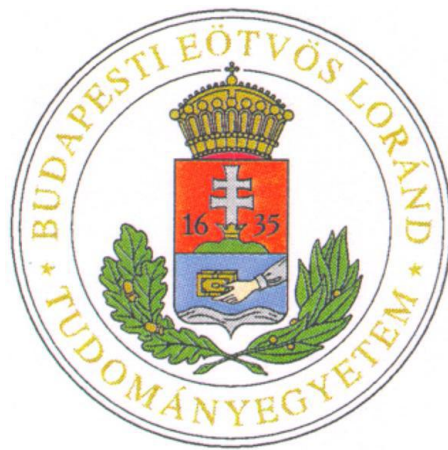


Adhezív peptiddel bevont felület hatása pluripotens őssejtek létrehozására, illetve in vitro differenciálódási képességére



TDK dolgozat

Készítette: Guba Péter, III. Biológia BSc biológus hallgató

Témavezetők:

Dr. Madarász Emília

MTA-KOKI

Dr. Gócza Elen

MBK

2011

BEVEZETŐ.....	2
DEFINÍCIÓ:	2
ÖSSEJT TÍPUSOK	2
PLURIPOTENS ÖSSEJTEK TÍPUSAI, EREDETÜK SZERINT:	2
DIFFERENCIÁLTATÁS.....	5
PLURIPOTENCIA MARKERELK:	5
MÉDIUMBAN LÉVŐ FAKTOROK	5
SEJTLLETAPASZTÓ TECHNIKÁK:	6
ÚJ ADHEZÍV BIOFELÜLETEK KIALAKÍTÁSA	7
AZ ÚJ ADHEZÍV PEPTIDEKKEL BEVONT FELSZÍNEKKEL TÖRTÉNŐ <i>EX VIVO</i> KÍSÉRLETEK	HIBA! A KÖNYVJELZŐ NEM LÉTEZIK.
CÉLKITŰZÉSEK:.....	7
ALKALMAZOTT MÓDSZEREK:.....	7
FELÜLETKEZELÉS POLIPEPTIDLÁNCOKKAL (LIG1, LIG2-1 ... LIG2-6).....	7
ZSELATINRÉTEG KÉSZÍTÉSE.....	8
FIBROBLASZT SEJTEK FEOLVASZTÁSA, FENNTARTÁSA	8
AZ EGÉR FIBROBLAST SEJTEK TENYÉSZTÉSE.....	8
MITOMYCINEZÉS	8
ES SEJTEK ELŐKÉSZÍTÉSE, TENYÉSZTÉSE:	9
RNS IZOLÁLÁS:	9
REAL TIME PCR (qPCR)	10
EMBRIÓSZERŰ TESTECKSKÉK (EB) LÉTREHOZÁSA, DIFFERENCIÁLTATÁS.....	10
ALKALIKUS FOSZFATÁZ FESTÉS.....	10
IMMUNFESTÉS:	11
SEJTSZÁMOLÁS:	11
EREDMÉNYEK:	12
KÖVETKEZTETÉSEK:.....	15
IRODALOMJEGYZÉK:	17
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS:	19

Bevezető

Az egér embrionális őssejtek önmegújulásának, differenciálódási képességének vizsgálata közelebb hozhat bennünket az embrionális fejlődésben szerepet játszó faktorok megismerésében.

Az integrin receptorok egy speciális típusa segíti számos sejtípus letapadását (neurális őssejteket, egér és humán embrionális és mesenchimális őssejteket). Azt vizsgáltuk, hogy a különböző eredetű őssejtek, képesek-e letapadni ezekre a felületekre. Ezen kívül megnéztük, hogy az egér embrionális eredetű őssejt vonalak esetében hogyan befolyásolja az AK-c(RGDfC) adhezív peptiddel bevont felület a sejtek pluripotenciájának megtartását, illetve differenciálódási képességét.

Definíció

Az őssejt egy olyan differenciálatlan sejt, amely képes önmegújulásra, azaz saját magát reprodukálni, illetve egy másik utódsejtet létrehozni aszimmetrikus osztódással. Korlátlan osztódásra képes és bármilyen testi sejt irányába differenciálódhat. Ez által többféle sejtípus alakulhat ki belőlük, amelyek képesek lehetnek az elpusztult sejteket pótolni, a roncsolt szöveteket helyreállítani. Az őssejteknek számos speciális típusa ismert, eltérő eredettel, differenciálódási képességgel.

Őssejt típusok

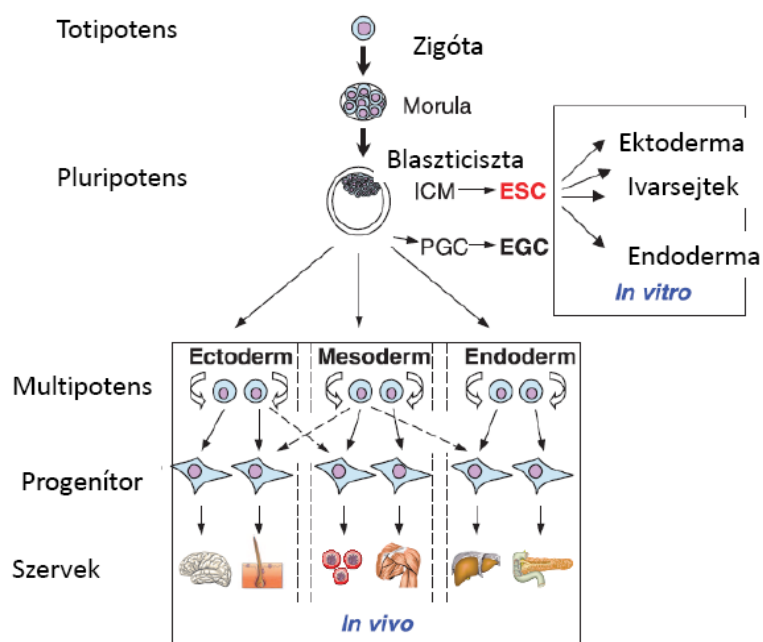
Az embrionális fejlődés során, az egy sejttes embrióból fejlődő embrió sejtjei egyre korlátozottabban fejlődési potenciállal rendelkeznek. Az összes sejtípus létrehozására képes sejteket **totipotensnek** nevezzük. Ezek embrionális és extraembrionális szöveteket is képesek létrehozni, ilyenek a megtermékenyített petesejt és a belőle fejlődő nyolc sejttes, illetve szedercsira (morula) állapotú embriók sejtjei (Wobus and Boheler, 2005). **Pluripotensek** azok a sejtek, amelyek már csak embrionális szöveteket képesek létrehozni, vagyis minden testi sejtet, illetve az ivarsejteket, de extraembrionális szövetet már nem. A **multipotens** őssejtek számos szöveti sejt létrehozására képesek, de már ivarsejteket nem képesek létrehozni. Ilyen sejtek többek közt a mezenchimális őssejtek (MSC), amelyek a szöveti őssejtek között talán a legnagyobb plaszticitással rendelkeznek. A progenitor sejtek, már csak egy bizonyos szövettípus, illetve sejtípus irányába tudnak differenciálódni. Ilyenek lehetnek a vérben található haematopoetikus őssejtek, valamint a izom progenitor sejtek, amelyeknek köszönhetően a szervezet képes pótolni vérvesztéskor, izom sérüléskor a sejteket.

Pluripotens őssejtek típusai, eredetük szerint

Az embrionális karcinóma sejtek (EC sejtek) teratocarcinómákból, azaz ivarszervekben keletkező tumorokból lehet létrehozni (Robertson et al., 1987). Jellemzője, hogy spontán

képes differenciálódni többféle sejtté, amelyek közül felismerhetőek mind a három csíralemez irányába elköteleződött sejtek. Sikertült embiószerű testecskéket (EB csomó) is létrehozni belőlük (Andrews et al., 2005). A sejtek nagy részének karitípusa abnormális. Az EC sejtekkel végzett korai kutatások jelentősége az, hogy a korai kutatások közelebb vittek az embrionális őssejtek (ES sejtek) természetének a megismeréséhez.

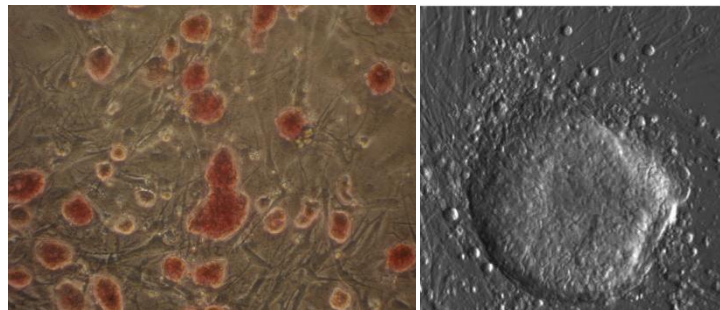
Az őssejtek egyik legfontosabb csoportja az embrionális eredetű őssejtek (ES), amely hólyagcsíra állapotú (blasztociszta) embrió embriócsomójából (ICM) származtatható (1. ábra). Először egér embriókból sikerült ezeket a sejt vonalakt létrehozni, egér embrionális fibroblaszt tápláló sejtrétegen, olyan médiumban, amelyben a sejtek differenciálódását megakadályozták (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Morfológiáját tekintve az ES sejtek hasonlítanak az EC sejtekre, vagyis a sejtmag/citoplazma arány magas, a sejtek szorosan kapcsolódnak egymáshoz. A belőlük kialakuló kolóniák ovális alakúak és jól körülhatárolt szélük van. A sejtekkel nagy része normális, euploid kariotípust mutat. Gazda embrióba injektálva kimérát lehet belőlük létrehozni, vagyis olyan állatot, amely mind a gazda embrióból, mind pedig az ES sejtől származó sejteket tartalmaz.



1. ábra: Az őssejtek típusai (Wobus, 2005)

2002-ben sikerült majom ES sejteket is előállítani. Ezek segítségével közelebb kerülhetünk a humán betegségek megértéséhez (Takada et al., 2002)

A humán ES sejteket humán IVF kezelések után visszamaradt, kutatási célokra felajánlott humán embriókból sikerült létrehozni (Thomson et al., 1998). A humán ES sejtek alapításához nagy segítséget jelentett a korábban humán embriók in vitro tenyésztési körülményeinek optimalizálása során végzett kísérletek (Gardner et al., 1998), valamint a főemlősök ES sejteinek vizsgálata (Thomson et al., 1995, 1996). A humán ES sejtek pluripotenciáját igazoló kísérletek, a sejtek kariotipizálása, in vitro és in vivo differenciáltatása teratokarcinómákat létrehozva (természetesen kiméra előállítására etikai okokból nem lehetséges) igazolta, hogy egyenértékűnek tekinthetők ezek a sejtek az egér ES sejtekkel. A kolóniák morfológiáját tekintve az egér ES sejtekhez viszonyítva sokkal laposabbak, mint a több sejt réteget tartalmazó, tojásdad alakú egér ES sejtek (2. ábra).



2. ábra: bal oldalt fibroblaszton tartott egér ES sejt kolóniákat láthatunk (saját felvétel), jobb oldalon humán ES sejt kolónia látható (Giritharan, 2011)

Sikerült számos más állat embrióiból kiindulva is előállítani ES sejteket (baromfi, nyúl, hörcsög, kutya, macska, szarvasmarha...). Olyan patkányt pluripotens homológ rekombinációt tartalmazó ES sejttenyészetek létrehozása is sikerült, amelyekből már ivarsejt kiméra patkányokat is létre tudtak hozni (Tong et al., 2010). A patkány jó modell állatnak számítanak cukorbetegség, illetve magas vérnyomás modellezéséhez. A patkány ES sejtek pluripotencia markerei szempontjából az egér ES sejtekhez hasonlíthatnak.

Az epiblast eredetű őssejteket (EpisC) is megemlíteném, amelyek szintén pluripotensek (Brons et al., 2007). Belőlük is sikerült létrehozni EB csomót, a három csíralemez irányába differenciálódott sejteket, de csak korai passzázsok esetében sikerült kimérákat létrehozni. A kolóniák morfológiájukban jobban hasonlíthatnak a humán ES sejtekhez, mint az egér ES sejtekhez, ezért talán alkalmas modellként szolgálhatnak humán ES sejtek fejlődési potenciáljának vizsgálatához.

Tovább folytatva a sort, a primordiális őssejtekből (PGC) hozták létre az úgynevezett embrionális csíra sejt eredetű (EG) őssejteket. Először Matsuinak sikerült előállítani EG sejttenyészeteket (Matsui et al., 1992). EG sejtekből létrejöhetnek testi és ivari sejtek kiméra

állatok is. Abban különböznek az ES sejtektől, hogy a genom imprinting által érintett gének metilációja nem történt meg teljes mértékben, valószínűleg ennek következtében az EG sejtekből kisebb eséllyel kaphatunk ivarsejt kiméra állatokat (Wobus and Boehler, 2005).

Végül egy szintén jelentős csoport következik, az indukált pluripotens sejtek (iPS), amelyeket már elkötelezett testi sejtekből képesek transzkripciós faktorok beépítésével kialakítani (Takahashi and Yamanaka, 2006). Az iPS sejtek képesek létrehozni EB csomót, valamint teratóma képződéssel a három csiravonal irányába differenciálódni (Taylor and Xu, 2010). A legnagyobb előny abban rejlik, hogy az etikai problémák így kiküszöbölhetőek, humán ES sejtek helyett az iPS sejteket alkalmazva, nem kell embriót elpusztítani. A másik alkalmazási előnye abban rejlik az iPS sejteknek, hogy saját testi sejtéből is elő lehet állítani iPS sejttenyészeteket, ezáltal az immunrendszer miatti kilökődés veszélyét minimalizálni lehetne.

Differenciáltatás

Az embrionális őssejtek képességeit jellemezhetjük a differenciálódási képességükkel, például a három csíralemez irányába elköteleződési képességgel, illetve in vivo teratóma képződéssel, valamint in vitro spontán differenciálódással. A teratómaképződéses vizsgálata immundeficiens (SCID) egereken történik. A vesetokba injektálják be az embrionális őssejteket. Néhány hét múlva mind három csíravonal irányába differenciálódó sejteket találhatunk (hámsejtek, izomsejtek, ganglionsejt-szerű struktúrák, porcsejtek...) A spontán in vitro differenciációs technika során embrionális őssejtekből soksejtes aggregátumokat, úgynevezett embriószerű testecskéket (EB) hoznak létre. Ezek sejtjei az idő előrehaladtával folyamatosan elvesztik pluripotenciájukat (pluripotencia markerek ellenőrzésével kimutatható) és képesek mind három csíralemez sejtjeinek létrehozására.

Pluripotencia markerek

A pluripotencia markerek képesek kimutatni a sejt differenciálatlan állapotát, pluripotenciáját, ilyenek a legáltalánosabban használt Oct3/4, Nanog, Sox2, ezen kívül számos speciális is markert is alkalmazhatunk, attól függően milyen élőlényből állították elő az ES sejteket.

Ezekon kívül, a mir290-295 mikroRNS klaszterról termelődő miRNS-eket említeném, amelyek ES sejtekre jellemzőek, őssejt specifikusak (Houbaviy et al.; 2003, Lichner et al., 2011).

Médiumban lévő faktorok

Az ES sejtek differenciálatlan állapot fenntartásában nagyon fontos szerepet játszanak azok a faktorok, amiket a médiumhoz adnak hozzá. Ilyen lehet a leukémia inhibítor faktor (LIF), valamint a BMP csont morfogén fehérje, ezen kívül egyéb inhibítorok (SU5402, PD0325905, CHIR99021). Attól függően, hogy hány és milyen fajta inhibítort használunk

megkülönböztetünk három (3i), illetve két (2i) rendszereket. Ezek a faktorok olyan speciális és bonyolult szignalizációs útvonalakat (Stat3, Jak, Rock) befolyásolnak, amelyek a vizsgált őssejtek differenciálatlan állapotát képesek fenntartani.

Sejtletapasztó technikák:

Az őssejtek differenciálatlan állapotban maradása nemcsak a fenntartó médiumtól, hanem az adott felszín anyagától, táplálósejtrétegétől (fibroblaszt) valamint az általuk termelt speciális anyagoktól is függ.

Természetes eredetű felszín, az ES sejtek fenntartásában már klasszikussá vált fibroblaszt táplálósejt réteg, amit az egér embrionális őssejtek esetében (mES) egér embrióból hoznak létre, míg humán ES sejtek (huES) esetében főleg előbőr eredetű fibroblasztot használnak.

Szintetikus felszínek olyan sejtadhéziós molekulákat tartalmaznak, amelyek képesek kapcsolatot létrehozni az őssejtekkel. Ennek a sejt-felszín összeköttetésnek a létrejötte a sejtek apoptózis elleni védelmét is szolgálja. Ha kevés kapcsolat van a felszín és a sejtek között, a sejtek elpusztulnak.

Matrigel az egyik legelterjedtebb és talán az egyik leghatékonyabb felszín, amit a differenciálatlan sejtek fenntartásakor alkalmaznak. Engelbreth-Holm-Swarm sarcomasejtekből származik, amely extracelluláris anyagokat, proteoglikánokat, növekedési faktorokat és olyan nagy biológiailag aktivitással rendelkező membrán kapcsoló anyagokat tartalmaz, amelyeken az őssejt vonalak hosszú ideig pluripotens állapotban fenntarthatók (Kolhar et al., 2010). Ez az anyag a számos speciális összetevő miatt nagyon drága. Ezért fontos szempontnak számít, hogy olcsóbb, szintetikus, de az őssejtek fenntartásában hasonló eredményeket felmutató felszíneket tudjanak előállítani, mint az eddig bevált felszínek (Matrigel, fibroblaszt). Olyan fehérjékkel próbálkoznak, amelyeken a sejtek szívesen megtapadnak növekednek és nem szükséges egy tápláló sejtréteget létrehozni.

Két olyan anyagtypust említenék meg, amivel szép eredményeket értek el. Az egyik az E-cadherin alapú, a másik a RGD mintázatot követő polimerek.

Röviden az E-cadherin egy Ca^{2+} függő sejt kapcsoló molekula. Ezt az anyagot kiegészítve IgG-FC doménnel, mTeSR1 médiumban jelentős sikereket értek el ezen a felszínen egér ES sejtek alkalmazásakor. Sikerült pluripotenciájukat megőrizni több passzálást követően. Ráadásul még kiméra egeret is elő tudtak állítani, amelyben ivarsejtbe is beépült a megfelelő genetikai információ. HuES sejteket vizsgálva, olyan eredményeket kaptak, amelyben a sejtek jellegzetes pluripotens sejt morfológiát mutatnak, valamint hasonló hatékonysággal bír többféle jellegzetességében, mint a Matrigelen tartott sejtek (Nagaoka et al., 2010).

A másik jelentős csoport, amelyet kísérleteink folyamán is felhasználtunk, azok az RGD mintázatú integrin molekulákat tartalmazó felszínek. Az RGD az integrinek egy olyan speciális csoportjába tartozik, amely alpha és beta heterodimerből épülnek fel és sejtadhéziós funkcióban látnak el feladatot. Irodalmi beszámolók alapján a ciklikus RGD mintázatot tartalmazó felületek magasabb hatékonysággal képesek egér, illetve humán ES sejtekkel kötést létesíteni, vagyis letapasztani azokat (Kolhar et al., 2010).

Új adhezív biofelületek kialakítása

Az általunk is vizsgált felületek is szintén ilyen ciklikus (cRGDfC) felépítésűek. Az ELTE – MTA peptidcsoport a BIO-SURF pályázat keretén belül egy olyan vegyületcsaládot alakított ki, amelyik egy oszteopontin nevezetű extracelluláris mátrix fehérje szekvenciáján alapul. Ez az anyag nagy jelentőséggel bíró biológiai aktivitással rendelkezik: sejtadhézióra, immunmodulációra valamint szövetregenerálódásra. Ezeket a tulajdonságokat alkalmazták biofelületekként, elsősorban csontimplantátumok felszínén.

Az előállított cRGDfC fehérje olyan speciális integrinekhez kapcsolódik, amelyek hatással vannak a sejt migrációjában és proliferációjában, a szövetek megújulásában. Hat féle csoportot hoztak létre. A közös bennük, hogy mindegyikben ott van az RGD mintázat ciklikus formában, valamint a kapcsolt SAK polipeptid csoport is.

Célkitűzések:

Célunk, olyan speciális összejt válogatási módszer kidolgozása, aminek segítségével lehetségessé válik a sejtek szelektív letapasztása, differenciálódásának adott irányokba történő befolyásolása (ideg, csont, szívmusculus irányba történő in vitro differenciálódás során). Ezen kívül célunk volt, egér embrionális fibroblaszt (MEF), illetve a drága mesterséges anyagok (matrigel, fibronectin, laminin) helyett olyan felületek kialakítása, amelyek az összejtek letapadását segítik elő, illetve csontimplantátumok felszínén olyan speciális anyagbevonatot hoznak létre, amin jobban megtapadhatnak a csont-össejtek.

Alkalmazott módszerek:

Felületkezelés polipeptidláncokkal (lig1, lig2-1 ... lig2-6)

A Petri-csészék műanyag felszínét bevonták az általunk vizsgált konjugátumokkal (AKcRGD (lig1), illetve különböző SAK-cRGD-OPN vegyületekkel (li2-1,..lig2-6). A felszínekre ioncserélt vízben oldott polimert tettek, majd inkubálták őket 37 °C-on 2 órán keresztül. Végül olyan felszínt kaptunk, amelyek szárazon, 4 °C-on is eltartható, akár hosszú távon is.

Számunkra ezeket az anyagokat a BIO-SURF pályázat keretén belül az ELTE – MTA peptidcsoport biztosította.

Zselatinréteg készítése

6 cm átmérőjű Petri-csészében (Greiner) 4ml 0,1 %-os zselatin oldatot (Sigma) mérünk, amelyet 30 percig hagyunk állni szobahőmérsékleten, majd víz-légszivattyú segítségével eltávolítjuk. 10 perc száradást követően, EM médiummal átmossuk.

Fibroblaszt sejtek felolvasztása, fenntartása

A sejteket folyékony nitrogénben tartjuk lefagyasztva, ahol a sejteket -196°C-on korlátlan ideig fenn lehet tartani. A felolvasztási protokoll szerint, a felolvasztást a lehető legrövidebb idő alatt kell elvégezni, mert a fagyasztás során védőanyagként használt DMSO (Sigma) károsíthatja a sejteket. A kiolvadt sejteket 5 ml fibroblaszt tenyésztő (FM) médiumban vesszük fel egy centrifugacsőbe. Centrifugáljuk a sejtsuszpenziót 7 percen keresztül, 4°C-on, 1400-1600 rpm-el. Víz-lég szivattyú és Pasteur pipetta segítségével távolíthatjuk el a felülúszót. A leülepedett sejteket 6ml FM médiumba felfuszpendáljuk (először 1-2 ml-t alkalmazunk és kipótoljuk) majd kihelyezzük megfelelő méretű (általában 10cm) műanyag Petri csészére. A sejteket inkubátorba helyezzük (37°C, 5% [CO₂]). Másnap érdemes az elhalt sejteket, törmelékeket PBS-sel lemosni, majd médiumot cserélni. Átoltani, vagyis passzálni 3-4 naponta szüksége a fibroblasztokat.

Az egér fibroblaszt sejtek tenyésztése

10 cm átmérőjű Petri-csészén történik. A sejteket konfluens állapotig (a felszint egyenletes rétegben lefedő sejtek ($1-3 \times 10^7$ sejt / Petri-csésze)) növesztjük, majd újabb Petri csészékbe osztjuk szét, szaporítjuk fel. A sejteket a felszíntől és egymáshoz való kötődés felszabadításához tripszin-EDTA (1:4) oldatot használunk (3ml tripszin-EDTA/Petri-csésze, 10 min, 37°C), aminek a hatására lekerekednek a sejtek. Az emésztést 3 ml FM médiummal állítjuk le. Majd centrifugáljuk a sejtsuszpenziót (7 min, 4°C, 1400-1600 rpm) és eltávolítjuk a felülúszót, felfuszpendáljuk 6 ml FM médiumba és kihelyezzük 10 cm átmérőjű Petri-csészékre, majd inkubátorba helyezzük és a megfelelő körülmények közé (37°C, 5% [CO₂]).

Mitomycinezés

Ahhoz, hogy ES sejtek tenyésztéséhez tápláló sejtként használni tudjuk ezeket a fibroblaszt sejteket, szükségünk van a sejtosztódásuk leállítására. Mitomycin-C-t alkalmazunk erre a célra. Használatával a sejtek elvesztik osztódó képességüket, de életképességüket nem. Az általunk használt protokoll szerint 60µl mitomycin oldatot (1mg/ml törzs oldatból)(Sigma) adunk 10 cm Petri-csészéhez (Greiner) 150 perc, 37°C, 5% [CO₂] körülmények között hagyjuk állni. Utána át kell mosni kétszer PBS oldattal, majd átpasszálni a már említett módon. A centrifugából kiszedve, leszívva a felülúszót felfuszpendáljuk FM médiumban

4×10^5 sejt/ml koncentrációban és az ES sejtek tenyésztésére használatos 6 cm átmérőjű Petri-csészékre helyezük ki. Két hétig használhatjuk az így kialakított mitomycinezett tápláló sejtréteget az ES sejtek tenyésztéséhez.

ES sejtek előkészítése, tenyésztése

Általunk alkalmazott kísérletek folyamán R1 egér ES sejteket (Nagy és mtsai., 1993) használtunk fel. A felolvasztási módszer ugyanaz, mint a fibroblaszt sejtek esetében, annyi különbséggel, hogy itt a sejteket, már mitomycinezett 6 cm átmérőjű Petri-csészékben található fibroblaszt sejtrétegre helyezük ki, valamint összejt tenyésztő médiumot (ES médiumot) alkalmazunk, az FM médium helyett. ES sejtek tenyésztésekor általában 6 cm-es átmérőjű Petri-csészét alkalmazunk, amelyhez 3 ml EM médiumot adunk hozzá. Egy Petri csészébe átlagosan 1×10^6 db ES sejtet helyezünk ki. A médiumot érdemes minden nap cserélni, minden másnap passzáljuk a sejteket. A passzálás során itt is a fibroblaszt sejteknél megszokott metodikával víz-légszivattyúval távolítjuk el a felülúszót, valamint tripszin-EDTA oldatos kezeléssel választjuk le a sejteket a felszínről, ugyanolyan körülmények között centrifugáljuk és szuszpendáljuk a sejteket, majd a már frissen előkészített mitomycines fibroblaszt rétegre tesszük rá a sejteket. Természetesen az egér ES sejteket is ugyanazon körülmények között tenyésztjük (37°C , 5% $[\text{CO}_2]$)

RNS izolálás

Az első lépésben az ES sejtek trizol oldat (Sigma) és pipetta segítségével feltárjuk. Az általunk használt protokoll szerint $5-10 \times 10^6$ sejt lizálásához 1 ml trizol oldatot használunk. A kapott lizátumot fagycsőbe helyezve -70°C -os hűtőben tároljuk.

Ezt követően, a felolvasztott 500 μl trizolos mintákat 100 μl kloroformban szuszpendáljuk fel, majd 10-15 percig szobahőmérsékleten állni hagyjuk. Az így kapott mintákat lecentrifugáljuk 15 percig 1200rpm, 4°C körülmények között, ennek során az elegy három fázisra különül el. A legfelső színtelen lesz az RNS, a középső enyhén opálos, fehéres színű a DNS, az alsó rózsaszín fázis pedig a fehérjéket alkotja. A legfelső réteget körültekintően leszívjuk pipetta segítségével és áthelyezzük egy eppendorf csőbe. Ilyenkor adunk hozzá 250 μl izopropanolt, majd 5-10 percig állni hagyjuk szobahőmérsékleten. Centrifugálást követően (10min, 12000rpm, 4°C) egy papírtörő segítségével felszívjuk a folyadékot és a bent maradó pelletet 1 ml 75% etanollal tisztítjuk. Egy utolsó centrifugálás (7500 rpm; 5 min; 4°C) történik, majd a felülúszó folyadékot eltávolítjuk, 5-10 percig hagyjuk szobahőmérsékleten száradni. A mintákat tisztított desztillált vízben veszem fel és -70°C -on tároljuk.

Real time PCR (qPCR)

A TaqMan ® Gene Expression Assays protokoll szerint történt az eljárás. Egy reakcióelegyhez szükséges egyenként 7,5 µl PCR mix, 0,75 µl Taqman primer, 5,75µl desztillált víz valamint 1µl cDNS, vagyis összesen egy mintának 15µl-nek kell lennie.

Első lépésben felolvasztjuk a taqman próbát -20°C-ról majd centrifugálás következik (5 min, 2000rpm, 4°C) körülmények között. Egy mixet készítünk a desztillált vízből, PCR mixből, valamint a taqman próbából, majd a PCR gépben használatos eppendorf csövekbe helyezünk ki belőlük 14µl mintánként, majd a 1µl cDNS mintákkal feltöltjük 15 µl-re. Már csak egy centrifugálás következik (3 min, 2000rpm, 4°C) és már be is helyezhetjük a Real Time PCR gépbe, hogy az adott programon végigfuthassanak a mintáink. A PCR munka során pluripotens össejtek, illetve egyéb differenciálódási irányba mutató markereket alkalmaztunk. korai pluripotencia marker az Oct3/4, Nanog, Sox2, már ideg irányba elköteleződést mutat az Sox1, Nestin valamint szívizomsejt irányú elköteleződést pedig az alfa-MHC, brachyury marker mutatta meg számunkra.

Embriószerű testecskék (EB) létrehozása, differenciáltatás

Az ES sejtek hetedik passzálását követően, in vitro szívirányú differenciáltatást indítottunk a megfelelő médiumban (LIF mentes 20 % FBS-t tartalmazó médium). Olyan embrió (EB) csomókat hoztunk létre, amelyek már elindulnak egy differenciálódási irányba, attól függően, milyen médiumokat adunk hozzá, mindezt függőcsepp tenyészetben végeztük el. Az ideg irányú protokoll szerint a neurális indukció előtt a sejteket 0,1%-os zselatinnal (Sigma) kezelt petri-csészékre (Greiner) helyeztük 24 órára. A sejteket (n=200) függőcsepp tenyészetben aggregáltattuk két napig, majd a kapott embrionális testecskéket (EB csomókat) bakteriális Petri-csészékbe helyeztük, differenciáltató tápoldatba (KO-DMEM médium, kiegészítve az alábbi komponensekkel: Glutamax, 50 µg/ml streptomycin, 50 U/ml penicillin, 50 mM β-mercaptoethanol, 0,1 mM nem-esszenciális aminosavak, és 10% FBS). Az EB csomókat két nap múlva új Petri-csészébe, zselatin felszínre helyeztük. Idegsejt irányú differenciáltatás képességének vizsgálata szintén LIF mentes, 10% FBS tartalmazó médiumban (DIFF EM), illetve egy speciális differenciáltató médiumban, Neuro-D médiumban történt. Az EB csomókat a harmadik napon tripszines emésztést követően zselatinos felszínre helyeztük ki.

Alkalikus foszfatáz festés

A pluripotens sejtek magas alkalikus foszfatáz aktivitásának köszönhetően a fast RED festék egy enzimatis reakció során vörös színűre festi azokat. A festési eljárást megelőzően a sejteket zselatinnal kezelt Petri csészén kell tartani. Mielőtt fixálnánk a sejteket eltávolítjuk az EM médiumot, majd PBS-sel átmossuk. A fixálás 4% paraformaldehid (PFA, Sigma) oldattal történik (3ml/Petri

csésze), majd 15 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk a sejteket. Még egy PBS mosást követően 3 ml TM pufferben (1x Tris-malate) hagyjuk a sejteket állni 10 percig szobahőmérsékleten. Az oldatot eltávolítjuk és következik a festés 3ml APS oldattal 30 percig szobahőmérsékleten. Végül PBS oldatban mossuk a sejteket és tároljuk 4°C-on. A TM pufferek és az APS festék összetevői a következők:

TM puffer (40x): 23,72 m/m% Tris-maleate; 12,11 m/m% Tris base; MQ vízben.

TM puffer (1x): 2,5 V/V% TM puffer (40x); MQ vízben.

APS oldat: 2,5 v/v% TM puffer (40x); 0,8 V/V% $MgCl_2$; 0,04 m/m% Naphtyl phosphate; 0,1 m/m%, Fast red; MQ vízben.

Immunfestés:

Az ES sejtek tenyésztését követően a médiumot leszívtuk, majd PBS-sel mostuk. A fixálást 4% paraformaldehidben végeztük (PFA, Sigma) 10 percen keresztül szobahőmérsékleten. Ezt követően 0,5 % BSA-t (Bovine Serum Albumin. Sigma) tartalmazó PBS oldattal történt a mosás. Az antitestek hozzáadását megelőzően a blokkolást 1% BSA-val kiegészített PBS oldatban 30 percen keresztül alkalmaztuk. Egész éjszakán keresztül hagytuk a mintáinkat az elsődleges antitesttel 4°C-on, a másodlagos antitestet már csak egy órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten. A következő elsődleges antitesteket alkalmaztuk:

nestin (patkány 401, 1:3, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA), *β III tubulin* (G7121, 1:2000, egér IgG, Promega), *nanog* (963488, 1:10, kecske IgG Promega)

1:400 hígított oldatként használtuk fel őket. DAPI tartalmú Vectashield mounting médiummal (Vector laboratories) fedtük a sejteket. A megfestett sejteket fluorescens mikroszkóp alatt vizsgáltuk (Zeiss), illetve Olympus inverz mikroszkópot használva készítettük a fotókat.

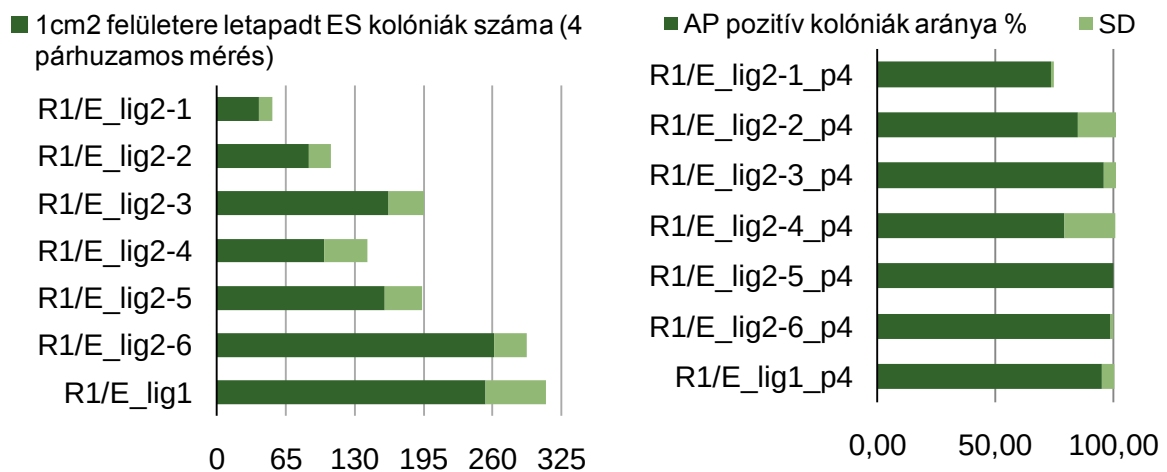
Sejtszámolás:

A sejtszámolás szintén az Olympus inverz mikroszkópon keresztül történt. Az alkalikus foszfatáz által festett (piros) kolóniákat számoltuk le a különböző felszíneken (3 - 4. ábra) és elemeztük az eredményeket.

Eredmények:

A vizsgált felületeknek fantázianevet adtunk lig1, amely az AkcRGD felszínt takarja, illetve lig2(1-6) a különböző SAK polipeptidláncoknak megfelelően 6 csoportba rendezve őket.

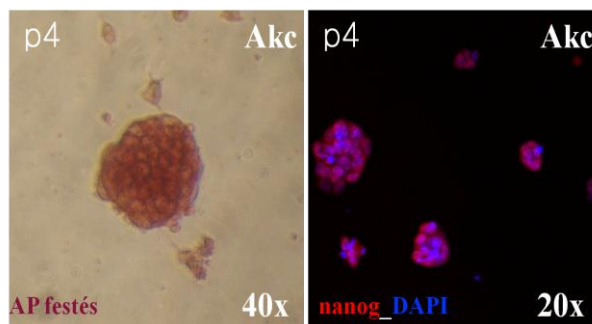
A negyedik passzást követően vizsgáltuk meg alkalikus foszfatáz (AP) aktivitás alapján (3-4. ábra) és hasonlítottuk össze a felszíneken letapadt kolóniákat. Eredményeink azt mutatják, hogy a lig1 valamint lig2-6 os felszínen szívesebbetapadnak le a sejtek (3. ábra).



3. ábra: Az 1 cm² – re letapadt ES sejtek száma (db) 4. passzázsor

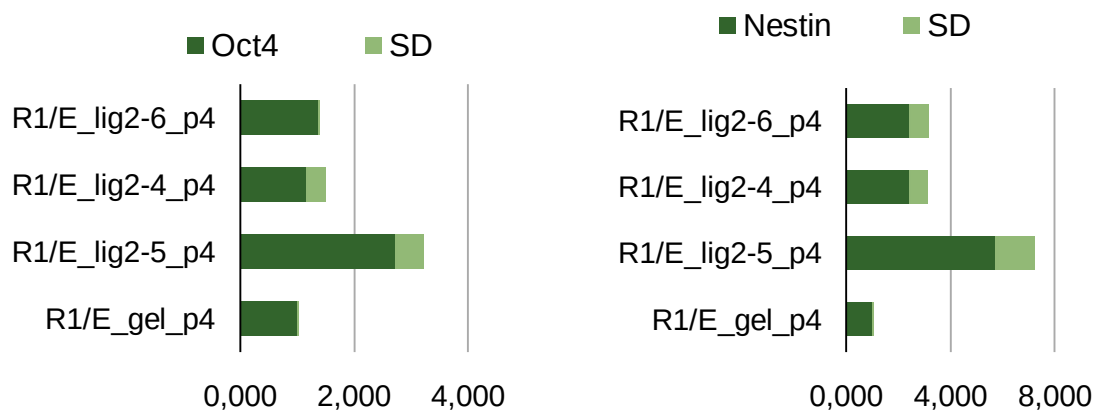
4. ábra: Alkalikus foszfatázzal festődött kolóniák százalékos megoszlása az adott felületeken

Az AP aktivitás, immunfestés és pluripotens markerek szempontjából pedig szépen követhető, hogy a letapadt ES sejtek a negyedik passzást követően is megtartják differenciálatlan, pluripotens állapotukat (5. ábra).



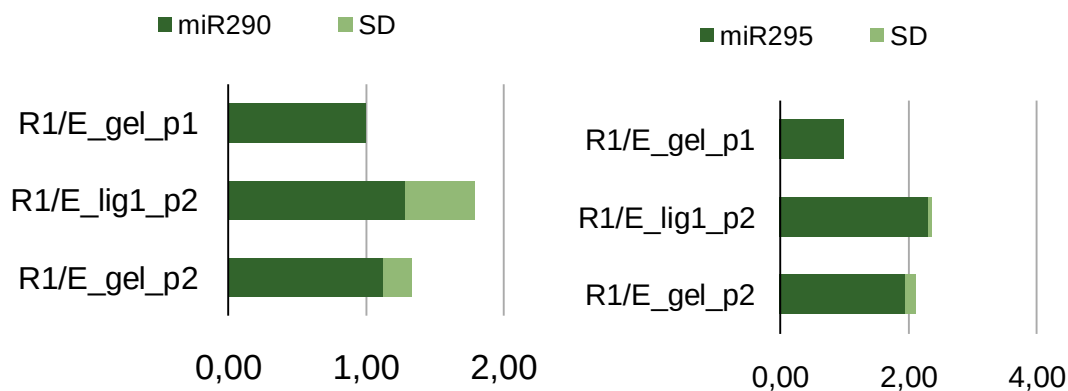
5. ábra: negyedik passzást követően készültek a képek. Jobb oldalon az AP festést a bal oldalon immunfestődést láthatjuk

A lig2-5 felszín érdekessége, hogy szignifikánsabban magasabb értéket kaptunk az Oct4 és Nestin expressziót illetően, mint a többi vizsgált felszín (6. ábra).



6. ábra: Oct4 pluripotens marker és nestin korai ideg irányú differenciálódást jellemző marker expressziója az adott felületekre vonatkozóan a negyedik passzázst követően

Ezen kívül még zselatinos (gel) felszínen is tenyésztettük párhuzamosan ES sejteket. A pluripotens sejtekre jellemző markerek (Oct4 (6.ábra), Nanog, miR290 és miR295(7. ábra), illetve korai differenciálódási markerek (Nestin, Gata4, Brachyury, Sox1) (8.ábra) szerint hasonló expressziós szintet mutatnak a zselatinon, illetve lig1 felszínen tartott kolóniák esetében a 2. passzázst követően. Megemlíteném, hogy kiméra egereket azonban csak a lig1 felületen tartott sejtekből kiindulva lehetett létrehozni.

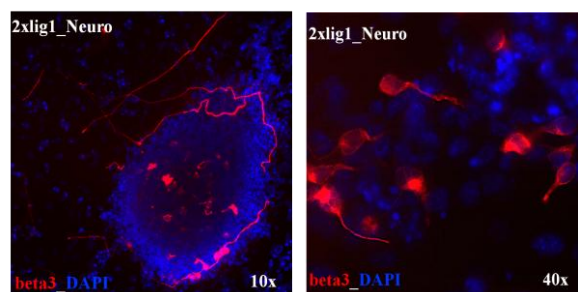


7. ábra: miR290 és mir295 mikroRNS pluripotens állapotot jellemző markerek expressziója lig1 (Akc-RGD) illetve zselatinos felületeken első és második passzázst követően



8. ábra: *Gata4 és Sox1 korai differenciálódást jellemző markerek lig1(Akc-RGD) illetve zselatinos felületeken első és második passzázst követően*

Az ES sejteket egér fibroblaszton (fib), zselatinon (gel), illetve lig1 (Akc-RGD) kezelt felületen tartottuk fent. Ezt követően LIF mentes ES médiumban (DIFF EM), illetve idegsejt differenciálódást elősegítő médiumban (NeuroD) EB csomókat hoztunk létre szuszpenziós tenyészetben. A Nestin, Sox1 és Neurod1 expressziót vizsgáltuk. A lig1 felszínen tartott ES sejtek a DIFF EM médiumban nagyobb arányban hoztak létre korai idegsejtekre jellemző markereket expresszáló sejteket (10. ábra), illetve NeuroD médiumban jóval több β III tubulint expresszáló sejtet lehetett kimutatni. A β III tubulint egy korai idegsejt differenciálódásra jellemző marker.



9. ábra: *második passzálást követően lig1 (Akc-RGD) felületekről készített sejtek β III tubulin, DAPI immunfestéssel készített felvételei*

R1/E ES	médium	nestin	sox1	neurod1
p2 gel	DIFF EM			+
p2 lig1	DIFF EM	+	+	+
p2 gel	NeuroD		++	+
p2lig1	NeuroD			++

10. ábra: *második passzázst után lig1(Akc-RGD), illetve zselatinnal kezelt felületen DIFF EM illetve NeuroD médiumban tenyésztett ES sejtek összehasonlítása (Nestin, Sox1, Neurod1)*

Szépen látható a lig1 felületen DIFF-EM médiumban tartott ES sejtekben, hogy második passzázst követően piros színnel jelölt, az idegsejt irányú differenciálódás mértékét jelezvő β III tubulin pozitív sejtek aránya milyen magas (9-10. ábra).

Következtetések:

Eredményeink alapján elmondható, hogy a lig1 (Akc-RGD) és lig2-6 felszínek elősegítik az egér embrionális őssejtek letapadását. Ezen kívül az Akc-RGD felszínen fenntartott egér ES sejtek több passzálást követően is megőrzik pluripotenciájukat. Ezen a felszínen fenntartott egér ES sejteket felhasználva, a második passzázt követően, kiméra egereket lehetett létrehozni. Továbbá megemlíteném, hogy a lig2-5 felületen fenntartott egér ES sejtek Oct4 és nestin expressziója szignifikánsan megnövekedett (6. *Ábra*). Szeretnénk kideríteni milyen sejttípus növekedését segítheti ez a felszín. Összehasonlítanánk az Akc-RGD felszínnel kapott eredményeket késői passzázsokban, valamint megvizsgálnánk képes-e hosszabb időn keresztül is a lig1 felszín az őssejtek pluripotens állapotát megtartani, képesek-e ekkor is kimérákat létrehozni. Az Ak-cRGD felszínen fenntartott egér ES sejtek nagyobb arányban képesek neuronokat létrehozni, mint a zselatinon fenntartott sejtek. Ezt a megfigyelést talán a későbbiekben, ki lehetne használni ideg irányú differenciáltatás alkalmazásában. Ha további eredményeink is igazolják előzetes kísérleteink eredményeit, elképzelehető, hogy az Ak-cRGD anyaggal bevont felületekkel le tudnánk cserélni a drágább szintetikus anyagokat (laminin alapú, Matrigel), valamint a nagyobb körütekintést igénylő bonyolultabb élő, táplálósejtes fibroblasztos felszínt is. Ezáltal egy olyan olcsóbb felületet alakíthatunk ki, amellyel ugyanolyan megbízható eredményeket érhetünk el, mint az ES sejtenyésztés szempontjából használatos felszíneken (fibroblast, laminin, Matrigel). Ezen kívül az Ak-cRGD típusú felszín a korai passzázt követően idegirányú differenciálódást mutatva a későbbiekben talán egy speciális őssejt válogatási módszerben is segítséget nyújthat. A jövőben talán olyan differenciáltatási módszert dolgozhatunk ki ez alapján, amely szerint csak egy felületváltás elég volna ahhoz, hogy az erre alkalmas sejtek a megfelelő irányba differenciálódjanak. Természetesen ezen módszerek eléréséhez még szükséges további vizsgálatok, kísérletek.

A legnagyobb lehetőséget talán a gyógyászatban láthatjuk. A különböző anyagból készült csontimplantátumokon (titán, platina egyéb fém ötvözetek) kevésbé képesek sejtek megtapadni, ezáltal kisebb stabilitást biztosítanak a csont-protézis közötti kapcsolat számára. Viszont, ha megfelelő adhezív peptidekkel bevonjuk, amelyekkel, szívesen létesítenek kapcsolatot progenitor, vagy más típusú differenciálatlan sejtek, és képesek csont irányba elköteleződni és megtapadni, akkor létrehozhatunk egy stabilabb, megbízhatóbb beépülést például egy csípőprotézissel rendelkező ember számára. A távlatokban a gyógyászat

csontimplantátumokat felhasználó területein (sebészet, fogászat...) nagy jelentőséggel bírhatnak az ilyen biológiaiilag aktív anyagokkal ellátott felszínek.

Irodalomjegyzék:

- Andrews PW, Matin MM, Bahrami AR, Damjanov I, Gokhale P, Draper JS. 2005. Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: Opposite sides of the same coin. *Biochem Soc Trans* 33:1526–1530.
- Brons, I.G., Smithers, L.E., Trotter, M.W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R.A., and Vallier, L. 2007. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448:191-195.
- Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154–156.
- Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. 1998. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 69:84–88.
- Giritharan G., Ilic D., Gormley M., Krtolica A., 2011. Human embryonic stem cells derived from embryos at different stages of development share similar transcription profiles. *PLoS One*. 6(10):e26570
- Houbaviy, H.B., Murray, M.F., and Sharp, P.A. 2003. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell* 5:351-358.
- Kolhar, P., Kotamraju, V.R., Hikita, S.T., Clegg, D.O., Ruoslahti E. 2010. Synthetic surfaces for human embryonic stem cell culture. *Journal of Biotechnology* 146: 143–146
- Lichner, Zs., Páll, E., Kerekes, A., Pállinger, E., Maraghechi, P., Bősze, Zs., Góczy, E. 2011. The miR-290-295 cluster promotes pluripotency maintenance by regulating cell cycle phase distribution in mouse embryonic stem cells. *Differentiation*, 81(1):11-24.
- Matsui, Y., Zsebo, K., Hogan, B.L.M. 1992. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70:841-847.
- Nagaoka, M., Si-Tayeb, K., Akaike, T. and Duncan, S.A. 2010. Culture of human pluripotent stem cells using completely defined conditions on a recombinant E-cadherin substratum. *BMC Developmental Biology* 10:6.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., and Roder, J.C. 1993. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8424-8428.
- Robertson, E.J. 1987. Embryo-Derived Stem Cell Lines in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells a Practical Approach. IRL Press, Oxford, 108-112.

- Takada T, Suzuki Y, Kondo Y, Kadota N, Kobayashi K, Nito S, Kimura H, Torii R. 2002. Monkey embryonic stem cell lines expressing green fluorescent protein. *Cell Transplant* 11:631–635.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663–676
- Taylor, M. and Xu, R.H. 2010 Determinants of Pluripotency: From Avian, Rodents, to Primates. *PROSPECT Journal of Cellular Biochemistry* 109:16–25
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP. 1995. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7844–7848.
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Hearn JP. 1996. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod* 55:254–259.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145–1147.
- Tong C, Li P, Wu NL, Yan Y, Ying QL. 2010. Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* 467:211-3.
- Wobus, Anna M., and Kenneth R. Boheler. Embryonic Stem Cells. 2005. Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. *Physiol Rev* 85: 635–678

Köszönetnyilvánítás:

Szeretném megköszönni témavezetőimnek: Dr. Madarász Emíliának és Dr. Gócza Elennek az elméleti és gyakorlati felkészülésben nyújtott támogatásukat.

Rajtuk kívül köszönöm Bontovics Babettnek és Gróf Mihályné Marikának a segítséget, amit kísérletek gyakorlati kivitelezése során kaptam.