

Szent István Egyetem
Mezőgazdasági- és Környezettudományi Kar
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont
Állatbiotechnológia csoport

Iker egerek létrehozása tetraploid komplementációs technológiával: a donor embriók genotípusának hatása

Készítette:
Balogh Erna
II. évfolyam

Belső témavezető: Dr. Gócza Elen
Tudományos főmunkatárs, csoportvezető

Külső témavezető: Bontovics Babett
Tudományos segédmunkatárs

Gödöllő
2013

1. Tartalom

2.	Rövidítések jegyzéke.....	4
3.	Bevezetés és célkitűzés	5
4.	Irodalmi áttekintés.....	7
4.1	Egér.....	7
4.1.1	Egér embrió fejlődése.....	8
4.2	A fejlődési plaszticitás.....	9
4.3	Kimérák	11
4.3.1	ES sejt- diploid embrió kimérák.....	13
4.3.2	Kiméra ES sejtekkel és diploid embrióval	14
4.3.3	Mutáns és vad típusú diploid embrió kiméra	15
4.3.4	Tetraploid kimérák	15
4.3.5	Iker kimérák	16
4.4	Transzkripció faktorok.....	18
4.4.1	Transzkripció faktorok az egér embrióban	19
4.5	Inhibitorok hatása	19
5.	Módszerek	21
5.1	Donor embrió genotípus hatásának vizsgálata	21
5.1.1	Felhasznált egértörzsek	21
5.1.2	Eszközök	21
5.1.3	Két-sejtes embriók begyűjtése	22
5.1.4	Nyolc-sejtes embrió begyűjtése	23
5.1.5	Tetraploid embriók létrehozása	23
5.1.6	Preimplantációs embrió tenyésztő médium és reagensek	24
5.1.7	Aggregáció	25
5.1.8	Embrió transzfer.....	26

5.2	Inhibitoros kísérletek	27
5.2.1	A kísérlet menete.....	27
5.2.2	Két-inhibitoros médium készítése	27
5.2.3	Immunfestés	27
5.2.4	Állatkísérleti szabályok	28
6.	Eredmények.....	29
6.1	Iker kimérákkal végzett kísérletek eredményei	29
6.2	Inhibitoros kísérletek	36
7.	Értékelés és következtetések	39
8.	Összefoglalás.....	42
9.	Köszönetnyilvánítás	44
10.	Irodalomjegyzék.....	45
11.	Nyilatkozat	49

2. Rövidítések jegyzéke

2i	két inhibitoros
BAC	baktériumból származó mesterséges kromoszóma (Bacterial artificial chromosome)
CDX2	Homeotikus fehérje CDX2 (Homeobox protein CDX2)
EGFP	zöld fluorescens fehérje módosított változata (Enhanced Green Fluorescent Protein)
EPI	epiblaszt
ERK	extracelluláris szignál regulált kináz
ES	embrionális eredetű őssejt (Embryonic Stem Cell)
FGF	fibroblaszt növekedési faktor
GATA4	transzkripciós faktor (GATA-binding factor 4)
GATA6	transzkripciós faktor (GATA-binding factor 6)
GSK	glikogén szignál kináz
ICM	embriócsomó vagy belső sejtcsoport (Inner Cell Mass)
LIF	leukémia inhibitor faktor (Leukaemia Inhibitory Factor)
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
mESC	egér embrionális őssejt
MT	mitokondriális
MZ	monozigóta
NANOG	Nanog homeotikus fehérje (Nanog homeobox protein)
OCT4	4-es oktamer kötő fehérje (Octamer binding protein 4)
PE	primitív endoderma
SOX2	transzkripciós faktor SOX2 (Transcription factor SOX2)
TF	transzkripciós faktorok
TS	trofoblaszt
YAC	élesztőből származó mesterséges kromoszóma (Yeast artificial chromosome)

3. Bevezetés és célkitűzés

Az ikrekkel kapcsolatos kutatások több évtizedes múltra tekintenek vissza. Sok különböző módszerrel próbáltak már eredményeket elérni ezen a területen. Több kutatási területen hasznos lenne, ha sikerülne jobb eredményeket elérni, ezért folyamatosan zajlanak az ezzel kapcsolatos kísérletek.

A dolgozatom készítése során egér embriókkal foglalkoztam. Az egér azért nagyon jó modell és labor állat, mert ez a faj a leginkább alkalmas a genetikai módosításokra. Transzgénikus egerek létrehozására jelenleg több módszert is alkalmaznak.

Kísérleteim során kiméra állatok létrehozásával foglalkoztam. A kiméra olyan élőlény, amely két fajhoz vagy fajtához tartozó egyed szöveteiből mesterségesen került kialakításra. A végső célom identikus ikrek létrehozása volt. Az iker vizsgálatok hasznosságát meggyőzően támasztja alá a szív rendellenességek, illetve a magas koleszterin szint okozta megbetegedések vizsgálata esetében elért új eredmények.

Napjainkig sokféle módszert fejlesztettek ki az egér embriók, őssejtek genetikai módosítására. Az így létrehozott transzgénikus egereket mind a fejlődés biológiai vizsgálatok során, mind pedig az orvoskutatás területén elterjedten alkalmazzák. Két egér embriót aggregáltatva, kiméra embriókat lehet létrehozni. Amennyiben tetraploid gazda embriókat használunk, a donor embrióból származó blasztomerekből identikus kettes, vagy hármas ikreket lehet létrehozni. Ezt a módszert nevezik tetraploid komplementációs technológiának.

A Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban iker egereket szeretnének létrehozni tetraploid embriókkal történő aggregáltatással. Korábbi kísérletek beszámoltak arról, hogy ez a módszer alkalmas lehet arra, hogy létrehozzunk iker egereket. Különböző egér törzsekkel dolgoztunk, és én azt vizsgáltam, hogy hogyan hat a donor embrió genotípusa a megszülető kiméra utódok számára.

Az iker kiméra létrehozás egy másik módszere lehet az embriódarabolás, ugyanis a megfeleztett embrió pontosan azt a fejlődést követi, mint a normál méretű embrió. Azonban ezzel a módszerrel kapcsolatban problémák merültek fel. Elsődleges hátráltató tényező a módszer sikerességét tekintve, hogy a fél embrió nem rendelkezik megfelelő epiblaszt sejtszámmal.

A tetraploid kimérák létrehozása mellett, különböző tenyésztő médiumban történő tenyésztést is végeztem normál egér embriókkal. Kis molekulás inhibitorokról kimutatták,

hogy megakadályozzák a primitív endoderma fejlődését és növelik az epiblaszt sejtszámot. Vizsgálataim során párhuzamosan tenyésztettem két-sejtes embriókat normál tenyésztő médiumban, valamint kétféle inhibitort tartalmazó médiumban.

Az identikus ikrek létrehozásának jelentősége, hogy az ilyen állatok genotípusa megegyezik, tehát genetikai állományuk azonos. Ha egy állat az általunk kívánt értékes tulajdonsággal rendelkezik, létrehozható belőle egyszerre több, azonos gén állománnyal rendelkező utód. Mivel genetikailag azonos egyedekről van szó, így ugyanazokkal a tulajdonságokkal fognak rendelkezni.

Ha az általunk alkalmazott tetraploid komplementációs módszerrel sikerülne identikus monozigóta (MZ) ikreket létrehoznunk, lényegesen csökkenteni lehetne azoknak az állatoknak a számát, amelyek szükségesek releváns statisztikai adatok létrehozásához, illetve a MZ ikrek hasznos információkkal szolgálhatnak mind az orvosbiológiai, mind pedig mezőgazdasági alkalmazásokban.

4. Irodalmi áttekintés

4.1 Egér

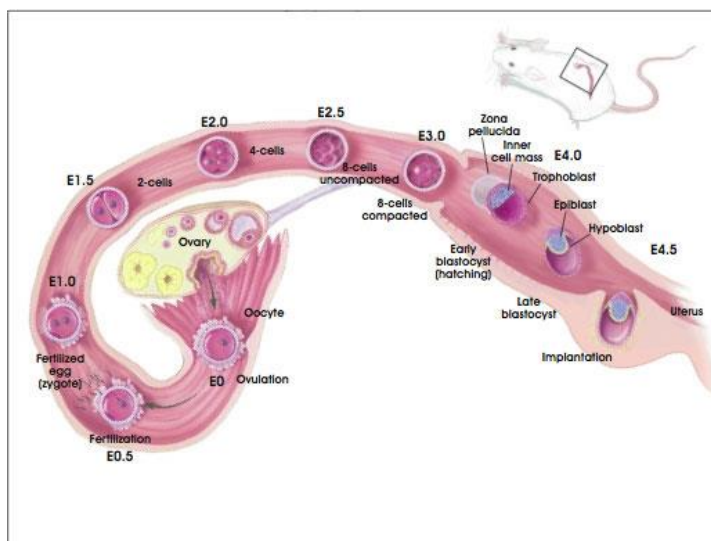
A házi egér vagy laboratóriumi egér (*Mus musculus*) igen fontos modell szervezet a biológia és az orvostudomány számára. Úgy tartják, hogy a *Homo sapiens* után, ez a második legnagyobb egyedszámú emlős faj. A laboratóriumi kísérletekben is ezt az emlőst használják leggyakrabban és több különböző transzgénikus fajtája létezik, melyeken emberi betegségeket modelleznek.

Kiváló laborállat, mert rendkívül szapora, 6 hetenként 8-10 utódot képes világra hozni egy egérpár. Az utódok 6 hetes korban elérik az ivarérettséget. A párzási időszak többnyire egész évben tart. Évente ötször, de akár többször is ellik. Igen nagy egyedsűrűség esetén, a rangsorban alacsonyan álló példányok szaporodóképessége csökken, csak a domináns nőtények fialnak, de ők is kevesebbet, mint általában. Az állomány ily módon önmagát szabályozza, nagy összeomlások nélkül, tehát folyamatosan alkalmazkodik a változó körülményekhez ([http1](#)).

Az egér agyának működése komplex és sok tekintetben hasonlít az emberéhez, ezért is választották az Alzheimer-kór modellezéséhez is. Ezen a fajon számos transzgénikus állatok előállítására alkalmas módszer használható ([http2](#)).

Az egerek DNS-ébe mesterséges módon, rekombináns genetikai módszerek segítségével mutáns géneket lehet bejuttatni. Ezután a mutáns gén nagy mennyiségben termelhet mRNS-t, azaz mesterségesen megnövelt génexpressziót lehet előidézni. Emellett az ellenkezője is elérhető, tehát lecsökkenthető, vagy teljesen meg is szüntethető a gén expressziója ("null" mutáció). Ezekben az úgynevezett transzgénikus egerekben egyetlen gén funkcióját módosították, és így a kiválasztott gén fenotípusára gyakorolt hatását lehet vizsgálni ([http2](#)). A transzgenezist egerekben felhasználják sejtvonal markerek létrehozására, szomatikus és meiotikus rekombináció tanulmányozására, vagy transzgénikus módszerek, vektorok kifejlesztésére, amelyek később gazdasági haszonállatokban is alkalmazhatóak (Nagy et al. 2003).

4.1.1 Egér embrió fejlődése



1. ábra: Egér embrió fejlődése a beágyazódásig (<http3>)

blasztociszta kibújik a zóna pellucidából és készen áll a beágyazódásra (1. ábra) (Nagy et al. 2003).

Az egér embrióban két fontos specializálódási esemény zajlik, mielőtt beágyazódik a méhbe (Kuijk et al. 2008). Az első ilyen esemény a kompaktizálódott morula állapotnál kezdődik és két elkülönülő vonalat eredményez: a trofektodermát (TE) és a belső sejt csomó sejtjeit (ICM). Az ICM sejtjeiből az embrionális sejtek, az extraembrionális mezoderma sejtek és a primitív endoderma sejtjei jöhetnek létre, míg a trofektodermából kifejlődő sejtek a külső magzatburok és a méhlepény részévé válnak (Van der Jeught et al. 2003).

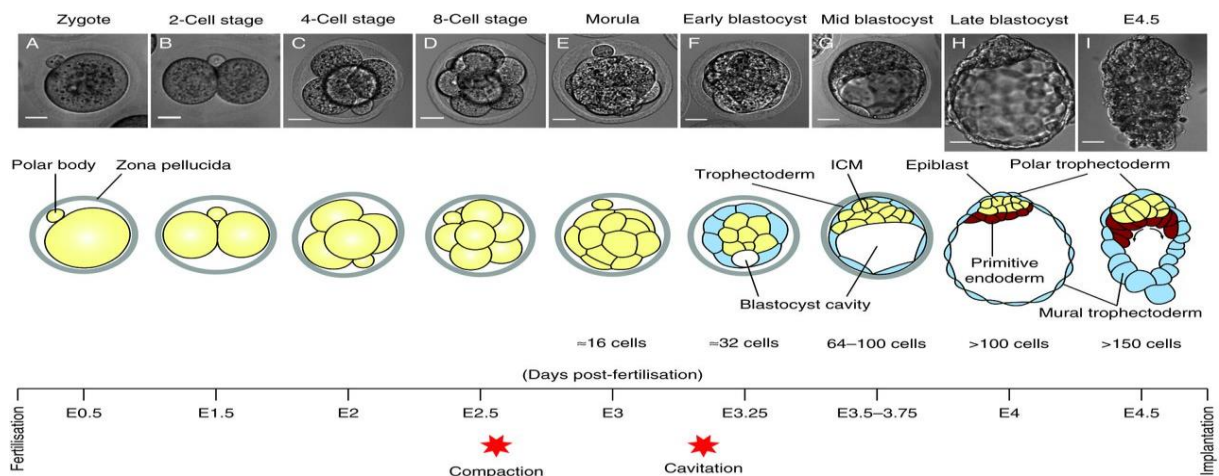
A trofektoderma és a hipoblaszt vonalak adják az extraembrionális szöveteket, hogy könnyebben beágyazódjon az embrió a méhbe, valamint segítsék a méhlepény kialakulását. Az epiblasztot pluripotens sejtek alkotják, amelyekből a magzat embrionális szövetei jönnek létre. A pluripotencia definíció szerint az a képesség, hogy bármelyik csíralemez irányába képes differenciálódni: az ektoderma, a mezoderma és az endoderma irányába is.

A trofektoderma és az ICM szegregációjában két transzkripciós faktor játszik szerepet: ezek az OCT4 és a CDX2. Az epiblaszt és a hipoblaszt szegregációja során a GATA6 és a NANOG expressziós szint változik meg a sejtekben. Ez a két faktor együttesen található az ICM sejtjeiben, azonban a késői blasztociszta különböző sejtrétegeiben kölcsönösen kizárják egymás jelenlétét. Az epiblaszt és a hipoblaszt eltérő transzkripciós faktor expressziót mutat az egér embrióban a 4,5. fejlődési napon, a beágyazódás előtt (Kuijk et al. 2008).

Az emlős embriókban az extraembrionális sejtréteg elsődleges szerepe, hogy segítse a méhbe épülést, és hogy a növekedő embrió és magzat a későbbiekben megfelelően fejlődjön (Nichols & Smith 2009).

Az emlősök fejlődésében a második differenciálódási lépéskor a primitív endoderma és a pluripotens primitív ektoderma elkülönülése következik be. Az egér embrióban az OCT4, CDX2, NANOG és GATA6 szabályozzák ezeket az eseményeket, de nem ismert, hogy ez általánosan elmondható az emlősökről (Roode et al. 2011).

A primitív endoderma (PE) és epiblaszt sejtek (EPI) két elkülönülő réteget alkotnak a 4,5 napos beágyazódott embrióban, úgy, hogy mind a két réteg a 3,5 napos blasztociszta belső sejt csomójából származik (2. ábra). A PE egy extra embrionális sejt vonal, amit elsősorban a zsigeri és a fali sejtek alakítanak ki a beágyazódás után. Az EPI sejtekből alakul ki a magzat



2. ábra: Egér embrió osztódása és sejtrétegeinek kialakulása (<http4>)

és néhány extraembrionális szövethez, mint például az amnion és az extraembrionális mezoderma. Az EP és EPI sejtek közti kölcsönhatások a korai poszt-implantációs fejlődésben fontosak.

A 3,5 napos blasztocisztában az ICM morfológiailag homogén sejtpopulációként jelenik meg. Két lehetőség van, vagy EPI vagy PE alakul ki belőle. A PE az ICM felszínén helyezkedik el egy elkülönülő réteggént. A PE és az EPI sejtek ennél a stádiumnál elkülönülő sejtrétegekké (sejtvonalakká) formálódnak. (Yamanaka et al. 2010).

4.2 A fejlődési plaszticitás

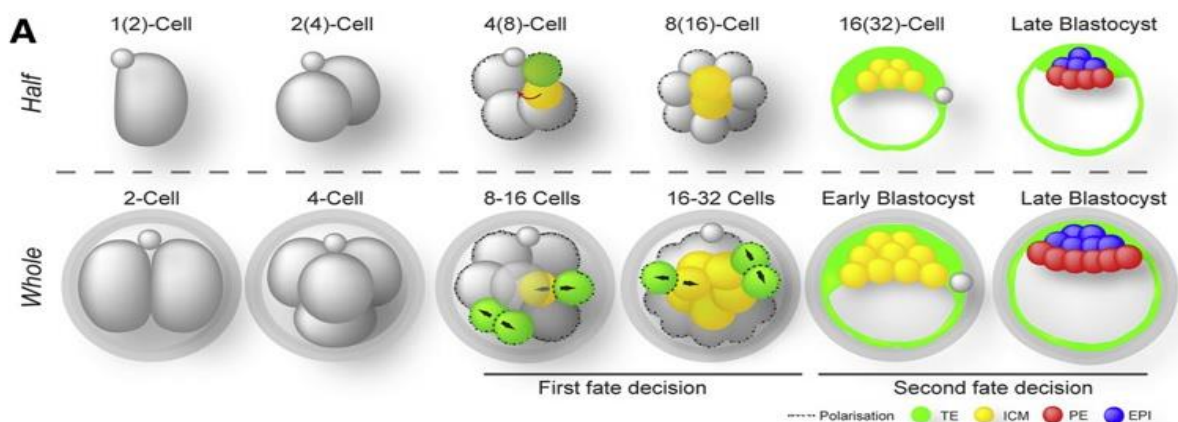
A plaszticitás egy jól ismert jellemző az emlősök fejlődésénél, azonban a mechanizmusáról még keveset tudunk. A felezett embriók ugyanazt a fejlődési időt követik,

mint a sértetlen embriók, azonban ha nem tartalmaznak minimum négy pluripotens sejtet a beültetés előtt, akkor a fejlődésük abbamarad (Morris et al. 2012).

Az egyik megkülönböztető jellemző az egerek fejlődésében a plaszticitás, amellyel az embriók képesek alkalmazkodni a megváltozott körülményekhez. Megfigyelhető, hogy ha a két-sejtes egér embrió egyik sejtje megsemmisül, ezt követően a megmaradt sejt gyakran kompenzálja a másik sejt elvesztését és így segíti a továbbfejlődést (3. ábra) (Nicholas & Hall 1942; Tarkowski 1959). A legtöbb esetben ez a plaszticitás megőrződik a későbbi fejlődési szakaszokban is. Abban az esetben, ha a sejteket különválasztjuk, a négy-és nyolc-sejtes egér embriók nem képesek tovább fejlődni a beültetéskor (Rossant 1976; Tarkowski & Wróblewska 1967), azonban képesek beépülni egy gazda embrió sejtjei közé, kiméra embriókat létrehozva (Kelly 1977; Piotrowska-Nitsche & Zernicka-Goetz 2005). A kiméra embriók pedig tovább fejlődnek (Mintz 1964; Tarkowski 1961).

A két-sejtes állapotban szétválasztott blasztomerekből nem sikerült iker egereket előállítani (Papaioannou & Ebert 1995; Tsunoda & McLaren 1983). Sem ennek az oka, sem a fejlődési plaszticitás mögöttes mechanizmusa jelenleg nem ismert. Ennek okait azóta számos kutató csoport vizsgálja.

A sikeres embrionális fejlődéshez olyan blasztocisztára van szükség, amelyből mind a három sejtípus kifejlődhet: az epiblaszt (EPI), ami a pluripotens sejteket adja (ami a jövőbeni szerveket alakítja ki), a primitív endoderma (PE) és a trofektoderma (TE). Ezek az extraembrionális szövetek nélkülözhetetlenek az embrió és a méhlepény fejlődéséhez (Zernicka-Goetz et al. 2009).



Annak ellenére, hogy jelentősen csökken a sejtszám a felezett embrióban, valamint az ICM néhány sejtjében is apoptózis megy végbe, pontosan ugyanabban az időben történik a

3. ábra: A felezett és a normál embrió fejlődése (Morris et al. 2012)

fejlődés menete, mint a normál méretű embriónál. A legfontosabb preimplantációs események a felezett embrióban is ugyanazt a fejlődési időt követik, bár érdekes módon néhány fejlődési átmenet mechanizmusa különböző (Le Douarin & McLaren 1984).

A részletes vizsgálatok azt mutatták, hogy a felezett embriók nagy variabilitást mutattak az ICM sejtszámban. Meghatározták a pontos pluripotens sejtszámot (NANOG pozitív), a PE (SOX17 pozitív) és a TE (CDX2 pozitív) sejteket a preimplantációs fejlődés vége előtt. Azt találták, hogy ellentétben a zavartalan fejlődéssel az EPI sejtszám a felezett embrióban drasztikusan megváltozott, összehasonlítva a normál méretű embrióval. Legalább négy EPI sejt szükséges a megfelelő fejlődéshez, mivel a fejlődés a beágyazódáson túl korrelál az EPI sejtszámmal. Tehát az EPI sejtszám az elsődleges limitáló tényező a sikeres fejlődéshez.

Ha sikerülne megnövelni az EPI sejtek számát az embriókban, el lehetne érni azt, hogy mindkét "fél" embrióból utód fejlődjön. Extracelluláris kis molekulás inhibitorok (2i), megakadályozzák a PE képződését és növelik az EPI sejtszámot. A kezelés eredményeképpen 30%-al nő a teljes ICM sejtszám, így az EPI sejtek száma is jelentősen megnövekszik (Morris et al. 2012).

4.3 Kimérák

A kiméra egy képzeletbeli lény az ókori mitológiában, aminek a feje oroszlán, a teste kecske és a farka egy kígyó. Ma olyan élőlényt vagy sejtet jelent, amely két fajhoz vagy fajtához tartozó egyed szöveteiből mesterségesen kerül kialakításra. (http5)

A kimérák a mutáns egerek komplex fenotípusának elemzésében fontos szerepet töltenek be. Kombinálva embrionális őssejt technológiával, molekulárisan jelölt mutációkkal és érzékeny sejtvonali markerekkel, a kimérák felbecsülhetetlen értékű betekintést nyújtanak egérgének hatásmechanizmusába.

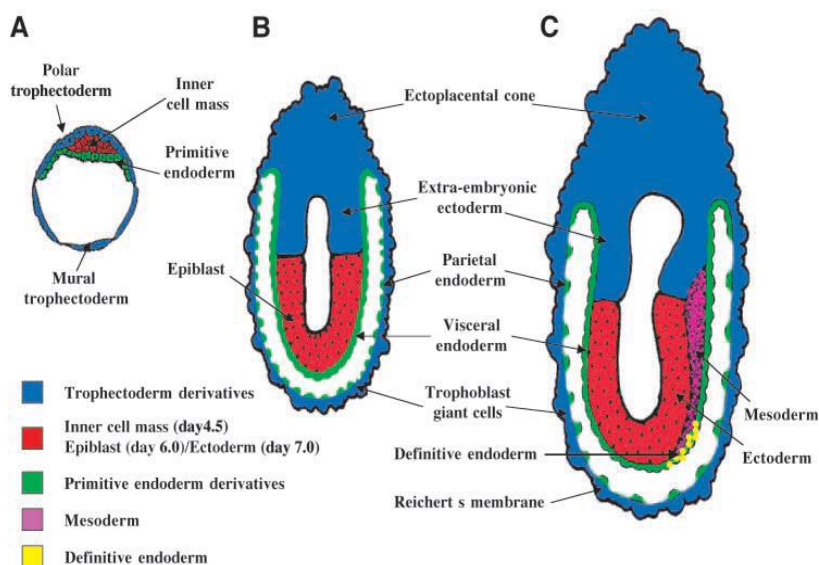
A kiméra előállítás az a modern technika, amely több szervezetből származó embrionális eredetű sejteket egyesít egy állatban. Az első embrionális kimérát az 1960-as években hozta létre Kristoph Tarkowski és Beatrice Mintz, akik két nyolc-sejtes embriót egyesítettek. Az eredmény egy kifejlett egér volt, amelynek szövetei különböző eredetű sejtek keverékéből származtak.

A kiméra előállítás egy másik módszere, sejtek injektálása blasztocisztába, Richard Gardnertől és Ralph Brinster-től származik. Ők pluripotens embrionális őssejteket injektáltak a

gazda embrióba. Ezek a sejtek minden szövettípus felé képesek differenciálódni, beleértve az ivarsejt vonalat is (Robertson 1986).

Oliver Smithies és Mario Capecchi igazolták, hogy a géneket Petri-csészében is lehet homológ rekombonációval módosítani, ezzel egy új korszakot nyitottak: a célzott mutagenézis tették lehetővé egerekben. A célzottan módosított gént tartalmazó sejtekből, kimérák előállításával lehet aztán létre hozni a legkülönbözőbb genetikai módosításokat tartalmazó egereket (Doetschman et al. 1988, Thomas & Capecchi 1989).

Az egér blasztociszta beágyazódás előtt három sejtípusból áll: az epiblasztból, a primitív endodermából, amelyek a belső sejt csomóból származnak, és a külső rétegből, ami a trofektoderma. Az epiblasztból alakul ki a három csíralemez (mezoderma, ektoderma és endoderma), amelyek a magzat minden szövetének őssejtjeit tartalmazza, illetve a zsigeri szikhólyag és a magzatburok extraembrionális mezodermája. A primitív endodermából fejlődik a zsigeri szikhólyag és a parietális szikhólyag endodermája, amelyek együttesen képezik a Reichert-membránt, amely magába foglalja a teljes zigótát. A trofektodermából származik a Reichert-membrán és a placenta trofektodermája (4. ábra) (Tam & Rossant 2003).



4. ábra: A gasztruláció folyamata: epiblaszt, primitív endoderma, trofektoderma eloszlása a zigóta különböző szöveteiben (Tam & Rossant 2003)

létrehozzák a belső sejt csomót vagy a trofektodermát, így képesek hozzájárulni minden sejtvonalkialakulásához.

Mikor két diploid nyolc-sejtes embriót vagy két diploid embrió blasztomerjeit aggregáltatjuk egymással, kimérizmus fordulhat elő az epiblasztban, a primitív endodermában és a trofektodermában. Ezzel szemben, amikor a diploid blasztociszta ICM-jének sejtjeit

Kimérák előállíthatók két nyolc-sejtes embrió kombinálásával vagy különböző osztódási fázisban levő embriók rész halmazainak egyesítésével (kettő és nyolc-sejtes állapotú embriók esetében). Mivel ezekben a fejlődési stádiumokban a korai embrionális sejtek még nem köteleződtek el, hogy

használjuk kiméra előállításra, akkor a bejuttatás a morulába vagy a blasztocisztába, illetve az aggregáltatás diploid nyolc-sejtes embrióval, azt eredményezi, hogy az epiblaszthoz és a primitív endodermához hozzájárulnak ezek a sejtek, de a trofektodermához nem.

Az ES sejtekkel hasonló a helyzet, úgy viselkednek, mint az epiblaszt sejtek. Azok csak az epiblaszt réteghez járulnak hozzá (Beddington & Robertson 1989), de nem vesznek részt a trofektoderma és a primitív endoderma kialakításában. A trofoblaszt őssejtek, amelyek állandó sejtvonalból származnak (akár a blasztociszta trofektodermájából vagy a kora poszt-implantációs trofoblasztból), hozzájárulnak a kiméra trofektoderma származékához a blasztocisztába injektálást követően (Tanaka et al. 1998).

Bár a tetraploid embriók alkothatnak blasztocisztát, de a poszt-implantációs fejlődésük gyenge marad, mert kevés epiblaszt sejttel rendelkeznek és az embriók elpusztulnak a vemhesség közepét követően (Kaufman & Webb 1990). Amikor tetraploid embriókat használnak, hogy diploid sejtekkel kimérát készítsenek, a tetraploid sejtek ritkán magához az embrióhoz (amiből az epiblaszt származik), de inkább a primitív endodermához és a trofektodermához járulnak hozzá (Tarkowski et al., 1987).

Ha diploid ES sejteket és tetraploid gazda embriót használunk kiméra készítésre, az azt eredményezi, hogy kizárólag ES sejt eredetű magzatból és extraembrionális mezodermából épül fel, de tartalmaz tetraploid trofektoderma és primitív endoderma származékot. Az ES sejt-tetraploid kimérákat már széles körben használják. Tetraploid komplementációs vizsgálattal tesztelik a megváltozott gén funkciókat, a sejtvonal potenciált és a funkcionális kölcsönhatást az embrió és az extraembrionális szövetek között (Tam & Rossant 2003).

4.3.1 ES sejt- diploid embrió kimérák

4.3.1.1 Embrionális őssejtek (ESC)

Az embrióban található pluripotens sejtpopulációból származnak az embrionális őssejtvonalak (ES). Fontos jellemzője az embrionális őssejteknek, hogy megfelelő tenyésztési körülmények között folyamatosan osztódnak, és az osztódásuk során is megtartják pluripotenciájukat, önmegújuló képességüket. Másik sajátos tulajdonságuk az, hogy a sejtek differenciálódni kezdenek, ha az optimális tenyésztési feltételek megváltoznak, és a legkülönbözőbb specializálódott sejttypusok képződnek belőlük (Bösze & Gócsa 2005).

Az ES sejteket széles körben használják genetikailag módosított állatok létrehozására (Ohta et al. 2008). Az ES sejtekkel, kiméra egereket lehet létrehozni, amelyek minden

szövetében megtalálhatók lesznek az ES sejtek utódsejtjei, még az ivarsejtek között is, így az ES sejteken végzett genetikai módosítások az ivarsejteken keresztül az utód nemzedékekbe is átadódhatnak. Genetikailag módosított, transzgénikus ES sejtek segítségével lehetségessé vált számos, az önmegújulásban, sejt-sejt kölcsönhatásban, sejt-elköteleződésben és a differenciálódásban szerepet játszó gén működésének megértése (Bösze & Gócza 2005).

1981-ben az első sikeres egér embrionális sejt vonal (mESC) ICM-ből származott. Kezdetben az mESC származtatása lehetséges volt 129SV egértörzsből optimalizált tenyésztési körülmények között, míg kevésbé volt hatékony más egér törzsek esetében. Kis molekulákat használva, amelyek a pluripotencia kialakításában szerepet játszó jelátviteli utak bizonyos molekuláinak gátlásában vesznek részt, lehetővé vált mES sejtvonalak létrehozása más egértörzsekből is.

Az embrionális őssejt tenyészetek esetében kis molekulákat lehet használni a kulcsfontosságú jelátvitel változtatásához, hogy elősegítse az önmegújulást és gátolja a differenciálódást. Egerekben az FGF/MEK/Erk és a GSK3b jelátviteli utak kis molekulás gátlása a preimplantációs fejlődés során elnyomja a hipoblaszt képződést és ez több pluripotens sejtet eredményez a belső sejt csomóban (Van der Jeught et al. 2012).

Az embrionális őssejtekbe történő célzott génbevitelt már széles körben használják, arra, hogy tanulmányozzák az embrionális fejlődésben szerepet játszó fehérjék szerepét (Duncan 2005).

4.3.2 Kiméra ES sejtekkel és diploid embrióval

Az ES sejtek képesek termékeny ivarsejtekké is alakulni. Ez a tulajdonságuk új lehetőségeket nyitott meg az egér molekuláris genetikában. A genetikai módosítások az ES sejt eredetű ivarsejtekkel, az utód nemzedékbe is átjutnak. A transzgént átörökítik az utód nemzedékre is (Gossler et al. 1986).

Jelenleg a legáltalánosabb eszköz a mutáns fenotípus tanulmányozására az ES sejt-embrió kiméra, amelyeket úgy hoztak létre, hogy vad típusú őssejteket jutattak mutáns embriókba, vagy fordítva. Mindkét esetben, az epiblaszt származékok (maga a kifejlett egér is) a vad típusú és a mutáns sejtek keveréke lett. Azonban az ES sejt nem tud hozzájárulni a primitív endoderamához vagy a trofektoderamához, így az extraembrionális primitív endoderma és trofektoderma el fog térni a felhasznált embrió és az ES sejtek genotípusától.

Az ES sejt-embrió kimérák használhatóak genetikai mutációk embrionális és extraembrionális hatásainak megkülönböztetésére, valamint a mutációk vonal specifikus hatásainak meghatározására az embrióban.

Ha homozigóta mutáns őssejteket használunk, az extra-embriónális szövetek nem fogják tartalmazni a mutációt, minden kiméra felhasználható a kísérletekben, nem lesz szükség genotipizálásra. Azonban ha vad típusú ES sejteket használunk mutáns embriókkal, az extraembrionális szövetek, valamint az embrió néhány szövete tartalmazhat mutációt. A mutáns hatás értelmezése a kiméra fejlődésében annak az embriónak a genotípusának ismeretét igényli, amibe ES sejteket jutattak be (Tam & Rossant 2003).

4.3.3 Mutáns és vad típusú diploid embrió kiméra

Ezt a kiméra típust úgy hozzák létre, hogy mutáns és vad típusú nyolc-sejtes embriót aggregáltatnak. Minden szövet mozaikos lesz, a mutáns sejtek képesek bármilyen szövetet létrehozni. A mutáns sejtek kizárását az adott sejtől vagy szövetből, illetve azok abnormális differenciálódását egy adott szövetben a mutáció általi sejt-autonóm hibák okozzák. A fő hátránya ennek a technikának az, hogy nehéz azonosítani informatív kimérákat. A heterozigóta keresztezésből származó kiméra embrióknak csak 25 %-a lesz majd homozigóta mutáns (Hart et al. 2002).

4.3.4 Tetraploid kimérák

Egy ES sejt-tetraploid kimérában az ES sejtek elsősorban az epiblaszt eredetű szövetekhez járulnak hozzá, mivel a tetraploid embrió sejtjei főleg az extraembrionális primitív endoderma és a trofektoderma sejtjeit hozzák létre. Az ES eredetű és a tetraploid sejtek csaknem teljes szegregációja egy hatékony eszközt ad a mutáció hatásának feltérképezésére az embrionális és az extraembrionális szövetek közötti összehasonlításban.

Ezen túlmenően, mivel a magzatot tulajdonképpen kizárólag ES sejtek alkotják, a kimérák ezen típusában nagy számú ES sejt genotípusú embriót lehet létrehozni, így megkerülve a hosszadalmas mutáns egér tenyésztéses módszert. Végül az ES-tetraploid kiméra technika alkalmazása egy gyors eszközt jelenthet a gének működésének elemzéséhez.

Tetraploid egér embrió két-sejtes állapotú preimplantációs embrió blasztomerjeinek elektrofúziójával hozható létre. A fúziót követően a kapott egy-sejtes embrió követni fogja a normál osztódást, és az ezt követően két-sejtes állapotba jutott embrió sejtmagja duplán tartalmazza a diploid DNS tartalmát, tehát tetraploid lesz. A tetraploid embrió rendszerint

normál körülmények között eljut a blasztociszta állapotig, bár jelentősen csökken a sejtek száma (Tam & Rossant 2003). A TE és az ICM sejtszáma is lecsökken a tetraploid embriókban. A kimérák létrehozásánál nem egy tetraploid embriót használnak, hanem kettőt, néha hármat is. A kimérák ES sejt csomók és zóna pellucida mentes tetraploid embriók aggregációjával készíthetők, ezáltal a sikeres fejlődéshez megfelelő sejtszám érhető el (Ohta et al. 2008). Később a kimérákat beültethetik nőstény egerekbe, ahol ezek az embriók képesek továbbfejlődni, mivel a tetraploid trofektoderma sejtekből képződő trofoblaszt funkcionálisan megfelel a diploid sejtekből képződő trofoblaszt sejteknek.

A hagyományos megközelítés a gének funkciójának értékelésére a mutáns embriók és kifejlett egerek fenotípusának elemzése. A kiméra elemzés egyszerű kísérleti megközelítést kínál a fenotípus értékelésére (Tam & Rossant 2003).

Aggregáltatva négy-sejtes embrióból származó blasztomert egy befogadó embrióval, a megszületett állatok kizárólag a négy-sejtes embrióból származó blasztomertől származtak. A kiméra egerekben, a diploid és tetraploid sejtek együttesen vannak. A tetraploidok ($4n$) hozzájárulnak az egészséges magzathoz, de a $4n$ sejtek elsősorban az extra-embrionális szövetekre korlátozódnak. Tetraploid sejteket a legtöbb kimérában csak a méhlepény trofektodermájában, valamint a magzatburok endoderma rétegében találtak (Nagy et al. 2003). Ennek fényében később négy- és nyolc-sejtes embrióból származó egyedülálló blasztomereket aggregáltattak tetraploid embrióval, ami egészséges egereket eredményezett (Carstea et al. 2007).

A diploid-tetraploid embrió aggregációs kimérákat tipikusan fenotípusos elemzésre használják, mint például olyan esetekben, amikor indukált mutáció hatását szeretnék megvizsgálni (Tam & Rossant 2003).

4.3.5 Iker kimérák

A biológusok és a pszichológusok számára az iker vizsgálatok nagyon fontosak, hogy feltárják a betegségek hátterét, és megértsék benne a genetika szerepét, valamint a környezeti faktorokat, amelyek meghatározzák a fenotípust (Wongl et al. 2005).

Az iker-alapú epigenetikai öröklődés hipotézisét Gartner és társai több mint 30 évvel ezelőtt tesztelték (Gartner & Baunack 1981). Az identikus ikrek létrehozására elvben több módszer is alkalmazható, ide tartozik a klónozás, az embrió darabolása blasztomerenként valamint a kimérák létrehozása is (Bodó & Dinnyés 2005).

Az első klónozási kísérletek a 19. századra tehetőek. 1891-ben Hans Driesch szétválasztotta a tengeri sün két-sejtes embrió blasztomerjeit. A sejtek elkezdtek növekedni, és két önálló tengeri sün alakult ki belőlük (Driesch 1891). Hans Spemann 11 évvel később megismételte a kísérletet egy gerinces fajjal (szalamandra), és hasonló eredményt ért el (Spemann 1902). Azonban az, hogy nem állt a rendelkezésre hatékonyan alkalmazható eszköz, valamint az emlős petesejtek és embriók meghatározott hőmérsékletet és körülményeket igényelnek a preimplantáció előtt (Bavister 2002), akadályozta az eljárás alkalmazhatóságát majdnem 80 évig (Vajta & Gjerris 2006). Az embriók preimplantációs stádiumban rendkívüli regenerációs képességgel rendelkeznek. Egészséges magzat fejlődhet az embrió feléből vagy akár a negyed részéből is. Ez alapján alkalmazható az embriódarabolás módszere is. Az így létrehozott identikus ikrek már klónnak tekinthetők, mivel genetikailag teljesen azonos egyedek (Bodó & Dinnyés 2005).

Azonban a kezdeti lelkesedést követően rájöttek, hogy az eljárás nem lesz olyan hatékony, mint gondolták. A technikai nehézségek és a veszélyeztetett terhességek magas aránya miatt az eljárás nem volt teljes mértékben megfelelő. Még ha a technikai nehézségeket megoldották is, valamint a terhességi arány javult, akkor is megmarad az a probléma, hogy az embriókat csak egyszer vagy kétszer lehet feldarabolni, és így mesterségesen csak kettő vagy négy genetikailag azonos utód hozható létre (Vajta & Gjerris 2006).

Bár az emlősök aszexuális reprodukciója a természetben nem fordul elő, az emlősöknél genetikailag azonos egyedek, egypetűjű ikrek előfordulhatnak. Ezek azonban nem tekinthetők klónnak, mivel nem ivartalan szaporodás eredményei, valamint ők megosztják genetikai anyagukat (a mesterségesen előállított klónok csak a mag DNS osztják meg, a mitokondriális DNS különbözik).

Az első sikeres sejtmag átültetéshez emlősöknél embrióból származó sejteket, blasztomereket használtak donorként. Ekkor sejtmagjától megfosztott zigótába jutatták be a korai embrionális sejteket. Később a zigóta helyett petesejtet használtak, ami jelentős áttörést jelentett, és megszülethetett az első klónozott emlősállat (Vajta & Gjerris 2006).

Több lehetőség is van a klónozásra, ezek közül a legígéretesebb a sejtmag-átültetés, de ezen kívül lehetséges a sejt kultúrákból származó sejtekből való klónozás is. A klónozás tekintetében a kezdeti eredmények nem voltak biztatóak, de aztán juhban és szarvasmarhában jelentős sikereket értek el (Bodó & Dinnyés 2005).

Az egér két-sejtes embriójának egy sejtje képes felnőtt egérré fejlődni. Tarkowski tanulmányából kiderült, hogy két-sejtes embrióból izolált egyedüli blasztomer képes életképes állattá fejlődni, ha tetraploid embrióval aggregáltatjuk. Más kutató csoportnak is sikerült identikus iker állatokat létrehozniuk (Carstea et al. 2007). Továbbá arról is beszámoltak, hogy nem csak nyolc, hanem tizenhat-sejtes embrió egy blasztomerjét aggregáltatva tetraploid embrióval szintén lehetséges az ikrek létrehozása (Tarkowski et al. 2005).

Az egypetéjű ikreknek azonos kromoszómális DNS szekvenciájuk van, kivéve a nagyon kis hibákat a replikációt követően a négy- és nyolcsejtes zigóta állapotban (Wongl et al. 2005).

Ellentétben a sejtmag átültetési klónozással, ahol mitokondriális (MT) heterogenitás mutatható ki a klónozott állatokban, a tetraploid kiméra embrió előállítási technika segítségével (Nagy et. al, 1990) létrehozott iker egerek mind mitokondriális, mind pedig a sejtmagi DNS tekintetében azonosak lesznek egymással. Az MT DNS számos fontos szabályozó elemet tartalmaz, és fontos az MT DNS és a genomi DNS összehangolt együttműködése is, így a klónozott embriók esetében kapott MT heterogenitás rendellenes fejlődést eredményezhet. Ez a probléma az tetraploid komplementációs technológiával létrehozott iker egerek esetében nem áll fenn (Carstea 2007).

Képesek voltak létrehozni egykétet, ikreket vagy akár tripleteket is, tizenhat-sejtes embrió egyetlen külső és belső sejtjeiből, valamint nagy ritkán harminckét-sejtes embrió egyetlen sejtjéből kiindulva, tetraploid embrióval aggregáltatva. Habár módszertanilag nehéz bizonyítani, hogy minden belső és külső sejt pluripotens, tetraploid komplementációs technikát alkalmazva egyértelmű választ kaptak erre. Sikerült igazolni, hogy a donor blasztomerek utód sejtjei mind a három fejlődési irányban megtalálhatóak, azaz az epiblasztban, a primitív endodermában és a trofektodermában (Tarkowszki et al. 2010).

Az identikus ikrek létrehozásának egyik jelentősége, hogy nagy értékű genotípusok gyors elszaporítása válik lehetővé ezáltal (Bodó & Dinnyés 2005).

4.4 Transzkripció faktorok

A transzkripció faktorok (TF) szabályozó elemek, amelyek szekvencia specifikus DNS-kötő faktorok. A genetikai információ DNS-ről mRNS-re történő átíródását szabályozzák. Funkciójukat tekintve lehetnek aktivátorok (=gének expresszióját serkentik) vagy represszorok (=gátolják a gén expressziót) azáltal, hogy befolyásolják az RNS polimeráz transzkripciót iniciáló komplexhez való kötődését.

4.4.1 Transzkripció faktorok az egér embrióban

A belső sejt csomóban olyan transzkripció faktorok expresszálódnak, mint az OCT4, SOX2 és NANOG, míg a trofektodermában egy másik transzkripció faktor a CDX2 expresszálódik.

Az egerek esetén a korai fejlődés molekuláris mechanizmusa jól ismert. Ebben OCT4 a CDX2, NANOG és a GATA6 transzkripció faktorok játszanak kulcsfontosságú szerepet. Bár az OCT4 és CDX2 kölcsönösen gátolják egymás expresszióját, mindkét transzkripció faktor detektálható a nyolc-sejtes embrió nukleuszában.

Mielőtt a PE kialakul, annak prekurzoraiban detektálható a NANOG és a GATA6 expresszió, majd a NANOG pozitív sejtek lesznek az epiblaszt, a GATA6 pozitív sejtek pedig a PE sejtek. Úgy tartják, hogy ezen prekurzorok mozaikos eloszlása függ a GRB2-RAS-MAP kináz jelátviteltől, ami a GRB2 inaktiválódását eredményezi. Ez a NANOG expressziójának megnövekedéséhez vezet az ICM minden sejtjében, valamint a GATA6 expressziójának elvesztéséhez.

Embrionális őssejtek, amelyekben a GATA6 vagy egy közeli családtag a GATA4 expresszálódik PE sejtekké fejlődnek, míg ES sejtek, amelyekben gátolt a GATA6 és a GATA4, nem fejlődnek zsigeri endodermává (*in vitro* differenciálási kísérletekben, vagyis embrionális sejt kultúrákban).

Egér embriókban, amelyekből hiányzik a NANOG, fejlődik PE és TE, de nem alkotnak epiblasztot, valamint a NANOG expresszió megszűnése az ES sejtekben az extraembrionális endoderma sejtek pusztulásához vezet. A rágsálók epiblasztjának kialakulását két szegregációs esemény határozza meg, melyeket az OCT4 és a NANOG expresszió szintje befolyásol. Míg a CDX2 expressziója meghatározza a trofektodermát, a GATA6 expressziója a primitív endodermát (Nakai-Futatsugi & Niwa 2013).

4.5 Inhibitorok hatása

A különböző inhibitorok a transzkripció faktorokra hatnak, gátolják azok működését az egér embrió sejtjeiben. Két specifikus inhibitor PD0325901 és CHIR99021 (más néven 2i) lehetővé tette, hogy patkány embriókból is létre lehessen hozni olyan embrionális őssejt vonalat, amiből ivarsejt kimérák is előállíthatóak voltak.

PD0325901 hat a fibroblaszt növekedési faktor (FGF) jelátviteli útra, célzottan a mitogén-aktivált protein kináz / extracelluláris szignál-regulált kinázra (MAPK / ERK kináz

vagy MEK), melyek blokkolják a differenciálódást. CHIR99021 gátolja a glikogén szintáz kinázt (GSK3b), ezáltal aktiválja a Wnt jelátviteli útvonalat, amely fontos szerepet játszik az önmegújulásban.

Egyéb kis molekulákról is kimutatták, hogy elősegítik az embrionális őssejtek megújulást. Például 3 inhibitor kombinációja elősegítette az ES vonalat C57Bl/6N egér törzsből származó embriókból is. Megállapították, hogy a LIF, a PD98059 és a BIO ötszörösére növeli az mESC vonalak alapítási hatékonyságát.

Vannak hasonló kis molekulák, melyek megváltoztatják a sejtek sorsát a preimplantációs fejlődés során. *In vitro* egér embriók tenyésztése 2i-ben befolyásolja az egér embriók ICM-jét, amelynek következtében minden sejt NANOG pozitív és GATA4 negatív lesz, vagyis gátolja a hipoblaszt képződés. Yamanaka munkája is alátámasztja azt, hogy az egér blasztocisztában a PE és az EPI rétegek szegregációjában az FGF jelátvitel szerepet játszik, egyben igazolta, hogy az FGF/MAPK jelátvitel befolyásolja a PE és az EPI vonalak specifikációját (Van der Jeught et al. 2012).

Azt is leírták, hogy az EPI sejtek száma az elsődleges, egyben limitáló tényező a sikeres embrionális fejlődéshez. Az extracelluláris kis molekulás inhibitorok (2i) megakadályozzák a PE képződését és növelik az EPI sejtszámot, aminek segítségével a jövőben elképzelhető lehet iker egerek előállítása (Morris et al. 2012).

5. Módszerek

5.1 Donor embrió genotípus hatásának vizsgálata

5.1.1 Felhasznált egértörzsek

A kísérleteink során különféle egértörzsekkel dolgoztunk az Állatbiotechnológiai Intézetnél. Ezek a CD1, C57B1/6, C57Bl/6 albino, EGFP/CD1 voltak, amelyek a legáltalánosabban használt törzsek az embriológiai kutatásoknál. Az embriók kezelése mind a négy egértörzsnél ugyan úgy történt.

Az embriók kinyerése során szuperovuláltatott egereket használtunk. A nőstény állatok tüszőérésének mesterséges serkentésével lehet nagyszámú petesejtet nyerni, melyhez hormonkezelést kellett alkalmazni. Az egészséges és megfelelő életkorú (8-10 hetes) nőstény egyedek kiválasztása után, PMSG (vemhes-kanca szérum gonadotropin) hormonnal kezelve többszörös tüszőérés következik be. Az injekciót követő második napon a tüszők repedését hCG (humán korion gonadotropin) hormonnal indukáljuk. Az ovulált petesejtek a petevezetőből moshatók ki. A nőstényeket a hCG injekciót követően pároztattuk. A párosodást ellenőriztük a következő nap délelőtt a hüvelyben, a Cowper-mirigy váladékának megjelenésével (plug vagy hüvelydugó képződés).

5.1.2 Eszközök

- Sztereo mikroszkóp(ok)
- Inkubátor (37°C, 5%CO₂)
- Sejt fúziós eszköz CF-150B 250µm-es réstávolságú platina elektródákat tartalmazó kamrával, aggregációs tű DN-09
- Steril Petri-csészék (35, 60, 100mm), tenyésztő edények.
- Steril 1ml-es fecskendő, tűk. Az öblítő tűt ki kell öblíteni 70%-os etanollal használat előtt és után.
- Bunsen vagy alkoholos égő az embrió-manipulációs pipetták húzásához.
- Embrió-manipulációs pipetták: Láng fölött kézzel készült és tört Pasteur pipetták, az embrió manipulációhoz, amelyeknél a kapilláris átmérője valamivel nagyobb, mint az embrióké. Fontos volt, hogy leégessük a pipetta hegyét, mert könnyen kárt okozhat a zóna mentes embriókban. Embrió-manipulációs pipetták csatlakoznak egy latex csövön keresztül egy szívó fűvókához. Ilyen szájjal irányítható pipetta használható

minden embrió manipulációhoz és embrió visszajutathoz. Újjal irányítható pipettát is használnak az embrió manipulációhoz.

- Sebészeti eszközök; éles, finom, hegyes ollók, finom csipeszek, egyenes vagy hajlított fogazott csipesz, sebkapcsok.

5.1.3 Két-sejtes embriók begyűjtése

Az kísérletekhez valamint a tetraploid embriókhoz kétsejtes állapotban lévő embriókat gyűjtöttünk az egerek petevezetőjéből. A kétsejtes embriók begyűjtése a megtermékenyítést követő 2. napon történt.

Mielőtt kivágtuk a vemhes nőtények petevezetőjét, elő kellett készíteni az eszközöket és anyagokat, amelyeket használni akartunk. Az M2 médiumot szobahőmérsékletre tettük, elő készítettünk tenyésztő edényeket a KSOM-AA médiumnak, valamint az olajnak, majd embrió manipulációs pipettát húztunk (kapilláris pipetta).

A vemhes nőtényből kivágtuk a petevezetőt, majd M2 cseppekbe helyeztük őket. Az embrió donorok cervikális diszlokációját követően az embriók tenyésztő edénybe helyezésének a lehető legkevesebb idő alatt meg kell történnie, így mi is erre törekedtünk a munkánk során (ideálisan ne legyen több mint 20-30 perc). Ez különösen fontos a kétsejtes embrióknál mivel azok érzékenyebbek, mint a morula állapotú embriók. Nem szabad több donor nőtényt boncolni, mint amennyit kezelni tudunk 20, maximum 30 perc alatt (kb.6-8 egér).

A petevezetők kivágása után, egy petevezetőt egy kis csepp M2 médiumba helyeztem. A boncoló mikroszkóp alatt az öblítő tűt, amelyhez 1ml-es M2-vel töltött fecskendő volt kapcsolva, a petevezető tölcsér alakú nyílásába (infundulumba) helyeztem, majd óvatosan betoltam az öblítő tűt, és egy csipeszt használva a megfelelő pozícióban tartottam azt. Az M2-médiumot a petevezetőbe juttattam, ezáltal a petevezető duzzadása volt megfigyelhető.

Ezt folytattam a maradék petevezetővel, amiket az embrió kimosás idejére M2 médiumban tartottam.

Összegyűjtöttem az embriókat húzott manipulációs pipettával, majd néhány tiszta médium cseppen keresztül mostam azokat, hogy megszabaduljanak az összes törmeléktől.

Az embriókat néhány KSOM-AA médium cseppen keresztül mostam, végül a tenyésztő cseppekbe tettem, és az inkubátorba helyeztem azokat.

5.1.4 Nyolc-sejtes embrió begyűjtése

Hasonlóan történt a nyolc-sejtes embriók begyűjtése, mint a kétsejtes embrió mosása, csak ebben az esetben, az egérből a petevezetővel együtt a méhet is kivágtuk, mert előfordulhat, hogy az embrió, a fejlődés során már lejutott a méhbe.

Ebben az esetben először a méhet mostam át, majd a méh eltávolítása után külön a petevezetőt is átmostam.

5.1.5 Tetraploid embriók létrehozása

5.1.5.1 Eszközök és reagensek

- Boncoló mikroszkóp(ok)
- 0.3 M mannitol
- Impulzus generátor (Sejt fúziós eszköz CF-150B) és 250 µm elektróda kamra
- M2 médium
- KSOM és embrió által kipróbált ásványi olaj, 35mm szövet tenyésztő edényekben, inkubátor (5% CO₂, 37°C-on).

Módszer

1. Be kellett állítani az impulzus generátort a megfelelő egyenáram és váltóáram feszültségre és a megfelelő impulzus időtartamra. Az aktuális paraméterek eltérőek lehetnek, és függenek a donor embriók genotípusától, így ezeket meg kellett határozni a kezdő/próba kísérletben. A cél elérni az embriók 90%-ának lízis nélküli fúzióját. Egyenáramú pulzus alkalmazásával lehet elérni, hogy a blasztoméra síkjával párhuzamosak legyenek az elektródák. Az állítható 1 MHz váltóáram tartomány lehetővé teszi az embriók csoportjának megfelelő elrendezését az oldatban a túl nagy váltóáram lízist okozhat. Az alap protokoll alapján az ICR embriók fuzionáltatását 250 µm-es kamrákban végeztük és 1-2 egyenáram impulzust használtunk 30 V-on és 40 mikro szekundum alatt, valamint 1-2 V váltóáramot az eligazításhoz.
2. Egy elektróda kamrát tartalmazó 100mm-es Petri-csészét kellett tenni egy sztereo mikroszkóp alá, és a kábeleket a pulzus generátorhoz kellett csatlakoztatni.
3. Két csepp M2 médiumot és egy csepp mannitol oldatot kellett rakni az edénybe körbe az elektróda kamrán, ezeket a cseppeket kellett használni az embriók lemosásához. Ha ugyanazt a mikroszkópot használjuk a mosásra és a fúzióra is, ajánlott, hogy

megakadályozzuk, hogy az elektróda kamra elmozduljon az edényben. Mannitol cseppet tettünk az elektróda kamrára.

4. 25-30 kétsejtes embriót átmostunk mannitol cseppben gyors le és föl pipettázással. Az embriókat mannitol cseppben helyeztük az elektróda közé, ekkor az embriók többségének iránya helyesen volt. Azokat az embriókat, amelyek nem voltak megfelelő orientációban megfelelő pozícióba mozgattuk a váltó áram segítségével.
5. Amikor az összes embrió megfelelő helyzetben volt, meg kellett nyomni a gombot a fúziós impulzus alkalmazásához.
6. Áttettük az embriókat az M2 cseppbe.
7. Mostuk az embriókat KSOM cseppeken keresztül, majd áthelyeztük őket KSOM mikro-cseppes tenyésztőedényben a médiumba, olaj alá és betettük a termosztátba (37°C, 5%CO₂).
8. Nagyon fontos volt, hogy a fuzionált embriókat új cseppbe helyezzük. Mivel az embriók közel vannak a második mitotikus osztódáshoz, a sikeresen fuzionált és osztódott tetraploid embriók összetéveszthetők nem fuzionált diploid kétsejtes embriókkal. Néha az egyik blasztomer lizálhat fúzió közben, ezeket az embriókat nem használjuk fel a további kísérletekben.
9. Optimális körülmények között az ICR embriók 80%-a fuzionál az alkalmazott impulzust követő 10-30 percben. A fuzionált embriókat egy éjszakán át tovább tenyésztettük a kísérlet folytatását megelőzően.

5.1.6 Preimplantációs embrió tenyésztő médium és reagensek

Az M2 és KSOM médiumot nem szabad tovább használni, mint 2 hét. A médiumot készen is meg lehet venni, de előállítható frissen is a protokollban leírt törzsoldatokat felhasználva. A víz minősége nagyon fontos! Egy rendszeresen karbantartott Milli-Q szűrőrendszeren átszűrt víznek kell lennie. A kereskedelemben elérhető ultra tiszta víz (embriótenyésztésre alkalmas = embrió víz) is használható alternatív megoldásként. Eldobható műanyag eszközt vagy tiszta, üveg eszközt használunk. Az üveg eszközöket soha nem szabad szerves oldószerekkel vagy savas, lúgos tisztító szerekkel mosogatni. A kísérletekben felhasznált vegyszereknek a legjobb minőségűeknek kell lennie (embrió- vagy sejtenyésztésben teszteltnek).

Az embriókat szervtenyésztő edényben tenyésztettük (rövid távon) vagy tenyésztő médium mikro-cseppjeiben embrió által bevizsgált ásványi olajjal fedve. A zigóták többsége blasztociszta stádiumig is képes fejlődni megfelelő tenyésztési körülmények között. Az

embriók nem tolerálják a pH és a hőmérsékletváltozást. A donor embriók feldolgozása és az embriók tenyésztő edénybe helyezése közötti minimális idő hozzájárul a sikeres embriótenyésztéshez.

Az M2 egy HEPES-pufferelt médium, ezt használtuk embriógyűjtéshez és más manipulációkhoz termosztáton kívül. M2 törzsoldatokat 4 °C-on tároltuk. A felhasználás előtt szobahőmérsékletűre melegítettük azt. Az embriók nem tarthatóak hosszabb ideig M2-ben és jól le kell öblíteni ekvibrált tenyésztő médium cseppen keresztül az inkubátorba helyezés előtt. Hagyományosan M2 médiumot használtunk az embrió manipulációhoz az inkubátoron kívül, azonban az M2 helyettesítésére használható más HEPES-pufferelt sejttenyésztő médium is.

KSOM egy nátrium-hidrogén-karbonát-pufferelt médium, ezt használtuk embriótenyésztéshez. A KSOM médium esszenciális és nem esszenciális aminosavakkal való kiegészítésével kapcsolatban kimutatták, hogy javít az embrió *in vitro* fejlődésén. A KSOM-AA törzsoldatot 4 °C-on kell tárolni. Ideális frissen készíteni a médiumot. A legfontosabb tenyésztő médiumoknak gáz-ekvibrálnak kellett lenniük. Embrió-vizsgált ásványi olajt kellett használni, a tenyésztőmédiumból készített mikro-cseppek beborításához.

5.1.7 Aggregáció

5.1.7.1 Az aggregációt előkészítő lemez

- KSOM-AA médiummal töltött fecskendővel mikro-cseppeket helyeztünk (~3mm átmérőjű vagy 10-15µl) egy edénybe. Mi általában 4 cseppet helyeztünk az edény közepére. Ezután azonnal fedtük a cseppeket „embrió-tesztelt” ásványi olajjal, és inkubátorba helyeztük. Előkészítettük a Petri-csészét az aggregációt megelőzően.
- Az aggregációs tűt 70%-os etanollal kellett mosni. A tűt a műanyagba nyomva, körkörös mozdulatokkal kis mélyedést kellett készíteni. A cél az volt, hogy létrehozzunk egy olyan mélyedést, ami elég mély ahhoz, hogy az aggregátum kívánt embriók ne ússzanak ki a mélyedésből még akkor sem, ha mozog a Petri-csésze az inkubátorban. A mélyedéseket úgy kellett körbe tenni, hogy nagyjából félúton a csepp közepe és csepp széle között legyenek, így ebben az esetben a levegő buborékoktól az embriók láthatóak maradtak. Érdemes 4-5 mélyedést készíteni cseppenként.
- Az aggregációs Petri-csészét az inkubátorban tartottuk, amíg szükséges volt.

5.1.7.2 Zóna eltávolítás

Annak érdekében, hogy a két embriót össze tudjuk tenni aggregáltatni, el kellett távolítanunk az embriókat körülvevő zóna pellucidát. Acid Tyrod's savas oldatot használtunk, hogy eltávolítsuk a glikoprotein membránt. Fontos volt, hogy az átvitelnél minimális oldat mennyiség legyen a cseppek között, és többször átmoszuk. Így csak 5-10 embriót kezeltünk egy alkalommal.

- Néhány M2 médium és Acid Tyrod's cseppet helyeztünk 100 mm-es Petri-csészébe. Hogy elkerüljük a műanyaghoz tapadást, a szövettenyésztő lemez fedelét használtuk.
- Felszedtünk 20-50 embriót minimális médium mennyiséggel, és átmostuk őket egy savas cseppen keresztül. Az embriókat ezután egy friss savas cseppbe jutattuk. Az embriókat pipettázással mostuk, és figyeltük a zóna feloldódását. Fontos volt, hogy leégyessük a pipetta hegyét, mivel a zóna-mentes embriók könnyen megsérülhetnek az éles végétől.
- Amint a zóna pellucida eltűnt, a zóna-mentes embriókat minimális mennyiségű savval M2 médium cseppbe jutattuk. Átöblítettük az embriókat néhány csepp M2-n keresztül.
- Ezt a folyamatot csináltuk végig a többi embrióval is.
- Majd az embriókat néhány csepp ekvibrál KSMO-AA-n keresztül mostuk; végül áthelyeztük őket egyesével aggregációs Petri-csészébe.

5.1.7.3 Aggregátum összeállítása

Az aggregáltatás a zóna eltávolítása után az általunk készített mélyedésekben történt. Miután a nyolc-sejtes embrióról eltávolítottuk a zóna pellucidát, egy különleges kapilláris pipettával blasztomerekre bontottuk, majd egy, kettő, vagy három blasztomert helyeztünk a mélyedésbe. Ezt követően melléjük helyeztünk egy korábban elkészített tetraploid embriót, majd inkubátorba helyeztünk őket 24 órára.

5.1.8 Embrió transzfer

Az aggregációt követő napon, leellenőriztük, hogy az embriók összeálltak és a megfelelő fejlődést követték. Ha minden megfelelően történt, az embriók visszaültethetők voltak álvemhes nőtényekbe. A transzfer során mind a két méhszarvba ültettünk, mert az egerekben normál körülmények között mind a két méhszarvba fejlődik magzat. Segítőként úgynevezett „helper”embriókat is alkalmaztunk, hogy elérjük az optimális embrió számot, ami a beágyazódott embriók továbbfejlődéséhez szükséges.

5.2 Inhibitoros kísérletek

5.2.1 A kísérlet menete

A vizsgálatok során kétféle egértörzzsel dolgoztunk, ezek a CD1 és a C57Bl/6 voltak. Az embriókat két-sejtes állapotban mostuk ki, a megtermékenyítést követő második napon. A kimosást követően az embriókat kettéosztottuk, majd kétféle médiumba helyeztük őket. Az egyik a kontroll, ami ebben az esetben KSOM, vagyis egyszerű embriótenyésztő médium volt, a másik pedig frissen készített két inhibitoros médium. Inkubátorba helyeztük azokat, és figyeltük a továbbfejlődésüket, majd mikor elérték a blasztocisza állapotot, fixáltuk és immunfestettük őket.

5.2.2 Két-inhibitoros médium készítése

Felhasznált anyagok:

- KSOM
- inhibitorok: PD0325901

CHIR99021

500 μ l KSOM-hez hozzáadtam 3 μ l CHIR99021 és 1 μ l PD0325901 inhibitort, és ezt a 20-szorosára hígítottam. Majd 3 cm-es Petri-csészére 15 μ l-es cseppeket helyeztem, melyet 3x700 μ l ásványi olajjal fedtem. Ezekbe a cseppekbe került bele az embriók fele a kontroll médiummal szemben.

5.2.3 Immunfestés

Puffer oldatok

1. puffer: AW-PBS 100 ml, BSA 1g
2. puffer: 45 ml 1. puffer, FCS 5 ml
3. puffer: 2. puffer 25 ml, TRITON-X 25 μ l
4. puffer: AW-PBS 10 ml, BSA 0,05g
5. puffer: AW-PBS 9 ml, BSA 0,01g, FCS 1ml

Az embriókat PBS-el mostuk először. Ezután 4 % PFA (SIGMA)-val 20 percig fixáltuk, majd ismét PBS-el mostuk 3x5 percig. 3-as vagy 5-ös pufferrel végeztünk blokkolást 45 percen keresztül (3. puffer $\rightarrow$ OCT4, NANOG esetén; 5. puffer $\rightarrow$ SSEA1 esetén)(R&D System, SC009 protokoll). A blokkolás lejártaival 30 μ l, az 1. Pufferben feloldott elsődleges

ellenanyag cseppekbe helyeztük az embriókat. A cseppeket egy éjszakára párás körülmények közé helyeztük, és 4°C-on tároltuk. A következő napon háromszor mostuk, 5-5 percig 1. pufferben, majd hozzáadtuk a másodlagos ellenanyagot (30 µl), és 60 percig hagytuk hatni. Kontrollhoz 1. puffert használtunk. A tárgylemezeket óvatosan leittattuk, mostuk PBS-ben, majd 1. pufferben 5 percig, majd Hoechst (SIGMA) festékkal festettük (5 µg/ml) 10 percig. A festés után háromszor mostuk 1. pufferben 5-5 percig. Ezt követően MQ vízben öblítettük le a fedőlemezeket, majd 10 µl-es VECTA SHIELD (Vector Lab.) cseppekbe ágyztuk azokat.

Az immunfestéshez kecske poliklonális anti egér OCT4 (Santa Cruz (1:200), és monoklonális egér SSEA-1(M480) (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City (1:100)), mint elsődleges ellenanyagot használtunk. FITC- konjugált anti-egér IgM és FITC konjugált anti kecske IgG (mindkettő Jackson Immuno Research Company (1:400)) volt a másodlagos ellenanyag. A mintákat Olympus IX-71 inverz mikroszkópot használva fotóztuk, illetve értékeltük ki. Az OCT4 festés esetében konfokális mikroszkópos felvételeket is készítettünk (Zeiss, LSM700).

5.2.4 Állatkísérleti szabályok

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

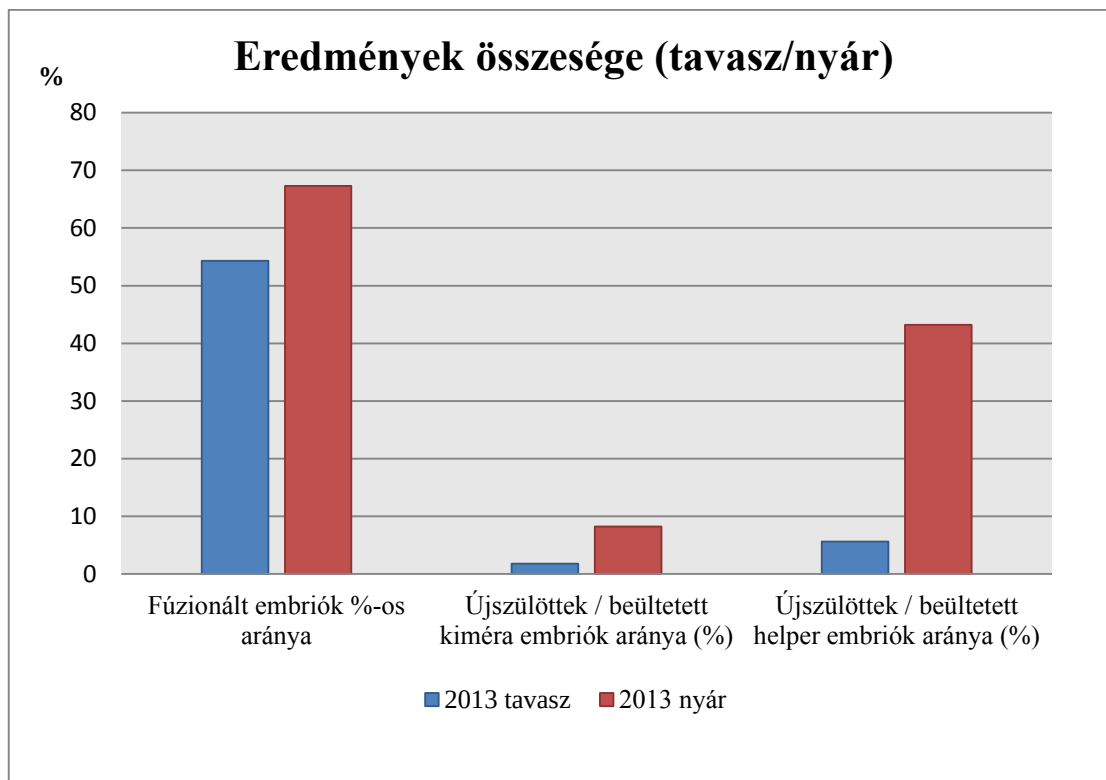
6. Eredmények

6.1 Iker kimérákkal végzett kísérletek eredményei

A tetraploid gazda embriókat CD1 és C57Bl/6 típusú egértörzsből származó embriókból hoztuk létre. Az aggregáltatásnál a tetraploid gazda embriók mellé donor embriók blasztomerjeit helyeztük. A blasztomer donor embriók EGFP/CD1 és C57Bl/6 genotípusú egértörzsből származtak. A donor embriókat minden esetben nyolc-sejtes állapotban használtuk. Ezekből a blasztomerekből többféle módon készítettünk kimérákat. A blasztomereket felhasználva egyetlen embrióból négy, illetve két kiméra embriót állítottunk össze, úgy hogy a nyolc-sejtes donor embrió blasztomerjeit (2-2 blasztomert vagy 4-4 blasztomert) a gazda tetraploid embriók mellé tettük. Majd ezeket a kiméra embriókat másnap visszaültettük recipiens nőtényekbe. A visszaültetésnél helper embriókat is alkalmaztunk.

1. táblázat: A két kísérleti időszakban kapott eredmények összeglése

Kísérletek	Tavaszi (2013)	Nyár (2013)	Összesen 2013
Hormon kezelt nőtények száma	366	145	511
Plag+ donor nőtények száma	229	83	312
Recipiens nőtények száma	86	23	109
Kimosott embriók száma	1165	501	1666
Az elektroporáció során felhasznált kétsejtes embriók száma	523	196	719
Fúzionált tetraploid embriók száma	284	132	416
Fúzionált embriók %-os aránya	54,3	67,3	57,9
Beültetett kimérák száma	56	49	105
Beültetett helper embriók száma	125	74	199
Beültetett kiméra embriókból származó újszülöttek száma	1	4	5
Újszülöttek /beültetett kiméra embriók aránya (%)	1,8	8,2	4,8
Beültetett helper embriókból származó újszülöttek száma	7	32	39
Újszülöttek / beültetett helper embriók aránya (%)	5,6	43,2	19,6
Felszívódások száma	30	33	63
Felszívódások / beültetett embriók aránya (%)	16,6	26,8	20,7



5. ábra: A tavasszal, illetve nyáron végzett kísérletek eredményeinek bemutatása

Az iker kísérletek két különböző periódusban zajlottak. Az első periódus tavasszal (január-május), míg a második nyáron (júliusban) volt. Összesen 511 nőtény egeret oltottunk (tavasz: 366, nyár: 145), ebből a donor nőtények száma 312 volt (tavasz: 229, nyár: 83), a beültetett embriók száma pedig 1666 (tavasz: 1165, nyár: 501) (1. táblázat).

A fuzionált embriók aránya (tavasz 54,3%, nyár 67,3%), a sikeres beültetések száma (tavasz 16,6%, nyár 26,8%) és a megszületett egerek aránya nyáron jóval magasabb volt, mint a munka első felében (tavasz 1,8 %, nyár 8,2%) (1. táblázat, 5. ábra). A nyáron elért jobb eredmények részben annak is köszönhetőek, hogy nagyobb gyakorlatot szereztünk addigra a kiméra előállításban, de szerepet játszott az is, hogy nyáron optimálisabb volt az egerek reprodukciós fázisa.

Az iker kimérák létrehozása során, különböző genotípusú donor embriók blasztomerjeit aggregáltattunk tetraploid embriókkal. A nyolc-sejtes donor embrió blasztomerjeit különböző módon osztottuk fel az aggregáltatáshoz. Létrehoztunk kimérát C57Bl/6 egértörzs használatával úgy, hogy az embrió blasztomerjeit négy, illetve két részre osztottuk, majd ezt követően tertaploid embrió mellé helyeztük azokat. Az EGFP/CD1 egér törzsből származó embriók esetében a blasztomereket csak két részre osztva alkalmaztuk.

2. táblázat: Négy, C57Bl/6 genotípusú donor embrióból származó iker embriók beültetését követően kapott eredmények összeggzése

Donor embrió genotípusa	Beültetett kiméra embriók száma	Beültetett helper embriók száma	Beültetett kiméra embriókból származó újszülöttek száma	Beültetett helper embriókból származó újszülöttek száma	Újszülöttek / beültetett kiméra embriók aránya (%)	Újszülöttek/ beültetett helper embriók aránya (%)
C57(2bl)	4	3	0	0	0,0	0,0
C57(2bl)	3	5	0	0	0,0	0,0
C57(2bl)	3	4	0	2	0,0	50,0
C57(2bl)	3	1	1	1	33,3	100,0
C57(2bl)	4	4	0	0	0,0	0,0
C57(2bl)	4	4	0	0	0,0	0,0
C57(2bl)	4	6	0	0	0,0	0,0
C57(2bl)	3	5	0	0	0,0	0,0
C57(2bl)	3	4	0	0	0,0	0,0
C57(2bl)	2	4	0	0	0,0	0,0
C57(2bl)	2	5	0	2	0,0	40,0
C57(2bl)	4	5	0	0	0,0	0,0
C57(2bl)	2	2	0	0	0,0	0,0
C57(2bl)	3	4	0	0	0,0	0,0
C57(2bl)	4	0	0	0	0,0	0,0
C57(2bl)	4	0	0	0	0,0	0,0
C57(2bl)	3	3	0	0	0,0	0,0
C57(2bl)	3	3	0	0	0,0	0,0
C57(2bl)	4	4	0	0	0,0	0,0
C57(2bl)	4	5	0	0	0,0	0,0
összegzés	66	71	1	5	1,5	7,0
átlag	3,30	3,55	0,05	0,25	1,7	9,5
SD	0,73	1,67	0,22	0,64	7,5	25,4

3. táblázat: Kettő, C57Bl/6 genotípusú donor embrióból származó iker embriók beültetését követően kapott eredmények összeggzése

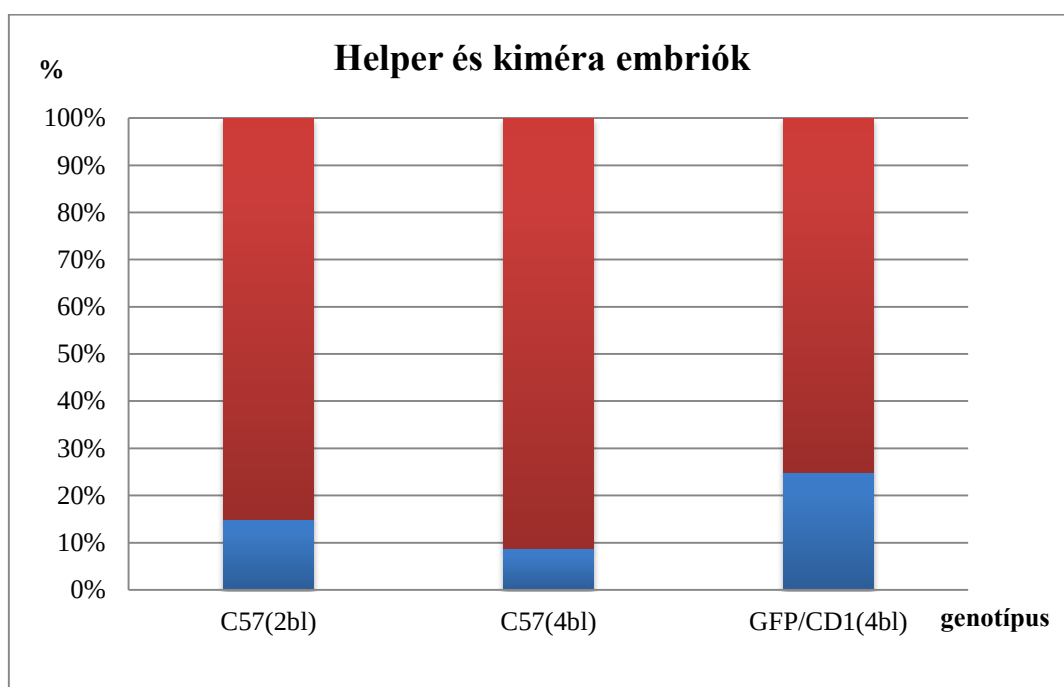
Donor embrió genotípusa	Beültetett kiméra embriók száma	Beültetett helper embriók száma	Beültetett kiméra embriókból származó újszülöttek száma	Beültetett helper embriókból származó újszülöttek száma	Újszülöttek/ beültetett kiméra embriók aránya (%)	Újszülöttek/ beültetett helper embriók aránya (%)
C57(4bl)	2	3	0	0	0,0	0,0
C57(4bl)	2	3	0	1	0,0	33,3
C57(4bl)	2	7	0	0	0,0	0,0
C57(4bl)	4	6	0	1	0,0	16,7

C57(4bl)	2	6	0	0	0,0	0,0
C57(4bl)	2	3	0	0	0,0	0,0
C57(4bl)	2	5	0	1	0,0	20,0
C57(4bl)	2	5	0	0	0,0	0,0
C57(4bl)	4	6	0	3	0,0	50,0
C57(4bl)	4	4	0	2	0,0	50,0
C57(4bl)	4	4	0	0	0,0	0,0
C57(4bl)	1	2	0	1	0,0	50,0
C57(4bl)	4	8	0	2	0,0	25,0
C57(4bl)	4	7	1	2	25,0	28,6
C57(4bl)	4	8	0	3	0,0	37,5
C57(4bl)	4	6	0	3	0,0	50,0
C57(4bl)	4	5	1	4	25,0	80,0
C57(4bl)	4	6	0	2	0,0	33,3
C57(4bl)	4	4	0	0	0,0	0,0
C57(4bl)	4	4	0	2	0,0	50,0
C57(4bl)	4	4	0	0	0,0	0,0
C57(4bl)	4	4	0	0	0,0	0,0
C57(4bl)	4	2	0	0	0,0	0,0
összegzés	75	112	2	27	2,7	24,1
átlag	3,26	4,87	0,09	1,17	2,2	22,8
SD	1,05	1,74	0,29	1,27	7,2	24,0

4. táblázat: Két, EGFP/CD1 genotípusú donor embrióból származó iker embriók beültetését követően kapott eredmények összegzése

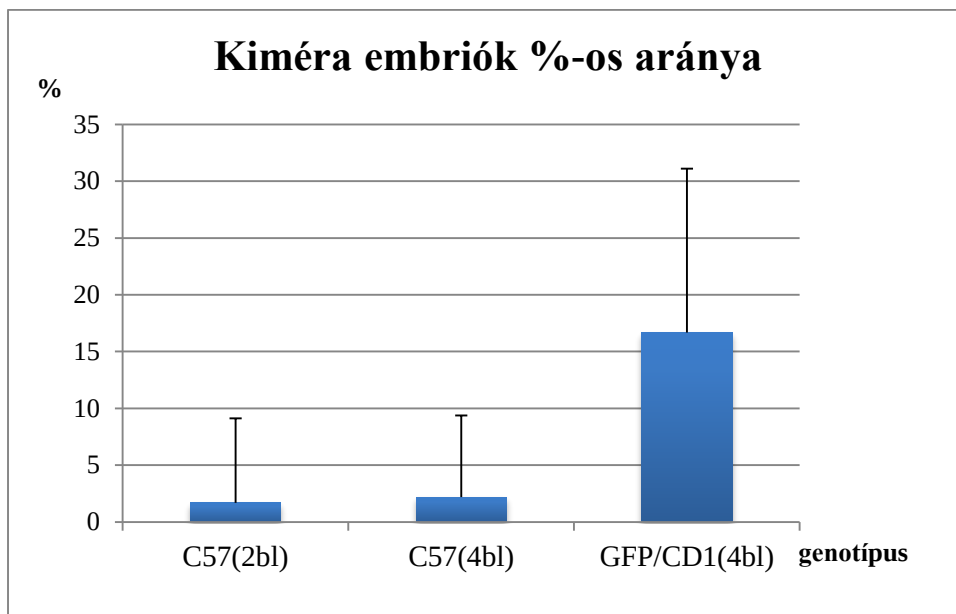
Donor embrió genotípusa	Beültetett kiméra embriók száma	Beültetett helper embriók száma	Beültetett kiméra embriókból származó újszülöttek száma	Beültetett helper embriókból származó újszülöttek száma	Újszülöttek/beültetett kiméra embriók aránya (%)	Újszülöttek/beültetett helper embriók aránya (%)
GFP/CD1(4bl)	4	6	1	6	25,0	100,0
GFP/CD1(4bl)	4	6	1	3	25,0	50,0
GFP/CD1(4bl)	4	4	0	0	0,0	0,0
összegzés	12	16	2	9	16,7	56,3
átlag	4,00	5,33	0,67	3,00	16,67	50,00
SD	0,00	1,15	0,58	3,00	14,43	50,00

Az eredményeink azt mutatták, hogy abban az esetben, amikor a nyolc-sejtes embriót kétfelé osztottuk, nagyobb volt a született kimérák %-os aránya, ugyanis négy blasztomer esetében 2,17% (3. táblázat), míg két blasztomer esetében 1,67% (2. táblázat), de szignifikáns különbséget nem találtunk. A négy részre osztott embriók esetében 9,5% (2. táblázat), míg a két részre osztott embriókat tekintve 22,8% (3. táblázat) volt a helper embriókból megszületett újszülöttek %-os aránya, EGFP/CD1 esetében 50,0% (4. táblázat). Az újszülöttek és a helper embriók aránya genotípusonként a 6. ábrán láthatóak.



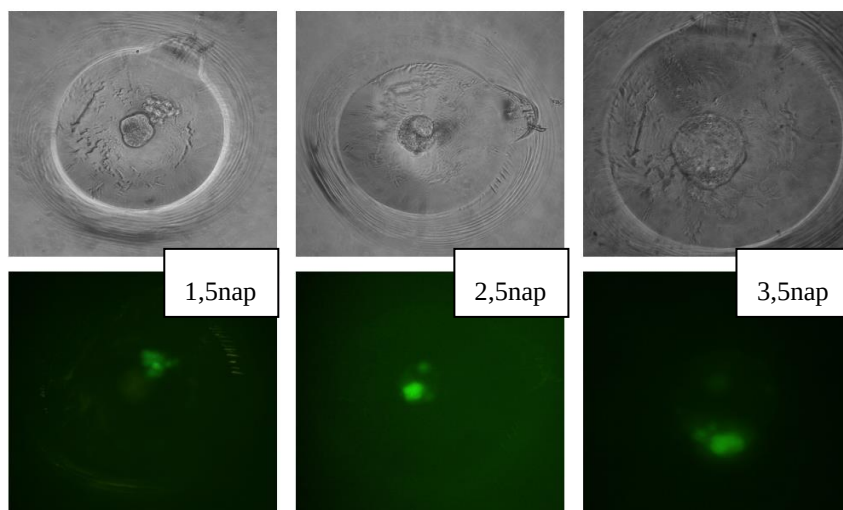
6. ábra: Különböző genotípusú, illetve számú donor blasztomereket felhasználva kapott újszülöttek aránya és megszületett helper embriók aránya

Mivel két különböző egértörzset használtunk a donor embriók esetében, azt vizsgáltuk, hogy van-e befolyása a donor embrió genotípusnak a megszületett kimérákra, illetve a velük egyidejűleg beültetett helper embrióból megszületett utódok számára. Azt az eredményt kaptuk, hogy az EGFP/CD1 egértörzs esetében magasabb arányban születtek meg az utódok (egykek), mintegy 16,7%-ban, összehasonlítva a C57BL/6 egértörzsszel, ahol viszont csak 1,67 %-ban amikor két blasztomert használtunk, négy blasztomer esetében pedig 2,17 % (7. ábra).

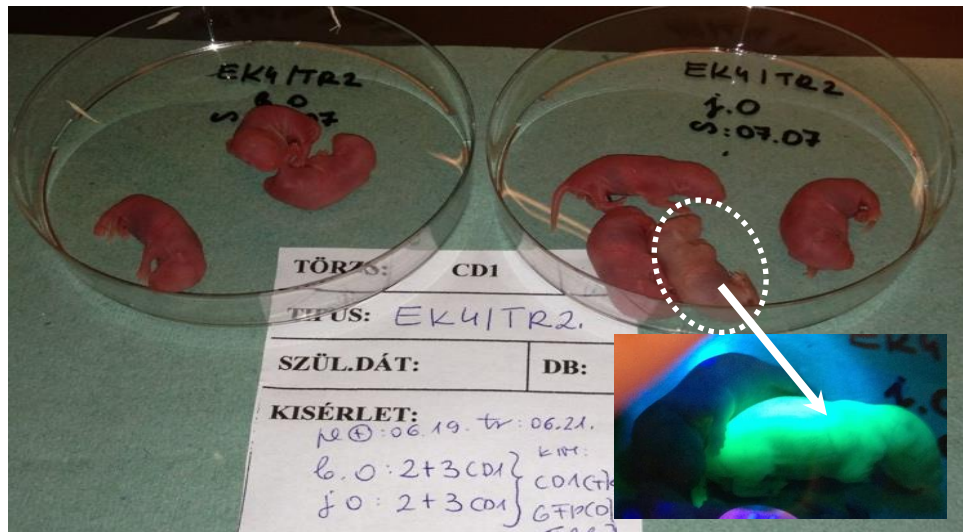


7. ábra: Különböző genotípusoknál megszületett kiméra embrióból származó utódok %-os aránya

Az eredmények azt mutatják, hogy annak ellenére, hogy EGFP/CD1 esetében magasabb arányban születtek meg az utódok, nem szignifikáns az eltérés a genotípusok között, mivel kevés volt EGFP/CD1 beültetett kimérák száma.



8. ábra: Összerakott kiméra embriók.



9. ábra: Császármetszést követően kapott utódok CD1/EGFP donor blaszto mer alkalmazását követően beültetett kiméra embriókból (zöld utód), illetve a megszületett helper utódok.

6.2 Inhibitoros kísérletek

Különböző genotípusú embriókat használva azt vizsgáltam, hogy hogyan hat a különböző összetételű médium az embriók fejlődésére és sejtösszetételére. A kísérletek során kétféle médiumot használtam. Az egyik frissen elkészített két inhibitoros (2i), a másik pedig általános (KSOM) embriótenyésztő médium volt. Az embriókat két-sejtes állapotban mostam ki az egerekből és tettem bele a különböző médiumokba. A tenyésztés inkubátorban zajlott (5%CO₂, 37°C). A tenyésztést követő ötödik napon, amikor az embriók már elérték a blasztociszta állapotot fixáltam, majd később immunfestettem azokat, hogy megállapítsam az OCT4 pozitív sejtek arányát.

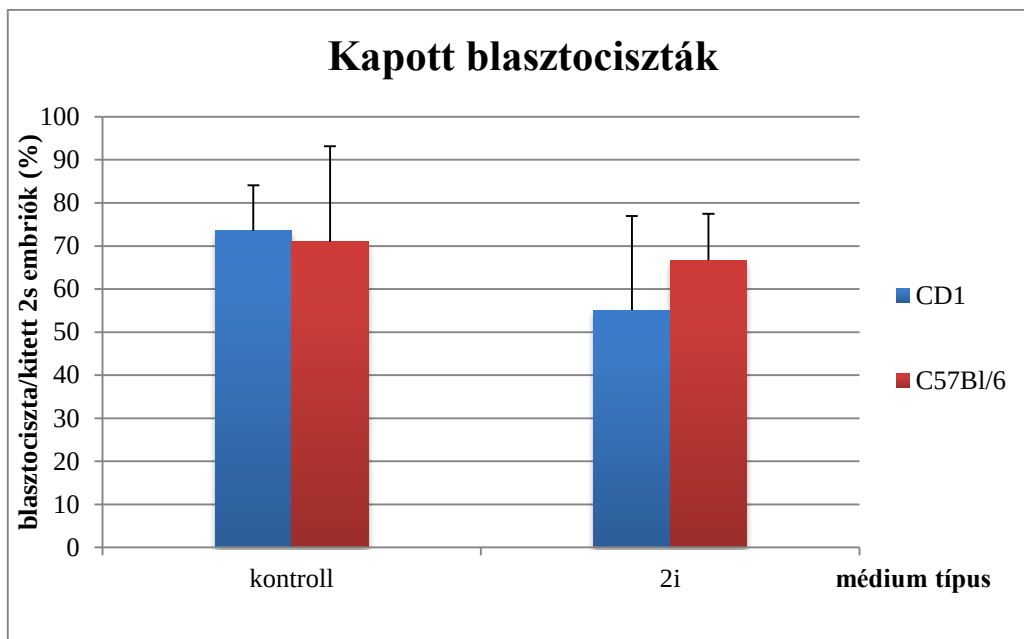
5. táblázat: Inhibitoros kísérletek alapján kapott eredmények

Egerek genotípusa	Kontroll médiumba tett embriók száma (2s)	Kontroll médiumban kapott blasztociszták (4,5 napos)	2i médiumba tett embriók száma (2s)	2i médiumban kapott blasztociszták (4,5 napos)
C57Bl/6	3	2	4	2
C57Bl/6	5	5	6	4
C57Bl/6	13	6	10	7
C57Bl/6	-	-	10	8
CD1	4	3	6	2
CD1	14	12	13	10
CD1	10	6	-	-

A kísérleteket C57Bl/6 és CD1 genotípusú embriókkal végeztem, és a kapott eredmények alapján kiszámoltam, hogy a különböző médiumokba tett kétsejtes embriókhoz viszonyítva százalékosan mennyi volt a kapott blasztociszták aránya.

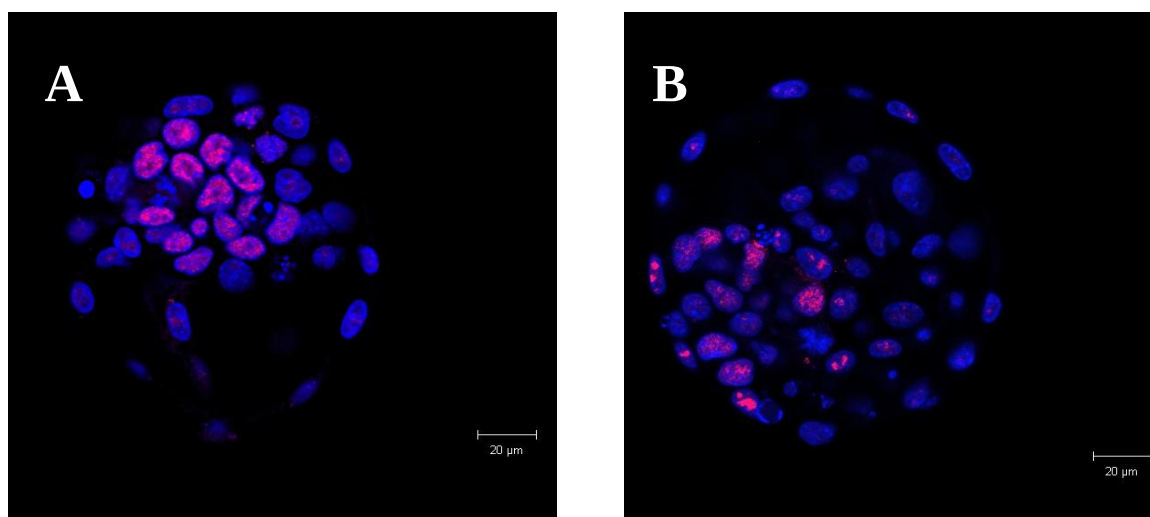
6. táblázat: Kapott blasztociszták %-os aránya

Egerek genotípusa	kontroll médium	2i médium
CD1	73,57%	55,13%
C57Bl/6	70,94%	66,67%



10. ábra: Különböző médiumokban kapott blasztociszták %-os aránya

Összehasonlítva a két médiumot az alapján, hogy a kitett embriókhoz képest százalékosan hány blasztocisztát kaptunk négy és feledik napon, az eredmények azt mutatták, hogy szignifikáns különbség nincs, tehát fejlődési szempontból a két inhibitoros médium ugyanúgy megfelelő mindkét egértörzs esetében, a kontroll médiumhoz viszonyítva (10. ábra, 6. táblázat). Az immunfestést követően megnéztetem az OCT4 pozitív sejtek arányát is, a két különböző médiumban kapott blasztocisztákban.



11. ábra: 2i médiumban kapott (A) illetve kontroll médiumban (B) tartott C57Bl/6 blasztociszta OCT4 immunfestés után.

Az eredmények azt mutatták, hogy sikerült az inhibitorokkal megakadályozni a primitív endoderma kifejlődését, valamint ezzel párhuzamosan az OCT4 pozitív epiblaszt sejtek aránya megnövekedett (11. ábra), azonban statisztikai analízist nem tudtunk végezni, mert nem volt elegendő embriónk az elemzéshez. Két különböző genotípusú egér embriók esetében végeztük a tenyésztést. Mivel a kutatóközpontban C57Bl/6 egértörzsekkel is dolgoznak, azt szeretnénk volna vizsgálni, hogy az ilyen genotípus esetében is hatásos a 2i médiumban történő tenyésztés. Az immunfestést követő konfokális mikroszkópos felvételeken jól látható, hogy az OCT4 pozitív sejtek szám a C57Bl/6 embriók esetében jelentősen megnövekedett a kontroll embriókéhoz képest.

7. Értékelés és következtetések

Tetraploid egér embriókat használva kétféleképpen is létre lehet hozni utódokat, ES-sejtekkel történő aggregáltatással, vagy ES-sejtek zóna pellucida alá történő injektálásával. Ezzel a módszerrel Nagy András és munkatársai (Nagy et al, 1990, 1993) sejtvonal eredetű utódokat hoztak létre (amik a sejtvonal létrehozásakor felhasznált embrióból származó klónok), így genetikailag azonos egerek voltak. Azonban a hatékonyság, amellyel jelenleg ES-sejt eredetű utódokat lehet létrehozni viszonylag alacsony (<10%). Megállapították, hogy nagyobb hatékonysággal lehet ES-sejtekből utódokat kapni tetraploid embriókkal, ha az ES-sejtek outbred egértörzsből származnak (Duncan 2005).

A kísérleteim alapján kapott eredmények azt mutatták, hogy a kültenyésztett EGFP/CD1 genotípusú (outbred) egértörzs esetében hatékonyabban lehet utódokat kapni, mint a C57Bl/6 (inbred) egértörzs esetében, tehát az utódok megszületését befolyásolja a donor embrió genotípusa, bár nem adott szignifikáns eltérést az általunk alkalmazott f próba. Ha a különböző genotípusú embriókat felhasználva kapott megszületett utódok számát hasonlítjuk össze a grafikonon (7. ábra), láthatóan nagyobb hatékonysággal kaptunk utódokat. A szignifikáns különbséget azért nem tudtuk igazolni, mivel kevés volt a beültetett EGFP/CD1 kimérák száma. Biológiai minták esetében mindig nagy a minták közti szórás, így csak sok kísérlet eredményét összesítve várhatjuk, hogy statisztikailag is kimutatható szignifikancia a hagyományos módszereket alkalmazva.

A továbbiakban ezeket az EGFP/CD1 egértípusokat és más outbred vagy hibrid fajokat javasoljuk a kísérletekhez. Ebben az esetben jóval több kontroll embrió esetében kell vizsgálatot végezni.

Azáltal, hogy az új eredményeinkből kiderül, hogy az utódok megszületését befolyásolja a donor blasztomerek genotípusa, tehát genotípus függés mutatható ki, jó útmutatást jelenthet a további iker kutatásokban.

Használunk tenyésztő médiumokat, amelyekben a Res/EKP MAPK és GSK3 jelátviteli utak inhibitorait alkalmazzák, hogy elnyomja az őssejtek differenciálódását és támogassa a pluripotens ES sejtek folyamatos osztódását. A kettős inhibitoros rendszert fel lehet használni egér törzsekből történő ES-sejtvonal létrehozására. A 2i tenyésztési körülmények befolyásolják az ES-sejtek tovább fejlődését a valódi ES-sejtek izolálásához. Különösen fontos a Ras/ERK jelátvitel az egér ESC differenciálódásában. Azonban a MEK aktivitás hatékony blokkolása, különösen a kis sejtszámot tartalmazó kultúrákban nem, elegendő a

hatékony sejtűtléléshez. Ezért a MEK blokkolását kombinálták Wnt jelátvitelt szabályozó (GSK3) aktivitásának blokkolásával, ezzel elősegítve az egér ES-sejtek osztódását az alacsony sűrűségű kultúrákban is. (Meek et al. 2012). Kísérleteinkben mi is arra az eredményre jutottunk, hogy a 2i sejttenyésztő médium nem befolyásolja az embriók fejlődési potenciálját, ugyanakkor az ICM-ben található OCT4 pozitív sejtek aránya jelentősen megnövekedett.

Az inhibitoros médiummal folytatott kísérleteink alapjául Morris és munkatársai által végzett kísérletek szolgáltak. Megállapították, hogy a felezett embrió ugyan azt a fejlődési időt követi, mint a normál embrió, azonban ha nem tartalmaznak az embriók minimum négy pluripotens sejtet a beültetésük előtt, a fejlődés abba marad. Ez a hiba kiküszöbölhető FGF és Wnt jelátviteli rendszer megfelelő ponton való gátlásával, ezzel megnövelhető lesz a pluripotens sejtek száma az embriókban, ezáltal lehetőség nyílik generációs egy petéjű ikrek létrehozására. Ők is végeztek két inhibitoros médiumban embriótenyésztést C57BL/6xCBA genotípusú egértörzsből származó embriókkal és azt az eredményt kapták, hogy az OCT4 pozitív sejtek számát megnövekedett az embriók ICM-jében, vagyis az epiblaszt sejtszámot megnövelte, a primitív endodermával szemben. A két-sejtes állapotú embriókat blasztomerekre szedték, majd 2i médiumba helyezték azokat. A 2i kezelést abbahagyták a blasztulák kifejlődését követően, majd a fél embriókat recipiens nőtényekbe ültették. Azt tapasztalták, hogy ez megduplázza az egykék és az ikrek gyakoriságát a nem kezelt kontrollhoz képest. A kísérleteik alátámasztották azt, hogy a fejlődés sikeressége a pluripotens sejt populációkra támaszkodik és hogy a fejlődésszabályozás fokozható további kezelésekkel, bár sikeres iker születést nem eredményezett a visszaültetés. Vizsgálataik során az is kiderült, hogy habár két-sejtes embriókból elkülönített sejtek megmenthetőek a tovább fejlődés érdekében, azonban a négy-sejtes embrió sejtjei nem (Morris et al. 2012).

Az én eredményeim is azt mutatták, hogy a 2i médiumban történő tenyésztés megnöveli az epiblaszt sejtszámot C57Bl/6 genotípusú egér embriók esetében is, és nem befolyásolja az embriók fejlődési képességét a kontroll embriókéhoz képest. Mi nem ültettünk vissza megnövekedett epiblaszt sejtszámú embriókat, hanem immunfestét követően analizáltuk az embriókban levő pluripotens sejtek arányát. Azt láttuk, hogy a kezelt embriókban az OCT4 pozitív (epiblaszt) sejtek aránya megnövekedet.

Az iker kimérékkal kapcsolatos kísérletek folytatódnak az MBK-ban, reméljük az általam kapott eredmények is segítik majd sikeres kettes vagy akár hármas iker létrehozását.

A későbbiekben a célunk az, hogy sikerüljön minél hatékonyabban iker utódokat előállítani, s ezeket az ikreket sikeresen tudjuk alkalmazni a humán iker kutatások modell állataiként is.

8. Összefoglalás

Különböző biológiai kutatásokban fontos szerepet töltenek be a kiméra egerek. Az iker kutatás területén elért új eredmények hasznos információkkal szolgálnak ahhoz, hogy minél nagyobb számban sikerüljön iker egereket létrehozni. Ezzel lehetőség nyílt olyan egyedeket létrehozni, amelyek génállománya teljesen megegyezik. Az ilyen iker egyedek nagy jelentőséggel bírnak a különböző kutatási területeken. Az agrárkutatás területén például a jó génállománnyal rendelkező egyedek gyors elszaporítása válik lehetővé.

Kísérleti munkám során egér kiméra embriókat hoztam létre. Azt vizsgáltam, hogy hogyan befolyásolja a létrehozott kiméra embriók fejlődését a donor embrióból származó sejtek (blasztomerek) genotípusa, illetve a tenyésztő médium összetétele.

Az egér embriók, őssejtek genetikai módosítására sokféle módszert fejlesztettek ki napjainkig. Az így létrehozott transzgenikus egereket mind a fejlődés biológiai vizsgálatok során, mind pedig az orvosi kutatás területén elterjedten alkalmazzák. Két egér embriót aggregáltatva, kiméra embriókat lehet létrehozni. Amennyiben tetraploid gazda embriókat használunk, a donor embrióból származó blasztomerekből identikus kettes, vagy hármas ikreket lehet létrehozni. Ezt a módszert nevezik tetraploid komplementációs technológiának.

Kísérleteimet az MBK, Állatbiotechnológiai Intézetében végeztem, ahol a tetraploid komplementációs technológia alkalmazásával, identikus iker egereket szeretnének létrehozni. Az identikus ikrek létrehozásának jelentősége az, hogy ezek az iker egerek ugyan abból a gazda embrióból származnak, így genotípusuk teljesen megegyezik. A donor, illetve a gazda embriók eltérő genotípusú egértörzsekből származtak. Azt az ideális donor-gazda embrió genotípus kombinációt kerestük, amiből a legnagyobb arányban sikerülhet iker egereket létrehoznunk.

A munkámat két periódusra lehet felosztani. Az első periódus januártól-májusig tartott, míg a második periódus júliusban volt. A fuzionált embriók aránya (tavasz 54,3%, július 67,3%), a sikeres beültetések száma (tavasz 16,6%, július 26,8%) és a megszületett egerek aránya júliusban jóval magasabb volt, mint a munka első felében (tavasz 1,8%, július 8,2%). A júliusban elért jobb eredmények részben annak is köszönhetőek, hogy nagyobb gyakorlatot szereztünk addigra a kiméra előállításban, de szerepet játszott az is, hogy júliusban optimálisabb volt az egerek reprodukciós fázisa is. CD1/EGFP donor embriókat alkalmazva jóval magasabb arányban sikerült kiméra egereket létrehozni, mint C57BL/6 genotípus esetében (CD1/EGFP 16,7%, C57BL/6 2,17%).

Az embriódarabolás az identikus ikrek létrehozásának egy alternatív módszere lehet. Amennyiben sikerülne inhibitorokkal megakadályozni a primitív endoderma kifejlődését, ezzel párhuzamosan megnövelni az epiblaszt sejtek számát, lehetségessé válhatna embriódarabolással is iker egereket létrehozni. Előzetes eredményeim azt mutatják, hogy a 2i médiumban tenyésztett embriók esetében az OCT4 pozitív epiblaszt sejtek aránya megnövekedett, így esély lehet iker egerek létrehozására ezzel a technológiával is.

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Gócza Elennek témavezetőmnek (konzulensemnek) a sok gyakorlati és elméleti útmutatást, amivel a munkámat segítette. Minden támogatást megadott ahhoz, hogy ez a dolgozat megfelelően elkészülhessen.

Szeretnék köszönetet mondani Bontovics Babett PhD hallgatónak is, aki a gyakorlati munkám során elengedhetetlen segítséget nyújtott.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Bősze Zsuzsannának (a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont), aki lehetővé tette számomra, hogy a szakdolgozati munkám gyakorlati részét az MBK-ban végezhessem.

10. Irodalomjegyzék

Balázs E., Dudits D., Sági L. (szerk.) (2011): Magyar fehér: Genetikailag módosított élőlények (gmo-k) a tények tükrében. Barabás Zoltán Biotechnológiai Egyesület, Szeged, 138p.

Bavister, B.D., (2002): Early history of *in vitro* fertilization. *Reproduction* 124, 181–196.

Beddington, R. . and Robertson, E.J. (1989): An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* 105, 733-737

Bodó SZ., Dinnyés A. (2005): *In vitro* és mikromanipulációs technológiák állattenyésztési felhasználása. In: **Heszky L., Fésűs L., Hornok L.**: Mezőgazdasági biotechnológia, Agroinform Kiadó 307p.

Bösze Zs., Gócza E. (2005): Transzgénikus haszonállatok előállításának lehetőségei és céljai. In: **Heszky L., Fésűs L., Hornok L.**: Mezőgazdasági biotechnológia, Agroinform Kiadó pp. 264-286pp.

Carstea Valer Bogdan (2007): Kiméra-technikák kidolgozása klónozás, ivar átfordítás és genetikai manipulációk céljára. Doktori értekezés tézisei. Szent István Egyetem. Gödöllő. 20

Carstea, V.B., Catunda Lemos, A.P., Ilie, E.D., & Varga L., Bodó S., Kovács A., Bösze Z., Gócza E. (2007): Production of identical mouse twins and a triplet with predicted gender. *Cloning Stem Cells*, 9, 247-56. PMID: 17579557.

Doetschman, T., Maeda, N. and Smithies, O. (1988): Targeted mutation of the Hprt gene in mouse embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8583-8587

Driesch, H., (1891): Entwicklungsmechanische Studien. I. Der Wert der beiden ersten Furchungszellen in der Echinodermmentwicklung. Experimentelle Erzeugung von Teil und Doppelbildungen. *Zeitschr. Wiss. Zool.* 53, 160–178

Duncan, S.A. (2005): Generation of embryos directly from embryonic stem cells by tetraploid embryo complementation reveals a role for GATA factors in organogenesis. *Biochemical Society Transactions* 33, part 6. 1534-1536

Gartner, K., Baunack, E. (1981): Is the similarity of monozygotic twins due to genetic factors alone? *Nature*. Aug 13, 292, 646-647

Gossler, A., Doetschman, T., Korn, R., Serfling, E., Kemler, R. (1986): Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 9065-9069.

Hart, A. H., Hartley, L., Sourris, K., Stadler, E. S., Li, R., Stanley, E. G., Tam, P. P., Elephanty, A. G. and Robb, L. (2002): *Mixl1* is required for axial mesendoderm morphogenesis and patterning in the murine embryo. *Development* 129, 3597-3608

Jaenishch, R., Fan, H., Croker, B. (1975): Infection of preimplantation mouse embryos and of newborn mice with leukemia virus: tissue distribution of viral DNA and RNA and leukemogenesis in the adult animal, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72, 4008-12

- Kaufman, M.H., Webb, S.** (1990): Postimplantation development of tetraploid mouse embryos produced by electrofusion. *Development* 110, 1121-1132
- Kelly, S.J.** (1977): Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. *J. Exp. Zool.* 200, 365–376
- Kirchain, S.M., Hayward, A.M., Mkandawire, J.M., Qi, P., Burds, A.A.** (2008): Comparison of Tetraploid Blastocyst Microinjection of Outbred Crl:CD1(ICR), Hybrid B6D2F1/Tac, and Inbred C57BL/6NTac Embryos for Generation of Mice Derived from Embryonic Stem Cells. *Comparative Medicine* Vol 58, 145-150
- Kuijk, E.W., Du Puy, L., Van Tol, H.T.A., Oei, C. H.Y., Haagsman, H. P., Colenbrander, B., Roelen, B.A.J.** (2008): Differences in Early Lineage Segregation Between Mammals. *Developmental Dynamics*, 237:918–927
- Lavitrano, M., Camaioni, A., Fazio, V.M., Dolci, S., Farace, M.G., Spadafora, C.** (1989): Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice, *Cell.*, 57, 717-23.
- Le Douarin, N., McLaren, A.** (1984): *Chimeras in Developmental Biology* (London, Orlando: Academic Press).
- Meek, S., Wei, J., Sutherland, L., Nilges, B., Buehr, M., Tomlinson, S.R., Thomson, A.J., Burdon, T.** (2012): Tuning of β -catenin Activity is Required to Stabilise Self-renewal of Rat Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 1-20
- Mintz, B.** (1964): Formation of genetically mosaic mouse embryos, and early development of “lethal (T12/T12)-normal” mosaics. *J. Exp. Zool.* 157, 273–292
- Morris, S. A., Guo, Y., Zernicka-Goetz, M.,** (2012): Developmental Plasticity Is Bound by Pluripotency and the Fgf and Wnt Signaling Pathways. *Cell Reports*, 1-10
- Nagy A., Gertsenstein, M., Vintersten K., Behringer, R.** (2003): *Manipulating the Mouse Embryo*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 764pp.
- Nagy A., Gócza E., Diaz E.M., Prideaux V.R., Iványi E., Markkula M., Rossant J.** (1990): Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development*, 110, 815-21. PMID: 2088722.
- Nakai-Futatsugi, Y., Niwa, H.** (2013): Transcription Factor Network in Embryonic Stem Cells: Heterogeneity under the Stringency. *Biol. Pharm. Bull.*, 36(2) 166–170
- Nicholas, J.S., Hall, B.V.** (1942): Experiments on developing rats. II. The development of isolated blastomeres and fused eggs. *J. Exp. Zool.* 90, 441–459
- Nichols, J., Smith, A.** (2009): Naive and Primed Pluripotent States. *Cell Stem Cell* 4., 487-492
- Ohta, H., Sakaide, Y., Yamagata, K., Wakayama, T.,** (2008): Increasing the Cell Number of Host Tetraploid Embryos Can Improve the Production of Mice Derived from Embryonic Stem Cells. *Biology of Reproduction*, 79, 486–492
- Papaioannou, V.E., Ebert, K.M.** (1995): Mouse half embryos: viability and allocation of cells in the blastocyst. *Dev. Dyn.* 203, 393–398
- Piotrowska-Nitsche, K., and Zernicka-Goetz, M.** (2005): Spatial arrangement of individual 4-cell stage blastomeres and the order in which they are generated correlate with blastocyst pattern in the mouse embryo. *Mech. Dev.* 122, 487–500

Robertson, E. J. (1986): Pluripotential stem cell lines as a route into the mouse germ line. *Trends Genet.* 2, 9-13

Roode, M., Blair, K., Snell, P., Elder, K., Marchant, S., Smith, A., Nichols, J. (2011): Human hypoblast formation is not dependent on FGF signalling. *Developmental Biology* 361,358–363

Rossant, J. (1976). Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 36, 283–290.

Tam, P.P.L., Rossant J. (2003): Mouse embryonic chimeras: tools for studying mammalian development. *The Company of Biologists*, 130, 6155-6163

Tanaka, S., Kunath, T., Hadjantonakis, A.K., Nagy, A. and Rossant, J. (1998): Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* 282, 2072-2075.

Tarkowski, A.K., Czołowska R., Oźdżeński, W. (2001): Mouse singletons and twins developed from isolated diploid blastomeres supported with tetraploid blastomeres, *Developmental Biology*, 45, 591-596

Tarkowski, A.K., Czołowska R., Oźdżeński, W. (2005): Identical triplets and twins developed from isolated blastomeres of 8- and 16-cell mouse embryos supported with tetraploid blastomeres. *Developmental Biology*, 49, 825-832.

Tarkowski, A.K., Suwińska A., Czołowska R., Oźdżeński, W. (2010): Individual blastomeres of 16- and 32-cell mouse embryos are able to develop into fetuses and mice, *Developmental Biology*, 348, 190–198

Tarkowski, A. K., Witkowska, A., Opas, J. (1987): Development of cytochalasin beta-induced tetraploid and diploid-tetraploid mosaic mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 41, 47-64

Tarkowski, A.K., Witkowska, A., Opas, J. (1977): Development of cytochalasin in B-induced tetraploid and diploid/tetraploid mosaic mouse embryos. *Journal of embryology and experimental morphology*, 41, 47-64

Tarkowski, A.K. (1959): Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Nature* 184, 1286–1287

Tarkowski, A.K. (1961): Mouse chimaeras developed from fused eggs. *Nature* 190, 857–860

Tarkowski, A.K., and Wróblewska, J. (1967): Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 18, 155–180

Thomas, K. R., Capecchi, M. R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo derived stem cells. *Cell* 61, 503-512

Tsunoda, Y., and McLaren, A. (1983): Effect of various procedures on the viability of mouse embryos containing half the normal number of blastomeres. *J. Reprod. Fertil.* 69, 315–322

Vajta, G., Gjerris, M. (2006): Science and technology of farm animal cloning: State of the art *Animal Reproduction Science*, 1-20

Van der Jeught, M., O’Leary, T., Ghimire, S., Lierman, S., Duggal, G., Versieren, K., Deforce, D., Chuva de Sousa Lopes, S., Heindryckx, B., De Sutter, P. (2012): The Combination of Inhibitors of FGF/MEK/Erk and GSK3b Signaling Increases the Number of

OCT3/4- and NANOG-Positive Cells in the Human Inner Cell Mass, But Does Not Improve Stem Cell Derivation. *Stem cells and development* Volume 22, Number 2, 2013:1-12

Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H. (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, *Nature*, 385: 810-813

Wong, A. H.C., Gottesman, I.I., Petronis, A. (2005): Phenotypic differences in genetically identical organisms: the epigenetic perspective. *Human Molecular Genetics*, Vol. 14: 1-8

Yamanaka, Y., Lanner, F., Rossant, J., (2010): FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst, *Development*, 137, 715-724

Zernicka-Goetz, M., Morris, S.A., Bruce, A.W. (2009): Making a firm decision: multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo. *Nat. Rev. Genet.* 10, 467–477

Internetes hivatkozás

- *http1: Wikipedia.* http://hu.wikipedia.org/wiki/H%C3%A1zi_eg%C3%A9r
- *http2: Magyar Tudomány 2003.* http://epa.oszk.hu/00700/00775/00057/2003_08_03.html
- *http3: Mouse Development- Embryology.*
http://php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=Mouse_Development
- *http4: Reproduction.* <http://www.reproduction-online.org/content/145/3/R65/F1.expansion.html>
- *http5: Wikipedia.* http://en.wikipedia.org/wiki/Chimera_%28genetics%29
- *http6: Digitális Tankönyvtár*
http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Jelativitel_hu_book/ch02s04.html

11. Nyilatkozat

Alulírott Balogh Erna a Szent István Egyetem Mezőgazdaság-és Környezettudományi Kar Mezőgazdasági biotechnológus szak nappali tagozatos hallgatója nyilatkozom, hogy a dolgozat a saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen **nem**.

Gödöllő, 2013. november 3.

.....

Hallgató aláírása