



SZENT ISTVÁN EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR
MEZŐGAZDASÁGI BIOTECHNOLÓGUS MSC

**IKER EGEREK LÉTREHOZÁSA TETRAPLOID
KOMPLEMENTÁCIÓS TECHNOLÓGIÁVAL:
A GAZDA EMBRIÓ GENOTÍPUSÁNAK HATÁSA**

Készítette:
Fábián Renáta

Témavezetők:
dr. Gócza Elen
Tudományos főmunkatárs, csoportvezető
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont
Állatbiotechnológia Intézet

Bontovics Babett
Tudományos segédmunkatárs
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont
Állatbiotechnológiai Intézet

Gödöllő
2013

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	4
2. Bevezetés és célkitűzések.....	5
3. Irodalmi áttekintés.....	7
3.1 Egér, mint modellállat.....	7
3.2 Történeti áttekintés.....	8
3.3 Egér embrió fejlődése.....	9
3.4 Klónozás.....	10
3.4.1 Típusai.....	11
3.5 ES sejtek.....	13
3.5.1 Össejt-vonal típusai.....	14
3.6 Kiméra.....	15
3.6.1 Kiméra típusai.....	16
3.6.2 A kiméra létrehozás építőkövei.....	19
3.7 Iker egerek.....	20
3.7.1 Iker kutatás jelentősége.....	23
4. Anyagok és módszerek.....	24
4.1 Egér embriók előállítása.....	24
4.1.2 Embrió előkészítése.....	24
4.2 Tetraploid embriók.....	25
4.3 Tetraploid aggregációs kiméra.....	27
4.3.1 Az aggregációs petri-csésze előállítása.....	27
4.3.2 Zóna eltávolítása.....	27
4.4 Embrió beültetés.....	28
4.5 Statisztikai vizsgálat: F-próba.....	28

4.6 Állatkísérleti szabályok	29
5. Eredmények és értékelésük	30
6. Következtetések és javaslatok	40
7. Összefoglalás.....	42
8. Köszönetnyilvánítás	44
9. Irodalomjegyzék.....	45
10. Nyilatkozat	49

1. Rövidítések jegyzéke

EC: embrionális teratokarcinóma sejtvonala

EGFP: zöld fluoreszcens fehérje módosított változata (Enhanced Green Fluorescent Protein)

EPL sejt: primitív ektoderma-szerű sejtvonalk

ES sejt: pluripotens embrionális eredetű őssejtvonala (Embryonic Stem Cell line)

HMC: kézzel történő klónozás (hand made cloning)

ICM: embriócsomó vagy belső sejtcsoomó (Inner Cell Mass)

Oct4: 4-es oktamer kötő fehérje (Octamer binding protein 4)

PCR: polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)

SCNT: szomatikus sejt transzfer

TS sejt: trofektoderma eredetű sejtvonala

2. Bevezetés és célkitűzések

Transzgénikus egerek alkalmazása az orvosbiológiai kutatások területén már széles körben elterjedt. A leggyakoribb felhasználása ezen egereknek a szövet specifikus és fejlődési állapot specifikus gén regulációs tanulmányok, valamint a transzgén expresszió fenotípusos hatásainak vizsgálata. Régóta végeznek a kutatók humán iker vizsgálatokat, és ezen kísérletek segítésére iker egerek tanulmányozásába fogtak. Az identikus iker egerek a sejtmag átültetéses klónozástól eltérően sejtmagi és citoplazmában található mitokondriális DNS szinten is azonosak. A tetraploid embrió komplementációs módszerrel létrehozott egypetéjű ikrek és hármas ikrek értékes eszközt jelenthetnek az orvos biológiai kutatások és mezőgazdasági alkalmazások területén is. Az identikus iker egerek alá támaszthatják azt az elképzelést, miszerint, a fenotípusos tulajdonságok is öröklődnek a DNS epigenetikus módosításokon keresztül, nem csak a DNS szekvenciával. Az iker egerek rámutathatnak egyes betegségek és tulajdonságok örökölhetőségére, és ezek epigenetikai természetére. Az iker vizsgálatok hasznosságát a szív rendellenességek, valamint a magas koleszterin szint okozta megbetegedések vizsgálatában elért új eredmények támasztják alá.

A Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban kísérleteink során tetraploid aggregációs kiméra módszerrel iker egerek előállítása volt a cél. A kiméra görög eredetű szó, mely olyan élőlényt jelent, amely több egyed vagy embrió sejtjeiből, szöveteiből jön létre. Aggregációs kiméráról akkor beszélünk, amikor két külön-külön megtermékenyített petesejtből származó embrionális sejtek (blasztomerek) az egyedfejlődés korai szakaszában aggregálódnak egymással, ily módon egyetlen utód jön létre négy ivarsejtből, négy génkészlettel rendelkezik. Egy két- sejtes egér embrió elektromos impulzus segítségével tetraploid embrióvá alakítható. Ha ezt a tetraploid embriót négy-sejtes fejlődési stádiumban aggregáltatjuk másik egér embrióból származó blasztomerrel, kiméra embriókat hozhatunk létre. A tetraploid embriók a gazdaembriók és a blasztomerek a donor embrióból származnak. A befogadó (gazda) embrióknak CD1 és C57Bl/6 albínó genotípusú egér törzseket, míg blasztomer donorként EGFP/CD1 és C57Bl/6 genotípusú embriókat alkalmaztunk.

Kísérleteink során az első célunk a fúziós paraméterek beállítása volt. Korábbi tanulmányok megadták az ICR egér embriók esetében alkalmazott paramétereket, mi azt szeretnénk volna megnézni, hogy az általunk használt CD1, C57Bl/6 albínó egértörzsek

esetében milyen paraméter lenne az optimális. A későbbiekben az optimális tetraploid gazda embrióként alkalmazható egértörzs megtalálása is feladatomból volt.

A fúziós paraméterek beállítása után tetraploid komplementációs módszerrel iker egereket hoztunk létre. Feladatomból a tetraploid gazda embrió genotípus hatásának vizsgálata volt a kiméra embriókból megszülető utódok számára. Kétféle genotípusú tetraploid egér embriót (CD1, C57Bl/6 albinó) hasonlítottam össze, és ez alapján állapítottam meg a gazda embrió hatását a megszülető újszülöttek arányára.

3. Irodalmi áttekintés

3.1 Egér, mint modellállat

Egy kísérleti állat modellként szolgálhat minden olyan esetben, mikor a kísérletek mindenki számára elfogadhatóak, ha az eredmények megkérdőjelezhetetlenek és reprodukálhatók, pontosak. Ez a helyzet akkor áll fent, ha a kísérleti (kezelt) állat és kontroll csoport csak egy aspektusban különbözik egymástól. Jelentős különbségek vannak egyes fajok érzékenysége között, a különböző genetikai háttérük miatt. Ez az oka annak, hogy egyes fajok nem megfelelőek adott kísérletben. A laboratóriumi állatok fontos követelménye, hogy tartásuk egyszerű legyen. Napjainkban a rágcsálók felelnek meg leginkább ennek a követelménynek. Az emlősök közül egereket és patkányokat használnak leginkább laboratóriumban (körülbelül 90%), de az utóbbi 20 évben ez az arány csökkenő tendenciát mutat (Kaszaki 2011).

A orvosbiológiai kutatásokban használt állatok 70%-a egér. Több, mint ezer fajtát és egértörzset állítottak elő, és több száz mutáns fajt használnak humán betegség modellként (Lawson 2000). Genetikai tekintetben az egér a legalaposabban jellemzett emlős. Jelenleg több, mint 400 különböző beltenyésztett törzs érhető el, és ezen törzsek eredete és jellemzői az egér genom informatikai adatbázisban (MGI) megtalálhatók. A laboratóriumi egér formális rendszertana nem egyszerű, az Európai egér, *Mus musculus* számos alfajának jelenlétét tükrözi, melyből származik. Erre az összetettségre már fény derült az egér DNS restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus (RFLP) vizsgálatainál (Nagy et al. 2003). Az egér élettartama 1,5-3 év. Érzékenyek a hőmérséklet ingadozásra, a huzatra és a magas páratartalomra. Az egerek poliösztrozusos állatok, egész évben szaporodnak, az ovuláció spontán. Az ivarzási ciklus 4-5 nap. Az átlagos vemhességi idő 20 nap. Az átlagos alomszám 10. A kölyköket 3 hetes korukban választják el (Schwiebert 2007).

Számos előnye van az egér kutatási állatként történő alkalmazásában. A nagy szaporodási teljesítmény, nagy alom méret és a rövid vemhességi idő azt jelenti, hogy sok generációt lehet előállítani viszonylag rövid idő alatt. Az egér kísérleti állatként történő alkalmazásának hátránya az állat kis mérete, mely korlátozza a beavatkozások körét, valamint az egyes állatokból beszerezhető minta kis térfogata is hátránynak tekinthető. Az utóbbi

korlátozás kiküszöböléséhez a mintákat több állatból kell beszerezni a kutatási és statisztikai elemzéshez.

Az egér kutatási állatként történő alkalmazása számos tudományos fejlődéshez vezetett (Kaszaki 2011). A genetikailag módosított egerek hasznos állatmodellek, melyek hozzájárulnak a biológia, a gén funkciók és betegségmegelőzés megértéséhez. Segítik a kutatókat abban, hogy értékeljék a genetikai hibák szerepét bizonyos betegségeknél, valamint az új terápiák kifejlesztésében is (Mader et al. 2009).

3.2 Történeti áttekintés

Transzgénikus állatnak nevezünk minden olyan állatot, melynek genomja emberi beavatkozással bejuttatott exogén DNS-t tartalmaz. Amióta napvilágot látott az első közlemény, mely bebizonyította, hogy lehetséges idegen DNS bevitele emlős genomba transzgénikus egerek tízezreit állították elő a génműködés in vivo szabályozásának vizsgálatára, illetve humán betegségek modelljeiként (Bösze & Gócza 2005).

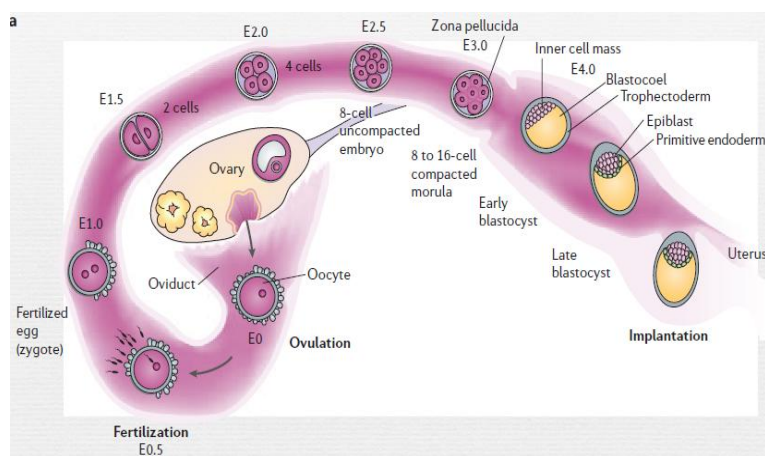
Rudolf Jaenisch 1974-ben vírus DNS-t juttatott egérembrióba, ez kimutatható volt az élő egerek szerveiben is. Ez az első, sikeres genetikai módosítás volt állatokban. (Proceedings of the National Academy of Sciences). Gordon és munkatársai 1980-ban genetikailag módosított (GM) egeret állítottak elő egy- sejtes embrió sejtmagjába mesterséges DNS mikroinjektálásával. Napjainkra számos DNS-beviteli módszert dolgoztak ki a kutatók: ezek köre a mikroinjektálás mellett kiterjed többek között az elektroporációra, vírusok és mesterséges kromoszómák felhasználására is (Balázs 2011). 1985-ben jelent meg először közlemény transzgénikus sertés és birka mikroinjektálással történt előállításáról, és ez 1997-ig egyeduralkodó volt (Bösze & Gócza 2005). Áttörést eredményezett a transzgénikus haszonállat előállításban Ian Wilmut által előállított Dolly, melynél felnőtt juh emlő sejt DNS-ét fuzionáltatta másik juh megtermékenyített petesejtjével. Így Dolly az első, felnőtt állati szövetből nyert sejtmag donorral történt sikeres átültetésből született (Turner 1997).

Richard Gardner és Ralph Brinster dolgoztak ki a blasztocisztába injektált sejtekből származó kiméra technikát, ezzel új lehetőségeket teremtve idegen sejtek bejuttatására az embrióba (Robertson 1986). A pluripotens embrionális őssejtek a blasztociszta belső sejtsomójából származnak, így a kiméra minden szövettípusát képesek létrehozni, a csíravonalat is beleértve (Doetschman 1988).

Oliver Smithies és Mario Capecchi demonstrálták, hogy a gének homológ rekombinációval képesek mutálódni az ES sejtekben. Ezzel új korszak lépett életbe, így már az egerekben lehetséges a célzott mutagenézis. Módosított ES sejtekből létrehozott kiméráknak kulcsfontosságú szerepük lett a mutáns egér létrehozásban. Mindazonáltal a kimérák többre használhatóak, mint mutáns egér létrehozás, alapvető fontosságúak a genetikai változások biológiai hatásának elemzésében is (Tam & Rossant 2003).

3.3 Egér embrió fejlődése

A többsejtű élőlények egyetlen sejt, a megtermékenyített petesejt osztódása révén indulnak fejlődésnek. A megtermékenyített petesejt (zigóta) a kiindulási alapja a későbbi élőlénynek. Bár az embrionális fejlődés a megtermékenyítéssel kezdődik, mind a petesejt mind a sperma érési folyamaton megy keresztül, amikor az ősi ivarsejt belép az ivarszerv telepbe (Nagy et al. 2003). Emlősnél ebből alakul ki az embrió, ezen sejt leszármazottai hozzák létre az extraembrionális képleteket, így a méhlepény magzati eredetű részét is. A zigóta fejlődése során számos átalakuláson megy keresztül, osztódással néhány sejtől álló szedercsíra (blasztula) jön létre először. A korai fázisában (négy-sejtes állapot) az individuális sejtek még megőrzik totipotens jellegüket, egymástól elkülönítve is képesek az egész élőlény kialakítására. Hasonló természetes folyamat vezethet a többpetéjű ikrek kialakulásához is. Az embriogenezis következő fázisa a hólyagcsíra, blasztociszta állapot. Korai blasztociszta állapotban (egérnél 3,5 nappal a megtermékenyítés után) az embriókezdemény körülbelül húsz-negyven sejtől áll (Szatmári 2013). A blasztociszta állapotban két különböző sejtípus



1. ábra: Egér embrió fejlődése

(dr. Góczy Elen előadás anyag)

alakul ki. A külső sejtréteg a trofektoderma, ezen sejtek nem vesznek részt a későbbi magzat kialakításában, ebből alakul ki a méhlepény nem anyai eredetű rétege, az extraembrionális szövetek (méhlepény, illetve szikzacskó) nagyobb része. A blasztociszta belsejében található a belső sejtömeg (inner cell mass, ICM), amit

embriócsomónak is neveznek. A korai blasztocisza állapotban az egér embriócsomó szinte homogén sejtcsoportnak tekinthető. Ebből fejlődik ki az embrió embrionális szövete, illetve az extraembrionális szövetek bizonyos sejtípusai. A fejlődés során az ICM sejtjei gyorsan osztódnak, s különböző irányban fejlődnek tovább (Gócza, 1998). A késői blasztocisza állapotban (egérnél 4,5 nappal a megtermékenyítés után), az embriócsomó sejtjei már egyértelműen elkülönülnek. A belül elhelyezkedő epiblaszt sejtekből jön létre az embrió minden sejt- és szövetfélesége. A hipoblaszt sejtek az extraembrionális szikhólyag endodermális részének kialakítását végzik, a későbbi embrió felépítésében nem vesznek részt. Az embriógenezis következő lépése (gasztruláció) amikor az embriócsomó elkülönült epiblaszt sejtjei egyrétegű struktúrát hoznak létre, majd ezen sejtréteg átalakul ektodermális, endodermális és mezodermális sejtréteggé. A fejlődés ezen fázisában kezdenek specializálódni a sejtek, ezen átalakult sejtformákból lesznek a különféle szervkezdemenyek (1.ábra) (Szatmári 2013). Két vonal szegregáció történik emlős embriók esetében, amikor a trofektoderm, primitív endoderma, és a pluripotens primitív ektoderma képződik. (Nichols et al. 1998). A szegregációt egér embrióknál az Oct4, Cdx2, Nanog, és Gata6 transzkripciós faktorok szabályozzák (Kuijk et al. 2008). A gasztruláció alatt, mikor a magzat elsődleges szövet típusai képződnek, az extraembrionális endoderma szerepe nélkülözhetetlen. Ha a kialakult extraembrionális endoderma sérült, a gasztruláció megakad, és a magzat későbbi fejlődésében zavar lép majd fel. Az extraembrionális endoderma funkciókat oszt meg a végleges endodermával, mely egy olyan szövet, ami végeredményben a szerveket adja (a gyomor-bél traktus, máj, hasnyálmirigy és a tüdő). Számos gén, mely fontos szerepet tölt be az endodermális eredetű szervek fejlődésében, szintén kontrolálja az extraembrionális endoderma differenciálódását. Ez azt jelenti, hogy azon gének elemzését, melyek potenciális szerepet töltenek be az endodermális szervek fejlődésében, nehezíti az a tény, hogy ugyanezek a gének szükségesek az extraembrionális endoderma funkciójának működéséhez is. (Duncan 2005).

3.4 Klónozás

Az emlős állatok körében aszexuális reprodukció nem fordul elő a természetben, bár emlős reprodukciónál előfordulhatnak genetikailag azonos egyének, az egypetűjű ikrek. Ezek azonban ebben a tekintetben nem tekinthetők klónoknak, mert nem ivartalan szaporodás eredményei, valamint a genetikai anyagukat megosztják, míg a mesterségesen előállított

klónok csak a mag DNS-t osztják meg, a mitokondriális DNS-ük különbözik egymástól. (Vajta & Gjerris 2006). Klónok az egy őstől ivartalanul előállított, genetikailag megegyező utódpopulációk, amik a genetika, orvostudomány, gyógyszerkutatás és állattenyésztés számára értékes kutatási alapot jelentenek (Solti 2004). Termékeny és életképes egereket lehet létrehozni szomatikus sejt klónozással enukleált petesejtekbe. Feltehetően azért, mert az átültetett szomatikus sejt genom átprogramozottá válik a petesejtben. Mind a donor sejtmag közvetlen injektálását, mind a sejtfúziót már sikerrel alkalmazzák klónozott egér létrehozására. Az egér klónozás jelenleg viszonylag rutin eljárás, bár még mindig nem hatékony. A sikeres egér klón előállításához szükséges számos faktor továbbra is ismeretlen. Azonban az utóbbi időben nyilvánvalóvá vált számos olyan faktor, mely hatással lehet az embrió fejlődésre: az embrió tenyésztő médium minősége, az in vitro kezelés időtartama, és a recipiens nőtény választása kritikus befolyásolja a klónozás sikerességét (Nagy et al. 2003).

3.4.1 Típusai

Embrió darabolás

Az első állatklónozási kísérletet 1891-ben Hans Driesch végezte blasztomerek szétválasztásával, két-sejtes tengeri sün embriókat tengervízben mechanikus rázatással választotta el. A sejtek önállóan növekedtek és két tengeri sün formálódott belőle (Driesch 1891). Hans Spemann 1902-ben gerinces (szalamandra) sejteket választott szét (Spemann 1902). Ugyanakkor a hatékony kezelési rendszer és elismerés hiánya, akadályozta az eljárás elterjedését az emlősök körében közel 80 évig (Bavister 2002). Végül ez első sikeres embrió felezést házi állaton végezték egy értékes egyed gyors szaporodás elősegítésének céljával. Az eljárás nem bizonyult olyan hatékonynak, mint várták: a technikai nehézségek, a veszélyeztetett terhességek aránya és az eljárás egyszerű matematikai határa miatt nem értékelték kellőképpen (Vajta & Gjerris 2006). A kutatók kezdetben igen egyszerű és könnyen kivitelezhető módszert alkalmaztak egypetűjű ikrek létrehozása céljából: 32-128-sejtes embriókat vágta félbe. Mikromanipulátor segítségével megoldották a szedercsíra embriók négyfelé osztását, de ennél több darabra vágott embrióból és fejlettebb állapotú embriódarabokból már nem sikerült életképes utódokat létrehozni (Gócza 1997). Az embriódarabolás a gyakorlatban is elterjedt, átlagban embriófelezéssel egy embrióból egy borjú születhet, míg nélküle csak 0,6 borjú/embrió lesz egy embrió-átültetéssel. Mivel a

darabolás csak egy-két klón létrehozását eredményezheti, hatékonyabb módszereket kezdtek kifejleszteni (Dinnyés & Bodó 2005).

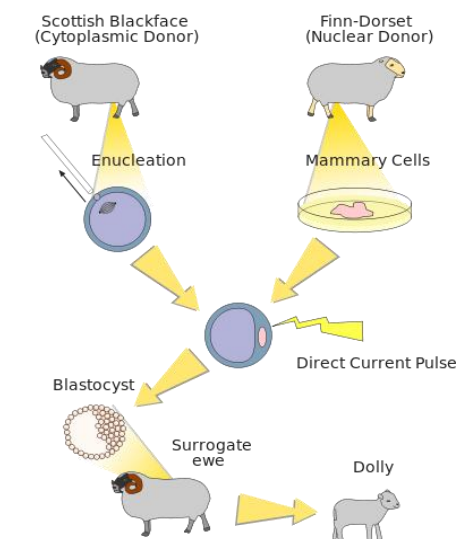
Embrionális sejt klónozás

Az első sikeres, emlős nukleáris transzfert embrionális sejteket használva donorként Illmensee és Hoppe végezte 1981-ben, akik korai embrió sejteket enukleált zigótába juttatva 3 egér születéséről számoltak be (McGrath & Solter 1984). Később Steen Malte Willadsen recipiensként petesejtet használt zigóta helyett (Willadsen 1986). Juhban és szarvasmarhában sejtmag donorként nyolc-tizenhat-sejtes embriók blasztomerjeit, recipiens sejtéket pedig DNS tartalmától megfosztott petesejteket használva sikerült utódokat előállítani (Dinnyés & Bodó 2005). Az embrió sokszorozás hatékonyabb módszerének látszott a sejtmag átültetési módszer, amivel elméletileg nagyobb számban lehet ikreket előállítani. A kísérlet során a recipiens petesejtből kipipettázzák a sejtmagot és a sarki testet, majd citoplazmájába egy másik sejt (donor) sejtmagját, vagy a teljes sejtét juttatják. Azután a két sejt citoplazmáját elektromos impulzus segítségével összeolvasztották, fuzionáltatták. Az elektromos sokk aktiválta a petesejtet, az embrió osztódni kezdett, normális embrionális fejlődés volt megfigyelhető (Gócza 1997).

Szomatikus sejt transzfer (SCNT)

Bár néhány korábbi publikáció már leírta, hogy tenyésztett embriósejtek egy előrehaladott fejlődési stádiumban használhatók donor sejtékként sejtmag átültetésnél, (Sims & First 1993; Campbell et al. 1996) Dolly születése után vált széleskörben elfogadottá, hogy lehetséges egy felnőtt állat klónozása egy felnőtt szomatikus sejt sejtmagjának eltávolításával, és enukleált petesejtbe juttatásával (2. ábra) (Wilmut et al. 1997). A klónozás alapjául szolgáló hámsejtek vemhes állat tögyéből származtak, a vemhesség alatt megnő az emlőmirigy regenerációját elősegítő, viszonylag differenciálatlan őssejtek száma. Az emlőmirigyből készített elsődleges szövettenyészetben a sejtek 98%-

ában differenciálódott sejtek, hámsejtek, myoepithel és fibroblaszt sejtek voltak kimutathatók. Így kezdetben nem lehetett kizárni, hogy nem differenciálódott testi sejteket, hanem őssejteket



2. ábra: Dolly

(<http://hu.wikipedia.org/wiki/Kl%C3%B3noz%C3%A1s>)

használtak fel, de vizsgálatok bebizonyították, hogy Dolly klón, egy hatéves birka genetikai mása.

Az egér klónozásának jelentőségét az adja, hogy rövid a vemhességi ideje (mintegy 20 nap), jól ismert a genetikája, valamint embrióinak könnyű manipulálhatósága révén lehetővé válik magának a klónozásnak, illetve az annak eredményét meghatározó faktoroknak széles körű kísérleti elemzése. Wakayama csoportjának 1999-ben sikerült embrionális őssejtekből származó egérklónokat létrehozni, így egy generáció során hozhatók létre mutáns homozigóta egérvonalak (Baranyai et al. 2000). Döntő szerepe van a recipiens citoplaszt és a donor sejtmag állapotának abban, hogy a bejuttatott sejtmag genetikai anyagát a citoplaszt újra programozhassa és az ismét totipotenssé váljon. A klónozott embriók mélyhűtése még alacsony hatékonyságú, ez is korlátozza gyakorlati felhasználóságát a klónozásnak, valamint a vetélések magas aránya, a megszülendő állatok nagy mérete, illetve a gyakori korai elpusztulás. A problémák pontos oka még nem ismert, de technikai gondokra és genom újraprogramozási hiányosságokra vezethetőek vissza (Dinnyés & Bodó 2005).

A standard SCNT eljárás három lépésből áll: petesejt enukleáció, a donor sejtek beillesztése és a rekonstruált embrió aktiválása. Ezt követően a klónozott embriókat *in vitro* tenyésztik és amikor eléri az embrió transzfer optimális fejlődési állapotát anya állatba ültetik őket (Vajta & Gjerris 2006).

Handmade klónozás (HMC)

Egy viszonylag új megközelítése a nukleáris transzfernek az úgynevezett handmade klónozási technika. Eredetileg embrionális sejtek sejtmag-átültetését módosították a szomatikus sejt transzfer technikához. Ezzel a módszerrel a zóna pellucidát a maturáció után és az enukleáció előtt távolítják el (Vajta et al. 2005).

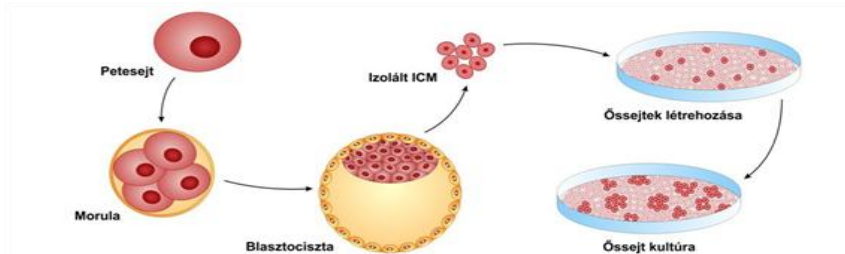
3.5 ES sejtek

Az embrionális őssejtek megfelelő tenyésztési körülmények között folyamatosan osztódnak, és az osztódások során megtartják pluripotenciájukat, önmegújuló képességüket, a sejtek differenciálódni kezdenek, ha az optimális tenyésztési körülmények megváltoznak (Gócza 2004).

Az embrionális eredetű őssejteket (ES sejtek) az embriológiai, sejtbiológiai kutatások számos területén alkalmazzák. Az ES sejteket embrionális környezetbe visszajuttatva kiméra

egereket lehet létrehozni, amelyek minden szövetében megtalálhatók lesznek az ES sejtek utódsejtjei (Bösze & Gócza 2005). ES sejtvonalkat nemcsak egér, hanem más állatfajok embrióiból kiindulva is létre lehet hozni.

3.5.1 Össejt-vonal típusai



3. ábra: Össejt vonal létrehozása

(http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Molekularis_terapiak_hu_book/ch08.html)

A hólyagsíra (blasztula) állapotú egér embrióban már két eltérő fejlődési képességgel rendelkező sejt típus található: a belső sejtsomó sejtjei, illetve a trofektoderma sejtek. Az ICM sejtjeit pluripotensnek

tekintjük, belőlük az embriót kialakító csíralemezek (ektoderma, endoderma és mezoderma) mindegyike kialakulhat (Bösze & Gócza 2005). A pluripotens embrionális eredetű egér őssejtvonalk a blasztociszta embriócsomójából származtathatóak. A blasztocisztát fibroblaszt rétegre helyezve a blasztociszta letapad, a külső trofoblaszt réteg pedig ICM csomót hoz létre. Ha az ICM csomót izoláljuk a tenyészetből az nem differenciálódik, tripszines kezelést követően friss fibroblaszt rétegre téve a kis csomók letapadnak, különböző morfológiájú kolóniákat képeznek (3.ábra). Ezeket ismét izolálni lehet a tenyészetből, átpasszálhatók. Ha a kolóniák egyformák lesznek, akkor rendelkezésünkre áll egy pluripotens embrionális eredetű egér őssejtvonalk. ES-sejtvonalk optimális tenyésztési körülményeknél állandóan osztódó, nem differenciálódó sejtekből épülnek fel. Az ES sejteket hólyagsíra állapotban levő gazdaembrióba injektálva vagy két nyolcsejtes gazdaembrióval aggregáltatva, kiméra utódokat kaphatunk (Gócza 1997).

Embrionális karcinóma vonalak

A teratokarcinómák tumorok, melyek az ivarmirigyekben keletkeznek. Az EC sejteket hólyagsíra állapotú embrió belsejébe juttatva kiméra embriók és magzatok hozhatók létre. Az EC sejtek alkalmazásának határt szabott, hogy az EC sejtvonalk sejtjei gyakran tartalmaztak kromoszóma rendellenességeket (Robertson et al. 1987).

Ősivarsejt eredetű sejtvonalk

Közvetlenül ezekből a sejtekből kiindulva is létre lehet hozni az ES sejtvonalakhoz hasonló fejlődési képességgel rendelkező sejtvonalat: ezek ősvarsejt eredetű sejtvonalak lesznek. Ezeknél több, az imprinting által érintett gén expressziójának mértéke eltért a normális szinttől (Matsui et al. 1992).

Primitív ektoderma-szerű sejtvonálnak (EPL)

Az EPL sejtek a primitív ektoderma sejtekre jellemző tulajdonságokat mutatnak. Az ES és EPL sejtvonalak összehasonlításával az ICM sejtek primitív ektoderma sejtekké történő alakulásában részt vevő gének tanulmányozhatók (Rathjen et al. 1999).

Trofoblaszt eredetű sejtvonalak

Trofektoderma sejtekből hozhatók létre. A TS sejtek, az ES sejtekhez hasonlóan, bekapcsolódhatnak a magzati fejlődésbe, ha hólyagcsíra állapotú embrióba injektálják. A TS sejtek azonban már elkötelezett sejtek, és a trofoblaszt sejtek differenciálódási mintázatának megfelelően differenciálódnak, így a belőlük származó sejtek a méhlepény kialakításában vesznek részt (Tanaka et al. 1998).

3.6 Kiméra

A görög mitológiában a kiméra egy oroszlán fejű, kecske testű és kígyófarkú szörnyeteg volt. Általános fogalomként használva a kiméra olyan dolgot ír le, amely több különböző forrás tulajdonságait egyesíti magában ([http1](#)).

A kiméra fogalma a biológiában genetikai mozaikot jelent, azon élőlényeket, melyek kettőnél több ivarsejtből, szövetből jöttek létre. Két csoportra lehet osztani, elsődleges és másodlagos kimérákra. Ez attól függ, hogy a megtermékenyülés során lépett fel a genetikai többlet, vagy az egyedfejlődés későbbi fázisában, sejtcseré vagy más transzplantáció révén.

A többsejtű élőlények legnagyobb hányadának minden sejtje azonos genetikai információt hordoz, kromoszómái megegyeznek a szülőével, vagy a váltivarúaknál a két szülő egy-egy fél kromoszómakészletének összességével. A zigóta sejtjeinek osztódásánál bekövetkezhet olyan genetikai esemény, mely során a megváltozott tulajdonságú sejtek életképesek maradnak, tovább osztódnak, tulajdonságaikat utódsejtjeiknek átadják, ezen utódok együtt maradva mozaikfoltot alkotnak. Amennyiben az embrióba idegen eredetű

genetikai információ épül be, vagy több embrió összeolvad, ezek is mozaikot alkothatnak. Kiméráról három vagy annál több génkészlet jelenléte esetén beszélünk (http2).

Az első egér kiméra kísérletek több mint 40 évvel ezelőtről származnak, Andrzej Tarkowski (1961) eltávolította a zóna pellucidát két genetikailag eltérő nyolc-sejtes állapotú embrióról és *in vitro* tenyésztette őket fizikai kontaktus mellett. Ezek az aggregátumok életképes kimérákat eredményeztek álvemhes nőténybe való beültetés után. Richard Gardner blasztociszta sejteket injektált blasztocisztába. Az 1960-1980-as években kutatási eszközként kimérákat alkalmazva sok fontos biológiai kérdés tisztázódott az embrionális- és szerv fejlődés terén. Két domináns módszer alakult ki ES sejtek preimplantációs állapotú embrióba juttatására: az úgynevezett injektált kiméra és az aggregációs kiméra (Nagy et al. 2003).

3.6.1 Kiméra típusai

Kiméra létrehozása különböző szövetekből

Diploid (mutáns) embrió - diploid (vad típusú) embrió aggregációs kimérák

Ezen kimérákat egy mutáns és egy vad típusú nyolc-sejtes embrió aggregációjával hozzák létre. Minden embrió képes bármely sejtvonalhoz hozzájárulni az egész magzatban, az extraembrionális membránt is beleértve (Mintz 1962). Ezek a kimérák egyre inkább elterjedtek mutáns fenotípus vizsgálatokban. Általában nyolc-sejtes morula állapotú, heterozigóta mutáns keresztezésű embriókat aggregáltatnak vad típusú embriókkal, hogy a mutáns sejtek viselkedését vizsgálják a vad típusú sejtekben (Rossant & Spence 1998). Mutáns sejtek kizáródása bizonyos sejtvonalból vagy szövetekből, illetve abnormális differenciálódása egy adott szövetben, rámutat a mutáció okozta sejt-autonóm elsődleges hibákra is (Tanaka et al. 1997). Csupán a heterozigóta keresztezésből származó kiméra embriók 25%-a lesz homozigóta mutáns. Ha csak nem történik meg az embriók genotipizálása az aggregáció előtt, genotípus stratégia szükséges, hogy megkülönböztethető legyen az alábbi három kiméra típus: vad típusú- vad típusú, heterozigóta mutáns- vad típusú, homozigóta mutáns-vad típusú. Ezt úgy tudjuk elérni, hogy nyomon követjük a törzs specifikus polimorfizmust, vagy gyakrabban a kérdéses gén molekulárisan jellegzetes mutáns allélját (Hart et al. 2002).

ES sejt- diploid embrió aggregációs és injektált kimérák

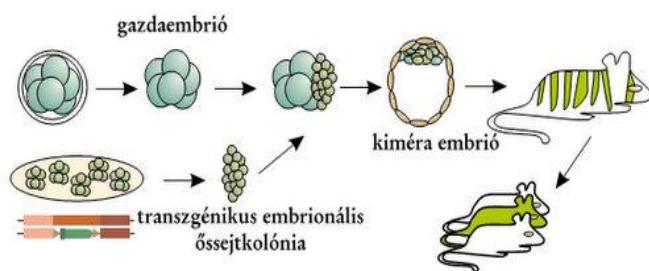
Jelenleg a leggyakoribb eszköz a mutáns fenotípus elemzésére az ES sejt kiméra embrió, melyet a vad típusú ES sejt mutáns embrióba juttatásával hoznak létre és vice versa. Mindkét esetben az epiblaszt genetikai állománya (az egér is) mutáns és vad típusú sejtek keverékéből fog származni. Azonban az ES sejtek nem járulnak hozzá a primitív endoderma vagy trofektoderma sejtekhez, tehát az extraembrionális primitív endoderma és trofektoderma összetétele az ES sejtek és a felhasznált embrió genotípusától függően eltérőek lehetnek. A vad típusú ES sejt és mutáns embrió kiméráknál, a primitív endoderma és trofektoderma mutáns lesz, míg a mutáns ES sejt és vad típusú embrió kiméráknál a primitív endoderma és trofektoderma vad típusú lesz (Tam & Rossant 2003). ES sejt embrió kimérák alkalmazhatók a genetikai mutációk hatásának vizsgálatára az embrionális és extraembrionális sejtekre, valamint a sejtvonal specifikus mutációk hatásának meghatározására az embriókban. Ha homozigóta mutáns ES sejteket használunk, az extraembrionális szövetek nem fogják tartalmazni a mutációt, minden kiméra informatív lesz és nem szükséges genotipizálás (Varlet et al. 1997). Azonban, ha vad típusú ES sejteket használunk mutáns embriókkal, az extraembrionális szövet, valamint az embrió néhány szövete tartalmazhatja a mutációt. Ezért a mutáció hatásának értelmezéséhez a kiméra fejlődése alatt szükséges az embrió genotípusának ismerete. Ez megvalósítható a kiméra extraembrionális szövetéből történő mintavétellel (viscerális endodermából vagy trofektodermából), így meghatározható, hogy mely kimérák tartalmaznak sejteket a homozigóta vagy heterozigóta mutáns embriókból. Egy egyszerűbb vizsgálat a vad típusú és mutáns allélok jelenlétének kimutatására, az összes lehetséges genotípus megkülönböztetése (Tam & Rossant 2003).

Diploid embrió- tetraploid embrió aggregációs kimérák

Ez a kombináció szintén egyedi jellemzőkkel rendelkező kimérákat hoz létre. A tetraploid komponens hozzájárulása a születés előtti fejlődésnél figyelhető meg. Tetraploid sejtek a kimérák nagy részénél csak a placenta trofoblaszt és a szikzacskó endoderm rétegében találhatók (Tarkowski et al. 1977). Ezen kimérák használata a fenotípusos analízisben akkor szükséges, ha az indukált mutáció extraembrionális fenotípussal rendelkezik (Guillemot et al. 1994).

ES sejt- tetraploid embrió aggregációs és injektált kimérák

Az ES sejt tetraploid embrió kimérák esetében, az ES sejt elsősorban az epiblasztból származó szövetekhez járul hozzá, míg a tetraploid embrió sejtjei főleg az extraembrionális primitív endodermát és trofektodermát hozzák létre. Az ES sejtek és tetraploid sejtek



4. ábra: ES sejt tetraploid kiméra létrehozása

(<http://www.nemzetigeografia.hu/node/666>)

sejtekkel azonos genotípusú ES sejtekből származó embrióknál és felnőtt egereknél a fenotípusos vizsgálatot azonnal el lehet végezni (Eggan et al.2001). Az ES sejt genotípusát hordozó nagyszámú embriók állíthatók így elő, megkerülve a mutáns egerek tenyésztésének fáradságos folyamatát. Végül az ES sejt tetraploid embrió kimérák innovatív eszközt nyújtanak a gén funkciók elemzésére (4.ábra).

Tetraploid blasztocisztába injektálva az ES sejteket, olyan teljes mértékben ES-sejt eredetű egereket kapunk, melyek segítségével a módosítás hatása azonnal tanulmányozható vagy kutatási célra azonnal egér kolóniát képezhetnek. Néhány hátránya a tetraploid módszernek: kevés életképes utód születik, így magasabbak a kezdeti költségek, bár később kevesebb idő kell a homozigóta vonal kialakításához. A tetraploid blasztociszta mikroinjektálás ugyan annyi idő, mint a diploid, a tetraploid eljárás magában foglalja további embriókultúra tenyésztési idejét is. Ezen túlmenően az elektrofúziós lépés egy egész napot vesz igénybe, ezt egyébként a diploid blasztocita mikroinjektálásra fordíthatnánk. Tetraploid módszerrel létrehozott utódok azonban hasznos állatok lesznek, mivel a mutáció kétségtelenül jelen lesz a csíravonalban. Ezért a tetraploid módszerből származó alacsonyabb utód hozam hosszabb távon nem ad okot aggodalomra. Továbbá, a tetraploid blasztociszta aggregációs kísérletek azt mutatják, hogy az ES sejtek genetikai háttere, valamint az embrió kínálat kulcsszerepet játszhat az egerek túlélésében. Ezért az embrió és ES sejtek választása is fontos tényező, amikor knockout egereket hozunk létre tetraploid blasztociszta injektálással (Kirchain 2008).

leszármazottainak közel teljes elkülönítése jól használható eszközt nyújt a mutációk hatásának feltárására az embrionális és extraembrionális szövetekben (Tam & Rossant 2003). Ezen túlmenően az ilyen típusú kiméráknál a magzat az ES sejtekből származik. Az ES

3.6.2 A kiméra létrehozás építőkövei

Az egér blasztociszta a beültetés előtt három sejtípust tartalmaz: az epiblasztot és a primitív endodermát, melyek a belső sejt csomóból származnak, valamint a külső trofektoderma réteget. Ez a három sejtípus mutatható ki a kiméra vizsgálatok során, és figyelhető meg a különböző sejtvonalak későbbi fejlődésénél is (Roode et al. 2012). Az epiblaszt hozza létre a három csíra lemezt (ektoderma, mezoderma és endoderma), melyek a magzat összes szöveti progenitor sejtjét tartalmazzák: a viscerális szikhólyag extraembrionális mezodermáját, valamint az allantoist és amniont (bélzsák és magzatburok). A primitív endoderma hozza létre az endoderma viscerális és parietális szikhólyagját, melyek együttesen alkotják a Reichert membránt, amely az egész zigótát körülveszi. A trofektoderma a Reichert membránt és a placenta trofoblaszt rétegét hozza létre (Tam & Rossant 2003).

Kiméra előállítható két teljes nyolc-sejtes embrió kombinálásával, vagy a két barázdálódási stádiumban levő embrió (kettőtől nyolc-sejtes állapotig) blasztomereinek kombinálásával. Mivel ezekben a fejlődési stádiumokban a korai embrionális sejtek sejtvonala potenciálja még nem korlátozott, képesek hozzá járulni az ICM és trofektoderma létrehozásához is. Amikor két diploid nyolc-sejtes embrió vagy két nyolc-sejtes embrió blasztomereit aggregáltatjuk egymással, kimérizmus fordulhat elő az epiblaszt, a primitív endoderma és trofektoderma rétegben is. Ezzel szemben, amikor a diploid blasztociszta ICM sejtjét használjuk kiméra létrehozására, akár mikrosebészeti úton injektáljuk a morulába vagy blasztocisztába, akár nyolc-sejtes diploid embrióval aggregáltatjuk, csak az epiblaszt és primitív endoderma kialakulásához járul hozzá, és a trofektodermához nem. Ez az ICM sejtek korlátozott sejtvonala potenciáljával magyarázható. ES sejtek hasonló helyzetben inkább epiblaszt sejtneként viselkednek. Csak a csíra lemez kialakulásához járulnak hozzá, melyből az összes embrionális szövet, illetve néhány extraembrionális szövet keletkezik (beleértve az amniont (magzatburok), a szikzacskó mezodermáját, az allantoist és az embrió eredetű véredényeket a placentában), de trofektoderma vagy primitív endoderma nem, annak ellenére, hogy *in vitro* az utóbbi sejtípusra képesek differenciálódni (Beddington & Robertson 1989). Azon TS őssejtek, melyek trofektoderma, blasztociszta vagy posztimplantációs trofoblaszt állandó sejtvonalból származnak, csak a kiméra trofektoderma származékaihoz járulnak hozzá (Tanaka et al. 1998).

Amikor tetraploid embriókat és diploid sejteket használnak kiméra létrehozásra, a tetraploid sejtek ritkán járulnak hozzá magához az embrióhoz, elsősorban csak a primitív

endoderma és trofektoderma réteghez (Tarkowski et al. 1977). Diploid és tetraploid sejtek szinte úgy különíthetők el, mint a kiméra két különböző része. Amikor a kiméra létrehozására diploid ES sejteket és tetraploid befogadó embriókat használnak, a kapott zigóta kizárólag ES sejt eredetű magzatból és extraembrionális mezodermából áll, valamint tartalmazni fog tetraploid trofektodermát és primitív endoderma származékokat is. Az ES sejt tetraploid embrió kimérákat széles körben alkalmazzák tetraploid komplementációs vizsgálatokban, elemelve a megváltozott gén funkciójának hatását a sejtvonal fejlődési potenciáljára, valamint a funkcionális kölcsönhatást az embrionális és extraembrionális szövetek között.

Az embrionális eger kimérák bizonyítottan hatékonyak a gén funkciók tisztázására, az egyszerű mutáns fenotípusos jellemzésen túl. Az alkalmazás nem korlátozódik a korai fejlődés embriológiai tanulmányozására, alkalmazható organogenezis elemzésre, születés utáni érés és életfunkciók vizsgálatára is. A genetikai aktivitás módosítható új szekvenciák beépítésével, ami azt jelenti, hogy a gén expressziót feltételesen megváltoztatjuk, vagy módosítjuk a gén funkciót (Tam & Rossant 2003).

3.7 Iker egerek

A nukleáris transzferrel létrehozott klónokkal ellentétben, melyek változatos mitokondriális heterogenitást mutatnak, a tetraploid komplementációs módszerrel létrehozott kimérák azonosak a sejtmagi és mitokondriális DNS tekintetében is (Evans et al. 1999). A mitokondriális funkció általában szabályozható egy kettős genom rendszerrel, a sejtmagi-és mitokondriálisan kódolt gének együttműködésével (Khan et al. 2006).

A több évtizedes különböző kísérleti megközelítések iker egerek létrehozására- mint a morula és hólyagsíra kettéosztása, a hasított embriók aggregációja kiméra létrehozásra, és az embrió szeparálása egyetlen blasztomerre- azt mutatták, hogy a korai emlős embriók, beleértve az eger embriókat is, nagyon rugalmasak azok fejlődési potenciálját tekintve. Általában a blasztomerek kettő, négy-vagy nyolc- sejt embriókból származnak, 1/2, 1/4, 1/8 blasztomerként és egyetlen blasztomerként jelölve őket. Ezek megfelelő befogadó és optimális körülmények között képesek normális termékeny felnőtté fejlődni, totipotensnek nevezhetők. Egyes állatokban, mint például a nyúl, juh-és szarvasmarha, normál felnőtt egyedek már kaptak 1/2, 1/4 és 1/8 blasztomerből (Johnson et al. 1995). Azonban úgy tűnt,

hogy egér esetében csak az 1/2 blasztomer, az 1/4 és 1/8 nem fejleszt egészséges felnőtt állatot (Sotomaru et al. 1998). Abban az esetben, mikor mindkét blasztomert hagyták külön fejlődni, identikus iker állatokat állítottak elő (Mullen et al. 1970).

Azt feltételezték, hogy az 1/4 vagy 1/8 egér blasztomer nem a korlátozott fejlődési potenciál miatt nem képes normális egeret létrehozni, hanem mert alacsony a jelen levő sejt szám a kapott embrióknál a kavitáció elején. Tarkowski úttörő tanulmánya, valamint Wroblewska és Rossant kimutatták, hogy ezen blasztocisztáknál az alacsony teljes sejt szám miatt nagyon kicsi az ICM, vagy egyáltalán nincs is. Annak érdekében, hogy leküzdjék ezt az akadályt, Kelly 1/4 és 1/8 blasztomereket aggregáltatott néhány genetikailag eltérő blasztomerrel, így a sejtek számát normális vagy közel normál szintre állította. Megállapították, hogy az egyetlen blasztomerből származó sejtek jelen voltak a test és az extraembrionális membrán különböző szöveteiben a kiméra magzatnál, állatnál. Ezen kívül azt találták, hogy több magzat, állat, kizárólag egyetlen blasztomerből származik. Ez azt jelzi, hogy az egér egyetlen 1/4 és 1/8 blasztomere is képes a teljes állat előállítására, ha azok hordozó blasztomerekkel vannak segítve. Ezt követően hasonló eredményeket kaptak Tsunoda és munkatársai (1987), valamint Pinyopummin és munkatársai (1994), amikor parthenogenetikus embriókat használtak hordozó sejt forrásként (Tarkowski et al. 2005).

A diploid és tetraploid embriók aggregálásából származó kiméra egereknél a tetraploid hozzájárulás az embrióhoz alacsony arányban fordul elő, a tetraploid sejtek elsősorban az extraembrionális sejtekre korlátozódnak. Bár kezdetben a 4n sejtek nincsenek kizárva az epiblasztból, az implantáció után elvesznek belőle. A négy-és nyolc- sejt embriókat egyetlen blasztomerre osztva és aggregáltatva egy tetraploid hordozó embrióval élve született egereket eredményez (M. Gertsenstein 2010). Identikus ikrek és hármas ikrek születtek egyetlen 1/8 és 1/16 pár blasztomerből tetraploid hordozókkal támogatva. Előre jelzett nemű ikrek és hármas ikrek keletkeztek egyetlen 1/8 blasztomerből. Újabb hasonló módszerrel bizonyították 1/16 és 1/32 blasztomereknek a fejlődését magzattá és kifejlett egerekké (Tarkowski et al. 2001). Már létrehoztak tizenhat-sejt embrió egyetlen külső vagy belső sejtjéből egykétet, ikreket, valamint hármas-és négyes ikreket is. Szórványosan sikerült 32-sejt embrió egyetlen sejtéből magzat előállítása. A konstitutívan expresszázó GFP embriók egyetlen, diploid blasztomerének donorként történő használata, lehetővé teszi a sejt utódainak azonosítását a létrehozott kiméra állatban. Kimutatták, hogy a donor blasztomerek leszármazottjai lokalizálták magukat mindhárom sejtvonalonban (Tarkowski 2010).

Tehát az egér embrió két-sejtes egyetlen blasztomere képes kifejlett egeret létrehozni, esetenként két elválasztott blasztomer is ikreket eredményezhet. A négy-sejtes állapotú izolált blasztomerekből fejlődött embriók beültethetők, de csak szórványosan érik el a késői blasztociszta utáni "small egg cylinders" állapotot. A legtöbb valószínűleg a kavitáció alatt végbemenő sejtszám csökkenés miatt, amely egy kicsi vagy hiányos belső sejt tömeget (ICM) eredményez. Más emlős fajoknál, mint a nyúl és a juh, ahol az implantáció ezen szakaszában a blasztociszta nagyobb, teljes sejt számot tartalmaz, ennek következtében nagyobb a sejt száma az ICM-nek, a négy- sejtes egyetlen blasztomer és olykor a nyolc- sejtes embrió is képes felnőtt egyedé fejlődni. A négy-sejtes embrió négy egyetlen blasztomerjének átültetésével, vagy a négy pár blasztomerból álló nyolc-sejtes embrióból előállítottak ikreket, hármas- és négyes ikreket (Tarkowski et al. 2001).

Kelly (1975, 1977) genetikailag elkülönülő diploid blasztomereket használt segítő sejtként, és bizonyította, hogy $1/4$ és $1/8$ blasztomerek hozzá járulnak az embrionális és extraembrionális szövetekhez a kimérában. Bizonyos esetekben, egyetlen blasztomer képes volt létrehozni a teljes nem-kiméra állatot, azonban a segítő blasztomer kizárólag az extraembrionális szövetekhez járult hozzá. Bár ezek az eredmények bizonyítéknak tekinthetők az egyetlen $1/4$ és $1/8$ blasztomerek totipotenciájára, ezen blasztomerek egyike sem volt önellátó az új egyedek létrehozásában (Pinyopummin et al. 1994). Kelly és mások kísérletei, akik az ő kísérleti tervét követték kimutatták, hogy az $1/4$ és $1/8$ blasztomerek képesek az embrió testét/magzatot/ állatot létrehozni, de csak akkor, ha hordozó sejtekkel támogatják (tetraploid blasztomerek vagy genetikailag elkülönült diploid blasztomerek, normál vagy parthenogenetikus embriók) őket (Tarkowski 2005). Egyetlen adott fejlődési szakaszból származó blasztomer fejlődési potenciáljának értékelés informatív, de annál értékesebb az összehasonlítás a testvér blasztomerek fejlődési potenciálja között. Az egér kísérletekben Mullen és munkatársai (1970), McLaren Tsunoda (1983), Togashi és munkatársai (1987), Wang és munkatársai (1997) és Sotomaru és munkatársai (1998) $1/2$ blasztomerból izolált ikreket hoztak létre, de ennek a hatékonysága meglehetősen alacsony volt. Eddig nem számoltak be születésről és sikeres születés utáni fejlődésről egér négyes ikreknél. Azonban a négyes ikrek előállítása juhoknál, (Willadsen 1981) hármas- és négyes ikrek szarvasmarhánál (Willadsen & Polge 1981, Johnson et al. 1995) négy vagy nyolc-sejtes embrió blasztomereinek elválasztásával azt mutatja, hogy bizonyos emlős fajoknál ezen fejlődési szakaszban minden blasztomer totipotens, nem igényelnek hordozó blasztomer támogatást (Tarkowski 2005).

3.7.1 Iker kutatás jelentősége

A molekuláris genetikai vizsgálatok előretörésével az iker vizsgálatok hasznosabbak, mint valaha, a kvantitatív lókuszos analízis fontossága miatt (Morley 2005). Az iker tanulmányok már meggyőzően bizonyítják az ischaemiás szívbetegség öröklődő aspektusait a koleszterin genetikai varianciájának hatását feltárva (Reed et al. 1991). Identikus iker egerek létrehozásával csökkenteni lehet azon állatok számát, amelyek szükségesek releváns statisztikai adatok létrehozásához, valamint az ikrek fontos információkkal szolgálhatnak az orvosi- és mezőgazdasági alkalmazásokban.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Egér embriók előállítása

Kísérleteink során a kiméra előállításához, donor és recipiens nőtényeket, hímeket és vazektomizált hímeket használtunk. A kísérlet során CD1, C57Bl/6, C57Bl/6 albinó és EGFP/CD1 egér törzseket alkalmaztunk.

A nagyobb számban történő embrió kinyerés érdekében az állatokat szuperovuláltattuk, így nagyobb számú petesejt indulhat érésnek az ösztrusz ciklusban.

Először a nőtény egereket PMSG injekcióval kezeltük, ettől többszörös tüszőérés következik be. A PMSG után 46-48 órával HCG-vel kezeltük (humán korion gonadotropin), mellyel kiváltjuk a fejlődésnek indult tüszők ovulációját, majd a nőtényeket hímek mellé helyeztük. A következő napon plagolni kell, vagyis a Cowper-mirigy váladékának jelenlétével (vagy hiányával) ellenőriztük a párosodást, és a plagos nőtényeket külön választottuk a hímeiktől.

Az embriókat szuperovuláltatott vemhes nőtény petevezetőjét átmosva nyertük ki, majd egy üveg kapilláris és kézi pipettor segítségével gyűjtöttük össze a kimosó folyadékból. Ezt követően néhány M2 médium cseppben átmostuk az embriókat, majd ásványi olajjal lefedett KSOM cseppbe helyeztük azokat. Ezt követően 37°C-on, 5% CO₂ mellett továbbtenyésztettük az embriókat a megfelelő fejlődési állapot eléréséig.

Az egér embriókat 24 vagy 48 órán át inkubáltuk az aggregációs kísérletekben: mivel a zona pellucida eltávolítása növeli az embriók érzékenységét, a siker eléréséhez optimális tenyésztési körülmények fenntartása feltétlenül szükséges. A zigóták többsége eléri a blasztociszta állapotot, ez mutatja az optimális tenyésztési körülményeket. Mivel az embriók nem tolerálják a pH és hőmérséklet változásokat, minimális időnek kell eltelni, míg az embriók a tenyésztő edénybe kerülnek a sikeres embrió kultúra létrehozás érdekében.

4.1.2 Embrió előkészítése

Az M2 médiumot tegyük szobahőmérsékletre, készítsünk tenyésztő edényeket ekvilibrált KSOM-AA médiumot és olajt használva, ha ezek nem voltak előző nap előkészítve. Húzzunk embrió manipulációs pipettákat. Vágjuk ki a petevezetőt a vemhes nőtényből, majd helyezzük M2 cseppbe. Az eltelt idő az embrió donor boncolása és a

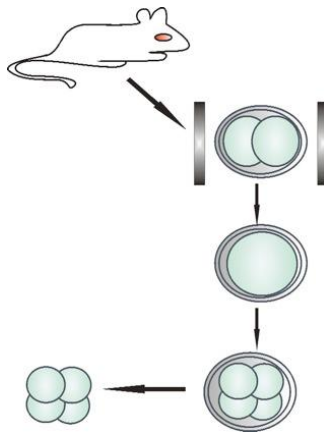
tenyésztő edénybe helyezés között a lehető legkevesebb legyen (ideálisan nem több mint 20-30 perc). Ez legfőképp a két-sejtes embriók esetében fontos, mert érzékenyebbek, mint morula állapotban. Kísérleteinkhez is két-sejtes embriókat használtunk, melyeket a megtermékenyítés utáni 2. napon nyertünk ki. Ne boncoljunk több donor nőtényt, mint amit 20-30 percen belül kezelni tudunk. Tegyük a petevezetőt egy kis csepp M2-be. Használjuk a boncoló mikroszkópot, illesszük be az öblítő tűt, csatlakoztassuk egy 1ml-es M2-vel töltött fecskendőhöz, juttassuk az infundibulumba, és óvatosan nyomjuk az öblítő tű hegyét az edény aljához, hogy az edény a helyén tartsa. Csipesz segítségével tartsuk a tűt a megfelelő pozícióban. Mossuk át a petevezetőt M2 médiummal, figyeljük meg a megduzzadását. Folytassuk a maradék petevezetővel, miközben a manipuláció idejét az M2 médiumban a minimumon próbáljuk tartani. Gyűjtsük össze az embriókat a húzott embrió manipulációs pipettát használva. Mossuk őket több M2 cseppben, hogy megszabadítsuk minden törmeléktől. Mossuk az embriókat több csepp ekvilibrált KSOM-AA médiumon keresztül, és tegyük szövettényesztő edényben az inkubátorba.

4.2 Tetraploid embriók

Tetraploid egér embriókat a két-sejtes állapotú implantáció előtti embriók blasztomereinek elektrofúziójával állítottuk elő. A sejtsztódásban, amit a fuzionált sejtek genetikai anyagának replikációja követ, a kapott két-sejtes embriók nukleuszai dupla diploid DNS tartalommal rendelkeznek, vagyis tetraploidok lesznek. A tetraploid embriók blasztociszta állapotig jól fejlődnek, bár sejt számuk jelentősen lecsökken. Azonban rendszerint normálisan beágyazódnak, mert a tetraploid trofektoderma és a trofoblaszt származhat tetraploid sejtekből.

A fúzió kezdetén a sejtfúziós gépen állítsuk be a paramétereket. A két-sejtes embriók blasztomer fúziója, akkor jelentkezik, ha DC elektromos impulzust alkalmazunk a blasztomer kapcsolat síkjára merőlegesen. Az elektróda kamra használatától függnék az értékek. A fúzióhoz alkalmazzunk egy vagy két impulzust, 30-40 V és 40-50 μ sec-on, az ICR embriókhoz nem elektrolit oldatban (mannitol). A kísérletek során CF-150B sejtfúziós eszközt a (BLS Ltd), és 250 μ m elektród kamrát használtunk. A szabályozható 1 MHz AC mező (1V) lehetővé teszi a két-sejtes embriók megfelelő orientációját az elektród kamrában. Az aktuális paraméterek eltérhetnek az eszközök és egértörzsek között, ezt kísérleti tapasztalatokból lehet megállapítani. A cél az, hogy legalább 80%-os legyen a fúzió 10-30

perc alatt az embriók lízise nélkül. Töröljük át az elektróda kamrát 70%-os etanollal. Csatlakoztassuk az impulzus generátorhoz és tegyük 100mm-es petri-csészébe. Helyezzünk két nagy csepp M2 médiumot, valamint több csepp mannitol oldatot a csészébe. Tegyük mannitol cseppet az elektród kamra fölé. Az összegyűjtött embriókat legalább 15 percig inkubálni kell az elektromos impulzus alkalmazása előtt. Helyezzünk 4x25-30 embriót az első M2 cseppbe. Az első csoport embriót mannitol cseppel öblítjük, gyorsan pipetázzuk fel-le. Helyezzük az embriókat az elektródák közé, úgy hogy egymástól elhatárolódjanak. Az AC



5. ábra: Fúzió

mező (1 V) az elektródára merőlegesen orientálja az embriókat, miközben ők felsorakoznak a kamrában. Kézzel mozgassuk az embriókat, melyeket az AC mező nem orientált megfelelően. Ha minden embrió megfelelően orientálódott, ráadhatjuk az impulzust. Nagyon fontos, hogy folyamatosan figyeljük az embriókat, és tegyük a fuzionált (hasonló, mint az egy- sejtes) embriókat friss cseppbe. Mikor az embriók helyrejuttek a második mitotikus osztódás során, sikeresen fuzionáltak és tetraploid embrióvá osztódtak, már könnyen összetéveszthetők a nem fuzionált diploid két-sejtes embriókkal. Alkalmanként az egyik blasztomer lizál a

fúzió közben, az ilyen embriókat nem tesszük a fuzionált tetraploid embriók közé (5.ábra).

Közvetlenül az összeolvadás után az embriókat helyezzük át az elektród kamrából a második M2 cseppbe. A kezelt embriókat mossuk keresztül több csepp M2 és ekvibrált KSOM-AA médiumon. Helyezzük őket az előkészített KSOM cseppeket tartalmazó, ásványi olajjal fedett petri-csészébe, majd inkubátorba.

Az egy éjszakán át tartó inkubáció után, a négy-sejtes embriókat használtuk az aggregációra. Optimális tenyésztési körülmények között legalább 80%-osnak kell lennie a fuzionált embriók négy-sejtesre történő fejlődésének. Az egy-sejtes állapotban maradt embriók nem használhatóak az aggregációhoz. A két-sejtes késleltetett embriókat később aggregáltatni lehet a nap folyamán, miután négy-sejtessé fejlődtek.

az embriókat néhány csepp ekvibrált KSMO-AA-n keresztül; helyezük őket egyénileg az aggregációs petri-csészébe.

Az aggregációs petri-csésze mélyedéseibe egyetlen, vagy több blasztomert, és egy megfelelő genotípusú tetraploid gazda-embriót helyeztünk egymás mellé (6.ábra). Donor embrióként C57Bl/6 és EGFP/CD1 törzseket, befogadóként pedig C57Bl/6 albínó és CD1 embriókat használtunk. A kiméra embriókat 24 órán át tovább tenyésztettük KSOM médiumban, 37°C-on, 5% CO₂ mellett.

4.4 Embrió beültetés

24 órás tenyésztést követően (87 hpg) a blasztocisztákat a 2,5 napos (dpc) álvemhes nőtények mindkét méhébe ültették. Segítőként helper embriókat is beültettünk a méhbe. A beültetésre váró embriókat médium cseppbe helyeztük. Az ültetéshez szájpipettát használtunk. A recipiensenőtényt intraperitoneálisan Avertinnel (2,2,2 tribromoetilalkohol) altattuk. A hát kültakaróján ejtett bevágáson át, éles csipesszel az izmot átdöfve a méhet a seben keresztül kiemeltük, és a zsírszövetet szerafinnal rögzítettük. A méh üregének felső harmadába döftünk egy tűvel, majd a szűrési csatornán bevezettük az ültető kapillárist. A méh lumenébe érve óvatosan bejuttattuk az embriókat. A sebet kapocccsal zártuk. Az alvó recipienseket ébredésig melegben tartottuk. Másnap ellenőriztük egészségi állapotukat.

4.5 Statisztikai vizsgálat: F-próba

Az egyenlő szórásnégyzetek ellenőrzésére használják. Két csoport teljesítménye azonos átlag esetén is különbözhet a különböző szórás miatt. Az F- próba arra ad választ, hogy ez az eltérés szignifikáns-e.

A vizsgálat menete: (Fisher-Snedecor eljárás)

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

Az F próba táblázatában két szabadságfok (=minta elemszáma-1) van:

1. az 1. minta elemszáma-1

2. a 2. minta elemszáma-1

- ha $F > F_{\text{táblázat}}$, akkor a varianciák különbsége nem a véletlen hatása, vagyis a különbség szignifikáns, tehát a kétmintás t-próba nem végezhető el. Ekkor a t-próba helyett pl. a Welch-próbát szokták alkalmazni.

- ha $F < F_{\text{táblázat}}$, akkor az átlagok különbsége a véletlen hatása, vagyis a különbség nem szignifikáns, tehát a kétmintás t-próba elvégezhető.

4.6 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).

5. Eredmények és értékelésük

Kísérleteink során tetraploid komplementációs módszerrel iker egereket hoztunk létre. A TDK munkám elkészítésénél a célom az volt, hogy minél nagyobb számban kapjak iker utódokat. A kiméra előállításához C57Bl/6, EGFP/CD1, CD1 és C57Bl/6 albínó egértörzseket alkalmaztunk. Donor embrióként EGFP/CD1 és C57Bl/6 egértörzseket használtunk, és a blasztomereket C57Bl/6 esetében négy- és kétfelé, EGFP/CD1 egereknél pedig négyfelé osztottuk. Gazda embrióként pedig C57Bl/6 albínó és CD1 egereket alkalmaztunk.

A tetraploid embriókat diploid embriók fúziójával készítettük. Munkánk során első feladatként a tetraploid embriók létrehozásához szükséges optimális fúziós paramétereket próbáltuk beállítani. Ehhez CD1, C57Bl/6alb és CD1/EGFP egerek embrióit fúzionáltattuk CF-150B típusú elektrofúziós készülékkel. A kísérlethez összesen 280 egér embriót használtunk fel. Ebből 166 embriót fúzionáltattunk és 107 darab lett négy-sejtes tetraploid (1.táblázat).

1. táblázat: A fúziós paraméterek eredményei a különféle genotípusú egereknél

Genotípus	Fúziós paraméterek				Embrió	Fúzionált embrió	4-sejtes tetraploid
	V	μs	~V	Ismétlés			
CD1/EGFP-1	30	40	2	2	45	15	14
CD1/EGFP-3	40	45	2	2x2	5	3	3
C57Bl/6alb-3	40	45	2	2x2	100	55	27
CD1-1	30	40	2	2	27	15	14
CD1-2	30	40	1	2	21	10	10
CD1-3	40	45	2	2x2	82	68	39
Összesen					280	166	107

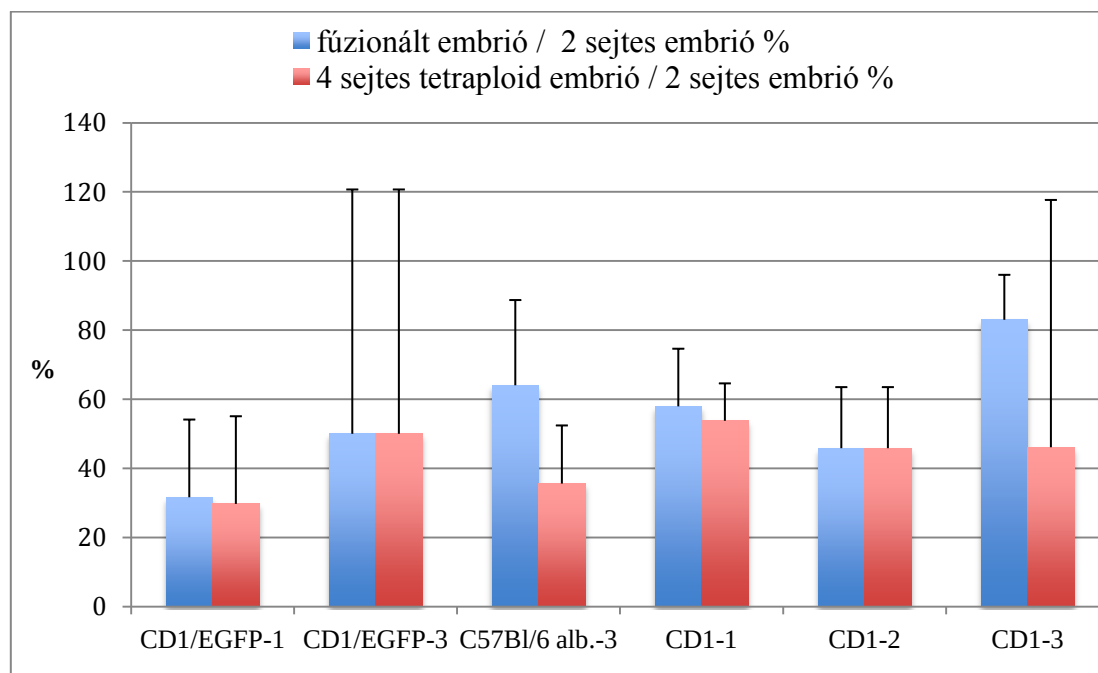
Három fúziós paraméterrel próbálkoztunk (2.táblázat):

1. 30 V, 40 μs-ig tartó 2 kV/cm-es négyszögjel karakterisztikájú két ismételtsben,
2. 30 V, 40 μs-ig tartó 1 kV/cm-es négyszögjel karakterisztikájú két ismételtsben,
3. 40 V, 45 μs-ig tartó 2 kV/cm-es négyszögjel karakterisztikájú kétszer két ismételtsben.

2. táblázat: Az alkalmazott három fúziós paraméter %-os eredményei

Fúziós paraméterek						fúzionált embrió / 2 -sejtes embrió %	4- sejtes tetraploid embrió / 2- sejtes embrió %
	Genotípus	V	μs	~V	ismétlés		
1.	CD1/EGFP-1	30	40	2	2	31,63	29,71
3.	CD1/EGFP-3	40	45	2	2x2	50	50
3.	C57Bl/6alb-3	40	45	2	2x2	64,04	35,59
1.	CD1-1	30	40	2	2	57,94	53,77
2.	CD1-2	30	40	1	2	45,83	45,83
3.	CD1-3	40	45	2	2x2	83	46,1

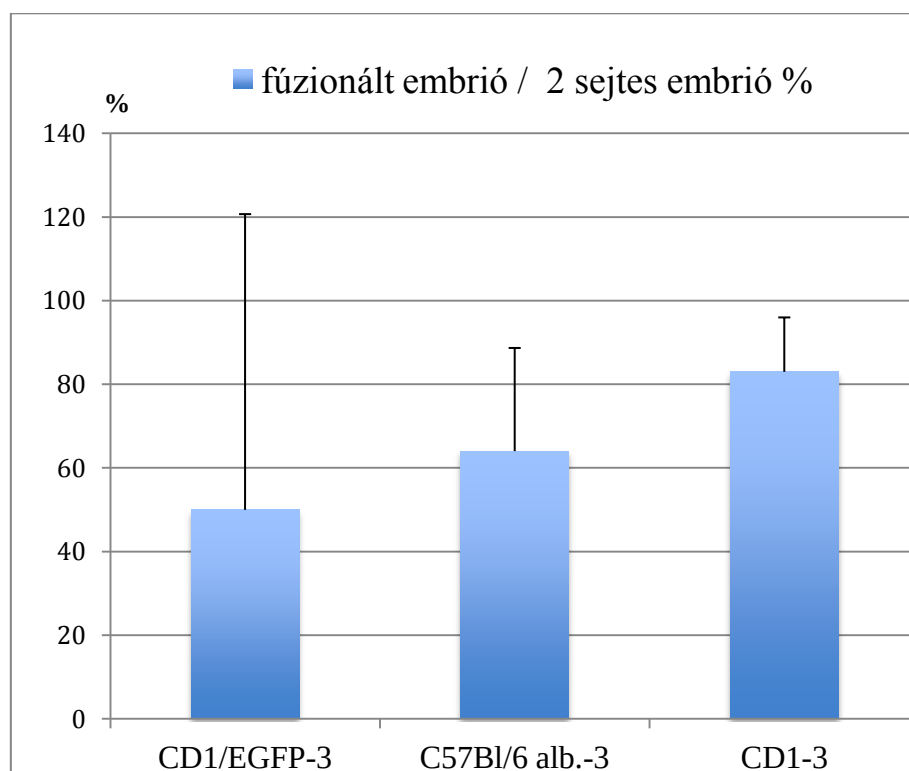
A legjobb eredményeket akkor kaptuk, amikor az embriókat az elektromos cellában kétszer, 45 μs tartó, 2 kV/cm-es négyszögjel karakterisztikájú, 40V egyenáramú elektromos impulzus adásával kezeltük (2.táblázat 3.paramétere). Tehát a fúzionáltatásnál a 3. paraméter a legjobb minden genotípus esetében, bár szignifikáns különbséget nem lehet megállapítani (7.ábra).



7. ábra: Fúzionált embriók %-os aránya a különféle paraméterek és genotípusok esetében

3. táblázat: A fúzionált embriók továbbfejlődése

Genotípus	V	μs	~V	repeat	embrió	4-sejtes tetraploid
C57/b6alb	40	45	2	2x2	10	5
C57/b6alb	40	45	2	2x2	8	3
C57/b6alb	40	45	2	2x2	52	6
C57/b6alb	40	45	2	2x2	30	13
Összesen					100	27 (27%)
CD1	40	45	2	2x2	10	18
CD1	40	45	2	2x2	10	
CD1	40	45	2	2x2	8	
CD1	40	45	2	2x2	10	
CD1	40	45	2	2x2	10	11
CD1	40	45	2	2x2	9	
CD1	40	45	2	2x2	9	
CD1	40	45	2	2x2	8	10
CD1	40	45	2	2x2	8	
Összesen					82	39 (47,6%)

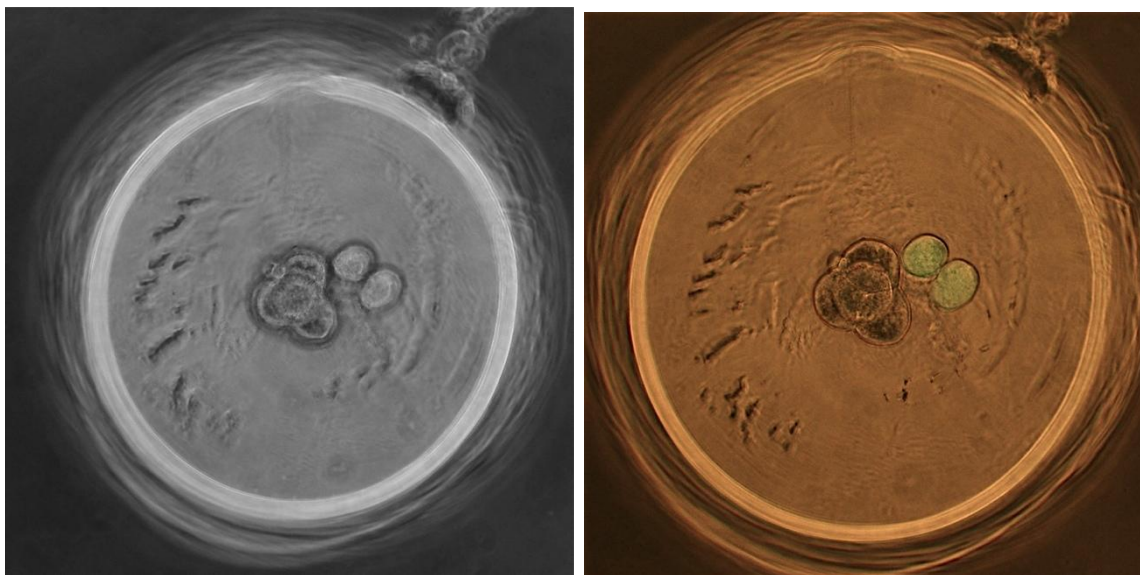


8. ábra: A fúzionált embriók arányának összehasonlítása a CD1/EGFP, C57Bl/6 alb. és CD1 egértörzsek között

C57Bl/6 albínó egerek esetében a négy- sejtes tetraploid embriók aránya az összes felhasznált embrió számához viszonyítva 27% lett. CD1 egértörzs alkalmazása esetén 47,6%-a fejlődött tovább négy- sejtes embrióvá (3.táblázat). EGFP/CD1 embriók esetében kevés adat állt rendelkezésünkre, így a továbbiakban a CD1 és C57Bl/6 albínó embriók fúziós arányát hasonlítottuk össze.

A fúziós adataink alapján megállapítottuk, hogy a CD1 egér embriók fúziós aránya lett a legmagasabb, ha a 3. fúziós paramétereket alkalmaztuk (83%), bár szignifikáns különbség nem figyelhető meg (8. ábra). Összesen 182 CD1 és C57Bl/6 embriót fuzionáltattunk különböző paraméterekkel (3. táblázat), és ebből 39 lett négy- sejtes tetraploid . Így további vizsgálataink során az elő kísérletekben legalkalmasabbnak talált 3. számú paraméterekkel a CD1, illetve a C57Bl/6 albínó genotípusú embriókat alkalmaztunk tetraploid gazda embrióként.

Kísérleteink következő lépése tetraploid aggregációs kimérákkal iker egerek létrehozása volt. A kiméra embriókat tetraploid gazda embriók és donor embrióból származó blasztomereket aggregáltatva készítettük (9.ábra). A blasztomer donor embriók C57Bl/6 és EGFP/CD1 genotípusúak, a tetraploid gazda embriók pedig CD1 és C57Bl/6 albínó genotípusúak voltak. Az így létrehozott kiméra embriókat recipiens nőténybe, helper embriókkal együtt ültettük vissza.



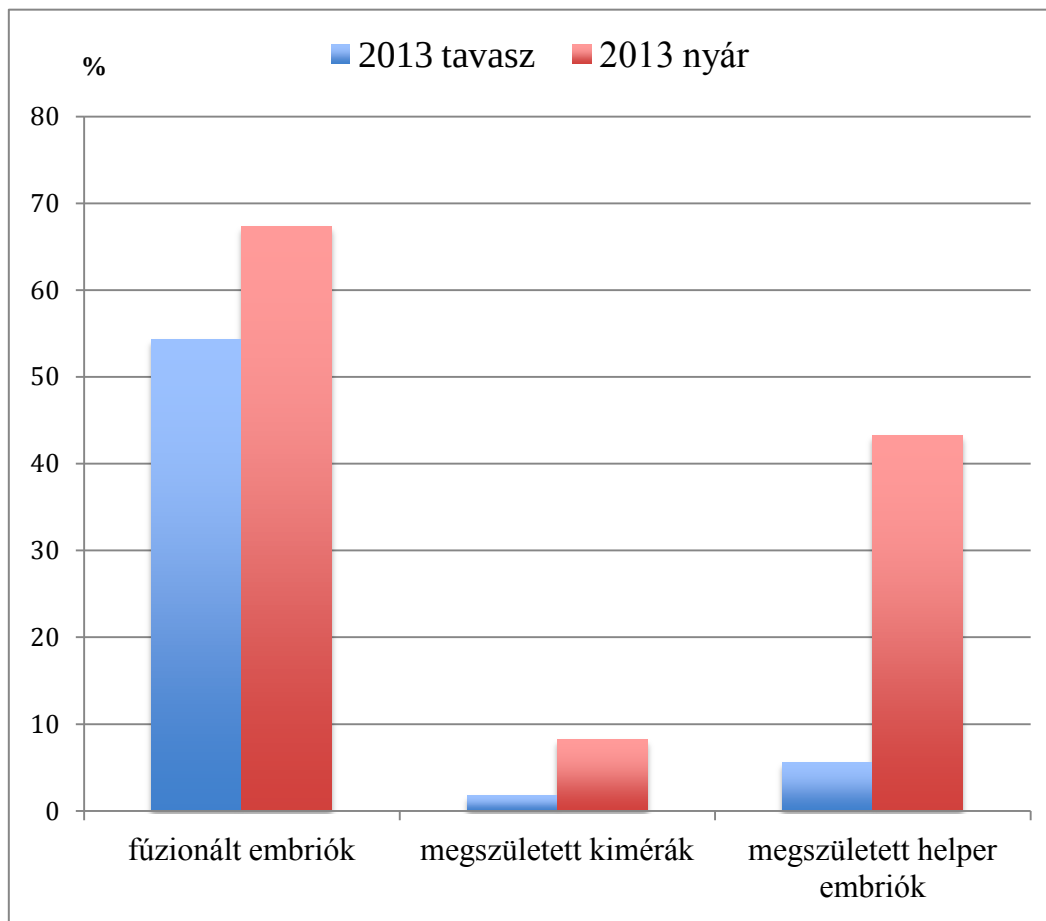
9. ábra: Kiméra embrió létrehozása

A kísérlet sorozat során összesen 511 nőstényből 1666 embriót sikerült beültetni. A fúzionált tetraploid embriók száma 416 volt, ez 57,9%-os fúziós arányt jelent. Ebből 105 lett jó kiméra, melyek összesen 199 helper embrióval együtt lettek 109 recipiens nősténybe beültetve. Az újszülöttekből 5 kiméra származott. Ez a megszületett kimérák és beültetett kiméra embriók %-os arányát tekintve 4,8% (4.táblázat).

4. táblázat: Kiméra kísérletek összegzése

Kísérletek	Tavaszi (2013)	Nyári (2013)	Összesen 2013
Hormon kezelt nőstények száma	366	145	511
Plag+ donor nőstények száma	229	83	312
Recipiens nőstények 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

A nyár folyamán nagy számú helper és egyke újszülöttet kaptunk. Ekkora nagyobb gyakorlatot szereztünk, és ez valószínűleg optimális reprodukciós időszak az egerek számára (10.ábra).



10. ábra: A tavaszi és nyári kísérletek sikerességének összehasonlítása

5. táblázat: A gazda embrió genotípus hatásának vizsgálata

Gazda embrió genotípusa	Beültetett kiméra embriók száma	Beültetett helper embriók száma	Beültetett kiméra embriókból származó újszülöttek száma	Újszülöttek / beültetett kiméra embriók aránya (%)	Beültetett helper embriókból származó újszülöttek száma	Újszülöttek / beültetett helper embriók aránya (%)
C57alb(T)	22	28	1	4,5	5	17,9
CD1(T)	131	171	4	3,1	36	21,1

Kísérleteink során azt vizsgáltam, hogy hogyan befolyásolja a tetraploid gazda embrió genotípusa a beültetett kiméra embriókból megszülető utódok arányát. C57Bl/6 albínó egértörzsből 22 kimérát ültettünk be (6.táblázat), CD1 genotípusából pedig 131 kimérát (7. táblázat). Az előbbi esetben 4 kiméra embriót kaptunk, míg az utóbbinál 1 kiméra embrió lett az újszülöttek között. Ez a született kimérák %-os arányát tekintve 3,1% (CD1), illetve 4,5% (C57/Bl6 albínó) (5.táblázat).

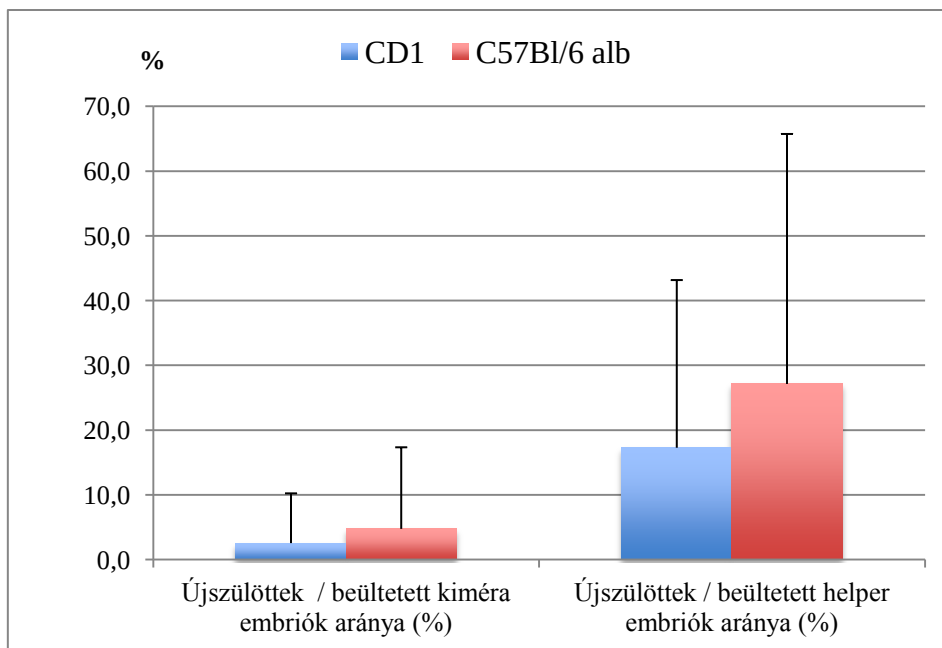
6. táblázat: C57Bl/6 albínó genotípusú gazda embrióból született kimérák és helper embriók

Kísérlet	Gazda embrió genotípusa	Beültetett kiméra embriók száma	Beültetett helper embriók száma	Beültett kiméra embriókból származó újszülöttek száma	Beültett helper embriókból származó újszülöttek száma	Újszülöttek /beültetett kiméra embriók aránya (%)	Újszülöttek / beültetett helper embriók aránya (%)
C57/1	C57alb(D)	3	4	0	0,00	2	50,00
C57/2	C57alb(T)	3	5	0	0,00	0	0,00
C57/3	C57alb(T)	3	1	1	33,33	1	100,00
C57/4	C57alb(T)	2	5	0	0,00	2	40,00
C57/5	C57alb(T)	3	4	0	0,00	0	0,00
C57/6	C57alb(T)	4	4	0	0,00	0	0,00
C57/7	C57alb(T)	4	5	0	0,00	0	0,00
	sum	22	28	1	4,55	5	17,86
	átlag	3,1428	4	0,1428	4,7619	0,7142	27,142
	SD	0,6900	1,4142	0,3779	12,598	0,9511	38,606

7. táblázat: CD1 genotípusú gazda embrióból született kimérák és helper embriók

Kísérlet	Gazda embrió genotípusa	Beültetett kiméra embriók száma	Beültetett helper embriók száma	Beültett kiméra embriókból származó újszülöttek száma	Beültett helper embriókból származó újszülöttek száma	Újszülöttek / beültetett kiméra embriók aránya (%)	Újszülöttek / beültetett helper embriók aránya (%)
CD1	CD1(T)	2	3	0	0	0	0
CD2	CD1(T)	2	3	0	0	1	33
CD3	CD1(T)	2	7	0	0	0	0
CD4	CD1(T)	4	6	0	0	1	17

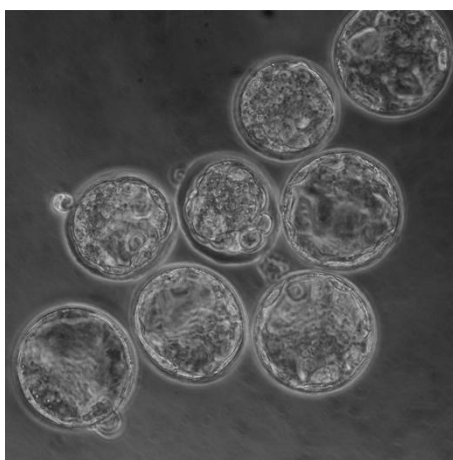
CD5	CD1(T)	2	6	0	0	0	0
CD6	CD1(T)	2	3	0	0	0	0
CD7	CD1(T)	4	3	0	0	0	0
CD8	CD1(T)	2	5	0	0	1	20
CD9	CD1(T)	2	5	0	0	0	0
CD10	CD1(T)	4	4	0	0	0	0
CD11	CD1(T)	4	4	0	0	0	0
CD12	CD1(T)	4	6	0	0	0	0
CD13	CD1(T)	3	5	0	0	0	0
CD14	CD1(T)	3	4	0	0	0	0
CD15	CD1(T)	2	4	0	0	0	0
CD16	CD1(T)	4	5	0	0	0	0
CD17	CD1(T)	2	2	0	0	0	0
CD18	CD1(T)	4	0	0	0	0	0
CD19	CD1(T)	4	0	0	0	0	0
CD20	CD1(T)	3	3	0	0	0	0
CD21	CD1(T)	3	3	0	0	0	0
CD22	CD1(T)	4	6	0	0	3	50
CD23	CD1(T)	4	4	0	0	2	50
CD24	CD1(T)	4	4	0	0	0	0
CD25	CD1(T)	1	2	0	0	1	50
CD26	CD1(T)	4	8	0	0	2	25
CD27	CD1(T)	4	7	1	25	2	29
CD28	CD1(T)	4	8	0	0	3	38
CD29	CD1(T)	4	6	1	25	6	100
CD30	CD1(T)	4	6	1	25	3	50
CD31	CD1(T)	4	4	0	0	0	0
CD32	CD1(T)	4	6	0	0	3	50
CD33	CD1(T)	4	5	1	25	4	80
CD34	CD1(T)	4	6	0	0	2	33
CD35	CD1(T)	4	4	0	0	0	0
CD36	CD1(T)	4	4	0	0	2	50
CD37	CD1(T)	4	4	0	0	0	0
CD38	CD1(T)	4	4	0	0	0	0
CD39	CD1(T)	4	2	0	0	0	0
	összegzés	131	171	4	3	36	21
	átlag	3,359	4,385	0,103	2,564	0,923	17,29
	SD	0,9315	1,8583	0,3073	7,6839	1,4397	25,89



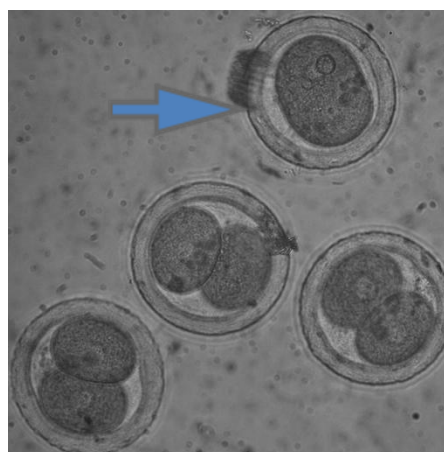
11.ábra: CD1 és C57Bl/6 albínó gazdaembrió összehasonlítása

Sajnos egyik genotípus esetében (C57Bl/6 albínó és CD1) sem sikerült kettes ikreket kapni, és nem találtunk összefüggést a megszületett embriók száma és a gazda embrió genotípusa között. Tehát a különféle genotípusú befogadó embriók esetében nincs szignifikáns különbség a megszületett egykék %-os aránya tekintetében, ezt az f-próba is alátámasztotta (11.ábra, 6. és 7. táblázat).

A 12. ábrán a beültetés előtti helper embriók (A) illetve közvetlenül a fúzió utáni embriók láthatók (B): A 12. B ábrán a nyíl a már fúzionált embriót jelzi, a többi körülötte még nem fuzionált.



12. ábra: A: helper embriók



B: Fúzió utáni gazda embriók

A képeken a kísérletekben létrehozott élő egyke és helper embriók láthatók (13. ábra). A nyilak a kiméra embriókból megszületett utódokat jelölik, a többi helper embrió.



13. ábra: Egyke és helper embriók

6. Következtetések és javaslatok

A kiméra egerek számos gén funkciójának tisztázásában segítettek már. Az ES sejtvonalakból többféle módszer segítségével állíthatunk elő kiméra egereket. A tetraploid komplementációs technológia segítségével sikerült létrehozni teljesen sejtvonal eredetű, élő, utódokat is. Ma ezt a módszert alkalmazzák annak igazolására is, hogy egy újonnan létrehozott egér ES sejtvonal valóban pluripotens. A tetraploid komplementációs módszerrel előállított utódokban a genetikai módosítás minden sejtben jelen lesz, így természetesen minden ivarsejtjében, s utódjaikban is.

Sajnos a tetraploid kiméra embriókból megszülető újszülöttek kevésbé életképesek, mint a normál kiméra embriók. Korábbi megfigyelések kimutatták, hogy ha nyolc-sejtes embrióba injektálják az ES sejteket az növeli az ES sejtek arányát a megszülető kiméra állatokban, s nagy arányban lesznek ivarsejt kimérák is. Korábbi tanulmányok azt mutatták, hogy az ES sejtek genotípusa és a gazda embrió genotípusa is lehet meghatározó abban, hogy sikerül-e ivarsejt kiméra állatokat létrehozni. A C57Bl/6 albínó embrió megfelelő gazda embrióként bizonyult C57Bl/6 embrióból származó ES sejtek esetében. Azt is megállapították, hogy a nagy számú passzáláson átesett ES sejtek esetében a CD1 embriók már nem voltak ideális gazda embriók. Munkám során én nem találtam számottevő különbséget a C57Bl/6 albínó és CD1 embriót gazda embrióként használva, a megszületett kiméra embrióból származó utódok arányában.

A két-és nyolc- sejtes emlős embrióból származó egyetlen blasztomer képes magzattá fejlődni. A blasztomerek csak két-sejtesen totipotensek, de négy, illetve nyolc sejtes embrió egyetlen blasztomerje is képes egy tetraploid gazda embrióval aggregáltatva mind az ICM, mind pedig a TE rétegébe beépülni a kialakuló kiméra embrióként. Amikor tizenhat- sejtes embrió blasztomerjeit alkalmazták, kettes, hármas- és négyes ikreket is sikerült létrehozni (Tarkowski, 2001, 2005, 2010). Az általuk alkalmazott 40V, 25 μ s-ig paraméter esetében, C57Bl/6, UBI-GFP/BL6 (hibrid) genotípusú embriókat alkalmaztak.

Sharron M. Kirchain (2008), szintén ES sejteket és tetraploid embriókat aggregáltatott. Fúziós paramétere: 2V, 50V 35 μ s-ig volt. Kísérletükben az alkalmazott egértörzseknél CD1, C57Bl/6 és B6D2F1(hibrid), ez a fúziós paraméter bizonyult a leghatékonyabbnak.

Mi a 40V, 45 μ s tartó, 2 kV/cm-es fúziós paraméterekkel CD1 egértörzs esetén 83 %-ban, C57Bl/6 egereknél pedig 64%-ban kaptunk fuzionált embriókat.

Wakayama és munkatársai (2008) két-, nyolc- sejtes állapotú embriókat fúzióáltattak és ezen embriókat aggregáltatták ES sejtekkel. Optimalizálták a befogadó gazda embriók számát, és arra az eredményre jutottak, hogy a 3 darab gazda embrió alkalmazása esetében kapható a legnagyobb arányban megszülető ES eredetű utód. M. Gertsenstein (2010) nyolc-sejtes embriók és egy-vagy két tetraploid embrió aggregációjával iker egereket állított elő. Mi kísérleteinkben egyetlen tetraploid embriókat alkalmaztunk, követve laboratóriumunkban korábban leírt módszert (Carstea et al. 2005), de a későbbiekben tervezzük két, három tetraploid gazda embriókat alkalmazva is megnézni a kiméra embriók fejlődési potenciálját.

Amennyiben az optimalizált tetraploid komplementációs módszer alkalmazásával sikerül identikus iker egereket létrehozunk, azok magatartás genetikai vizsgálatát követően, a szöveteik epigenetikai összehasonlítását tervezzük.

7. Összefoglalás

Több évtizede foglalkoztatja a kutatókat az, hogyan lehetne iker egereket létrehozni. Különböző kísérleti megközelítéseket dolgoztak ki. Szedercsíra, vagy hólyagcsíra állapotú embriókat próbáltak meg kettévágni, két-, négy-, nyolc-sejtes embriókat szedtek szét blasztomerekre, aggregáltattak zóna pellucida nélküli embriókat, majd ezeket a fél embriókat, kimérákat, blasztomereket, álvemhes nőtényekbe visszaültetve próbáltak meg iker embriókat létrehozni, több-kevesebb sikerrel. Mára az iker kutatások segítségével számos új felfedezés látott napvilágot. Az iker vizsgálatok hasznosságát meggyőzően támasztják alá a szívrendellenességek, illetve a magas koleszterin szint okozta megbetegedések vizsgálata terén elért új eredmények. Az iker egerek összehasonlításából kapott adatok értékes új információkat adhatnak mind orvos biológiai, mind pedig az agrárkutatások területén. Iker egereket használva a vizsgálatokban lényegesen csökkenteni lehetne azon állatok számát, melyek szükségesek releváns statisztikai adatok létrehozásához.

Kísérleteink során aggregációs kimérákat állítottunk elő. A kiméra olyan élőlény, amelyet két fajhoz vagy fajtához tartozó egyed, vagy embrió szöveteiből, sejtjeiből hoznak létre. A vizsgálataink célja tetraploid aggregációs kimérák előállításával (tetraploid koplementációval) ikrek létrehozása C57Bl/6, EGFP/CD1 és C57Bl/6 albínó egértörzsek felhasználásával. Az így létrehozott identikus kettes vagy hármas iker egerek a sejtmag átültetési klónozástól eltérően sejtmagi-, és citoplazmában található mitokondriális DNS szinten is azonosak lesznek.

A tetraploid embriókat elektrofúzióval állítjuk elő. A kísérletem első felében a leghatékosabb fúziós paraméterek beállítása és az erre legalkalmasabb egértörzs megtalálása volt a feladatom. A fúzióhoz C57BL/6 albínó és CD1 genotípusú embriókat vizsgáltunk. A fuzionált tetraploid embriók aránya CD1 egerek esetében volt a legnagyobb (82,92%). Három fúziós paramétert teszteltünk és a legjobb eredményeket akkor kaptuk, amikor az embriókat az elektromos cellában kétszer, 45 μ s tartó, 2 kV/cm-es négyzetjellel karakterisztikájú, 40V egyenáramú elektromos impulzus adásával kezeltük (CD1 továbbfejlődés 47,56%, C57 : 27%).

Ezután a tovább fejlődött négy- sejtes tetraploid CD1 és C57Bl/6 albínó egér embriókat aggregáltattam 4 vagy 2 blasztomerrel. Vizsgálataim során a tetraploid gazda embrió genotípusának hatását figyeltem a megszületett kiméra embriók számára. Megállapítottam,

hogy különféle genotípusú gazda embriók esetében nincs szignifikáns különbség a megszületett egerek %-os (3,1% CD1, 4,5% C57BL/6) arányát tekintve.

A fúziós eredmények alapján azt találtam, hogy a CD1 egértörzsből származó embriók a legalkalmasabbak gazda embriónak, az általunk vizsgált genotípusok közül, tetraploid komplementációs technológiával végzett iker egerek előállítására. A tetraploid embrió komplementációs módszer paramétereinek optimalizálást követően azt reméljük, hogy előre meghatározott nemű identikus ikrek és hármas ikrek nagy hatékonysággal lesznek előállíthatóak.

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Bősze Zsuzsannának, aki lehetővé tette számomra, hogy a diplomadolgozati munkám gyakorlati részét a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban végezhettem.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani konzulensemnek, dr. Gócza Elennek, hogy lehetőséget teremtett diplomadolgozatom elkészítéséhez. Szakmai segítsége munkám során elengedhetetlen volt.

Szeretnék köszönetet mondani Bontovics Babettnek, a gyakorlati módszerek elsajátításában nyújtott segítségéért és jó tanácsaiért.

9. Irodalomjegyzék

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

Baranyai B., Bodó Sz., Gócza E. (2000 március): Dolly öröksége. Természet világa 131.évf.3.sz. 118-120

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

Bősze Zs., & Gócza E (2005): Transzgénikus. haszonállat előállítás lehetőségei és céljai In: Heszky L., Fésüs L., Hornok L.: Mezőgazdasági biotechnológia. Agroinform Kiadó pp. 264-286 246-271

Campbell, K.H., McWhir, J., Ritchie, W.A., Wilmut, I. (1996): Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. Nature 380, 64–66

Dinnyés A., Bodó Sz. (2005): Állattenyésztési biotechnológia. IV. fejezet: In vitro és mikromanipulációs technológiák állattenyésztési felhasználása 304-312

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, 6: 1534-1536

Eggan K., Akutsu H., Loring J., Jackson-Grusby L., Klemm M., Rideout W.M., 3rd, Yanagimachi R., Jaenisch R. (2001): Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 6209-6214

Evans, M.J., Gurer, C., Loike, J.D., Wilmut, I., Schnieke, A.E., Schon, E.A. (1999): Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep. Nat.Genet. 23, 90-93

Gócza E. (1998, április): Emlőszállatok futószalagon, Az embrionális eredetű őssejtvonalak felhasználásának távlatai. Természet világa, 129.évf.4.sz. 166-168

Guillemot F., Nagy A., Auerbach A., Rossant J., Joyner A.L. (1994): Essential role of Mash-2 in extraembryonic development. Nature, 371:333-33

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

Johnson W.H., Loskutoff, N.M., Plante, Y., Betteridge, K.J. (1995): Production of four identical calves by the separation of blastomeres from an in vitro derived four-cell embryo. Vet. Rec. 137: 15–16

Kaszaki J. (2011.október 17.): Animal Experiments in Medicine, Animal houses, breeding of experimental animals. Institute of Surgical Research, HURO/0901/069/2.3.1

Kelly, S.J. (1975): Studies of the potency of the early cleavage blastomeres of the mouse. In The Early Development of Mammals (Eds. M. Balls and A.E. Wild). Cambridge University Press, Cambridge, London, New York, Melbourne. 97-10

Kelly, S.J. (1977): Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomere. *J. Exp. Zool.* 200: 365- 376

Khan, S.M., Smigrodzki, R.M., Swerdlow, R. (2006): Cell and Animal Models of mtDNA. *Biology: Progress and Prospects. Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 291, 203-217

Kirchain M.S., Hayward M.A., Mkandawire M.J., 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, No 2 145-150

Kuijk E.W., Leonie Du Puy, Helena T.A. Van Tol, Christine H.Y. Oei, Henk P. Haagsman, Colenbrander B., A.J. Roelen B.(2008): Differences in Early Lineage Segregation Between Mammals Developmental. *Dynamics* 237:918–927

Lawson, P. T. (2000): Laboratory Animal Technician Training Manual, American Association for Laboratory Animal Science

M. Gertsenstein (2010): Generation of MZ twins from split blastomeres using tetraploid approach, In: Gertsenstein M.; Nutter M.J.L. Monica Reid T.; Stanford W.; Rossant J; Nagy A.. Efficient generation of germ line transmitting chimeras from C57BL/6N ES cells by aggregation with outbred host embryos. *PloS one*, 5(6): 11260

Mader L.S., Libal L.N, Pritchett-Corning K., Yang R., M.D, Murphy J.S. (2009): Refining timed pregnancies in two strains of genetically engineered mice. *Lab Anim* 38(9): 305–310

Matsui, Y., Krisztina ZS., Hogan, Brigid L. M. (1992): Derivation of Pluripotential Embryonic Stem Cells from Murine Primordial Germ Cells in Culture. *Cell.* 70/5, 841-7

McGrath, J., Solter, D.(1989): Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal 'es paternal genomes. *Cell* 37, 179–183

Mintz B. (1962): Formation of genetically mosaic mouse embryos. *Am.Zool*, 2:432

Morley, R, Dwyer, T. (2005): Studies of twins: what can they tell us about the fetal origins of adult disease? *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 19, 2-7

Mullen, R.J., Whitten, W.K., Carter, S.C. (1970): Studies on chimeric mice and half embryos. Annual Report of the Jackson Laboratory. Bar Harbour, 67-68

Nagy A., Gertsenstein M, Vintersten K., Behringer, R. (2003): Manipulating the mouse embryo third edition. Cold spring harbor, New York

Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A.(1998): Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell. PubMed, Web of Science* 95: 379–391

Pinyopummin, A., Takahashi, Y., Hishinuman. and Kanagawa, H. (1994): Development of single blastomeres from 4-cell stage embryos after aggregation with parthenogenones in mice. *Jpn. J. Vet. Res.* 42: 119-126

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 71: 1250

Rathjen, Joy, Lake, J.A., Bettess, M.D., Washington, J. M. , Chapman, G. ,Rathjen, P.D. (1999): Formation of a Primitive Ectoderm Like Cell Population, EPL Cells, from ES Cells in Response to Biologically Derived Factors. *Journal of Cell Sci.* 112, 601-612

- Reed, T., Quiroga, J., Selby, J.V., Carmelli, D., Christian, J.C., Fabsitz, R.R., Grim C.E.** (1991): Concordance of ischemic heart disease in the NHLBI twin study after 14–18 years of follow-up. *J. Clin. Epidemiol.* 44, 797–805
- Robertson, E. J.** (1986): Pluripotential stem cell lines as a route into the mouse germ line. *Trends Genet.* 2,9 -13
- Robertson, Elizabeth J.** (1987): *Embryo-Derived Stem Cell Lines in Teratocarcinomas And Embryonic Stem Cells a Practical Approach.* IRL Press, Oxford, 108-112
- Roode M., Blair K., Snell P., Elder K., Marchant S., Smith A., Nichols J.** (2012): Human hypoblast formation is not dependent on FGF signalling. *Developmental Biology* 361, 358–363
- Rossant J. & Spence** (1998): Chimeras and mosaics in mouse mutant analysis. *Trends Genet* 14: 358-363
- Schwiebert R. Daclam** (2007. július): The Laboratory Mouse Rodent Users Wetlab Administered by Laboratory Animals Centre National University of Singapore
- Sims, M., First, N.L.** (1993): Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 6143–6147
- Solti L.** (2004): Klónozás és génmódosítás: szép új világ? *Magyar Tudomány*, 2004/2 198
- Sotomaru, Y., Kato, Y. and Tsunoda, Y.** (1998): Production of monozygotic twins after freezing and thawing of bisected mouse embryos. *Cryobiology* 37:139-145
- Spemann, H.** (1902): Entwicklungsphysiologische Studien am Tritonei II. *Arch f. Entw. Mech.* 15, 448–534
- Szatmári I.** (2013. jún.): A pluripotens összegek különleges biológiai programja, embrionális és indukált összegek. *A Magyar Tudományos Akadémia folyóirata*, 678-687
- Tam P.P.L., Rossant J.** (2003): Mouse embryonic chimeras: tools for studying mammalian development. *The Company of Biologists*, 130: 6155-6163
- Tanaka M., Gertsenstein M., Rossant J., Nagy A.,** (1997): Mash2 acts cell autonomously in mouse spongiotrophoblast development. *Dev. Biol.* 190:55-65
- Tanaka, Satoshi ,Kunath, T. Hadjantonakis, A. K. , Nagy A. ,Rossant, J.** (1998): Promotion of Trophoblast Stem Cell Proliferation by FGF4. *Science.* 282, 2072-207
- Tarkowski, A.K., Wroblewska, J.** (1967): Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J. Embryol, Exp. Morphol.* 18, 155-180
- Tarkowski A.K., Witkowska A., Opas J.** (1977): Development of cytochalasin in B-induced tetraploid and diploid/tetraploid mosaic mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 41:47-64
- Tarkowski A.K., Ozdzenski, W., Czolowska, R.** (2001): Mouse singletons and twins developed from isolated diploid blastomeres supported with tetraploid blastomeres. *Int. J. Dev. Biol.* 45: 591-596
- Tarkowski A.K., Ozdzenski W., Czolowska R.** (2005): Identical triplets and twins developed from isolated blastomeres of 8- and 16-cell mouse embryos supported with tetraploid blastomeres. *Int. J. Dev. Biol.* 49: 825-832
- Tarkowski A.K., Suwińska A., Czolowska R., Ożdżeński W.** (2010): Individual blastomeres of 16- and 32-cell mouse embryos are able to develop into fetuses and mice. *Developmental Biology* 348: 190–198
- Turner L.** (1997): Cloning experiment answers some questions but raises many more, A sheep named Dolly. *Can Med Assoc* ; 156 (8) 1149-1150

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

Vajta, G., Kragh, P.M., Mtango, N.R., Callesen, H. (2005): Handmade Cloning approach: potentials and limitations. *Reprod. Fertil. Dev.* 17, 97–112

Varlet I., Collignon J., Robertson E.J. (1997): Nodal expression in the primitive endoderm is required for specification of the anterior axis during mouse gastrulation. *Development*, 124: 1033-1044

Willadsen, S.M. (1981): The developmental capacity of blastomeres from 4- and 8-cell sheep embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.* 65: 165-172

Willadsen, S.M., Polge, C. (1981): Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Vet. Rec.* 108: 211-213

Willadsen, S.M. (1986): Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320, 63–65

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

Internetes hivatkozások

Gócza E. (1997): Emlősállatok klónozása. *Természet világa* 128.évf.8.sz. 352-356: <http://www.termeszetvilaga.hu/tv9708/klon.html>

Gócza E. (2004): Embrionális összeitek és összejt-vonalak. *Magyar Tudomány* 2004/3.sz. 285-292: <http://www.matud.iif.hu/2004-03.pdf>

http1: <http://idegen-szavak.hu/kim%C3%A9ra>

http2: Kiméra: [http://hu.wikipedia.org/wiki/Kim%C3%A9ra_\(biol%C3%B3gia\)](http://hu.wikipedia.org/wiki/Kim%C3%A9ra_(biol%C3%B3gia))

10. Nyilatkozat

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

Gödöllő, 2013.....hó.....nap

.....

hallgató aláírása

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a TDK dolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmak korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

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

Gödöllő, 2013.....hó.....nap

.....

témavezető aláírása