

## ZÁRÓJELENTÉS 2012

**Vezető kutató:** Dr. Gócza Elen

**A téma címe:** “Fejlődés specifikus gének expressziós mintázatának összehasonlítása pluripotens nyúl embrionális és epiblaszt őssejtekben.”

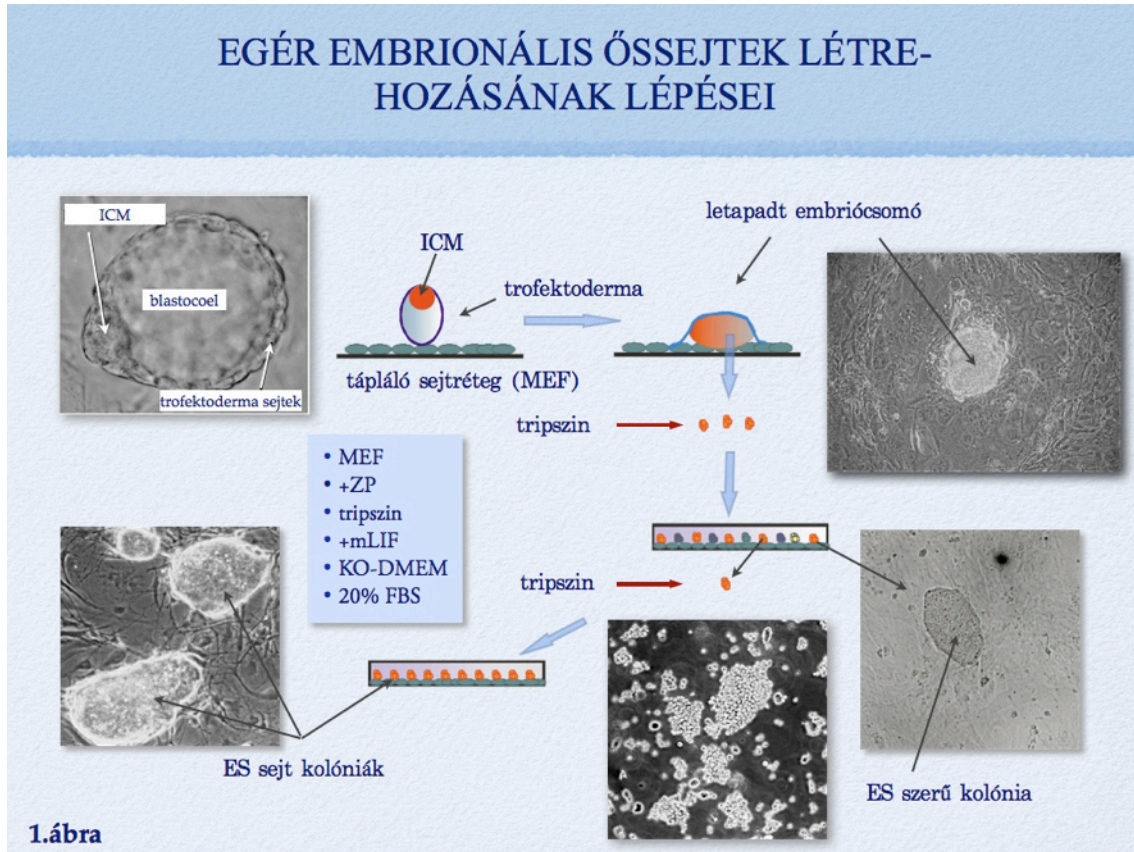
**A kutatás időtartama:** 2009. 04. 01-2012. 03. 31.

### CÉLKITŰZÉSEK

A pályázati munka során a nyúl embriók epiblasztjából újonnan létrehozott úgynevezett epiblaszt őssejt tenyészetekben (EpiESC), a már meglévő pluripotens nyúl embrionális őssejt tenészetekben (ESC), illetve a nyúl embriók fejlődése során, a fejlődés specifikus gének expressziós mintázatának feltérképezésével szeretnénk volna pontosabb képet kapni arról, milyen faktorok irányítják a nyúl embriók fejlődését, ezen keresztül az őssejtek pluripotenciájának megtartását. Azt reméljük, ezen faktorok ismeretében sikerülhet valóban pluripotens, hosszú ideig fenntartható nyúl őssejt-vonalakat alapítanunk, amiből ivarsejt kiméra állatokat is létre lehet hozni majd a jövőben.

### PLURIPOTENS ŐSSEJTEK

Pluripotens (mind három embrionális csíralemez, így az embrionális ektoderma, mezoderma, endoderma sejtjeinek létrehozására is képes) egér embrionális őssejt vonalakat (mESC) egér embrionális fibroblasztból létrehozott tápláló sejtrétegen (MEF) hólyagcsíra állapotú embrió (balsztociszta) embriócsomójából (ICM), magzati borjúsavót (FBS) tartalmazó tenyésztő médiumban először 1981-ben sikerült létrehozni (Evans és Kaufman, 1981; Martin, 1981) (*1.ábra*) Az első pluripotens humán embrionális őssejtek (huESC) létrehozása 1998-ban valósult meg (Thomson és mtsai, 1998). ES sejtvonalakat gazdasági haszonállatok embrióiból azonban, mind a mai napig nem sikerült létrehozni. Bár feltételezik, hogy a pluripotencia a sejtek alapállapota, mégis a különböző fajok embrióiból létrehozott ES szerű sejtvonalak eltérő tulajdonságokkal rendelkeznek, eltérő faktorokat igényelnek a pluripotens állapotuk fenntartásához (Honda és mtsai, 2008, 2009).



A pluripotencia megtartásában szerepet játszó faktorok megismerésével ezen a területen is sikerült előrelépni. 2006-ban Takahashi and Yamanaka arról számolt be, hogy négy a pluripotenciát meghatározó faktor (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) túltermeltetésével egér fibroblaszt sejtekben, egy új pluripotens sejtípust, az úgynevezett indukált pluripotens sejteket (iPSC) sikerült létrehozniuk. Ezek az iPS sejtek, jelenlegi ismereteink alapján, minden tekintetben egyenértékűnek tekinthetők az embriók embriócsomójából származó ES sejt vonalak sejtjeivel (Takahashi és Yamanaka, 2006).

Az egér iPS sejt létrehozásakor alkalmazott technikát hamarosan sikeresen alkalmazták humán iPS sejt vonalak (Takahashi és mtsai, 2007; Yu és mtsai, 2007) létrehozására, majd számos más állatfaj esetében, beleértve a majmot is (Li és mtsai, 2008; Liu és mtsai, 2008; Liao és mtsai, 2009). 2010-ben Honda és mtsai nyúl iPS sejt vonal létrehozásáról is beszámoltak (Honda és mtsai, 2010)

#### A "2 INHIBITOR" RENDSZER SZEREPE A SEJTEK PLURIPOTENCIÁJÁNAK MEGTARTÁSÁBAN

Ying és mtsai igazolták, hogy ha a PD0325901 (PD) (mitogen-activated protein kinase inhibitor) Mek inhibitort adják együtt a CHIR99021 (CH) Gsk3 inhibitorral, a sejtek hatásosan megtudják

tartani pluripotenciájukat. Igazolták, hogy CHIR99021 és a PD0325901 inhibitorok hozzáadása a tenyésztő médiumhoz (2i inhibitoros rendszer) elegendő új ES sejtvonalak hatékony alapításához. Az ES sejtek pluripotenciája addig marad meg, amíg a differenciálódást indukáló Erk szignál rendszer gátolva van a PD0325901 inhibitorral, vagy a LIF/BMP hozzáadásával (Ying és mtsai., 2008). A Gsk3 gátlása elősegíti a sejtek önmegújulását, azáltal, hogy a sejteket folyamatosan osztódó állapotban tartja, illetve megakadályozza az idegsejt irányú differenciálódásukat.

Ying és munkatársainak sikerült 2 inhibitoros médiumban létrehozott patkány ES sejtekben homológ rekombinációval p53 (tumor szupresszor) „gén kiütött” patkányt létrehozniuk. **Azzal, hogy a patkány ES sejtekben is lehetségessé vált az egér ES sejtekhez hasonlóan homológ rekombinációt létrehozni, lehetővé vált, hogy a patkány, mint modellállat, alkalmazható legyen az emberi betegségek tanulmányozására** (Ying és mtsai, 2010).

Nichols és mtsai. 2009-ben azt vizsgálták, hogy hogyan hat a 2i inhibitoros tenyésztő médium (KSOM+CH+PD) a fejlődő egér embriókban kialakuló pluripotens epiblaszt sejtekre. Azt találták, hogyha az Erk szignál rendszert gátolták, CH+PD kiegészítést alkalmazva, ez nem hátráltatta az embriók fejlődését. A CH+PD médiumban kifejlődött blasztocisztákban nem jött létre a hipoblaszt sejtek rétege, az ICM-et alkotó sejtek száma azonban nem lett kevesebb. Az összes epiblaszt sejt nanog expressziót mutatott, nem jelent meg a Gata6/Gata4 pozitív sejtek rétege (Nichols és mtsai, 2006, 2009). **(9.ábra)**. A nanog/Oct4 pozitív sejteket tartalmazó epiblasztból származó sejtekből kiindulva pedig sikerült pluripotens ES sejtvonalkat létrehozniuk.

A hipoblaszt sejtréteg kialakulása az FGF/Erk szignál rendszer hatására indul el, ha gátoljuk ezt a jelátviteli útvonalat a CH+PD inhibitorokkal, az embrióban nem alakul ki a hipoblaszt sejtek rétege, de az epiblaszt sejtek megtartják pluripotenciájukat. Ez azt is jelenti, hogy az epiblaszt sejtek osztódásának fenntartása nem igényel parakrin jelet a hipoblaszt irányából. A kísérletek alapján feltételezik, hogy az egér epiblaszt és az ES sejtek azonos alapállapotban vannak, autonóm képesek folyamatosan osztódni, azonban Erk szignál rendszer felől érkező jel hatására a pluripotens állapotban lévő sejtek differenciálódni kezdenek. Nichols és mtsai által leírt szabályozás azt igazolja, hogy az ES sejtek nem valamilyen in vitro létrehozott sejtípust jelentenek, hanem eredendően azonosnak tekinthetők az embrióban levő epiblaszt sejtjeivel.

Munkánk során arra szerettünk volna választ kapni, hogy **milyen szignálok szabályozzák a nyúl korai embrionális fejlődését, az embriók beágyazódásának hatékonyságát, illetve az embriócsomóból származó sejtek pluripotenciájának megőrzését**. Azt is vizsgáltuk, hogy a Nichols és munkatársai által kidolgozott **egér ES sejtvonala alapítási rendszer alkalmazható-e**

**nyúl epiblasztból származó őssejtvonalak létrehozásához, illetve, hogy a CH és PD inhibitorok hogyan befolyásolják a nyúl embriók korai embrionális fejlődését.**

## ANYAG ÉS MÓDSZER

### Embriók tenyésztése

A nyolc-sejtes (1,5 napos) nyúl embriókat RDH, illetve RDH+CH+PD tenyésztő médiumban tartottuk hólyagsíra (blasztociszta) állapot eléréséig. Az RDH+CH+PD médium esetében az RDH médiumot 3 $\mu$ M CHIR99021 és 1 $\mu$ M PD0325901 inhibitorral egészítettük ki. A fejlődésüket a 2,5, 3,5 4,5 napon ellenőriztük, majd a 4,5 napos embriókból RNS-t izoláltunk, illetve kitettük azokat egér embrionális fibroblasztra.

### Nyúl embrióból származó ES, illetve EpiES sejtenyészetek létrehozása

A 4,5 napos blasztocisztákat borító mucin réteget és zona pellucidát 0,5 % pronázos emésztést alkalmazva távolítottuk el. Az embriókat ezt követően nyúl ES sejtenyésztő médiumba, mitomycin-C kezelt egér embrionális fibroblaszt rétegre helyeztük. Az embriók két napon belül letapadtak a tápláló sejtrétegre. A letapadást követően három-négy nap múlva üveg kapillárist alkalmazva izoláltuk az embriócsomót (ICM csomót, embrió diszk). Az ICM csomót accutase oldatban disszociáltattuk, majd friss tápláló sejtrétegre helyeztük. A differenciálatlan sejteket egy hét múlva újra izoláltuk a tenyészetből, sejt-szuszpenziót készítettünk, majd friss tápláló sejtrétegre helyeztük az így kapott sejt-szuszpenziót. A kinőtt kolóniákat 5-6 naponként passzáltuk tovább (**2.ábra**).

15% SRL-t tartalmazó, bFGF-el és rLIF-el kiegészített KO-DMEM médiumot használtunk a sejtvonalak alapításához.



### RNS izolálás, kvantitatív RT PCR

Az embriókból történő RNS preparáláshoz először a sejteket feltártuk TRI reagensben (SIGMA) való pipettázással. Az így kapott lizátumot fagycsővekbe helyeztük és  $-70^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Az RNS preparálás első lépéseként  $500\ \mu\text{l}$  TRI reagensre számolva  $100\ \mu\text{l}$  kloroformban szuszpendáltuk fel a felolvasztott mintákat, melyeket 10-15 percig szobahőmérsékleten állni hagyunk. A centrifugálást követően ( $12000\ \text{rpm}$ ;  $15\ \text{min}$ ;  $4^{\circ}\text{C}$ ) az elegy három fázisra különült. A felső, színtelen fázis az RNS-t, a fehér vagy opálos interfázis a DNS-t és a rózsaszín, alsó fázis a fehérjét tartalmazza. A felső RNS tartalmú fázist óvatosan átpipettáztuk egy új Eppendorf csőbe, és  $250\ \mu\text{l}$  izopropanolt (REANAL) adtunk hozzá, majd 5-10 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Ezt követően lecentrifugáltuk ( $12000\ \text{rpm}$ ;  $10\ \text{min}$ ;  $4^{\circ}\text{C}$ ). A pelletet ezután  $1\ \text{ml}$  75%-os etanollal mostuk. Újra lecentrifugáltuk ( $7500\ \text{rpm}$ ;  $5\ \text{min}$ ;  $4^{\circ}\text{C}$ ), szobahőmérsékleten szárítottuk 5-10 percig. A száradást követően vízben vettük fel a mintákat, majd  $-70^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk felhasználásig. A kapott RNS minta koncentrációját Thermo Scientific NanoDrop TM 1000 Spectrophotometer-el mértük. A cDNS szintézishez High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-et (Applied Biosystems) használtunk,

a cDNS szintézist a gyártó ajánlása alapján végeztük. A qRT-PCR reakciót, SYBR Green jelölést használva (Applied Biosystems), az ajánlott protokollt alkalmazva végeztük. Az Oct4, Nanog, Cdx2, Gata4, Gata6 relatív expressziós szintet GAPDH belső kontrollokhoz viszonyítva adtuk meg. A specifikus nyúl primereket Primer3 program segítségével terveztük. A futtatásokat Eppendorf Mastercycler ® Realplex4 készüléken végeztük, az adatok kiértékelése GenEx program segítségével történt.

## **Immundefés**

A kiméra embriókat 4%-os PFA oldatban fixáltuk 15 percig, majd 0.1%-BSA-t tartalmazó PBS-el (PBS/BSA) mostuk 3x10 percig, 0,25% Triton X-100-el permeabilizáltuk, majd 45 percig blokkoltuk blokkoló pufferrel, ami 0,1%BSA-t, 0.01%Twin 20 és 2% szamár szérumot (DS) tartalmazott.

A blokkolást követően az elsődleges ellenanyaggal az inkubálást 1 éjszakán át, 4 °C-on végezzük, majd a másodlagos ellenanyaggal 60 percig, 37C-on folytattuk. A fedőlemezeket 10 µl-es VECTA SHIELD (VECTOR LAB.) cseppekbe ágyazzuk. Az immunfestéshez kecske poliklonális Oct4, Nanog, Gata6, Cdx2 (1:10)(Abcam) és egér SSEA-1 (1:3)(Hybridoma Bank) elsődleges ellenanyagot használunk. Cy3-anti-egér IgG, Cy3-anti-kecske IgG és Cy3-anti-egér IgM (1:400) (Jackson Immuno Research Company) másodlagos ellenanyagokat használunk. A mintákat Olympus invert mikroszkópot (MBK, Állatbiotechnológiai Intézet), Zeis Axiovert (Biotalentum Kft., Gödöllő), illetve Zeis LSM konfokális mikroszkópot (Animal Production Research Centre, Nitra, Slovak Republic), használva fotózzuk le.

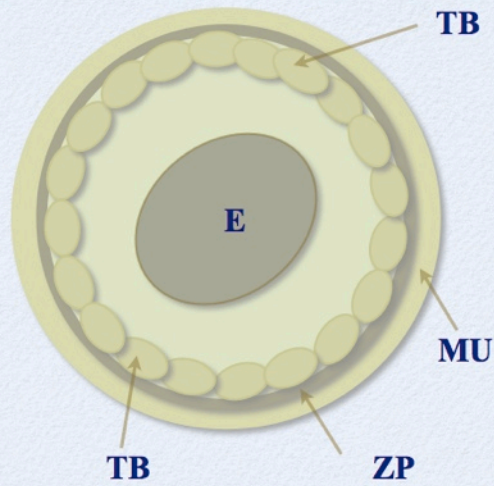
**EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK**

Korábbi kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy az általunk létrehozott nyúl ES-”like” sejttenyészeteket csak leukémia inhibitor faktor (LIF) jelenlétében lehetett hosszabb ideig fenntartani. Ha a médiumot nem egészítettük ki LIF-el, a sejtek differenciálódni kezdtek (Lemos és mtsai, 2008). Az egér embriók az egér LIF-el (mLIF) és 20% FCS-el kiegészített sejttenyésztő médiumban letapadtak a tápláló sejtréteg felületére, nem differenciálódott sejteket tartalmazó epiblaszt eredetű kolóniákat kaptunk.

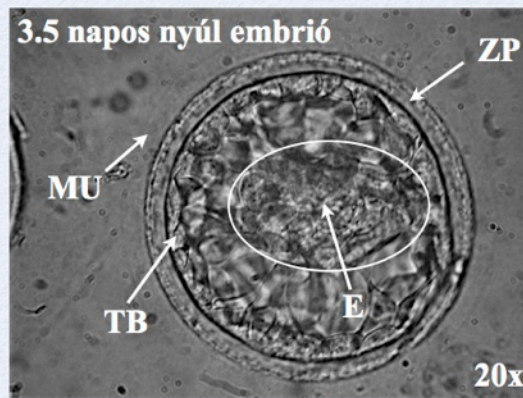
A nyúl epiblaszt sejteket patkány LIF-el (rLIF) és/vagy humán bFGF-el, 15% SRL-el (magzati szérum helyett gyárilag előállított kiegészítő oldat), vagy FCS-el (magzati borjú savó) kiegészített alap tenyésztő médiumba helyeztük, egér fibroblaszt rétegre. Nem találtunk lényeges különbséget a letapadt embriócsomók számában az eltérő összetételű médiumok között. Eltérés mutatkozott azonban a korai passzázsokat követően kapott ES-szerű morfológiát mutató kolóniák számában. Az FCS-el és rLIF-el kiegészített, bFGF-t nem tartalmazó médiumban találtuk a legtöbb ES szerű kolóniát (**2.ábra**). A 3. passzázs után azonban már bFGF kiegészítést is tartalmazó médiumban kaptunk magasabb számban kolóniákat, ezek azonban az epiblaszt sejtekre jellemző morfológiát mutattak. A 6. passzázs után differenciálatlan sejteket tartalmazó kolóniákat, azonban már csak az SRL, bFGF és rLIF kiegészített médiumban találtunk. A KO-DMEM/ISCOV médiumban, amit rLIF, humán bFGF-el, 15% SRL egészítettünk ki, nyolcadik passzázsig sikeresen fenn tudtuk tartani a nyúl ES sejttenyészeteket. 90% SRL és 10% DMSO oldatban lefagyasztott ES sejtek nagy része újra tenyészetbe volt vihető a felolvasztást követően.

Munkánkat a nyúl epiblaszt sejtek differenciálatlan állapotában való fenntartásához szükséges speciális faktorok keresésével folytattuk. 3.5 napos, illetve 6. napos (**3.ábra**) (**4.ábra**) a nyúl embriókban, embrionális őssejtekben expresszáló transzkripciós faktorok, így az Oct4 és a Nanog: epiblaszt, a Cdx2: trofoblaszt, a Gata4: hipoblaszt specifikus génjeire, illetve egy belső kontroll génre (GAPDH), nyúl genomiális adatbázis segítségével, primereket terveztünk, illetve a nyúl embriók esetében is alkalmazható elsődleges ellenanyagokat (Oct4, Cdx2, GATA6, SSEA-1) kerestünk (**5.ábra**) (**6.ábra**) (**7.ábra**) (**8.ábra**) (**9.ábra**).

### 3.5 NAPOS NYÚL EMBRIÓ

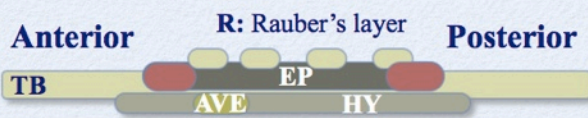
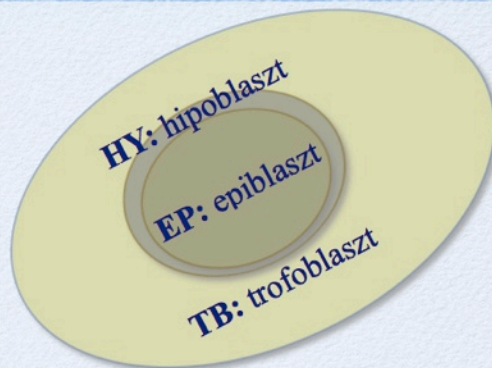
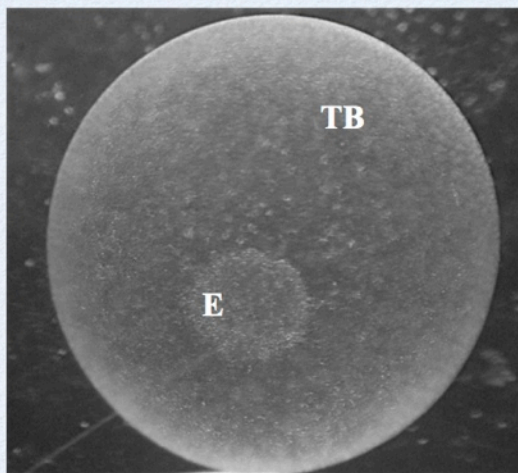


**E:** embrió diszk (ICM)  
**TB:** trofoblaszt  
**ZP:** zona pellucida  
**MU:** mucin réteg



3.ábra

### 6 NAPOS NYÚL EMBRIÓK



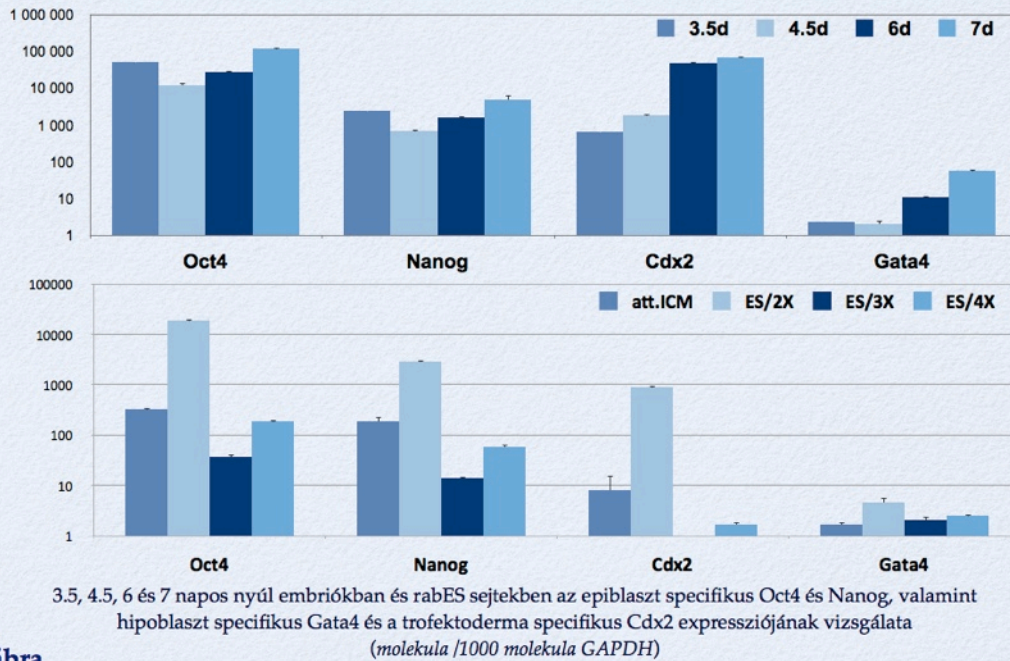
**EP:** OCT4, NANOG  
**HY:** GATA6, GATA4  
**TB:** CDX2

**SSEA-1:** mESC, rabESC  
**SSEA-4:** huESC, rabESC

4.ábra



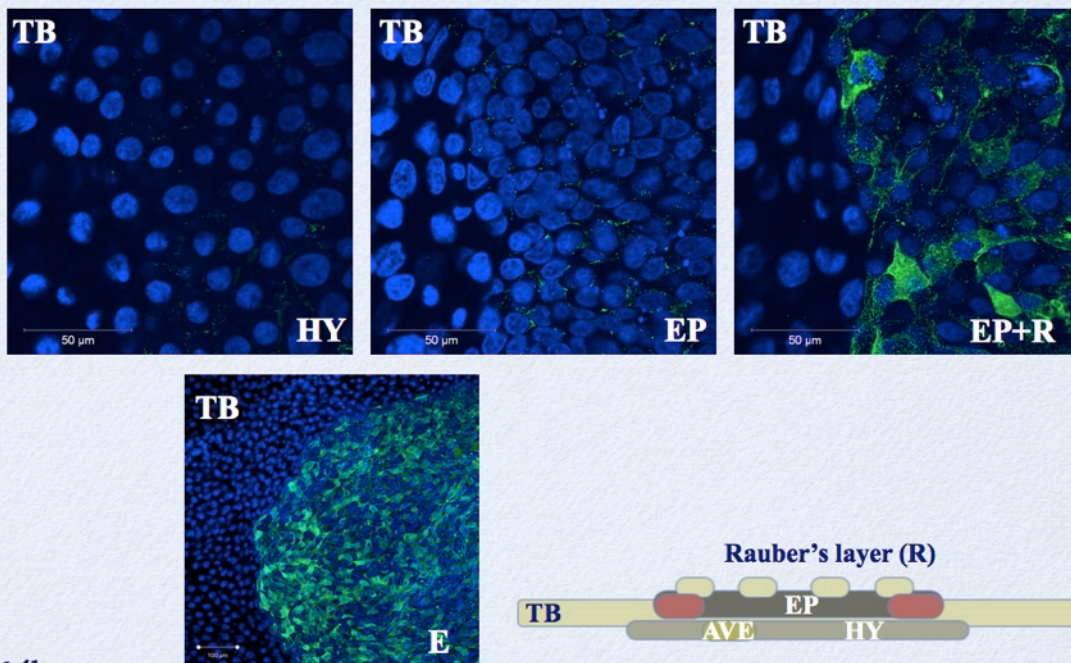
## ŐSSEJT SPECIFIKUS MARKEREK EXPRESSZIÓJA NYÚL EMBRIÓKBAN ÉS EMBRIONÁLIS ŐSSEJTEKBE



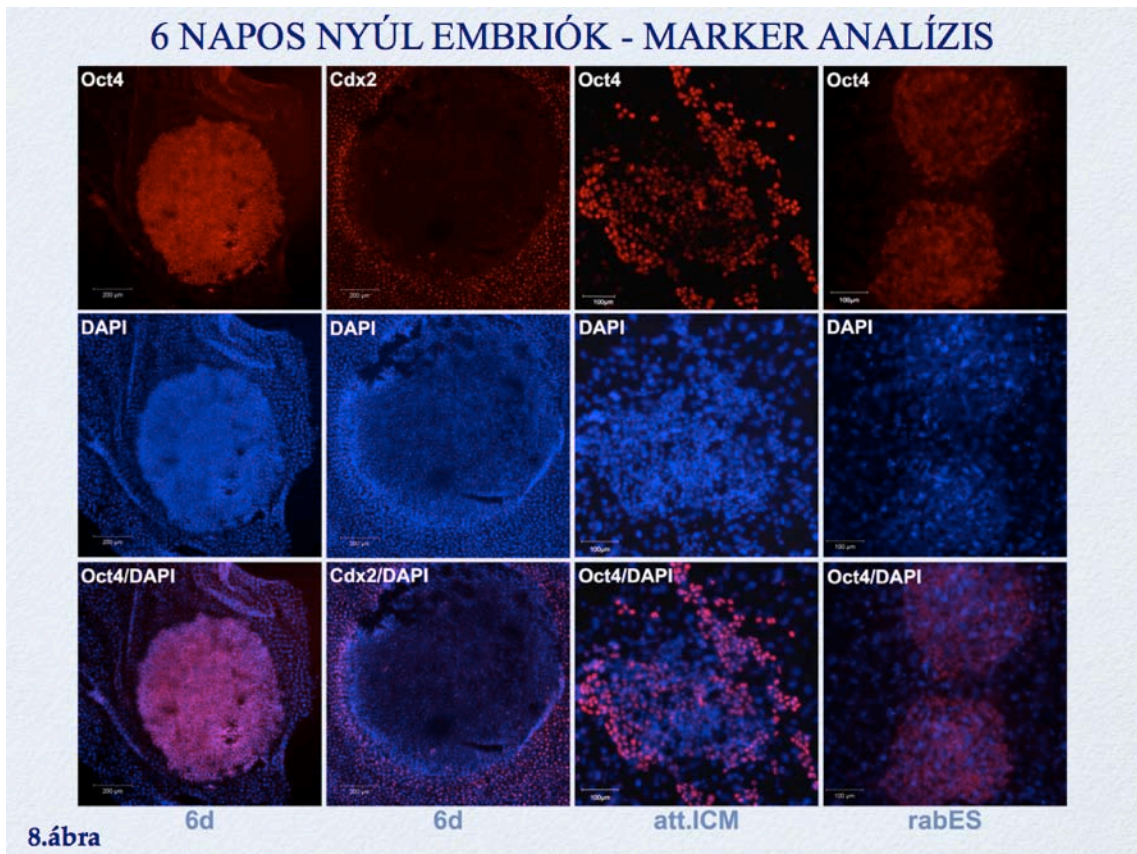
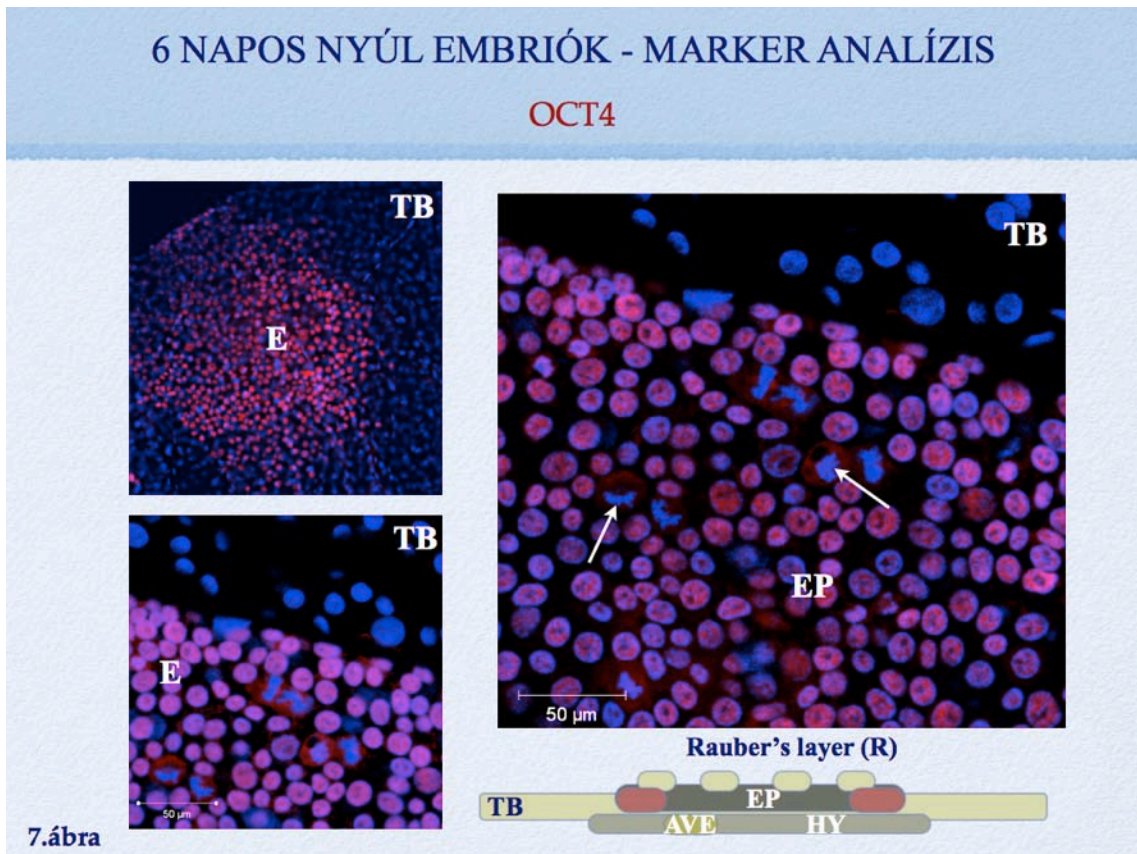
5.ábra

## 6 NAPOS NYÚL EMBRIÓK - MARKER ANALÍZIS

### SSEA-1

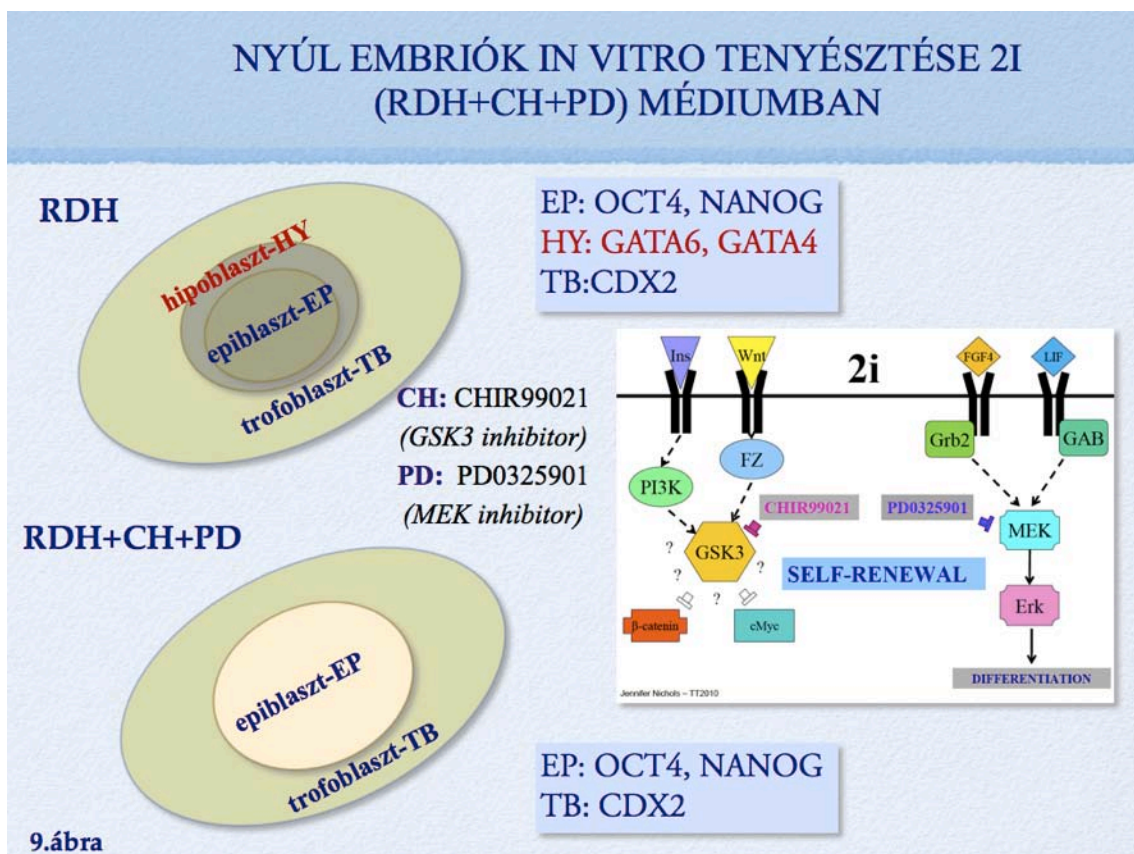


6.ábra

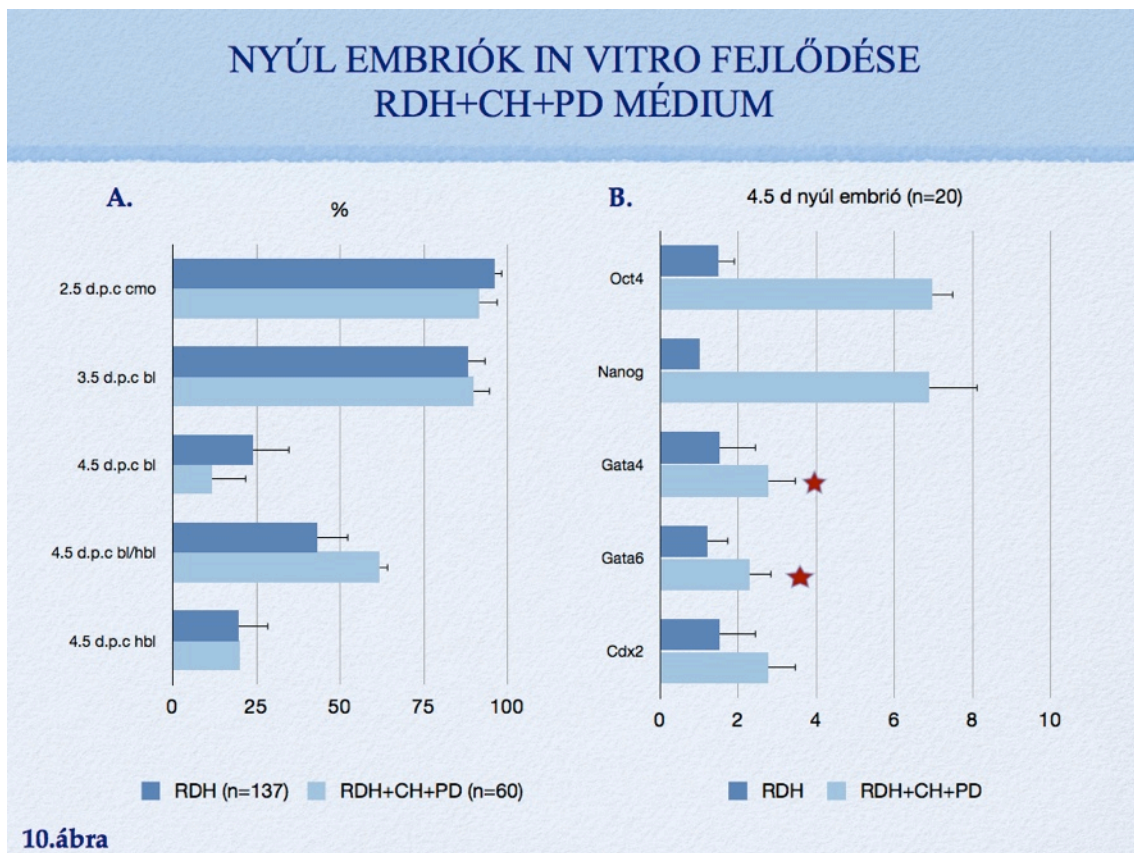


Miután az embriók fejlődése során a pluripotens sejtekre jellemző faktorok, illetve a korai embrionális fejlődésben szerepet játszó transzkripciós faktorok expressziós szintjét meghatároztuk, letapadt embrió diszkben (att.ICM), illetve korai passzázsok során a nyúl ESC kolóniákban (rabES, ES1x, ES2x, ES3x, ES4x) is megnéztük az expressziós szintjüket. A passzázsok előrehaladtával az epiblaszt specifikus Oct4, Nanog szint csökkenni kezdett, illetve a trofoblaszt (Cdx2) és hipoblaszt (GATA4) sejtekre jellemző markerek expressziója is kimutatható volt (**5.ábra**). Az ESC kolóniák nagy része differenciálódni kezdett, valószínűleg a sejtenyészetben megtalálható hipoblaszt és trofoblaszt eredetű sejtekből származó faktorok hatásának eredményeként.

Az embrió diszket immunosurgeryt alkalmazva sikerült izolálni (**12.ábra**). Német és francia kutató csoportokkal kialakított együttműködés során (*OMFB-00130-00131/2010, MÖB-47-1/2009*) megtanultuk az epiblaszt és hipoblaszt sejtréteg szétválasztását mechanikus úton, illetve egy speciális médiumot alkalmazva megpróbáltuk a hipoblaszt sejtréteg kialakulásának gátlásával elérni azt, hogy olyan hólyagcsíra állapotú embrióink legyenek, amikben csak epiblaszt és trofoblaszt sejtek találhatóak. Ehhez a nyúl embrió tenyésztő médiumot (RDH médium) két inhibitor molekulával egészítettük ki, a CH (CHIR99021, Gsk3 inhibitorral) és PD (PD0325901, mitogen-activated protein kinase (Mek) inhibitor) (**9.ábra**). A munka további részében azt néztük, hogy hogyan befolyásolják a nyúl embriók korai embrionális fejlődését ezek az inhibitorok.

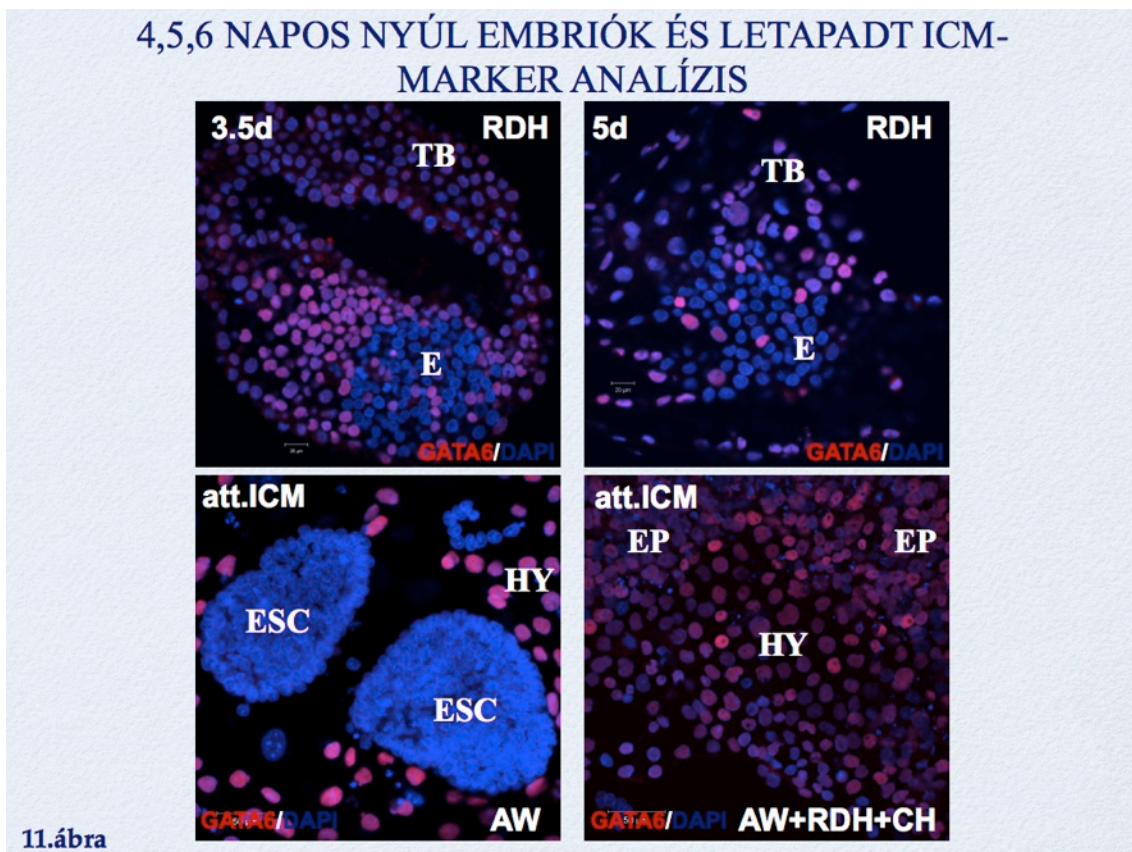


A két inhibitorral végzett kísérleteink első szakaszában RDH, illetve 2 inhibitorral kiegészített RDH médiumban vizsgáltuk a nyúl embriók fejlődését. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a korai nyúl embriók fejlődését nem befolyásolja a tenyésztő médiumhoz adott 2 inhibitor. Az embriók normálisan fejlődtek, mind az alap RDH, mind pedig a 2 inhibitorral kiegészített RDH médiumban (**10/A.ábra**). Az embriók fejlődése során a pluripotens sejtekre jellemző faktorok, illetve a korai embrionális fejlődésben szerepet játszó transzkripciós faktorok expressziós szintjét is meghatároztuk. Az Oct4 és a Nanog epiblaszt, a Cdx2 trofoblaszt, a Gata4, Gata6 hipoblaszt specifikus markerek. Az Oct4 és Nanog transzkripciós faktorok expressziós szintje az RDH+CH+PD médiumban tenyésztett embriók esetében szignifikáns különbséget mutatott az RDH médiumban tartott embriókéhoz képest. Az RDH+CH+PD médiumban az Oct4 esetében több mint négyszeres, míg Nanog esetében majdnem hétszeres expressziós szintet mértünk. A Gata4, Gata6, illetve a Cdx2 transzkripciós faktorok esetében nem volt szignifikáns különbség az expressziós szintekben, és jól látható, hogy a PD és CH inhibitorok nem tudták meggátolni a Gata6, Gata4 hipoblaszt sejttréteg kialakulását (\*) (**10/B.ábra**).



A nyúl embriókat RDH+CH+PD médiumban tenyésztve ugyan megnőtt az Oct4, illetve Nanog expresszió mértéke a kontroll embriókéhoz képest, azonban Nichols és mtsai által közölt eredményekkel ellentétben (Nichols és mtsai., 2006), az RDH+CH+PD médiumban tartott nyúl embriókban kimutatható volt Gata4 és Gata6 expresszió. Annak eldöntésére, hogy a megnövekedett Oct4/Nanog expresszió, megnövekedett számú epiblaszt sejtet is jelent-e, a munka folytatásaként immunfluoreszcens festést végeztünk kontroll (AW) és kezelt (AW+CH+PD) embriókon (4d, 5d), letapadt embrió diszkben (att.ICM) (6d). A Gata6 pozitív sejtek mind a hipoblasztban (HY), mind pedig a trofoblaszt területén (TB) megtalálhatók voltak. Az epiblaszt eredetű (EP) EpiSC kolóniák viszont nem tartalmaznak Gata6 pozitív sejteket. Meglepő módon az AW+CH+PD médiumban is megjelentek a hipoblaszt eredetű sejtek, sőt a letapadt epiblaszt területén is felfedezhetőek voltak ezek a Gata6-ot expresszáló sejtek (**11.ábra**). Az AW+CH+PD médiumban nem találtunk tisztán epiblaszt eredetű kolóniákat.

Az RDH+CH+PD médiumban tartott 4,5 napos embriók egy része esetében pronázos kezeléssel eltávolítottuk a zona pellucidát, majd immunosurgery-t alkalmazva izoláltuk az embrió diszket. Ezt zselatin kezelt felszínre letapasztva, AW+CH+PD médiumban tovább tenyésztve vizsgáltuk. Az izolált embrió diszk (E) ugyan letapadt a felületre, de a sejtek nem osztódtak tovább, egy idő után elpusztultak (**12.ábra**).



A nem kezelt embriókat AW+LIF médiumban tovább tenyésztve, a tápláló sejtrétegre letapadó, szépen növekvő, nem differenciálódó kolóniákat is meg lehetett figyelni. Amennyiben nem adtunk LIF-et a tenyésztő médiumhoz, a sejtek spontán differenciálódni kezdtek, néhány nap kultiváció után pulzáló szívizom sejteket lehet megfigyelni. Érdekes módon, ha a nyúl ES tenyésztő médiumot inhibitorokat tartalmazó egér ES tenyésztő médiumra (N2B27+PD+CH+LIF) cseréljük, néhány nap után idegsejtek jelentek meg a tenyészetben. Ha nem végzünk immunosurgeryt, az RDH+CH+PD médiumos kultiváció során, a normál tenyésztő médiumban hosszabb idejű tenyésztést követően CDX2 pozitív TB kolóniák is megjelennek.

Sajnos az egér és patkány sejtvonalak esetében alkalmazott inhibitorok alkalmazása nem vezetett sikerre. A további időszakban szeretnénk megismerni a nyúl Ins, Wnt, FGF4 és LIF jelátvitelben résztvevő elemeket, ezek nyúl specifikus szabályozási mechanizmusát (**9.ábra**). Ezen jelátviteli rendszerekben fontos szerepe van az őssejt specifikus mikroRNS-eknek is. Csoportunk sikerült azonosítania a két meghatározó őssejt specifikus nyúl mikroRNS klasztert (Maraghechi és mtsai, 2012), az elkövetkező időszakban a jelátviteli útvonalakhoz kapcsolódó, a szabályozásban fontos szerepet betöltő újabb mikroRNSeket is szeretnénk azonosítani.

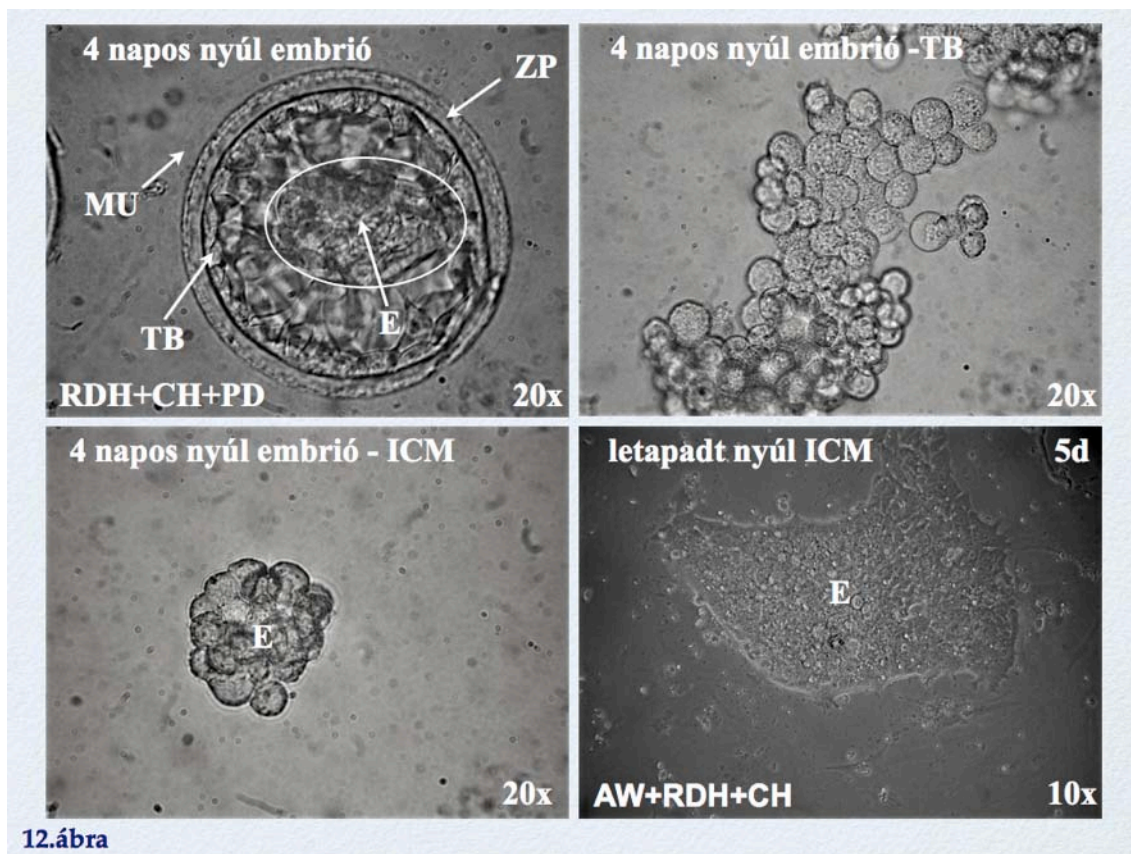
Nyúl fibroblaszt sejteket kétféle vektorral (pEGFP-C1(Clontech) és pmaxEGFP (Amaxa)) transzformáltunk, lipofectamin 2000 (Invitrogene) transzfekeciós reagenst alkalmazva. Mind két vektorral történő transzformáció után sikerült EGFP-t expresszáló sejteket kapnunk. A pEGFP-C1 vektor esetében a sejtek kevesebb mint 5%-a, míg pmaxEGFP vektor esetében a fibroblaszt sejtek több mint 10%-a expresszálta tranziensen az EGFP-t. Csak pmaxEGFP vektor esetében kaptunk stabil transzformációt.

Az elmúlt két évben a laboratóriumunkban a hagyományos DNS mikroinjektációs transzgenézis mellett lenti vírus és transzpozon alapú transzgenézist is elkezdtek alkalmazni. Lentivírus alkalmazásakor, bár igen hatékony a transzgenézis, mozaikos beépülést kapunk, és a transzgént nem örökítette a transzgenikus alapító egyed (Hiripi és mtsai, 2010).

Együttműködés keretében ( Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, Kanada) elkezdtek a transzpozon alapú transzgenézist is. A piggyBac transzpozon alkalmazása nyúl fibroblaszt sejtek estében nem bizonyult hatékony módszernek (Nagy, K. és mtsai, 2010). Nyúl indukált pluripotens sejteket (iPS) nem sikerült létrehozni piggyBac transzpozon alapú vektorral. A nyúl ES sejtek fenntartása során alkalmazott médiumban nem lehetett növekvő iPS kolóniákat látni a transzformációt követően. Francia együttműködő partnereinknek (OMFB-00130-00131/2010) azonban sikerült retrovírus alapú vektorral nyúl embrionális fibroblaszt sejteket felhasználva, iPS sejteket létrehozni, egy módosított ES tenyésztő médiumban. Az elkövetkező időszakban, az általuk

rendelkezésünkre bocsájtott nyúl iPS sejtek molekuláris, illetve in vitro, in vivo karakterizálását fogjuk elvégezni.

A SleepingBeauty (SB) transzpozon-transzpozáz rendszerrel jó hatékonysággal sikerült transzgenikus egér és humán embrionális őssejt vonalakt létrehozni (Orbán és mtsai, 2010). Intézetünkben, a hiperaktív SB100X transzpozáz és CAGGS/Venus SB transzpozon alkalmazásával a Venus transzgént örökítő alapító nyulakat sikerült létrehozni. Ezek embrióiban is kimutatható a Venus fehérje expressziója, aminek segítségével a nyúl ESC, illetve EpiSC sejtek beépülése a nyúl kiméra embriókba nyomon követhetővé válik (**13.ábra**).



## TRANSZGÉNIKUS NYULAK ELŐÁLLÍTÁSA SLEEPING BEAUTY (SB) TRANSZPOZON MIKROINJEKTÁLÁSSAL

László Hiripi, Orsolya Hoffmann

*Nyúl ES kimérák létrehozása*

**13.ábra**

A pályázat keretében végzett munka során elért eredményeket a az alábbi pontokban lehet összefoglalni (**14.ábra**)

## NYÚL EPIBLASZT EREDETŰ ÖSSEJT VONALAK LÉTREHOZÁSÁNAK HATÉKONYSÁGÁT NÖVELŐ LÉPÉSEK

- Nyúl embriókban, őssejt vonalakban pluripotens sejtekre jellemző markerek expressziójának vizsgálata - **megfelelő ellenanyagok ✓, real time PCR primerek kiválasztása ✓**
- Trofoblaszt sejtek osztódásának megakadályozása - **immunosurgery ✓**
- Hipoblaszt sejtek osztódásának megakadályozása - **mechanikus úton elválasztott epiblaszt-hipoblaszt ✓, inhibitorok alkalmazása (?)**
- Nyúl fibroblaszt és nyúl őssejt transzgenézise - **SB transzpozon rendszer alkalmazása ✓**
- Nyúl őssejt in vitro differenciáltatása - **szívizom (LIF megvonás) ✓, idegsejt irányba (N2B27 médium+PD+CH+bFGF) ✓, endoderma irányba (AW médium+PD+CH) ✓**
- Nyúl kiméra embriók létrehozásának hatékonyságát növelni - **optimalizált transzfer időpont ✓, EGFP expresszió ✓**
- Újabb pluripotencia markerek vizsgálata - **őssejt specifikus miRNS expresszió vizsgálata nyúl embriókban, nyúl ES sejtekben ✓**

**14.ábra**



**IRODALOMJEGYZÉK**

- Evans, M.J., Kaufman, M.H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292. 154-156.
- Hiripi, L., Negre, D., Cosset, F-L., Kvell, K., Czömpöly, T., Baranyi, M., Gócza, E., Hoffmann, O., Bender, B., Bősze, Zs. (2010): Transgenic rabbit production with simian immunodeficiency virus-derived lentiviral vector. *Transgenic Research* 19:799-808.
- Honda A, Hirose M, Hatori M, Matoba S, Miyoshi H, Inoue K, Ogura A. 2010: Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine. *J Biol Chem*, 285(41):31362-9
- Honda A, Hirose M, Ogura A. 2009. Basic FGF and Activin/Nodal but not LIF signaling sustain undifferentiated status of rabbit embryonic stem cells. *Exp Cell Res* 315.2033–2042.
- Honda A., Hirose M., Inoue K., Ogonuki N., Miki H., Shimozawa N., Hatori M., Shimizu N., Murata T., Hirose M., Katayama K., Wakisaka N., Miyoshi H., Yokoyama K. K., Sankai T. and Ogura A. 2008. Stable embryonic stem cell lines in rabbits: potential small animal models for human research. *Reprod Biomed Online* 17. 706-15.
- Li W, Wei W, Zhu S, Zhu J, Shi Y, Lin T, Hao E, Hayek A, Deng H, Ding S. 2008. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 4. 16–19.
- Liao J, Cui C, Chen S, Ren J, Chen J, Gao Y, Li H, Jia N, Cheng L, Xiao H, Xiao L. 2009. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell* 4. 11–15
- Liu H, Zhu F, Yong J, Zhang P, Hou P, Li H, Jiang W, Cai J, Liu M, Cui K, Qu X, Xiang T, Lu D, Chi X, Gao G, Ji W, Ding M, Deng H. 2008. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 3.587–590
- Maraghechi, P., Hiripi, L., Tóth, G., Bősze, Zs., Gócza, E. (2012): Identification of stem cell-specific microRNAs in rabbit preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.*, submitted
- Martin, G.R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78.7634–7638.
- Nagy, K., Smith, L., Laflamme, S., Critser, J., Gócza, E., Nagy, A. (2010): Derivation of iPS cell lines from domestic species with piggyBac transposons. *ISSCR 2010*, Los Angeles, poster, abstract
- Nichols J, Jones K, Phillips JM, Newland SA, Roode M, Mansfield W, Smith A, Cooke A. 2009. 17/21.

Validated germline-competent embryonic stem cell lines from nonobese diabetic mice. *Nat Med.* 15(7).814-8

Nichols J, Ying QL. 2006 Derivation and propagation of embryonic stem cells in serum- and feeder-free culture. *Methods Mol Biol.* 329.91-8

Orban TI, Apati A, Nemeth A, Varga N, Krizsik V, Schamberger A, Szebenyi K, Erdei Z, Varady G, Karaszi E, Homolya L, Német K, Gócza E, Miskey C, Mátés L, Ivics Z, Izsvák Z, Sarkadi B: Applying a "double-feature" promoter to identify cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells following transposon-based gene delivery. *Stem Cells* 2009, 27:1077–1087.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5).861-72.

Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 126(4).663-76.

Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S. Jones J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-7.

Ying QL, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A. 2008. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453.519–523

Ying QL, Yan Y, Wu N.L, Li P, Tong C. 2010. Production of p53 knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature.* 467(7312). 211–213.

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318.1917–1920.

**A PÁLYÁZAT KERETÉBEN VÉGZETT MUNKÁT BEMUTATÓ PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE:****Külföldön kiadott tudományos folyóiratok**

1. Maraghechi, P., Hiripi, L., Tóth, G., Bősze, Zs., Gócza, E. (2012): Identification of stem cell-specific microRNAs in rabbit preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.*, submitted **IF: 4,791**, *OTKA hiv*
2. Tancos, Zs., Nemes, Cs., Polgar, Zs., Gocza, E., Daniel, N., Stout, T. A. E, Maraghechi, P., Purity, M. K., Osteil, P., Tapponnier, Y., Markossian S., Godet M., Afanassieff M., Bosze Zs., Duranthon, V., Savatier P., Dinnyes A. (2012): Generation of rabbit pluripotent stem cell lines. *Review, Theriogenology*, submitted **IF: 2,045**, *OTKA hiv*

**Könyvrészletek:**

1. Sági L., Gócza E., Kovács K. (2011): A genetikailag módosított szervezetek előállításának módszerei "Genetikailag módosított élőlények (gmo-k) a tények tükrében. Magyar Fehér Könyv" (Szerk: Balázs E., Dudits D., Sági L.), Tisza Press Nyomda, ISBN 978-963-08-1065-4, pp. 18-35.
2. Sági L., Gócza E., Kovács K. (2011): Plain Facts about GMOs.: Hungarian white paper. (Szerk: Balázs E., Dudits D., Sági L.), Barabás Zoltán Federation of Biotechnology, Tisza Press Nyomda, ISBN:978-963-08-1066-1, pp. 18-33.

**Kongresszusi kiadványokban megjelent közlemények****Angolul:**

1. Gócza, E., Maraghechi, P., Lichner, Zs., Hiripi, L., Lemos, A.P.C., Bősze, Zs. (2009): Examination of the influence LIF and bFGF on the efficiency of rabbit ESC line derivation. *Regenerative Medicine*, 4(6) Suppl. 2. S183-184., World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig, Germany, October 29-31., 2009., *abstract, poster*, **IF: 2,78**, *OTKA hiv*
2. Maraghechi, P., Lichner, Zs., Hiripi, L., Lemos, A.P.C., Bősze, Zs., Gócza, E. (2010): Investigation of the effect of LIF and bFGF on rabbit ESC pluripotency and derivation efficiency. *Transgenic Research* 19(2) p341, *poster, abstract* **IF: 2,569**, *OTKA hiv*

3. Maraghechi, P., Lichner, Zs., Bősze, Zs., Gócza, E. (2010): Identification of embryonic stem cell-specific microRNAs. Non-Coding Genom conf. Heidelberg, Germany, October 13-16., *poster, abstract*, p165, *OTKA hiv*
4. Gócza, E., Lichner, Zs., Maraghechi, P., Hiripi, L., Bősze, Zs. (2011): Investigation of embryonic stem cell-specific miRNA expression in mouse and rabbit stem cells. ISSCR 9th Annual Meeting, P3554, Toronto, Canada, June 15-18, 2011\*
5. Gócza, E., Maraghechi, P., Bontovics, B., Hiripi, L., Makarevich, A.V., Slamecka, J., Chrenek, P., Bősze, Zs. (2011): Pluripotency markers in early rabbit development and embryonic stem cells. 4th International Rabbit Biotechnology Meeting. Budapest, Hungary, 2011.06.30-07.01. p35., *abstract, lecture, Worl Rabbit Sci.*, **IF: 0,660**, *OTKA hiv*
6. Maraghechi P., Hiripi L., Tóth G., Lichner Zs., Bősze, Zs. Gócza, E. (2011): Stem cell - specific microRNA expression in rabbit embryonic development and embryonic stem cells. 4th International Rabbit Biotechnology Meeting. Budapest, Hungary, 2011.06.30 -07.01. p37., *abstract, Worl Rabbit Sci., abstract, lecture*, **IF: 0,660**, *OTKA hiv*
7. Gocza E., Maraghechi P., Bontovics B., Hiripi L., Hoffmann O.I., Kerekes A., Bosze Zs. (2011): Expression pattern of stem cell specific markers and microRNAs during rabbit embryonic development and in embryonic stem cells. Regenerative Medicine, 6/Suppl.2. p205, World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig, Germany, November 2-4., 2011., *abstract, poster*, **IF: 3,358**, *OTKA hiv*
8. Dinnyes, A., Purity, M. K., Gocza, E., Osteil, P., Daniel, N., Tancos, Zs., Polgar, Zs., Maraghechi, P., Ujhelly, O., Nemes, C., Stout, T., Tapponnier, Y., Bosze, Zs., Jouneau, A., Afanassieff, M., Savatier, P. (2012): Generation of rabbit pluripotent stem cell lines Reproduction Fertility and Development, (24)(1), p286 *abstract* **IF: 1,637**
9. Bontovics, B., Slamecka, J., Maraghechi, P., Hiripi, L., Makarevich, A.V., Chrenek P., Bősze, Zs., Gócza E. (2012): Expression pattern of pluripotency markers in rabbit epiblast and embryonic stem cells. 75th Anniversary of Albert-Szent Györgyi's Nobel Prize award. Szeged, Hungary, March, 22-25. 2012., *abstract, poster*, P-M3, p. 237., *OTKA hiv*
10. Gócza E., Bontovics B., Slamecka J., Maraghechi P., Hiripi L., Makarevich A.V., Chrenek P., Bodó Sz., Carstea V.B., Kovács A., Bősze Zs. (2012): Current issues in pluripotent stem cell research (Őssejtkutatás időszerű kérdései)., CEELA-II 2012.06.02., *abstract, lecture*, *OTKA hiv*

### Kongresszusi kiadványokban megjelent közlemények

**Magyarul:**

1. Gócza Elen (2009): Embrionális eredetű őssejtvonalak létrehozása, típusai, főbb alkalmazási lehetőségei. Semmelweis Egyetem Kardiológiai Központ, Budapest, 2009. november 25. p4-5, absztrakt, előadás, OTKA \*
2. Maraghechi, P., Lichner, Zs., Hiripi, L., Lemos, A.P.C., Bősze, Zs., Gócza, E. (2010): Investigation of the role of LIF and bFGF on rabbit ES cell pluripotency and derivation efficiency. 9. Genetikai Műhelyek Magyarországon, Minikonferencia, Szeged, 2010. szeptember 3., előadás\*\*
3. Gócza E., Lichner Zs., Maraghechi, P., Hiripi, L., Tóth, G., Bősze Zs. (2011): Őssejt-specifikus miRNS-ek expressziójának vizsgálata egér és nyúl embrionális eredetű őssejtekben. IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, O068, pp. 98-99., Siófok, 2011.03.25-27., absztrakt, előadás, OTKA *hiv*
4. Maraghechi P., Bontovics B., Hiripi L., Kerekes A., Hoffmann O.I., Bősze Zs., Gócza E. (2011): Az embrionális fejlődés kezdeti szakaszára jellemző markerek expressziós mintázatának vizsgálata nyúl embriókban. 23. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, Kaposvár, 2011. május 25. pp. 99-104., ISBN 978-963-9821-30-9. absztrakt, előadás, OTKA *hiv*
5. Gócza E. (2012): miRNS expresszió vizsgálata egér és nyúl embrionális őssejtekben. II. Magyar Őssejt Konferencia, Budapest, Mercure Buda Hotel, 2012.április 26., előadás\*\*

\* az absztraktban nem volt lehetséges pályázati hivatkozás megadása, poszteren fel lett tüntetve az OTKA pályázat száma

\*\* nem kellett absztraktot beküldeni, az előadásban fel lett tüntetve az OTKA pályázat száma

Beküldött impakt faktoros cikk: 2

Könyvrészletek:

angol	1
magyar	1

Kongresszusi kiadványokban megjelent közlemények:

angol (ebből előadás):	10 (3)
magyar (ebből előadás):	5 (5)