

## Zárójelentés K-46171

### **Egér klónozás testi- és embrionális őssejtekből: A donor sejtek eredetének és kezelésének hatása a genetikai újraprogramozás folyamatára**

A testi sejt klónozás módszere az elmúlt években gyors fejlődésen ment keresztül. A módszer várhatóan számos orvosi és mezőgazdasági alkalmazásra nyújt majd lehetőséget. Ennek ellenére a módszer számos problémával küzd, amelyek a hatékonyságot jelentősen csökkentik. A magas magzati fejlődés alatti és megszületés utáni veszteségek rendellenes génműködési okokra vezethetők vissza. Egérben a testi sejtéből és embrionális őssejtéből származó klónozott egerek esetében különbségek figyelhetők meg az utódfejlődési arányokban, jelezve a kétféle eredetű sejtek közötti „újraprogramozhatósági” hatékonyság különbséget. Az elvégzett kutatások kiindulási koncepciója szerint a testi sejtek őssejt-kivonattal történő kezelése alkalmasabbá teheti ezen sejteket a sejtmagátültetés során szükséges genetikai újraprogramozásra.

#### **A kutatások célja volt:**

- 1) Testi- és magzati őssejtekből klónozott egerek előállítása, Magyarországon elsőként.
- 2) A donor sejtek genetikai újraprogramozhatóságát befolyásoló tényezők vizsgálata, és ennek révén a hatékonyság fokozása.

A kutatások első évében, (2004) *a tervezetteknek megfelelően a következő kísérletek történtek meg:*

#### **1. A klónozási módszer technikai feltételeinek megteremtése**

- Piezo-manipulátor és automatikus manipulátor karok rendszerbe állítása.
- Mikromanipulációs pipetták készítése és tesztelése
- A teljes manipulációs és optikai rendszer összehangolása és tesztelése

#### **2. Az egér klónozási technológia biológia feltételeinek és technikai lépéseinek tesztelése**

- Petesejt donor egér törzsek összehasonlítása
- Petesejt aktivációs eljárások tesztelése
- Embrió kultivációs eljárások tesztelése
- Embrió beültetés és embrió recipiens egértörzsek összehasonlítása

A technológiai rendszer négy alrendszerből tevődik össze:

1. Embriótenyésztés
2. Donorsejt előkészítés
3. Mikromanipuláció
4. Embrió beültetés

2004-ben a tervezetteknek megfelelően elsősorban a mikromanipulációs és az embriológiai alrendszerek optimalizálását végeztük el. A sejtmag-átültetéshez frissen izolált kumuluszsejteket használtunk, ezért a donor sejt előkészítési rendszer nem igényelt fejlesztést.

#### **1. A klónozási módszer technikai feltételeinek megteremtése**

**Mikromanipulációs rendszer beüzemelése és tesztelése intra-citoplazmatikus spermium injektálás (ICSI) segítségével**

A sejtmag-átültetés mikromanipulációs módszere jelentősen eltér a szarvasmarha, sertés, juh klónozás során alkalmazott eljárástól, mivel az egér petesejt membránja és az azt körülvevő zona pellucida fiziko-kémiai tulajdonságai mások, és nehezebbé teszik a zona átszúrását. A 90'es évek közepén fejlesztettek ki a probléma áthidalására egy Piezo-elektromos hatáson alapuló, horizontális irányban, változtatható frekvenciájú és amplitúdójú, mikrorezgéseket kifejtő rendszert, ami az injektáló mikrokapilláris átjutását segíti az egér petesejt zona pellucidáján és membránján. A sejtmag-átültetési beavatkozást előkísérleteként először az intra-citoplazmatikus spermium injektálási (ICSI) rendszert állítottuk fel. Az ICSI során egyetlen hímvarsejtet juttatunk a petesejt citoplazmájába, biztosítva ezzel az ivarsejtek összeolvadását. Az egér modellrendszeren végzett ICSI beavatkozással létrehozott embriók alkalmasak lehetnek arra is, hogy korszerű génműködés-vizsgálati módszerekkel tanulmányozhassuk a mikromanipuláció következtében esetleg kiváltott epigenetikus változásokat. Az epigenetikus változások és az utód analízis adatainak összevetésével az egér rendszeren tapasztalt összefüggések nagy jelentőséggel bírhatnak a humán ICSI-t alkalmazó szakemberek számára is.

A technológia lépései

1. Szuperovuláltatás hormonkezeléssel, majd a petesejtek kinyerése a petevezetőből.
  2. A petesejtek denudálása: 300 IU/ml töménységű hyaluronidase tartalmú HEPES-CZB médiumban.
  3. A sperma előkészítése: Az ondóvezetőből nyert spermát 0,5 ml HEPES-CZB médium alá rétegezzük egy 2 ml-es Eppendorf csőben, majd inkubátorban 10-20 percig állni hagyjuk. A felülről 5 µl-nyit pipettázunk a mikromanipulációs edény 20 µl-es, 10% PVP-t (polivinyl-pirrolidon) tartalmazó HEPES-CZB cseppjébe.
  4. A spermium fej szeparálása: Egy speciális, a Piezo-elektromos hatást felhasználó készüléket (Primetech, Japán) használunk. A 7-10 µm belső átmérőjű, tompa végű mikrokapillárisba beszívjuk a spermiumot a farki részénél kezdve, és amikor a kapilláris vége éppen eléri a fej-nyak összeköttetést, működésbe hozzuk a Piezo készüléket, ami mikrorezgéseket továbbít a kapilláris hegyére, aminek hatására a fej elválik a faroktól. A továbbiakban csak a fejet szívjuk be a kapillárisba, a farkra nincs szükség. Egérben az ICSI-hez, illetve az azt követő normális előmagképzéshez, valamint osztódáshoz elegendő a spermium feje, ugyanis a sejtosztódást irányító centroszómát nem a spermium nyaki része tartalmazza, hanem a petesejt.
  5. A spermium fejének beinjektálása a petesejt citoplazmájába nem hajtható végre az emberi petesejten korábban leírtaknak (hegyes kapillárisal beszúrva) megfelelően, mivel az egér petesejt zona pellucidája és plazmamembránja túl rugalmas ahhoz, hogy azokon így át tudjunk hatolni. A Piezo készülék a 7-10 µm belső átmérőjű, tompa végű mikrokapillárist kis kalapácsként átüti a zona pellucidán, miközben abból egy henger alakú darabot kimetsz. Ezt a darabot, mivel nincs rá szükség, benyomjuk a zona pellucida és az oolemma közötti perivitelináris térbe. Ezután a plazma membránnak nyomva a kapilláris végét a Piezo-impulzussal megszakítjuk azt, és a citoplazmába injektáljuk a spermium fejét.
- A Piezo készülék alkalmazásáról általánosságban elmondható, hogy a fent említett három különféle művelet három különböző beállítást igényel a roncsolandó biológiai képlet fizikai tulajdonságai miatt. Alapelv, hogy mindig a legkevesebb számú, és legkisebb amplitúdójú, még hatékony rezgéseket alkalmazzuk, elkerülve ezzel a sejt lízist.
6. Az embriók in vitro tenyésztése CZB-IVC médiumban.

1. Táblázat: Az ICSI eredményessége különböző egér törzsből származó petesejteken

Törzs	No.	Túlélés	Osztódás (túlélők közül)	Blasztociszta
ICR	207	104 (50%)	64 (58%)	-
F1	113	83 (73%)	68 (82%)	23 (34%)



1. kép. Egér ICSI

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a CD1 (ICR) petesejtek jelentősen érzékenyebben reagáltak a mikromanipulációs beavatkozásra – a mikropipilláris penetrációját követően nagy számban következett be azonnali sejtlízis (50%), és a sikeresen injektált petesejtek továbbfejlődési képessége is rendkívül gyengének bizonyult. Kísérleteinkből egyértelműen következik, hogy a sejtmag-átültetés során alkalmazott, az ICSI-vel megegyező sejtmag injektálási lépést csak enukleált F1 petesejteken érdemes elvégezni, mivel az outbred ICR petesejtek citoplasztiként való alkalmazása a lízisre való nagyobb érzékenység miatt nem ígérkezik sikeresnek.

### Sejtmagátültetés

A mikromanipulációs technikát sikeresen alkalmaztuk kumulusz sejtek magátültetésére (NT) is. A kumuluszsejtek magját szintén Piezo-rendszeres membrán roncsolás segítségével izoláltuk, majd Piezo mikromanipuláció segítségével enukleált petesejtekbe injektáltuk. A mikromanipulációt követően az NT konstrukciókat öt órán keresztül aktivációs médiumban (10mM SrCl<sub>2</sub> + Cytochalasin B Ca<sup>2+</sup>-mentes CZB médiumban) inkubáltuk. Az aktiválás után az NT konstrukciókat CZB médiumban tenyésztettük négy napon keresztül. Az eljárással sikerült életképes hólyagsíra stádiumú „klónozott” embriót létrehozunk in vitro tenyésztést követően (2. kép).



2. kép. Kumulusz sejt NT egér blasztociszta.

## **2. Az egér klónozási technológia biológia feltételeinek és technikai lépéseinek tesztelése** **In vitro egér embrió előállító és beültető rendszer kidolgozása**

Két egértörzs (C57Bl6 –inbred x DBA2J –inbred: D2B6 F1 és ICR-outbred) embrióinak zigóta stádiumtól blasztociszta stádiumig történő in vitro tenyésztésére alkalmas rendszert alakítottunk ki. Az embriódonor állatokból eCG és hCG szuperovulációs kezelést követően zigóta stádiumtól morula stádiumig a leölt állatok petevezetőjéből, blasztociszta stádiumban a méhből kinyert embriókat CZB, illetve KSOMAA médiumokban sikerült in vitro a „hatched blasztociszta” állapotig tenyészteni.

Bebizonyítottuk, hogy a tenyésztési rendszer alkalmas parthenogenetikus embriók továbbtenyésztésére, ami a sejtmagátültetett embriók továbbtenyésztésének minőségi kontrollját biztosítja. A parthenogenezist 5 órás  $\text{SrCl}_2$  + Cytochalasin B inkubációval, illetve 7 perces etanolban történő aktiválással váltottuk ki.

A parthenogenetikus embriók létrehozásához felhasznált petesejt aktivációs lépés megegyezik a sejtmag-átültetéses klónozási technológiában alkalmazott aktivációval, így ennek a lépésnek az optimalizálása elengedhetetlen a klónozási folyamat kidolgozásához. A parthenogenetikus embriók számára a két in vitro kultivációs szisztéma közül a CZB tenyésztési rendszer bizonyult hatékonyabbnak, ezért a sejtmagátültetéssel létrehozott klónozott embriók számára ez a tenyésztési eljárás célravezető.

Embrióbeültetési kísérletek két sejtes stádiumú embriókkal folytak. A két-sejtes embriók beültetésével a vemhesség előrehaladott stádiumában (17. napon) megvizsgált recipiensekben megfelelő fejlettségű magzatok voltak megfigyelhetőek, a vemhesülési arányok (60%) is kielégítőek voltak.

### **Sejtvonalak módosítása**

- *a legjobb testi sejtvonal kezelése embrionális őssejtekből nyert kivonatokkal és az így nyert sejtekből klónozás*

Az őssejt kivonatos kezelés számos előkísérletet igényelt, így ezek megkezdése már 2004-ben indokolt volt. Philippe Collas és munkatársai egy új módszert dolgoztak ki a transzdifferentiálásra (2002). A teljes sejt helyett csak annak kivonatát használják fel a differenciálódás elindítására. Rendszerükben in vitro körülmények között sikerült a sejtkivonattal befolyásolni a génextpressziót más típusú sejtekben. A rendszer lényege, hogy a sejtkivonat olyan szabályozó faktorokat tartalmaz, melyek változást idéznek elő a célsejtek génextpressziójában. A célsejtek és a sejtkivonatot adó sejtek különböző szövetekből származtak. A kezelés következtében elérhető, hogy a sejtek G0 fázisba kerüljenek. Ezzel a hipotézis szerint a klónozás számára alkalmas sejtpopulációk állíthatók elő, már differenciálódott tenyészetekből, mint például a fibroblaszt tenyészetek.

Laboratóriumunkban folytatott kísérleteink során ezeket az eredményeket alapul véve embrionális őssejtekből (ES sejtek) készítettünk kivonatot és annak hatását fibroblaszt tenyészeteken vizsgáltuk. A munka célja a fibroblaszt sejtek G0, vagy G1 stádiumba történő visszaprogramozásának lehetőségének vizsgálata volt, őssejt kivonattal történő kezelést követően.

Az őssejtekből kivont sejtmag DNS mentes, citoplazma alkotókat tartalmazó oldatot a testi sejtek membránjának ideiglenes átjárhatóvá tételével juttattuk be. Az így kezelt sejteket sejtdonorként felhasználva azok genetikai újraprogramozását az in vitro, majd in vivo fejlődési adatok alapján hasonlítottuk össze a kezeletlen testi sejtekből, valamint az őssejtekből származó csoportokkal.

Kísérleteinkben egér embrionális őssejtek lízissel, illetve cukor-grádiensen történő ultracentrifugálással előállított kivonatait teszteltük, primer egér embrionális fibroblaszt tenyészeteken. Vizsgáltuk a nukleáris kivonat, illetve a citoszol frakció hatását koncentráció és az alkalmazott kezelés idejének függvényében. Megvizsgáltuk proteáz inhibitor kivonathoz történő adagolásának hatását is. A sejtek osztódási rátáját és életképességét a kezelést követően 16, 20 és 24 órával mértük MTT-assay, fluoreszcens BrdU-teszt és tripánkék festés segítségével.

A tesztek eredményeként a legnagyobb osztódási ráta növekedés a nukleáris extrakt kezelést követően volt megfigyelhető. A proteáz inhibitorok adagolása a vizsgált kezelési időtartamban szignifikánsan javította sejtek túlélését. A kezelés időtartamának meghatározásakor dózisfüggő hatást tapasztaltunk.

Ezt követően megvizsgáltuk Ca-ionok jelenlétének hatását a kezelésre: ebben az esetben Ca-ion koncentrációfüggő osztódás-csökkenést, illetve gátlást tapasztaltunk. A kapott eredményeket a génexpresszió vizsgálatával is elemeztük. Két, a sejtciklus szabályozásában részt vevő gén expresszióját nyomon követve a sejtosztódás blokkolását igazoltuk a kezelések következtében.

Eredményeinket összegezve elmondható, hogy transzdzifferenciáltatási kísérleteinkben a legjobb eredményeket az ES sejtekből készített  $10^4$  és  $10^5$  sejt/ml koncentrációból kiinduló nukleáris extrakt eredményezte, 5 mM  $\text{CaCl}_2$  koncentráció és proteáz inhibitor koktél együttes alkalmazásával.

A kutatások második évében, **(2005) a tervezetteknek megfelelően a következő kísérletek történtek meg:**

#### ***Sejtmag-donor sejtvonalak összehasonlítása***

- Fibroblaszt sejtvonalak alapítása és tesztelése klónozással
- Kumulusz sejtek tesztelése, friss és sejtvonal sejtek összehasonlítása
- Meglévő és újonnan alapított embrionális őssejt-vonalak tesztelése

A sejtmagdonor sejtek szerepe döntő fontosságú a klónozási rendszer hatékonysága szempontjából. A különböző eredetű sejtek kimutathatóan hatással vannak a klónozást követő fejlődési arányokra.

A különböző sejtvonalak eltérnek fenntarthatóságukban. A testi sejt vonalak egy meghatározott számú osztódás után, a „krízis” során elpusztulnak, vagy genetikailag elváltoznak, és ezáltal válnak alkalmatlanná a klónozásra. A viszonylag hosszú élettartam rendkívül fontos a klónozás gyakorlati alkalmazása (pl. génkiütés) sikeréhez. A már létező és újonnan alapított egér őssejtvonalak tesztelése szükséges, mivel az egyes sejtvonalak felhasználhatósága klónozási célokra igen jelentősen eltérhet. A tesztelés egy fontos eleme a sejtvonalak génkiütésre való alkalmasságának vizsgálata. A kísérletek során a donor sejtekkel előállított klónozott embriók életképességét alapvetően in vitro fejlődésük és az így nyert embriók sejt száma révén hasonlítottuk össze. Az ígéretes sejtvonalak esetében embrió beültetésre is sor került.

#### ***A. Sejtvonalak tesztelése génkiütési célokra***

##### **A kiválasztott sejtvonal transzgenikusá, illetve génkiütötté tétele, génkiütött embrionális őssejtek létrehozása**

A pályázatban tervezetteknek megfelelően összehasonlításra kerültek különböző embrionális őssejt (ES) vonalak, valamint fibroblaszt és kumulusz sejtek.

## FELHASZNÁLT ES SEJTVONALAK

A kísérletekhez két nemzetközi ES sejtvonalat használtunk. Az R1 sejtvonal (p9) Dr. Nagy András torontói laboratóriumából kaptuk (Nagy et al. 1993; Nagy et al. 2003), valamint a HM-1 (p22) sejtvonal, amelyet Dr. Jim McWhir, a Roslin Institute kutatója (Magin et al. 1992; McEwan and Melton, 2003) bocsátott a rendelkezésünkre.

### **ES sejtek tenyésztése**

A sejtek tenyésztését Nagy és munkatársai (2003) kézikönyvében közölt protokollját követve végeztük az alábbiak szerint. Az ES sejtek differenciálatlan állapotban való fenntartásához mitomicin C antibiotikum kezelt (Sigma, 10 $\mu$ g/ml), 13,5 napos egér embrió kötőszövetes részeiből származó egér embrionális fibroblaszt (MEF) tápláló sejtréteget használtunk. A sejteket DMEM médiumban (Gibco) tenyésztettük, 15% FCS kiegészítés mellett (Hyclone). A médium L-glutamin (Gibco; 2mM),  $\beta$ -merkaptóethanol (Sigma; 0,1 mM), Napiruvát (Gibco, 1mM) nem esszenciális aminosav (Sigma, 10mM), penicillin (Gibco, 50 U/ml), streptomycin (Gibco, 50 $\mu$ g/ml) és rekombináns egér Leukémia Inhibitor Faktor (ESGRO-LIF; Chemicon; 1000 U/ml) kiegészítést tartalmazott. A sejteket kétnaponta passzáltuk át Tripszin:EDTA (0.25% tripszin; Gibco) emésztést végezve, új mitomicin C kezelt fibroblaszt sejtrétegre, az optimális sejtszám beállítását követően.

### FIBROBLASZT SEJT TENYÉSZETEK

A klónozáshoz embrionális fibroblaszt tenyészeteket (továbbiakban MEF) a CB1 transzgénikus egértörzsből izoláltuk, amelyet Dr. Szabó Gábor, KOKI munkacsoportja állított elő és bocsátott a rendelkezésünkre.

A primer MEF tenyészetek izolálásakor Nagy és munkatársai (2003) kézikönyvében közölt protokollját követve végeztük az alábbiak szerint. A magzatokat 13,5 napos vemhességet követően emeltük ki a méhből, antibiotikum tartalmú PBS oldatba. A steril laboratóriumban steril fülke alatt az embriókat először az extraembrionális burkoktól és a méhlepénytől mentesítettük, majd a kötőszövetes részeket izoláltuk. Az így nyert szövetdarabokat tripszines kezeléssel (Tripszin:EDTA oldat, 0.25% tripszin; Gibco) 2x 30min ideig 37°C-on disszociáltattuk, majd 100  $\mu$ m, 70  $\mu$ m és 50  $\mu$ m szűrősorozaton tisztítottuk és szűrtük. Az így nyert sejtszuspenziót tenyésztő médiumban (DMEM+10% FBS, Gibco) szélesztettük 75 cm<sup>2</sup> tenyészfelületű sejtenyésző flasksba (Greiner). A médiumot a le nem tapadó sejtek és az izolálásakor keletkező törmelék eltávolítása céljából 12 h elteltével 2xPBS mosás mellett cseréltük le. A sejteket ezután a konfluencia eléréséig tenyésztettük, majd optimális sejtszámmal tovább passzáltuk, vagy lefagyasztottuk és folyékony nitrogénben tároltuk további felhasználásig.

### KUMULUSZ SEJTEK

A kísérletek során friss kumulusz sejtek kerültek felhasználásra, amelyeket a petesejtek izolálása és sejtektől való megtisztítása során nyertünk.

### A SEJTMAG DONOR SEJTEK GENETIKAI MÓDOSÍTÁSA

#### **ES sejtek elektroporálása, KO klónok létrehozása**

Az elektroporáláshoz a sejteket 800  $\mu$ l elektroporációs oldatban vettük fel 10<sup>7</sup> sejt/ml koncentrációban. A sejtekhez ezt követően a bevinni kívánt transzgén konstrukciót 20  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O-ban felvéve kevertük hozzá, majd azonnal elektroporátor küvettába helyeztük (0,4 mm elektród távolság; BioRad) és elektroporáltuk (Genew Pulser X, BioRad; 240 V, 500  $\mu$ F, 250  $\Omega$ ). Ezt

követően a sejteket tenyésztő médiummal hatszoros térfogatra hígítottuk, majd mitomicin C kezelt MEF tápláló sejtréteget tartalmazó, 10 cm-es Petri-csészékre szélesztettük. Az antibiotikum szelekciót 48 h múlva kezdtük meg (200 µg/ml G418). A klónok szelektálása 2 hét elteltével kezdődött.

A szelektált klónokat sztereo mikroszkóp alatt (SZH, Olympus) mikropipetta segítségével emeltük ki egyedileg, 96-lyukú tenyésztőedénybe. A klónok felnövekedését követően a tenyészeteket 3 felé osztottuk, tripszinezést követően, ahol 1/3 rész PCR-analízisre került, 1/3 részt fagyasztásra, míg 1/3 részt további tenyésztésre használtunk fel. A PCR analízist a targetált szekvencia alapján tervezett primerekkel végeztük. A PCR pozitív klónokat a 96-lyukú tenyésztőedényből izoláltuk, majd 24-lyukú, végül pedig 6 cm-es Petri csészében tenyésztettük tovább, a szokásos ES-tenyésztési protokollt követve. A klónokat fagyasztáshoz és genomiális DNS izoláláshoz szaporítottuk fel, ahol a szokásos Souther-blot analízissel vizsgáltuk a génkiütés sikerét. Az elektroporálási kísérletek eredményeit az 2. Táblázat szemlélteti. Az eredmények megfelelnek a nemzetközi élenjáró csoportok teljesítmény szintjének. A knock-out kísérletekben létrehozott génkiütött sejtklónokból mind az R1, mind pedig a HM-1 sejtvonalon esetén 2-2 klónt választottunk ki, amelyeket kiméra előállításra használtunk, így tesztelve a sejtvonalat.

**2. Táblázat: KO ES-sejtvonali klónok**

Sejtvonali	R1-9	hatékonyság	HM-1	hatékonyság	Σ
Szelektált klónok (db)	800		900		1700
PCR pozitív klónok (db)	27	3,4%	35	3,9%	62 (3,6%)

### ***KO ES sejtek felhasználása kiméra előállításra***

Az előállított KO ES sejtek funkcionális minőségét, a génkiütés sikerességét un. "kiméra" embriók, majd utódok előállításával lehet tesztelni. A sejtek tenyésztése a standard protokoll szerint történt (Nagy et al. 2003). A 24h-val korábban passzált sejteken tripszines kezelést alkalmazva szuszpenziót készítettünk. A sejteket 10 cm-es petri csészére szélesztettük 15 min időtartamra (preplating). Ezt követően a le nem tapadó sejteket összegyűjtöttük, majd lecentrifugáltuk és a sejt-pelletet a blasztociszta injektáláshoz kialakított HEPES-pufferelt (Sigma) tápoldatban szuszpendáltuk fel. Ezt követően a sejtsuszpenziót jégre helyeztük 30 percre, majd injektáltuk azokat blasztociszta stádiumú egér embriók blasztocoel üregébe. A HM1 KO össejteket 92 CD-1 blasztocisztába, az R1 KO össejteket 57 CD-1 blasztocisztába injektáltuk. Az injektáláshoz Piezo-berendezés segítette mikromanipulációt alkalmazva 10-12 össejtet juttatunk mindegyik embrióba. Az embriók egy részét CD-1 recipiens állatokba ültettük (9 ET program), másik részét vitrifikáltuk, majd felolvasztás után szintén beültettük (7 ET program).

**3. Táblázat: Blasztociszta injektálási és embrióültetési adatok**

KO össejtek		Beültetett embriók	Megszületett utód	Kiméra
HM1	Mélyhűtés után	29	5	4
HM1	Mélyhűtés nélkül	57	6	3
R1	Mélyhűtés után	37	6	0
R1	Mélyhűtés nélkül	14	8	3

A kiméra utódokat CD-1 nőstényekkel pároztattuk. Az almodokat vizsgálva nem találtunk HM1, illetve R1 szőrszínnel rendelkező utódokat. 2006-ban a KO ES sejtklónokat tovább teszteltük osztrák együttműködésben, és az általunk előállított gén targetált sejtekből sikerült ivari sejt kimérákat és stabil KO állatokat is előállítani. Ezek további vizsgálata, karakterizálása jelenleg is folyik.

### ***ES sejtek tenyésztése a klónozást megelőzően***

Az ES sejteket a klónozást megelőzően 72-96 órával passzáltuk, úgy, hogy a klónok konfluenciája ne haladja meg a 75-80 %-ot a felhasználásig. A tenyésztő médium szérumban tartalmát nem csökkentettük le, szérumban megvonást nem alkalmaztunk. A sejteket a klónozás reggelén frissen tripszinezttük, majd tenyésztő médiumban hígítottuk ki és jégen tároltuk felhasználásig. A sejtek felhasználásának eredményei alább kerülnek bemutatásra.

### ***B. Klónozás és kiméra előállítás transzgenikus és géntöröltött sejtekből, a hatékonyság és életképesség összehasonlítása***

Az egér klónozás sikeres megvalósítása céljából egy új mikromanipulációs eljárás technikájának tökéletesítését, optimalizálást végeztük el. A korábbi kísérletek során a Piezo-segített mikromanipulációval nem sikerült átütő eredményeket elérnünk (az enukleálás hatékonysága ellenére a sejtmag-injektálást követően magas volt a sejtek membrán sérülés okozta elpusztulása), ezért egy, a szarvasmarha klónozás során már sikerrel alkalmazott módszert adaptáltunk egérre.

Az új, ún. „zona-mentes klónozási” eljárás lényege, hogy a klón konstrukció előállításához zona pellucidától megfosztott enukleált citoplasztokat használunk fel. A beavatkozás során nem sejtmagot juttatunk a citoplazmába, hanem egy teljes, citoplazmával rendelkező szomatikus sejtet fuzionáltatunk a citoplasztal.

Kumulusz sejtekből, embrionális őssejtekből, transzgenikus embrionális sejtekből, valamint fibroaszt sejtekből kíséreltünk meg embriókat, beültetésre, mélyhűtésre alkalmas hólyagcsírákat, majd a beültetést követően utódokat létrehozni.

A munka során a sok részelem optimalizálásával az alább közölt **módszertani protokollt** sikerült kidolgoznunk.

#### **1. Petesejt nyerés a citoplasztok előállításához**

6-8 hetes B6D2 F1 nőstényeket intraperitoneálisan 7,5 IU PMSG (eCG)-vel, majd 48 órával később 7,5 IU hCG-vel szuperovuláltatjuk. Az állatokat 14 órával a hCG kezelést követően leöljük, és a petevezetőt kiperaráljuk.

A petevezetők ampullájából kinyert petesejteket a kumuluszsejtektől 50 µl 0,1 % Hialuronidáz enzimet tartalmazó CZB-Hepes médiumban történő 37 °C-on történő, 3-4 perces emésztéssel távolítjuk el. A petesejteket az emésztést követően 30 percre CZB-IVC médiumban inkubáljuk 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó gázelegyen.

#### **2. Citoplasztok előállítása**

##### Zona pellucida eltávolítása

A petesejtekről a zona pellucidát 0,5%-os CZB-Hepesben oldott Pronáz segítségével 37 °C-on, 5 perces emésztés segítségével távolítjuk el. A petesejteket felhasználásukig CZB-IVC médiumban inkubáljuk 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó gázelegyen.

##### Mikromanipuláció



A petesejtekből a kromatin állományt mikromanipulációval távolítjuk el. A mikropipettákat Harvard GC100T-15 boroszilikát üvegapillárisokból készítjük kapilláris húzó berendezés és mikrohuta segítségével. (A Sutter P97 típusú kapilláris húzó berendezés javasolt beállításai: P=100 Heat=555, Pull=75, Vel=100, Time=100)

Az üvegapillárisokat Narishige mikrohuta platinaszálára helyezett üvegyöngyhöz való olvasztása segítségével törjük el. A kívánt pipettaszájadék átmérője a tartókapilláris esetén 60-70  $\mu\text{m}$ , az enukleáló pipetta esetén 18-20  $\mu\text{m}$ . A pipettaszájadékot a platinaszál hevítése segítségével a tartókapilláris esetén teljesen, az enukleáló kapilláris esetén enyhén beolvasztjuk. Mindkét pipettát az izzó üvegyöngy felett 30°-os szögben meghajítjuk. A pipettákat Narishige mikromanipulátorokhoz erősítjük, és az enukleáló pipettát paraffinolajjal töltjük fel. A tartó és enukleáló pipettát egymással egy vonalba rendezzük mind vertikálisan, mind horizontálisan. A mikromanipuláció előtt az enukleáló pipettát 12%-os PVP-CZB-Hepes oldattal átmoszuk.

4x5 petesejtet helyezünk el egyszerre Cytochalasin B-t 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  koncentrációban tartalmazó 10  $\mu\text{l}$ -es olajjal fedett CZB-Hepes cseppekbe. A mikromanipuláció 22 °C-on történik, egy kezelési csoport enukleálása 15-20 percet vesz igénybe.

A meiózis II. metafázis stádiumában levő petesejtek metafázisos kromoszómáit az inverz mikroszkóp (Olympus IX 71) „relief contrast” optikai rendszerének segítségével lehet láthatóvá tenni, így a hagyományos alkalmazott fluoreszcens Hoechst festésre és UV megvilágításra nincs szükség a beavatkozás során.

A jól látható kromoszómákat tartalmazó citoplazmát az enukleáló kapillárishoz csatlakoztatott VarioCell mikrocsavar manipulátorral létrehozott enyhe vákuum segítségével távolítjuk el a sejttől, majd a tartókapilláris segítségével teljesen leválasztjuk. Törekedni kell arra, hogy a kromoszómákon kívül a lehető legkevesebb citoplazmát távolítsuk el. A beavatkozás 90-100%-os hatékonysággal hajtható végre.

Az enukleált petesejteket CZB-IVC médiumban inkubáljuk 37 °C-on, 5%  $\text{CO}_2$  –t tartalmazó gázelegyenletben a további felhasználásukig.

### **3. Donor sejtek**

A klónozási módszer beállításához a hialuronidáz kezelés során frissen izolált kumuluszsejteket, embrionális őssejteket, transzgént tartalmazó embrionális őssejteket, valamint fibroblaszt kultúrából származó fibroblaszt sejteket használtunk fel. A sejtek saját tenyésztőmédiumukban, 4°C-on tároltuk a felhasználásukig.

### **4. Donorsejtek és citoplasztok aggregáltatása**

Kb. 20 sejt közül méret és morfológia alapján kiválogatott 10 donorsejtet 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Phytohemagglutinin-t tartalmazó CZB-Hepes oldatban finom pipettamozgatással 10 enukleált citoplaszthoz ragasztunk. A sejtek rövid idő alatt időlegesen a citoplasztokhoz tapadnak. A konstrukciókat átmoszuk a sejtfúzóhoz használt 0.2 M Mannitol oldatban, majd a fúziós edénybe helyezük. A tapadás mértéke a donorsejtek minőségétől függ. Frissen izolált, jó minőségű sejtek esetén 70-80%-ban lehet tartós tapadást elérni.

### **5. Sejtfúzió**

A konstrukciókat az elektromos cellában kétszer 16 micromásodpercig tartó, 2 kV/cm –es négyyszögjel karakterisztikájú egyenáramú elektromos impulzussal kezeljük szobahőmérsékleten, aminek hatására az összetapadt sejtek közös membránja reverzibilisen vezikularizálódik, s így a citoplazmák egymásba olvadhatnak és a sejtek egyesülhetnek.

A fúzióhoz BLS B-150 készüléket és 500  $\mu\text{m}$  elektródatávolságú kamrát használunk.

A konstrukciókat a megfelelő pozícióba, hogy az elektromos áram iránya merőleges essen a közös membránfelületre, kézzel állítjuk be. A fúziót követően a sejteket 60 percig CZB-IVC médiumban inkubáljuk 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> –t tartalmazó gázelegyenben. A sejtfúzió során előforduló leggyakoribb veszteség a donorsejt lízise az elektromos impulzus hatására. Sejtlízis esetén a fúziós kamrát át kell öblíteni és újra kell tölteni a fúziós médiummal. A fúzió eredményessége 30-70% közé tehető.

## **6. Sejtaktiváció**

A donorsejtek magjának a fogadó citoplazma általi újraprogramozásához és a sejtosztódási mechanizmus beindításához a klónkonstrukciókat aktiválni kell. Aktivációs ágensként SrCl<sub>2</sub> –ot alkalmazunk a mikrotubulusok stabilizálása mellett. A konstrukciókat 6 órán keresztül 10 mM SrCl<sub>2</sub>-ot, 5 µg/ml Cytochalasin B-t, 15 mg/ml BSA-t tartalmazó, Ca<sup>2+</sup> mentes CZB-IVC médiumban inkubáljuk. Az aktiváció során 10-30% közötti sejtlízis tapasztalható.

## **7. In vitro kultiváció**

Az aktivációt követően is ép klónkonstrukciókat morula, hólyagsíra állapotig, négy napon keresztül in vitro kultiváljuk. Mivel a zona pellucidát eltávolítottuk, az embriók összetapadásának megakadályozása céljából a műanyag tenyésztőedény aljába egy erre a célra kialakított acéltűvel kb. 80-100 µm mélységű kör keresztmetszetű, negatív kúp formájú vajatokat készítünk, amikbe egyedileg helyezük el az embriókat (ld. kép). Az embriók fejlődésük során olyan parakrín faktorokat bocsátanak a környezetükbe, amik szinergista hatást fejtenek ki a csoportban tenyésztett embriókra. Egy 30 µl-es tenyésztő médium – CZB-IVC cseppben így 10-12 embriót tenyésztünk a vajatokban szeparáltan, mégis közösen.

A sikeres aktiváció végén jól megfigyelhető a donor sejtől származó sejtmag. 24 órás tenyésztést követően az első mitotikus sejtosztódás eredménye figyelhető meg. Az in vitro tenyésztés harmadik napján a kompaktálódó morulák, a negyedik napon a korai blasztociszták aránya állapítható meg.

## **8. Klónozott embriók beültetése**

### Álvemhes nőtények előállítás

Embriók sikeresen csak álvemhes nőtényekbe ültethetők egér esetében. E célból 8-10 hetes CD-1 outbred nőtények vazektomizált CD-1 hímekkel pároztatunk. Mivel az ivarzásszinkronizálás egér esetén hátrányosan befolyásolná a beültetett embriók implantációját, ezért nem alkalmazunk hormonkezelést. Így 10 vazektómizált hímrel párosított nőtény közül csak az ösztrospanban levő 1-2 párzik, aminek bekövetkeztét a másnap megfigyelhető, a vaginában megtalálható megszilárduló dugó, un. plug megléte jelzi.

Az álvemhesség 2,5 napján az in vitro létrehozott morulák illetve blasztociszták a véres sebészeti eljárással a nőtények méhébe ültethető.

### Embrióbeültetés

A beültetésre váró embriókat CZB-Hepes médiumba helyezük. Az ültetéshez enyhén beolvasztott 100-120 µm nyílásátmérőjű szájpipettát használunk.

A recipiensnőtényt intraperitoneális 200 mg/kg dózisú Avertinnel (2,2,2 tribromoetilalkohol) altatjuk. A hát kültakaróján ejtett bevágáson át éles csipesszel az izmot átdöfve a méhet a seben keresztül kiemeljük és a zsírszövetet szerafinnal rögzítjük. A méh üregének felső harmadába döfünk egy 26G-s tűvel, majd a szűrési csatornán bevezetjük az ültető kapillárist. A méh

lumenébe érve óvatosan bejuttatjuk az embriókat. A sebet kapocccsal zárjuk. Az alvó recipienseket ébredésig melegben tartjuk. Másnap ellenőrizzük egészségi állapotukat.

### 9. Császármetszés – dajkásítás

Mivel a klónozási eljárás végén a felmerülő veszteségek miatt 10 embriónál kevesebb ültetésével számolhatunk, valamint előre kalkulálhatók implantációs veszteségek és a vemhesség során bekövetkező magzatelhalások, valószínűsíthető, hogy egy-két utód megszületésére van csak esély. A nőtény egér kis alomlétszám esetén gyakran megöli az utódait. Részben ennek megelőzése céljából, részben a placentán elvégzendő mérések és vizsgálatok, valamint az ellési rendellenességek – pertinatális veszteség elkerülésére császármetszés alkalmazására van szükség. A dajka anyja a jó nevelő képességű CD-1 törzsből származik, természetes pároztatással termékenyített és a császármetszés előtt fél-másfél nappal ellett. Az alomtestvérek szőrszínben eltérnek a klónozott utódoktól. A dajkaanyát eltávolítjuk a ketrecből és kiveszünk néhány újszülöttet az alomból, úgy, hogy az alomlétszám a klónozott utóddal – utódokkal 6-8 körüli legyen.

A vemhesség 18,5 napján a recipiens állatot cervikális diszlokációval megöljük, a méhet feltárjuk, az újszülött egereket a méhből kivágjuk és a köldökzsinór kauterizálásával leválasztjuk a méhlepényről. Az orrból a váladékot eltávolítjuk, majd a testtömeg mérést követően, az állatot folyamatosan melegen tartva a dajkaanya alma közé keverjük. A dajka anyát az alomra vizeltetjük, majd visszatesszük utódaihoz.

### Az optimalizálás minimum kritériumai

A rendszer fejlesztését több lépésben végeztük.

Az in vitro kultivációs rendszer hatékonyságát zona pellucida mentes parthenogenetikus embriók in vitro tenyésztésével teszteltük. Az aktiváció megegyezik a klónozás során alkalmazott eljárással. Elfogadhatónak ítéltük a rendszer hatékonyságát, amint az in vitro tenyésztett, aktivált petesejtek legalább 85%-a tovább osztódott két-sejtes embrióvá, és az eljárás kultiváció végén legalább 70% blasztocisztát eredményezett.

#### 4. táblázat: Beállított aktivációs rendszer eredményessége (5 ismétlés alapján)

Aktivált ps.	Aktiválódott ps. (%)	2 sejtes embrió (%)	Blasztociszta (%)
92	88 (95,6±2,8)	71 (80,7±12,4)	68 (77,2±13,4)

A mikromanipulációs eljárást a Hoechst festés elhagyását követően 11 NT program során teszteltük. A kapilláris méretének és formájának meghatározását követően az eljárás két operátor mellett is 90 % feletti hatékonysággal hajtható végre.

#### 5. táblázat: Beállított mikromanipulációs rendszer eredményessége 11 ismétlés alapján

Mikromanipulált MII petesejt db.	Ép citoplaszt db.	Hatékonyság %
502	479	95,4±6,8

A technológiai rendszer gyenge láncszeme a sejtfúzionáltatási lépés. Az egér sejtmagátültetési klónozási során élő utódot először kumulusz sejtek klónozásával hoztak létre így először mi is ezzel a sejttípussal teszteltük a rendszerünket, azonban kumulusz sejtekkel nem sikerült továbbtenyészhető klónkonstrukciókat kapni. Valószínűsíthető, hogy a hialuronidáz enzimes

kezelés után a kumuluszsejtek membránja nem alkalmas a fent leírt protokollal való kezelésre. Mivel a pályázat célkitűzése alapvetően sejtenyésztésből származó sejtek felhasználása, a kumulusz sejtekkel való kísérleteket felhagytunk.

Az aggregáltatás és fúzionáltatás időbeli korlátot is meghatároz, ami magával vonja a létrehozható konstrukciók számát is. A petesejt aktiválást a hCG oltást követő 18. órában célszerű megkezdeni, így a sejtfúziót legkésőbb ez előtt egy órával abba kell hagyni. Figyelembe véve a mikromanipuláció és a többi kezelés sebességét, egy fúziós berendezést felhasználó munkacsoport optimális körülmények között legfeljebb 6-7 fúziós sorozatot tud megvalósítani. Ez a tény rámutat hogy a donorsejtek közötti szelekció milyen kitüntetett szerephez jut. A jelenlegi szelekciós technika a sejtek méretének és a membrán épségének megfigyelésén alapul. Amennyiben a donorsejt állomány homogénebbé tehető, a szelekció hatékonysága növelhető, és a felesleges ismétlődő lépések így elhagyhatók.

Donor sejtnek további kísérleteinkben embrionális őssejteket és fibroblasztsejteket választottunk. Az embrionális őssejteket 70-80%-os konfluencia elérésekor használtuk fel. Két őssejtvonalat teszteltünk, a HM-1 és a munkacsoport sejtenyésztő alcsoportja által alapított GFP transz gént tartalmazó UBI-GFP trg B6D2 F1 sejtvonalat. A rendszer kontrolljaként fibroblasztsejtekkel végzett klónozási programokat (1., 2.) futtatunk.

6. táblázat: A mikromanipulációs, sejtfúziós és aktivációs rendszer eredményessége

Sejtvonal	Sikeresen enukleált petesejtek (%)	Sikeresen fuzionált (%)	Sikeresen aktiválódott (%)
UBI-GFP trg ES	330 (96,1±3,7)	116 (38,5±18,0)	61 (51,0±17,7)
HM-1 ES	720 (94,1±5,3)	299 (39,4±17,5)	133 (54,3±26,0)
Fibroblaszt 1.	224 (92,4±5,3)	128 (56,5±18,6)	94 (73,0±21,6)
Fibroblaszt 2.	351 (98,6±2,7)	239 (68,0±8,1)	173 (72,3±31,9)

A kísérletben az aktivációt követően in vitro továbbtenyésztettük az aktiválódott NT embriókat.

7. táblázat: Az NT embriók in vitro fejlődési képessége

ES sejtvonal	Sikeresen aktiválódott	Kétsejtes NT embriók (%)	NT Blasztociszták (%)
UBI-GFP trg ES	61	21 (34,4±36,3)	1 (1,6±2,9)
HM-1 ES	133	59 (44,3±27,1)	17 (12,8±15,6)
Fibroblaszt 1.	94	63 (57,7±27,6)	0 (0)
Fibroblaszt 2.	171	152 (87,8±9,7)	40 (24,2±21,7)*

\*: morula+blasztociszta

Az NT blasztociszták közül 4 és 3 blasztociszta két embriótranszfer programban beültetésre került. A császármetszés során nem találtunk implantációs nyomot a méhen. 5 blasztocisztát mélyhűtöttünk, mivel az embrióbeültetéshez legalább 3 embrió beültetését tartottuk kívánatosnak. A további blasztocisztákat ES alapítás céljára használtuk fel.

A fibroblaszt sejtekből létrehozott klón morulák közül 12 morula folyékony nitrogénben várja, hogy felolvasztást követően recipiens anyába ültessék. 2 morula és 2 blasztociszta felolvasztást követő embriótranszfer után a vemhesség 8,5 napján történő vizsgálat alapján nem implantálódott.

Mélyhűtés nélkül 12 NT morulát ültettünk egy recipiens állatba. A vemhesség 8,5 napján a méhet kiperarálva 4 implantálódott magzatot találtunk. A magzatokat további hisztológiai vizsgálatok céljából fixáltuk.

Az implantáció tényének igazolása után a továbbiakban a fibroblaszt sejtekből létrehozott NT embriókat recipiens állatokba ültetjük, és a vemhesség 18,5 napján császármetszést végzünk.

A kutatások harmadik évében, **(2006) a tervezetteknek megfelelően a következő kísérletek történtek meg:**

#### **Sejtvonalak módosítása**

- klónozott egerek nyerése, Magyarországon elsőként
- összejt-kivonattal kezelt sejtekből embriók és esetleg utódok nyerése

2006-ban világossá vált, hogy az összejt kivonatos kezelés közvetlen felhasználása a NT során nem könnyű. A magas sejtpusztulási arány és az újraprogramozás várhatóan korlátozott szintje a magyarázat arra, hogy a 2002-es Nature cikket az eredeti technológia csoport nem tudta megismételni.

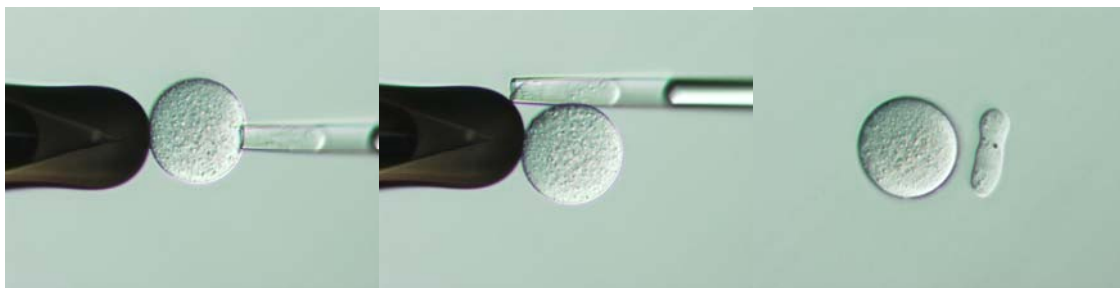
Az első cél, a klónozott utód létrehozása céljából két, egymástól jelentősen eltérő egérklónozási rendszert vizsgáltunk 2006. során. Az ún. "zona pellucida mentes" klónozási eljárással összejtek és fibroblaszt sejtek klónozását, a Piezo-segítette klónozási eljárással kumuluszsejtek klónozását valósítottuk meg.

A zona pellucida mentes sejtmagátültetéssel testi sejtekből származó embriókat állítottunk elő, amikből összejt vonalakat hoztunk létre. A Piezo segítette klónozással előállított embriókat álvmehes nőstényekbe ültettük, majd császármetszés segítségével segítettük világra a testi sejtől klónozott állatokat, hazánkban először.

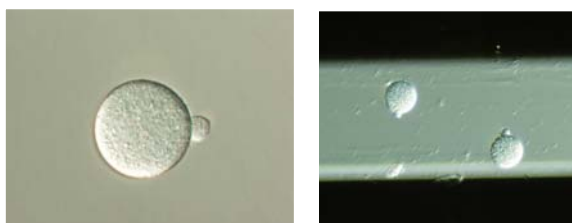
A petesejteket mindkét eljárás során 8 hetes szuperovuláltatott B6D2 F1 nőstényekből nyerték ki, a hCG kezelés után 15 órával. A petesejteket körülvevő kumuluszsejteket hialuronidáz emésztéssel távolították el.

#### A zona pellucida mentes klónozás lépései

A petesejtek zona pellucidáját 0,5%-os pronáz emésztéssel távolították el. A sejteket kromatin állományuktól egy Olympus IX71 mikroszkópra szerelt Narishige mikromanipulátorral vezérelt, helyben készített, 18–20 µm átmérőjű üvegapillárral fosztották meg.



Enukleálás folyamata



A létrehozott citoplasztot PHA lectin segítségével tapasztották össze a sejtmag donor

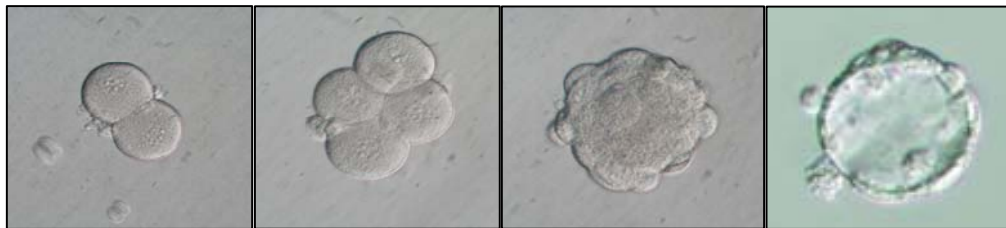
testi sejtekkel – magzati fibroblaszt sejtekkel, illetve HM1 őssejtekkel.

A sejtek membránját elektromos impulzus (2x2 kV/cm DC, 16 µsec) segítségével egyesítették.

Klónkonstrukció

Elektrofúzió

Az egy órán belül sikeresen fuzionált klónkonstrukciókat mesterségesen aktiválták 10 mM SrCl<sub>2</sub> in Ca free CZB-IVC+5µg/ml CB+15mg/ml BSA oldatban 6 órán keresztül. Az aktiválást követően a klónozott embriókat in vitro tenyésztették blasztociszta stádiumig CZBG tenyésztőoldatban.



Klónozott embriók fejlődése , 2 sejtés, 4 sejtés embriók, morula, blasztociszta

A blasztocisztákból embrionális őssejtvonalakat alapítottunk.

Az enukleálás hatékonysága 98%, a sejt-fúzió hatékonysága fibroblaszt sejtek esetén 70-80%, őssejt esetén 30-50% körüli volt. A klón konstrukciók aktivációjának sikeressége 75-80% volt. Az embriók 65-70%-a osztódott, és 16%-a érte el a blasztociszta fejlettségi állapotot (fibroblaszt sejtek esetében).

8. ábra. Különböző donor sejt eredetű sejt vonalak hatékonysága klónozás során.

	<b>Kísérletek száma</b>	<b>Embriók száma</b>	<b>Kitapadt embriók</b>	<b>%</b>	<b>ICM izolálás</b>	<b>%</b>	<b>ES sejt vonalak</b>	<b>%</b>
<b>Őssejt HM1 NT</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>12</b>	<b>82</b>	<b>11</b>	<b>73</b>	<b>4</b>	<b>22</b>
<b>Fibroblaszt NT</b>	<b>17</b>	<b>136</b>	<b>60</b>	<b>44</b>	<b>33</b>	<b>24</b>	<b>1</b>	<b>2</b>

#### A piezo segítette klónozás lépései

A piezo-enukleáció során a petesejtek zona pellucidáján piezo elektromosság segítségével rezgésbe hozott, 7 µm átmérőjű üvegkapillárisal hatolnak keresztül, és a kromatin állományt a létrehozott nyíláson keresztül távolítják el. A kumuluszsejtek sejtmagját az injektáló kapillárisba felszívott sejtek membránjának megsértése segítségével izolálják, majd a citoplasztok ooplazmájába injektálják.

Az aktivált klón konstrukciókat blasztociszta stádiumig tenyésztettük in vitro KSOM tenyésztőmédiumban, illetve 2-sejtés állapotban álvemhes nőtények petevezetőjébe ültették őket. Az embriók 90%-a osztódott, és 32% érte el a blasztociszta fejlettségi állapotot.

2006 novemberéig 11 álvemhes nőténybe 221 NT embriókat ültettek, 4 sikeres vemhességet elérve 2 utód született meg császár metszéssel, ebből egy maradt életben (a „Klonilla” nevet kapta).

Az első hazánkban testi sejtéből klónozott egeret a következő két hónapban még öt klónozott utód követte („Kamilla”, „Éva” és három identikus iker klón.) Az állatok megfigyelhető

rendellenesség nélkül nevelkednek, Klonillának és Kamillának természetes pároztatás után egészséges utódai születtek (8 és 9 utód).



Klonilla a dajkaalomban

Ez az eredmény egy fontos lépés a mesterséges úton sorozatban "gyártható" transzgenikus egerek, nyulak és más állatfajok technológiai rendszerének kimunkálására, amely nagy segítségül szolgálhat az állattenyésztésben, genetikailag betegség-rezisztens állatok előállításához, valamint az orvostudománynak a különféle betegségek gyógyítására végzett kutatásaihoz.

#### **Összefoglalva:**

Az eredeti tervekhez képest a kutatások nagyon eredményesek voltak (lényegesen több konferencia absztrakt és teljes cikk jelent meg). A tervezettekhez képest csak a sejtkivonatok közvetlen hatása testi sejtekre nem került tesztelésre, mivel a jelen korai stádiumban ez csökkentette volna az élő utód esélyeit. A kutatások eredményeképpen megszületett több klónozott egér is.