

AZ IVAR ÁTFORDÍTÁS LEHETŐSÉGÉNEK VIZSGÁLATA EGÉR KIMÉRÁK ALKALMAZÁSÁVAL*

CARSTEA, VALER BOGDAN — LEMOS, ANA PAULA CATUNDA — ILIE, DANIELA —
BODÓ SZILÁRD — KOVÁCS ANDRÁS — BÖSZE ZSUZSANNA — GÓCZA ELEN

ÖSSZEFOGLALÁS

A kimérák fontos szerepet töltenek be az embrionális fejlődést befolyásoló genetikai változások tanulmányozásában. A munka annak igazolását tűzte ki célul, hogy egy nyolc-sejtes embrió egyetlen blasztomerje, tetraploid embrióval aggregáltatva, életképes utódot képes létrehozni.

A szerzők olyan kiméra embriókat hoztak létre, amiben egy GFP-t expresszáló nyolc-sejtes embrió egyik blasztomerjét aggregáltattak a GFP-t nem expresszáló tetraploid embrióval, vagy 8-sejtes diploid embrió hét sejtjével (a nyolc-sejtes embrióból egy blasztomert eltávolítottak, hogy meg tudják állapítani az embrió genotípusát). 84 olyan kiméra embrió került visszaültetésre, amelyekben XY-genotípusú EGFP-t expresszáló embrió egyetlen blasztomerjét aggregáltatták XX-genotípusú diploid embrióval ($2n,XY/2n,XX$). Ebből 12 (14,3%) kiméra utód született. A megszületett utódok közt 11 (91,7%) hím, s csak egy nőstény (8,3%) utód volt. A kísérlet folytatásaként olyan kimérákat állítottak elő, amelyekben egy tetraploid embriót ($4n$) aggregáltattak egyetlen diploid ($2n$) blasztomerrel. 36 ($2n,XY/4n$) olyan kimérát ültettek be, amelyekben XY-kromoszómát tartalmazó blasztomerrel aggregáltatták a tetraploid embriót. 5 élő utódot kaptak: melyek között 2 pár kettős iker volt. Azonos embrióból származó, 4 XX-blasztomer, és egy-egy tetraploid embrió felhasználásával létrehozott és beültetett 4 kimérából, identikus nőstény hármas ikrek születtek.

Az eredmények azt mutatják, hogy tetraploid gazda embrióval aggregáltatott, egyetlen blasztomerből is tud életképes utód születni. A kidolgozott módszert alkalmazva, előre meghatározott nemű, identikus hármas ikreket is sikerült létrehozni.

SUMMARY

Carstea, V.B. – Lemos, A.P.C.Ms. – Ilie, D.Ms. – Bodó, Sz., - Kovács, A. – Bösze, Zs.Ms. – Gócza, E.Ms.: EXAMINATION OF THE OPPORTUNITY OF SEX REVERSAL USING MOUSE CHIMERAS

Chimeras play crucial role in analyzing the biological effects of genetic changes. In the study they wanted to demonstrate, that a single blastomere of 8-cell stage embryo, supported with a tetraploid embryo, is capable develop to healthy animal.

They produced chimeras by aggregating one single blastomere derived from sexed, GFP expressing, diploid 8-cell stage embryos, with tetraploid embryo, or by combining one diploid XY, GFP expressing blastomere, with a diploid, XX, 7-cell embryo (one blastomere from the 8-cell embryo was taken for sexing). From the transferred 84 ($2n,XY/2n,XX$) aggregates they got 12 (14.3%) newborns, 11 (91.7%) males and one (8.3%) female. From the transferred 36 ($2n,XY/4n$) aggregates, where one XY blastomere was combined with a tetraploid embryo, they got 5 living male newborns: 2 pairs of twins and one singleton. They transferred also 4 ($2n,XX/4n$) chimera embryos, where one XX-blastomere was aggregated with a tetraploid embryo. We got a set of living female triplet from this aggregates.

They could demonstrate that a single blastomere of the 8-cell stage embryo is capable to develop into living newborn. They could obtain identical triplets derived from 3 blastomeres isolated from the same embryo.

* A munkát az OTKA T037582 és a Tét RO-3/2002 pályázatok támogatták

BEVEZETÉS

Munkánk során a szex-determináció folyamatának kezdeti lépéseit tanulmányoztuk egér kimérákat alkalmazva. A kimérák fontos szerepet töltenek be az embrionális fejlődés tanulmányozásában, a sejtek fejlődési potenciáljának vizsgálatában, a determináció folyamatának nyomon követésében, az embrionális korban ható mutációk feltárásában, ill. transzgenikus egyedek létrehozásában (Tam és Rossant, 2003).

Az, hogy az ES kimérák fejlődése során a szex-kimérák (XX/XY) ivari determinációja hogyan történik, még nem pontosan ismert. Az irodalomban eddig közölt adatok ellentmondásosak (Tarkowski, 1998), ezért az eddig leírt kísérleti eredményeket kiegészítendő, olyan kiméra embriókat hoztunk létre, ahol egy EGFP-t expresszáló (Hadjantonakis és mtsai, 1998), nyolc-sejtes, XY-genotípusú embriónak egyetlen sejtjét aggregáltattuk az EGFP-t nem expresszáló, XX-genotípusú embrió hét sejtjével. Azt szeretnénk volna megállapítani, hogy képes-e egyetlen XY-genotípusú blasztomer, egy női ivarú embrióval aggregáltatva, a létrehozott kiméra magzatban átfordítani annak ivarát, s tudnak-e életképes him fenotípusú kiméra állatok szülni.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A kísérletekben a CD1, illetve CD1/EGFP, 1,5 napos, két-sejtes egér embriókat szuperovuláltatott nőtények petevezetőjéből mostuk ki. Az embriókat 2,5 napos korig tovább tenyésztettük KSOM médiumban. A szuperovulációt 7 IU PMSG (pregnant mare serum gonadotrophin) intraperitoneális injekcióját követő 48. óra múlva 7 IU HCG (human chorionic gonadotrophin) adásával indukáltuk.

A kimérák előállításakor egy nyolc-sejtes embrió egyetlen sejtjét aggregáltattuk egy nyolc-sejtes embrió hét sejtjével. A nyolc-sejtes (2,5 napos) embriókat körülvevő zona pellucidát acid Tyrode's (pH: 2,5) oldattal távolítottuk el (Nagy és mtsai, 2003). A zona mentes 8 sejtes embriókat Ca- és Mg-mentes 0,1% BSA-val kiegészített PBS oldatba helyeztük 10 percre. Az embriót alkotó blasztomereket egy vékony kapillárisal történő pipettázással választottuk el egymástól. Minden embrióból egyetlen blasztomert PCR csőbe helyeztünk, a többi blasztomert egyenként, kis KSOM médium cseppben, ásványi olaj alatt tartva inkubáltuk tovább.

Az PCR csőbe helyezett blasztomereket X- és Y- specifikus PCR reakciót alkalmazva genotipizáltuk (Carstea és mtsai, 2005). A PCR reakció eredményét néhány órán belül megkaptuk, és a szexelés eredményeként meg tudtuk mondani a különböző embriók genotípusát (XX vagy XY). Az eredmény ismeretében XX-genotípusú 7 sejtet tartalmazó, CD1 embriókat aggregáltattuk egy CD1/EGFP him (XY) genotípusú blasztomerrel. A kiméra embriókat másnap recipiens állatokba ültettük.

A két-sejtes embriók blasztomerjeinek fúziójához a BLS Ltd., Hungary cég, CF-150B típusú elektrofúziós készülékét alkalmaztuk. A két-sejtes embriókat két platina elektród közé helyeztük, és egy elektromos impulzust kaptak. Az embrió két blasztomerje ennek hatására fuzionált és tetraploid embriók jöttek létre (Nagy és mtsai, 1990).

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A kísérlet első felében, egy EGFP-t expresszálo nyolc-sejtes, XY-genotípusú embrió egyetlen sejtjét aggregáltattuk egy EGFP-t nem expresszálo, XX-genotípusú embrió hét sejtjével (a nyolc-sejtes embrió egy sejtjét a genotípus megállapításához használtuk fel). Az így létrejött kimerák közül 84-et ültettünk vissza, ebből 12 kimerá utód született. A megszületett utódok közt csak egy nőtényt találtunk (1. táblázat). A nőtény szöveti sejtjeinek 10%-a expresszála az EGFP-t, PCR teszt alapján XX/XY genotípusú, fertilis szex kimerá volt, de az utódai közt nem találtunk EGFP-t expresszálot.

Kísérletünk folytatásaként olyan kimerákat állítottunk elő, ahol egy tetraploid embriót (4n) aggregáltattunk egyetlen diploid (2n) blasztomerrel. Olyan 2n/4n kimerát ültettünk be, ahol XY-blasztomerrel aggregáltattuk a tetraploid embriót. 5 élő utódot kaptunk (1. táblázat).

1. táblázat

A beültetett kimerá embriók beágyazódást követő fejlődése

Kimérák típusa(1)	[XY(2n)(1-sejt)]/ [XX(2n)(7-sejt)](10)	[XY(2n)(1-sejt)]/ [(4n)(4-sejt)](11)	[XX(2n)(1-sejt)]/ [(4n)(4-sejt)](12)
Beültetett embriók száma(2)	84	36	4
Felszívódások aránya (Felszívódás/beültetett %)(3)	39 (46,4)	11 (30,6)	1 (25)
Újszülöttek aránya (Újszülöttek száma/beültetett %)(4)	22 (26,2)	11 (30,6)	3 (75)
Élő egerek száma (Élő egerek/beültetett embriók %)(5)	14 (16,7)	5 (13,9)	3 (75)
Kimérák száma(6)	12 (85,7)	5 (100)	3 (100)
Élő kimerák száma(7)	12	5 (A1, B2, A2, B1)	3 (C1, C2, C3)
Élő him kimerák száma (Him/Kiméra %)(8)	11 (91,7)	5 (100)	0
Nőtény kimerák száma (Nőtény/Kiméra %)(9)	1 (8,3)	0	3 (100)

[XY(2n)(1-cell)]/[XX(2n)(7-cells)]: egy XY-genotípusú, EGFP-t expresszálo, 8-sejtes embrióból származó egyetlen blasztomer és XX-genotípusú 7-sejtes embrió aggregálásával létrehozott kimerá embriók(10)

[XY(2n)(1-sejt)]/[(4n)(4-sejt)]: egy XY-genotípusú, EGFP-t expresszálo, 8-sejtes embrióból származó egyetlen blasztomer és egy 4-sejtes tetraploid embrió aggregálásával létrehozott kimerá embriók. A1-B2, A2-B1 him újszülöttek egy-egy nyolc sejtes embrióból származó iker újszülöttek(11)

[XX(2n)(1-sejt)]/[(4n)(4-sejt)]: egy XX-genotípusú, EGFP-t expresszálo, 8-sejtes embrióból származó egyetlen blasztomer és egy 4 sejtes embrió tetraploid embrió aggregálásával létrehozott kimerá embriók. C1, C2, C3 nőtény újszülöttek egyetlen nyolc sejtes embrióból származó identikus hármastestvérek(12)

Table 1.: Postimplantation development of sexed diploid/diploid and diploid/tetraploid chimeric blastocysts

type of chimeras(1), number of transferred embryos(2), ratio of resorptions (resorptions/transferred %)(3), ratio of newborns (alive and stillborn mice/transferred %)(4), ratio of mouse born alive (alive mice/transferred %)(5), number of chimeras(6), number of chimeras born alive(7), ratio of male chimeras (male/chimera %)(8), ratio of female chimeras (female/chimera %)(9), [XY(2n)(1-cell)]/[XX(2n)(7-cells)](10): Blastomeres, derived from male, EGFP expressing, diploid 8-cell stage embryos [XY(2n)(1-cell)] were aggregated with female diploid 7-cell embryos [XX(2n)(7-cells)](10), [XY(2n)(1-cell)]/[(4n)(4-cell)](11): Male, EGFP expressing blastomeres, isolated from 8-cell embryos were aggregated with tetraploid carrier embryos. A1-B2, A2-B1 are identical male twins, derived from the same 8-cell embryos(11), [XX(2n)(1-cell)]/[(4n)(4-cell)](12): Female, EGFP expressing blastomeres, isolated from 8-cell embryos were aggregated with tetraploid carrier embryos. C1-C2-C3 females are identical triplet, derived from the same 8-cell stage embryos(12)

Azonos embrióból származó, XX-blasztomerek, és egy-egy tetraploid embrió felhasználásával létrehozott 4 kiméra embrióból három nőstény utód, identikus hármassikrek születtek.

Eredményeink azt mutatják, hogy egyetlen, az ICM-be beépülő XY-blasztomer jelenléte is elégséges lehet a kiméra embriók nemének átfordításához, azonban nem minden esetben kapunk hím fenotípusú szex-kimérákat. Igazoltuk, hogy tetraploid gazda embrióval aggregáltatott egyetlen blasztomerből is tud életképes utód születni. Az általunk kidolgozott módszert alkalmazva előre meghatározott nemű, identikus ikreket lehet létrehozni.

IRODALOM

- Carstea, V.B. – Ilie, D. – Ghisa, G. – Lemos, A.P.C. – Bodó, Sz. – Kovács, A. – Gócza, E.*(2005): Masculinisation phenomenon in chimeric organisms. *Lucr. Stint. Zooteh. Bioteh.*, XXXVIII., ISSN 1221-5287., 757-762.
- Hadjantonakis, A.K. – Gertsenstein, M. – Ikawa, M. – Okabe, M. – Nagy, A.*(1998): Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mech Dev.* 76. 1-2. 79-90.
- Nagy, A. – Gertsenstein, M. – Vintersten, K. – Behringer, R.*(2003): Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press
- Nagy, A. – Gócza, E. – Diaz, E.M. – Prideaux, V.R. – Iványi, E. – Markkula, M. – Rossant, J.*(1990): Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* 110. 815-821.
- Tam, P.P.L. – Rossant, J.*(2003): Mouse embryonic chimeras: tools for studying mammalian development. *Development*, 130. 6155-6163.
- Tarkowski, A.K.*(1998): Mouse chimaeras revisited: recollections and reflections. *Int. J. Dev. Biol.*, 42. 903-908.

Érkezett: 2006. február

Szerzők címe: *Carstea, V.B. – Lemos, A.P.C. – Bodó, Sz. – Bősze, Zs. – Gócza, E.:*

Authors' address: Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Állatbiológia Intézet
Agricultural Biotechnology Center (ABC), Department of Animal Biology
H-2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u. 4.

Ilie, D.: Faculty of Animal Science and Biotechnology
Calea Aradului 119, Timisoara, 300645, Romania

Kovács, A.: Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
Research Institute for Animal Breeding and Nutrition
H-2053 Herceghalom, Gesztenyés út 1.