

AZ OCT-4 ÉS NANOG TRANSZKRIPCIÓS FAKTOR GÉNEK AZONOSÍTÁSA PREIMPLANTÁCIÓS KORÚ NYÚLEMBRIÓKBAN*

TÁNCOS ZSUZSANNA — KOBOLÁK JULIANNA — BAJI GÁL ÁRPÁD — DINNYÉS ANDRÁS

ÖSSZEFOGLALÁS

Az emlős embrió fejlődését számos gén koordinálja. Ide tartozik a vizsgált Oct-4 és Nanog gén is. Az Oct-4 génaktivitással egy időben jelenik meg a Nanog gén terméke, ami az Oct-4 fehérjével együtt irányítja az embrionális fejlődés korai szakaszában lejátszódó folyamatokat. A munka célja az Oct-4 és Nanog gének izolálása nyúlból, az irodalomban már korábban leírásra került más fajokból származó szekvenciák alapján.

A szerzők az ismert fajokból származó szekvenciákat analizálva PCR-primereket terveztek a szekvencia hasonlóságok alapján. A vizsgálatokhoz az mRNS-t superovulált nyulaktól nyert preimplantációs korú embriókból nyerték. A gének expresszióját real-time PCR segítségével vizsgálták. A kiválasztásra került optimális primerpárok a Nanognál elsőként egy 131, később egy 420 bp méretű fragmentet eredményeztek, az Oct-4 esetében pedig az eddig ismert szekvenciák alapján várható 450 bp méretű fragmentet kaptak.

Az eddig elért eredményeket összefoglalva: elsőként azonosították sikeresen az Oct-4 és Nanog gének cDNS részletét nyúl fajban, kidolgoztak egy RT-PCR reakciót, amellyel a gének expressziója faj- és génspecifikusan kimutatható, valamint a módszer segítségével a két gén expressziós mintázatát szövetspecifikusan és embrionális stádium szerint vizsgálható. Továbbiakban céljuk a két gén teljes kódoló régiójának klónozása (RACE-PCR), a szekvencia meghatározása, valamint az általuk kódolt fehérjék nyúl embrióban mutatott aktivitásának *in situ* hibridizációval történő vizsgálata.

SUMMARY

Táncos, Zs. Ms. – Kobolák, J. Ms. – Baji Gál, Á. – Dinnyés, A.: IDENTIFICATION OF OCT-4 AND NANOG, THE TWO PLURIPOTENCY MARKER GENES IN RABBIT PRE-IMPLANTATION-STAGE EMBRYOS

Several genes, including Oct-4 and Nanog, coordinate the embryogenesis of mammalian embryos. Whereas Oct-4 has an activator effect, the Nanog protein blocks the transcription of several genes in early stages; however, the product of these two genes appears parallel and directs early embryogenesis. The goal of this work was to isolate the Oct-4 and Nanog genes from rabbit, based on the sequences of other species published so far. The sequence of known genes has been analyzed, and primers have been designed based on similarity of sequences. Oocyte-to-blastocyst-stage embryos were collected from superovulated rabbits in RNase-free water. The reaction mix was electrophoretically separated to facilitate fragment isolation. In the case of Nanog, a 131-bp fragment was cloned. Sequence analysis revealed significant homology with the mouse sequence. Based on this finding, new primers were designed in order to isolate a larger fragment as well as the genomic copy of the gene. In the case of Oct-4, several combinations of primers were tested, because of the rather conservative sequence of the Oct-4 transcription factor family.

As a result, an optimal primer pair was found that yielded a 450 bp fragment, expected according to known sequences. For further analysis, the cDNA fragments of both genes were isolated (MinElute Gel Extraction Kit, Qiagen, Valencia, CA, USA) and cloned into bacterial plasmids (TOP 10 Cloning KIT, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). At this point, it can be stated that: (1) both genes have been successfully identified in rabbit genome, (2) a method has been developed to detect expres-

* 12. Szaporodásbiológiai találkozó anyaga „Szaporodásbiológiai gondozás a fenntartható állattenyésztésben”. Hajdúszoboszló, 2005. november 4–5. (Proc. 12th Meeting of Hungarian Society for Animal Reproduction)

sion of genes, and (3) gene-specific primers have been produced. Our further goal is to clone the whole coding region of the genes and to identify the sequence. The cloned fragments will be used for *in situ* hybridization in implanted stage embryo sections.

BEVEZETÉS

A gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Állatbiológiai Intézetében több éve folynak nyúl embriológiai és őssejtvonal alapítási kísérletek. Ezek előrehaladását jelentősen segítené, ha a pluripotencia kialakításában szerepet játszó gének működése vizsgálható lenne. Ma úgy véljük, hogy a pluripotencia több gén együttes kölcsönhatásának eredményeként létrejövő állapotként írható le. Számos, a pluripotencia kialakításáért felelős gén aktivitása leírásra került, amelyek közül a legfontosabbak az Oct-4 és Nanog gének, melyek egy-egy transzkripciós faktor fehérjét kódolnak. A fehérjék az embrionális fejlődés barázdálódási szakaszában részt vevő más fehérjék termelődésének elindítását, az embrionális csíralemezek kialakulásának irányítását szabályozzák.

Az Oct-4 transzkripciós faktor: Az őssejtek toti-, illetve pluripotenciája részben ennek a transzkripciós faktornak a jelenlétére vezethető vissza. A fejlődő embrióban az Oct-4 faktor kifejeződése és aktivitása párhuzamot mutat a sejtek fejlődési potenciáljával. Egy idő után az Oct-4 jelenléte csak a pluripotens sejtekben mutatható ki, a gasztruláció után pedig aktivitása a germinális sejtekre korlátozódik, elnémul a szomatikus sejtekben (Schöler és mtsai, 1989).

Az Oct-4 termelését az anyai szervezet kezdi meg, hogy ellássa vele a megtermékenyítetlen petesejteket, majd az embrió sejtei veszik át a szintézist. A fehérjét kódoló POU5F1 gén null mutánsaiban (knock-out mutáns), Oct-4 hiányában, az embrió nem tud a blasztocisza állapotnál tovább fejlődni, és az embrionális sejtek elvesztik pluripotenciájukat. Ekkor az embrió sejteinek differenciálódása az extraembrionális trofoblasztok irányára korlátozódik, míg az Oct-4-termelő sejtek, vagyis a belső sejtcsoport, vagy más néven ICM (Inner Cell Mass) sejtek hiányában a trofoblasztok szaporodása is korlátozódik.

Az Oct-4 hiánya, az őssejt-jelleg elvesztését okozza, viszont a normális pluripotenciát fenntartó koncentrációnál két-háromszor magasabb szintek a sejtek differenciálódását váltják ki primitív endodermális és mezodermális irányba (Kemény és Duda, 2004).

Az Oct-4 elengedhetetlen a pluripotens sejtpopulációk fenntartása szempontjából. Aktivitásának szigorú szabályozására van szükség, ami biztosítja a csírvonal folytonosságát és a különböző szövetek és szervek megfelelő kialakulását.

A még nem termékenyült oocytában anyai eredetű Oct-4 mRNS és fehérje található. A termékenyülést követően a fehérje az előmagban (pronucleus) lokalizálódik (Schöler és mtsai, 1989; Rosner és mtsai, 1990; Yeom és mtsai, 1991; Palmieri és mtsai, 1994). Termékenyülés után az Oct-4 mRNS szintje lecsökken és a gén zigotikus expressziója csak a nyolcsejtes stádiumot megelőzően kezdődik, amikor a sejtmagokban az mRNS és a fehérje szintje meg-

emelkedik (Yeom és mtsai, 1991). Kompakt morula állapotig az Oct-4 mRNS és fehérje szintje magas és egyenlő marad minden sejtben egészen a blasztocöl kialakulásáig, amikor is a morula belső sejtjei a trofektodermát, mely az implantálódáshoz és a placenta kialakulásához szükséges, külső sejtjei pedig az ICM-et hozzák létre, melyből később az embrió fejlődik ki. Az Oct-4 gén expressziója ekkor már csak az ICM sejtjeiben detektálható, a trofektoderma sejtjeiben nem. Ez a jelenség fajtól függ, mivel a szarvasmarha és a sertés blasztocisztájában az Oct-4 expressziója a trofektoderma sejtekben is kimutatható (Kirchhof és mtsai, 2000). Ez azonban csak az implantáció ideje alatt marad fent, azt követően megszűnik. Az implantációt követően az ICM-ből kialakul a primitív endo- és ektoderma. Az Oct-4 expressziója ezek után már csak a primitív endoderma sejtjeire korlátozódik. Közép-gasztrula stádiumban pedig már csak a primordiális őssejtek azok, amelyekben fennmarad az Oct-4 expressziója a gasztruláció után is, egészen a gaméták ivari differenciálódásáig (Schöler és mtsai, 1989).

Az 1. ábra az egér preimplantációs fejlődése során detektált Oct-4 expressziót mutatja be egy sematikus ábra segítségével. Az ábrán megfigyelhető az ICM eredetű pluripotens sejtek Oct-4 expressziója is.

1. ábra: Az Oct-4 expresszió alakulása egérembrióban a termékenyüléstől a preimplantációs korú embrióig, illetve az abból izolált pluripotens *in vitro* kultúrákban (Pan és mtsai, 2002)

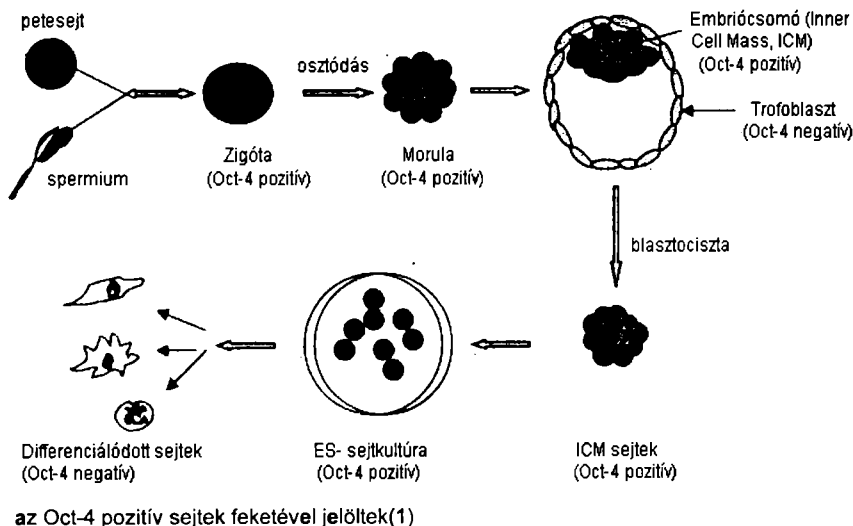


Fig. 1.: Oct-4 expression in the mouse embryo from fertilisation to preimplantation stage, and in the *in vitro* pluripotent cultures (Based on Pan et al., 2002) black color indicates Oct4 positive cells(1)

A Nanog transzkripció faktor: A Nanogot eddig csak egér őssejtekből sikerült izolálni. Az egyik kísérletben Nanog hozzáadásával meggátolták az egér őssejtjének specializálódását, még akkor is, amikor olyan körülményeknek voltak kitéve, melyben normál esetben érett sejtekké váltak volna.

A további kísérletek során összehasonlították a Nanog és az Oct-4 gének működését. A trofektoderma eltávolítása után kimutatták, hogy a Nanogot nem tartalmazó ICM nem tartja meg pluripotens képességét, hanem rövid időn belül differenciálódni kezd. Szemben az Oct-4 hiányos mutánsokkal, ahol nem mutatnak ki differenciálódást. Ezzel a kísérlettel bizonyítható, hogy a Nanog nélkülözhetetlen a pluripotencia fenntartásában (*Mitsui és mtsai, 2003*).

A kutatások szerint a Nanog valószínűleg más gének ki és bekapcsolásával az embrió ICM-sejtek önmagukat megújító folyamatát irányítja. A főgén által koordinált génaktivitás mintája az emberi embrió összejelek esetében fejlődésük negyedik vagy ötödik napjában látható, amikor a sejtek még nem determinálódtak egyetlen sejtípus felé sem (*Chambers és mtsai, 2003*).

További kísérletek igazolták, hogy a Nanog gén aktiválásában szerepet játszik az Oct4 és Sox2 fehérje komplex (*Rodda és mtsai, 2005*), azonban a túl-expresszálatási kísérletek azt is bizonyították, hogy az Oct-4 jelenléte szükséges de nem elégséges az aktiváláshoz. Így feltételezhető, hogy más fehérje(k) aktiváló hatása szükséges a Nanog szabályozásához (*Kuroda és mtsai, 2005*).

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

mRNS preparálás preimplantációs korú nyúl embriókból: A génaktivitás jelenlétét a transzkriptum, azaz az RNS kimutatásával tudjuk igazolni. Az RNS preparálás a génkifejeződés vizsgálatához szükséges.

Az mRNS izolálás RNáz mentes környezetben, eszközökkel és anyagokkal történik. Az izoláláshoz a Dynal cég (Dynal, Hamburg, Germany) Dynabeads mRNS izoláló kit-jét alkalmazzuk. Az inkubálás alatt a sejtízátumhoz a korábban már apró mágnesezhető partikulumokhoz kötött oligodT primereket adunk. A primerek specifikusan kötődnek az mRNS polyA végéhez. Ezután mágnesre helyezük az oldatot 30 min időtartamra, ami alatt a mágnes a partikulumokat magához vonzza, így a felülúszó eltávolítható. Az mRNS-t 2 perc, 90°C kezeléssel reverzibilisen eltávolítjuk az oligodT partikulumokról, majd mágnesre helyezük és az mRNS-t azonnal átpipettáztuk az előkészített cDNS szintézis reakcióelegyébe.

Az mRNS cDNS-sé történő átírását reverz transzkripcióval végezzük. Az átíródott cDNS, így már a genomális DNS-hez hasonlóan megsokszorozható a polimeráz láncreakció (PCR) során.

PCR-reakció: A cDNS-ből specifikus primerek segítségével PCR reakcióval mutathatók ki az egyes gének és azok működése. A PCR rövid oligonukleotid DNS szakaszok és egy hőstabil polimeráz enzim segítségével lehetővé teszi az adott DNS szakaszok ciklikus felszaporítását. Ez a módszer lehetőséget nyújt az igen kis mennyiségben jelen lévő szekvenciák azonosítására is.

A PCR reakcióhoz szükséges reakcióelegy a következőket tartalmazta (50 µl-ben): 5 µl 10x Taq polimeráz puffer; 3 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl primer elegy (25 pmol Forward és Revers primermix), 0,4 µl Taq polimeráz (5 U/µl), 10 µl cDNS oldat; valamint dH₂O a végtérfogatra történő kiegészítéshez.

A PCR program a következő volt:

- Denaturálás: 30 sec 95 °C,
- Primer feltapadás: 60 sec 60 °C,
- Lánc-hosszabbítás: 90 sec 72 °C.

A program 45 ciklusból állt. A ciklus befejeztével 10 perc 72 °C végső lánc-hosszabbítás következett, majd a mintákat 4 °C-ra hűtöttük. Az egyes reakciókat gélelektroforézis segítségével analizáltuk.

Gélelektroforézis: A PCR reakcióelegyhez (50 µl) 10 µl 6x stop puffert adtunk, majd ebből az elegyből 20 µl-t 1,5% agaróz 1xTAE géltre vittünk fel. A futtatást 100V/10W-on BioRad típusú gélelektroforézis készülékkel végeztük. Az elválasztás időtartama közel 1 óra volt. A gél a DNS fragmentek kimutatásához 0,5 mg/ml etidium-bromidot tartalmazott. Az elválasztás befejeztével fotót készítettünk, UV lámpa felett.

Az Oct-4 fragment izolálása gélből: A fragment izolálásához a QIAGEN cég MinElute Gel Extraction Kit-jét használtuk. Az izolálás során a keresett DNS fragmentet egy steril szike segítségével kivágtuk a gélből. A kivágott gélseleket ezután Eppendorf csőbe tettük és lemértük. Háromszoros mennyiségű QG puffert adtunk a gélhez, majd 10 percig inkubáltuk 50 °C-on, hogy az oldódást elősegítsük és minden 2–3. percben vortexeltük az inkubáció alatt. A gélhez 1:1 arányban adtunk izopropanolt és összeráztuk. A MinElute oszlopot gyűjtőcsőbe helyeztük. A mintát erre pipettáztuk át. Ezután 1 perc centrifugálás következett (13 000 rpm), majd az átfolyó oldatot leöntöttük. A MinElute oszlopot ismét visszahelyeztük ugyanabba a csőbe és 500 µl QG puffert pipettáztunk rá. Az átfolyó oldatot leöntöttük, majd 750 µl PE puffert pipettáztunk az oszlopra. Ezután újra centrifugálás következett 1 percen át (13 000 rpm). Az átfolyó oldatot ismét leöntöttük és még 1 percig centrifugáltuk (13 000 rpm). Végül az oszlopot egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe helyeztük, 10 µl EB puffert adtunk hozzá és ismét 1 perc centrifugálás következett (13 000 rpm). Az így eluált DNS fragment koncentrációját gélelektroforézissel ellenőriztük, a fragmentet további felhasználásig –20 °C-on tároltuk.

Az Oct-4 fragment ligálása: A gélből izolált fragmentet PCR Cloning Kit (Invitrogen) segítségével bakteriális plazmidba klónoztuk. A reakcióelegy (melynek végtérfogata 10 µl) 100 fM plazmid DNS-t, 100 fM inszert DNS-t, 1mM ATP, 1U ligáz enzimet és 10x puffert tartalmazott. Az inkubálás 14 °C-on egész éjszakán át történt.

A Nanog cDNS PCR termék tisztítása, direkt ligálása: Direkt ligáláskor a PCR termék tisztítást az A-vég felragasztása előzte meg. Az 50 µl végtérfogatú reakcióelegy a következőket tartalmazta: 15,8 µl steril víz, 5 µl 10x puffer, 3 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl dATP, 0,2 µl Taq polimeráz enzim (5 U/µl) valamint 25 µl DNS-t. Ezt a reakcióelegyet, a PCR gépben, 72 °C-on, 20 percig inkubáltuk, majd az elegyet 4 °C-ra hűtöttük.

Ezután következett a tisztítás, a QIAGEN MinElute PCR Purification Kit segítségével, a következők szerint. A MinElute oszlopot gyűjtőcsőbe helyeztük. A mintát átpipettáztuk a MinElute oszlopra (DNS kötés), majd 1 percig centrifugál-

tuk. Az átfolyó oldatot kiöntöttük és a MinElute oszlopot visszahelyeztük ugyanabba a csőbe. Az oszlopra 750 µl PE puffert adtunk (le mosás), majd 1 perc centrifugálás következett. Az átfolyó oldatot kiöntöttük. A MinElute oszlopot ismét visszahelyeztük ugyanabba a csőbe. Ezután 1 perc centrifugálás maximális sebességen. MinElute oszlopot tiszta eppendorf csőbe helyeztük. Ezt 10 µl EB puffer (10mM Tris Cl, pH 8,5) hozzáadása követte. Az oszlopot 1 percig állni hagytuk, majd 1 percig centrifugáltuk. Az így nyert tisztított fragment koncentrációját gélelektroforézissel ellenőriztük, majd a fragmentet azonnal felhasználtuk.

A tisztított DNS fragmentet ligálási reakcióban használtuk, amely 10 µl végterfogóban a következőket tartalmazta: 30 fmol linearizált plazmid DNS, 30 fmol inszert DNS, 1 µl 10x puffer, 1mM ATP, valamint 1U ligáz enzim. A reakcióelegyet egy éjszakán át, 14 °C-on inkubáltuk, majd transzformáltuk.

Transzformálás: A transzformálást 50 µl kompetens sejt felolvasztásával kezdtük, majd 20 ng plazmid DNS-t adtunk hozzá. Ezután jégen inkubáltuk 30 percig. Az inkubálás befejeztével 42 °C-os vízfürdőbe helyeztük másfél percre. Ezután újra jégen inkubáltuk 10 percig. 1ml LB (20% LB (SIGMA L3022) desztillált vízben oldva) hozzáadása után 37 °C-on inkubáltuk 1 órán keresztül, rázógépben. Végül hígítás után, 4 µl 20% IPTG oldat és 40 µl 2% X-gal oldatok hozzáadásával ampicillin antibiotikumot tartalmazó lemezekben szélesztettük és éjszakára 37 °C-ra tettük. A kék-fehér és antibiotikum szelekciónak köszönhetően a fehér telepeket, vagyis a DNS-inszertet tartalmazó bakteriális telepeket tovább oltottuk, majd mimiprep segítségével analizáltuk.

Miniprep (bakteriális plazmid DNS tisztítás): Az *Escherichia coli* sejteket 2 ml LB-t és antibiotikumot tartalmazó tápoldatban tenyésztettük egy éjszakán át. Eppendorf csőbe átöntve centrifugáltuk (1 perc, 13 000 fordulat/perc), a felülúszót leöntöttük. Ezután a sejteket 100 µl Sol I lízis oldatban (50 mM glükóz, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) szuszpendáltuk, és 10 percig jégen inkubáltuk. Ezt követően 200 µl Sol II (0,2 N NaOH, 1% SDS) oldatot adtunk hozzá, majd kevertük és újra inkubáltuk 5 percig. Ezután 150 µl Sol III (300 mM K-acetát, 11,5% ecetsav) oldatot adtunk hozzá és 10 percig inkubáltuk (RT). Az oldatot centrifugáltuk (10 percig, 13 000 fordulat/perc), majd a felülúszót 1 ml abszolút etanolba öntöttük át és 15 percig, -20 °C-on inkubáltuk. Újra centrifugálás következett (10 perc, 13 000 fordulat/perc). A felülúszót leöntöttük, majd a DNS pelletet 500 µl 70%-os etanollal mostuk. A felülúszó eltávolítása után a DNS pelletet szárítottuk, majd 50 µl TE pufferben (pH: 8) oldottuk. A plazmid DNS tárolása további felhasználásig -20 °C-on történt.

A célgének amplifikált fragmentjeinek szekvenálása: A Nanog és Oct-4 fragmentek szekvenálását Egedi Sándor, az MBK DNS szekvenáló laboratórium technikus a végezte, az Applied Biosystems BigDye v3.1 Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit segítségével.

Szekvencianalízis: A gén azonosítására számítógépes szekvencia-analízist alkalmaztunk. A nyert DNS-szekvenciákat Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) homológia vizsgálatnak vetettük alá a klónozott genom-szakasz azonosítására

és a téves klónozások kiszűrésére. Az interneten keresztül, a GenBank (NCBI, National Center for Biotechnology Information) adatbázisát használtuk.

Oligonukleotid primerek tervezése: A kísérletekben alkalmazott primereket magunk terveztük Primer3 programmal (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>). A vizsgálathoz felhasznált szekvenciák a GeneBank adatbázisából, illetve saját vizsgálataink eredményeiből származtak (<http://www.ncbi.nih.gov/nucleotide>).

EREDMÉNYEK

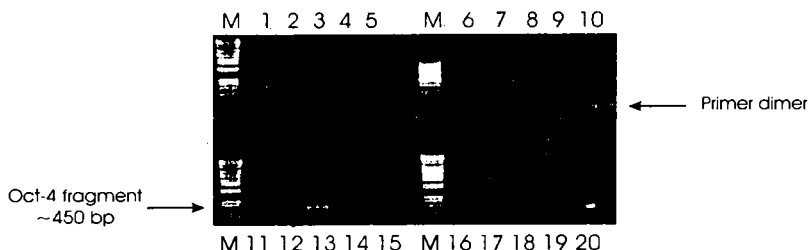
Szekvencia összehasonlítás és primerek tervezése: A keresett gének izolálása érdekében, az irodalomban közölt, eddig már sikeresen izolált Oct-4 és Nanog szekvenciákat kellett megvizsgálnunk. Erre azért volt szükség, hogy a szekvencia egyezések és hasonlóságok alapján olyan génszakaszt keressünk, amelyre várhatóan magas specifitással rendelkező primer tervezhető.

Az analízis eredménye alapján oligonukleotid primereket (20–30 bázispárból álló DNS-szakaszok) terveztünk több régióra. Kísérleteinkben két Nanog és négy Oct-4 „interspecifikus” primerpárt terveztünk, majd teszteltünk.

Primerek tesztelése RT-PCR kísérletben: Az RT-PCR módszer alkalmazásával lehetőség van az adott stádiumban expresszálo gén kimutatására, a korábbi eredmények alapján feltételezhető volt, hogy az Oct-4 gén hólyagsíra fejlődési stádiumban aktív, így lehetséges a géntermék kimutatása. Az mRNS cDNS-é történő átírása révén pedig, a cDNS szekvencia meghatározása.

Először hólyagsíra fejlődési stádiumú nyúl embriók poolozott (10 embrió/pool) mintáin teszteltük az egyes primermixeket. A teszt eredménye a 2. ábrán látható. A kísérlet eredményeként a legjobbnak a 4. primermix bizonyult az Oct-4 génre tervezett primerkombinációk közül. Így a további vizsgálatok számára a 4. mix került kiválasztásra.

2. ábra: Az Oct-4 primerek tesztelése RT-PCR kísérletben



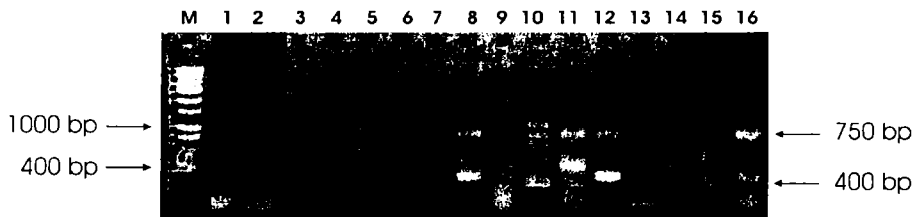
M: molekulásúly marker, 1-5: mix2, 6-10: mix3, 12-15: mix4, 16-20: mix1; 1,6,11,16: negatív kontroll, 2-5, 7-10, 12-15, 17-20: egyedi nyúl blasztociszta mRNS(1)

Fig. 2.: Testing of Oct-4 primers in RT-PCR

(M): DNA ladder, (1-5): mix2, (6-10): mix3, (12-15): mix4, (16-20): mix1; (1, 6, 11, 16): negative control, (2-5, 7-10, 12-15, 17-20): mRNA sample from single rabbit blastocyst stage embryo(1)

Az amplifikált fragment intenzitása alapján azonban a PCR reakció optimalizálására volt szükség. Kísérletünkben az Oct-4 primerek tesztelése a felhasznált magnézium-klorid koncentrációjának (25 mM) változtatásával történt. A magnézium mennyiségét 1-, 2-, illetve 3 mM mennyiségben változtatva vizsgáltuk a primerek által amplifikált fragmenteket. Ebből a 2 mM és a 3 mM $MgCl_2$ tartalmú reakcióelegy adott kedvező eredményt, így a további kísérletekben már csak ezeket a koncentrációkat alkalmaztuk (3. ábra).

3. ábra: A 4-es Oct-4 primermix tesztelése RT-PCR kísérletben a magnézium koncentráció változtatásának függvényében



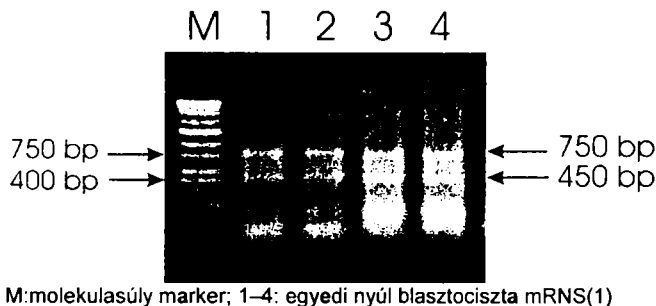
M: molekulaszú marker, 1: negatív kontroll (1mM $MgCl_2$, 1.primermix), 2: negatív kontroll (1mM $MgCl_2$, 2.primermix), 3: negatív kontroll (1mM $MgCl_2$, 3.primermix), 4: negatív kontroll (1mM $MgCl_2$, 4.primermix), 5: nyúl blasztociszta mRNS (1mM $MgCl_2$, 1.primermix), 6: nyúl blasztociszta mRNS (1mM $MgCl_2$, 2.primermix), 7: nyúl blasztociszta mRNS (1mM $MgCl_2$, 3.primermix), 8: nyúl blasztociszta mRNS (1mM $MgCl_2$, 4.primermix), 9: nyúl blasztociszta mRNS (2mM $MgCl_2$, 1.primermix), 10: nyúl blasztociszta mRNS (2mM $MgCl_2$, 2.primermix), 11: nyúl blasztociszta mRNS (2mM $MgCl_2$, 3.primermix), 12: nyúl blasztociszta mRNS (2mM $MgCl_2$, 4.primermix), 13: nyúl blasztociszta mRNS (3mM $MgCl_2$, 1.primermix), 14: nyúl blasztociszta mRNS (3mM $MgCl_2$, 2.primermix), 15: nyúl blasztociszta mRNS (3mM $MgCl_2$, 3.primermix), 16: nyúl blasztociszta mRNS (3mM $MgCl_2$, 4.primermix)(1)

Fig. 3.: Testing of the oct4 primermix4 with different magnesium concentrations in RT-PCR (M): DNA ladder, (1): negative control (1mM $MgCl_2$, 1.primermix), (2): negative control (1mM $MgCl_2$, 2.primermix), (3): negative control (1mM $MgCl_2$, 3.primermix), (4): negative control (1mM $MgCl_2$, 4.primermix), (5): rabbit blastocyst mRNA (1mM $MgCl_2$, 1.primermix), (6): rabbit blastocyst mRNA (1mM $MgCl_2$, 2.primermix), (7): rabbit blastocyst mRNA (1mM $MgCl_2$, 3.primermix), (8): rabbit blastocyst mRNA (1mM $MgCl_2$, 4.primermix), (9): rabbit blastocyst mRNA (2mM $MgCl_2$, 1.primermix), (10): rabbit blastocyst mRNA (2mM $MgCl_2$, 2.primermix), (11): rabbit blastocyst mRNA (2mM $MgCl_2$, 3.primermix), (12): rabbit blastocyst mRNA (2mM $MgCl_2$, 4.primermix), (13): rabbit blastocyst mRNA (3mM $MgCl_2$, 1.primermix), (14): rabbit blastocyst mRNA (3mM $MgCl_2$, 2.primermix), (15): (3mM $MgCl_2$, 3.primermix), (16): (3mM $MgCl_2$, 4.primermix)(1)

Az Oct-4 izolálásának eredménye

Az Oct-4 génnel a transzkripció faktor család igen konzervatív szekvenciája miatt, első lépésben, különböző primerkombinációk tesztelését végeztük. Ennek eredményeként kiválasztásra került egy olyan optimális primerpár, amely az eddig ismert szekvenciák alapján várható 450 bp méretű fragmentet eredményezett (4. ábra).

4. ábra: Nyúl Oct-4 fragment amplifikálása PCR-reakcióban a 4. primermix alkalmazásával



M:molekulasúly marker; 1–4: egyedi nyúl blasztociszta mRNS(1)

Fig. 4.: Amplification of Oct-4 fragment with primermix4 in PCR
(M): DNA ladder; (1–4): mRNA sample from single rabbit blastocyst stage embryo(1)

Mivel az Oct-4 PCR optimalizálása során mindvégig megjelent egy második, nagyobb méretű fragment (~750 bp), így mindkét fragment izolálása és szekvenálása mellett döntöttünk. Az izolált mintákat szekvenáltuk. A szekvencia meghatározást követően adatbázis segítségével vizsgáltuk az amplifikált fragmenteket. A nagyobb méretű, mintegy 750 bp-os DNS fragment aspecifikus amplifikáció eredménye, nem mutatott hasonlóságot a keresett gén, vagy gén-család tagjaival. A rövidebb, 450 bp méretű fragment azonban pozitív eredményt hozott. A fragmentet BLAST programmal vizsgálva, a kapott szekvenciát különböző állatfajokból izolált, már ismert Oct-4 szekvenciákkal hasonlítottuk össze. A nyútból és az egérből izolált Oct-4 szekvencia 83%-os hasonlóságot mutatott.

A szekvenálással azonosított alsó fragmentet bakteriális plazmidba klónoztuk. Az Oct-4 génnek ez a 450bp-os szekvencia részlete a POU-domént kódoló régióban található. A POU-domén nélkülözhetetlen a DNS-kötés szempontjából, így a transzkripció folyamatában is. Ez a domén két szerkezetileg független aldoménből áll. A 75 aminosavból álló N-terminális POU specifikus régióból (POUs) és a 60 aminosavból álló C-terminális homeodoménből (POUh). Mindkét domén specifikus kapcsolat kiépítésére képes a hélix-hurok-hélix struktúrának köszönhetően. Egymástól egy 15–56 aminosavból álló variábilis szakasz választja el őket. A POU doménen kívüli régiók nem kulcsfontosságúak a DNS-kötés szempontjából. Az N-terminális domén prolinban, míg a C-terminális domén prolinban, szerinben és treoninban gazdag. A jelenlegi eredmények szerint, mindkét doménnek a transzaktivációban van szerepe. A különbség az, hogy az Oct-4 C-terminális domén sejtspecifikus és a foszforiláción keresztül regulált, míg az N-domén nem (5. ábra).

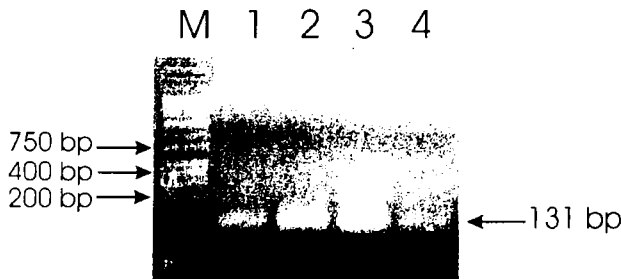
5. ábra: Az Oct-4 fehérje felépítése (Pan és mtsai, 2002)



Fig. 5.: Structure of the Oct4 protein (Pan et al., 2002)

Nanog izolálásának eredménye: Kísérletünkben a Nanog gén esetén először egy 131 bp méretű fragment került klónozásra. A homológia ugyanis csak rövid szakaszon volt megfigyelhető a különböző fajok között, ezért az első lépésben csak rövid fragmentum amplifikálására nyílt lehetőségünk. A PCR egyetlen fragment amplifikálását mutatta (6. ábra), ezért direkt ligálást alkalmaztunk, és plazmid vektorba klónoztuk.

6. ábra: A Nanog gén amplifikált fragmentjeinek kimutatása



M: molekulasúly marker, 1-4: egyedi nyúl blasztociszta mRNS(1)

Fig. 6.: Identification of the amplified fragments of Nanog gene
(M): DNA ladder, (1-4): mRNA sample from single rabbit blastocyst stage embryo(1)

Ezután szekvenálás következett, majd az Oct-4 esetében már leírt módon, ismét a BLAST programmal, szekvencia-összehasonlítást végeztünk. A nyúlból és az egérből izolált Nanog-szekvencia 98%-os hasonlóságot mutatott. Mivel a szekvencia analízis jelentős homológiát mutatott az egér szekvenciával, így várható volt, hogy a többi fajtól eltérően, az egér és nyúl szekvencia erősebb egyezést mutat. Így új primerek kerültek tervezésre, amellyel már egy 420 bp-os fragmentet amplifikáltunk sikeresen. A 420 bp méretű fragment a szekvencia-összehasonlítás során 75%-os hasonlóságot mutatott a teljes fragmentre vonatkoztatva az egér szekvenciához képest.

Az Oct-4 gén expressziója nyúl embrióban és szövetekben: Az irodalomban leírt adatok szerint, az Oct-4 embrionális expressziójának vizsgálatakor, az egér esetében, az Oct-4 anyai mRNS már kimutatható a petesejtben, ezt követően, a kétsejtes stádiumban megkezdődő zgotikus expresszió pedig egészen blasztociszta stádiumig tart. Az ember esetében a petesejtben már szintén detektálható az anyai mRNS, de a zgotikus expresszió csak a 8 sejtjes stádiumot megelőzően kezdődik. A szövetek esetében, az egér herében és petefészekben, míg emberben csak a herében mutattak ki Oct-4 expressziót (1. táblázat).

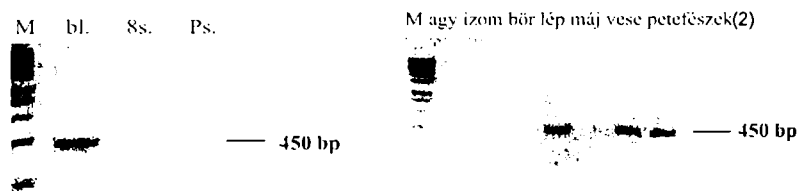
Ezt követően, immár nyúl- és génspecifikus primereinkkel vizsgáltuk az Oct-4 embrió- és szövetspecifikus expresszióját. Az embrionális expresszió vizsgálatakor a humánhoz hasonló eredményt kaptunk, a szövetek vizsgálatakor azonban pozitív eredményt kaptunk az agyban, lépben, vesében és méhben is (7. ábra). Az Oct-4 gén nyúl embrióban és szövetekben mutatott aktivitását a közeljövőben még *in situ* hibridizáció segítségével is kívánjuk vizsgálni.

Az Oct-4 embrió és szövetspecifikus expressziója egérben és emberben

		Preimplantációs embrió(1)					
		p.s.	2s.	4s.	8s.	Mor.	Bl.
Egér(2)		+	+	+	+	+	+
Humán		+	—	—	+	+	+

	Szövetek(3)										
	agy (4)	szív (5)	vese (6)	here (7)	lép (8)	izom (9)	petefészkek (10)	gyomor (11)	thymus	máj (12)	bőr (13)
Egér(2)	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—
Humán	—	—	—	+	—	—	—	—	—1	—	—

Table 1.: Specific expression of Oct-4 in mouse and human tissues and embryos
 In preimplanted embryos(1), mouse(2), tissues(3), brain(4), heart(5), kidney(6), testicle(7), spleen(8), muscle(9), ovary(10), stomach(11), liver(12), skin(13),

7. ábra: Az Oct-4 embrió- és szövetspecifikus expressziója nyúlban

(M-molekulasúly marker, bl.:blastociszta, 8s.: 8 sejtes embrió, p.s.: petesejt)(1)

Fig. 7.: Specific expression of Oct-4 in rabbit tissues and embryos
 M-DNA ladder, bl.-blastocyst stage embryo, 8s.-8 cells stage embryo, p.s.-oocyte(1), brain, muscle, skin, spleen, liver, kidney, ovary)(2)

KÖVETKEZTETÉSEK

Munkánk során sikeresen azonosítottuk mindkét gént a nyúl genomban, kidolgoztunk egy a gének expresszióját kimutató eljárást és génspecifikus primereket. Így a faj- és szekvencia specifikus primerekkel lehetőségünk nyílik a gén expressziójának szövet és fejlődési stádium specifikus vizsgálatára egyaránt. Várakozásaink szerint eredményeink a pluripotencia kialakításában szerepet játszó gének és mechanizmusok jobb megértéséhez vezetnek. Nyúlra folytatott embriológiai kísérleteink úttörő jellegűek, jelenleg igen csekély információ áll rendelkezésre a nyúl embrió korai fejlődés és differenciálódást irányító gének expressziójáról. A nyúl genom szekvenciájának meghatározása céljából hamarosan elinduló projekt éveken belül fel fogja gyorsítani a nyúlra, mint modellállaton végzett kutatások ütemét. Addig is azonban a csoportunk által végzett molekuláris biológiai szintű kutatás fontos eredményekkel szolgálhat az orvosi biológiai és transzgénikus kutatási területek számára.

További vizsgálatainkban, a jelenleg különböző fejlődési stádiumú embriók mintáinak gyűjtése zajlik. Ehhez szuperovulálással oocytát, illetve termékenyítést követően preimplantációs korú embriókat gyűjtöttünk. Az embriók szöve-

teinek analizését RT-PCR és *in situ* hibridizáció segítségével tervezzük elvégezni. A továbbiakban a gének teljes kódoló régiójának klónozása, és a szekvencia meghatározása a másik fő cél. Ehhez ún. 3'→5' RACE PCR-t használunk. A RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) olyan rekombináns DNS-technika, amely a nukleinsav szekvenciák gyors amplifikációját eredményezi mRNS templátból. Az 5' és 3' végek izolálását követően, lehetőség nyílik az exon-határokon primerek tervezésére, amelyek segítségével a genomi kópia teljes génje izolálható lesz, az intronok is amplifikálhatóvá válnak.

Eredményeink közvetlen felhasználója továbbá kutatócsoportunk nyúl klónozási csoportja, amelyik a nukleusz transzplantációs kísérletekben nyert klónozott embriók fejlődési potenciáljának analizisekor alkalmazhatja az általunk felállítani kívánt RT-PCR rendszert.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Ez úton szeretnénk köszönetet mondani a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Mikromanipulációs és Genetikai Újraprogramozási csoport minden munkatársának. Az elvégzett munka az EU-FP6-MEXT-CT-2003-509582; a Wellcome Trust (Grant No. 070246); az OTKA T046171; valamint az OMFB-00330/2004 pályázatok finanszírozásából valósult meg.

IRODALOM

- Boiani, M. – Echardt, S. – Shöler, H.R. – McLaughlin, K.J.(2002): Oct-4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes and Development*, 16. 10. 1209–1219.
- Chambers, I. – Colby, D. – Robertson, M. – Nichols, J. – Lee, S. – Tweedle, S. – Smith, A.(2003): Functional Expression Cloning of Nanog a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. *Cell*, 113. 643–655.
- Fésüs, L. – Komlósi, I. – Varga, L. – Zsolnay, A.(2000): Molekuláris genetikai módszerek alkalmazása az állattenyésztésben. I. fejezet
- Hansis, C. – Grifo, J. – Krey, L.(2000): Oct-4 expression in inner cell mass and trophectoderm of human blastocyst. *Mol. Hum. Reprod.*, 6. :999–1004.
- Mitsui, K. – Tokuzawa, Y. – Itoh, H. – Segawa, K. – Murakami, M. – Takahashi, K. – Maruyama, M. – Maeda, M. – Yamanaka, S.(2003): The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells. *Cell*, 113. 631–642.
- Kemény, A. – Duda, E.(2004): Az őssejtek különleges tulajdonságai: pluripotencia és sajátos sejtciklusszabályozás. *Magyar Tudomány*, 3. 276–284.
- Kirchhof, N. – Carnwath, J.W. – Lemme, E. – Anastasiadis, K. – Schöler, H.R. – Niemann, H. (2000): Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol. Reprod.*, 63. 6. 1698–1705.
- Kuroda, T. – Tada, M. – Kubota, H. – Kimura, H. – Hatano, S.Y. – Suemori, H. – Nakatsuji, N. – Tada, T.(2005): Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol. Cell. Biol.*, 25. 2475–2485.
- Palmieri, S.L. – Peter, W. – Hess, H. – Schöler, H.R.(1994): Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev. Biol.*, 166. 259–267.
- Pan, G.J. – Chang, Y.Z. – Schöler, H.R. – Pei, D.(2002): Stem cell pluripotency and transcription factor Oct-4. *Cell Res.*, 12. 5–6. 321–329.
- Rodda, D.J. – Chew, J.L. – Lim, L.H. – Loh, Y.H. – Wang, B. – Ng, H.H. – Robson, P.(2005): Transcriptional regulation of Nanog by OCT4 and SOX2. *J. Biol. Chem.*, 280. 24731–24737.

- Rosner, M.H. – Viganao, M.A. – Ozato, K. – Timmons, P.M. – Poirier, F. – Rigby, P.W. – Staudt, L.M.(1990): A POU- domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature*, 345. 686–692.
- Schöler, H.R. – Hatzopoulos, A.K. – Balling, R. – Suzuki, N. – Gruss, P.(1989): A family of octamer-specific proteins presents during mouse embryogenesis: evidence for germ- line-specific expression of an Oct factor. *EMBO J.*, 8. 2543–2550.
- Yeon, Y.I. – Ha, H.S. – Balling, R. – Schöler, H.R. – Artzt, K.(1991): Structure, expression and chromosomal location of the Oct-4 gene. *Mech. Dev.*, 35. 171–179.

Érkezett: 2006. február
Szerzők címe: Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont
Authors' address: Agricultural Biotechnology Center
H-2100 Gödöllő, Szent Györgyi A. u. 4.
E-mail: dinnyes@abc.hu