



SZENT ISTVÁN EGYETEM

Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

**BIOTECHNOLÓGIAI ELJÁRÁSOKKAL ELŐÁLLÍTOTT EMLŐS
EMBRIÓK FEJLŐDÉSÉT KÍSÉRŐ GÉNEXPRESSZIÓS MINTÁZATOK
VIZSGÁLATA MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL**

Doktori (PhD) értekezés

Bock István

Gödöllő

2015

A doktori iskola

megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Állattenyésztési tudományok

vezetője: **Prof. Dr. Mézes Miklós az MTA levelező tagja**
Tanszékvezető, egyetemi tanár,
SZENT ISTVÁN EGYETEM, Mezőgazdaság- és
Környezettudományi Kar, Állattudományi Alapok Intézet,
Takarmányozástani Tanszék

témavezető: **Prof. Dr. Dinnyés András az MTA doktora**
Laboratóriumvezető, egyetemi magántanár,
SZENT ISTVÁN EGYETEM, Mezőgazdaság- és
Környezettudományi Kar, Állattudományi Alapok Intézet,
Molekuláris Állatbiotechnológiai Laboratórium

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	3
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS	9
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	13
2.1. Emlős ivarsejt és embrió krioprezerváció	13
2.2. Az emlős ivarsejt és embrió krioprezerváció korlátai.....	15
2.2.1. A fagyasztás okozta stressz a sejtekben	15
2.2.2. Ondómélyhűtés	16
2.2.3. Petesejt mélyhűtés.....	17
2.2.4. Embrió mélyhűtés	18
2.3. A krioprezerváció hatékonyságát növelő módszerek.....	20
2.4. A magas hidrosztatikus nyomáskezelés - egy alapvetően új megközelítés a sejtek fagytoleranciájának növelésére	22
2.4.1. A hidrosztatikai (hidrosztatikus) nyomás jellemzése.....	24
2.4.2. A magas hidrosztatikus nyomáskezelés hatása a sejt működésre	25
2.4.3. A magas hidrosztatikus nyomáskezelés hatására kialakuló stresszválasz.....	27
2.4.4. A magas nyomás hatása az emlős sejtekre.....	28
2.4.5. Az emlős ivarsejteken és embriókon alkalmazott magas hidrosztatikus nyomáskezelés	29
2.4.6. Az asszisztált reprodukciós eljárások területén alkalmazott magas hidrosztatikus nyomáskezeléssel elért eredmények	30
2.4.6.1. Beágyazódás előtti embriók nyomáskezelése	30
2.4.6.2. Hímivarsejtek nyomáskezelése	31
2.4.6.3. Petesejtek nyomáskezelése	32
2.4.6.4. Embriónális őssejtek nyomáskezelése	33
2.5. A magas hidrosztatikus nyomáskezelés ivarsejtekre és embriókra kifejtett hatásmechanizmusának vizsgálata	34
2.5.1. Morfológiai megfigyelések	34
2.5.2. Molekuláris biológiai vizsgálatok	36
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	37
3.1. A kísérleti minta előállítása.....	37
3.1.1. Hólyagcsíra stádiumú embriók kinyerése, tenyésztése	37
3.1.2. Petesejtek kinyerése	37
3.1.3. A hólyagcsíra állapotú embriók kezelése magas hidrosztatikus nyomással	38
3.1.4. A petesejtek kezelése magas hidrosztatikus nyomással.....	39
3.1.5. A petesejtek és hímivarsejtek előkészítése ICSI-hez	39

3.1.6. Intracitoplazmatikus spermium injektálás	39
3.1.7. A petesejtek és a belőlük fejlődött négysejtes embriók mikroszkópos vizsgálata ICSI után	40
3.2. A HHP-kezelt hólyagsíra állapotú embriók génexpressziós vizsgálata	41
3.2.1. RNS izolálás és cDNS szintézis.....	41
3.2.2. Primer tervezés.....	41
3.2.3. Az RT-qPCR mérések normalizálásához használt referenciagének előzetes validálása .	42
3.2.4. Kvantitatív reverz-transzkripció PCR (RT-qPCR).....	43
3.3. A HHP-kezelt petesejtek, valamint a belőlük fejlődő négysejtes embriók génexpressziós microarray vizsgálata	43
3.3.1. RNS izolálás és minőség ellenőrzés.....	43
3.3.2. RNS amplifikáció, jelölés és microarray hibridizáció	44
3.3.3. Kétszínű expressziós microarray chippek leolvasása során nyert nyers adatok előzetes feldolgozása és statisztikai elemzése	45
3.3.4. RT-qPCR primerek tervezése és optimalizálása a microarray eredmények validálásához ...	46
3.3.5. A validáláshoz használt cDNS szintézise	47
3.3.6. RT-qPCR-es validálás.....	48
3.3.7. Bioinformatikai elemzés	48
4. EREDMÉNYEK	51
4.1. A referenciagének stabil expressziója a HHP-kezelés után	51
4.2. A HHP-kezelésre adott azonnali és elhúzódó transzkripció válasz egér blasztocisztákban .	52
4.3. A HHP-kezelésre adott globális génexpressziós válasz egér petesejtekben és négysejtes embriókban	53
4.3.1. A translációban résztvevő gének jelentős expresszió csökkenése a négysejtes embriókban.....	58
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	61
5.1. Hipotézis a magas hidrosztatikus nyomáskezelés emlős ivarsejtekre és embriókra kifejtett előnyös hatására vonatkozóan.....	68
5.2. További javaslatok	69
6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	73
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	75
8. SUMMARY	79
9. MELLÉKLETEK.....	81
9.1 Irodalomjegyzék.....	81
9.2. A HHP Machine 100 készülék működése.....	99
9.2.1. Minták előkészítése.....	102
9.2.2. A nyomáskezelés menete	102
9.3. A négysejtes embriókban szignifikáns expresszióváltozást mutató gének listája	103
9.4. A négysejtes embriókban DAVID programmal végzett funkcionális kategorizálás során azonosított szignifikáns Gene Ontology kategóriák részletes bemutatása.....	117
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	120

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

4x44K	Four identical subgrids of approximately 44,000 probes each (négy megegyező négyzetrács egyenként 44000 próbával)
AFP	Antifreeze protein (fagyásgátló fehérje)
ART	Assisted reproductive technologies (asszisztált reprodukciós eljárások)
BLASTn	Basic Local Alignment Search Tool – nucleotide (alap helyi illesztő kereső eszköz – nukleotid)
BSA	Bovine Serum Albumin (szarvasmarha savó albumin)
COC	Cumulus Oocyte Complex (kumulusz petesejt komplex)
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (csoportos, szabályosan megszakított rövid palindróm ismétlések)
cDNS	komplementer dezoxiribonukleinsav
cRNS	komplementer ribonukleinsav
C _t	Threshold cycle (küszöbérték)
CZB	Chatot-Ziomek-Bavister tápoldat
DMSO	Dimetil szulfoxid
EB	Embryoid body (embrioid test)
EGA	Embryonic genome activation (embrionális genom aktiváció)
ER	Endoplasmic reticulum (endoplazmás retikulum)
FCS	Fetal calf serum (magzati borjúsavó)
FDR	False discovery rate (hamis találati arány)
G2 fázis	Második növekedési szakasz
gDNS	Genomiális dezoxiribonukleinsav
GO	Gene Ontology (gén ontológia)
GSH	Glutathione (glutation)
hCG	Human chorionic gonadotropin (emberi koriongonadotrop hormon)
HHP	High hydrostatic pressure (magas hidrosztatikus nyomás)
HMC	Handmade cloning (kézi klónozás)
HSP	Heat shock protein (hősokk fehérje)
ICM	Inner cell mass (a hólyagsíra állapotú embrió belső sejtcsomó sejtjei)

ICSI	Intracytoplasmic sperm injection (intracitoplazmatikus spermium injektálás)
IU	International unit (nemzetközi egység)
IVC	<i>In vitro</i> culture (<i>in vitro</i> tenyésztés)
IVF	<i>In vitro</i> fertilization (<i>in vitro</i> fertilizáció)
IVM	<i>In vitro</i> maturation (<i>in vitro</i> érlelés)
IVP	<i>In vitro</i> produced (<i>in vitro</i> előállított)
IVT	<i>In vitro</i> transcription (<i>in vitro</i> transzkripció)
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Kyotói Gén és Genom Enciklopédia)
KSOM	Potassium Simplex Optimized Medium (egyszerű kálium optimalizált tápoldat)
LOWESS	Locally weighted scatterplot smoothing (helyi súlyozású szóródási kép korrekció)
MII	Metafázis II (a meiotikus osztódás második fázisának metafázisa)
mRNS	Hírvivő ribonukleinsav
MZT	Maternal-to-zygotic transition (anya-zigóta átmenet)
NADPH	Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (redukált forma))
NCBI	National Center for Biotechnology Information (A Biotechnológiai Információ Nemzeti Központja – Amerikai Egyesült Államok)
PA	Parthenogenetikus aktiválás
PCR	Polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
PMSG	Pregnant mare serum gonadotropin (vemhes kanca szérum gonadotropin)
PVA	Polyvinyl alcohol (polivinil alkohol)
PVP	polyvinylpyrrolidone (polivinil-pirrolidon)
RIN	RNA integrity number (RNS integritás érték)
rRNS	Riboszómális ribonukleinsav
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction (reverz transzkripció polimeráz láncreakció)
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (kvantitatív reverz transzkripció polimeráz láncreakció)
SEM	Standard error of the mean (a középérték közepes hibája)

SD	Standard deviation (szórás)
SPF	Specific pathogen free (meghatározott kórokozóktól mentes)
SSV	Solid Surface Vitrification (szilárd felszínű vitrifikáció)
TALLEN	Transcription activator-like effector nuclease (transzkripció aktivátor-szerű effektor nukleáz)
TCM-199	Tissue Culture Medium (szövettenyésztő médium)
TE	Trophectoderm (trofektoderma)
ZFN	Zinc-finger nuclease (cink-ujj nukleáz)

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A reprodukív sejtek és szövetek fagyasztásának lehetősége forradalmasította az állattenyésztés, a biotechnológia és a humán gyógyászat területeit azáltal, hogy térben és időben megválaszthatóvá tette a megtermékenyítés és az embrió-fejlődés folyamatát. Az olyan alapvető technikák, mint az *in vitro* embrió előállítás vagy a sejtmagátültetési klónozás kidolgozásához a krioprezerváció nyitotta meg az utat, mivel ezekhez az eljárásokhoz a gaméták és embriók mélyhűtésének biztosítása elengedhetetlen. Annak ellenére azonban, hogy e technika új mérföldkövet jelentett számos biotechnológiai eljárás tekintetében, napjainkban is jelentős problémát okoznak azok a károk, amelyek a fagyasztási eljárások során jelentkeznek, csökkentve ezzel a felhasználható ivarsejtek és embriók mennyiségét és minőségét egyaránt. A nehézségek nagyságrendjét jól mutatja, hogy az első valóban sikeres sejtfagyasztási kísérletek óta (Polge 1949) eltelt több mint fél évszázad során a legtöbb állatfaj esetében egyelőre csak a hímivarsejt fagyasztást sikerült megbízható módon megoldani, a petesejt és az embrió krioprezervációt azonban nem (Ciani et al. 2012). Habár számos gazdasági haszonállat esetében (pl. sertés), vagy akár a humán reprodukciós eljárások során lehetséges az ivarsejtek és embriók mélyhűtése, azonban gyakran csak nagy veszteségek árán (Saragusty és Arav 2011). A kriobiológia tudományágának központi célja csökkenteni a fagyasztás folyamán a sejtekben keletkező sérüléseket úgy, hogy kiolvasztás után a lehető legmagasabb túlélési és fejlődési arány legyen elérhető. A fagyasztás során jelentkező károkat a kutatók hagyományosan mindig is egyfajta védekező szemlélettel próbálták minimalizálni. Megkísérelték tehát minél tökéletesebben megállapítani a sejtek elméletileg fennálló fiziológiai szükségleteit (pl.: a megfelelő hőmérséklet, pH és médium összetevők kiválasztásával), illetve csökkenteni a sejtek érzékenységét, és ezek biztosításával próbáltak jobb fagyasztási hatékonyságot elérni (Saragusty és Arav 2011).

Az elmúlt években a Szent István Egyetem, Állatorvos-Tudományi Kar, Szülészeti és Szaporodásbiológiai tanszékének kutatócsoportja egy radikálisan új megközelítéssel próbálta meg növelni a sejtek mélyhűtési toleranciáját. Kísérleteik során abból indultak ki, hogy a sejteket előzetesen érő és megfelelő mértékben alkalmazott stresszhatás a károkozás helyett akár védőhatást is kifejthet, amely a következő (pl.: fagyasztás okozta) sokkhatás során nyilvánul meg (Pribenszky et al. 2005a). A kutatók elsődleges stresszhatásnak a magas hidrosztatikus nyomást (High Hydrostatic Pressure; HHP) választották, amellyel emlős embriókat és ivarsejteket kezeltek a tolerancia határukhoz közeli nyomásértékekkel, majd mélyhűtötték őket, és azt vizsgálták, hogy lehetséges-e így javítani a sejtek mélyhűtési toleranciáját. A módszer olyannyira hatásosnak

bizonyult, hogy napjainkban már számos gazdasági állatfaj (pl. sertés, szarvasmarha, juh) esetében sikerrel alkalmazzák, nem csak a mélyhűtés, hanem több más asszisztált reprodukciós eljárás hatékonyságának a javítására is (Pribenszky és Vajta 2011).

A magas hidrosztatikus nyomáskezelés alkalmazása az embriológiai kísérletek során új utakat nyitott a krioprezervációs technikák tudományában. Annak ellenére azonban, hogy a nyomáskezelést a mélyhűtéssel kombinálva számos esetben jelentős javulást lehetett elérni, a jótékony hatás hátterében álló intracelluláris folyamatok napjainkban még nem ismertek. Elengedhetetlenül fontos lenne ezért megértenünk a magas hidrosztatikus nyomáskezelés által befolyásolt molekuláris biológiai folyamatokat, amelyek a védőhatás hátterében állnak, mivel ez a fagyasztási protokollok további tökéletesítését is lehetővé tehetné. Munkám során ezért a HHP-technika korai (preimplantációs) génaktivációra kifejtett hatásának tanulmányozását tűztem ki célul, amellyel választ kívántam kapni arra a kérdésre, hogy mi állhat a HHP-technika mélyhűtési toleranciát növelő hatásának hátterében. A nyomás-stressz hatására megváltozott intracelluláris folyamatok megismerésével pedig közvetve azt is vizsgálhattam, hogy miként képesek a sejtek a mélyhűtés okozta stresszhatás leküzdésére. Mivel a HHP-kezelés a különböző mélyhűtési módszereken túl olyan egyéb asszisztált reprodukciós eljárások esetében is hatásosnak bizonyult, mint például a sejtmagátültetési klónozás (Pribenszky és Vajta 2011), ezért munkám során egy olyan általános védekezési mechanizmusba nyerhettem bepillantást, amely az ivarsejtek és embriók túlélését segíti *in vitro* körülmények között.

Kísérleteim fő céljai a következők voltak:

1. Első lépésben bizonyítani kívántam, hogy a HHP-technika az általunk választott modellrendszerben transzkripcionális szintű változásokat okoz egyes géneknél. Modell rendszernek egér hólyagcsíra állapotú embriókat választottunk, amelyek esetében a HHP-technika már hatásosnak bizonyult a kriotolerancia növelésében. További fontos szempont volt még, hogy az egér teljes genom szekvenciája régóta ismert és jól karakterizált, így a génexpressziós változásokat real-time PCR módszer segítségével követhettem.
2. A továbbiakban egér petesejteket vizsgálva választ kívántunk kapni arra a kérdésre, hogy a HHP-kezelés befolyásolja-e a bennük eltárolt anyai RNS készletet. A genom egészét lefedő génexpressziós microarray technika segítségével a teljes transzkriptumban (transzkriptomban), azaz az összes expresszált génre vonatkozóan vizsgáltuk az esetlegesen bekövetkező változásokat.

3. Ahhoz, hogy a HHP hatását az embrionális genom aktiváció (EGA) után is vizsgálhassuk, a magas hidrosztatikus nyomással kezelt, majd intracitoplazmatikus spermium injektálás (ICSI) útján megtermékenyített egér petesejteket négysejtes-embrió állapotig tenyésztettük. Az így nyert embriók transzkriptomát szintén génexpressziós microarray technika alkalmazásával vizsgáltuk.

4. A globális génexpressziós vizsgálatok során nyert nagy mennyiségű adatot bioinformatikai programok segítségével részletesen elemeztem azzal a céllal, hogy bepillantást nyerjek a HHP-eljárás által befolyásolt mechanizmusokba, amelyek szerepet játszhatnak a petesejtekben és az embriókban a mélyhűtés okozta stressz leküzdése során.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Emlős ivarsejt és embrió krioprezerváció

Az emlős ivarsejt és embrió krioprezerváció jelentősége, hogy rendkívül alacsony hőmérséklet segítségével a sejtekben zajló biológiai folyamatokat és az osztódási ciklust meghatározott ideig felfüggeszthetjük, ezáltal lehetővé válik az értékes genetikai anyagot tartalmazó élő sejtek felhasználásának térbeli és időbeli koordinációja. Habár a spermium krioprezervációval kapcsolatos megfigyelések egészen 1776-ra vezethetők vissza (Spallanzani 1776), a modern emlős ivarsejt krioprezerváció területét Polge 1949-ben megjelent közleménye nyitotta meg, amelyben ondósejtek sikeres, krioprotektív glicerin felhasználásával történt fagyasztásáról számolt be (Polge 1949). A krioprotektáns anyagok felfedezésének óriási hatása volt a kriobiológiai kutatások területére, mert segítségükkel olyan részletekre derülhetett fény, amelyek nagyban segítettek a krioprezervációs protokollok továbbfejlesztését. Az élő sejtek legnagyobb arányban előforduló építőeleme a víz. A krioprotektánsok, vagy más néven védővegyületek hozzáadása nélkül a sejt vízkészlete csaknem teljesen megfagy és csak a sók valamint más oldott molekulák feldúsulása akadályozza meg a teljes jégképződést. Ha krioprotektánst is tartalmaz a sejt, úgy annak a koncentrációja folyamatosan növekszik a jégkristályok képződése során. Azon a hőmérsékleten, amelyen a védővegyületek koncentrációja elég magassá válik ahhoz, hogy a fagyáspontot a külső hőmérséklettel megegyező szintre csökkentse, megáll a jégképződés. Végül a krioprotektáns koncentrációja eléri azt a szintet, amelyen az oldata már nem tud megfagyni. Ekkor már nem jelentkezik jégképződés a hőmérséklet további csökkenésekor és a megmaradt folyékony fázisú oldatokban megőrződnek a sejtek létfontosságú alkotóelemei.

Az első vizsgálatokat a krioprezerváció biofizikai hatásaival kapcsolatosan Mazur végezte, melyek segítségével optimalizálni próbálta a már meglévő eljárásokat (Mazur 1963). Kísérletei alapján matematikai modellekkel írta le a sejtek vízáteresztő képessége, a hűtési sebesség és a felület-térfogat arány közötti kapcsolatot. Ezeknek, a kriobiológia alapjait jelentő vizsgálatoknak az eredményeként a 70-es évek elején megszületett az első olyan egér, amely fagyasztva tárolt embrióból fejlődött ki (Whittingham et al. 1972).

A kutatások nyomán az elmúlt évtizedekben két alapvető technika terjedt el az emlős ivarsejt és embrió krioprezerváció területén: a hagyományos, lassú fagyasztás (egyensúlyi mélyhűtés) és a vitrifikáció (nem-egyensúlyi mélyhűtés; Ciani et al. 2012). Az ún. lassú fagyasztás során az alacsony hűtési sebesség hatására először a sejtek körüli extracelluláris víz kristályosodik

ki, amely a vizet a sejtből kiszívó ozmotikus áramlást generál, amíg a sejten belüli térben a megnövekedett oldatkoncentráció révén egyensúlyba nem kerül az ozmotikus nyomás. A folyadék sejtthártyán keresztüli mozgásának iránya és sebessége határozza meg a sejten belüli jégképződés arányát és ezáltal a sejt túlélésének esélyét. Optimális fagyási sebesség fennállása esetén egyensúly alakul ki a sejt vízvesztésének és a sejten kívüli víz jéggé alakulásának sebessége között, így a sejten belül nem képződnek jégkristályok (Pegg 2007). Az egyensúlyi mélyhűtési eljárások során általában órákra van szükség ahhoz, hogy a sejtek olyan állapotba kerüljenek, ahonnan már folyékony nitrogénbe helyezve sem alakulnak ki (vagy csak nagyon kisméretű) jégkristályok a sejten belül (Pegg 2007), ezért itt a pontos hűtési sebesség elérése érdekében általában számítógép vezérelte fagyasztó készülékeket használnak.

A lassú fagyasztástól eltérően az ún. vitrifikációs technikával a mélyhűtés jégkristály-mentes környezetben történik, vagyis a lehűtés során a sejten kívül és a sejten belül sem keletkeznek jégkristályok (Pegg 2007). A módszer lényege, hogy a rendkívül gyors hűtési sebesség (500 – 30000°C/perc) miatt nem áll rendelkezésre elég idő ahhoz, hogy a víztartalomból jégkristály képződjön, így a sejt folyadék amorf, üvegszerű formában szilárdul meg, amely már nem károsítja a sejtet. Ebben az esetben nincs szükség programozható fagyasztó készülékekre, mert a sejteket gyakorlatilag közvetlenül folyékony nitrogén hőmérsékletére helyezik (Pegg 2007). Mindkét említett módszer védőanyagokat (krioprotektánsokat) használ, amelyek a mélyhűtés során fellépő sérülésektől védik a sejteket és ezáltal jobb túlélési hatékonyságot tesznek lehetővé (Pegg 2007). Miután a sejtek megfagytak, vagy vitrifikálódtak elméletileg korlátlan ideig tárolhatóvá válnak a -196°C hőmérsékletű folyékony nitrogénben. A hosszú tárolás lehetőségét jól mutatja, hogy kutatók sikeresen termékenyítettek meg szarvasmarha petesejteket 37 évig fagyasztva tárolt bika spermiummal, sőt mi több, a krioprezerváció humán alkalmazási területét nézve egészséges gyermek születését jegyezték fel egy 21 évig fagyasztva tárolt spermiummal történt termékenyítés után (Leibo et al. 1994; Horne et al. 2004). A sejtek életképességének szempontjából szintén kulcsfontosságú tényező a felmelegítés folyamata, mivel ennek optimális sebességen kell végbemennie a sejten belüli nagyméretű jégkristályok kialakulásának elkerüléséhez. A felmelegítést követően újra kell indítani a sejtek anyagcseréjét és biológiai folyamatait a potenciálisan toxikus krioprotektánsok eltávolításával, valamint a fagyasztás során elvesztett víz pótlásával (Ciani et al. 2012).

A kriobiológia tudományága számos olyan biofizikai és biokémiai jelenséget vizsgál manapság, mint például a krioprotektív anyagok hozzáadása, vagy kivonása során fellépő transzmembrán áramlások, intra- és extracelluláris jégképződés, hűtési és felmelegítési sebesség (Ciani et al. 2012). A krioprezervációs technikák hatékonysága számos biológiai tényezőtől is függ,

ilyen például a sejt típusa és mérete, a sejt felületének nagysága, a citoplazma tartalma valamint, hogy egyedi sejt vagy soksejtes szövet kerül fagyasztásra (Saragusty és Arav 2011). Példaként említhető, hogy a nagy citoplazmával rendelkező petesejt mélyhűtése sokkal bonyolultabb a citoplazmával alig rendelkező spermiumhoz képest. A krioprezerváció összetettségéből adódó nehézségeket jól mutatja, hogy embriók esetében az első sikerekre Polge eredményei után még további két évtizedet kellett várni (Whittingham 1971; Whittingham et al. 1972; Wilmut 1972), mitöbb, a fagyasztva tárolt petesejtek felhasználásával előállított első egerek megszületésére 1977-ben (Whittingham 1977) került sor. Részben technikai, részben pedig etikai okokra vezethető vissza, hogy emberek esetében az első ilyen sikeres terhességről csak 1986-ban számolhattak be (Chen 1986).

2.2. Az emlős ivarsejt és embrió krioprezerváció korlátai

2.2.1. A fagyasztás okozta stressz a sejtekben

A mélyhűtés során a sejt sérüléseinek kiváltó oka a víz ún. tisztulásának a folyamata. A víz a jégkristály képződés során tiszta formában fagy meg, minden további komponens nélkül. Tehát a sejtben található víz a fagyás során nem marad meg az életfolyamatokhoz szükséges anyagokat tartalmazó oldatként, hanem kristályokat növeszt, miközben minden más anyagot „kilök” magából. Mivel először az extracelluláris térben indul meg a jégképződés, így először a vizet a sejtből kiszívó ozmotikus áramlás alakul ki (Lovelock 1954). Ez a stresszhatás károsítja például a sejtmembránt és a sejtorganelumokat is (Mazur 2004). A továbbiakban a csökkenő hőmérséklet jégképződéshez vezethet a sejten belül is, amely tovább roncsolja a membránt és az organelumokat (Luyet és Gehenio 1940; Leibo et al. 1978). Az elsődleges károsító hatást tehát az így kialakuló mechanikus sérülések jelentik, melyek a sejt alkotó elemeit fizikailag sértik. Jelentős sérüléseket okozhat még a jégkristályok között megmaradó folyékony vízben koncentrált oldatok és elektrolitok kémiai és ozmotikus hatása is (Lovelock 1953). Ezek a hatások gyakran együttesen jelentkeznek, és oly mértékben károsíthatják a sejteket, hogy ez végül a pusztulásukhoz vezethet. Ezért a megfagyás előtt célszerű a sejtben a számára veszélyes mennyiségű folyadékot eltávolítani és megfelelő adalékanyagok alkalmazásával csökkenteni azt a hőmérsékletet, amelyen a jégkristályok képződnek (Fuller 2004).

2.2.2. Ondómélyhűtés

Habár a vitrifikációs technikák elterjedése és folyamatos fejlődése egyre több emlősfajnál tette lehetővé a petesejt és embrió mélyhűtést, a legtöbb faj esetében még mindig csak az ondómélyhűtés az egyetlen megbízhatóan működő krioprezervációs módszer (Ciani et al. 2012).

A funkciójából eredően a spermium sikeres mélyhűtéséhez nem csak működésbeni de szerkezeti épségét is meg kell őrizni úgy, hogy az a felolvasztás után is alkalmas legyen *in vivo* és *in vitro* megtermékenyítésre. Csakhogy a fagyasztás és kiolvasztás során a jelentős sérülések mellett néhány nem túl nyilvánvaló károsodás is teljesen tönkretelheti a hímivarsejt termékenyítő képességét. A termékenyítéshez a hímivarsejtnak ugyanis nem csak működőképes flagellumra van szüksége, hanem például megfelelő membrán felületre ahhoz, hogy elkerülje a fagociták támadását, vagy a hámsejtekhez való végleges kikötődést. A továbbiakban a termékenyítéshez szükséges még, hogy a spermium kötődjön a *zona pellucidához* és ott elindítsa az akroszóma reakciót (Walters et al. 2009). Ez azt jelenti, hogy az ondósejt plazma- és a külső akroszóma-membránjának (azon fajokban, ahol ez létezik) is sértetlennek kell maradnia a krioprezerváció folyamata során. Ezen finom paraméterek jelentőségét jól mutatja, hogy a szarvasmarhánál a frisshez hasonló termékenyítő képességet csak körülbelül tízszer annyi fagyasztott spermiummal lehetett elérni (Shannon 1978; Vishwanath et al. 1996).

A különböző alkotórészek, úgymint a feji rész, a nyaki rész és a flagellum máshogyan reagálnak a fagyasztás okozta stresszre. Olyan esetekben például, amikor a hímivarsejt motilitása még megőrizhető, az ozmotikus stressz az akroszómát már visszafordíthatatlanul is károsíthatja (Willoughby et al. 1996; Agca et al. 2002; Guthrie et al. 2002). A fagyasztás során jelentkező megváltozott ozmotikus állapot a hímivarsejteknel is a víz kiáramlása miatt bekövetkező térfogatvesztéssel jár (Meyers 2005). Általánosságban elmondható, hogy az így kialakuló mechanikai stresszel szemben jelentős az emlős spermium ellenállóképessége (Willoughby et al. 1996; Songsasen és Leibo 1997; Agca et al. 2002), habár az ozmotikus tolerancia mértékét számos tényező együttesen határozza meg. Ilyenek a membrán permeabilitása, a plazmamembrán lipid összetétele és a citoskeleton szerkezete (Meyers 2005). A hímivarsejt plazmamembránja különálló területekre osztható (Friend 1984), és különleges elrendezésben tartalmaz lipideket (Lin et al. 1993; Parks et al. 1987). Spermium viszont nem képes a lipid tartalmának átstrukturálására, ezért így nem tud a fagyasztás okozta körülményekhez alkalmazkodni (Holt 2000). A sertés spermium például rendkívül érzékeny az oxidatív sérülésekre a magas telítetlen foszfolipid és az alacsony antioxidáns tartalma miatt (Cerolini et al. 2000; Brezezinska-Slembodzinska et al. 1995).

Előfordulhat, hogy a különböző stresszhatások miatt az ondó oly mértékben károsodik, hogy már nem lehetséges az *in vivo* megtermékenyítés. Ilyen esetekben *in vitro* fertilizáció (IVF) segítségével még megoldhatóvá válhat a termékenyítés, különösen akkor, ha a humán gyakorlatban rendkívül elterjedt intracitoplazmatikus spermium injektálást (ICSI; Palermo et al. 1992) használják. Ennek során akár motilitásában teljesen gátolt, erősen sérült sejtmembránú spermiumot is injektálhatunk a petesejtbe, előidézve ezzel a megtermékenyülést, és mivel ez egy viszonylag hatékony mikromanipulációs módszer, csak nagyon kevés hímivarsejtre van szükség (Walters et al. 2009). Habár napjainkban az ondómélyhűtésnél már optimalizált protokollokat használnak, még így is a spermiumok 40–50%-a elpusztul a fagyasztás okozta sérülések miatt (Isachenko 2003). A veszteség mértéke mutatja, hogy az előzőekben felsorolt tényezők valóban jelentősen befolyásolják az ondómélyhűtés hatékonyságát és további optimalizálási lépésekre lenne szükség a károsodások csökkentéséhez.

2.2.3. Petesejt mélyhűtés

A humán mesterséges megtermékenyítés területén 2009-ig mélyhűtött petesejtek felhasználásával csak mintegy 900 élve születésről számoltak be (Noyes et al. 2009), de az azóta eltelt időben a petesejt vitrifikálás bevezetésével a terület robbanásszerűen fejlődött és számos országban sok tízezres petesejt bankok alakultak ki. Az elmúlt években a labor- és gazdasági használatokban a biotechnológia tudományterületén jelentősen felértékelődött a petesejt szerepe az olyan újításoknak köszönhetően, mint a transzgénikus technológiák vagy a sejtmagátültetési klónozás (Dinnyés et al. 2002; Wilmut et al. 2002). Az emlős petesejt a mérete szempontjából jelentős eltérést mutat a spermiumhoz, vagy az embriók sejtjeihez képest. Átmérője az egérnél 80 μm , a szarvasmarhánál 100 μm , az embernél 130 μm , így a térfogata több tízezerszerese a hímivarsejt méretének. Ez jelentősen megkönnyíti egyedi manipulálhatóságát, azonban a mélyhűtés szempontjából hátrányt jelent az alacsony felület-térfogat aránya (Critser et al. 1997). A humán petesejt felület-térfogat aránya 0,05, míg a spermium esetében ez az érték 4,3. A kedvezőtlen arány miatt, a petesejtnek jelentősen kisebb a hővezetése, így sokkal érzékenyebb a fagyasztásra, valamint a sejten belüli jégképződésre is (Toner et al. 1990; Ruffing et al. 1993; Dinnyés et al. 2007). Nehézségeket okoz továbbá, hogy az érett (metafázis II állapotú) petesejtek plazma membránja alacsony permeabilitással rendelkezik, ezért a krioprotektáns anyagok és a víz lassabban képesek átjutni rajta (Ruffing et al. 1993). További gátat jelent ezen anyagok mozgásának a petesejtet körbevevő *zona pellucida*, amely egy specializált, átlagosan 10 μm vastagságú extracelluláris

mátrix réteg (Betteridge 1995). A fagyasztás és kiolvasztás folyamata során a *zona pellucida* megkeményedése is bekövetkezhet. Az ún. „zona hardening” után a hímivarsejtek már nem képesek a petesejtbe behatolni (a megtermékenyülés utáni természetes, polispermiát gátló folyamat idő előtti bekövetkeztéről van szó) és ezért a spermiumot a megtermékenyítéshez mesterségesen, például ICSI technikával lehet csak bejuttatni (Schalkoff et al. 1989; Matson et al. 1997; Palermo et al. 1992). A petesejtek fagyérzékenységét tovább növeli, hogy a membránjukat viszonylag kevés aktin-filamentum erősíti (Gook et al. 1993), és magas citoplazmatikus lipid tartalmuk is hátrányt jelent (Ruffing et al. 1993). Számos tanulmány bizonyítja az összefüggést a sejtek magas lipidtartalma és a fagyasztás utáni alacsony túlélési arányuk között (Abe et al. 2002a; Seidel 2006; Sturmey et al. 2009), amelynek hátterében a fagyasztás hatására a lipidekben bekövetkező fizikai változások állnak (Pereira és Marques 2008). A peteérés stádiuma is fontos tényező, mert az éretlen petesejt az érettnél is érzékenyebb a fagyasztásra (Lim et al. 1992; Rojas et al. 2004), viszont az metafázis II (MII) során formálódó meiotikus orsó is jelentős sérüléseket szenvedhet el a fagyasztás folyamán (Ciotti et al. 2009). A megtermékenyítés során a petesejt rendkívüli átalakuláson megy át, melynek következtében a felsorolt körülmények legtöbbje előnyösen változik a fagytolerancia szempontjából, így az embriók már jobban elviselik a fagyasztás okozta stresszt (Gook et al. 1993).

2.2.4. Embrió mélyhűtés

Az ivarsejtekhez hasonlóan, az embriók mélyhűtése szintén komoly morfológiai és funkcionális károsodásokkal járhat, azonban összetettségükből adódóan számos új, a gamétáknál még nem jelenlevő tényező is erősen befolyásolja a fagyasztás sikerességét. Először is nagy jelentőséggel bír, hogy a lefagyasztott embrió *in vivo* vagy *in vitro* előállítású-e, ugyanis több tanulmány eredménye is azt mutatja, hogy kevesebb *in vitro* létrehozott embrió éli túl a fagyasztást, mint *in vivo* gyűjtött társaik (Massip et al. 1995; Hasler et al. 1995; Fair et al. 2001; Enright et al. 2000; Martinez et al. 2006). Az *in vitro* létrehozott embriók leginkább a megemelkedett és megváltozott összetételű lipid tartalmuk miatt válhatnak érzékenyebbé a hidegsokra (Leibo és Loskuto 1993; Massip et al. 1995; Nedambale et al. 2004), amely a nem megfelelő *in vitro* tenyésztési körülményekre vezethető vissza (Iwasaki et al. 1990; Greve et al. 1993; Leibo és Loskuto 1993; Fair et al. 2001). Ezt az is bizonyítja, hogy amikor centrifugálással csökkentették az *in vitro* embriók lipidtartalmát, azok jobb ellenállóságot mutattak a fagyás okozta sérülésekkel szemben (Leibo et al. 1995).

Jelentős különbségeket mutatnak mélyhűtési tolerancia szempontjából a különböző fejlődési stádiumú embriók is. A több évtizedes kutatások eredményeként napjainkban egyre több információ áll rendelkezésre arról, hogy a különböző fejlődési állapotban lévő embriók hogyan reagálnak a fagyasztásra. A hólyagsíra állapotú embriók számos fajban hasonlóan jól fagyaszthatóak hagyományos lassú fagyasztással, mint vitrifikációval ezért gyakran ilyen stádiumú embriókat tárolnak hosszú távon (Massip 2001). Szarvasmarhákön végzett kutatások a szedercsíra, vagy hólyagsíra állapotú embriók jobb túlélési arányát mutatták a korábbi fázisban lefagyasztott embriókhoz képest, és a legellenállóbbnak a 7 napos kibújt blasztociszta bizonyult (Han et al. 1994; Hasler et al. 1997; Sommerfeld és Niemann 1999). A sertésnél szintén a kibújt hólyagsíra embriók rendelkeztek a legjobb túlélési aránnyal a többi embrionális stádiumhoz képest (Gajda és Smorag 2000). A lovak esetében pedig jobban ellenállnak a fagyasztás okozta sérüléseknek a kisebb méretű 6 napos blasztociszták, mint a nagyobb 7 naposak (Hochi et al. 1995). Nemrégiben közölt eredmények alapján, az embernél az 5 és a 6 napos blasztociszta a legalkalmasabb állapot a fagyasztásra (Liebermann 2009). A korai embriókhoz képest a blasztociszta általános előnye több okra is visszavezethető. Egyrészt a morula állapottól a sejt lipid tartalma jelentősen csökkenni kezd (Romek et al. 2009), másrészt a nagyobb sejtszáma miatt a blasztociszta rugalmasabban tud alkalmazkodni a mélyhűtés okozta stresszhez. Ráadásul a blasztomérák (az embriókat felépítő sejtek) citoplazmatikus térfogata is alacsonyabb a megelőző állapotokhoz képest, ami miatt kevésbé kitéttek a fagyasztás okozta sérüléseknek (Liebermann 2009).

Egy további befolyásoló tényezőt, amely a fajok közötti különbségeket vizsgálva látható, hogy amíg például az embernél, a szarvasmarhánál, a juhnál és az egérnél nagy sikerrel alkalmazható az embriómélyhűtés technikáját, addig számos más faj esetében jelentős problémákkal kell szembenézni (Saragusty és Arav 2011). Ráadásul, az egy fajon belüli különböző genotípusoknak is jelentős hatása lehet a mélyhűtés hatékonyságára (Dinnyés et al. 1995). A fajok közötti különbségek a sejtméretben, az összetételben és szerkezetben keresendők. A sertések jól ismert érzékenysége például a blasztomérákban mért magas lipid tartalomra vezethető vissza (Dobrinsky 2001), amely a humán és egér embriókra viszont nem jellemző. Napjainkig mindössze 40 fajnál (beleértve az embert és a laboratóriumi állatokat) sikerült embriókat fagyasztással megőrizni (Saragusty és Arav 2011). Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy a krioprezerváció alkalmazhatóságának másik, igen lényeges korlátja egy-egy faj szaporodásbiológiai paramétereinek nem kielégítő ismerete, illetve az ivartermékek és embriók elérhetőségének nehézségében rejlik. Az ivarsejt és embriómélyhűtés hatékonyságának növeléséhez a továbbiakban olyan új eljárások fejlesztésére van szükség, amelyek figyelembe veszik és kiküszöbölik az előzőekben feltárt korlátokat, egyben egy újabb lépést téve a technika biológiai hátterének pontos tisztázása felé is.

2.3. A krioprezerváció hatékonyságát növelő módszerek

Az elmúlt évek során jelentős erőfeszítések történtek a fagyasztási eljárások hatékonyságának növelésére és számos olyan új technika látott napvilágot, amely több-kevesebb sikerrel megpróbálta csökkenteni a kiolvasztás utáni veszteségeket. A módszerek nagyobb része azokból a megfigyelésekből indult ki, hogy a különböző reproduktív sejtek és embriók eltérő mértékben tolerálják a fagyasztás okozta stresszhatást. A stressztoleranciát befolyásoló biológiai tényezőket vizsgálva számos olyan új eljárást dolgoztak ki, amely a fagyasztandó sejteket minél inkább közelíteni igyekszik egyfajta optimális fagyűrő képességhez.

A petesejtek és embriók intracelluláris lipidtartalma szoros összefüggésben áll a minőségükkel és a fagyűrő képességükkel. A sejtekben elkülönülten tárolt lipid cseppek szerkezetében a rendkívül alacsony hőmérséklet hatására bekövetkező fizikai változások nagymértékben felelősek a sejtek fagyási sérüléseiért (Pereira és Marques 2008). Emellett, az organelumokat körülvevő- valamint a plazmamembránban található lipidtartalom is befolyásolja egy adott sejt fagytoleranciáját (Saragusty és Arav 2011). A lipid cseppek centrifugálással való polarizációja bevált módszernek számít a sertés zigóták pronukleuszainak megjelenítésekor. Az ily módon egy helyre csoportosított lipid cseppeket mechanikusan el lehet távolítani az embriókból, ezáltal növelhető a kriotoleranciájuk. Nagashima és munkatársai a nagy sebességű centrifugálás (> 10000 g) és a mikromanipulálás módszerének kombinálásával az elsők között távolították el a sertés zigóták lipidtartalmát (1994) és azt találták, hogy a csökkentett lipid-tartalmú embriók jobban tolerálták a fagyasztás folyamatát, mint a kontroll embriók. További vizsgálatok pedig megmutatták, hogy azok a sertés morulák és blasztociszták, amelyekből a fenti módon a lipidtartalmat kivonták, sokkal jobb túlélési aránnyal rendelkeztek a nem kezelt embriókhoz képest (Dobrinsky 1999). Szarvasmarhák esetében is értek már el sikereket ezzel a módszerrel. A delipidáción átesett, majd 8 és 16 sejtes állapotig tenyésztett embriók fagyasztás utáni fejlődési aránya magasabb volt a kontrollhoz képest (Ushijima et al. 1999).

A mikromanipulációs lipideltávolítás alternatívájaként nemrégiben egy olyan új módszert publikáltak, amely a *zona pellucida* részleges, enzimkezeléssel végzett, ún. emésztése révén teszi lehetővé a lipidtartalom elkülönítését a centrifugálás folyamán. Ezt a módszert már sikerrel alkalmazták *in vitro* előállított sertés szedercsíra (Esaki et al. 2004), petesejt (Du et al. 2006) és klónozott hólyagszíra embriók esetében is (Nakayama et al. 2008). Ráadásul ez a módszer megoldást jelent a mikrosebészeti lipideltávolítás legnagyobb problémájára, ugyanis a lecsökkent időigénye miatt, egyszerre nagy mennyiségű embrió feldolgozását is lehetővé teszi az embriók sérülése nélkül (Li et al. 2008).

Szintén alkalmazható eljárásnak számít a kémiai módszerrel végzett lipid-tartalom csökkentés. Megfigyelték, hogy a zsírsav szintézist gátló fenazin-etoszulfát (PES; Sudano et al. 2011) hozzáadása mellett *in vitro* tenyésztett szarvasmarha embriók kisebb mennyiségben tartalmaztak lipid cseppeket (Barcelo-Fimbres és Seidel 2007a), amely azonban még így is magasabb volt az *in vivo* embriókban található mennyiségnél (Seidel 2006; De La Torre-Sanchez et al. 2006). Az így lecsökkent lipiddtartalom mellett a lassú fagyasztás és a vitrifikáció esetében is nőtt az embriók mélyhűtési toleranciája (Barcelo-Fimbres és Seidel 2007b).

A petesejt, vagy embrió lipid tartalmát a tenyésztési körülmények is befolyásolják, és a felhalmozódásának egyik lehetséges oka a szérum jelenléte a médiumban (Pugh et al. 1998). Többen az FCS (fetal calf serum) hozzáadása mellett tenyésztett szarvasmarha embriókban megemelkedett lipid tartalomról számoltak be, amelynek hátterében valószínűleg a nagyobb mennyiségű lipid felvétel, illetve a mitokondrium anyagcseréjében fellépő zavar állhat (Dinnyés et al. 1996). Ezzel összhangban szérumentes rendszerben tenyésztett szarvasmarha embrióknál a lipid tartalom relatív csökkenése volt megfigyelhető, és ezáltal javult az embriók kriotoleranciája is (Abe et al. 2002a, Pereira et al. 2007). Juhok esetében szérumentes tenyésztőközeg alkalmazásával szintén jelentősen javítani lehetett a zigóták osztódási rátáját és a blasztociszta állapotig történő fejlődési képességét (Gardner et al. 1994).

A fagyasztás folyamata során a citoszkeleton többféle módon sérülhet. Gyakori károsodás például a petesejtekben a szabálytalan osztódási orsó, amely főként a meiotikus mikrotubulusok hibás „összeszerelése” miatt alakul ki (Pereira és Marques 2008). Emellett a sejtvázs károsodása kromoszómális rendellenességeket vagy a plazmamembrán törését is okozhatja. Éppen ezért a citoszkeleton fagyasztás előtti megerősítése szintén hozzájárulhat a reproduktív sejtek és embriók fagyasztás utáni jobb túléléséhez (Jiménez-Trigos et al. 2013). A Taxol a sejtvázs stabilizálásával fejti ki jótékony hatását. Jellemzője, hogy hozzákapszódik a mikrotubulusokhoz és csökkenti a tubulinok összeszereléséhez szükséges kritikus koncentrációt, ezáltal növeli a polimerizációjuk mértékét (Mailhes et al. 1999; Sun et al. 2001). Taxolt adva a vitrifikációs közeghez sikerült növelni humán (Fuchinoue et al. 2004), sertés (Shi et al. 2006) és szarvasmarha (Morato et al. 2008a) petesejtek túlélési arányát. Az utóbbiak elektronmikroszkópos vizsgálatakor megállapították, hogy a taxol képes megvédeni a metafázis során az egyenlítői síkba rendeződött kromoszómákat, valamint az osztódási orsó szerkezetét a vitrifikáció közben jelentkező hideg sokktól (Morato et al. 2008b).

A fagyasztás során az ivarsejteket és embriókat jelentősen fenyegető veszély az oxidatív sérülés. Az oxidatív stressz a sejt számos pontján okozhat károkat, például a foszfolipidek peroxidációjával, a fehérjék roncsolásával, vagy a DNS szálakban előidézett törésekkel (Johnson et al. 1994; Kitagawaa et al. 2004). Az embriótenyésztésnél az oxidatív sérülések kiküszöbölésére

gyakran adnak a médiumhoz β -merkapotoetanolt. Ez a vegyület fokozza az endogén antioxidánsok (például a glutation; GSH) termelődését (Caamano et al. 1998; Geshi et al. 1999; Mori et al. 2006). A GSH közvetlenül is hozzáadható a vitrifikáció előtti tenyésztőközeghez, így eger embrióknál ezáltal növelni lehetett a blasztociszta stádiumig való fejlődés arányát a kiolvasztás után. A kedvező hatás feltételezhetően abból eredt, hogy a GSH csökkentette a reaktív oxigéngyökök szintjét, és így a sejtmembrán telítetlen lipidjeinek oxidációjából eredő sérüléseket is meggátolta (Aksoy et al. 1999).

A fentiekben bemutatott módszerek ígéretesek ugyan, de közülük jelenleg még egyik sem alkalmazható a krioprotektánsokhoz hasonlóan standardizáltan, hatékonyan és általánosan. A felvázolt technikák jelentősége véleményem szerint, hogy segítenek a krioprezerváció során bekövetkező biológiai változások pontosabb megértésében és így hosszútávon hozzájárulhatnak az ivarsejt és embriómélyhűtési technikák további tökéletesítéséhez.

2.4. A magas hidrosztatikus nyomáskezelés - egy alapvetően új megközelítés a sejtek fagytoleranciájának növelésére

Munkám során egy olyan új módszer biológiai alapjait vizsgáltam, amely magas hidrosztatikus nyomás (HHP) alkalmazásával, a sejteket prekondicionálva segíti a további stresszhatások elleni védekezésüket. A módszer, amelyet a Szent István Egyetem, Állatorvos-Tudományi Kar, Szülészeti és Szaporodásbiológiai tanszékén Dr. Pribenszky Csaba és munkatársai dolgoztak ki (2005a), az élelmiszeriparban már évtizedek óta sterilizálásra alkalmazott technikával kapcsolatos megfigyeléseken alapszik. A magas nyomáskezelést az élelmiszertechnológiában több mint egy évszázada, Hite felfedezése óta használják, miszerint ezzel a módszerrel növelni lehet a tehéntej eltarthatóságát (Hite 1899). A HHP egy olyan nem-hőmérséklet alapú pasztörizációs módszer, amellyel lehetséges az ételekben található mikroorganizmusok inaktíválása. A technikát leggyakrabban a 600 MPa körüli nyomástartományban alkalmazzák, 1-15 percig, 40°C alatt (Barbosa-Cánovas és Juliano 2008), de néhány készülékkel akár az 1400 MPa nyomásérték is elérhető (Fernandes 2012). A többi tartósítási eljárással szemben e módszer előnye abban rejlik, hogy úgy tudja jelentősen csökkenteni az élelmiszerekben előforduló kórokozók számát, hogy közben az ételek eredeti frissessége, színe és íze is megmarad. További lényeges előny, hogy a HHP azonnal és egységesen hat mindenhol, függetlenül az élelmiszer méretétől, alakjától és összetevőitől (Butz és Tauscher 2002). A módszer folyamatos fejlesztésének eredményeként napjainkban már elterjedten használják számos élelmiszerfajta pasztörizálására.

Az asszisztált reprodukciós eljárások területén, beleértve a krioprezervációs technikákat is, tradicionálisan mindig védekező szemlélettel próbálták növelni az egyes módszerek hatékonyságát. Következésképp megpróbálták az optimális *in vivo* körülményekhez minél inkább közelítő környezetet létrehozni a beavatkozások során és minél jobban kielégíteni a sejtek elméletileg fennálló fiziológiai szükségleteit például a megfelelő hőmérséklet, pH és médium összetevők kiválasztásával és alkalmazásával. A passzív módszereken felül az előző fejezetben felsorolt kísérleti fázisban lévő eljárások is a sejtek egyfajta optimális állapotának biztosítását célozzák meg úgy, hogy az érzékenységüket próbálják csökkenteni vagy a védekezőképességüket segíteni. A HHP-technika ezektől a módszerektől alapvetően eltérő megközelítéssel, egy pontosan beállított stressz-kezeléssel egy védekezési folyamatot indít el az emlős sejtekben és ezáltal éri el a jobb hatékonyságot (Pribenszky et al. 2010a). Az emlős sejtek stressz-kezelésének gondolatához egy meglepő élelmiszer mikrobiológiai felfedezés vezetett. Amikor egy kísérlet során olyan *Listeria monocytogenes* baktériumokat kezeltek magas hidrosztatikus nyomással, amelyeket ezt megelőzően hideg-sokkban (10°C, 4 óra) részesítettek, meglepő módon, 100-szor magasabb volt a túlélési arányuk a nyomáskezelés előtt 37°C-on tartott kontrollhoz képest (Wemekamp-Kamphuis 2002). Ezzel összhangban élesztőben magas hőmérséklet által indukált barotoleranciát figyeltek meg (Iwahashi et al. 1991), amit a későbbiekben hideg-sokkal is el tudtak érni (Palhano et al. 2004). A kutatók a nem várt hatást azzal magyarázták, hogy az első, szubletális stressz kezelés valamilyen módon felkészíthette a mikroorganizmusokat a következő stressz káros hatásainak kivédésére. Ezek a megfigyelések hívták fel a figyelmet a szubletális stressz esetleges védő hatására, amely alapján megkezdődtek az első, asszisztált reprodukciós eljárások területére is kiterjedő kísérletek (Pribenszky et al. 2010a). Az ivarsejt és embriómélyhűtés korábban részletesen ismertetett nehézségei miatt nagy szükség van a krioprezervációs technikák hatékonyságának növelésére, de emellett számos olyan *in vitro* eljárás, mint például a sejtmagátültetési klónozás is hatékonyságjavításra szorul. Pribenszky és munkatársai azért a magas hidrosztatikus nyomáskezelést választották kísérleteik során prekondicionáló stressz tényezőnek, mert számos előnnyel rendelkezik bármilyen más stresszorhoz képest. Ezek az előnyök, hogy a HHP (i) azonnal és egységesen hat a minta minden pontján, (ii) nincs jelen bejutási probléma és nem jellemző a gradiens-jelenség sem, (iii) nagy pontossággal, megbízhatósággal és biztonsággal alkalmazható (iv) különlegesen nagy tartományon belül alkalmas terápiás célra, valamint (v) minimális vagy egyáltalán nem kimutatható a kezelt sejtek közötti variancia (Pribenszky et al. 2010a, Pribenszky és Vajta 2011; Pribenszky et al. 2012). Összefoglalva, ez a kezelés a hagyományos környezeti stresszhatásoktól eltérően könnyedén és nagyon pontosan programozható, valamint egyszerűen és megbízhatóan megismételhető, tehát standardizálható.

2.4.1. A hidrosztatikai (hidrosztatikus) nyomás jellemzése

Az alábbiakban röviden ismertetem a hidrosztatikai nyomás meghatározását és a fontosabb fizikai paramétereit, amellyel bepillantást nyerhetünk e hatás működési mechanizmusába. Az egységnyi felületre ható nyomóerőt nyomásnak nevezzük. A felületre merőleges nyomóerő és a nyomott felület hányadosa megadja, hogy egységnyi felületre mekkora erő hat.

A nyomás jele: p

A nyomás szabványos SI-mértékegysége a pascal (Pa). $\text{Pa} = \text{N/m}^2$

A nehézségi erő hatása alatt álló, összenyomhatatlan folyadékban, a felszíntől mérve a nyomás a mélységgel lineárisan növekszik. A hidrosztatikai nyomás a folyadék súlyából származik, és mértéke egyenlő a folyadék sűrűségének, a folyadékoszlop magasságának és a gravitációs gyorsulásnak a szorzatával. Ha a folyadék felszínén nem hat külső felületi erő, akkor egy adott helyen a hidrosztatikai nyomást a következő képlettel fejezhetjük ki:

$$p_h = \rho \times g \times h$$

ahol

ρ = a folyadék sűrűsége (kg/m^3)

g = gravitációs gyorsulás (állandó értéke $g = 9,81 \text{ N/kg}$)

h = folyadékoszlop magassága (m)

Azonban ha a folyadékra külső felületi erő hat, az így létrehozott nyomás a folyadékban minden irányban gyengítetlenül terjed tovább a folyadékok összenyomhatatlansága miatt (Pascal 1647). Mivel a folyadékok sűrűsége állandó, ezért egy meghatározott mélységnek megfelelő hidrosztatikai nyomás értéke minden irányban ugyanakkora, tehát izosztatikusan, minden oldalról egyenletesen hat. Ezek alapján a magas hidrosztatikus nyomás tökéletes közeg egy pontosan meghatározott stressz azonnali és egységes közvetítéséhez a kezelt sejtek számára.

További fontos tényező, amelyre a nyomáskezelő készülékek kidolgozása során ügyelni kellett, hogy a nyomáskezelés folyamán a kompressziós melegedés hatására emelkedik a hőmérséklet a nyomásátadásra használt és a kezelt anyagban egyaránt. A hőmérsékletváltozás mértéke nem csak a nyomás erejétől (P) és a kiindulási hőmérséklettől (T) függ, hanem az alábbi egyenletben leírt termodinamikai tulajdonságoktól is:

$$\frac{dT}{dP} = \frac{\alpha \times T \times v}{C_p}$$

ahol

C_p a hőkapacitás

v a specifikus térfogat

α a hőtágulási együttható

Ebből következően a nyomáskezelés során a nyomásváltoztatással egyidejűleg szükséges a hőmérséklet megfelelő kontrollálása is, amely a kísérleteinkben alkalmazott HHP-100 készülékben számítógép vezérléssel történik meg (9.2. melléklet).

2.4.2. A magas hidrosztatikus nyomáskezelés hatása a sejtműködésre

A magas hidrosztatikus nyomás hatását leíró adatok nagy része mikroorganizmusok vizsgálatából származik. Ennek oka egyfelől, hogy a földi élet jelentős hányada az atmoszféricusnál (0,1 MPa) magasabb nyomáson, mélytengeri körülmények között található (Fang et al. 2010). Az óceánban lefele haladva a nyomás 100 méterenként átlagosan 1 MPa-al növekszik, így 1000 m mélyen eléri a 10 MPa-t. A térfogatukat nézve a Föld óceánjainak 75%-a 1 km mélység alatt található és becslések szerint ez a terület a globális bioszféra mintegy 62%-ának ad otthont. Mint ahogy ez a meglepően magas szám is mutatja, a mélytengerben meglehetősen gazdag mikrobiális élet található, annak ellenére, hogy itt szegényesek a táplálékforrások és a hőmérséklet sem emelkedik 2-3°C fölé (Fang et al. 2010). Az elmúlt évtizedekben a barofil (azaz a magas nyomást kedvelő) mikroorganizmusok tanulmányozása során született eredmények lehetővé tették a HHP sejtekre kifejtett hatásának jobb megértését. Egy kisebb szintű nyomásváltozást minden élő sejtnak el kell viselnie, azonban több 10 MPa-t elérő változásokhoz csak a mélytengeri organizmusok alkalmazkodtak. Ebből kiindulva kezdték el használni a magas hidrosztatikus nyomáskezelést élelmiszerek tartósítására Hite felfedezése (1899) óta, mert így lehetővé vált a patogén mikrobák inaktiválása az élelmiszerekben. A gyakorlatban alkalmazott HHP-kezelés elterjedésének köszönhetően széleskörűen kezdték el vizsgálni mikrobákban ennek a stresszhatásnak a következményeit. A mélytengeri körülmények és a nyomással-tartósító eljárások beállításai miatt a legtöbb esetben 20 MPa-nál magasabb nyomás hatásait vizsgálták a kutatások (Follonier et al. 2012).

Attól függetlenül, hogy a nyomás egyszerűen csak az adott biológiai rendszer térfogatát változtatja meg, ennek szerteágazó következményei vannak a különböző sejtfolyamatokra. Ennek ellenére elmondható, hogy mind a bakteriális és archeális barofilek nagy része közeli rokonságban áll olyan felszíni mikroorganizmusokkal, amelyek nem rendelkeznek jelentősebb nyomástoleranciával. Ez a tény azt mutatja, hogy a magas nyomás-alapú adaptáció kialakulásához nem kellett drámai mértékű evolúciós változásoknak bekövetkezniük (Bartlett 2002). A sejtalkotórészek közül a duplaszálú DNS a legellenállóbb a magas nyomással szemben, a két szálát stabilizáló hidrogén-híd kötéseknek köszönhetően. Hozzá kell azonban tenni, hogy a transzkripciót vagy replikációt lehetővé tevő egyszálú DNS már nem rendelkezik ilyen védelemmel, így jóval könnyebben károsodik a nyomás emelkedésekor (Macgregor 2002). A foszfolipid membránok a sejtalkotórészek közül az egyik legérzékenyebbek. Esetükben a nyomás a hidegsokkal megegyező eredményekkel jár, így az acil-láncok tömörödésével és a membránok fázisváltásával, amely során a folyadékkristályos állapotból gél állapotba mennek át (Weber és Drickamer 1983; Winter és Jeworrek, 2009). A membrán szétesése végül 100 és 200 MPa között következik be (Pagán és Mackey 2000). A mélytengeri mikroorganizmusok az ilyen károsodások ellen úgy védekeznek, hogy membránjuk sokkal nagyobb arányban tartalmaz telítetlen zsírsavakat, melyek magas nyomáson is biztosítják a membránok fluiditását (DeLong és Yayanos 1985; Yano et al. 1997). A fehérjék szintén meglehetősen érzékenyek a magas nyomásra, különösen az összetett fehérjék, ugyanis az őket felépítő polipeptid láncok gyenge kötésekkel kapcsolódnak. A negyedleges és részben a harmadlagos szerkezet disszociációja 200-300 MPa között történik meg. Az így szétváló peptidek megőrzik a másodlagos szerkezetüket és „olvadt gombóc”-szerű szerkezetet vesznek fel. (Meersman és Heremans 2008).

Az *E. coli* és más mezofil baktériumok is képesek folyamatosan növekedni egészen 50 MPa nyomásig (ZoBell és Johnson 1949) ami azt mutatja, hogy ezekben a szervezetekben a létfontosságú sejtfolyamatok még működőképesek ilyenkor. Túl magas nyomáson a sejtnövekedés leállítását általában a fehérje alapú rendszerek disszociációja, vagy konformációjának megváltozása okozza. Mintegy 70 MPa elérésekor *E. coli*-ban megáll a fehérje szintézis a riboszómák szétesése miatt (Gross et al. 1993; Schulz et al. 1976). Fontos azonban megjegyezni, hogy a szétesés 100 MPa alatt majdnem tökéletesen visszafordítható és normális nyomásértékre visszatérve a fehérjeszintézis újraindul (Mackey és Mañas 2008). Az RNS polimeráz enzim a riboszómáknál nagyobb toleranciával rendelkezik, így *E. coli*-ban csak 140 MPa körül esik szét az alegységeire. Ettől függetlenül már 20 MPa nyomás hatással van a transzkripció folyamatára és 80 MPa már teljes gátlást okoz, valószínűleg a bekövetkező konformációs változások miatt (Yayanos és Pollard 1969). A transzkripció folyamatánál a DNS szintézis és a kromoszóma replikáció jóval érzékenyebb a

magas nyomásra. *E. coli*-ban a replikáció már 50 MPa-nál gátlódik (Yayanos és Pollard 1969). Ez azzal magyarázható, hogy habár a kétszálú DNS stabilitása önmagában nagy, duplaszálú töréseket okozhatnak rajta a nyomás hatására aktiválódó endonukleázok, így megváltozhat a metilációs mintázatuk és egyes genetikai elemek is mobilizálódhatnak (Chilton et al. 1997; Long et al. 2006; Lin et al. 2006). Jól ismert jelenség továbbá a baktériumok motilitásának elvesztése, amely *E. coli*-ban már 10 MPa-on bekövetkezik a flagellum vagy a sejtmembrán károsodásának következtében (Meganathan és Marquis 1973). Számos mezofil baktérium a magas nyomáson történő tenyésztés során szálas alakúvá válik, amely jelzi, hogy az osztódás megállt, de a sejtek növekedésre még képesek. Ebből arra következtethetünk, hogy ezekben a mikroorganizmusokban a sejtosztódás folyamata a növekedésnél jóval érzékenyebb a HHP okozta stresszre (ZoBell és Cobet 1950; 1963).

2.4.3. A magas hidrosztatikus nyomáskezelés hatására kialakuló stresszválasz

Az olyan mikroorganizmusok (pl.: *E. coli*), amelyekben a törzsfajlás során nem fejlődött ki a magas nyomáshoz való adaptációs képesség, úgy reagálnak a nyomás-stresszre, mint bármely más őket érő stresszhatásra (Ishii et al. 2005). A stresszválaszuk során megváltozik a génexpressziós mintázatuk, aminek következtében nagyobb toleranciát mutatnak az őket érő stresszhatással szemben (Aertsen et al. 2004). Ezzel összhangban *S. cerevisiae* 1 órás „edzése” 50 MPa-on oly mértékben megnöveli a sejtek barotoleranciáját, hogy a későbbiekben akár az egyébként halálos mértékű 200 MPa nyomást is elviselik 30 percen keresztül (Domitrovic et al. 2006). Ilyen eredményeket mutatott *L. sanfranciscensis* baktériumok nyomással történő prekondicionálása is (Scheyhing et al., 2004). A nyomás-stressz kiváltotta általános transzkripciós válasz gyakran jelentős hasonlóságot mutat a hideg- vagy hő-sokk következtében elinduló folyamatokkal. Megfigyelték például, hogy *E. coli*-ban 55 MPa nyomáskezelés 4 hideg-sokk és 11 hő-sokk gén expresszióját növeli meg (Welch et al. 1993), amely eredményeket a későbbiekben globális génexpressziós vizsgálatok is alátámasztották (Aertsen et al. 2004; Ishii et al. 2005). A több különböző sokk kezelésében résztvevő fehérjék együttes expressziója nem meglepő, hiszen ezek egymást támogató hatásokkal rendelkeznek. A hideg-sokk fehérjék segítenek megőrizni a membrán fluiditását és a megfelelő fehérje szintézist, a hő-sokk proteinek eközben segítenek helyreállítani az újonnan keletkezett fehérjék térszerkezetét és közreműködnek a denaturálódott fehérjék lebontásában (Thieringer et al. 1998; Aertsen és Michelis 2008). A különböző stresszhatásokra adott válasz hasonlóságára szolgáltatott gyakorlati bizonyítékot Iwahashi és munkatársainak felfedezése (1991), miszerint élesztőben magas hőmérséklet által indukált barotoleranciát figyeltek meg. Ezt a hatást ráadásul a későbbiekben hideg-sokkal is el tudták érni különböző mikrobákban

(Wemekamp-Kamphuis 2002; Palhano et al. 2004). A globális génexpressziós vizsgálatoknak köszönhetően egyre több adat áll rendelkezésre a HHP-kezelés hatásairól. Az egyik ilyen vizsgálat során élesztő gombák 200 MPa-os, 30 percig történő kezelése következtében a stressz válasz mellett a szénhidrát anyagcsere gének expressziója emelkedett meg a leginkább. A legnagyobb expressziós csökkenést viszont a sejtciklus szabályozáshoz és a fehérjeszintézishez tartozó gének mutatták (Fernandes et al. 2004). Ezzel némileg ellentmondóan *Listeria monocytogenes* baktériumokban a 400-600 MPa nyomás hatására a DNS hibajavítás, a transzkripció és fehérje szintézis gének expressziója nőtt meg leginkább, míg a legnagyobb csökkenést mutató gének között az energia előállításban, átalakításban és a szénhidrát anyagcserében résztvevő gének voltak megtalálhatók (Bowman et al. 2008). *E. coli* baktériumokban 100 MPa nyomáskezelés után leginkább a stressz-válasz valamint a tiol-diszulfid redox rendszerek aktiválódtak (Malone et al. 2006). *Lactobacillus sanfranciscensis* baktériumok vizsgálatakor pedig a fehérje szintézisben és az anyagcserében résztvevő gének reagáltak a 45 MPa nyomáskezelésre (Pavlovic et al 2005). A fenti eredmények alapján látható, hogy a különböző fajok nyomás stresszre adott transzkripciós válaszában jelentős hasonlóságok mutatkoznak, így az olyan útvonalak expressziója, mint a transláció folyamata, az anyagcsere és a stressz válasz a legtöbb esetben megváltozik.

2.4.4. A magas nyomás hatása az emlős sejtekre

A mikroorganizmusok mellett már számos mélytengeri gerinctelen és hal, sőt, mélyre merülő tengeri emlősök esetében is bizonyított a nagymértékű nyomásváltozáshoz való alkalmazkodási képesség (Kelly és Yancey 1999; Castellini et al. 2001). Magas nyomás ráadásul a szárazföldön élő emlősállatokban is kialakul bizonyos szövetekben. Hús kg súly megemelése például 2,3 MPa terhelést okoz az emberi gerincnek (Wilke et al. 1999), de normális mozgás során az ízületi porcok akár 18 MPa nyomásnak is ki vannak téve (Hodge et al. 1986). Ennél magasabb értékek azonban jelentős károsodásokhoz és végül a sejtek halálához vezetnek. A 100 MPa alatti nyomást még képes tolerálni az eukarióta sejtek egy része, de már megfigyelhető a sejtorganelumok morfológiai elváltozása, valamint elindul a hő-sokkhoz hasonló stresszválasz. A 150 MPa fölötti nyomásértéket még túlélhetik egyes humán sejtek, de egér sejtekben ekkor már mindenképp elindul az apoptózis. Kétszáz MPa körül a humán sejtekben is apoptotikus sejthalál következik be majd a 300 MPa-nál magasabb nyomáson a nekrotikus-folyamatok okozzák a sejtek elpusztulását (Frey et al. 2004; 2008). A magas nyomás kiváltotta apoptózis a kaszpáz-3 útvonal aktiválódásával következik be. Az apoptózis következtében a sejtek összeesnek, a kromatin állomány kondenzálódik, amely végül a sejt halálához vezet (Yamaguchi et al. 2008). A Magas nyomással kiváltott apoptózist megfigyelték

már egér erythroleukemia, humán limfoblasztóma, és retinális ganglion sejtvonalakban is (Takano et al. 1997; Agar et al. 2006; Yamaguchi et al. 2008). A nekrozis esetében a sejtek megduzzadnak, az organellumok tönkremennek, a mitokondrium is visszafordíthatatlanul károsodik és a sejt ioneqyensúlya felborul. Ezek a hatások végül a sejtmembrán szétesését okozzák, aminek következtében a sejt alkotóelemei a sejtől kiszabadulnak (Takano et al. 1997; Yamaguchi et al. 2008).

2.4.5. Az emlős ivarsejteken és embriókon alkalmazott magas hidrosztatikus nyomáskezelés

A kutatók a kísérleteik során először a szubletális, majd az optimális nyomáshatárokat és kezelési időtartamokat állapították meg különböző sejteken és szöveteken. A szubletális nyomástartományt azt tekintették, ahol a sejteken bekövetkezett változások még visszafordíthatóak voltak. A továbbiakban a kísérletek egy általános formát követtek. Először a sejteket a megfelelő (5-80 MPa) nyomással kezelték, 30-120 perc időtartamig. Ehhez a művelethez a Magyarországon külön erre a célra kifejlesztett és szabadalommal védett HHP Machine 100 és 1400 készülékeket (Cryo-Innovation Kft., Budapest, Magyarország) használták. A HHP Machine 100 működését a 9.2. melléklet mutatja be részletesen. A kezelést követően a sejteket szabványos tenyésztőkörülmények között 5-120 percig inkubálták a normális működésük helyreállítása céljából, majd a másodlagos stresszet jelentő *in vitro* beavatkozás (pl.: lassú fagyasztás, vitrifikáció, parthenogenetikus aktiválás (PA), *in vitro* maturáció és tenyésztés, enukleáció és szomatikus sejtmagátültetés, mesterséges termékenyítés) következett. A HHP-kezelés hatásának felmérésekor a kutatók figyelembe vették többek között a sejt morfológiát, a membrán integritást, a termékenyítő és a fejlődési képességet és a spermium motilitását, valamint *in vivo* vizsgálatok esetében a vemhesülési arányt és az alomszámot. Az így kapott eredményeket egy olyan kontrollhoz hasonlították, amelyet nyomáskezelés nélkül hasonló körülmények között tartottak (Pribenszky et al. 2010a; Pribenszky és Vajta 2011; Pribenszky et al. 2012).

Az eredmények meglepő módon azt mutatták, hogy a 30-120 percig tartó 20-60 MPa erejű nyomáskezelés semmiféle károsodást nem okoz az emlős ivarsejteken és embriókban, habár normális esetben ezeket a sejteket kisebb, mint 0,2 MPa nyomás éri. A különböző sejt típusoknál az így megállapított optimális és szubletális nyomásértékeket a 1. táblázat tartalmazza. Ebben az értelemben optimális tartományt azt a nyomásértéket nevezzük, amelyen a legmagasabb védőhatást lehet elérni a további stresszhatásokkal kombinálva, a szubletális pedig azt a határt mutatja, amely felett a sejtek károsodása visszafordíthatatlanul a pusztulásukhoz vezet.

1. táblázat. Optimális és szubletális nyomásértékek embriók és ivarsejtek esetében. (Pribenszky et al. 2010a).

Kezelt biológiai anyag	Optimális nyomás tartomány (MPa)	Optimális kezelés hossz (perc)	Szubletális nyomás tartomány (MPa)
Egér és szarvasmarha embriók	40-60	30-60	≤ 80
Sertés, egér és humán petesejtek	20	60-90	≤ 60
Szarvasmarha, sertés, ló és nyúl hímvasejtek	10-30	90-120	≤ 60
Egér embrioid testek (EB)	60	30-60	≤ 80

Az kísérletek során az is kiderült, hogy a HHP-kezelés hőmérsékletét a következőben alkalmazandó asszisztált reprodukciós technikához kell igazítani. Megfigyelték például, hogy amikor a kezelendő spermium szobahőmérsékleten volt, akkor a HHP-kezelést eredményesebben lehetett szobahőmérsékleten végezni, mint 37°C-on (Pribenszky et al. 2010a; Pribenszky és Vajta 2011).

2.4.6. Az asszisztált reprodukciós eljárások területén alkalmazott magas hidrosztatikus nyomáskezeléssel elért eredmények

2.4.6.1. Beágyazódás előtti embriók nyomáskezelése

Az elmúlt években több kutatócsoport is vizsgálta a HHP-kezelés egér, szarvasmarha és juh embriókra gyakorolt hatását. A HHP-kezelés hatására bekövetkező általános jelenség volt a blasztocöl reverzibilis összeesése. Az első meghatározó eredményeket a módszerrel egér blasztociszták kezelése során érték el. Ekkor az embriók 60 MPa nagyságú, 30 percig tartó nyomáskezelése jelentősen megnövelte a vitrifikáció utáni túlélési arányt (Pribenszky et al. 2005a). A szarvasmarha embriók ennél magasabb nyomással szemben (80 MPa, 45 perc) is toleránsak voltak, ráadásul a nyomáskezelés kétszer magasabb túlélési arányt eredményezett lassú fagyasztás után a kontrollhoz viszonyítva (Pribenszky et al. 2005b). Mivel a későbbiekben megállapították, hogy 80 MPa nyomással már az embriók felső tolerancia határát érték el, ezért a paramétereket tovább finomították és az optimalizált kezelést vitrifikációval kombinálták. A kedvező hatás legerősebben akkor jelentkezett, amikor a nyomáskezelés mértéke és ideje 60 MPa és 1 óra volt, valamint amikor a kezelés és a vitrifikáció között 1 órás regenerációs időt hagytak az embrióknak. Az eredmények azt mutatták, hogy a HHP-kezelés segítette az embriókat a normális *in vitro*

fejlődéshez való visszatérésben a kiolvasztás után, valamint növelte az embriók re-expansziós (expansion) és kibújási (hatching) rátáját is (Pribenszky et al. 2008a). A HHP-vel végzett későbbi kísérletek részben, vagy teljes egészében megerősítették az *in vitro* tenyésztett szarvasmarha embrióknál tapasztalt kedvező eredményeket (Siqueira Filho et al. 2011; Trigal et al. 2012). Juh embriók esetében a 70 perces, 40 MPa nagyságú kezelés minőségjavító hatásának bizonyult, mert a kezelt hólyagcsírák sejtszáma növekedett és a piknózisos sejtmagok aránya csökkent (Bogliolo et al. 2011). Későbbi vizsgálatok azt is megmutatták, hogy az előzetesen nyomáskezelt, majd lefagyasztott juh blasztocisztáknál 3 órával a kiolvasztás után szignifikánsan nagyobb arányban következett be re-expanszió és a sejtszámuk is nagyobb volt (Ledda et al. 2010). Az emlős embriókon végzett kísérletek megmutatták, hogy az optimális mértékben alkalmazott szubletális stressz sajátos védő hatással rendelkezhet. Az így elért első sikeres eredmények megalapozták a HHP-technika bevezetését az asszisztált reprodukciós eljárások területére.

2.4.6.2. Hímivarsejtek nyomáskezelése

Sertés és szarvasmarha ondósejtek nyomáskezelése után szintén megfigyelhető volt az embrióknál tapasztalt pozitív hatás. Az elsők között szarvasmarha spermiumot tettek ki különböző mértékű nyomásnak és megállapították, hogy a 30 MPa/90 perc kombináció jelentősen javítja a hímivarsejtek fagytoleranciáját (Pribenszky et al. 2005c). A spermium életképességének indikátoraként a kutatók a kiolvasztás utáni motilitást vizsgálták meg és azt tapasztalták, hogy a HHP-kezelés jelentősen növelte a sejtek mozgékonyágát. További vizsgálatok azt is kimutatták, hogy a nyomáskezelt mintákban szignifikánsan több spermium őrizte meg a feji- és farokrész valamint az akroszóma integritását a fagyasztás során (Pribenszky et al. 2007). Magas nyomás alkalmazásával a sertés spermium krioteranciáját is sikerült javítani, a legjobb eredményeket pedig a testhőmérsékleten kezelt hímivarsejtekkel érték el (Pribenszky et al. 2006; Huang et al. 2009a). A fagytolerancia javulása mellett az *in vitro* tárolt sertés hímivarsejtek hideg ellenállósága is megnőtt a kezelés következtében (Pribenszky et al. 2008b). A nyomáskezelés hosszabbtávú *in vivo* hatásait vizsgálva, HHP-kezelt friss hímivarsejtekkel végzett mesterséges megtermékenyítés esetén növekedést lehetett elérni az utódszámban, annak ellenére, hogy a vemhesülési arány nem változott (Pribenszky et al. 2008b). Ezekből kiindulva Kuo és munkatársai (2008) HHP-kezelést alkalmaztak sertés spermium fagyasztása előtt, majd a kiolvasztott hímivarsejteket használták kocák termékenyítéséhez. A megfigyelések itt is azt mutatták, hogy a kezelés nem befolyásolta a vemhesülési arányt, de jelentősen javította az alomszámot. Ezek az eredmények azért kiemelkedően

fontosak, mert csökkentik a sertés spermium fentiekben ismertetett jelentős fagy- és hidegérzékenységét, így általánosságban javíthatják a sertéstenyésztés hatékonyságát.

2.4.6.3. Petesejtek nyomáskezelése

A szubletális és optimális kezelési határokat először itt is mátrix elrendezésű kísérletekkel, 20, 40, 60 és 80 MPa nyomástartományon, valamint 30, 60 és 120 perc időhosszokkal, test- és szobahőmérsékleten vizsgálták (Pribenszky et al. 2008c; 2012). Az eredmények alapján a kutatók megállapították, hogy a reprodukív sejtek közül a petesejtek a leginkább érzékenyek a nyomáskezelésre. A 60-80 MPa nyomás hatására a parthenogenetikusan aktivált (PA) petesejtek osztódása már teljesen leállt. Az optimális határnak a mindössze 20 MPa (és 60 perc) bizonyult, amivel növelni lehetett az osztódási és a blasztociszta arányt a vitrifikáció után (Pribenszky et al. 2008c). Az osztódási arány azt mutatja, hogy a megtermékenyített vagy parthenogenetikusan aktivált petesejtek hány százaléka osztódik tovább a kétsejtes majd a további beágyazódás előtti embrionális állapotokig egy adott kezelés után, a blasztociszta arány pedig azt tükrözi, hogy mekkora részük éri el ezt az implantáció előtti embrionális stádiumot. Ezzel a két jellemzővel jól vizsgálható a petesejtek és a belőlük fejlődött embriók életképessége. Sertés *in vitro* érlelt, PA petesejteknél a blasztociszta arány javult a HHP-kezelés hatására, ahol a legjobb eredményt a 37°C-on végzett kezeléssel érték el (Du et al. 2008a). Ehhez hasonlóan, éretlen (germinális vezikulum stádiumú) sertés petesejtek szobahőmérsékleten történt HHP-kezelése is nagyobb blasztociszta arányt és sejtszámot eredményezett az *in vitro* maturációt, majd a parthenogenetikus aktivációt követő *in vitro* tenyésztés során (Pribenszky et al. 2008d). A sertés ondómélyhűtéshez hasonlóan ezek az eredmények szintén áttörést jelenthetnek a sertéstenyésztés hatékonyságának növelése terén. A sertés gazdasági haszna mellett több szempontból is az egyik legjobb modellállata az emberi betegségeknek. A gyakorlatban azonban még nagyon kevés transzgenikus sertés betegségmodellt sikerült létrehozni, mivel nem áll a kutatók rendelkezésére stabil sertés őssejtvonala. A jövőben az iPS (indukált pluripotens őssejt) és a nagy hatékonysággal rendelkező szekvencia specifikus nukleázok felfedezése, úgymint a TAL effektor nukleáz (TALEN), a CRISPR/Cas9 rendszer (csoportos, szabályosan megszakított rövid palindróm ismétlések/Cas9 fehérje) valamint a Cink-újj nukleázok (ZFN) jelentősen megváltoztathatják ezt (West et al. 2011, Park és Telugu 2014), azonban a sertésnél továbbra is leginkább a klónozás jelenti a megoldást a transzgenikus, génmanipulált egyedek létrehozására (Carlson et al. 2012). Mindazonáltal ez a technika jelenleg nagyon alacsony (0,5-5%) hatékonysággal működik (Aigner et al. 2010). Du és kollégái ezért

kísérletükben nyomáskezelt sertés petesejtek sejtmagját távolították el és donorként használták őket a sejtmagátültetési klónozáshoz. Az így létrehozott embriók vitrifikáció utáni túlélési aránya, valamint blasztociszta és sejtszám aránya jelentősen javult a kontrollhoz képest. A legerősebb hatást a nyomáskezelés és a sejtmagátültetés közötti 2 órás regenerációs idő közbeiktatásával sikerült elérni. Az így előállított klónozott embriókat kocákba ültették és egészséges utódok jöttek a világra (Du et al. 2008b). Az egér petesejtek nyomás toleranciája hasonló volt a sertésekéhez. A vitrifikációt megelőzően 60 percig tartó 20 MPa kezelést alkalmaztak, majd a kiolvasztott petesejteket intracitoplazmatikus spermium injektálás útján termékenyítették meg. A nyomásstressz a petesejtek kiolvasztás utáni túlélési arányát ugyan nem növelte, azonban ami ennél fontosabb, a blasztociszta arány és utódszám szignifikánsan megemelkedett a kezelés következtében (Pribenszky et al. 2010b, Pribenszky et al. 2012). Szarvasmarha petesejtek HHP-előkezelésével azonban nem sikerült a belőlük létrehozott embriók fagytoleranciáját javítani (Díez et al. 2012), tehát további termékenyítési vizsgálatokra van szükség annak megállapítására, hogy a különböző fajok esetében milyen hatással van a petesejtek nyomáskezelése a későbbi *in vivo* fejlődésre. Az állattenyésztés területén elért számos sikeres eredmény alapján felmerült, hogy a HHP-technika a humán reprodukciós eljárások során is használható lehet. Előkísérletként kiselejtezett *in vitro* érlelt (IVM) vagy nem termékenyült humán petesejteket nyomáskezelték, majd lassú fagyasztást követően folyékony nitrogénben tárolták őket. A kiolvasztás után a petesejteket morfológiai vizsgálatnak vetették alá, majd parthenogenetikusan aktiválták őket. Az aktivált petesejtek nem érték el a hólyagcsíra stádiumot, viszont javult a fagyasztás utáni túlélési arányuk, az aktivációs rátájuk és az osztódási arányuk is (Mátyás et al. 2010; Pribenszky et al. 2010b). Ezek az eredmények egy lépéssel közelebb hozták a HHP-technikát a humán gyógyászati felhasználáshoz, azonban még számos további vizsgálat szükséges a módszer biztonságos alkalmazásához.

2.4.6.4. Embriónális őssejtek nyomáskezelése

Az első embriónális őssejteken alkalmazott HHP-kezelés eredményeiről 2010-ben számoltak be. Egér embriónális őssejtekből embrioid testeket (EB) hoztak létre, majd az EB formálódása utáni negyedik napon 30 percig 60 MPa nyomással kezelték őket, szobahőmérsékleten. Ezek után az embrioid testeket a szilárd felszínű vitrifikáció (SSV) módszer alkalmazásával lefagyasztották (Dinnyés et al. 2000; Dinnyés et al. 2001) és kiolvasztás után mikroszkópos megfigyeléssel valamint immunhisztokémiai módszerekkel vizsgálták a kardiomiocitává történő differenciálódási képességüket. Az eredmények alapján a HHP-kezelés nem befolyásolta a kontroll,

nem fagyaszott EB-k túlélését és differenciálódását, azonban a nyomáskezelést fagyasztással kombinálva jelentősen javult a sejtek kardiális irányú differenciálódási képessége a kezelés nélkül vitrifikált kontrollhoz viszonyítva (Dinnyés et al. 2010; Pribenszky et al. 2010a).

2.5. A magas hidrosztatikus nyomáskezelés ivarsejtekre és embriókra kifejtett hatásmechanizmusának vizsgálata

Annak ellenére, hogy manapság bőséges és folyamatosan gyarapodó eredmények bizonyítják a fentiekben bemutatott HHP-technika reprodukív sejtekre kifejtett jótékony hatását, az e mögött rejlő sejtbiológiai folyamatok még kevésbé ismertek. Az alábbiakban összefoglalom azokat a megfigyeléseket, amelyek a HHP-kezelés sejtekre kifejtett hatásáról jelenleg rendelkezésünkre állnak, és bemutatom azokat a következtetéseket, amelyekkel a kezelés hatására bekövetkező változásokat magyarázzák.

2.5.1. Morfológiai megfigyelések

Pribenszky és munkatársai a HHP-technikát megalapozó cikkükben a kezelt egér blasztocisztákat többféle alaktani vizsgálatnak vetették alá. Az embriók túlélése alapján két csoportra osztották a nyomáskezelés során bekövetkező változásokat. Amikor az embriókat tolerancia határukon belül kezelték (pl.: 90 MPa/30 percig, vagy 30 MPa/3 óráig), azok reverzibilis morfológiai elváltozásokat mutattak. A hólyagcsírák a *zona pellucidán* belül összeestek, a blasztocöl (a hólyagcsírákon belül található üreg) eltűnt és csökkent a blasztomérák mérete, de szerkezetileg sértetlenek maradtak. Megfigyelték továbbá, hogy négy-ötórányi *in vitro* tenyésztés után re-expanszió következik be (a blasztocöl helyreáll), majd az ekkor már normális méretű blasztociszták a kontrollhoz hasonló módon kibújnak a *zona pellucidából* (Pribenszky et al. 2005a). További nyomáskísérletekkel igazolták, hogy a blasztocöl reverzibilis összeesése a kezelés hatására általánosan bekövetkező jelenség (Pribenszky et al. 2010a; Pribenszky és Vajta 2010). Fontos megfigyelés volt azonban, hogy az alaktani elváltozások előidézéséhez mindkét tényező (nyomás/időtartam) együttesen megemelt szintjére van szükség. Ugyanis, amikor a blasztocisztákat csak rövid ideig tették ki a magas stresszhatásnak (pl. 80 MPa/10 percig) vagy hosszabb ideig alacsonynak (pl. 30 MPa/2 óráig), azok nem mutattak alaktani elváltozást a kontrollhoz képest és a kibújásuk is normális volt (Pribenszky et al. 2005a). Azok az embriók, amelyeket a toleranciaküszöböt meghaladó mértékű stresszhatás ért (pl.: 90 MPa/2 óráig, vagy 30 MPa/5 óráig),

nem voltak képesek az újbóli feltöltődésre, vagy már közvetlenül a dekompreszió után szétesett állapotban voltak. Ezek az irreverzibilis morfológiai változások egyértelműen jelezték, hogy ilyenkor az embriók már nem élik túl a nyomáskezelést (Pribenszky et al. 2005a).

In vitro előállított (IVP) juh blasztocisztákban szintén vizsgálták a magas nyomás sejtekre kifejtett hatását. Itt is megfigyelhető volt az előzőekben már ismertetett blasztocöl összeesés a 40-60 MPa-os kezelést követően. A kutatók ezután fluoreszcens konfokális mikroszkópia segítségével tanulmányozták a kezelt és kontroll hólyagcsírák belső sejtsomó (ICM) és trofektoderma (TE) sejtjeit. A vizsgálat során megállapították, hogy a kezelt embriók ICM és TE sejtszáma egyaránt magasabb volt a kontrollénál, attól függetlenül, hogy a nyomáskezelést itt nem kombinálták másodlagos stresszel. Ebből arra következtettek, hogy a HHP mitogenikus hatással is rendelkezik. A kutatók továbbá a sejtek stressztűrő képességét is megvizsgálták piknózis sejt index segítségével (Hardy et al. 1989). A módszer alapja, hogy a sejtmag jelentős zsugorodása, majd szétesése (piknózis) az apoptózis, azaz a programozott sejthalál egyértelmű jele (Burgoyne 1999). Amikor a kutatók az embriókat konfokális mikroszkóppal ellenőrizték, azt tapasztalták, hogy a HHP-kezelt blasztocisztákban szignifikánsan kevesebb blasztomernek volt piknózisos a sejtmagja, tehát a nyomáskezelés anti-apoptotikus hatással is rendelkezik (Bogliolo et al. 2011).

Szarvasmarhánál vitrifikációval is kombinálták a HHP-kezelést és ezt követően határozták meg az IVP blasztociszták sejtszámát. Az eredmények egy órával a kiolvasztás után azt mutatták, hogy a nyomáskezelt embriók sejtszáma csökken az előkezelés nélkül lefagyasztott kontrollhoz képest. Azonban 48 órával a kiolvasztás után, a kibújáskor itt is tetten érhető volt a HHP-kezelés jótékony hatása, mert ekkor a kezelt embriók már jelentősen több ICM sejttel rendelkeztek a kontrollhoz képest (Trigal et al. 2012). Egy másik tanulmányban 60 MPa/1 óra nyomásnak kitett szarvasmarha hólyagcsírák ultrastruktúráját vizsgálták elektronmikroszkópia segítségével. A felvételek azt mutatták, hogy a kontrollhoz képest a HHP-kezelt embrióknál megnőtt a mikrobolyhok és a megemelkedett anyagcserével rendelkező mitokondriumok száma. Amikor a nyomáskezelést vitrifikációval is kombinálták, látható volt, hogy az előzetesen nyomáskezelt embriók sejtmagjának felülete nagyobb (Pribenszky et al. 2010a; Pribenszky és Vajta 2010). Összegzéséként elmondható, hogy a rendkívül magas nyomás hatására az embriók komoly alaktani változásokon mennek keresztül, azonban a változások optimális nyomásértékek alkalmazása mellett nem hátrányosak, visszafordíthatóak, a kezelés pedig végső soron jótékony hatással bír.

Az ivarsejtek nyomáskezelés hatására bekövetkező morfológiai elváltozásait a kutatások idáig kevésbé vizsgálták. Emlős petesejtek esetében nem számol be a szakirodalom a HHP hatására jelentkező különös morfológiai elváltozásról. A hímivarsejtek HHP-kezelés utáni életképességét pedig az eddigi vizsgálatok szinte kizárólag csak a kiolvasztás utáni motilitás alapján határozták

meg. Kivételt képez ez alól Pribenszky és munkatársainak (2007) közleménye, ahol bika spermium fej és farokrészének, valamint akroszóma membránjának integritását vizsgálták Kovacs-Foote festéssel (Kovacs és Foote 1992). Mintánként 300 hímivarsejtet elemezve a kutatók megállapították, hogy a HHP-kezelés eredményeként szignifikánsan több lefagyasztott, majd kiolvasztott spermium őrizte meg épségben a vizsgált alkotórészek szerkezetét (Pribenszky et al. 2007).

Az előzőekben bemutatott kutatások fő irányvonala az előnyös HHP-hatás feltérképezése volt a különböző fajokban, illetve biológiai mintákban. A vizsgálatok csak kevésbé foglalkoztak a kedvező hatás hátterével, azt azonban egyértelműen megmutatták, hogy a nyomáskezelés képes jelentősen megváltoztatni a sejtek morfológiáját, szerkezetét és a bennük zajló folyamatokat is. Ahhoz viszont további, részletesebb vizsgálatokra van szükség, hogy megismerhessük és megérthessük, melyek azok a védekező mechanizmusok, amelyek az optimális nyomástartományban történő kezelés következtében aktiválódnak, és segítséget jelentenek egy következő stressz leküzdésében.

2.5.2. Molekuláris biológiai vizsgálatok

Emlős reprodukzív sejtekben a HHP-kezelés génexpresszióra kifejtett hatását először Huang és munkatársai (2009a) vizsgálták. Kilencven percig tartó 30 MPa nyomáskezelésnek alávetett sertés spermium protein profilját vizsgálták, és több fehérje mennyiségében is elváltozásokat találtak a kezelést követően. A kutatók által beazonosított HHP-aktivált fehérjék többek között a *zona pellucidához* való kötődésért, a triacilglicerol hidrolízis és az oxidatív foszforiláció folyamataiért felelősek. Ezek az eredmények bizonyították elsőként, hogy a magas nyomáskezelés hatására bizonyos gének expressziója megváltozik. További fontos megállapítás volt, hogy a vizsgált nyomás- és időtartományban a kezelés nem okoz visszafordíthatatlan fehérje károsodást. A továbbiakban a kutatók Western blot technika alkalmazásával és denzitometriás értékeléssel vizsgálták két hősokk fehérje, a HSP70 és HSP90 (heat shock protein) expressziós szintjét, mert elképzelhetőnek tartották, hogy a hősokk fehérjék szerepet játszanak a HHP-indukált krioteranciában (Pribenszky et al. 2005a; Du et al. 2008a). Az eredmények azonban azt mutatták, hogy sertés hímivarsejtekben a vizsgált hősokk fehérjék szintjét a HHP-kezelés nem változtatja meg (Pribenszky et al. 2011). Kutatásomhoz Huang és munkatársainak első eredményei jelentették a kiindulópontot, amelyek alapján génexpressziós vizsgálatokat végeztem a HHP-kezelés hatásának tanulmányozása céljából.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A kísérleti minta előállítása

3.1.1. Hólyagcsíra stádiumú embriók kinyerése, tenyésztése

Kísérletsorozatunk első részében a célunk a HHP-kezelés hatására bekövetkező géneexpressziós változások tanulmányozása volt nyomáskezelt egér blasztocisztákban. A vizsgálatokhoz szükséges embriók előállításához 10 hetes F1 (C57BL/6xDBA) SPF (specific pathogen free) nőtény egereket szuperovuláltattunk, 7,5 (IU) vemhes kanca szérum gonadotropin hormon (PMSG; Folligon, Intervet International B.V., Boxmeer, Hollandia) kezeléssel, majd 48 órával később 7,5 IU humán chorion gonadotropin hormon (hCG; Choragon, Richter Gedeon, Budapest, Magyarország) hasüregbe történő injektálásával. A szuperovuláltatott nőtényeket CD1 hímekekkel pároztattuk. A korai blasztocisztákat 3,5 nappal a hCG adás után, Hepes-t tartalmazó Chatot-Ziomek-Bavister médium (CZB-Hepes) használatával mostuk ki a méhből. A kinyert blasztocisztákat 30 µl-es Potassium Simplex Optimized Medium (KSOM; (Millipore, Billerica, USA) mikrocseppekben, ásványi olaj (Ovoil, Vitrolife, Kungsbacka, Svédország) alatt *in vitro* tenyésztettük, 37°C-on, 5% CO₂ tartalmú légtérben, az expandálódott blasztociszta stádium eléréséig.

3.1.2. Petesejtek kinyerése

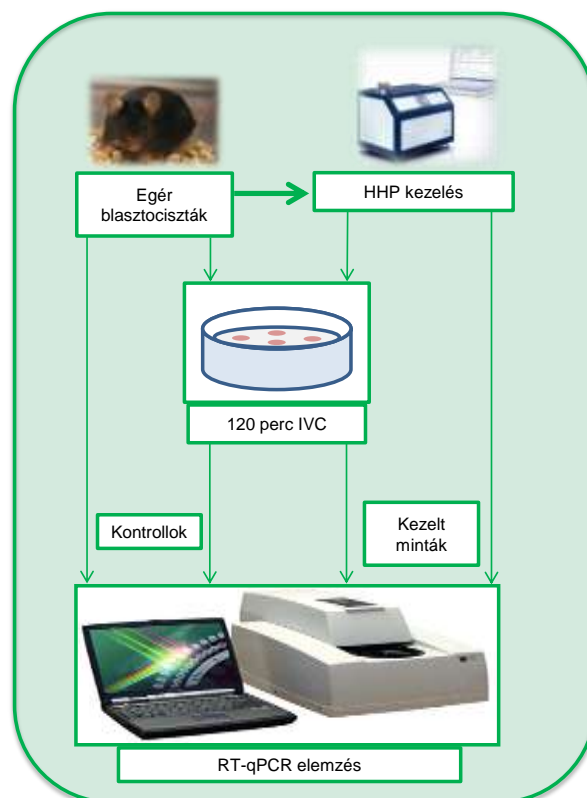
A kísérlethez B6D2F1 nőtény egereket szuperovuláltattunk 5 IU PMSG, majd 48 órával később 5 IU hCG hasüregbe történő injektálásával. A petesejteket a hCG injekció beadása után ~14 órával mostuk ki a petevezetőkől. A petesejtmosáshoz és az azt követő mikromanipulációhoz CZB-Hepes médiumot használtunk, amely a következő kiegészítőket tartalmazta: 20 mmol/l HEPES, 5 mmol/l NaHCO₃ és 0,1 mg/ml polivinil alkohol (PVA) a BSA helyett. Az itt említett kiegészítőket a Sigma-Aldrich Kft-től (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) vásároltuk meg. A petesejt és embriótenyésztés során használt CZB médium 5,56 mmol/l D-glükózt és 5 mg/ml szarvasmarha savó albumint (BSA) tartalmazott. A médium pH értékét 7,4-re állítottuk 37°C-on, 5% CO₂ tartalmú légtérben.

3.1.3. A hólyagcsíra állapotú embriók kezelése magas hidrosztatikus nyomással

A kezeléshez illetve kontrollként három-három, egyenként 10 darab expandálódott blasztocisztából álló csoportot hoztunk létre. Az embrió csoportokat 0,25 ml térfogatú műszalmába töltöttük (IMV, L'Aigle, Franciaország) CZB-Hepes médiumban úgy, hogy levegő buborékot ne tartalmazzon. A műszalmák lezárása műanyag tömítéssel történt. Az összes műveletet 37°C-os fűtött alátéten végeztük, majd a továbbiakban a műszalmákat hagytuk szobahőmérsékletre (22-26°C) hűlni. Ezután a hidrosztatikus nyomáskezelés következett, amelyet a HHP 100 (Cryo-Innovation Kft., Budapest, Magyarország) készülékkel végeztünk el. Az embriókat szobahőmérsékleten 60 MPa nyomással kezeltük 30 percig. A nyomás emelése és csökkentése a készülékben az alapértelmezett 10 MPa/perc értékkel történt. Kontrollként háromszor 10 darab blasztocisztát azonos körülmények között tartottunk, nyomáskezelés nélkül. Ahhoz, hogy a nyomáskezelés hosszabbtávú hatását is tanulmányozni lehessen, a kezelt és kontroll minták nyomáskezelést követő azonnali begyűjtésén kívül, a kezelés után meghatározott idővel további csoportokat gyűjtöttünk. Ehhez a HHP-kezelt blasztocisztákat és nem kezelt kontrolljaikat további 120 percig *in vitro* tenyésztettük KSOM (Millipore, Billerica, USA) médiumban, 37°C-on, 5% CO₂ tartalom mellett. A minták ezt követően azonnal fagyasztásra kerültek (-80°C), RNS izolálásig. Az egér blasztociszták vizsgálatának lépéseit a 1. ábra mutatja be.

1. ábra

A HHP-kezelés egér blasztocisztákra kifejtett hatásának vizsgálatát bemutató folyamatábra.



3.1.4. A petesejtek kezelése magas hidrosztatikus nyomással

A kumulusz petesejt komplex csoportokat 37°C hőmérsékletű G-MOPS médiumban (Vitrolife, Kungsbacka, Svédország) 0,25 ml térfogatú műszalmába töltöttük úgy, hogy levegő buborékot ne tartalmazzon. A műszalmák lezárása műanyag tömítéssel történt meg. Ezután a műszalmákat a HHP 100 (Cryo-Innovation Kft., Budapest, Magyarország) készülék 37°C hőmérsékletű desztillált vizet tartalmazó nyomáskamrájába helyeztük, majd a hidrosztatikus nyomáskezelés következett. A petesejteket 37°C-on 20 MPa nyomással kezeltük 60 percig. A nyomás emelése és csökkentése a készülékben az alapértelmezett 10 MPa/perc értékkel történt. Ezután a nyomáskezelt és kontroll petesejteket körülvevő kumuluszsejteket 0,1% hialuronidáz (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) használatával távolítottuk el, amelyet CZB-Hepes médiumban adtunk a sejtekhez 1 percig. A kezelés után, 4 ismétlésben 50 kezelt és 50 kontroll petesejt csoportot -80°C-ra fagyasztottuk az RNS izolálásig. A megtermékenyítendő petesejteket újra CZB médiumban inkubáltuk a spermium injektálásig.

3.1.5. A petesejtek és hímivarsejtek előkészítése ICSI-hez

A nyomáskezelt és kontroll petesejteket körülvevő kumuluszsejtek eltávolítása után a sejteket CZB médiumban mostuk majd inkubáltuk (37°C-on, 5% CO₂ tartalmú légtérben 4 óráig), ezután intracitoplazmatikus spermium injektálás (ICSI) módszerével megtermékenyítettük őket.

A hímivarsejtek kinyeréséhez CD1 hímekből kimetszett mellékheréket 1 ml CZB-Hepes médiumba helyeztünk egy 3 cm átmérőjű Petri csészében. Ezek után a szövetet egy 26-os méretű injekciós tűvel perforáltuk, majd körülbelül 1 óras 37°C-on, 5% CO₂ tartalmú légtérben történt inkubálás után a kioldott spermium szuszpenziót összegyűjtöttük a felülúszóból. Az ICSI-hez 80%-os vagy annál nagyobb motilitású spermiumot használtunk.

3.1.6. Intracitoplazmatikus spermium injektálás

A mikromanipulációs lépéseket egy Olympus IX 71 inverz mikroszkópra (Olympus Optical, Tokyo, Japán) telepített piezo-elektromos mikromanipulációs rendszeren végeztük (PMAS-CT150, Prime Tech, Ibaraki, Japán) CZB-Hepes médiumban. A mellékheréből kioldott spermium szuszpenzióból 6 µl-t 5 µl 12%-os polivinilpirrolidon (PVP; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) oldattal egészítettük ki. Az injektáló tűbe egyenként felszívott hímivarsejtek flagellumát néhány

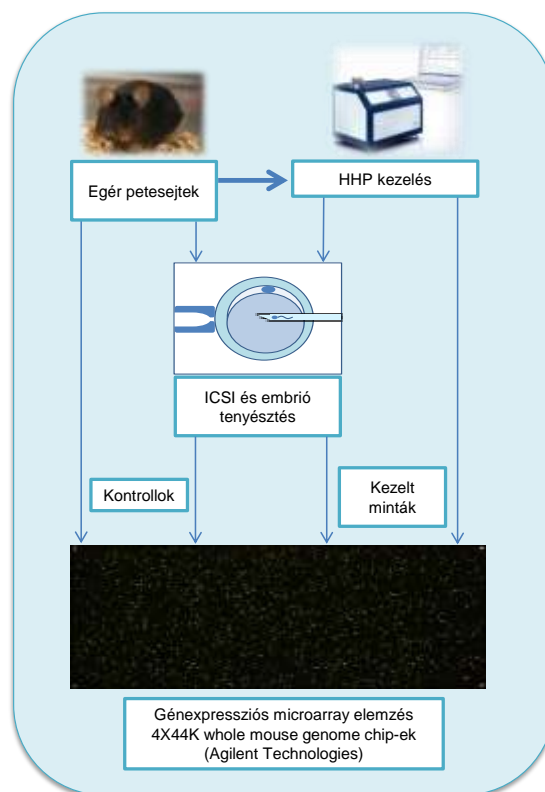
piezo-rezgéssel választottuk le a feji részről (Kuretake et al. 1996). A flagellum nélküli feji részeket azonnal a már előkészített kezelt és kontroll egér petesejtekbe injektáltuk.

3.1.7. A petesejtek és a belőlük fejlődött négysejtes embriók mikroszkópos vizsgálata ICSI után

Az egér hímivarsejtek feji részének beinjektálása után a nyomáskezelt és kontroll egér petesejteket 6-8 órán keresztül CZB médiumban tenyésztettük 37°C-on, 5% CO₂ tartalmú légtérben 100% relatív páratartalom mellett, majd Hoffmann-féle modulációs kontraszttal ellátott Olympus IX mikroszkóppal (Olympus Optical, Tokyo, Japán) vizsgáltuk, hogy az aktiváció megtörtént-e. Azokat a zigótákat tenyésztettük tovább CZB médiumban, amelyekben a két pronukleusz és a második poláris test látható volt. Az embriók *in vitro* fejlődését a négysejtes stádium eléréséig figyelemmel kísértük. A fertilizáció után a HHP-kezelt embriók 78%-a és a kontroll embriók 82%-a maradt életben, amelynek 76 illetve 65%-a fejlődött tovább a négysejtes állapot eléréséig. A nyomáskezelést és a nem kezelt kontrollok gyűjtését hat alkalommal ismételtük meg, ennek során 9 db kontroll (8-24 db embrió) és 5 db kezelt (21-30 db embrió), csoportot alakítottunk ki. A mintákat a begyűjtést követően azonnal -80°C-ra helyeztük, és az RNS izolálásig fagyaszta tároltuk őket. A teljes microarray kísérletsorozat lépéseit a 2. ábra foglalja össze.

2. ábra

A HHP-kezelés egér petesejtekre kifejtett azonnali és a preimplantációs embrionális korban megnyilvánuló hatását vizsgáló microarray kísérletsorozat lépéseit bemutató folyamatábra



3.2. A HHP-kezelt hólyagsíra állapotú embriók génexpressziós vizsgálata

3.2.1. RNS izolálás és cDNS szintézis

A HHP-kezelt és kontroll, 10 darabos blasztociszta csoportokból a hírvivő RNS (mRNS) izolálása Dynabeads mRNA DIRECT Micro Kit (Dyna, Oslo, Norvégia) használatával történt, a gyártó utasításai szerint. Ez a protokoll olyan mágneses, oligo(dT)₂₅ nukleotidokkal kapcsolt gyöngyöket használ, amelyek az mRNS poly(A) farkával hibridizálva lehetővé teszik e molekulák izolálását a sejtlizátumból. A kezelt és kontroll blasztociszta csoportokból 3 ismétlésben izoláltunk mRNS-t. A kioldott mRNS-ből M-MLV RT Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) felhasználásával cDNS-t szintetizáltunk, 20 µl-es reakció térfogatban.

3.2.2. Primer tervezés

A vizsgálatokhoz olyan géneket kerestünk a szakirodalomban, amelyek egy esetleges stressz válaszban szerepet játszhatnak, ezért expressziójukra a HHP-kezelés is hatással lehet. Azért, hogy több különböző típusú sejtválaszt is vizsgálni lehessen, a keresés alapján olyan géneket választottunk, amelyek sejtosztódás-gátló, oxidatív-stressz, apoptózis vagy hideg-sokk útvonalakban vesznek részt. A real-time PCR vizsgálatokhoz kilenc választott génre terveztünk primereket a Primer3 (Rozen és Skaletsky 2000) szoftver segítségével. A primerek specifikuságának ellenőrzése a BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) szoftver alkalmazásával történt. Az elkészült primerek listáját a fontosabb adatokkal a 2. táblázat tartalmazza. A megtervezett primereket ezt követően optimalizáltuk, amely során megállapítottuk a megfelelő tapadási hőmérsékleteket.

2. táblázat. Az RT-qPCR vizsgálatokhoz használt primerek.

Szimbólum	GenBank azonosító	Teljes gén név	Forward és Reverse Primerek (5'-től 3'-ig)	Termék méret (bp)	Folyamat/funkció melyben a gén részt vesz
Sod2	NM_013671	superoxide dismutase 2, mitochondrial	TTACAGATTGCTGCCTGCTCTAAT ATCCCCAGCAGCGGAATAA	71	oxidatív stressz válasz
Sod1	NM_011434	superoxide dismutase 1, soluble	ACCTCATTTTAA TCCTCACTCTAAGAAAC ATTGGCCACACCGTCTTT	106	oxidatív stressz válasz
Rbm3	NM_016809	RNA binding motif protein 3	CACCTTCACAA ACCCAGAGCAT GATTTGGCGCCCA TCCA	76	hideg sokk válasz
Trp53	NM_011640	transformation related protein 53	GCTTCTCCGAAGACTGGATGA AGAGGGGAGCTCGAGGCTGAT	66	általános stressz válasz, sejtsztódás gátlás
Gas5	NR_002840	grow th arrest specific 5	CAGGACTCGTCAGGAAGCTG GTGTGGGTTGAGGGA TCTTTAG	122	sejtnövekedés gátlás
Azin1	NM_018745	antizyme inhibitor 1	CATGAAGTTTGCACTACAC CACACATCGAGCATCAGA	154	sejtnövekedés szabályozás
Csda	NM_139117	cold shock domain protein A	CGCAGATGGGCA GTTCTC CCTGCA TTCTGTTGGGATG	149	ozmotikus stressz válasz
Gadd45g	NM_011817	grow th arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	GAAAGCACTGCACGAACTTC GTCACATTGTCA GGGTCCAC	105	általános stressz válasz, sejtsztódás gátlás
Dido1	NM_175551	death inducer-obliterator 1	ACAGACTCCAGATAGGCGATGG GGGCGACACAGCATTA TCC	130	apoptózis szabályozás
Ppia*	NM_008907	peptidylprolyl isomerase A	CGCGTCTCCTTCGAGCTGTTTG TGTAAGTCA CCA CCCTGGCAGAT	150	
H2afz*	NM_016750	H2A histone family, member Z	ACAGCGCAGCCATCCTGGAGTA TTCCCGATCAGCGATTTGTGGA	202	

* A normalizáláshoz használt referenciagének.

3.2.3. Az RT-qPCR mérések normalizálásához használt referenciagének előzetes validálása

A normalizáláshoz a kutatócsoportunk által korábban publikált, két legstabilabb egér preimplantációs referenciagént, a H2A histone family member Z-t (H2afz) és a peptidylprolyl isomerase A-t (Ppia) választottuk (Mamo et al. 2007). Mivel azonban az nem volt ismert, hogy a HHP-kezelés e gének kifejeződését befolyásolja-e, szükség volt az expressziójuk $2^{-\Delta Ct}$ módszerrel történő előzetes vizsgálatára (Schmittgen és Zakrajsek 2000). Ehhez a 3.1.3. fejezetben ismertetett módon további két időpontban (kezelés után 30 és 60 perccel) egér blasztocisztákat gyűjtöttünk, majd RT-qPCR-el megmértük bennük a referenciagének expresszióját. A vizsgált időpontok között mért expressziós eltéréseket egyutas varianciaanalízissel elemeztük. Szignifikánsnak a 0,05-nél kisebb P-értéket tekintettük.

3.2.4. Kvantitatív reverz-transzkripció PCR (RT-qPCR)

Az mRNS mennyiségi meghatározása során génenként 3-3 biológiai ismétlésben elemeztük a 10 darabos blasztociszta csoportokból álló kezelt mintákat és a kontrolljaikat, emellett pozitív és negatív kontrollokat használtunk minden reakcióban. Egy 15 µl térfogatú reakció komponensei a következők voltak: 0,2 embriónak megfelelő cDNS, 200-430 nM primer és 7,5 µl SYBR Green JumpStart Taq Ready Mix (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). A reakciókat Rotor-Gene 3000 real-time PCR készüléken (Corbett Research, Mortlake, Australia) futtattuk. A reakciókörülményeket a 3. táblázat mutatja be. A PCR termékek specificitását olvadáspont analízissel és agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. A PCR hatékonyság kiszámításához ötpontos, négyszeres hígítási sorokat készítettünk. A relatív mennyiségi változásokat a Relative Expression Software Tool - 384 version 2 (Pfaffl et al. 2002) program segítségével állapítottuk meg.

3. táblázat RT-qPCR reakciókörülmények a blasztociszták elemzése és a microarray validálása során.

Kísérlet	Enzimaktiválás		40 ciklus					
			Denaturáció		Primer annealing		Lánchosszabítás	
blasztociszták elemzése	95°C	3 perc	95°C	15 mp	56/58/60 °C	20 mp	72°C	30 mp
microarray validálása	94°C	3 perc	95°C	5 mp	60 °C	15 mp	72°C	30 mp

3.3. A HHP-kezelt petesejtek, valamint a belőlük fejlődő négysejtes embriók génexpressziós microarray vizsgálata

3.3.1. RNS izolálás és minőség ellenőrzés

Az 50 darabos petesejt csoportokból a totál RNS izolálása RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, Hilden, Németország) használatával történt, a gyártó protokollja szerint. Az esetlegesen szennyezést jelentő genomi DNS eltávolítását gDNS eliminátor oszlopokkal végeztük (Qiagen, Hilden, Németország). Az RNS az izolálást követően azonnal két részre lett osztva, az egyik felét a microarray kísérletet megelőző RNS amplifikációhoz, a másik részét a microarray eredmények későbbi validálásához használtuk. Az RNS mintákat a felhasználásig -80°C-on tároltuk. Az RNS

integritás, koncentráció és az esetleges DNS szennyeződés ellenőrzése Agilent 2100 Bioanalyzer készülék és RNA 6000 Pico Chip Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) használatával történt.

A négysejtes embriókat vizsgáló kísérletnél a minél koncentráltabb minta előállítása érdekében bizonyos embrió csoportokat összevontunk, így az egyes ismétlések random egyesítéséből a vizsgálatokhoz 4 db 30-44 darabos kezelt és 4 db 24-36 darabos kontroll állt rendelkezésre. Az embrió csoportokból az RNS izolálása és minőségellenőrzése a petesejtekkel megegyező módon történt. Egyik minta esetében sem volt kimutatható RNS bomlás vagy DNS szennyeződés.

3.3.2. RNS amplifikáció, jelölés és microarray hibridizáció

A petesejtekből és négysejtes embriókból izolált RNS mennyisége önmagában nem volt elegendő ahhoz, hogy microarray hibridizációra közvetlenül felhasználható legyen, ezért az RNS jelölés előtt kétkörös amplifikációra volt szükség a megfelelő RNS mennyiség biztosítása érdekében. Ennek során a TrueLabeling-PicoAMP Kit (SABiosciences, Frederick, USA) segítségével mintánként 240 pg teljes RNS-ből a hibridizáláshoz szükséges mennyiségű komplementer RNS-t (cRNS) állítottunk elő, a gyártó előírásai szerint. A cRNS mennyiségi és minőségi ellenőrzése NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, Montchanin, USA) történt. Az RNS-amplifikálást követően kétszínű jelölést végeztünk, Cy3/Cy5 Post-Labeling Reactive Dye Pack (GE Healthcare, Waukesha, USA) kit alkalmazásával. A festékepülés hatékonyságának ellenőrzése szintén NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel történt. Az első microarray kísérlet során mind a négy kezelt és kontroll petesejt csoportból sikerült megfelelő mennyiségű cRNS-t előállítanunk. A második kísérletnél (a kezelt petesejtekből fejlődő 4 sejtes embriók vizsgálatakor), az ellenőrző mérések alapján három darab minta esetében nem volt elfogadható az amplifikált RNS, mert ezek koncentrációja a negatív kontrollénál alacsonyabb értéket mutatott. Mivel az amplifikációs kísérlet ismétlése során sem sikerült ezekből a mintákból megfelelő mennyiséget nyerni és újabb minták előállítására sem volt lehetőség, ezért csak a három megfelelő kontroll és a két megfelelő kezelt minta felhasználásával folytatódott a jelölési művelet. Azért, hogy a kezelt mintáknál is rendelkezünk a szükséges három ismétléssel, a két megfelelő kezelt minta keverékéből létrehoztunk egy harmadik, mesterséges, biológiai ismétlést. A legyűjtött mintákból és kontrolljaikból készült amplifikált/jelölt RNS hibridizációjához mindkét microarray kísérlet esetében Agilent 4x44k whole mouse genome chipet használtunk (GPL4134; Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Ezekhez a chipkekhez a gyártó Two-Color Microarray-Based Gene

Expression Analysis (kétszínű microarray-alapú génexpressziós elemzés) protokollja szerint egyenként 825 ng Cy5 jelölt kezelt és Cy3 jelölt kontroll mintát adtunk és 30 percig 60°C-on inkubáltuk őket, 10X Blocking Agent és 25X Fragmentation Buffer (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) jelenlétében. A következőkben 2x GEx Hybridization HI-RPM Buffer hozzáadása után a microarray chipet 60°C-on 17 óráig hibridizáltuk Agilent Microarray Hybridization Oven készülékben. A hibridizáció után a chipet protokoll szerint mostuk a ki nem kötődött minta eltávolítása érdekében. Végül a chipet scannelése következett Agilent Technologies Scanner G2505B készülékkel a Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis protokoll szerint.

3.3.3. Kétszínű expressziós microarray chipet leolvasása során nyert nyers adatok előzetes feldolgozása és statisztikai elemzése

A leolvasás során a scanner által készített nagyfelbontású képfájlok adatbeolvasása automatikusan, a Feature Extraction (version 9.5.1.1, Agilent Technologies, Palo Alto, USA) szoftver segítségével történt, a GE2-v5_95_Feb07 protokoll szerint. Az így nyert nyers adatokat intenzitásfüggő LOWESS módszer (Locally Weighted Scatterplot Smoothing, Cleveland 1979) használatával normalizáltuk. Ez a módszer a mérés során fellépő esetleges, a technológiából fakadó kisebb szisztematikus torzítások korrigálására ad lehetőséget (pl. a két fluoreszcens festék némiképp eltérő módon épül be a jelölés során, spot szignál érték variációk, stb.).

A normalizált adatokat a továbbiakban a GeneSpring GX 11 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) szoftver használatával elemeztük. Adattisztítás során a normalizált adatokból minden olyan spot kiszűrésre került, melyekben a pixelek intenzitása a háttér zajszintje alatt volt, illetve amelyeknél a pixelintenzitás nem követte az Agilent által készített, spoton belüli pixelintenzitásra vonatkozó hibamodellt. Ezek a kizárt spotok úgynevezett „absent” jelölést kaptak, és a további adatértékelési lépésekből kimaradtak. A HHP-kezelés hatására szignifikánsan megváltozott expressziójú gének azonosítására t-tesztet alkalmaztunk, ahol a P-érték határértékének a $P < 0,05$ határoztuk meg. A t-teszttel azonosított géneket a továbbiakban többszörös tesztelés korrekció alkalmazásával elemeztük (Benjamini és Hochberg 1995). Ez a módszer lehetőséget nyújt a több tízezer adat elemzése miatt megjelenő fals pozitív találatok kiszűrésére. Az így kapott eredményeket a továbbiakban RT-qPCR módszerrel validáltuk.

3.3.4. RT-qPCR primerek tervezése és optimalizálása a microarray eredmények validálásához

A kvantitatív real-time PCR vizsgálatokhoz a két microarray kísérlet esetében 12 illetve 8 db, az adatelemzés alapján szignifikáns expressziós változást mutató gént választottunk ki. A kiválasztott génekre a Primer3 szoftver (Rozen és Skaletsky 2000) használatával primereket terveztünk. A primertervezés során az amplifikáció hatékonyságát esetlegesen zavaró másodlagos DNS szerkezetek az mFOLD program (Zuker 2003) segítségével kerültek kiszűrésre. A primerek specifikuságának ellenőrzése a BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) szoftver segítségével történt. Belső kontrollnak az előzőekben általunk már optimalizált H2afz, Ppia illetve a Hprt1 (Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) génekre specifikus primereket használtunk. Az elkészült primerek listáját a fontosabb adatokkal a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat. A két microarray kísérlet validálása során használt primerek.

Referencia gének				
Szimbólum	GenBank azonosító	Teljes gén név	Forward és Reverse Primerek (5' to 3')	Termék méret (bp)
H2afz	NM_016750	H2A histone family, member Z	GGCAGGAAATGCGTCAAA ATGACACCACCACCAGCAA	126
Hprt1	NM_013556	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	ACAGGCCAGACTTTGTTGGA GCGCTCATCTTAGGCTTTGT	146
Ppia	NM_008907	Peptidylprolyl isomerase A	GCAAATGCTGGACCAAACAC TTCACCTTCCCAAAGACCAC	98
Petesejt vizsgálat				
Supt5h	NM_013676	Suppressor of Ty 5 homolog (S. cerevisiae)	GGCTACATTGGTGTGGTGAA ACAGAGATGGTCTGGCAGGT	80
Rnf130	NM_021540	Ring finger protein 130	ACAGTGGATCGCCTTGCTAC ACCGGCTCCTCTTTGGATT	120
Rgs10	NM_026418	Regulator of G-protein signalling 10	CGAAGGAGAGGGATGGACT TCATGCAGAGGTTGCTGTTC	129
Ptp4a2	NM_008974	Protein tyrosine phosphatase 4a2	GGCCGTTTGATGATGGAG AAGCGCAACTAGCACAGGAG	149
Lrrc8e	NM_028175	Leucine rich repeat containing 8 family, member E	TTGTGACAGGGATGGTACTT GCTGGAATTAAGGCGTGTG	179
Tbc1d10a	NM_134023	TBC1 domain family, member 10a	CATTGCTGCTGTGCTCCTC GGATTGCCTCCAGTTTCTCA	113
Mta2	NM_011842	Metastasis-associated gene family, member 2	CTCTGCCCGCTTCTTCAC CTCTCATCCCACCTCCCTTC	90
Ptp4a1	NM_011200	Protein tyrosine phosphatase 4a1	TGCATGTGCTCAAGTTCCAG CTGGCACCCAATTCTAAACC	154
Cdv3	NM_175833	Carnitine deficiency-associated gene expressed in ventricle 3	AGTGCCTGGGTTTCTCTCTG TCCATTTCTGTTCCACTCC	89

Mdh2	NM_008617	Malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)	ACCCAGTGAAGTCCACCATC ACCCTTTAGCTCTGCCACAA	134
Rps29	NM_009093	Ribosomal protein S29	GCAGTACGCGAAGGACATAG AGACTAGCATGATCGGTTCCA	96
Spcs1	NM_026911	Signal peptidase complex subunit 1 homolog (S. cerevisiae)	CATGAGCTTAAACCGCCTATG ACACACGGGAAAGAAGCATT	172
Négysejtes embrió vizsgálat				
Supt5h	NM_013676	Suppressor of Ty 5 homolog (S. cerevisiae)	GGCTACATTGGTGTGGTGAA ACAGAGATGGTCTGGCAGGT	80
Gadd45a	NM_007836	Growth arrest and DNA- damage-inducible 45 alpha	CGAGGGCTCAGAGATGACTT TTCTCGAGCTTCCTTCTTC	65
Cdca5	NM_026410	Cell division cycle associated 5	CCGAGCAGTTTGAGCTTCTG CAAGAGGCCAGCAATACCTT	172
Rpl34	NM_001005859	Ribosomal protein L34	CATGTGTGCCAAGTGTGTCC ACTCTGTGCTTGTGCCTTCA	97
Mrps18c	NM_026826	Mitochondrial ribosomal protein S18C	ATTTCTCCATTTACCGGATG TCCCTCTGTTTCTTTCCACAA	68
Eef1g	NM_026007	Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	TCCAATGAGGACACCCTCTC AGGTCTGGGTCAGCTCTTCA	115
Rps2	NM_008503	Ribosomal protein S2	ACCTGTTCTCCCTGCCCAT GCTTCTGCACTGGCATGATT	99
Rpl24	NM_024218	Ribosomal protein L24	AGAAAGGGCAGTCGGAAGA ATGGCTCGTTGGAATTTGAC	67

A megtervezett primereket a továbbiakban négy pontos, kétszeres hígítású standard sorok beállításával optimalizáltuk. A primerek specifikusságát illetve a primer-dimer hiányát melting analízissel, valamint agaróz gélelektroforézissel bizonyítottuk.

3.3.5. A validáláshoz használt cDNS szintézise

A microarray vizsgálatokhoz megtisztított RNS-t az izolálás után azonnal kettéosztottuk, és a felhasználásig -80°C -on tároltuk őket. Az RT-qPCR-el történő validálásához, a kezelésként 4x25 petesejtnek, illetve 4x12-22 embriónak megfelelő, 6 μl térfogatú RNS-ből SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) használatával cDNS-t szintetizáltunk. A reakciók térfogata 20 μl volt és az átírás a gyártó által javasolt protokoll szerint történt, azzal a módosítással, hogy a 42°C -os inkubációs időt 90 percre emeltük. Közvetlenül az átírás után a cDNS-t megfelelő koncentrációra hígítottuk, majd egyszer használatos aliquotokba osztottuk szét és a mérésekig -20°C -on tároltuk őket.

3.3.6. RT-qPCR-es validálás

Az mRNS mennyiségi meghatározása során a petesejt és a négysejtes embrió csoportokból álló kezelt mintákat és a kontrolljaikat génenként legalább 3 biológiai ismétlésben elemeztük, emellett pozitív és negatív kontrollokat használtunk minden reakcióban. A 15 µl térfogatú reakciók a következőket tartalmazták: 0,5 petesejt vagy 0,25 embrió egyenértékű cDNS, 300 nM primer és 7,5 µl SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) reakcióelegy. A real-time PCR reakciókat QIAgility pipettázó robottal (Qiagen, Hilden, Germany) mértük össze és Rotor-Gene Q real-time PCR készüléken (Qiagen, Hilden, Germany) futtattuk le. A reakciókörülményeket a 3. táblázat mutatja be. A minták „Take Off” és amplifikációs értékeit a Rotor-Gene Q Series Software 1.7 program Comparative Quantitation Analysis moduljának segítségével állapítottuk meg. Az adatok további elemzését a Relative Expression Software Tool 2008 V2.0.7 (Pfaffl et al. 2002) program alkalmazásával végeztük. A primerek specifikusságát illetve a primer-dimer hiányát melting analízissel igazoltuk. A microarray és RT-qPCR vizsgálatokkal meghatározott génexpressziós értékek közötti hasonlóságot Pearson-féle korrelációval vizsgáltuk.

3.3.7. Bioinformatikai elemzés

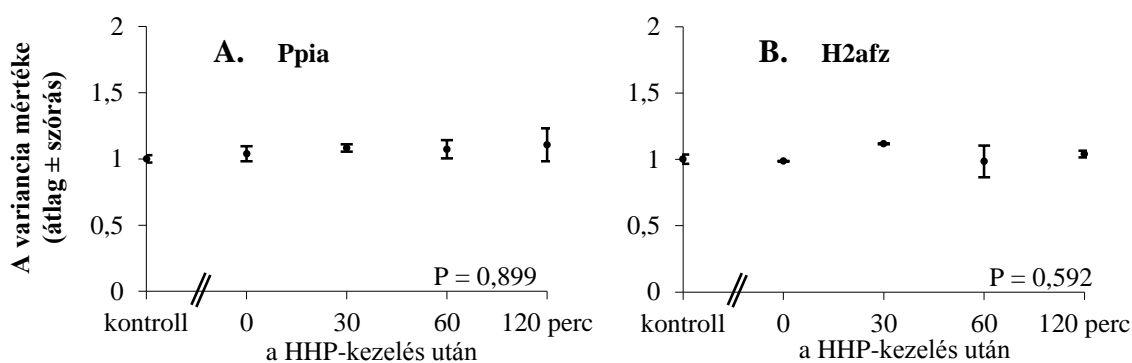
A microarray vizsgálatok során a szignifikáns expressziós változást mutató géneket a GeneSpring GX 11 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) elemzésben alkalmazott t-tesztek alapján azonosítottuk. Szignifikánsnak a $P < 0,05$ értékeket tekintettük. A t-teszttel azonosított géneket a továbbiakban többszörös tesztelés korrekció alkalmazásával elemeztük (Benjamini és Hochberg 1995), de sem a petesejt sem a négysejtes embrió vizsgálatnál kapott P-értékek nem voltak elég erősek ahhoz, hogy az elemzés szignifikancia küszöbét átlépjék ($FDR \leq 0,05$). A továbbiakban ezért kizárólag annak a mérésnek az eredményeit fogadtuk el valós változásokként, amelyet az RT-qPCR-es validálás visszaigazolt. A szignifikánsan megváltozott expressziójú gének további szűrése céljából az expresszió változás mértékére is alsó határértéket állapítottunk meg. A biológiai ismétlések közötti hasonlóságot, így az ismétlések közötti varianciát hierarchikus klaszterezés segítségével vizsgáltuk. GenesisWeb hierarchikus klaszteranalízis program (Rainer et al. 2006) Spearman-féle rangkorreláció beállításával fadiagramot készítettünk, amely a kezelt mintákat és kontrolljaikat a szignifikáns változást mutató gének expressziója alapján csoportosította. A szignifikánsan megváltozott kifejeződésű gének közötti esetleges funkcionális

kapcsolatokat a DAVID Bioinformatics Resources szoftver funkcionális annotációs eszközének (Dennis et al. 2003; Huang et al. 2009b) segítségével azonosítottuk. Ez a program a világ legrészletesebb bioinformatikai adatbázisaiban rendelkezésre álló adatok alapján olyan csoportokba rendezi a vizsgált géneket, amelyek valamely tulajdonságukban hasonlóságot mutatnak (pl. ugyanabban az anyagcsere/jelátviteli/stb. útvonalban vesznek részt). A program segítségével tehát kiemelkedő (azaz egy csoport mérete alapján a véletlen előfordulásnál nagyobb számú megváltozott expressziójú gént tartalmazó) csoportokat kerestünk a Gene Ontology (GO, <http://www.geneontology.org/>) és a Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/>) adatbázisokban. A szignifikáns csoportokat a program Fisher-féle egzakt próbával azonosítja, majd az így nyert P-értékeket Benjamini-féle többszörös tesztelés korrekciónak veti alá. Az összes adatot, amely a microarray kísérletek feldolgozása során keletkezett a NCBI Gene Expression Omnibus adatbázisba töltöttük fel (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), amely az analízis paraméterek minőségi ellenőrzése után az adatokat befogadta és a GSE28443 azonosítót rendelte hozzájuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A referenciagének stabil expressziója a HHP-kezelés után

Mivel az RT-qPCR vizsgálatok megfelelő normalizálásához stabil expressziójú referenciagének szükségesek, ezért előzetesen bizonyítani kell, hogy az adott kísérleti tényező nem befolyásolja a használni kívánt referenciagének expresszióját (Bustin et al. 2009). A normalizáláshoz a H2afz és a Ppia géneket kívántuk használni, melyekről kutatócsoportunk korábban bebizonyította, hogy az egér petesejtben és a beágyazódás előtti embrionális fejlődés során stabilan expresszálódnak (Mamo et al. 2007). Annak megállapításra, hogy a gének a nyomáskezelés után is megőrzik-e a stabilitásukat, első lépésben kezelt egér blasztocisztákban vizsgáltuk meg az mRNS szintjüket. Mivel a választott gének HHP-kezelésre adott válaszát egy 2 órás időskálán belül kívántuk vizsgálni, ezért a referencia gének expresszióját a nyomáskezelést követően ebben a tartományban, négy időpontban mértük meg (3. ábra). A $2^{-\Delta Ct}$ módszer (Schmittgen és Zakrajsek 2000) alapján kivitelezett egyutas varianciaanalízissel megállapítottuk, hogy a vizsgált időszak folyamán a H2afz és a Ppia gének expressziós szintje nem változik meg a kezeletlen kontrollhoz képest, ezek a gének tehát alkalmasak a HHP-kezelt mintákban végzett RT-qPCR mérések normalizálására.

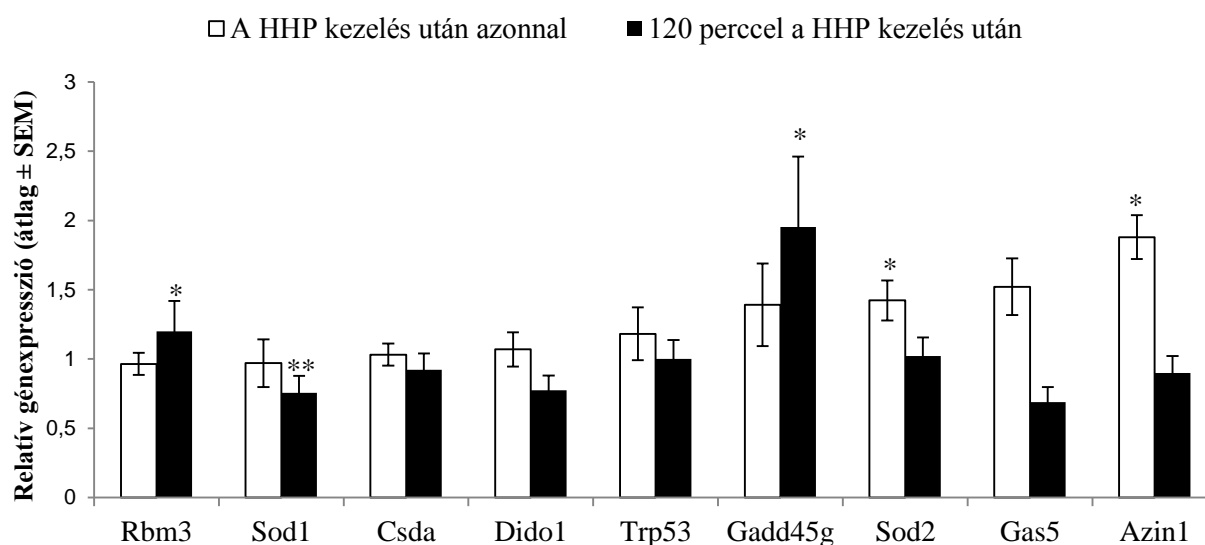


3. ábra

A HHP-kezelés hatása a Ppia (A) és H2afz (B) referencia gének expressziójára. Az embriókat a nyomáskezelés után azonnal illetve további 30, 60 és 120 perc *in vitro* tenyésztést követően gyűjtöttük be RNS izoláláshoz. A vizsgált időszak alatt a referenciagének expressziója nem változott meg a kezeletlen kontrollhoz képest.

4.2. A HHP-kezelésre adott azonnali és elhúzódó transzkripciós válasz egér blasztocisztákban

Kísérleteink során először a közvetlenül a HHP-kezelés után begyűjtött minták expressziós szintjét vizsgáltuk RT-qPCR mérésekkel (4. ábra). Megállapítottuk, hogy egyik vizsgált génnek sem csökkent az expressziója, azonban közel kétszeres, szignifikáns növekedés volt tapasztalható az antizim-inhibitor 1 (Azin1) gén esetében, valamint a mitokondriális szuperoxid dizmutáz 2 (Sod2) gén mRNS szintje is szignifikánsan megemelkedett ($P < 0,05$). Emellett a growth arrest specific 5 (Gas5) gén expressziója ugyancsak nőtt, habár csak tendenciózusan ($P < 0,1$).



4. ábra

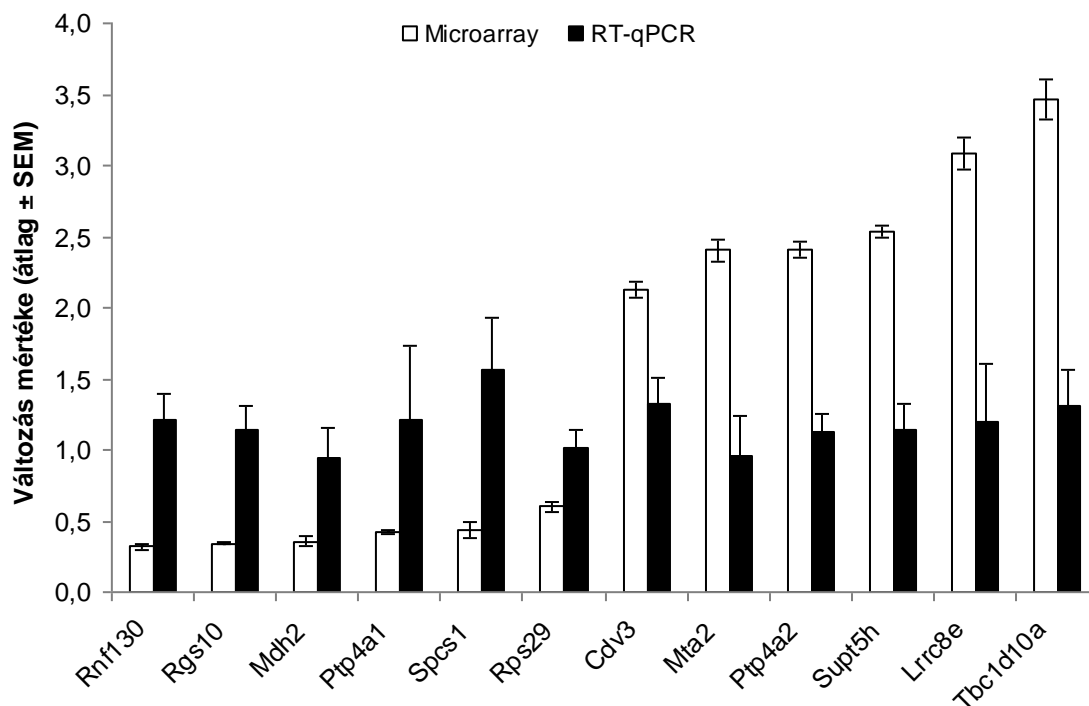
A vizsgált kilenc stressz-asszociált gén expressziós profílija 60 MPa hidrosztatikus nyomáskezelés után azonnal, illetve további 120 perc IVC-t követően. * Azok a gének, amelyek expressziója szignifikánsan nőtt; ** Azok a gének, amelyek expressziója szignifikánsan csökkent a kezeletlen kontrollhoz képest.

A nyomáskezelést követő 120 perces *in vitro* tenyésztés folyamán általános transzkriptum csökkenést figyeltünk meg a vizsgált géneknél (4. ábra). A csökkenés mértéke a réz/cink szuperoxid dizmutáz 1 (Sod1) génnél már szignifikáns volt, és emellett a death inducer-obliterator 1 (Dido1) és a Gas5 gének mutattak tendenciát a csökkenésre. A growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma (Gadd45g) és a RNA binding motif protein 3 (Rbm3) gének kivételt jelentettek, mert expressziójuk szignifikánsan emelkedett a tenyésztés alatt, ráadásul az összes vizsgált gén közül a Gadd45g mutatta a legnagyobb mértékű változást. Megállapítottuk tehát, hogy a HHP-kezelés hatással van a különböző stressz válaszokban résztvevő gének kifejeződésére. A kezelés hatására transzkriptum csökkenés és növekedés egyaránt tapasztalható volt.

4.3. A HHP-kezelésre adott globális génexpressziós válasz egér petesejtekben és négysejtes embriókban

A HHP-kezelés egér petesejtek és beágyazódás előtti embriók teljes transzkriptumára (transzkriptomára) kifejtett hatásának tanulmányozása céljából nyomáskezelt petesejteket és a belőlük fejlődött négysejtes embriókat vizsgáltunk Agilent 4x44K teljes egér genomot lefedő génexpressziós microarray segítségével. A bioinformatikai elemzés során alkalmazott t-teszt a kezelt és a kontroll petesejtek összehasonlításakor 672 szignifikáns expressziós változásra utaló oligonukleotid próbát azonosított, míg a négysejtes embriók összehasonlításakor 696-ot talált ($P < 0,05$). Azonban amikor ezeken az értékeken Benjamini Hochberg-féle többszörös tesztelés korrekciót (Benjamini és Hochberg 1995) hajtottunk végre a szignifikancia szintek egyik kísérlet esetében sem lépték át a meghatározott küszöbértéket ($FDR < 0,05$). Ez azzal magyarázható, hogy a microarray vizsgálatok a mintalimitáció miatt csak rendkívül kevés (mindössze 240 pg) teljes RNS-ből indultak ki, emiatt magasabb volt a biológiai ismétlések közötti variancia mértéke és így értelemszerűen a P-értékek is gyengébbnek bizonyultak egy szokványos kísérlethez képest. Mivel a Benjamini Hochberg-féle módszerrel nem volt lehetőségünk a fals pozitív találatok kiszűrésére, ezért kísérletenként megfelelő számú gén expressziós szintjét RT-qPCR módszerrel validáltuk, amely alapján egyértelműen megállapíthatóvá vált, hogy valós változásokat detektáltak-e a microarray vizsgálatok. A petesejteken végzett microarray vizsgálat validálásához 12, az elemzés alapján szignifikáns változást mutató gént választottunk ki, majd RT-qPCR-el elemeztük az expressziós szintjüket. A négysejtes embriók esetében 8 gént elemeztünk hasonlóképpen. A petesejt microarray eredmények validálását az 5. ábra mutatja be. Jól látható, hogy az RT-qPCR elemzés a 12 gén közül egyik esetében sem igazolta vissza a microarray analízisből származó értékeket (Pearson-féle korrelációs együttható, $r=0,02$). Az összes vizsgált gén expressziója a kontrolléval közel megegyezett, melyből egyértelműen kiderült, hogy a HHP-kezelés transzkripció szinten nem gyakorolt detektálható mértékű hatást az egér petesejtekre. A HHP-kezelés biztonságosságának szempontjából további fontos megfigyelés, hogy a 60 percig tartó 20 MPa kezelés (amely több mint százszorosa a fiziológias értéknek) nem károsítja a sejtekben található RNS molekulákat. Ezt egyrészt az Agilent 2100 Bioanalyzer készülék és RNA 6000 Pico Chip Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) használatával történt RNS minőség ellenőrzés során láthattuk, melynek eredményeként egyik mintában sem találtunk RNS-lebomlásra utaló RNS integritás értéket ($RIN=8.975\pm 0.206$; $n=4$). Másfelől, a fenti észrevétel összhangban áll az RT-qPCR-es validálás eredményével is, mely szerint nem volt eltérés a kezelt és kezeletlen petesejtek

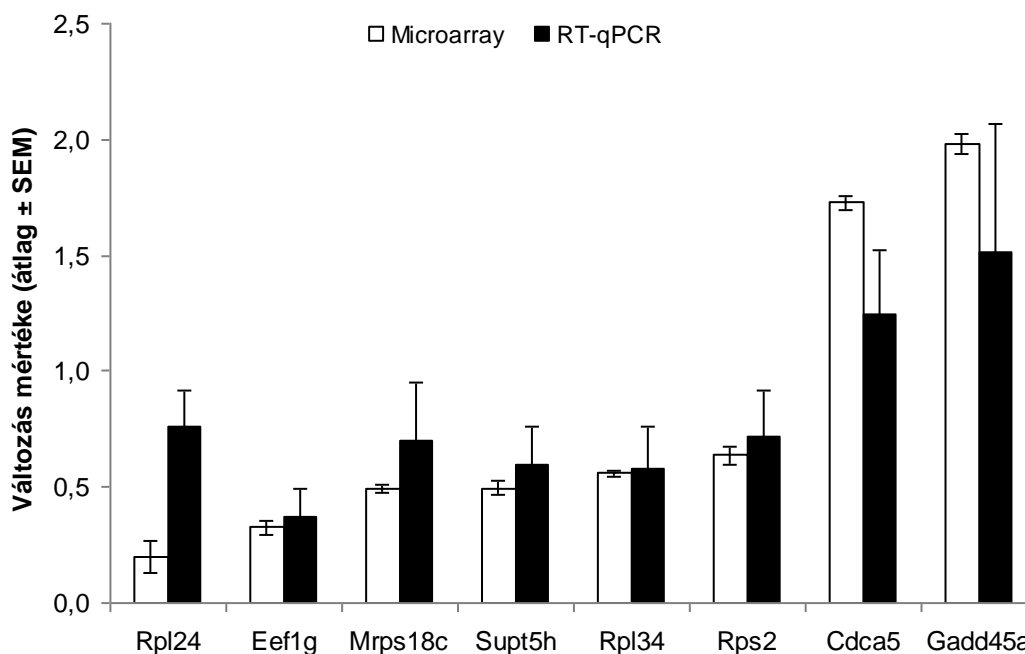
génexpressziójában, holott a vizsgált RNS integritásában bekövetkező bármilyen változás jelentős különbségeket okozhatott volna a fluoreszcencia mértékében.



5. ábra

A HHP-kezelt egér petesejtek vizsgálata során validált gének kifejeződésének változása a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva, a microarray-analízisből valamint az RT-qPCR mérésekből származó értékek alapján. A microarray által detektált értékeket az RT-qPCR validálás nem igazolta vissza.

Ezzel szemben, a kezelt petesejtekből létrehozott négysejtes embriók vizsgálata során az RT-qPCR mérés mind a nyolc gén esetében a microarray vizsgálattal megegyező irányú változást detektált ($p \leq 0,015$; Pearson-féle korrelációs együttható, $r=0,93$), ezzel egyértelműen bizonyítva, hogy az ebben a méréssorozatban beazonosított gének expressziója valóban megváltozott a nyomáskezelés hatására, tehát a microarray eredménye valós változásokat tükröz (6. ábra). A két technológia eltérő érzékenységből adódóan a változás mértékében láthatóak kisebb különbségek. Fontos még megemlíteni, hogy bár a microarray kísérletnél a mintalimitáció miatt csak két biológiai továbbá egy mesterséges ismétlést vizsgálhattunk a kezelt mintákból, az RT-qPCR elemzésnél 3 teljes értékű biológiai ismétlés igazolta vissza a microarray eredményeket.



6. ábra

A HHP-kezelt petesejtekből fejlődő négysejtes egér embriók vizsgálata során validált gének kifejeződésének változása a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva, a microarray-analízisből valamint az RT-qPCR mérésekből származó értékek alapján.

Mindegyik vizsgált gén esetében a microarray eredményekkel megegyező irányú változást detektáltunk az RT-qPCR elemzés során.

Megállapítottuk tehát, hogy az egér petesejtek transzkriptoma a HHP-kezelés hatására nem változik meg, azonban négysejtes stádiumban már egyértelmű génexpressziós válasz tapasztalható, mely a petesejt-kezelés hosszabb távú, az embriófejlődés során manifesztálódó hatásaként értelmezhető. A következőkben ezért kizárólag a négysejtes embrió microarray vizsgálat eredményeit elemeztük részletesen, az anyagok és módszerek részben bemutatott bioinformatikai programok segítségével.

Azért, hogy a továbbiakban egy olyan csoportot vizsgálhassunk, amely a HHP-kezelésre leginkább reagáló géneket tartalmazza, a 696 szignifikáns változást mutató gén közül kiemeltük azokat, amelyek expressziója minimálisan 1,5-szeres mértékben változott meg a kezelés hatására, és csak ezeket analizáltuk tovább. Az így megszürt génlista, amelyet a további elemzésekhez használtunk 250 növekedést és 255 csökkenést mutató gént tartalmazott. Ezeket a géneket részletesen a 9.3. mellékletben mutatom be. Az 5. táblázatban ezek közül a szignifikancia szint alapján legerősebb expressziós változást mutató 25-25 db gén látható, valamint a gének főbb ismert funkciói.

5. táblázat. A HHP-kezelés hatására legnagyobb expresszióváltozást mutató gének a négysejtes embriókban. A folyamat oszlopban az egyes gének főbb funkciói láthatóak. n.i.: nem ismert. ($P < 0,05$; változás mértéke $\geq 1,5$)

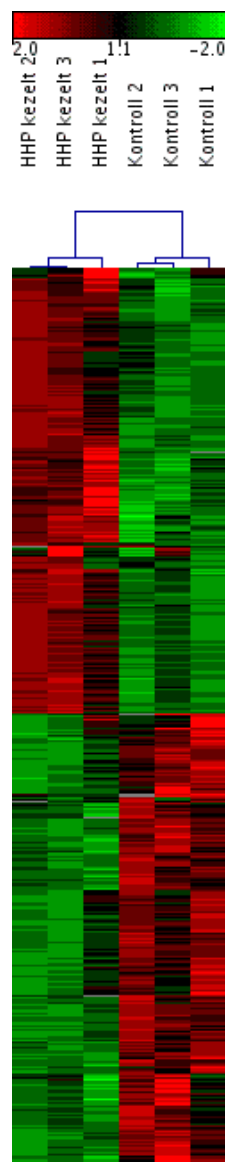
A nyomáskezelés hatására megemelkedett expressziójú gének					
Szimbólum	Entrez GeneID	P-érték	Változás mértéke	Leírás	Folyamat
<i>1110004E09Rik</i>	68001	0,00007	2,25	RIKEN cDNA 1110004E09 gene	n.i.
<i>Klk1b24</i>	16617	0,00016	2,00	kallikrein 1-related peptidase b24	proteolízis
<i>Pgd</i>	110208	0,00020	2,24	phosphogluconate dehydrogenase	D-Glükonát metabolizmus
<i>Eva1b</i>	230752	0,00041	2,62	eva-1 homolog B	n.i.
<i>Gadd45a</i>	13197	0,00095	1,98	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	stressválasz, sejtciklus szabályozás
<i>Cdca5</i>	67849	0,00097	1,73	cell division cycle associated 5	sejtciklus szabályozás
<i>Dcun1d1</i>	114893	0,00125	6,23	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 1	n.i.
<i>Phlda2</i>	22113	0,00188	2,02	pleckstrin homology-like domain, family A, member 2	embrió/méhlepény fejlődés szabályozása
<i>Iqce</i>	74239	0,00213	1,79	IQ motif containing E	n.i.
<i>Gmfb</i>	63985	0,00236	3,15	glia maturation factor, beta	aktin filamentumok képzése
<i>Mpeg1</i>	17476	0,00288	1,82	macrophage expressed gene 1	n.i.
<i>Epc2</i>	227867	0,00308	1,51	enhancer of polycomb homolog 2	DNS hibajavítás
<i>Ccdc85b</i>	240514	0,00347	2,69	coiled-coil domain containing 85B	sejtoszódás gátlása
<i>Dhx33</i>	216877	0,00350	2,04	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 33	transzkripció elősegítése
<i>Trim3</i>	55992	0,00358	1,63	tripartite motif-containing 3	fehérje szállítás
<i>Rad17</i>	19356	0,00390	1,66	RAD17 homolog	DNS hibajavítás
<i>Atmin</i>	234776	0,00393	2,07	ATM interactor	DNS hibajavítás
<i>Fbxo30</i>	71865	0,00474	1,50	F-box protein 30	ubikvitináció
<i>Stat3</i>	20848	0,00578	1,79	signal transducer and activator of transcription 3	transzkripció elősegítése, sejtoszódás gátlása
<i>Plekhm1</i>	353047	0,00635	1,52	pleckstrin homology domain containing, family M (with RUN domain) member 1	szignál transzdukció
<i>Kif5c</i>	16574	0,00644	2,59	kinesin family member 5C	sejtvázon történő szállítás
<i>Smek1</i>	68734	0,00650	1,69	SMEK homolog 1, suppressor of mek1 (Dictyostelium)	glükoneogenezis elősegítése
<i>Spata5</i>	57815	0,00661	1,70	spermatogenesis associated 5	spermatogenezis
<i>Bspry</i>	192120	0,00665	1,78	B-box and SPRY domain containing	kalcium ion szállítás
<i>Metap1</i>	75624	0,00679	1,67	methionyl aminopeptidase 1	proteolízis
A nyomáskezelés hatására lecsökkent expressziójú gének					
Szimbólum	Entrez GeneID	P-érték	Változás mértéke	Leírás	Folyamat
<i>Uqcr11</i>	66594	0,00005	1,68	ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit XI	hidrogénion szállítás
<i>Fam159b</i>	77803	0,00046	4,16	family with sequence similarity 159, member B	n.i.
<i>Fam65c</i>	69553	0,00059	2,06	family with sequence similarity 65, member C	n.i.
<i>Pcnt</i>	18541	0,00064	2,36	pericentrin (kendrin)	embrió fejlődés
<i>Mastl</i>	67121	0,00100	2,62	microtubule associated serine/threonine kinase-like	sejtciklus szabályozása
<i>Fbxo6</i>	50762	0,00121	1,58	F-box protein 6	DNS hibajavítás, hibásan gomolyodott fehérjék feldolgozása
<i>Acot13</i>	66834	0,00124	3,97	acyl-CoA thioesterase 13	metabolizmus
<i>Bptf</i>	207165	0,00127	1,89	bromodomain PHD finger transcription factor	transzkripció szabályozása
<i>Rpl34</i>	68436	0,00178	1,79	ribosomal protein L34	fehérje szintézis
<i>Emc10</i>	69683	0,00191	6,47	ER membrane protein complex subunit 10	n.i.
<i>Gm6905</i>	628696	0,00199	1,95	PREDICTED: similar to ribosomal protein L11	fehérje szintézis
<i>Fau</i>	14109	0,00200	1,76	Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed (fox derived)	fehérje szintézis
<i>Rnaseh2b</i>	67153	0,00223	2,44	ribonuclease H2, subunit B	RNS lebontás
<i>Mmps18c</i>	68735	0,00225	2,03	mitochondrial ribosomal protein S18C	fehérje szintézis
<i>Rps16</i>	20055	0,00234	1,81	ribosomal protein S16	fehérje szintézis
<i>Coa6</i>	67892	0,00285	1,94	cytochrome c oxidase assembly factor 6	hidrogénion szállítás
<i>Cebpz</i>	12607	0,00290	2,47	CCAAT/enhancer binding protein zeta	transzkripció szabályozása
<i>Rps25</i>	75617	0,00348	1,66	ribosomal protein S25	fehérje szintézis
<i>Gon4l</i>	76022	0,00373	2,87	gon-4-like	transzkripció szabályozása
<i>Sdhb</i>	66925	0,00374	4,77	succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein	hypoxia válasz
<i>Lztr1</i>	66863	0,00400	2,54	leucine-zipper-like transcriptional regulator, 1	transzkripció szabályozása
<i>Anapc13</i>	69010	0,00407	2,24	anaphase promoting complex subunit 13	sejtciklus szabályozása
<i>Hypk</i>	67693	0,00416	1,77	huntingtin interacting protein K	n.i.
<i>Tmem145</i>	330485	0,00433	1,83	transmembrane protein 145	G-fehérje kapcsolt receptor jelátvitel
<i>Lrrc58</i>	320184	0,00443	1,92	leucine rich repeat containing 58	n.i.

A teljes génlistán először az ismétlések közötti varianciát kívántuk vizsgálni fadiagram készítésével, amelyhez a GenesisWeb hierarchikus klaszteranalízis programot használtuk (Rainer et al. 2006) Spearman-féle rangkorreláció beállításával. Ez a program a vizsgált gének különböző

mintákban mért expressziós értékének összehasonlítása alapján olyan csoportokba rendezi a minták ismétléseit, melyekben az expressziós értékek hasonlóak, illetve a gének változásának az iránya is megegyezik. Az így elkészült fadiagramon látható (7. ábra), hogy a program a kezelt mintákat és a kontrolljaikat lefedő 3-3 ismétlést két külön szuperkategóriába csoportosította az 505 szignifikánsan megváltozott expressziójú gén kifejeződése alapján. A fadiagram expressziós hőtérképén az is jól látszik, hogy az egyes mintáknál mért változások megismételhetőek voltak a microarray vizsgálat során, amely az RT-qPCR-es validálással összhangban bizonyítja, hogy a négysejtes microarray eredményei valós változásokat mutatnak.

7. ábra

A négysejtes embrió kísérlet ismétléseinek hierarchikus klaszterezése során kapott fadiagram és expressziós hőtérkép ("heat map"). A színskála a detektált expressziós értékeket mutatja 2 és -2 közötti értéktartományban. A „HHP-kezelt 1-3” a nyomáskezelt és a „Kontroll 1-3” a kezeletlen kontroll ismétléseket mutatja.



4.3.1. A translációban résztvevő gének jelentős expresszió csökkenése a négysejtes embriókban

Az előzetes validálási módszereket követően, a továbbiakban a valós változásokat tükröző négysejtes embrió microarray analízise során talált gének funkcionális kapcsolatait vizsgáltuk a DAVID Bioinformatics Resources program (Dennis et al. 2003; Huang et al. 2009b) alkalmazásával. A szoftver segítségével olyan Gene Ontology (GO) kategóriákat kerestünk, amelyekben a véletlen előfordulás alapján vártnál jelentősen több gén szerepel a vizsgált 505 gén közül. Mivel a funkcionális analízis során alkalmazott módosított Fisher-féle egzakt próba által kalkulált P-értékek olyan erősnek bizonyultak, hogy többszörös tesztelés korrekció alkalmazására is lehetőség volt, ezért a továbbiakban csak azokat a kategóriákat vizsgáltuk, amelyek a korrekció után is átlépték a szignifikancia határértékét ($FDR < 0,05$). Így az elemzés 21 olyan GO kategóriát talált, amelyben a vártnál szignifikánsan magasabb volt a megváltozott expressziójú gének száma, és amelyek statisztikailag nem tartalmaztak fals pozitív találatokat (6. táblázat). Az egyes kategóriákat és az oda tartozó gének adatait részletesen a 9.4. melléklet mutatja be.

A 21 kategória vizsgálata során a „transzláció” (translation) volt az egyetlen, rendkívül erős P-értékkel azonosított GO biológiai folyamat. Ezzel összhangban a GO molekuláris funkció kategóriából a „riboszóma strukturális alkotórésze” (structural constituent of ribosome; $P=2,20E-19$) és a GO sejt alkotórész kategóriából a „riboszóma” (ribosome; $P=1,60E-21$) csoportok rendelkeztek a legerősebb szignifikancia értékekkel. Ezek mellett számos további, a transzláció folyamatához tartozó kategóriát szignifikánsként azonosított a program, amely arra utal, hogy a fehérje szintézis folyamatát jelentősen befolyásolja a HHP-kezelés. A Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) adatbázisban való keresés eredménye is megerősítette a GO adatbázisban találatokat, mivel itt az egyetlen szignifikáns kategóriának a „riboszóma” (ribosome $P=8,2E-26$) csoport bizonyult. Az elemzés kiemelten fontos megfigyelése volt továbbá, hogy a translációval kapcsolatos csoportok mindegyike döntő többségben (94-100%-ban) csökkent expressziójú géneket tartalmazott. A funkcionális elemzés eredményei alapján tehát nagy valószínűséggel megállapíthatóvá vált, hogy a HHP-kezelés hatására a fehérje szintézis mértéke csökken a kezelt petesejtekből fejlődött beágyazódás előtti egér embriókban.

6. táblázat. A DAVID programmal végzett funkcionális kategorizálás során azonosított szignifikáns Gene Ontology kategóriák. A többszörös tesztelés korrekción átesett P-értékeket a Benjamini oszlop mutatja. Az egyes csoportokhoz rendelt gének számát a „megemelkedett/lecsökkent expressziójú gének” oszlopok mutatják aszerint, hogy a HHP-kezelés hatására nőtt vagy csökkent az expressziójuk. * A „lecsökkent expressziójú gének aránya” a csökkenő expressziójú gének százalékát mutatja az adott csoportba tartozó összes, megváltozott kifejeződésű gén számához képest. A 90%-nál magasabb arányt aláhúzással emeltem ki.

Kategória	GO elnevezés	Benjamini	Megemelkedett expressziójú gének	Lecsökkent expressziójú gének	A lecsökkent expressziójú gének aránya*
Biológiai folyamat (Biological Process)					
	transzláció (translation)	1,00E-11	2	35	<u>95</u>
Molekuláris funkció (Molecular Function)					
	a riboszóma szerkezeti alkotórésze (structural constituent of ribosome)	2,20E-19	1	32	<u>97</u>
	szerkezeti építés (structural molecule activity)	1,10E-09	5	34	87
	RNS kötés (RNA binding)	6,00E-03	7	27	79
	nukleotid kötés (nucleotide binding)	8,30E-03	47	31	40
Sejt alkotórész (Cellular Component)					
	riboszóma (ribosome)	1,60E-21	1	37	<u>97</u>
	ribonukleofehérje egység (ribonucleoprotein complex)	2,60E-18	3	48	<u>94</u>
	nem-membrán kapcsolt szervecske (non-membrane-bounded organelle)	5,30E-08	18	68	79
	sejten belüli nem-membrán kapcsolt szervecske (intracellular non-membrane-bounded organelle)	5,30E-08	18	68	79
	riboszóma alegység (ribosomal subunit)	2,10E-05	0	12	<u>100</u>
	riboszóma kis alegység (small ribosomal subunit)	2,10E-03	0	7	<u>100</u>
	citoplazmatikus riboszóma (cytosolic ribosome)	2,50E-03	0	6	<u>100</u>
	sejtmagvacsk a (nucleolus)	4,30E-03	6	14	70
	citoplazmatikus riboszóma nagy alegység (cytosolic large ribosomal subunit)	1,40E-02	0	4	<u>100</u>
	mitokondrium (mitochondrion)	2,50E-02	17	32	65
	membránnal-körülzárt lumen (membrane-enclosed lumen)	2,70E-02	14	31	69
	citoszol (cytosol)	2,70E-02	6	20	77
	sejtmag lumen (nuclear lumen)	2,70E-02	11	25	69
	szervecske lumen (organelle lumen)	2,90E-02	14	29	67
	sejten belüli szervecske lumen (intracellular organelle lumen)	3,00E-02	14	29	67
	riboszóma nagy alegység (large ribosomal subunit)	3,70E-02	0	6	<u>100</u>

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Napjainkban egyre több információ áll rendelkezésünkre arról, hogy a magas hidrosztatikus nyomáskezelés hogyan befolyásolja az emlős ivarsejtekben vagy embriókban lezajló sejtbiológiai folyamatokat (lásd irodalmi áttekintés), azonban munkám megkezdésekor kizárólag Huang és munkatársai (2009a) eredményei álltak rendelkezésre erről a területről. A mikrobák esetében viszont több mint egy évszázada alkalmazzák már a HHP-technikát (Hite 1899), és részletes irodalom számol be arról, hogy milyen hatást gyakorol a nyomáskezelés a sejtekre (lásd irodalmi áttekintés). Első kísérleteink során ezért leginkább az egysejtűeknél már rendelkezésre álló adatokra támaszkodhattunk. Mikrobákban végzett globális génexpressziós vizsgálatokkal már sikerült olyan funkcionális géncsoportokat találni, amelyek tagjai részt vesznek a HHP-sokk hatására kialakuló válaszreakciókban (Vogel et al. 2005; Fernandes 2005; Malone et al. 2006; Bowman et al. 2008). A leginkább befolyásolt útvonalak között megtalálható volt a stresszválasz, a fehérjeszintézis és az anyagcsere. Japán kutatók olyan géncsoportokat is azonosítottak már, amelyek mind a hideg, mind a magas nyomású környezetben való növekedés során fontos szerepet játszanak (Abe és Minegishi 2008). Ilyenek például az aminosav bioszintézis, a mitokondrium működés illetve a membrán transzport folyamataiban résztvevő gének.

Munkám során először azt kívántam vizsgálni, hogy a magas hidrosztatikus nyomáskezelés hatással van-e egér blasztociszták génexpressziójára. Ehhez a vizsgálathoz a mikrobákon rendelkezésre álló irodalom alapján olyan géneket kerestünk, amelyek az emlős embriókban is aktiválódhatnak a HHP-kezelés hatására. Figyelembe vettük továbbá kutatócsoportunk korábbi eredményeit, melyek vitrifikált nyolcsejtes egér embriók microarray vizsgálata során születtek (Mamo et al. 2006), így olyan géneket választhattunk, amelyek esetleg a fagyasztás okozta stressz elleni védekezésben is részt vesznek. Így a vizsgált stressz útvonalak közé került a sejtosztódás-gátlás, az apoptózis, az oxidatív-stressz és a hideg-sokk. Azért, hogy a HHP-kezelés közvetlen és hosszabb távú hatását is tanulmányozhassuk, a kezelt blasztocisztákból a dekompreszió után azonnal és a nyomáskezelést követő 120 perces *in vitro* tenyésztés után is mintát vettünk. A kezelési csoport kiválasztásakor figyelembe vettük Dr. Losonczy Eszter és munkatársai eredményeit, melyek egér *in vivo* és *in vitro* expandált blasztociszták összehasonlításakor azt mutatták, hogy 20 MPa kezelés nem okozott morfológiai elváltozást az embriókban, de 40 MPa vagy ennél magasabb nyomás a blasztocöl reverzibilis összeesésével járt. A kísérlet fontos megfigyelése volt, hogy az *in vivo* embriók blasztocöljének összeeséséhez magasabb nyomásra volt szükség az *in vitro* tenyésztettekéhez képest (Bock et al. 2010). Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy az *in vitro*

tenyésztett hólyagsírák stressztoleranciája valamelyest csökken a tenyésztési körülmények hatására. Ez nem meglepő, hiszen az előzőekben bemutatott számos vizsgálat bizonyítja, hogy az *in vitro* embriók érzékenyebbek a fagyasztás okozta stresszre is. A HHP kezeléshez ezért *in vivo* gyűjtött blasztocisztákat használtunk, így csökkentve minimálisra a transzkripciót esetlegesen befolyásoló egyéb hatásokat. Eredményeink azt mutatták, hogy a HHP-kezelés után közvetlenül az Azin1 és az Sod2 gének, a további 120 perces *in vitro* tenyésztés során pedig a Gadd45g és az Rbm3 gének expressziós szintje szignifikáns mértékben megemelkedett. Mivel az utóbbi gének a kezelést követően azonnal nem mutattak génexpressziós változást, megállapítható volt, hogy az embriók hosszabb távú válaszreakciójában vesznek részt. Az említett két génen kívül, a nyomáskezelést követő 120 perc folyamán általános transzkriptum csökkenés volt megfigyelhető, melyből a Sod1 gén csökkenése szignifikánsnak bizonyult. Ez a megfigyelés összhangban van a Siqueira Filho és munkatársai (2011) által szarvasmarha blasztocisztákon végzett kísérletek eredményével, amely azt mutatta, hogy a vizsgált gének expressziója a nyomáskezelés után 1 órával volt a legmagasabb, majd újra csökkenésnek indult. Az Rbm3 egy hideg-sokk hatására aktiválódó gén, és fő funkciója a fehérje-szintézis lehetővé tétele a fiziológiánál hidegebb környezetben (Dresios et al. 2005). Ennek a génnek a megemelkedett mRNS szintje tehát arra utalhat, hogy a HHP-kezelés olyan védekezési folyamatokat is aktivál, amelyek a sejteket fagyasztáskor illetve kiolvasztáskor érő hideg-sokk során is biztosítják a stabil működést. A szolubilis szuperoxid dizmutáz (Sod1) és a mitokondriális szuperoxid dizmutáz (Sod2) géneknél tapasztalt eltérő expressziós szint arra utalhat, hogy a citoplazma kevésbé, de a mitokondrium jobban ki van téve az oxidatív stressznek a nyomáskezelés következtében. Ezzel kapcsolatban megjegyzendő, hogy amikor szarvasmarha blasztocisztákban az egér Sod2 ortológját vizsgálták, eredményeinkhez hasonlóan a nyomáskezelést követően expresszió emelkedést, majd 2 órával később csökkenést mutattak ki, bár ez nem volt szignifikáns (Siqueira Filho et al. 2011). A Gadd45g és a Gas5 gének a sejtosztódás gátlásában is részt vesznek (Smith és Steitz 1998; Zhan et al. 1994). Egér embriókban a vitrifikáció hatására a Gadd45g expressziós szintje hasonló mértékben növekedett, mint a nyomáskezelésnél (Mamo et al. 2006), elképzelhető tehát, hogy előnyt jelent a sejt számára, ha a HHP-kezelés hatására már a fagyasztás előtt aktiválódik ez a gén. Hasonlóan az előző két génhez a szignifikánsan megemelkedett szintet mutató Azin1 is fontos szerepet tölt be a sejtnövekedés szabályozásában, a poliamin szintézis befolyásolásán keresztül (Tang et al. 2009). Az említett gének magasabb mRNS szintje arra utalhat, hogy az embrió úgy védekezik a nyomáskezelés okozta stressz ellen, hogy lelassítja vagy akár teljesen felfüggeszti a növekedését, egészen addig, amíg újra megfelelő körülmények közé kerül. Ez a visszafogott növekedési állapot segítséget jelenthet a következő (pl.: fagyasztás okozta) stressz leküzdésében, mert így a már védekező állapotban lévő

sejteket a megváltozott környezet kevésbé tudja károsítani. Az elmélettel összefüggésben élesztőben megfigyelték már, hogy a szubletális tartományban alkalmazott magas hidrosztatikus nyomáskezelés a normál sejtciklus átmeneti megállását eredményezi a G2 fázisban (George et al. 2007). Több tanulmány szerint a Gadd45g, az Azin1 és a Gas5 gének az endoplazmás retikulum (ER) stressz válaszában is részt vesznek (Williams és Lipkin 2006; Belmont et al. 2008), továbbá az is bizonyított, hogy az ER membrán érzékeny a magas hidrosztatikus nyomásra (Mentré et al. 1999; Frey et al. 2008). Az endoplazmás retikulomot ért stressz hatására kialakuló zavar a fehérjék gombolyodásában a nem megfelelő szerkezetű fehérjék felgyülemelését okozza a durva felszínű ER lumenében. Emiatt a sejtben különböző fehérje gombolyító és lebontó útvonalak aktiválódnak, ami a fehérje szintézis gátlásával jár (Rutkowski és Kaufman 2004). Valószínűsíthető, hogy az említett három gén expressziós szintje az endoplazmás retikulomot ért stressz következtében emelkedik meg, ez a változás pedig olyan következményekkel járhat, mint például a sejtnövekedés vagy a fehérje transzláció lassulása. Ezzel összhangban az ún. GADD géncsaládról azt feltételezik, hogy az ER stressz következtében fejt ki szabályozó hatását a sejtek osztódására és növekedésére (Outinen et al. 1999).

Kísérletünkben bizonyítottuk, hogy a magas hidrosztatikus nyomáskezelés változásokat okoz a génkifejeződésben egér blasztocisztákban. Az eredmények alapján feltételezhető, hogy egyes sejtnövekedést szabályozó gének regulációja a durva felszínű endoplazmás retikulomot ért HHP-stressz hatására változik meg, ennek következtében az embriókban az osztódási folyamat ideiglenesen lelassul vagy megáll, amely segítséget jelenthet a következő (pl. fagyasztás okozta) stressz tolerálásában. Egy további kísérletben, a HHP *in vivo* fejlődésre kifejtett hatásának vizsgálata céljából 60 MPa nyomással, 1 óráig kezelt egér blasztociszták álterhes nőstényekbe kerültek beültetésre. Az így világra jött utódok az élethosszukban és reprodukciós képességükben nem mutattak szignifikáns különbséget a kontrollhoz képest sem a közvetlen utódoknál sem a pároztatásukból származó második generációban (Bock et al. 2010), tehát a HHP-kezelésnek nem volt kimutatható káros hatása hosszabb távon sem. Ez további bizonyítékot jelent arra nézve, hogy az optimális mértékben alkalmazott szubletális stressz által kiváltott génexpressziós változások reverzibilisek és nem károsak az embriók számára.

Szarvasmarhánál IVP blasztocisztákban vizsgálták a HHP-kezelés hatására bekövetkező változásokat néhány oxidatív- és hőstressz, valamint a lipid metabolizmusban résztvevő gén mRNS szintjében, szemikvantitatív RT-PCR (reverz transzkripció polimeráz láncreakció) módszerrel (Siqueira Filho et al. 2011). Az eredmények azt mutatták, hogy a vizsgált gének expressziója 1 óra regenerációs idő után volt a legmagasabb, majd újra csökkenésnek indult. A változások mértéke azonban inkább csak tendenciát mutatott és egyedül a lipid metabolizmusban résztvevő sterol-C4-

methyloxidáz (SC4MOL) gén esetében volt szignifikáns. A kísérlet eredményei azt sugallják, hogy a nyomáskezelés mellett a stresszhatás utáni regenerációs időnek is jelentős hatása van a HHP-aktivált gének expressziójára.

Juh blasztocisztákban a HHP-kezelés hatását Bogliolo és munkatársai (2011) RT-qPCR módszerrel vizsgálták. Ehhez 70 percig 40 MPa nyomással kezelték IVP hólyagszöveteket, majd 8 választott gén expresszióját mérték meg. Az elemzés azt mutatta, hogy a HHP-kezelés hatására jelentősen csökkent a BCL2-associált X protein (BAX) és az Octamer-binding protein 4 (OCT4) expressziós szintje. Mivel a BAX gén a pro-apoptotikus szabályozásban is szerepet játszik, ezért csökkent szintje összhangban van az irodalmi áttekintésben taglalt piknózis vizsgálat eredményével, mely szerint a nyomáskezelés anti-apoptotikus hatással is rendelkezik. A kutatók az OCT4 gén alacsonyabb expressziós szintjét pedig azzal magyarázták, hogy a kezelt embriók már egy fejlettebb, előrehaladottabb állapotba juthattak ekkorra a kontrollhoz képest. Ezt támasztja alá az is, hogy a nyomáskezelt blasztocisztákban a kontrollhoz viszonyítva magasabb sejtszámot lehetett mérni (Bogliolo et al. 2011).

Az egér blasztocisztákon végzett RT-qPCR-es kísérletünkkel sikeresen bizonyítottuk, hogy a HHP-kezelés befolyásolja az egér embriók transzkripcióját, majd ezt követően több kutatócsoport is hasonló eredményekről számolt be. Mivel azonban ezek a kísérletek csak néhány kiválasztott gén vizsgálatára terjedtek ki, ahhoz hogy a nyomás-stressz kiváltotta folyamatokat átfogóan tanulmányozhassuk a teljes genomot lefedő vizsgálatokra volt szükség. Az ilyen vizsgálatokhoz a leggyakrabban génextpressziós microarrayeket használnak. A rendkívül kevés sejtet tartalmazó minták (mint például petesejtek és embriók) vizsgálata azonban sokáig nem volt lehetséges a microarray módszer magas RNS igénye miatt (Bermudez et al. 2004; Kalisky and Quake 2011). Erre a problémára a megoldást az exponenciális és a lineáris amplifikációs módszerek hozták el (Eberwine et al. 1992; Van Gelder et al. 1990). Napjainkban a legelterjedtebben a polimeráz láncreakción (PCR) és az *in vitro* transzkripción (IVT) alapuló technikákat használják (Chiang and Melton 2003, Luo et al. 1999). Ezek az amplifikációs eljárások lehetővé teszik, hogy akár egyetlen sejt teljes transzkriptómát vizsgálhassuk microarray technika segítségével. A globális génextpressziós vizsgálatok során ezért a megfelelő RNS mennyiség biztosítása érdekében a petesejtekből és embriókból származó RNS-t kétkörös IVT-n alapuló módszerrel amplifikáltuk, így elegendő komplementer RNS állt rendelkezésre a hibridizáláshoz.

A microarray vizsgálataink során egér petesejtek és embriók teljes transzkriptómájának a változását kívántuk vizsgálni. Azért az egérre, mint modellszervezetre esett a választásunk, mert ennél a fajnál már bizonyított a nyomáskezelés előnyös hatása (lásd irodalmi áttekintés), valamint az emberi genom után az egér genomja a leginkább karakterizált (Stamatoyannopoulos et al. 2012).

A globális hatást elemezve célunk volt azoknak a sejteken belül zajló folyamatoknak az azonosítása, amelyeket a magas hidrosztatikus nyomáskezelés döntően befolyásol. Munkánk során először egér petesejtek transzkripcionális válaszát vizsgáltuk génexpressziós microarray technika alkalmazásával. A megtermékenyítéskor a spermium citoplazmájából a petesejtbe jutó alkotórészek csak kis mértékben járulnak hozzá az embriógenézis folyamatához (Sutovsky és Schatten 2000) és a zigóta ekkor még transzkripcionálisan inaktív (Schier 2007), így a megtermékenyített petesejt a fejlődése során egészen az embrionális genom aktivációig (EGA) a benne előzetesen felhalmozódott anyai RNS és fehérje készletre kell, hogy támaszkodjon (Bachvarova és De Leon 1980; Cascio és Wassarman 1982). Az anya-zigóta átmenet (maternal-to-zygotic transition, MZT) elindulásáig a petesejt számára tehát létfontosságú az anyai RNS készlet, ezért első vizsgálatunk során azt kívántuk tanulmányozni, hogy az ekkor bekövetkező nyomás-stressz hatással van-e az anyai RNS készletre, például szelektív degradáció előidézésével (Sirard 2012). Az egérben a *de novo* RNS szintézis kétsejtes állapotban indul el az EGA során (Bolton et al. 1984; Li et al. 2010), ezért a petesejtet ért hatások által indukált olyan rejtett változások, amelyek a transzkripciót befolyásolják, ekkortól válnak láthatóvá. Azért, hogy azt is tanulmányozhassuk, hogy a HHP-kezelés generál-e ilyen változásokat, a nyomáskezelt egér petesejteket ICSI-módszer segítségével megtermékenyítettük, majd az ezt követően kifejlődő embriók expressziós profilját négysejtes állapotban elemeztük, génexpressziós microarray technika alkalmazásával. Így tehát lehetőségünk nyílt a petesejtet ért HHP beágyazódás előtti embriófejlődés során megnyilvánuló hatásának tanulmányozására.

A microarray kísérletek kiértékelésekor egyértelművé vált, hogy a HHP-kezelt petesejtekben és a belőlük létrehozott négysejtes embriókban teljesen eltérő reakciót vált ki a szubletális stressz. A microarray eredmények RT-qPCR-el történő validálása alapján a petesejtek RNS állományában nem következett be kimutatható változás a nyomáskezelés hatására, valamint a megállapított RNS integritás érték alapján sem volt tapasztalható RNS-bomlás. Ez utóbbi egy fontos megállapítás a HHP-kezelés biztonságosságának szempontjából, hiszen a kísérletünkben a petesejteket a normális nyomásérték több mint százszorosa (20 MPa) érte 60 percig, ez azonban eredményeink szerint nem okoz károsodásokat a petesejtek RNS készletében. Megfigyeléseink összhangban állnak Lin és munkatársai (2014) a közelmúltban publikált eredményeivel. Ebben a kísérletsorozatban a kutatók sertés petesejtekben és embriókban tanulmányozták a nyomáskezelés hatását figyelembe véve, hogy a faj számos humán betegség ideális modellállata. Első lépésben sertés petesejteket kezelték 20 MPa nyomással 60 percen keresztül, majd a nyomáskezelés után parthenogenetikus aktiválással (PA) vagy kézi klónozással (HMC) embriókat hoztak létre belőlük. Ezután a kezelt petesejtek, illetve a belőlük létrehozott embriók transzkriptomát a kezeletlen kontrollokhoz hasonlítva

GeneChip Porcine Genome Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) microarray platformon vizsgálták. Az eredmények kiértékelése során többszörös tesztelés korrekciót alkalmaztak a kutatók és megállapították, hogy a sertés petesejtekben csak nagyon kevés, mindössze 6 gén reagál expresszióváltozással a HHP-kezelésre. Összhangban tehát az egér petesejtekénél tapasztaltakkal, a sertés petesejtek transzkriptomának is több mint a 99.99 %-a változatlan maradt egy hasonló mértékű nyomáskezelés után (Lin et al. 2014).

A közvetlen hatástól eltérően a petesejteket ért nyomás-stressz a négysejtes embrió stádiumban már figyelemre méltó transzkripcionális válaszreakciót váltott ki. Az eredmények arra utalnak, hogy a magas hidrosztatikus nyomáskezelés jelentős hatást fejt ki a petesejtek intracelluláris folyamataira, ez azonban transzkripcionális szinten a kezelés után közvetlenül még nem detektálható. A továbbiakban viszont, az EGA elindulásával ez a hatás az embriók RNS készletében lényeges változásokat generálva láthatóvá válik. Az azonos módon nyomáskezelt, majd parthenogenetikus aktiválással (PA) vagy kézi klónozással (HMC) létrehozott négysejtes sertés embriók esetében Lin és munkatársai (2014) ettől jelentősen eltérő expressziós profilt találtak. Ezekben az embriókban csak nagyon kevés gén reagált expresszióváltozással a HHP-kezelésre. A kézi klónozással létrehozott embriók például egyáltalán nem mutattak eltérést az alapján, hogy kezelt vagy kontroll petesejtekből származnak-e és a parthenogenetikusan aktivált embrióknál is összesen csak 33 gén expressziós szintje változott meg. A vizsgálati csoportok hierarchikus klaszterezése is arra utalt, hogy a megváltozott kifejeződésű gének száma nagyon kevés, mert az expresszióváltozáson alapuló elemzés nem tudta elkülöníteni egymástól a nyomáskezelt és a kontroll embrió csoportok ismétléseit (Lin et al. 2014). Az egér és sertés embrióknál tapasztalt eltérő eredmények egyrészt a fajok között fennálló jelentős különbségekkel magyarázhatók, de emellett az is okot adhat az eltérésekre, hogy kísérletükben Lin és munkatársai parthenogenetikus aktiválással, illetve kézi klónozással indították el az embriófejlődést. Vizsgálatainkban ettől jelentősen eltérően intracitoplazmatikus spermium injektálás útján termékenyítettük meg az egér petesejteket, amely jóval közelebb áll az *in vivo* eseményhez, így megbízhatóbban reprezentálja a sejtek stresszhatásra adott természetes válaszreakcióit.

Azért, hogy betekintést nyerjünk a négysejtes egér embrióknál szignifikánsan megváltozott kifejeződésű gének sejtműködésben betöltött szerepébe, a továbbiakban funkcionális kategorizálással csoportosítottuk őket. Az elemzés azt mutatta, hogy a HHP-kezelésre nagyszámú, a translációban résztvevő gén reagált jelentős expresszióváltozással. Ez a gének döntő többségénél expresszió csökkenést jelentett. Az eukariótákban a riboszómák négy fajta riboszómális RNS-ből (rRNS) és további 79 különböző riboszómális fehérjéből (r-fehérje) állnak (Wool 1979; Nakao et al. 2004). A tanulmányunkban 37 lecsökkent és 1 megemelkedett expressziójú gént azonosítottunk,

amelyek a riboszóma építőelemei. Ez a megfigyelés egyértelműen azt mutatja, hogy a riboszómális fehérjék többsége transzkripcionálisan gátolódik a HHP-kezelés következtében. Megjegyzendő, hogy a rRNS-ek közül egyik sem reagált a nyomáskezelésre, így valószínű, hogy ezeknek a géneknek a HHP-stresszre adott válasza eltérő módon szabályozódik, mint a riboszómális fehérjéké. Az r-fehérjék jelentős gátlása arra utal, hogy a HHP-stressz megállította/felfüggesztette a sejtekben a riboszóma összeszerelést, ezáltal pedig ideiglenesen korlátozta a fehérje szintézis mértékét. Ezek az eredmények összhangban vannak a mikrobáknál már jól ismert jelenséggel, miszerint a magas hidrosztatikus nyomáskezelés a riboszómák disszociációjával jár (Schulz et al. 1976; Gross és Jaenicke 1990; Gross et al. 1993; Niven et al. 1999; Alpas et al. 2003) és ez a sejtek osztódását is jelentősen gátolja (Gross et al. 1993). Mindazonáltal, meghatározott nyomásérték alatt ez a folyamat teljesen visszafordítható, tehát a dekompresszió után a fehérje szintézis újraindul. *Escherichia coli* baktériumoknál ez a határ 100 MPa (Mackey és Mañas 2008). Patkány májsejtekben is megfigyelték már, hogy a riboszómák működése gátolódik a magas hidrosztatikus nyomás következtében, amely azonban 120 MPa alatt teljesen visszafordíthatónak bizonyult (Lu et al. 1997). Így feltételezhető, hogy az emlős ivarsejteknél és embrióknál az előbbiekhöz hasonló módon, a szubletális HHP-kezelés a riboszómák reverzibilis gátlását okozza.

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy az optimális tartományban alkalmazott HHP stressz a transláció rövidtávú gátlásával jár, majd a szétesett riboszómák ismét összeszerelődnek és a sejtekben újraindul a fehérje szintézis. Ez az ideiglenes gátlás *in vivo* és *in vitro* embriológiai megfigyelések alapján nem érinti hátrányosan az embriók fejlődési képességét. Ezzel összhangban szarvasmarha petesejtek 6 órán át tartó, optimális mértékű gátlása a fehérje szintézisben nem csökkentette a kezelt petesejtekből fejlődő embriók blasztociszta képzési és kibújási arányát (Lonergan et al. 1998). Az *in vitro* megtermékenyítéssel létrehozott, majd vitrifikált szarvasmarha blasztocisztákban a fagyasztás okozta stressz ugyancsak a translációs útvonal jelentős gátlását okozza, rámutatva ezzel arra, hogy a fehérje szintézis megfelelő regulációja kulcsfontosságú az embriómélyhűtés során (Aksu et al. 2012). Mivel a riboszóma bioszintézis a leginkább energiaigényes folyamat az eukarióta sejtekben (Warner 1999; 2001), ezért az r-fehérjék transzkripciójának csökkenésével illetve a translációs folyamatok átmenteti lassulásával a sejtek jelentős mennyiségű intracelluláris energiát takaríthatnak meg. A fiziológias körülmények között növekvő embriókban a metabolikus folyamatok relatíve magas intenzitással zajlanak azért, hogy biztosítsák a háttérrel a folyamatos osztódáshoz. Így amikor egy jelentős (pl.: fagyasztás okozta) stresszhatás éri őket, gyakran nem képesek elég rugalmasan alkalmazkodni a megváltozott környezethez, amely végzetes lehet a számukra. Ezzel összhangban mélyfagyasztott, majd kiolvasztott humán embriók vizsgálatok azt mutatták ki, hogy azok az embriók, amelyek nem

tudnak a blasztociszta állapotig fejlődni, túl aktív aminosav metabolizmussal rendelkeznek. A sikeresen fejlődő társaik ehhez képest sokkal lassabban állítják elő és használják fel az aminosav készletüket (Stokes et al. 2007). Ezek az eredmények és az általunk felvázolt teória is jól beleillenek az úgynevezett Csendes Embrió Hipotézisbe (Quiet Embryo Hypothesis), amely részletes adatok alapján azt feltételezi, hogy azok a beágyazódás előtti embriók az életképesebbek, amelyek anyagcsere folyamatai általánosságban alacsonyabb szinten zajlanak (Leese et al. 2008; Leese 2012). A HHP módszerhez hasonlóan emlős petesejtekben már többféle stressz kezeléssel próbáltak valamilyen védőhatást előidézni. Ilyen volt a szubletális ozmotikus kezelés (Lin et al. 2009), amellyel sertés petesejtek kriotoleranciáját lehetett fokozni. Hasonló, jótékony hatás volt megfigyelhető szarvasmarha petesejtek hidrogén-peroxiddal végzett kezelése során (Vandaele et al. 2010), amellyel az *in vitro* embriótenyésztés hatékonysága volt javítható. Ezzel összefüggésben fontos megjegyezni, hogy mind az ozmotikus mind az oxidatív stressz a fehérje szintézis időleges gátlását okozza emlős sejtekben (Wiese et al. 1995; Morley and Naegle 2002). Így tehát nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét, hogy ezek a sokkhatások is a HHP-hoz hasonló módon fejtik ki a hatásukat a petesejtekre.

Az egér blasztociszták vizsgálata során a fentiekhez hasonló következtetésekre jutottunk, habár a vizsgált gének száma alapján csak korlátozott mértékben vonhatunk le következtetéseket a sejtekben a nyomáskezelés hatására megváltozó folyamatokról. Mindazonáltal, a Csendes Embrió Hipotézissel összhangban az egér blasztociszták nyomáskezelése után 120 perccel a legtöbb gén esetében transzkriptum csökkenést tapasztaltunk. Hasonló csökkenésről számoltak be szarvasmarha blasztociszták nyomáskezelésekor is (Siqueira Filho et al. 2011). Ezért felmerül, hogy a sejtnövekedést szabályozó gének aktivizálódása annak bizonyítéka, hogy a HHP-kezelt blasztociszták is egy olyan visszafogott működésre állnak át átmenetileg, amely egy további stressz megjelenésekor segíti a túlélésüket. Mivel a riboszómák átmeneti szétesése a sejtek osztódását is jelentősen gátolja (Gross et al. 1993), ezért az is elképzelhető, hogy a négysejtes embriókhoz hasonlóan a blasztocisztákban is a translációs útvonal gátlódása miatt változott meg a sejtnövekedést szabályozó gének expressziója.

5.1. Hipotézis a magas hidrosztatikus nyomáskezelés emlős ivarsejtekre és embriókra kifejtett előnyös hatására vonatkozóan

Eredményeink megmutatták, hogy a magas hidrosztatikus nyomáskezelés a fehérje szintézis gátlásával jár transzkripciós szinten, egér embriókban. A rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján feltételezem, hogy az egér petesejtekben működő riboszómák a nyomás-stressz hatására szétesnek,

azonban ha a sejteket optimális mértékű nyomás-stressz éri ez a hatás teljesen reverzibilis. Miután a nyomás visszaáll a fiziológiás értékre, a riboszómák újra összeszerelődnek és a sejtekben újraindul a fehérje szintézis. Az ideiglenes lassulás a sejtek anyagcseréjében önmagában természetesen nem előnyös, azonban egy újabb sokkhatás megjelenésekor (például a mélyhűtés okozta sokk esetében) a sejtek már egy leszabályozott állapotban találkoznak a károsító körülményekkel, ezáltal veszteségeik is mérsékeltebbek lesznek. A magas hidrosztatikus nyomáskezelés véleményem szerint a sejtek anyagcseréjének időleges csökkenését és ezáltal a metabolitok felhalmozódását okozhatja, az így felkészített sejtek pedig rugalmasabban alkalmazkodhatnak egy következő stressz során a megváltozott környezethez, mint a fiziológiás körülmények között növekvő társaik. A HHP-hatás tehát ily módon járulhat hozzá az egér petesejtek fokozottabb stressztoleranciájához, amely segítséget jelent a krioprezerváció káros hatásaival szembeni védekezésben. A fenti eredmények összhangban állnak azokkal a megfigyelésekkel, melyek szerint az optimális határok között alkalmazott HHP-kezelés nincs káros hatással a petesejtek fejlődésére, sőt, egy további stresszhatással kombinálva jelentősen javítja a belőlük létrehozott embriók fejlődési képességét, blasztociszta sejtszámát és az utódszámot (lásd irodalmi áttekintés).

5.2. További javaslatok

Az általunk elvégzett microarray vizsgálat az egér petesejtek és embriók teljes transzkriptumának vizsgálatát tette lehetővé, ezért kísérletünk eredménye átfogó képet adott a sejtek RNS készletében bekövetkező változásokról. Eredményeink fontos információkat szolgáltatnak a magas hidrosztatikus nyomáskezelés emlős ivarsejtekre és embriókra kifejtett hatásmechanizmusának megértéséhez, azonban a továbbiakban fontos lenne a HHP-kezelés génexpresszióra kifejtett hatását egy másik (pl.: mélyhűtés okozta) stresszhatás kombinálásával is vizsgálni, hogy így még pontosabb képet kaphassunk arról a védekezési folyamatról, amelyet a nyomáskezelés aktivál. Azt is érdemes lenne megvizsgálni, hogy a különböző asszisztált reprodukciós eljárások milyen hatással vannak az ivarsejtek és embriók fehérje szintézisére és általánosságban a metabolizmusukra. Egy szarvasmarha blasztocisztákon végzett microarray vizsgálat már beszámolt hasonló eredményekről, azaz hogy a mélyhűtés okozta stressz a translációs útvonal jelentős gátlását okozza (Aksu et al. 2012). Ezek az eredmények jó kiindulási alapot jelentenek további hasonló vizsgálatokhoz.

Mivel hipotézisem egy általánosan bekövetkező folyamatot feltételez, ezért érdemes lenne megvizsgálni a nyomáskezelés transzkripcionális hatását a preimplantációs embriófejlődés további stádiumaiban is. Amennyiben a négysejtest követő állapotokban ugyancsak ki lehetne mutatni a

transzláció időleges gátlását, az újabb bizonyítékot szolgáltatna az előzőekben bemutatott hipotézisre. Megfelelően megválasztott időpontokban végzett vizsgálatokkal véleményem szerint nem csak a gátlást, hanem a fehérjeszintézis újraindulását is nyomon lehetne követni a beágyazódás előtti embriókban.

Azt is érdemes lenne tanulmányozni, hogy a fehérje szintézis reverzibilis gátlása az embriókban és ivarsejtekben kiváltható-e egyéb módszerekkel is. Ha sikerülne ilyen hatást előidézni, akkor megvizsgálhatnánk, hogy az a sejtek számára jár-e valamilyen előnnyel. Az már bizonyított, hogy például hidrogén-peroxiddal előidézhető egyfajta védőhatás (Vandaele et al. 2010), valamint azt is tudjuk, hogy ez a vegyület a fehérje szintézis időleges gátlását okozza (Wiese et al. 1995). Így elképzelhető, hogy ha kémiai úton valósítjuk meg a fehérje szintézis gátlását, akkor az ugyancsak jótékony hatással járna ivarsejtekben és embriókban. Erre a célra használhatnánk különböző, az eukarióta sejtekben transzláció-gátlást okozó antibiotikumokat, mint például a cycloheximidet vagy a puromycint. A cycloheximiddel kapcsolatban már bizonyított tény, hogy optimálisan alkalmazott koncentrációban előnyös hatással van emlős petesejtek parthenogenetikus aktivációt követő továbbfejlődésére (Mori et al. 2008).

Véleményem szerint elképzelhető, hogy a folyamat megfelelő pontján ható vegyület optimalizált alkalmazásával pozitív eredményeket tudnánk elérni, azonban nem valószínű, hogy az a HHP-nél eredményesebb lehetne. Ezt arra alapozom, hogy a kémiai úton történő gátlásra nem jellemzőek a nyomáskezelés előnyös tulajdonságai. Nem alkalmazható olyan standardizáltan, a minta minden pontján ugyanakkora mértékben, ezért az optimalizálása sokkal nehezkesebb lenne. A HHP kezelés további előnye egy kémiai kezeléssel szemben, hogy sokkal gyorsabban közvetíthető a nyomás stressz és gyorsan el is távolítható, így az embriófejlődés során csak egy nagyon rövid időszakot érint. Figyelembe véve, hogy a kémiai gátlásnak teljesen más a hatásmechanizmusa, mint a magas nyomásnak, csak akkor lehetne sikerrel alkalmazni, ha hatása visszafordítható (a hidrogén-peroxidnál bizonyítottan ilyen) és nem jár káros mellékhatásokkal. További, érdekes lehetőséget jelentene a TAL effektorok (Zhang et al. 2011) vagy CRISPR-aktivátorok (Perez-Pinera et al. 2013) alkalmazása. Ezekkel ugyanis igényeink szerint változtathatnánk meg az egyes riboszómális fehérjék kifejeződését, így azt is vizsgálhatnánk, hogy van-e egyes géneknek kitüntetett szerepe a transzláció időleges gátlásában.

A microarray technika legkorszerűbb alternatívája jelenleg az RNS-szekvenálás. Ez a módszer számos előnnyel rendelkezik a génexpressziós microarrayekhez képest. Az egyik, hogy eredményei megbízhatóbbak; mert amíg a microarray próbákhoz történhet nem specifikus kötődés is, addig az RNS-szekvenálás során minden egyes mRNS szekvenciáját leolvassák, amely lehetővé teszi az egyes transzkriptumok pontos azonosítását. További előny, amely a szekvenciák pontos

ismeretéből adódik, hogy az RNS-szekvenálás módszerével alternatív splicing eseményeket is észlelhetünk. Így akár azt is vizsgálhatnánk, hogy hatással van-e a magas hidrosztatikus nyomáskezelés a különböző gén izoformák expressziójára.

Azonban a globális génextpressziós mintázat tanulmányozásakor nem szabad elfeledkeznünk arról, hogy nincs mindig egyértelmű összefüggés adott gén transzkriptumának és a belőle készülő fehérje mennyiségének illetve az aktivitásának változása között, valamint hogy a génextpresszióon kívül egyéb közvetett okok is szerepet játszhatnak egy gén mRNS szintjének megváltozásában, például az eltérő mértékű degradáció. A továbbiakban ezért célszerű és meggyőző lenne a microarray kísérletek fehérje szintű validálásának elvégzése. Erre napjainkban számos olyan módszer nyújt lehetőséget, mint például a Western-blot technika vagy a tömegspektrometria, valamint remélhetőleg hamarosan olyan sztenderdizált fehérje-microarrayek is elérhetőek lesznek, amelyekkel a DNS-microarray technológiához hasonló módon akár a teljes proteom expresszióját is vizsgálni lehet (Berrade et al. 2011). Különösen hasznos vizsgálati módszer lenne eredményeink validálásához a poliszóma analízis (Masek et al. 2011), amellyel az mRNS-ekhez kötődött, 80S monoszómákból formálódó poliszómák mennyisége vizsgálható, így a transláció hatékonyságáról kaphatnánk információt általánosságban és génspecifikusan is. Viszonylag egyszerűen kivitelezhető és általánosan elterjedt módszer még a ³⁵S-metionin jelölés (Suissa 1981). Ennél a módszernél a sejtek tápoldata nem tartalmaz metionint, ezért helyette a metioninnak kizárólag ezt a radioaktív izotópját építik be a sejtek a fehérjék szintézise során. Ezután a radioaktivitás mértékét vizsgálva általános képet kaphatunk a transláció mértékéről az egyes mintákban. Ennek alternatívájaként az úgynevezett SUNSET módszer is használható. Ez abból a megfigyelésből indul ki, hogy a megfelelő mértékben alkalmazott puromycin az újonnan szintetizálódó fehérjékhez kötődik. A kötődés mértéke arányos a fehérje szintézis ütemével a sejtekben. A SUNSET módszer ezt felhasználva puromycin-ellenanyag segítségével vizsgálja a transláció folyamatát a sejtekben (Schmidt et al. 2009). Amennyiben az eredményeinket fehérje szinten is sikerül visszaigazolni, úgy a következőkben érdemes lehet hasznosítani azokat az asszisztált reprodukciós eljárások területén. Elképzelhető például, hogy adott riboszomális fehérjék expresszióját vizsgálva olyan assay-rendszert fejleszthetnénk ki, amelyet blasztomer biopsziával kombinálva előre lehetne jelezni a beágyazódás előtti embriók fejlődési képességét.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A világon elsőként mutattam ki, hogy egér embriókban a magas hidrosztatikus nyomáskezelés befolyásolja egyes gének mRNS szintjét.
2. A világon elsőként vizsgáltam egér petesejtekben és négysejtes embriókban a magas hidrosztatikus nyomáskezelés hatására bekövetkező teljes transzkriptum változásokat.
3. Kimutattam, hogy egér petesejtekben az optimális szintű magas hidrosztatikus nyomáskezelés nem idéz elő génexpressziós változásokat, illetve nem okoz RNS bomlást, ezzel bizonyítékot szolgáltatam a technika biztonságosságára vonatkozóan.
4. Kimutattam, hogy az optimális mértékű magas hidrosztatikus nyomással kezelt egér petesejtekből létrehozott négysejtes embriókban a kezelés hatására jelentősen csökken számos, a fehérje szintézisben résztvevő gén expressziója.
5. Eredményeim és a szakirodalomban fellelhető adatok felhasználásával felállítottam egy hipotézist, mely szerint az optimális szintű magas hidrosztatikus nyomáskezelés a sejtek fehérje szintézisének időleges csökkenését, így egyes metabolitok felhalmozódását okozhatja, amely segítséget jelenthet egy további stressz káros hatásaival szembeni védekezésben.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az ivarsejteken és embriókon alkalmazott magas hidrosztatikus nyomáskezeléssel (HHP) a krioprezerváció és számos más asszisztált reprodukciós eljárás hatékonyságát is jelentős mértékben javítani lehet. Az ilyenkor a sejteket érő optimális mértékű, szubletális tartományon belüli stressz előnyös hatású, mert segíti az ivarsejtek és embriók védekezését egy következő stresszhatással szemben. Napjainkban terjedelmes irodalom számol be arról, hogy a HHP-kezelést sikerrel alkalmazták különböző módszerekkel kombinálva, egér, sertés, szarvasmarha, juh, sőt humán sejtek esetében is. Azonban az, hogy ez a stresszhatás milyen módon készíti fel a sejteket a károsító tényezők elleni védekezésre, még nem ismert. Munkám során célom a HHP-kezelés által befolyásolt molekuláris szintű folyamatok minél részletesebb megismerése volt, hogy ezáltal magyarázatot találjak az előnyös hatás hátterére vonatkozóan. Vizsgálati célterületnek a génexpressziót választottam, mert az itt rendelkezésre álló kifinomult módszerekkel akár a genomot teljesen lefedő mértékben is lehetséges a sejtekben zajló folyamatok tanulmányozása. Vizsgálendő állatfajként az egérre esett a választás, mert ennél az állatnál jól ismert a HHP-kezelés előnyös hatása, valamint a génexpressziós változások megértését nagyban segíti, hogy napjainkban az egér genom az egyik legjobban karakterizált. Az eredmények elemzésével bepillantást nyerhettem abba, hogy az emlős ivarsejtek és embriók hogyan képesek a különböző behatások okozta sérülések elleni védekezésre.

Kísérleteim során első lépésben azt vizsgáltam, hogy a magas hidrosztatikus nyomáskezelés befolyásolja-e egyes gének expresszióját egér blasztocisztákban. Ehhez kilenc különböző, a stresszválaszban résztvevő gént választottuk, majd 30 percig tartó 60 MPa kezelés után megmértük az expressziós szintjüket. Azért, hogy a kezelés elhúzódó hatásait is tanulmányozhassuk, az embriók egy részét a nyomáskezelés után 120 percig *in vitro* tenyésztettük, és ezután vizsgáltuk meg a kiválasztott gének kifejeződését. Az RT-qPCR elemzés alapján a kezelés hatására azonnal és 120 perccel később is több olyan gén expressziója szignifikáns változást mutatott, amelyek a sejtosztódás-gátlásában, a hideg-sokk, vagy az oxidatív-stressz válaszában vesznek részt. Eredményeinkkel bizonyítottuk, hogy egér blasztocisztákban a HHP-kezelés a transzkripciót befolyásoló hatással rendelkezik, azonban jelentős korlátot jelentett, hogy ebben a vizsgálatban csak néhány gén elemzésére volt lehetőség. Azért tehát, hogy átfogó képet kaphassunk a nyomás-stressz hatására megváltozó folyamatokról, a teljes transzkriptumot lefedő vizsgálatra volt szükség.

A következő kísérletsorozatban egér petesejtek és embriók teljes transzkriptumának a változását kívántuk tanulmányozni. A globális hatást elemezve célunk azoknak a sejteken belül

zajló folyamatoknak a megismerése volt, amelyeket a magas hidrosztatikus nyomáskezelés aktivál vagy gátol. Vizsgálatunk tárgyául petesejteket és az intracitoplazmatikus spermium injektálással végzett fertilizációt követően belőlük kifejlődött négysejtes embriókat választottuk, ezáltal a petesejteket ért HHP hatását a beágyazódás előtti embriófejlődés során is tanulmányozni tudtuk. Mivel a petesejt számára egészen az embrionális genom aktivációig (EGA) létfontosságú az anyai RNS készlet, ezért az első vizsgálatunk keretében azt kívántuk génexpressziós microarray módszer segítségével tanulmányozni, hogy a petesejtre gyakorolt nyomás-stressz hatással van-e a benne tárolt anyai RNS készletre. Annak megválaszolására, hogy a HHP-kezelés milyen módon befolyásolja az embrionális genom aktiváció folyamán elinduló *de novo* RNS szintézist, a nyomáskezelt egér petesejtekből létrehozott négysejtes embriók expressziós profilját elemeztük hasonlóképpen.

A microarray analízist követő validálási folyamat során megállapítottuk, hogy a nyomáskezelés nem gyakorolt közvetlen hatást az egér petesejtek RNS készletére, ettől eltérően azonban a petesejteket ért nyomás-stressz a belőlük létrehozott négysejtes embriók transzkriptumában már számottevő változásokat okozott. Megállapítottuk továbbá, hogy a petesejteket érő optimális mértékű szubletális nyomáskezelés nem jár RNS bomlással, tehát biztonságosnak tekinthető abból a szempontból, hogy a sejtekben található RNS molekulákat nem károsítja. A globális génexpressziós vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a magas hidrosztatikus nyomáskezelés jelentős hatást fejt ki a petesejtek intracelluláris folyamataira, ez azonban transzkripcionális szinten csak az embrionális genom aktiváció után válik láthatóvá. Kísérletünket a négysejtes embriók vizsgálata során beazonosított, szignifikáns expresszió-változást mutató gének funkcionális elemzésével folytattuk, a nyomáskezelés által befolyásolt sejtfolyamatok feltárása céljából. A funkcionális kategorizálás eredménye alapján a HHP-kezelésre nagyszámú, főként a translációban résztvevő gén reagált jelentős expresszió változással. Ezeknek a géneknek a nagy része riboszómális fehérjét kódol és a döntő többségüknél a változás expresszió csökkenést jelentett. A megfigyelésünkkel összhangban több publikáció számol be arról, hogy a mikrobák esetében a nyomás-stressz a riboszómák disszociációjával jár, azonban bizonyos nyomáshatárokon belül ez teljesen reverzibilis. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy az egér petesejtekben a nyomáskezelés hatására a riboszóma bioszintézis, illetve a transláció részben gátolódik, és mivel ezek rendkívül energiaigényes folyamatok az eukarióta sejtekben, ezért csökkent intenzitásuk jelentős energia-megtakarítással járhat. Vizsgálataink eredménye arra utal, hogy a magas hidrosztatikus nyomáskezelés hatására a sejtekben az anyagcsere folyamatok időlegesen lelassulnak és ez a metabolitok felhalmozódását okozza. A nagyobb hozzáférhető metabolit készletek lehetővé

teszik a sejtek számára, hogy egy következő stresszhatás esetén gyorsabban és rugalmasabban alkalmazkodjanak a megváltozott környezethez.

Feltételezésem szerint a HHP-hatás ily módon járul hozzá az egér petesejtek fokozottabb stressztoleranciájához, és ezáltal végső soron segítséget jelent a krioprezerváció káros hatásaival szembeni védekezésben. A dolgozatomban bemutatott eredmények közelebb vihetnek bennünket az emlős ivarsejteket és embriókat védő magas hidrosztatikus nyomáskezelés működésének megértéséhez, valamint új utakat jelölhetnek ki a krioprezervációs technikák tanulmányozásához és fejlesztéséhez.

8. SUMMARY

The efficiency of various assisted reproductive techniques can be improved by preconditioning the reproductive cells and embryos with sublethal high hydrostatic pressure (HHP) treatment. This previously optimized, sublethal stress treatment can be beneficial as it assists the gametes and embryos to overcome a subsequent shock evoked by an *in vitro* intervention. Precisely adjusted hydrostatic pressure stress has been shown to have an advantageous effect on porcine, bovine, ovine, mouse and human oocytes, embryos or spermatozoa in combination with different *in vitro* techniques such as slow freezing, vitrification, *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. However, the underlying molecular mechanism responsible for the protective effect is still lacking and requires further investigation. My aim was to reveal as many details as possible about the molecular processes lie behind this protective attribute of the HHP. I also sought to gain insight into the cellular processes that help the gametes and embryos to tolerate the freezing-injury. I have chosen the gene expression as the research field, since the available state-of-the-art methods allow to study the reactions of the cells even on the whole genome scale. Furthermore, the mouse was chosen for the studies as model animal, because it has been already demonstrated that the HHP-method has a positive impact on mice, moreover due to its well-characterized genome it allows a more comprehensive understanding of the gene expression alterations.

Primarily, my aim was to examine whether the high hydrostatic pressure has any impact on the expression of selected genes in mouse blastocysts. For this, nine different stress-related genes were chosen, and their expression was determined after 30 minutes long, 60 MPa treatment. To study the prolonged response of the embryos to the HHP treatment, further groups were *in vitro* cultured for 120 minutes before the analysis. Based on the results of the RT-qPCR assay, the expression of certain growth-arrest, cold-shock and oxidative-stress related genes was significantly altered as a consequence of the treatment. Although we demonstrated, that the high hydrostatic pressure treatment has an effect on the gene expression of mouse blastocysts, this study was limited to the expression analysis of only a few selected genes. Accordingly, to comprehensively investigate the cellular processes affected by the pressure-stress, a study covering the whole transcriptome was needed.

In the second set of the experiments we analyzed the impact of the HHP-treatment on murine oocytes and preimplantation embryos, developed from treated oocytes after fertilization with intracytoplasmic sperm injection, in order to follow the effect of the pressure treatment during preimplantation development. We performed gene expression microarray experiments initially on

matured oocytes immediately after the HHP stress, to reveal the intracellular processes activated or inhibited by the treatment. As until the embryonic genome activation (EGA) the maternal RNA is indispensable, in the first part of the experiments we studied whether the HHP stress affected the RNA abundance of oocytes, e.g. by inducing selective degradation. Since the EGA occurs at the 2-cell stage in mouse embryos, initiating *de novo* RNA synthesis, treatment effects generated in the oocyte may become apparent at the transcriptional level in the subsequent stages of embryo development. Therefore, we also analyzed the global gene expression pattern of four-cell stage embryos developed from HHP-treated oocytes after fertilization with ICSI.

The transcription profiling experiments of the HHP-treated oocytes and four-cell stage embryos that developed from these oocytes showed distinct responses to the applied stress. HHP treatment did not perturb the transcriptome of oocytes, and the high RIN values of the RNAs isolated from the HHP-treated oocytes indicated that the treatment did not induce RNA degradation. However, the same stress did result in a marked effect on transcription at the 4-cell stage, i.e. after the EGA. The results of the global gene expression profiling indicate that the HHP has an outstanding effect on the intracellular processes of the oocytes, which is not apparent immediately but is manifested at transcriptional level later, after the embryonic genome activation. To gain insights into the molecular mechanisms involved, we used functional annotation clustering to identify the genes showing significantly altered expression in 4-cell embryos. The analysis has shown that a large number of translation related genes were affected by the HHP-treatment, exhibiting massive downregulation. Our results are consistent with the well-known phenomenon in microbes, where high pressure induces ribosomal dissociation, but within a certain range it is completely reversible. Based on this we assume, that precisely adjusted HHP stress may transiently suspend translation and precondition cells for the subsequent stress, after which ribosome reassembly initiates and translation is continued. Since ribosome biosynthesis is the most energy-consuming process in eukaryotic cells, a transient arrest upon HHP-treatment might result in intracellular energy saving. I propose that the higher developmental competence of the pressure-treated oocytes was supported by reduced metabolism rate and the accumulation of metabolites. I assume that by this way the HHP-method supports the stress tolerance of the mouse oocytes, thereby assists the cells to be protected against the harmful effect of the cryopreservation. These results suggest a potential mechanism for how HHP preconditions the reproductive cell and embryos, which might open new ways for studying and further developing the cryopreservation techniques.

9. MELLÉKLETEK

9.1 Irodalomjegyzék

- Abe F., Minegishi H. (2008): Global screening of genes essential for growth in high-pressure and cold environments: searching for basic adaptive strategies using a yeast deletion library. *Genetics*. 178: 851-872.
- Abe H., Yamashita S., Itoh T., Satoh T., Hoshi H. (2002a): Accumulation of cytoplasmatic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free medium or in serum-containing medium. *Mol Reprod Dev*. 61: 57-66.
- Aertsen A., Vanoirbeek K., De Spiegeleer P., Sermon J., Hauben K., Farewell A., Nyström T, Michiels CW. (2004): Heat shock protein-mediated resistance to high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 70: 2660–2666.
- Aertsen A., Michiels C. (2008): Cellular impact of sublethal pressures on *Escherichia coli*. 87–100. p. In: Michiels C., Bartlett D.H., Aertsen A. (Szerk.): *High-pressure microbiology*. Washington DC: ASM Press.
- Agar A, Li S, Agarwal N, Coroneo MT, Hill MA. (2006): Retinal ganglion cell line apoptosis induced by hydrostatic pressure. *Brain Res*. 1086: 191–200.
- Agca Y., Critser J.K. (2002): Cryopreservation of spermatozoa in assisted reproduction. *Semin Reprod Med*. 20: 15-23.
- Aigner B., Renner S., Kessler B., Klymiuk N., Kurome M., Wunsch A., Wolf E. (2010): Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *J Mol Med (Berl)*. 88: 653-664.
- Aksoy M., Takahashi Y., Hishinuma M., Elsheikh A.S., Tanaka H., Kanagawa H. (1999): Influences of retrieval stages and glutathione addition on post-thaw viability of quick frozen mouse morula during in vitro culture. *Theriogenology*. 51: 681-687.
- Aksu D.A., Agca C., Aksu S., Bagis H., Akkoc T., Caputcu A.T., Arat S., Taskin A.C., Kizil S.H., Karasahin T., Akyol N., Satilmis M., Sagirkaya H., Ustuner B., Nur Z., Agca Y. (2012): Gene expression profiles of vitrified in vitro- and in vivo-derived bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev*. 79: 613–625.
- Alpas H., Lee J., Bozoglu F., Kaletunc G. (2003): Evaluation of high hydrostatic pressure sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* 157:H7 by differential scanning calorimetry. *Int. J. Food Microbiol*. 87: 229-237.
- Bachvarova R., De Leon V. (1980): Polyadenylated RNA of mouse ova and loss of maternal RNA in early development. *Dev Biol*. 74: 1-8.
- Barbosa-Cánovas G.V., Juliano P. (2008): Food sterilization by combining high pressure and thermal energy. 9-46. p. In: Gutiérrez-López G.F., Barbosa-Cánovas G.V., Welti-Chanes J. (Szerk.): *Food Engineering Integrated Approaches*. New York: Springer.

- Barcelo-Fimbres M., Seidel G.E. Jr (2007a): Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid accumulation in vitro. *Mol Reprod Dev.* 74: 1406-1418.
- Barcelo-Fimbres M., Seidel G.E. Jr (2007b): Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embryonic development after cryopreservation. *Mol Reprod Dev.* 74: 1395-1405.
- Bartlett D.H. (2002): Pressure effects on in vivo microbial processes. *Biochim Biophys Acta-Protein Struct Mol Enzymol* 1. 595: 367–381
- Belmont P.J., Tadimalla A., Chen W.J., Martindale J.J., Thuerauf D.J., Marcinko M., Gude N., Sussman M.A., Glembotski C.C. (2008): Coordination of growth and endoplasmic reticulum stress signaling by regulator of calcineurin 1 (RCAN1), a novel ATF6-inducible gene. *J Biol Chem.* 283: 14012-14021.
- Benajmini Y., Hochberg Y. (1995): Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol.* 57: 289-300.
- Berrade L., Garcia A.E., Camarero J.A. (2011): Protein microarrays: novel developments and applications. *Pharm Res.* 28:1480-1499.
- Betteridge K.J. (1995): Phylogeny, ontogeny and embryo transfer. *Theriogenology.* 44: 1061-1098.
- Bermúdez M.G., Wells D., Malter H., Munné S., Cohen J., Steuerwald N.M. (2004): Expression profiles of individual human oocytes using microarray technology. *Reprod Biomed Online.* 8: 325-337.
- Bock I., Losonczi E., Mamo S., Polgár Z., Harnos A., Dinnyés A., Pribenszky C. (2010): Stress tolerance and transcriptional response in mouse embryos treated with high hydrostatic pressure to enhance cryotolerance. *Cryo Letters.* 31: 401-412.
- Bogliolo L., Ariu F., Leoni G., Uccheddu S., Bebbere D. (2011): High hydrostatic pressure treatment improves the quality of in vitro-produced ovine blastocysts. *Reprod Fertil Dev.* 23: 809-817.
- Bolton V.N., Oades P.J., Johnson M.H. (1984): The relationship between cleavage, DNA replication, and gene expression in the mouse 2-cell embryo. *J Embryol Exp Morphol.* 79: 139-63.
- Bowman J.P., Bittencourt C.R., Ross T. (2008): Differential gene expression of *Listeria monocytogenes* during high hydrostatic pressure processing. *Microbiology.* 154: 462-475.
- Brezczynska-Slebodzinska E., Slebodzinski A.B., Pietras B., Wiczorek G. (1995): Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma *Biol. Trace Elem. Res.* 47: 69-74.
- Burgoyne L.A. (1999): The mechanisms of pyknosis: hypercondensation and death. *Exp Cell Res.* 248: 214-222.

- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. (2009): The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 55: 611-622.
- Butz P., Tauscher B. (2002): Emerging technologies: chemical aspects. *Food Research International.* 35: 279-284.
- Caamaño J.N., Ryoo Z.Y., Youngs C.R. (1998): Promotion of development of bovine embryos produced in vitro by addition of cysteine and beta-mercaptoethanol to a chemically defined culture system. *J Dairy Sci.* 81: 369-374.
- Carlson D.F., Tan W., Lillico S.G., Stverakova D., Proudfoot C., Christian M., Voytas D.F., Long C.R., Whitelaw C.B., Fahrenkrug S.C. (2012): Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109: 17382–17387.
- Cascio S.M., Wassarman P.M. (1982): Program of early development in the mammal: Post-transcriptional control of a class of proteins synthesized by mouse oocytes and early embryos. *Dev Biol.* 89: 397-408.
- Castellini M.A., Castellini J.M., Rivera P.M. (2001): Adaptations to pressure in the RBC metabolism of diving mammals, *Comp. Biochem. Physiol. A* 129: 751-757.
- Cerolini S., Maldjian A., Surai P., Noble R. (2000): Viability susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci.* 58: 99-111.
- Chen C. (1986): Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet.* 1: 884-886.
- Chilton P., Isaacs N.S., Mackey B., Stenning R. (1997): The effects of high hydrostatic pressure on bacteria. 225-228. p. In: Heremans K. (Szerk.): *High pressure research in the biosciences and biotechnology*. Leuven: Leuven University Press.
- Chiang M.K., Melton, D.A. (2003): Single-cell transcript analysis of pancreas development. *Developmental cell.* 4: 383-393.
- Ciani F., Cocchia N., Esposito L., Avallone L. (2012): Fertility Cryopreservation. 225-248. p. In: Wu B. (Szerk.): *Advances in Embryo Transfer*. Rijeka: InTech.
- Ciotti P.M., Porcu E., Notarangelo L., Magrini O., Bazzocchi A., Venturoli S. (2009): Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human oocytes compared to slow freezing. *Fertil Steril.* 91: 2399-2407.
- Cleveland W.S. (1979): Robust Locally Weighted Regression and Smoothing Scatterplots. *J Am Stat Assoc.* 74: 829-836.
- Critser J.K., Agca Y., Gunasena K.T. (1997): The cryobiology of mammalian oocytes. 329-359. p. In: Karov A, Critser JK (Szerk.): *Reproductive Tissue Banking Scientific Principles*. San Diego, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press.
- De La Torre-Sanchez J.F., Gardner D.K., Preis K., Gibbons J., Seidel G.E. Jr (2006): Metabolic regulation of in vitro-produced bovine embryos. II. Effects of phenazine ethosulfate, sodium

- azide and 2,4-dinitrophenol during post-compaction development on glucose metabolism and lipid accumulation. *Reprod Fertil Dev.* 18: 597-607.
- DeLong E.F., Yayanos A.A. (1985): Adaptation of the membrane lipids of a deep-sea bacterium to changes in hydrostatic pressure, *Science.* 228: 1101-1103.
- Dennis G. Jr, Sherman B.T., Hosack D.A., Yang J., Gao W., Lane H.C., Lempicki R.A. (2003): DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* 4: P3.
- Díez C., Trigo B., Caamaño J.N., Muñoz M., Correia E., Martín D., Carrocera S., Pribenszky C., Gómez E. (2012): Quality of bovine embryos produced in vitro from immature oocytes treated with a sublethal hydrostatic pressure. *Reprod Fertil Dev.* 25: 179.
- Dinnyés A., Wallace G.A., Rall W.F. (1995): Effect of genotype on the efficiency of mouse embryo cryopreservation by vitrification or slow freezing methods. *Mol Reprod Dev.* 40: 429-435.
- Dinnyés A., Carolan C., Lonergan P., Massip A., Mermillod P. (1996): Survival of frozen or vitrified bovine blastocysts produced in vitro in synthetic oviduct fluid. *Theriogenology*, 46: 1425-1439.
- Dinnyés A., Dai Y., Jiang S., Yang X. (2000): High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod.* 63: 513-518.
- Dinnyés A., Yang X.Z., Li X.L., Bagis H., Presicce G.A., Gasparri B., Neglia G., Nagai T., Wilmut I. (2001): Solid Surface Vitrification (SSV): an efficient method for oocyte and embryo cryopreservation in cattle, pig and mouse. *Cryobiology.* 43: 332.
- Dinnyés A., De Sousa P.A., King T., Wilmut I. (2002): Somatic cell nuclear transfer: recent progress and challenges. *Cloning Stem Cells.* 4: 75-84.
- Dinnyés A., Liu J., Nedambale T.L. (2007): Novel gamete storage. *Reprod. Fert. Develop.* 19: 719-731.
- Dinnyés A., Polgár Z., Pribenszky C., Pírity M.K. (2010): Improved embryoid body cryopreservation and cardiomyocyte differentiation following high hydrostatic pressure treatment. In: *Proceedings of The 1st International Congress on Controversies in Cryopreservation of Stem Cells, Reproductive Reproductive Cells, Tissue and Organs, Valencia.* p. 27-30.
- Dobrinsky J.R. (1999): Cryopreservation of swine embryos: Production for the future. *Embryo Transfer Newsletter.* 11: 18-23.
- Dobrinsky J.R. (2001): Cryopreservation of pig embryos: adaptation of vitrification technology for embryo transfer. *Reprod. Suppl.* 58: 325-333.
- Domitrovic T., Fernandes C.M., Boy-Marcotte E., Kurtenbach E. (2006): High hydrostatic pressure activates gene expression through Msn2/4 stress transcription factors which are involved in the acquired tolerance by mild pressure precondition in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 580: 6033-6038.

- Dresios J., Aschrafi A., Owens G. C., Vanderklish P. W., Edelman G. M., Mauro V. P. (2005): Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60S ribosomal subunits, alters microRNA levels, and enhances global protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102: 1865-1870.
- Du Y., Kragh P.M., Zhang X., Yang H., Vajta G., Bolund L. (2006): Successful vitrification of parthenogenetic porcine blastocysts produced from delipated in vitro-matured oocytes. *Reprod. Fert. Develop.* 18: 153. (abstract).
- Du Y., Pribenszky C., Molnár M., Zhang X., Yang H., Kuwayama M., Pedersen A.M., Villemoes K., Bolund L., Vajta G. (2008a): High hydrostatic pressure: a new way to improve in vitro developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification. *Reproduction*. 135: 13-17.
- Du Y., Lin L., Schmidt M., Bøgh I.B., Kragh P.M., Sørensen C.B., Li J., Purup S., Pribenszky C., Molnár M., Kuwayama M., Zhang X., Yang H., Bolund L., Vajta G. (2008b): High hydrostatic pressure treatment of porcine oocytes before handmade cloning improves developmental competence and cryosurvival. *Cloning Stem Cells*. 10: 325-330.
- Eberwine J., Yeh H., Miyashiro K., Cao Y., Nair S., Finnell R., Zettel M., Coleman P. (1992): Analysis of gene expression in single live neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3010–3014.
- Enright B.P., Lonergan P., Dinnyés A., Fair T., Ward F. A., Yang X., Boland M.P. (2000): Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology*. 54: 659-673.
- Esaki R., Ueda H., Kurome M., Hirakawa K., Tomii R., Yoshioka H., Ushijima H., Kuwayama M., Nagashima H. (2004): Cryopreservation of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Biol. Reprod.* 71: 432-437.
- Fair T., Lonergan P., Dinnyés A., Cottell D.C., Hyttel P., Ward F.A., Boland M.P. (2001): Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. *Mol Reprod Dev.* 58: 186-195.
- Fang J., Zhang L., Bazylinski D.A. (2010): Deep-sea piezosphere and piezophiles: geomicrobiology and biogeochemistry. *Trends Microbiol.* 18:413–422
- Fernandes P., Domitrovic T., Kao C.M., Kurtenbach E. (2004): Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. *FEBS Lett.* 556: 153-160.
- Fernandes F.A.N. (2012): High-Pressure Processing. 37-50. p. In: Rodrigues S., Fernandes F.A.N. (Szerk.): *Advances in Fruit Processing Technologies*. Boca Raton: CRC Press.
- Fernandes P.M. (2005): How does yeast respond to pressure?. *Braz J Med Biol Res.* 38: 1239-1245.
- Follonier S., Sven P., Manfred Zinn. (2012): Pressure to kill or pressure to boost: a review on the various effects and applications of hydrostatic pressure in bacterial biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 93: 1805-1815.

- Frey B., Franz S., Sheriff A., Korn A., Bluemelhuber G., Gaipf U.S., Voll R.E., Meyer-Pittroff R., Herrmann M. (2004): Hydrostatic pressure induced death of mammalian cells engages pathways related to apoptosis or necrosis. *Cell Mol Biol.* 50: 459–467
- Frey B., Janko C., Ebel N., Meister S., Schlucker E., Meyer-Pittroff R., Fietkau R., Herrmann M., Gaipf U.S. (2008): Cells under pressure-treatment of eukaryotic cells with high hydrostatic pressure, from physiologic aspects to pressure induced cell death. *Curr Med Chem.* 15: 2329-2336.
- Friend D.S. (1984): Membrane organization and differentiation in the guinea pig spermatozoa. 75-85. p. In: Van Blerkom J., Motta P.M. (Szerk.): *Ultrastructure of Reproduction*. Boston: Martinus Nijhoff.
- Fuchinoue K., Fukunaga N., Chiba S., Nakajo Y., Yagi A., Kyono K. (2004): Freezing of human immature oocytes using cryoloops with Taxol in the vitrification solution. *J Assist Reprod Genet.* 21: 307-309.
- Fuller B.J. (2004): Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo Letters.* 25: 375-388.
- Gajda B., Smorąg Z. (2000): Survival of pig morula and blastocyst after exposure to vitrification media or vitrification. *Cryo Letters.* 21: 231-236.
- Gardner D.K., Lane M., Spitzer A., Batt P.A. (1994): Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol Reprod.* 50: 390-400.
- George V.T., Brooks G., Humphrey T.C. (2007): Regulation of cell cycle and stress responses to hydrostatic pressure in fission yeast. *Mol Biol Cell.* 18: 4168-4179.
- Geshi M., Yonai M., Sakaguchi M., Nagai T. (1999): Improvement of in vitro co-culture systems for bovine embryos using a low concentration of carbon dioxide and medium supplemented with beta-mercaptoethanol. *Theriogenology.* 51: 551-558.
- Gook D.A., Osborn S.M., Johnston W.I.H. (1993): Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Hum Reprod.* 8: 1101-1109.
- Greve T., Avery B., Callesen H., (1993): Viability of in vivo and in vitro produced bovine embryos. *Reprod Domest Anim.* 28: 164-169.
- Gross M., Jaenicke R. (1990): Pressure-induced dissociation of tight couple ribosomes. *FEBS Lett.* 267: 239-241.
- Gross M., Lehle K., Jaenicke R., Nierhaus K.H. (1993): Pressure-induced dissociation of ribosomes and elongation cycle intermediates. Stabilizing conditions and identification of the most sensitive functional state. *Eur J Biochem.* 218:463-468.
- Guthrie H.D., Welch G.R. (2005): Effects of hypothermic liquid storage and cryopreservation on basal and induced plasma membrane phospholipid disorder and acrosome exocytosis in boar spermatozoa. *Reprod Fertil Dev.* 17: 467-477.

- Han Y.M., Yamashina H., Koyama N., Lee K.K., Fukui Y. (1994): Effects of quality and developmental stage on the survival of IVF-derived bovine blastocysts cultured in vitro after freezing and thawing. *Theriogenology*. 42: 645-654.
- Hardy K., Handyside A.H., Winstons R.M.L. (1989): The human blastocyst: cell number, death and allocation during late pre-implantation development in vitro. *Development*. 107: 597-604.
- Hasler J.F., Henderson W.B., Hurtgen P.J., Jin Z.Q., McCauley A.D., Mower S.A., Neely B., Shuey L.S., Stokes J.E., Trimmer S.A. (1995): Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*. 43: 141-152.
- Hasler J.F., Hurtgen P.J., Jin Z.Q., Stokes J.E. (1997): Survival of IVF derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. *Theriogenology*. 48: 563-579.
- Hite B.H. (1899): The effects of pressure in the preservation of milk. *W Va Agric Exp Station Bull*. 58: 15-35.
- Hochi S., Fujimoto T., Oguri N. (1995): Large equine blastocysts are damaged by vitrification procedures. *Reprod Fertil Dev*. 7: 113-117.
- Hodge W.A., Fijan R.S., Carlson K.L., Burgess R.G., Harris W.H., Mann R.W. (1986): Contact pressures in the human hip joint measured in vivo. *Proc Natl Acad Sci*. 83: 2879-2883.
- Holt W.V. (2000): Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*. 18: 3-22.
- Horne G., Atkinson A.D., Pease E.H.E., Logue J.P., Brison D.R., Lieberman B.A. (2004): Live birth with semen cryopreserved for 21 years prior to cancer treatment. *Hum Reprod*. 19: 1448-1449.
- Huang S.Y., Pribenszky C., Kuo Y.H., Teng S.H., Chen Y.H., Chung M.T., Chiu Y.F. (2009a): Hydrostatic pressure affects the protein profile of boar sperm before and after freezing-thawing. *Anim Reprod Sci*. 112: 136-149.
- Huang D.W., Sherman B.T., Lempicki R.A. (2009b): Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc*. 4: 44-57.
- Ishii A., Oshima T., Sato T., Nakasone K., Mori H., Kato C. (2005): Analysis of hydrostatic pressure effects on transcription in *Escherichia coli* by DNA microarray procedure. *Extremophiles*. 9:65-73
- Isachenko E. (2003): Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reprod Biomed Online*. 6: 191-200.
- Iwahashi H., Kaul S.C., Obuchi K., Komatsu Y. (1991): Induction of barotolerance by heat shock treatment in yeast. *FEMS Microbiol Lett*. 64: 325-328.
- Iwasaki S., Yoshida N., Ushijima H., Watanabe S., Nakahara T. (1990): Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. *J Reprod Fertil*. 90: 279-284.

- Jiménez-Trigos E., Naturil-Alfonso C., Vicente J., Marco-Jiménez F. (2013): Post-Warming Competence of In Vivo Matured Rabbit Oocytes Treated with Cytoskeletal Stabilization (Taxol) and Cytoskeletal Relaxant (Cytochalasin B) Before Vitrification. *Reprod Domest Anim.* 48: 15-19.
- Johnson M.H., Nasr-Esfahani M.H. (1994): Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? *Bioessays.* 16: 31-38.
- Kalisky T., Quake S.R. (2011): Single-cell genomics. *Nature methods,* 8: 311-314.
- Kelly R.H., Yancey P.H. (1999): High contents of trimethylamine oxide correlating with depth in deep-sea teleost fishes, skates, and decapod crustaceans. *Biol Bull.* 196: 18-25.
- Kitagawaa Y., Suzukib K., Yonedaa A., Watanabea T. (2004): Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology.* 62: 1186-1197.
- Kovács A., Foote R.H. (1992): Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotech. Histochem.* 67: 119-124.
- Kuo Y.H., Pribenszky C., Huang S.Y. (2008): Higher litter size is achieved by the insemination of high hydrostatic pressure-treated frozen-thawed boar semen. *Theriogenology.* 70: 1395-1396.
- Kuretake S., Kimura Y., Hoshi K., Yanagimachi R. (1996): Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. *Biol Reprod.* 55: 789-795.
- Ledda, S., Bogliolo, L., Ariu, F., Bebbere, D., Uccheddu, S., Strina, A., Pintus, E., and Nieddu, S. (2010): High hydrostatic pressure - treatment prior to vitrification improves the re-expansion speed and quality of in vitro-produced ovine embryos. In: the Proceedings of The 1st International Congress on Controversies in Cryopreservation of Stem Cells, Reproductive Cells, Tissue and Organs, Valencia.
- Leese H.J., Baumann C.G., Brison D.R., McEvoy T.G., Sturmey R.G. (2008): Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Mol Hum Reprod.* 14: 667-672.
- Leese H.J. (2012): Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction.* 143: 417-427.
- Leibo S.P., McGrath J.J., Cravalho E.G. (1978): Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate. *Cryobiology.* 15: 257-271.
- Leibo S.P., Loskuto M. (1993): Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology.* 39: 81-94.
- Leibo S.P., Semple M.E., Kroetsch T.G. (1994): In-vitro fertilization of oocytes by 37-year-old cryopreserved bovine spermatozoa. *Theriogenology.* 42: 1257-1262.
- Leibo S.P., Pollard J.W., Martino A. (1995): Chilling and freezing sensitivity of „reassembled” in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology.* 43: 265. (abstract).

- Li L., Zheng P., Dean J. (2010): Maternal control of early mouse development. *Development*. 137: 859-870.
- Li R., Murphy C.N., Spate L., Wax D., Isom C., Rieke A., Walters E.M., Samuel M., Prather R.S. (2008): Production of piglets after cryopreservation of embryos using a centrifugation-based method for delipation without micromanipulation. *Biol Reprod*. 80: 563-571.
- Liebermann J. (2009): Vitrification of human blastocysts: an update. *Reprod Biomed Online*. 19: 105-114.
- Lim J.M., Fukui Y., Ono H. (1992): Developmental competence of bovine oocytes at various maturation stages followed by in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology*. 37: 351-362.
- Lin D.S., Connor W.E., Wolf D.P., Neuringer M., Hachey D.L. (1993): Unique lipids of primate spermatozoa - desmosterol and docosahexaenoic acid. *J. Lipid Res*. 34: 491-499.
- Lin X., Long L., Shan X., Zhang S., Shen S., Liu B. (2006): In planta mobilization of mPing and its putative autonomous element Pong in rice by hydrostatic pressurization. *J Exp Bot*. 57: 2313-2323
- Lin L., Kragh P.M., Purup S., Kuwayama M., Du Y., Zhang X., Yang H., Bolund L., Callesen H., Vajta, G. (2009): Osmotic stress induced by sodium chloride, sucrose or trehalose improves cryotolerance and developmental competence of porcine oocytes. *Reprod Fertil Dev*. 21: 338-344.
- Lin L., Luo Y., Sørensen P., Prætorius H., Vajta G., Callesen H., Pribenszky C., Bolund L., Kristensen T.N. (2014): Effects of high hydrostatic pressure on genomic expression profiling of porcine parthenogenetic activated and cloned embryos. *Reprod Fertil Dev*. 26: 469-484.
- Lonergan P., Fair T., Khatir H., Cesaroni G., Mermillod P. (1998): Effect of protein synthesis inhibition before or during in vitro maturation on subsequent development of bovine oocytes. *Theriogenology*. 50: 417-431.
- Long L., Lin X., Zhai J., Kou H., Yang W., Liu B. (2006): Heritable alteration in DNA methylation pattern occurred specifically at mobile elements in rice plants following hydrostatic pressurization. *Biochem Biophys Res Commun*. 340: 369-376.
- Lovelock J.E. (1953): The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta*. 11: 28-36.
- Lovelock J.E. (1954): The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. *Biochem J*. 56: 265-270.
- Lu B., Li Q., Liu W.Y., Ruan K.C. (1997): Effects of hydrostatic pressure on the activity of rat ribosome and cell-free translation system. *IUBMB Life*. 43: 499-506.
- Luo L., Salunga R.C., Guo H., Bittner A., Joy K.C., Galindo J.E., Xiao H., Rogers K.E., Wan J.S., Jackson M.R., Erlander, M.G. (1999): Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes. *Nat med*. 5: 117-122.

- Luyet B.J., Gehenio P.M. (1940): Life and Death at Low Temperatures. 236-241. p. Normandy, Missouri: Biodynamica.
- Macgregor R.B.J. (2002): The interactions of nucleic acids at elevated hydrostatic pressure. *Biochim Biophys Acta Protein Struct Mol Enzymol.* 1595: 266–276
- Mackey B., Mañas P. (2008): Inactivation of *Escherichia coli* by high pressure. 53-85. p. In: Michiels C., Bartlett D.H., Aertsen A. (Szerk.): *High pressure microbiology*. Washington DC: ASM Press.
- Mailhes J.B., Carabatsos M.J., Young D., London S.N., Bell M., Albertini D.F. (1999): Taxol-induced meiotic maturation delay, spindle defects, and aneuploidy in mouse oocytes and zygotes. *Mutat Res.* 423: 79–90.
- Malone A.S., Chung Y.K., Yousef A.E. (2006): Genes of *Escherichia coli* O157: H7 that are involved in high-pressure resistance. *Appl Environ Microbiol.* 72: 2661-2671.
- Mamo S., Bodo S., Kobolák J., Polgár Z., Tölgyesi G., Dinnyés A. (2006): Gene expression profiles of vitrified in vivo derived 8-cell stage mouse embryos detected by high density oligonucleotide microarrays. *Mol Reprod Dev.* 73: 1380-1392.
- Mamo S., Gal A.B., Bodo S., Dinnyés A. (2007): Quantitative evaluation and selection of reference genes in mouse oocytes and embryos cultured in vivo and in vitro. *BMC Dev Biol.* 7: 14.
- Martinez A.G., Valcacec A., Furnus C.C., de Matos D.G., Iorio G., de las Heras M.A. (2006): Cryopreservation of in vitro produced bovine embryos. *Small Rum Res.* 63: 288-296.
- Mašek T., Valášek L., Pospíšek M. (2011): Polysome Analysis and RNA Purification from Sucrose Gradients. *Methods Mol Biol.* 703: 293-309.
- Massip A., Mermillod P., Dinnyés A., (1995): Morphology and biochemistry of in vitro produced bovine embryos: implication for their cryopreservation. *Hum Reprod.* 10: 3004-3011.
- Massip, A. (2001): Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod Domest Anim.* 36: 49-55.
- Matson P.L., Graefling J., Junk S.M., Yovich J.L., Edirisinghe W.E. (1997): Cryopreservation of oocytes and embryos: use of a mouse model to investigate effects upon zona hardness and formulate treatment strategies in an in-vitro fertilization programme. *Hum Reprod.* 12: 1550-1553.
- Mátyás S., Pribenszky C., Kovács P., Rajczy K., Molnár K., Losonczi E., Molnár M., Kaáli S.G., Vajta G. (2010): Preconditioning oocytes by sublethal hydrostatic pressure stress in order to improve cryosurvival - animal models and human application. In: *Proceedings of The 1st International Congress on Controversies in Cryopreservation of Stem Cells, Reproductive Cells, Tissue and Organs, Valencia.*
- Mazur P. (1963): Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol.* 47: 347-369.
- Mazur P. (2004): Principles of Cryobiology. 3-65. p. In: Fuller B.J., Lane N.J., Benson E.E. (Szerk.): *Life in the Frozen State*. Boca Raton: CRC Press.

- Meersman F., Heremans K. (2008): High hydrostatic pressure effects in the biosphere: from molecules to microbiology. 1–17. p. In: Michiels C., Bartlett D.H., Aertsen A. (Szerk.): *High-pressure microbiology*. Washington DC: ASM Press.
- Meganathan R., Marquis R.E. (1973): Loss of bacterial motility under pressure. *Nature*. 246: 525–527
- Mentré P., Hamraoui L., Hui Bon Hoa G., Debey P. (1999): Pressure-sensitivity of endoplasmic reticulum membrane and nucleolus as revealed by electron microscopy. *Cell Mol Biol. (Noisy-le-Grand)*. 45: 353-362.
- Meyers S.A. (2005): Spermatozoal response to osmotic stress. *Anim Reprod Sci*. 89: 57-64.
- Morato R., Izquierdo D., Albarracin J.L., Anguita B., Palomo M.J., Jimenez-Macedo A.R., Paramio M.T., Mogas T. (2008a): Effects of pre-treating in vitro-matured bovine oocytes with the cytoskeleton stabilizing agent taxol prior to vitrification. *Mol Reprod Dev*. 75: 191-201.
- Morato R., Mogas T., Maddox-Hyttel P. (2008b): Ultrastructure of bovine oocytes exposed to Taxol prior to OPS vitrification. *Mol Reprod Dev*. 75: 1318-1326.
- Mori M., Otoi T., Wongsrikeao P., Agung B., Nagai T. (2006): Effects of beta-mercaptoethanol and cycloheximide on survival and DNA damage of bovine embryos stored at 4 degrees C for 72 h. *Theriogenology*. 5: 1322-1332.
- Mori H., Mizobe Y., Inoue S., Uenohara A., Takeda M., Yoshida M., Miyoshi K. (2008): Effects of cycloheximide on parthenogenetic development of pig oocytes activated by ultrasound treatment. *J Reprod Dev*. 54: 364-369.
- Morley S.J., Naegele S. (2002): Phosphorylation of eukaryotic initiation factor (eIF) 4E is not required for de novo protein synthesis following recovery from hypertonic stress in human kidney cells. *J Biol Chem*. 277:32855-32859.
- Nagashima H., Kashiwazaki N., Ashman R.J., Grupen C.G., Seamark R.F., Nottle M.B., (1994): Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol. Reprod*. 51: 618-622.
- Nakao A., Yoshihama M., Kenmochi N. (2004): RPG: the Ribosomal Protein Gene database. *Nucleic Acids Res*. 32 (Database issue): D168-170.
- Nakayama N., Tomii R., Ueno S., Matsunari H., Saito H., Ogawa B., Nagashima H. (2008): Production of cloned piglets from nuclear transfer embryos after vitrification. *Reprod. Fert. Develop*. 20: 123. (abstract).
- Nedambale T.L., Dinnyés A., Groen W., Dobrinsky J.R., Tian X.C., Yang X. (2004): Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology*. 62: 437-449.
- Niven G.W., Miles C.A., Mackey B.M. (1999): The effects of hydrostatic pressure on ribosome conformation in *Escherichia coli*: an in vivo study using differential scanning calorimetry. *Microbiology*. 145: 419-425.

- Noyes N., Porcu E., Borini A. (2009): Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies. *Reprod Biomed Online*. 18: 769-776. *Nucleic Acids Res*. 31: 3406-3415.
- Noyes N., Boldt J., Nagy Z.P. (2010): Oocyte cryopreservation: is it time to remove its experimental label? *J Assist Reprod Genet*. 27: 69-74.
- Outinen P.A., Sood S.K., Pfeifer S.I., Pamidi S., Podor T.J., Li J., Weitz J.I., Austin R.C. (1999): Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood*. 94: 959-967.
- Pagán R., Mackey B. (2000): Relationship between membrane damage and cell death in pressure-treated *Escherichia coli* cells: differences between exponential- and stationary-phase cells and variation among strains. *Appl Environ Microbiol*. 66: 2829–2834.
- Palermo G., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A.C. (1992): Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 340: 17-18.
- Palhano F.L., Orlando M.T., Fernandes P.M. (2004): Induction of baroresistance by hydrogen peroxide, ethanol and cold-shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*. 233: 139-145.
- Park K.E., Telugu B.P.V. (2014): Role of stem cells in large animal genetic engineering in the TALENs–CRISPR era. *Reprod Fertil Dev*. 26: 65-73.
- Parks J.E., Arion J.W., Foote R.H. (1987): Lipids of plasma-membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biol. Reprod*. 37: 1249-1258.
- Pascal B. (1647): *Experiences nouvelles touchant le vide*.
- Pavlovic M., Hörmann S., Vogel R.F., Ehrmann M. A. (2005): Transcriptional response reveals translation machinery as target for high pressure in *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Arch Microbiol*. 184: 11-17.
- Pegg, D.E. (2007): Principles of Cryopreservation. 39-58. p. In: Day J.G., Stacey G.N., (Szerk.): *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Totowa: Humana.
- Pereira R.M., Baptista M.C., Vasques M.I., Horta A.E.M., Portugal P.V., Bessa R.J.B., Chagas e Silva J., Silva Pereira M., Marques C.C. (2007): Cryo-survival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t, 12c CLA). *Anim Reprod Sci*. 98: 293-301.
- Pereira R.M., Marques C.C. (2008): Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Bank*. 9: 267-277.
- Perez-Pinera P., Kocak D.D., Vockley C.M., Adler A.F., Kabadi A.M., Polstein L.R., Thakore P.I., K.A Glass, D.G. Ousterout, K.A. Leong, F. Guilak, G.E. Crawford, T.E. Reddy, Gersbach, C. A. (2013): RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat meth*. 10: 973-976.

- Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L. (2002): Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30: e36.
- Polge C., Smith A.U., Parkes A.S. (1949): Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.* 164: 666.
- Pribenszky C., Molnár M., Cseh S., Solti L. (2005a): Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge. *Anim Reprod Sci.* 87: 143-150.
- Pribenszky C., Molnár M., Ulrich P., Barbosa C., Hatamoto L., Santos C. (2005b): Pressure assisted cryopreservation: a novel possibility for IVP bovine blastocyst cryopreservation. *Reprod Domest Anim.* 40: 338. (abstract).
- Pribenszky C., Molnár M., Solti L., Degg J., Lederer J. (2005c): The effect of high hydrostatic pressure on the motility of fresh and frozen-thawed bull semen. *Reprod Fertil Dev.* 17: 199-200. (abstract).
- Pribenszky C., Molnár M., Horváth A., Harnos A., Szenci O. (2006): Hydrostatic pressure induced increase in post-thaw motility of frozen boar spermatozoa. *Reprod Fertil Dev.* 18: 162-163. (abstract).
- Pribenszky C., Molnár M., Horváth A., Kútvölgyi G., Harnos A., Szenci O., Degg J., Lederer J. (2007): Improved post-thaw motility, viability and fertility are achieved by hydrostatic pressure treated bull semen. *Reprod Fertil Dev.* 19: 181-182. (abstract).
- Pribenszky C., Siquiera E., Molnár M., Rumpf R. (2008a): Improved post-warming developmental competence of open pulled straw-vitrified in vitro produced bovine blastocysts by sublethal hydrostatic pressure pretreatment. *Reprod Fertil Dev.* 20: 125. (abstract).
- Pribenszky C., Molnár M., Kútvölgyi G., Harnos A., Horváth A., Héjja I. (2008b): Sublethal hydrostatic pressure treatment improves fresh and chilled boar semen quality in vitro and in vivo. *Reprod Fertil Dev.* 21: 107. (abstract).
- Pribenszky C., Du Y., Molnár M., Harnos A., Vajta G. (2008c): Increased stress tolerance of pig oocytes after high hydrostatic pressure treatment. *Anim Reprod Sci.* 106: 200-207.
- Pribenszky C., Du Y., Molnár M., Vajta G. (2008d): Sublethal stress on porcine oocytes enhances the efficacy of ART procedures. *Human Reprod.* 23: 161. (abstract).
- Pribenszky C., Vajta G., Molnár M., Du Y., Lin L., Bolund L., Yovich J. (2010a): Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology. *Biol Reprod.* 83: 690-697.
- Pribenszky C., Mátyás S., Losonczi E., Stanca C., Bock I., Vajta G. (2010b): Stress for stress tolerance: Improving cell survival by sublethal stress treatment of eggs before vitrification pilot study. In: *Scientific Abstracts from the 2010 Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine, Colorado, Denver.* *Fertil Steril.* 94: O-106. (abstract).

- Pribenszky C., Vajta G. (2011): Cells under pressure: how sublethal hydrostatic pressure stress treatment increases gametes' and embryos' performance. *Reprod Fertil Dev.* 23: 48-55.
- Pribenszky C., Horváth A., Végh L., Huang S.Y., Kuo Y.H., Szenci O. (2011): Stress preconditioning of boar spermatozoa: a new approach to enhance semen quality. *Reprod Domest Anim.* 46 (Suppl 2): 26-30.
- Pribenszky C., Lin L., Du Y., Losonczi E., Dinnyés A., Vajta G. (2012): Controlled stress improves oocyte performance - cell preconditioning in assisted reproduction. *Reprod Domest Anim.* 47 (Suppl. 4): 197-206.
- Pugh P.A., Ankersmit A.E., McGowan L.T., Tervit H.R. (1998): Cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos: effects of protein type and concentration during freezing or of liposomes during culture on postthaw survival. *Theriogenology.* 50: 495-506.
- Rainer J., Sanchez-Cabo F., Stocker G., Sturn A., Trajanoski Z. (2006): CARMAweb: comprehensive R- and Bioconductor-based web service for microarray data analysis. *Nucleic Acids Res.* 34 (Web Server Issue): W498-503.
- Rojas C., Palomo M.J., Albarracín J.L., Mogas T. (2004): Vitrification of immature and in vitro matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments. *Cryobiology.* 49: 211-220.
- Romek M., Gajda B., Krzysztofowicz E., Smorag Z. (2009): Lipid content of non-cultured and cultured pig embryo. *Reprod Domest Anim.* 44: 24-32.
- Rozen S., Skaletsky H.J. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 132: 365-386.
- Ruffing N.A., Steponkus P.L., Pitt R.E., Parks J.E. (1993): Osmometric behavior, hydraulic conductivity, and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages. *Cryobiology.* 30: 562-580.
- Rutkowski D.T., Kaufman R.J. (2004): A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol.* 14: 20-28.
- Saragusty J., Arav A. (2011): Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction* 141: 1-19.
- Schalkoff M.E., Oskowitz S.P., Powers R.D. (1989): Ultrastructural observations of human and mouse oocytes treated with cryopreservatives. *Biol Reprod.* 40: 379-393.
- Schier A.F. (2007): The maternal-zygotic transition: death and birth of RNAs. *Science* 316: 406-407.
- Schmidt E.K., Clavarino G., Ceppi M., Pierre P. (2009): SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat meth.* 6: 275-277.
- Schmittgen T.D., Zakrajsek B.A. (2000): Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods.* 46: 69-81.

- Schulz E., Lüdemann H.D., Jaenicke R. (1976): High pressure equilibrium studies on the dissociation-association of *E. coli* ribosomes. *FEBS Lett.* 64: 40-43.
- Seidel G.E. (2006): Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology.* 65: 228-235.
- Shannon P., (1978): Factors affecting semen preservation and conception rates in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 54: 519-527.
- Scheyhing C.H., Hörmann S., Ehrmann M.A., Vogel R.F. (2004): Barotolerance is inducible by preincubation under hydrostatic pressure, cold-, osmotic- and acid-stress conditions in *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451T. *Lett Appl Microbiol.* 39: 284–289.
- Shi W.Q., Zhu S.E., Zhang D., Wang W., Tang G., Hou Y., Tian S. (2006): Improved development by Taxol pretreatment after vitrification of in vitro matured porcine oocytes. *Reproduction.* 131: 795-804.
- Siqueira Filho E., Caixeta E.S., Pribenszky C., Molnar M., Horvath A., Harnos A., Franco M.M., Rumpf R. (2011): Vitrification of bovine blastocysts pretreated with sublethal hydrostatic pressure stress: evaluation of post-thaw in vitro development and gene expression. *Reprod Fertil Dev.* 23: 585-590.
- Sirard M.A. (2012): Factors Affecting Oocyte and Embryo Transcriptomes. In: *Proceedings of the 17th International Congress on Animal Reproduction (ICAR) Reproduction in Domestic Animals 47 (Supplement s4): 148-155.*
- Smith C.M., Steitz J.A. (1998): Classification of gas5 as a multi-small-nucleolar-RNA (snoRNA) host gene and a member of the 5'-terminal oligopyrimidine gene family reveals common features of snoRNA host genes. *Mol Cell Biol.* 18: 6897-6909.
- Sommerfeld V., Niemann H. (1999): Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology.* 38: 95-105.
- Songsasen N., Leibo S.P. (1997): Cryopreservation of mouse spermatozoa. I. Effect of seeding on fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa. *Cryobiology.* 35: 240-254.
- Spallanzani, L. (1776): Osservazioni e speienze interno ai vermicelli spermatici dell'uomo e degli animali. *Opusculi di Fisica Animale e Vegetabile, Modena, Italy.*
- Stokes P.J., Hawkhead J.A., Fawthrop R.K., Picton H.M., Sharma V., Leese H.J., Houghton F.D. (2007): Metabolism of human embryos following cryopreservation: implications for the safety and selection of embryos for transfer in clinical IVF. *Hum Reprod.* 22: 829-835.
- Sturmey R.G., Reis A., Leese H.J., McEvoy T.G. (2009): Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reprod Domest Anim.* 44: 50-58.
- Sudano MJ., Paschoal DM., da Silva Rascado T., Magalhães L.C.O., Crocomo L.F., de Lima-Neto J.F., da Cruz Landim-Alvarenga F. (2011): Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology.* 75: 1211-1220.

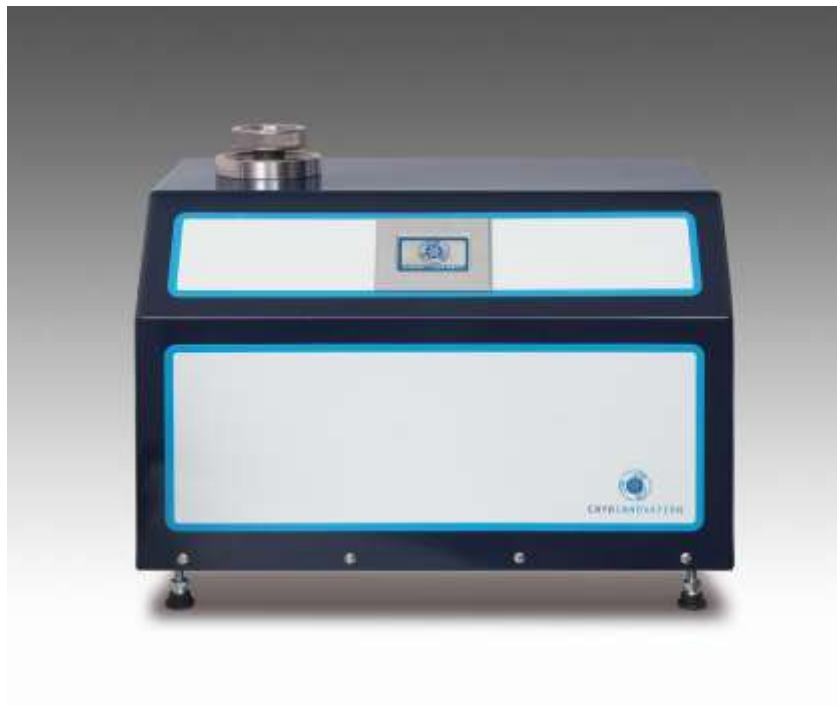
- Suissa M. (1981): Nonenzymatic labeling of proteins by preparations of [35 S] methionine. *Anal biochem.* 115: 67-71.
- Sun Q.Y., Lai L., Wu G.M., Park K.W., Day B.N., Prather R.S., Schatten H. (2001): Microtubule assembly after treatment of pig oocytes with taxol: correlation with chromosomes, gamma-tubulin, and MAP kinase. *Mol Reprod Dev.* 60: 481-490.
- Sutovsky P., Schatten G. (2000): Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization after sperm-egg fusion. *Int Rev Cytol.* 195: 1-65.
- Stamatoyannopoulos J.A., Snyder M., Hardison R., Ren B., Gingeras T., Gilbert D.M., et. al. (2012): An encyclopedia of mouse DNA elements (Mouse ENCODE). *Genome Biol.* 13: 418.
- Takano K.J., Takano T., Yamanouchi Y., Satou T. (1997): Pressure-induced apoptosis in human lymphoblasts. *Exp Cell Res.* 235: 155–160.
- Tang H., Arika K., Ohkido M., Murakami Y., Matsufuji S., Li Z., Yamamura K.I. (2009): Role of ornithine decarboxylase antizyme inhibitor in vivo. *Genes Cells.* 14: 79-87.
- Thieringer H.A., Jones P.G., Inouye M. (1998): Cold shock and adaptation. *Bioessays.* 20: 49–57.
- Toner M., Cravalho E.G., Karel M. (1990): Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells. *Journal of Applied Physics.* 67: 1582-1593.
- Trigal B., Muñoz M., Gómez E., Caamaño J., Martin D., Carrocera S., Casais R., Diez C. (2012): Cell Counts and Survival to Vitrification of Bovine In Vitro Produced Blastocysts Subjected to Sublethal High Hydrostatic Pressure. *Reprod Domest Anim.* 48: 200-206.
- Ushijima H., Yamakawa H., Nagashima H. (1999): Cryopreservation of bovine pre-morula-stage in vitro matured/in vitro fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer. *Biol Reprod* 60: 534-539.
- Vandaele L., Thys M., Bijttebier J., Van Langendonck A., Donnay I., Maes D., Meyer E., Van Soom A. (2010): Short-term exposure to hydrogen peroxide during oocyte maturation improves bovine embryo development. *Reproduction.* 139: 505-511.
- Van Gelder R.N., von Zastrow M.E., Yool A., Dement W.C., Barchas J.D., Eberwine J.H. (1990). Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87: 1663-1667.
- Vishwanath R., Pitt C.J., Shannon P. (1996): Sperm numbers, semen age and fertility in fresh and frozen bovine semen. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 56: 31-34.
- Vogel R.F., Pavlovic M., Hörmann S., Ehrmann M.A. (2005): High pressure-sensitive gene expression in *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Braz J Med Biol Res.* 38: 1247-1252.
- Walters E.M., Benson J.D., Woods E.J., Critser J.K. (2009): History of Sperm Cryopreservation. In: Pacey A., Tomlinson M.J. (Szerk.): *Practical Guide for Sperm Banking*. Cambridge: Cambridge University Press.

- Warner J.R. (1999): The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 24: 437-440.
- Warner J.R., Vilardell J., Sohn J.H. (2001): Economics of ribosome biosynthesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 66: 567-574.
- Weber G., Drickamer H.G. (1983): The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules, *Q Rev Biophys.* 16: 89-112.
- Welch T.J., Farewell A., Neidhardt F.C., Bartlett D.H. (1993): Stress response of *Escherichia coli* to elevated hydrostatic pressure. *J Bacteriol.* 175: 7170–7177.
- Wemekamp-Kamphuis H.H., Karatzas A.K., Wouters J.A., Abee T. (2002): Enhanced levels of cold shock proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon exposure to low temperature and high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microbiol.* 68: 456-463.
- West F.D., Uhl E.W., Liu Y., Stowe H., Lu Y., Yu P., Gallegos-Cardenas A., Pratt S.L., Stice S.L. (2011): Brief report: chimeric pigs produced from induced pluripotent stem cells demonstrate germline transmission and no evidence of tumor formation in young pigs. *Stem Cells.* 29: 1640-1643.
- Whittingham D.G. (1971): Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature.* 233: 125-126.
- Whittingham D.G., Leibo S.P., Mazur P. (1972): Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. *Science.* 178: 411-414.
- Whittingham D.G. (1977): Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at K196 8C. *J Reprod Fertil.* 49: 89-94.
- Wiese A.G., Pacifici R.E., Davies K.J. (1995): Transient adaptation to oxidative stress in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys.* 318: 231-240.
- Winter R., Jeworrek C. (2009): Effect of pressure on membranes. *Soft Matter.* 5: 3157–3173.
- Wilke H.J., Neef P., Caimi M., Hoogland T., Claes L.E. (1999): New in vivo measurements of pressures in the intervertebral disc in daily life. *Spine.* 24: 755-762.
- Williams B.L., Lipkin W.I. (2006): Endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration in rats neonatally infected with borna disease virus. *J Virol.* 80: 8613-8626.
- Willoughby C.E., Mazur P., Peter A.T., Critser J.K., (1996): Osmotic tolerance limits and properties of murine spermatozoa. *Biol Reprod.* 55: 715-727.
- Wilmot I. (1972): The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci.* 11: 1071-1079.
- Wilmot I., Beaujean N., De Sousa P.A., Dinnyés A., King T.J., Paterson L.A., Wells D.N., Young, L. E. (2002): Somatic cell nuclear transfer. *Nature.* 419: 583-587.

- Wool IG. (1979): The structure and function of eukaryotic ribosomes. *Annu Rev Biochem.* 48: 719-754.
- Yamaguchi T., Hashiguchi K., Katsuki S., Iwamoto W., Tsuruhara S., Terada S. (2008): Activation of the intrinsic and extrinsic pathways in high pressure-induced apoptosis of murine erythroleukemia cells. *Cell Mol Biol Lett.* 13: 49–57.
- Yano Y., Nakayama A., Yoshida K. (1997): Distribution of polyunsaturated fatty acids in bacteria present in intestines of deep-sea fish and shallow-sea poikilothermic animals, *Appl Environ Microbiol.* 63: 2572-2577.
- Yayanos A.A., Pollard E.C. (1969): A study of the effects of hydrostatic pressure on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Biophys J.* 9:1464–1482
- Zhan Q., Lord K.A., Alamo Jr I., Hollander M.C., Carrier F., Ron D., Kohn K.W., Hoffman B., Liebermann D.A., Fornace Jr A.J. (1994): The gadd and MyD genes define a novel set of mammalian genes encoding acidic proteins that synergistically suppress cell growth. *Mol Cell Biol.* 14: 2361-2371.
- Zhang F., Cong L., Lodato S., Kosuri S., Church G.M., Arlotta P. (2011): Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nat biotechnol.* 29: 149-153.
- ZoBell C.E., Cobet A.B. (1950): Some effects of hydrostatic pressure on the multiplication and morphology of marine bacteria. *J Bacteriol.* 60: 771-781.
- ZoBell C.E., Cobet A.B. (1963): Filament formation by *Escherichia coli* at increased hydrostatic pressures. *J Bacteriol.* 87: 710-719.
- ZoBell C.E., Johnson F.H. (1949): The influence of hydrostatic pressure on the growth and viability of terrestrial and marine bacteria. *J Bacteriol.* 57: 179–189.
- Zuker M. (2003): Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31: 3406-3415.

9.2. A HHP Machine 100 készülék működése

A HHP Machine 100 (8. ábra) segítségével ellenőrzött környezetben 2-90 MPa hidrosztatikus nyomás állítható elő. A készülék a nyomást közvetítő közegként desztillált vizet használ. A nyomáskamra hőmérséklete a készülékbe épített fűtőmodullal szabályozható. A beállított nyomás szabályozása automatikusan történik. A készülék számítógéphez is csatlakoztatható (9. ábrán a számítógépes program felülete látható működés közben), lehetővé téve a nyomáskészülék működése során keletkező adatok tárolását és elemzését valamint egyedi nyomás beállítások alkalmazását (Cryo-Innovation Kft., Budapest, Magyarország). A 7. táblázat a nyomáskészülék legfontosabb paramétereit mutatja be.



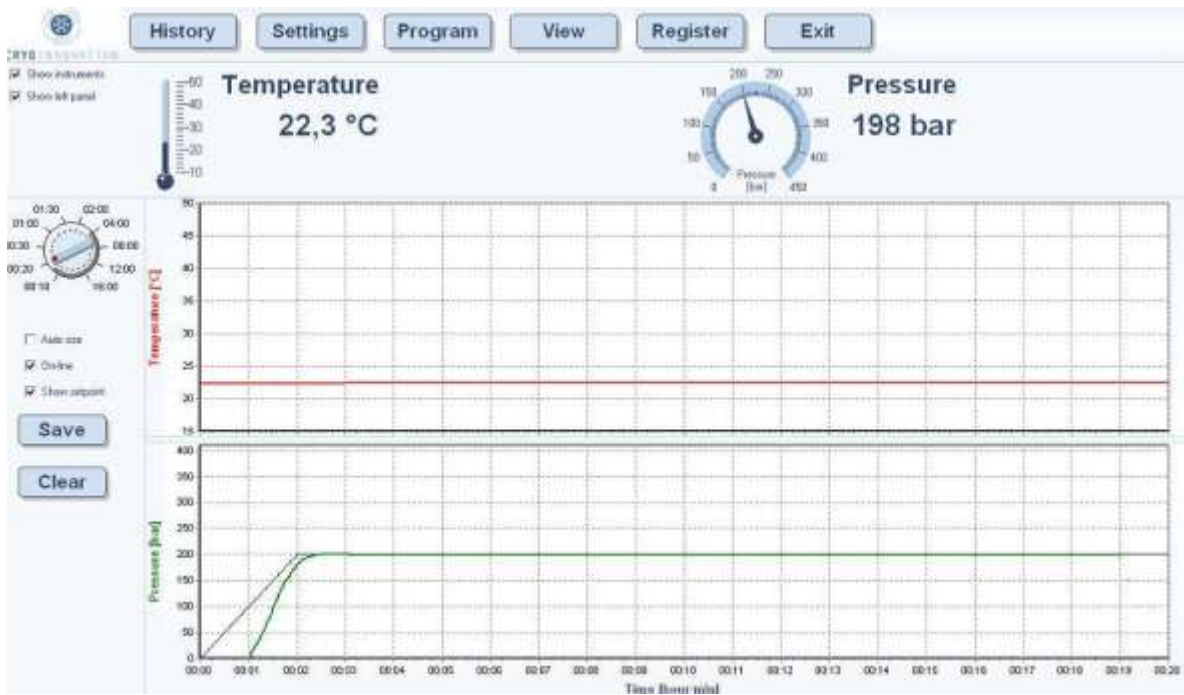
8. ábra

A HHP Machine 100 (Cryo-Innovation Kft., Budapest, Magyarország).

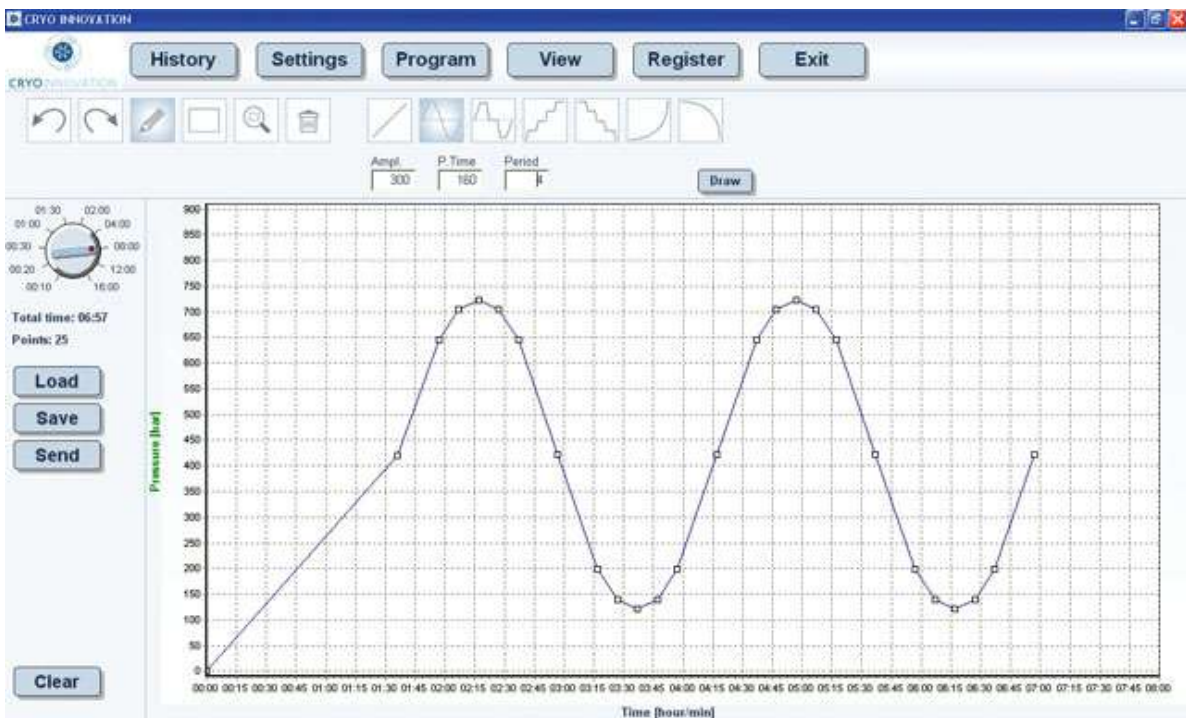
7. táblázat. A HHP-100 készülék paraméterei (Cryo-Innovation Kft., Budapest, Magyarország).

Működési paraméterek	
Működési nyomástartomány	2-90 MPa
Működési hőmérséklettartomány	Helységi hőmérséklet - 45°C
Legnagyobb nyomásemelkedés	1 MPa / sec
Legnagyobb hőmérséklet emelkedés	12°C / óra
Kamra méret	26 x 150 mm (átmérő x mélység)
Kamra térfogat	80 ml
Kamra anyaga	Rozsdamentes acél
Működtetés típusa	Teljesen automatizált, számítógép vezérelt
Záró rendszer	Kézi
Nyomásleadás pontossága	1%
Hőmérsékletvezérlés pontossága	± 1°C
Működtetési környezet hőmérséklete	0-25°C
Vezérlés és csatlakozások	
Kezelő felület	Önálló mód: érintőképernyős LCD
	Számítógép vezérelt: LCD és PC
Szükséges operációs rendszer, memória	Windows XP, 64 KB
LCD érintőképernyő mérete	128 x 64 pixel
Számítógépes csatlakozás	RS232 / USB
Áramforrás	230 V, 50 Hz, (maximum 200 W)
A kezelőfelület jellemzői	
Érintőképernyős LCD	Beállítható a nyomás nagysága és időtartama, valamint a nyomáskezelés hőmérséklete.
	A kijelzőn nyomon követhető az aktuális nyomás és hőmérséklet.
	A ciklusadatot eltárolja.
	Az adatok számítógépre átvihetők.
	Egy csatlakoztatott számítógépről az egyéni kezelési beállítások letölthetők és futtathatók.
Számítógépes program	Archivál minden lefutott ciklust.
	Grafikusan kijelzi az aktuális ciklus paramétereit.
	Speciális nyomás profilok tervezhetők a programmal (pl. oszcilláció), amelyek lefuttathatók a készüléken.
Fizikai paraméterek	
Méret	505 x 340 x 350 mm (sz x m x h)
Súly	45 kg

(A)



(B)



9. ábra

A HHP 100 készülék szoftvere működés közben. (A) Általános, változatlan nyomásértéken végzett kezelés, (B) Egyedi, 15-75 MPa között oszcilláló nyomásértéken végzett kezelés (Cryo-Innovation Kft., Budapest, Magyarország; Pribenszky et al. 2012)

9.2.1. Minták előkészítése

A mintákat a megfelelő tároló eszközbe helyezük, hogy a nyomás közvetítése a kívánt módon megtörténjen. Ilyenek például a különböző méretű műszalmák (0,25-5 ml), amelyekbe a hímivarsejteket, petesejteket, embriókat vagy egyéb sejteket a számukra alkalmas médiumban (pl. TCM-199, G-MOPS, KSOM) juttatjuk be. A tárolóedényt légbuborékok nélkül kell megtölteni és megfelelően lezárni úgy, hogy a mintákat esetlegesen károsító desztillált víz ne tudjon bejutni a tároló eszközbe (Cryo-Innovation Kft., Budapest, Magyarország).

9.2.2. A nyomáskezelés menete

1. A kívánt nyomás (bar-ban kifejezve), hőmérséklet (°C) és idő (h:min) értékek beprogramozása.
2. A készülék automatikusan a kívánt hőmérsékletre melegíti a nyomáskamrát, illetve ha a kamra hőmérséklete melegebb, akkor meg kell várni, amíg a kamra a kívánt hőmérsékletre hűl.
3. A nyomáskamra fedelének kinyitása, az óra járásának megfelelően tekerve.
4. A megfelelő tárolóedényben lévő minták behelyezése a kamrában található desztillált vízbe.
5. A fedél visszazárása. A megfelelő záráshoz a kamrában minimum 2 MPa nyomásnak kell uralkodnia. A készülék hangjelzést ad, amikor ez megtörtént és a fedő rendben lezárult.
6. A futtatás gomb megnyomása után a programozott nyomásszabályozás elindul. A készülék szoftvere segítségével valós időben követhetők a kezelés aktuális paraméterei.
7. A nyomáskezelési program végén a készülék automatikusan leáll és az eredeti nyomás értéket állítja vissza a kamrába, ezután a minták kivehetők (Cryo-Innovation Kft., Budapest, Magyarország).

9.3. A négysejtes embriókban szignifikáns expresszióváltozást mutató gének listája(P < 0,05, változás mértéke \geq 1,5)

Szimbólum	P-érték	Változás iránya	Mértéke	Leírás
Uqcr11	0,00005	csökkent	1,68	Mus musculus ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit XI (Uqcr11), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_025650]
1110004E09Rik	0,00007	nőtt	2,25	Mus musculus RIKEN cDNA 1110004E09 gene (1110004E09Rik), mRNA [NM_026502]
Klk1b24	0,00016	nőtt	2,00	Mus musculus kallikrein 1-related peptidase b24 (Klk1b24), mRNA [NM_010643]
Pgd	0,00020	nőtt	2,24	Mus musculus phosphogluconate dehydrogenase (Pgd), mRNA [NM_001081274]
Fam176b	0,00041	nőtt	2,62	Mus musculus family with sequence similarity 176, member B (Fam176b), mRNA [NM_172145]
Fam159b	0,00046	csökkent	4,16	Mus musculus family with sequence similarity 159, member B (Fam159b), mRNA [NM_029984]
Fam65c	0,00059	csökkent	2,06	Mus musculus adult male tongue cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:2310033K02 product:weakly similar to DJ530I15.2 (NOVEL PROTEIN SIMILAR TO PLACENTAL PROTEIN DIFF40) (FRAGMENT) [Homo sapiens], full insert sequence. [AK009597]
Pcnt	0,00064	csökkent	2,36	Mus musculus pericentrin (kendrin) (Pcnt), transcript variant 1, mRNA [NM_008787]
Gadd45a	0,00095	nőtt	1,98	Mus musculus growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha (Gadd45a), mRNA [NM_007836]
Cdca5	0,00097	nőtt	1,73	Mus musculus cell division cycle associated 5 (Cdca5), mRNA [NM_026410]
Mastl	0,00100	csökkent	2,62	Mus musculus microtubule associated serine/threonine kinase-like (Mastl), mRNA [NM_025979]
Fbxo6	0,00121	csökkent	1,58	Mus musculus F-box protein 6 (Fbxo6), transcript variant 1, mRNA [NM_015797]
Acot13	0,00124	csökkent	3,97	Mus musculus acyl-CoA thioesterase 13 (Acot13), mRNA [NM_025790]
Dcun1d1	0,00125	nőtt	6,23	Mus musculus DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 1 (S. cerevisiae) (Dcun1d1), mRNA [NM_033623]
Bptf	0,00127	csökkent	1,89	Mus musculus bromodomain PHD finger transcription factor (Bptf), mRNA [NM_176850]
Rpl34	0,00178	csökkent	1,79	Mus musculus ribosomal protein L34 (Rpl34), transcript variant 2, mRNA [NM_001005859]
Phlda2	0,00188	nőtt	2,02	Mus musculus pleckstrin homology-like domain, family A, member 2 (Phlda2), mRNA [NM_009434]
2310044H10Rik	0,00191	csökkent	6,47	Mus musculus RIKEN cDNA 2310044H10 gene (2310044H10Rik), mRNA [NM_197991]
Gm6905	0,00199	csökkent	1,95	PREDICTED: Mus musculus similar to ribosomal protein L11 (LOC268696), misc RNA [XR_004960]
Fau	0,00200	csökkent	1,76	Mus musculus Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed (fox derived) (Fau), transcript variant 1, mRNA [NM_007990]
Iqce	0,00213	nőtt	1,79	Mus musculus IQ motif containing E (Iqce), mRNA [NM_028833]
Rnaseh2b	0,00223	csökkent	2,44	Mus musculus ribonuclease H2, subunit B (Rnaseh2b), mRNA [NM_026001]
Mrps18c	0,00225	csökkent	2,03	Mus musculus mitochondrial ribosomal protein S18C (Mrps18c), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_026826]
Rps16	0,00234	csökkent	1,81	Mus musculus ribosomal protein S16 (Rps16), mRNA [NM_013647]
Gmfb	0,00236	nőtt	3,15	
1810063B05Rik	0,00285	csökkent	1,94	Mus musculus RIKEN cDNA 1810063B05 gene (1810063B05Rik), mRNA [NM_174987]
Mpeg1	0,00288	nőtt	1,82	Mus musculus macrophage expressed gene 1 (Mpeg1), mRNA [NM_010821]
Cebpz	0,00290	csökkent	2,47	Mus musculus CCAAT/enhancer binding protein zeta (Cebpz), mRNA [NM_001024806]
Epc2	0,00308	nőtt	1,51	Mus musculus enhancer of polycomb homolog 2 (Drosophila) (Epc2), mRNA [NM_172663]
Ccdc85b	0,00347	nőtt	2,69	Mus musculus coiled-coil domain containing 85B (Ccdc85b), transcript variant 1, mRNA [NM_198616]
Rps25	0,00348	csökkent	1,66	Mus musculus ribosomal protein S25 (Rps25), mRNA [NM_024266]
Dhx33	0,00350	nőtt	2,04	Mus musculus DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 33 (Dhx33), mRNA [NM_178367]

A négysejtes embriókban szignifikáns változást mutató gének

Trim3	0,00358	nőtt	1,63	Mus musculus tripartite motif-containing 3 (Trim3), mRNA [NM_018880]
Gon4l	0,00373	csökkent	2,87	Mus musculus gon-4-like (C.elegans) (Gon4l), mRNA [NM_027389]
Sdhd	0,00374	csökkent	4,77	Mus musculus succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein (Sdhd), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_025848]
Rad17	0,00390	nőtt	1,66	Mus musculus RAD17 homolog (S. pombe) (Rad17), transcript variant 1, mRNA [NM_011233]
Atmin	0,00393	nőtt	2,07	Mus musculus ATM interactor (Atmin), mRNA [NM_177700]
Lztr1	0,00400	csökkent	2,54	Mus musculus leucine-zipper-like transcriptional regulator, 1 (Lztr1), mRNA [NM_025808]
Anapc13	0,00407	csökkent	2,24	Mus musculus anaphase promoting complex subunit 13 (Anapc13), mRNA [NM_181394]
2310003F16Rik	0,00416	csökkent	1,77	Mus musculus RIKEN cDNA 2310003F16 gene (2310003F16Rik), mRNA [NM_026318]
Tmem145	0,00433	csökkent	1,83	Mus musculus transmembrane protein 145 (Tmem145), mRNA [NM_183311]
Lrrc58	0,00443	csökkent	1,92	Mus musculus leucine rich repeat containing 58 (Lrrc58), mRNA [NM_177093]
Atp5g3	0,00453	csökkent	1,61	Mus musculus ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F ₀ complex, subunit C3 (subunit 9) (Atp5g3), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_175015]
Nubp1	0,00466	csökkent	2,37	Mus musculus nucleotide binding protein 1 (Nubp1), mRNA [NM_011955]
Rab11fip1	0,00467	csökkent	2,47	Mus musculus RAB11 family interacting protein 1 (class I) (Rab11fip1), mRNA [NM_001080813]
Fbxo30	0,00474	nőtt	1,50	Mus musculus F-box protein 30 (Fbxo30), transcript variant 1, mRNA [NM_027968]
Stat3	0,00578	nőtt	1,79	Mus musculus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), transcript variant 1, mRNA [NM_213659]
Rpl36al	0,00587	csökkent	1,54	Mus musculus ribosomal protein L36A-like (Rpl36al), mRNA [NM_025589]
Syncrip	0,00613	csökkent	2,34	Mus musculus synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein (Syncrip), transcript variant 1, mRNA [NM_019666]
Plekhm1	0,00635	nőtt	1,52	Mus musculus pleckstrin homology domain containing, family M (with RUN domain) member 1 (Plekhm1), mRNA [NM_183034]
Gm3552	0,00641	csökkent	2,10	PREDICTED: Mus musculus similar to Rpl11 protein (LOC100041864), mRNA [XM_001477137]
Kif5c	0,00644	nőtt	2,59	Mus musculus kinesin family member 5C (Kif5c), mRNA [NM_008449]
Smek1	0,00650	nőtt	1,69	Mus musculus SMEK homolog 1, suppressor of mek1 (Dictyostelium) (Smek1), transcript variant 1, mRNA [NM_211355]
Spata5	0,00661	nőtt	1,70	Mus musculus spermatogenesis associated 5 (Spata5), transcript variant 2, mRNA [NM_021343]
Rpl13	0,00664	csökkent	1,68	Mus musculus ribosomal protein L13 (Rpl13), mRNA [NM_016738]
Bspry	0,00665	nőtt	1,78	Mus musculus B-box and SPRY domain containing (Bspry), mRNA [NM_138653]
Eef1g	0,00671	csökkent	3,10	Mus musculus eukaryotic translation elongation factor 1 gamma (Eef1g), mRNA [NM_026007]
Metap1	0,00679	nőtt	1,67	Mus musculus methionyl aminopeptidase 1 (Metap1), mRNA [NM_175224]
	0,00683	nőtt	2,40	BB180072 RIKEN full-length enriched, adult male hypothalamus Mus musculus cDNA clone A230082C16 3'. [BB180072]
Supt5h	0,00703	csökkent	2,02	Mus musculus suppressor of Ty 5 homolog (S. cerevisiae) (Supt5h), mRNA [NM_013676]
Nol8	0,00716	csökkent	2,11	Mus musculus nucleolar protein 8 (Nol8), mRNA [NM_001081350]
Tdp1	0,00723	nőtt	1,70	Mus musculus tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (Tdp1), mRNA [NM_028354]
6030442H21Rik	0,00725	csökkent	1,63	Mus musculus 13 days embryo male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:6030442H21 product:unclassifiable, full insert sequence. [AK020062]
Itch	0,00736	csökkent	1,89	Mus musculus ubiquitin protein ligase (Itch) mRNA, complete cds. [AF037454]
Mpzl1	0,00750	nőtt	2,24	Mus musculus myelin protein zero-like 1 (Mpzl1), transcript variant 2, mRNA [NM_001001880]
Phlda2	0,00751	nőtt	1,94	Mus musculus pleckstrin homology-like domain, family A, member 2 (Phlda2), mRNA [NM_009434]
C130026I21Rik	0,00758	csökkent	2,62	Mus musculus RIKEN cDNA C130026I21 gene (C130026I21Rik), transcript variant 1, mRNA [NM_175219]
Mrps31	0,00776	csökkent	1,99	Mus musculus mitochondrial ribosomal protein S31 (Mrps31), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_020560]

A négysejtes embriókban szignifikáns változást mutató gének

Acer2	0,00790	nőtt	1,71	Mus musculus 10 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:B930001C21 product:hypothetical protein, full insert sequence. [AK046888]
Ldhd	0,00791	nőtt	1,90	Mus musculus lactate dehydrogenase B (Ldhd), mRNA [NM_008492]
Ube2k	0,00833	nőtt	2,10	Mus musculus ubiquitin-conjugating enzyme E2K (UBC1 homolog, yeast) (Ube2k), mRNA [NM_016786]
	0,00842	nőtt	1,90	Mus musculus 6 days neonate head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:5430420K21 product:hypothetical protein, full insert sequence. [AK017327]
Il15	0,00844	nőtt	1,61	Mus musculus mRNA for shorter isoform of interleukin 15, partial cds. [AB022307]
Ube2o	0,00848	nőtt	1,84	Mus musculus ubiquitin-conjugating enzyme E2O (Ube2o), mRNA [NM_173755]
Chd6	0,00855	nőtt	1,75	Mus musculus chromodomain helicase DNA binding protein 6, mRNA (cDNA clone IMAGE:3597702), partial cds. [BC027287]
Slc30a6	0,00855	nőtt	3,17	Mus musculus solute carrier family 30 (zinc transporter), member 6 (Slc30a6), mRNA [NM_144798]
Adi1	0,00874	csökkent	2,38	Mus musculus acireductone dioxygenase 1 (Adi1), mRNA [NM_134052]
	0,00874	csökkent	2,26	Mus musculus adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:1700051O16 product:Warning: possibly chimeric clone, full insert sequence. [AK006763]
Rit1	0,00876	csökkent	1,72	Mus musculus Ras-like without CAAX 1 (Rit1), transcript variant 1, mRNA [NM_009069]
Rxra	0,00877	nőtt	1,59	Mus musculus retinoid X receptor alpha (Rxra), mRNA [NM_011305]
Tut1	0,00883	csökkent	1,89	Mus musculus terminal uridylyl transferase 1, U6 snRNA-specific (Tut1), mRNA [NM_197993]
Gulo	0,00887	csökkent	2,55	Mus musculus gulonolactone (L-) oxidase (Gulo), mRNA [NM_178747]
Pelo	0,00888	nőtt	1,87	Mus musculus pelota homolog (Drosophila) (Pelo), mRNA [NM_134058]
BC018101	0,00902	csökkent	1,63	Mus musculus cDNA sequence BC018101 (BC018101), transcript variant 1, mRNA [NM_001005358]
Pphln1	0,00906	csökkent	3,57	Mus musculus periphilin 1 (Pphln1), transcript variant 1, mRNA [NM_146062]
Wdr46	0,00911	csökkent	2,86	Mus musculus WD repeat domain 46 (Wdr46), mRNA [NM_020603]
Ugdh	0,00914	nőtt	3,24	Mus musculus UDP-glucose dehydrogenase (Ugdh), mRNA [NM_009466]
Rap2a	0,00915	nőtt	3,77	Mus musculus RAS related protein 2a (Rap2a), mRNA [NM_029519]
Rlf	0,00916	csökkent	2,13	Mus musculus rearranged L-myc fusion sequence (Rlf), mRNA [NM_001081013]
Dbf4	0,00935	nőtt	2,20	Mus musculus DBF4 homolog (S. cerevisiae) (Dbf4), mRNA [NM_013726]
Psme2	0,00952	nőtt	4,46	Mus musculus proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, beta (Psme2), transcript variant 1, mRNA [NM_011190]
Lmna	0,00954	csökkent	2,51	Mus musculus lamin A (Lmna), transcript variant 2, mRNA [NM_019390]
Gng5	0,00965	csökkent	2,26	Mus musculus guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 5 (Gng5), mRNA [NM_010318]
Gm13777	0,00966	csökkent	1,83	PREDICTED: Mus musculus similar to acidic ribosomal phosphoprotein P1, transcript variant 1 (LOC279067), mRNA [XM_205095]
Arhgef7	0,00980	nőtt	4,16	Mus musculus Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF7) (Arhgef7), transcript variant 1, mRNA [NM_001113517]
Prdx4	0,01002	nőtt	7,80	Mus musculus B cells CRL-1702 WEHI 231 cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:G430003P20 product:peroxiredoxin 4, full insert sequence. [AK165551]
Mphosph10	0,01006	csökkent	2,07	Mus musculus M-phase phosphoprotein 10 (U3 small nucleolar ribonucleoprotein) (Mphosph10), mRNA [NM_026483]
Nufip2	0,01013	csökkent	3,10	Mus musculus nuclear fragile X mental retardation protein interacting protein 2 (Nufip2), mRNA [NM_001024205]
	0,01023	csökkent	1,67	lae72b04.y1 Gastric Epithelial Progenitor Mus musculus cDNA 5', mRNA sequence [CF546364]
M6pr	0,01032	csökkent	2,18	Mus musculus mannose-6-phosphate receptor, cation dependent (M6pr), mRNA [NM_010749]
Cnih	0,01046	nőtt	1,62	Mus musculus cornichon homolog (Drosophila) (Cnih), mRNA [NM_009919]
Gtdc1	0,01046	nőtt	5,76	Mus musculus 16 days neonate thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A130074L23 product:unclassifiable, full insert sequence. [AK038057]
Tpr	0,01050	csökkent	3,46	Mus musculus translocated promoter region (Tpr), mRNA [NM_133780]
Chml	0,01062	csökkent	2,07	Mus musculus choroideremia-like (Chml), mRNA [NM_021350]

A négysejtes embriókban szignifikáns változást mutató gének

St13	0,01075	csökkent	1,91	Mus musculus 18-day embryo whole body cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:1110007I03 product:unclassifiable, full insert sequence. [AK003545]
Ldb1	0,01079	nőtt	1,54	Mus musculus LIM domain binding 1 (Ldb1), transcript variant 3, mRNA [NM_010697]
Rpl23a	0,01083	csökkent	1,59	Mus musculus ribosomal protein L23a (Rpl23a), mRNA [NM_207523]
Lce1l	0,01087	nőtt	1,96	Mus musculus late cornified envelope 1L (Lce1l), mRNA [NM_028628]
2610002J23Rik	0,01097	nőtt	2,89	Mus musculus 10 days embryo whole body cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:2610002J23 product:unclassifiable, full insert sequence. [AK011292]
Phf3	0,01105	csökkent	2,29	Mus musculus PHD finger protein 3 (Phf3), mRNA [NM_001081080]
Ybx1	0,01114	csökkent	1,54	Mus musculus Y box protein 1 (Ybx1), mRNA [NM_011732]
	0,01129	nőtt	1,79	Q7TS76_MOUSE (Q7TS76) Sip1 protein, partial (25%) [TC1643988]
Rpl6	0,01151	csökkent	1,61	Mus musculus ribosomal protein L6 (Rpl6), mRNA [NM_011290]
S100a6	0,01151	nőtt	1,52	Mus musculus S100 calcium binding protein A6 (calcylin) (S100a6), mRNA [NM_011313]
Defb19	0,01163	nőtt	1,74	Mus musculus defensin beta 19 (Defb19), mRNA [NM_145157]
Ulk2	0,01172	nőtt	2,74	Mus musculus Unc-51 like kinase 2 (C. elegans) (Ulk2), mRNA [NM_013881]
Wdr55	0,01182	nőtt	2,38	Mus musculus WD repeat domain 55 (Wdr55), mRNA [NM_026464]
Pabpc2	0,01199	csökkent	1,53	Mus musculus poly(A) binding protein, cytoplasmic 2 (Pabpc2), mRNA [NM_011033]
Ttl	0,01235	csökkent	2,15	Mus musculus tubulin tyrosine ligase (Ttl), mRNA [NM_027192]
Tspan4	0,01254	csökkent	2,19	Mus musculus tetraspanin 4 (Tspan4), mRNA [NM_053082]
Ddx26b	0,01257	nőtt	2,28	Mus musculus DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 26B (Ddx26b), mRNA [NM_172779]
Smc4	0,01265	csökkent	2,37	Mus musculus structural maintenance of chromosomes 4 (Smc4), mRNA [NM_133786]
Dctn3	0,01301	csökkent	1,92	Mus musculus dynactin 3 (Dctn3), transcript variant 1, mRNA [NM_016890]
Zbtb43	0,01308	csökkent	2,33	Mus musculus zinc finger and BTB domain containing 43 (Zbtb43), transcript variant 1, mRNA [NM_027947]
Rrp7a	0,01309	nőtt	1,96	Mus musculus adult male olfactory brain cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:6430628D06 product:hypothetical RNA-binding domain, RBD structure containing protein, full insert sequence. [AK032596]
Rpl18a	0,01324	csökkent	1,55	Mus musculus ribosomal protein L18A (Rpl18a), mRNA [NM_029751]
Fmn13	0,01353	nőtt	2,12	Mus musculus formin-like 3 (Fmn13), mRNA [NM_011711]
Nup35	0,01357	nőtt	1,77	Mus musculus nucleoporin 35 (Nup35), mRNA [NM_027091]
Intu	0,01379	nőtt	1,63	Mus musculus inturnd planar cell polarity effector homolog (Drosophila) (Intu), mRNA [NM_175515]
Tkt1l	0,01388	nőtt	2,64	Mus musculus transketolase-like 1 (Tkt1l), mRNA [NM_031379]
LOC100044541	0,01396	nőtt	1,82	predicted gene 4736 Gene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3647826] [ENSMUST00000091791]
Gpr172b	0,01402	nőtt	1,50	Mus musculus G protein-coupled receptor 172B (Gpr172b), mRNA [NM_029643]
Mrps30	0,01436	nőtt	1,85	Mus musculus mitochondrial ribosomal protein S30 (Mrps30), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_021556]
Cops4	0,01443	csökkent	1,67	Mus musculus COP9 (constitutive photomorphogenic) homolog, subunit 4 (Arabidopsis thaliana) (Cops4), mRNA [NM_012001]
Nup188	0,01445	nőtt	1,71	Mus musculus strain BALB/c unknown mRNA. [U89435]
Rock1	0,01446	csökkent	1,92	Mus musculus Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1 (Rock1), mRNA [NM_009071]
Tpt1	0,01453	csökkent	1,63	Mus musculus tumor protein, translationally-controlled 1 (Tpt1), mRNA [NM_009429]
Pnrc2	0,01455	csökkent	2,78	Mus musculus proline-rich nuclear receptor coactivator 2 (Pnrc2), mRNA [NM_026383]
Lmx1b	0,01456	nőtt	1,59	Mus musculus LIM homeobox transcription factor 1 beta (Lmx1b), mRNA [NM_010725]
Eif4ebp1	0,01459	csökkent	1,71	Mus musculus eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 (Eif4ebp1), mRNA [NM_007918]
Hexb	0,01461	csökkent	1,65	Mus musculus hexosaminidase B (Hexb), mRNA [NM_010422]
Fem1b	0,01471	nőtt	2,20	Mus musculus feminization 1 homolog b (C. elegans) (Fem1b), mRNA [NM_010193]

A négysejtes embriókban szignifikáns változást mutató gének

Gcap14	0,01511	csökkent	2,39	Mus musculus granule cell antiserum positive 14 (Gcap14), transcript variant 1, mRNA [NM_027045]
Mllt3	0,01543	nőtt	2,06	Mus musculus myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 3 (Mllt3), transcript variant 1, mRNA [NM_027326]
Trmt11	0,01550	csökkent	1,82	Mus musculus tRNA methyltransferase 11 homolog (S. cerevisiae) (Trmt11), mRNA [NM_028604]
Cyp2c37	0,01564	nőtt	2,30	Mus musculus cytochrome P450, family 2. subfamily c, polypeptide 37 (Cyp2c37), mRNA [NM_010001]
Smpdl3a	0,01572	csökkent	2,83	Mus musculus sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A (Smpdl3a), mRNA [NM_020561]
Rps17	0,01573	csökkent	1,98	Mus musculus ribosomal protein S17 (Rps17), mRNA [NM_009092]
Usp54	0,01576	nőtt	1,55	Mus musculus adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4930429G18 product:hypothetical General substrate transporters containing protein, full insert sequence. [AK019588]
Ndufaf4	0,01589	csökkent	1,95	Mus musculus NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, assembly factor 4 (Ndufaf4), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_026742]
Rpl22	0,01592	csökkent	2,73	Mus musculus ribosomal protein L22 (Rpl22), mRNA [NM_009079]
Dnajc2	0,01624	csökkent	3,16	Mus musculus DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 2 (Dnajc2), mRNA [NM_009584]
Ndufc2	0,01634	csökkent	3,52	Mus musculus NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 2 (Ndufc2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_024220]
Rps2	0,01637	csökkent	1,58	Mus musculus ribosomal protein S2 (Rps2), mRNA [NM_008503]
Slc4a1ap	0,01641	csökkent	1,92	Mus musculus solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1, adaptor protein (Slc4a1ap), mRNA [NM_009206]
Otud5	0,01666	csökkent	1,50	Mus musculus OTU domain containing 5 (Otud5), mRNA [NM_138604]
Zfp330	0,01686	nőtt	1,52	Mus musculus zinc finger protein 330 (Zfp330), mRNA [NM_145600]
Rpl35	0,01688	csökkent	2,17	Mus musculus ribosomal protein L35 (Rpl35), mRNA [NM_025592]
Sgk3	0,01713	csökkent	2,96	Mus musculus serum/glucocorticoid regulated kinase 3 (Sgk3), transcript variant 1, mRNA [NM_133220]
	0,01713	nőtt	2,69	Mus musculus 13 days embryo male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:6030423C18 product:lysyl-tRNA synthetase, pseudogene 1, full insert sequence. [AK077897]
Psm3	0,01728	csökkent	2,73	Mus musculus proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 3 (Psm3), mRNA [NM_011971]
4833408D11Rik	0,01733	nőtt	2,01	Mus musculus 0 day neonate head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4833408D11 product:unclassifiable, full insert sequence. [AK014664]
Calm3	0,01754	nőtt	1,55	Mus musculus calmodulin 3 (Calm3), mRNA [NM_007590]
Nop58	0,01764	csökkent	1,74	Mus musculus NOP58 ribonucleoprotein homolog (yeast) (Nop58), mRNA [NM_018868]
Osbp19	0,01795	csökkent	1,87	Mus musculus oxysterol binding protein-like 9 (Osbp19), transcript variant b, mRNA [NM_173350]
Agpat5	0,01797	nőtt	1,53	Mus musculus 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 5 (lysophosphatidic acid acyltransferase, epsilon) (Agpat5), mRNA [NM_026792]
9130011J15Rik	0,01826	nőtt	1,82	Mus musculus RIKEN cDNA 9130011J15 gene (9130011J15Rik), mRNA [NM_172396]
Lemd3	0,01876	nőtt	2,65	Mus musculus LEM domain containing 3 (Lemd3), mRNA [NM_001081193]
Slc39a13	0,01878	nőtt	1,73	Mus musculus solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 13 (Slc39a13), mRNA [NM_026721]
Gtf2ird1	0,01917	csökkent	2,03	Mus musculus general transcription factor II I repeat domain-containing 1 (Gtf2ird1), transcript variant 1, mRNA [NM_020331]
Tbx3	0,01927	csökkent	1,63	Mus musculus T-box 3 (Tbx3), transcript variant 1, mRNA [NM_011535]
Rnf141	0,01935	nőtt	2,52	ring finger protein 141 Gene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1914400] [ENSMUST00000106682]
Ibtk	0,01942	nőtt	1,65	Mus musculus inhibitor of Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase (Ibtk), mRNA [NM_001081282]
Polr2i	0,01959	csökkent	1,58	Mus musculus polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide I (Polr2i), mRNA [NM_027259]
Slc29a2	0,01961	nőtt	1,51	Mus musculus solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 2 (Slc29a2), mRNA [NM_007854]
Sec61g	0,01963	csökkent	1,76	Mus musculus SEC61, gamma subunit (Sec61g), transcript variant 1, mRNA [NM_011343]

A négysejtes embriókban szignifikáns változást mutató gének

Rnaseh2a	0,01968	nőtt	1,62	Mus musculus ribonuclease H2, large subunit (Rnaseh2a), mRNA [NM_027187]
1810020D17Rik	0,01974	nőtt	2,43	Mus musculus RIKEN cDNA 1810020D17 gene (1810020D17Rik), transcript variant 2, mRNA [NM_183251]
1700040A12Rik	0,01975	nőtt	1,70	Mus musculus adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:1700040A12 product:unclassifiable, full insert sequence. [AK018844]
Ddx21	0,01976	csökkent	1,90	Mus musculus DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 21 (Ddx21), mRNA [NM_019553]
Tcf7l2	0,01981	csökkent	2,43	Mus musculus transcription factor 7-like 2, T-cell specific, HMG-box (Tcf7l2), transcript variant 3, mRNA [NM_009333]
Usp38	0,01986	nőtt	1,52	Mus musculus ubiquitin specific peptidase 38 (Usp38), mRNA [NM_027554]
Rps3a	0,02005	csökkent	2,32	Mus musculus ribosomal protein S3A (Rps3a), mRNA [NM_016959]
Lrrc46	0,02015	nőtt	1,78	Mus musculus leucine rich repeat containing 46 (Lrrc46), mRNA [NM_027026]
Pkmyt1	0,02024	csökkent	1,92	Mus musculus MYT1 kinase (Myt1) mRNA, complete cds. [AF175892]
Oas1d	0,02035	nőtt	1,79	Mus musculus 2'-5' oligoadenylate synthetase 1D (Oas1d), mRNA [NM_133893]
Zfp593	0,02052	csökkent	2,48	Mus musculus activated spleen cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:F830108D24 product:Zinc finger protein T86, full insert sequence. [AK156931]
	0,02077	nőtt	1,83	Mus musculus 10 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:B930003O19 product:unclassifiable, full insert sequence. [AK046927]
Btg4	0,02081	nőtt	2,16	Mus musculus B-cell translocation gene 4 (Btg4), mRNA [NM_019493]
Dhx36	0,02085	nőtt	2,79	Mus musculus DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 36 (Dhx36), mRNA [NM_028136]
Errfi1	0,02090	nőtt	11,13	Mus musculus ERBB receptor feedback inhibitor 1 (Errfi1), mRNA [NM_133753]
Cisd1	0,02093	csökkent	2,08	Mus musculus CDGSH iron sulfur domain 1 (Cisd1), mRNA [NM_134007]
	0,02105	nőtt	1,83	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 4 Gene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1341873] [ENSMUST00000074855]
Baz2a	0,02112	csökkent	2,80	Mus musculus bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2A (Baz2a), mRNA [NM_054078]
Wscd2	0,02133	nőtt	2,14	Mus musculus WSC domain containing 2 (Wscd2), mRNA [NM_177292]
Polr2g	0,02134	csökkent	1,90	Mus musculus polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide G (Polr2g), mRNA [NM_026329]
Plac9	0,02159	csökkent	1,82	Mus musculus placenta specific 9 (Plac9), mRNA [NM_207229]
Rpl24	0,02165	csökkent	6,95	Mus musculus ribosomal protein L24 (Rpl24), mRNA [NM_024218]
Tmem85	0,02166	csökkent	1,61	Mus musculus transmembrane protein 85 (Tmem85), mRNA [NM_026519]
Itpa	0,02167	csökkent	1,67	Mus musculus inosine triphosphatase (nucleoside triphosphate pyrophosphatase) (Itpa), mRNA [NM_025922]
Bat2l2	0,02171	csökkent	2,22	Mus musculus HLA-B associated transcript 2-like 2 (Bat2l2), mRNA [NM_001081290]
Rab11fip1	0,02173	csökkent	1,94	Mus musculus RAB11 family interacting protein 1 (class I) (Rab11fip1), mRNA [NM_001080813]
Clec10a	0,02180	nőtt	2,67	Mus musculus C-type lectin domain family 10, member A (Clec10a), mRNA [NM_010796]
Rpl19	0,02193	csökkent	2,13	Mus musculus ribosomal protein L19 (Rpl19), transcript variant 1, mRNA [NM_009078]
Haus6	0,02210	nőtt	1,59	Mus musculus HAUS augmin-like complex, subunit 6 (Haus6), mRNA [NM_173400]
Taf9	0,02216	nőtt	1,70	Mus musculus TAF9 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor (Taf9), transcript variant 2, mRNA [NM_027592]
Cand1	0,02222	csökkent	1,72	Mus musculus cullin associated and neddylation disassociated 1 (Cand1), mRNA [NM_027994]
Mfsd1	0,02226	csökkent	1,58	Mus musculus major facilitator superfamily domain containing 1 (Mfsd1), mRNA [NM_025813]
Cdh24	0,02237	nőtt	1,68	Mus musculus cadherin-like 24 (Cdh24), mRNA [NM_199470]
Tmem9b	0,02241	nőtt	7,69	Mus musculus TMEM9 domain family, member B (Tmem9b), mRNA [NM_020050]
Agbl5	0,02247	nőtt	2,09	Mus musculus ATP/GTP binding protein-like 5 (Agbl5), transcript variant 5, mRNA [NM_174849]
Erv3	0,02247	nőtt	1,80	Mus musculus endogenous retroviral sequence 3 (Erv3), mRNA [NM_001166206]
Ap3s1	0,02286	csökkent	2,09	Mus musculus adaptor-related protein complex 3, sigma 1 subunit (Ap3s1), mRNA [NM_009681]

A négysejtes embriókban szignifikáns változást mutató gének

AA881470	0,02288	nőtt	1,90	Mus musculus EST AA881470 (AA881470), transcript variant 1, mRNA [NM_172724]
Dhx40	0,02290	csökkent	1,51	Mus musculus DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 40 (Dhx40), mRNA [NM_026191]
Blm	0,02292	csökkent	2,01	Mus musculus Bloom syndrome homolog (human) (Blm), transcript variant 1, mRNA [NM_007550]
Plekha3	0,02302	nőtt	3,25	Mus musculus pleckstrin homology domain-containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 3 (Plekha3), mRNA [NM_031256]
Rabac1	0,02303	csökkent	2,30	Mus musculus Rab acceptor 1 (prenylated) (Rabac1), mRNA [NM_010261]
Nme4	0,02305	csökkent	1,78	Mus musculus non-metastatic cells 4, protein expressed in (Nme4), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_019731]
Hnrpll	0,02339	csökkent	1,97	Mus musculus heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like (Hnrpll), mRNA [NM_144802]
Cab39	0,02340	csökkent	1,56	Mus musculus calcium binding protein 39 (Cab39), mRNA [NM_133781]
Heatr2	0,02352	csökkent	1,54	Mus musculus HEAT repeat containing 2 (Heatr2), mRNA [NM_001081265]
Uba52	0,02369	csökkent	1,93	Mus musculus ubiquitin/60S ribosomal fusion protein mRNA, complete cds. [AF118402]
Uba52	0,02371	csökkent	2,47	Mus musculus ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1 (Uba52), mRNA [NM_019883]
Rheb1	0,02372	nőtt	2,32	Mus musculus Ras homolog enriched in brain like 1 (Rheb1), mRNA [NM_026967]
Tlr9	0,02387	nőtt	1,87	Mus musculus toll-like receptor 9 (Tlr9), mRNA [NM_031178]
Dusp23	0,02389	csökkent	1,56	Mus musculus dual specificity phosphatase 23 (Dusp23), mRNA [NM_026725]
Hmgxb4	0,02417	csökkent	3,86	Mus musculus HMG box domain containing 4 (Hmgxb4), mRNA [NM_178017]
Ybx1	0,02445	csökkent	1,56	Mus musculus Y box protein 1 (Ybx1), mRNA [NM_011732]
Zfp560	0,02446	csökkent	1,84	Mus musculus adult male tongue cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:2310022J22 product:kit ligand, full insert sequence. [AK009475]
Slc19a2	0,02458	nőtt	5,12	Mus musculus solute carrier family 19 (thiamine transporter), member 2 (Slc19a2), mRNA [NM_054087]
Aim1	0,02489	csökkent	2,72	Mus musculus absent in melanoma 1 (Aim1), mRNA [NM_172393]
Ppp2r5c	0,02503	nőtt	2,74	Mus musculus protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), gamma isoform (Ppp2r5c), transcript variant 1, mRNA [NM_012023]
Gm7634	0,02504	csökkent	1,53	PREDICTED: Mus musculus similar to Ac2-210 (LOC665434), mRNA [XM_001473920]
Psm1	0,02515	csökkent	1,86	Mus musculus proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 1 (Psm1), mRNA [NM_011965]
Aprt	0,02522	csökkent	1,78	Mus musculus adenine phosphoribosyl transferase (Aprt), mRNA [NM_009698]
Hnrnpa2b1	0,02534	csökkent	2,01	Mus musculus heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 (Hnrnpa2b1), transcript variant 2, mRNA [NM_182650]
Nol6	0,02536	csökkent	1,75	Mus musculus nucleolar protein family 6 (RNA-associated) (Nol6), mRNA [NM_139236]
Metap2	0,02554	csökkent	1,55	Mus musculus methionine aminopeptidase 2 (Metap2), mRNA [NM_019648]
3110001D03Rik	0,02566	csökkent	1,57	Mus musculus RIKEN cDNA 3110001D03 gene (3110001D03Rik), mRNA [NM_025849]
Tmem111	0,02569	csökkent	1,72	Mus musculus transmembrane protein 111 (Tmem111), mRNA [NM_175101]
Nae1	0,02577	csökkent	4,84	Mus musculus NEDD8 activating enzyme E1 subunit 1 (Nae1), mRNA [NM_144931]
Ubl4	0,02592	csökkent	2,33	Mus musculus ubiquitin-like 4 (Ubl4), mRNA [NM_145405]
Pppde1	0,02605	nőtt	2,98	Mus musculus PPPDE peptidase domain containing 1 (Pppde1), mRNA [NM_024282]
Ccar1	0,02605	csökkent	1,78	Mus musculus cell division cycle and apoptosis regulator 1 (Ccar1), mRNA [NM_026201]
Aurkaip1	0,02609	csökkent	2,03	Mus musculus aurora kinase A interacting protein 1 (Aurkaip1), mRNA [NM_025338]
	0,02629	csökkent	2,21	Q5JK17_ORYSA (Q5JK17) Transcription factor ICE1-like, partial (5%) [TC1624228]
Lsm7	0,02637	csökkent	1,52	Mus musculus LSM7 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae) (Lsm7), mRNA [NM_025349]
Degs1	0,02650	nőtt	1,63	Mus musculus degenerative spermatocyte homolog 1 (Drosophila) (Degs1), mRNA [NM_007853]
Fam46c	0,02652	nőtt	1,71	Mus musculus family with sequence similarity 46, member C (Fam46c), mRNA [NM_001142952]

A négysejtes embriókban szignifikáns változást mutató gének

Cct5	0,02654	csökkent	2,37	Mus musculus chaperonin containing Tcp1, subunit 5 (epsilon) (Cct5), mRNA [NM_007637]
Nme2	0,02678	csökkent	1,64	Mus musculus non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed in (Nme2), transcript variant 2, mRNA [NM_001077529]
Rnf130	0,02681	csökkent	3,19	Mus musculus ring finger protein 130 (Rnf130), mRNA [NM_021540]
Wdr3	0,02682	nőtt	1,78	Mus musculus WD repeat domain 3 (Wdr3), mRNA [NM_175552]
Cad	0,02682	csökkent	1,71	Mus musculus carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase (Cad), mRNA [NM_023525]
Mlst8	0,02691	csökkent	3,94	Mus musculus MTOR associated protein, LST8 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (Mlst8), mRNA [NM_019988]
Ap3s1	0,02709	csökkent	1,66	Mus musculus adaptor-related protein complex 3, sigma 1 subunit (Ap3s1), mRNA [NM_009681]
Acaca	0,02710	nőtt	1,65	Mus musculus acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha (Acaca), mRNA [NM_133360]
Pa2g4	0,02729	csökkent	2,28	Mus musculus proliferation-associated 2G4 (Pa2g4), mRNA [NM_011119]
Atp5j	0,02751	csökkent	1,76	Mus musculus ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit F (Atp5j), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_016755]
lah1	0,02753	csökkent	1,54	Mus musculus 0 day neonate head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4833421E05 product:weakly similar to SIMILARITY TO ISOAMYL ACETATE-HYDROLYZING ESTERASE [<i>Arabidopsis thaliana</i>], full insert sequence. [AK014743]
Epas1	0,02758	csökkent	4,22	Mus musculus endothelial PAS domain protein 1 (Epas1), mRNA [NM_010137]
Ktn1	0,02759	nőtt	1,59	Mus musculus kinectin 1 (Ktn1), mRNA [NM_008477]
Cebpz	0,02769	csökkent	2,34	Mus musculus CCAAT/enhancer binding protein zeta (Cebpz), mRNA [NM_001024806]
AU040320	0,02772	nőtt	2,11	Mus musculus expressed sequence AU040320 (AU040320), transcript variant 1, mRNA [NM_001035526]
Ppp2r5e	0,02781	nőtt	1,52	Mus musculus adult male cecum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9130002I04 product:protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), epsilon isoform, full insert sequence. [AK078894]
Gnpat	0,02785	nőtt	2,13	Mus musculus glyceronephosphate O-acyltransferase (Gnpat), mRNA [NM_010322]
Pvrl3	0,02796	csökkent	1,87	Mus musculus poliovirus receptor-related 3 (Pvrl3), transcript variant alpha, mRNA [NM_021495]
Tmem203	0,02839	csökkent	1,60	Mus musculus transmembrane protein 203 (Tmem203), mRNA [NM_177344]
Brca2	0,02843	csökkent	1,64	Mus musculus breast cancer 2 (Brca2), transcript variant 2, mRNA [NM_009765]
Pold3	0,02843	csökkent	2,82	Mus musculus polymerase (DNA-directed), delta 3, accessory subunit (Pold3), mRNA [NM_133692]
Sugt1	0,02860	csökkent	1,83	Mus musculus SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1 (<i>S. cerevisiae</i>) (Sugt1), mRNA [NM_026474]
Cenpe	0,02862	csökkent	8,12	Mus musculus centromere protein E (Cenpe), mRNA [NM_173762]
Tpr	0,02871	csökkent	9,37	Mus musculus translocated promoter region (Tpr), mRNA [NM_133780]
Oog1	0,02872	nőtt	2,35	Mus musculus oogenesis 1 (Oog1), mRNA [NM_178657]
Tmem60	0,02878	nőtt	2,35	Mus musculus transmembrane protein 60 (Tmem60), mRNA [NM_177601]
Uap1	0,02888	csökkent	1,58	Mus musculus UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1 (Uap1), mRNA [NM_133806]
Phgdh	0,02893	csökkent	2,24	Mus musculus 3-phosphoglycerate dehydrogenase (Phgdh), mRNA [NM_016966]
Eif3c	0,02904	csökkent	1,57	Mus musculus eukaryotic translation initiation factor 3, subunit C (Eif3c), mRNA [NM_146200]
AY761184	0,02928	nőtt	1,53	Mus musculus cDNA sequence AY761184 (AY761184), mRNA [NM_001007582]
Yif1b	0,02932	csökkent	2,21	Mus musculus Yip1 interacting factor homolog B (<i>S. cerevisiae</i>) (Yif1b), transcript variant 1, mRNA [NM_029887]
Pigf	0,02937	nőtt	1,83	Mus musculus phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class F (Pigf), mRNA [NM_008838]
Gm6436	0,02947	csökkent	2,08	PREDICTED: Mus musculus predicted gene, EG623505 (EG623505), mRNA [XM_001001941]
Pde3b	0,02949	nőtt	1,82	Mus musculus phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited (Pde3b), mRNA [NM_011055]
Ipo5	0,02952	csökkent	1,81	Mus musculus importin 5 (Ipo5), mRNA [NM_023579]
Ncoa6	0,02967	nőtt	1,95	Mus musculus nuclear receptor coactivator 6 (Ncoa6), mRNA [NM_019825]
2700029M09Rik	0,02969	nőtt	2,46	Mus musculus RIKEN cDNA 2700029M09 gene (2700029M09Rik), mRNA [NM_028299]

A négysejtes embriókban szignifikáns változást mutató gének

Smchd1	0,02980	csökkent	2,06	Mus musculus SMC hinge domain containing 1 (Smchd1), mRNA [NM_028887]
Rfc4	0,03006	csökkent	2,24	Mus musculus replication factor C (activator 1) 4 (Rfc4), mRNA [NM_145480]
Fbxw21	0,03028	nőtt	4,69	Mus musculus F-box and WD-40 domain protein 21 (Fbxw21), mRNA [NM_177069]
	0,03035	csökkent	2,05	mab23e04.x1 Soares_NMEBA_branchial_arch Mus musculus cDNA clone IMAGE:3971047 3' similar to SW:RS16_HUMAN P17008 40S RIBOSOMAL PROTEIN S16. ; [BF721801]
N4bp2	0,03040	nőtt	1,92	Mus musculus NEDD4 binding protein 2 (N4bp2), mRNA [NM_001024917]
Dgka	0,03058	csökkent	8,24	Mus musculus diacylglycerol kinase, alpha (Dgka), mRNA [NM_016811]
Atmin	0,03067	nőtt	1,95	Mus musculus ATM interactor (Atmin), mRNA [NM_177700]
Ndufa13	0,03073	csökkent	1,92	Mus musculus NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 13 (Ndufa13), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_023312]
Dek	0,03074	nőtt	2,20	Mus musculus DEK oncogene (DNA binding) (Dek), mRNA [NM_025900]
Chst4	0,03087	nőtt	1,77	Mus musculus carbohydrate (chondroitin 6/keratan) sulfotransferase 4 (Chst4), mRNA [NM_011998]
Mrpl33	0,03095	csökkent	2,00	Mus musculus mitochondrial ribosomal protein L33 (Mrpl33), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_025796]
Gm5595	0,03102	nőtt	2,11	Mus musculus predicted gene 5595 (Gm5595), mRNA [NM_001008427]
Sdad1	0,03113	csökkent	1,59	Mus musculus SDA1 domain containing 1 (Sdad1), mRNA [NM_172713]
Naa30	0,03115	nőtt	2,06	Mus musculus N(alpha)-acetyltransferase 30, NatC catalytic subunit (Naa30), mRNA [NM_001081430]
Miip	0,03117	csökkent	1,52	Mus musculus migration and invasion inhibitory protein (Miip), mRNA [NM_001025365]
Hnrnph1	0,03119	csökkent	1,56	Mus musculus heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (Hnrnph1), mRNA [NM_021510]
Mrpl39	0,03126	csökkent	3,02	Mus musculus mitochondrial ribosomal protein L39 (Mrpl39), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_017404]
Myl12b	0,03131	csökkent	2,00	Mus musculus myosin, light chain 12B, regulatory (Myl12b), mRNA [NM_023402]
Gm6718	0,03133	csökkent	2,47	PREDICTED: Mus musculus predicted gene, EG626903 (EG626903), mRNA [XM_891513]
Rpl6	0,03151	csökkent	1,80	Mus musculus ribosomal protein L6 (Rpl6), mRNA [NM_011290]
Aldh4a1	0,03160	nőtt	3,32	Mus musculus aldehyde dehydrogenase 4 family, member A1 (Aldh4a1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_175438]
Cttnbp2nl	0,03165	nőtt	3,02	Mus musculus CTTNBP2 N-terminal like (Cttnbp2nl), transcript variant 1, mRNA [NM_030249]
1110031I02Rik	0,03178	csökkent	1,66	Mus musculus RIKEN cDNA 1110031I02 gene (1110031I02Rik), mRNA [NM_025402]
Pno1	0,03194	nőtt	1,54	Mus musculus partner of NOB1 homolog (S. cerevisiae) (Pno1), mRNA [NM_025443]
Parg	0,03199	csökkent	2,38	Mus musculus poly (ADP-ribose) glycohydrolase (Parg), mRNA [NM_011960]
Xpr1	0,03202	csökkent	2,29	Mus musculus xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1 (Xpr1), mRNA [NM_011273]
Polr2a	0,03210	nőtt	1,88	Mus musculus polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A (Polr2a), mRNA [NM_009089]
	0,03213	nőtt	1,64	Putative uncharacterized protein Fragment [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q9CUK7] [ENSMUST00000015856]
Polrmt	0,03229	csökkent	2,17	Mus musculus polymerase (RNA) mitochondrial (DNA directed) (Polrmt), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_172551]
Atf7ip2	0,03241	nőtt	3,43	Mus musculus 7 days embryo whole body cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:C430003N19 product:RIKEN cDNA 4930558K11 gene, full insert sequence. [AK049401]
Aco1	0,03241	nőtt	2,89	Mus musculus aconitase 1 (Aco1), mRNA [NM_007386]
Appbp2	0,03253	nőtt	1,78	Mus musculus amyloid beta precursor protein (cytoplasmic tail) binding protein 2 (Appbp2), mRNA [NM_025825]
Tuft1	0,03260	nőtt	1,59	Mus musculus tuftelin 1 (Tuft1), mRNA [NM_011656]
Tmcc3	0,03268	nőtt	3,28	Mus musculus transmembrane and coiled coil domains 3 (Tmcc3), transcript variant 1, mRNA [NM_172051]
Slc25a12	0,03281	csökkent	1,62	Mus musculus solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, Aralar), member 12 (Slc25a12), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_172436]

A négysejtes embriókban szignifikáns változást mutató gének

Ctage5	0,03299	csökkent	1,58	Mus musculus CTAGE family, member 5 (Ctage5), transcript variant 1, mRNA [NM_146034]
	0,03300	nőtt	1,75	TRDV2-1 Fragment [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q5R1A5] [ENSMUST00000103677]
Tnfrsf1b	0,03324	nőtt	1,65	Mus musculus tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b (Tnfrsf1b), mRNA [NM_011610]
Slc35a2	0,03328	nőtt	1,73	Mus musculus solute carrier family 35 (UDP-galactose transporter), member A2 (Slc35a2), transcript variant 1, mRNA [NM_078484]
Rps11	0,03334	csökkent	1,71	Mus musculus adult male brain cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:0710005E13 product:ribosomal protein S11, full insert sequence. [AK002987]
Use1	0,03337	nőtt	1,75	Mus musculus unconventional SNARE in the ER 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (Use1), transcript variant 1, mRNA [NM_025917]
Ubr7	0,03365	nőtt	1,62	Mus musculus ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 7 (putative) (Ubr7), mRNA [NM_025666]
2610030H06Rik	0,03372	csökkent	2,13	Mus musculus RIKEN cDNA 2610030H06 gene (2610030H06Rik), mRNA [NM_001081356]
Ube2j1	0,03372	csökkent	2,13	Mus musculus ubiquitin-conjugating enzyme E2, J1 (Ube2j1), mRNA [NM_019586]
Sesn1	0,03374	nőtt	3,09	Mus musculus sestrin 1 (Sesn1), transcript variant 2, mRNA [NM_001013370]
Coil	0,03402	nőtt	1,55	Mus musculus coilin (Coil), mRNA [NM_016706]
Edem3	0,03403	csökkent	1,68	Mus musculus ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 3 (Edem3), mRNA [NM_001039644]
Rpl36	0,03428	csökkent	2,42	Mus musculus ribosomal protein L36 (Rpl36), mRNA [NM_018730]
Rpl34	0,03435	csökkent	2,03	Mus musculus ribosomal protein L34 (Rpl34), transcript variant 2, mRNA [NM_001005859]
Rheb1	0,03452	nőtt	2,27	Mus musculus Ras homolog enriched in brain like 1 (Rheb1), mRNA [NM_026967]
Tiparp	0,03469	nőtt	1,97	Mus musculus TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase (Tiparp), mRNA [NM_178892]
Hoxa4	0,03486	nőtt	1,63	Mus musculus homeobox A4 (Hoxa4), mRNA [NM_008265]
Usp28	0,03494	nőtt	5,98	Mus musculus ubiquitin specific peptidase 28 (Usp28), mRNA [NM_175482]
Gm13103	0,03497	nőtt	2,40	Mus musculus predicted gene 13103 (Gm13103), mRNA [NM_177571]
Spic	0,03529	csökkent	1,64	Mus musculus Spi-C transcription factor (Spi-1/PU.1 related) (Spic), mRNA [NM_011461]
Olfr139	0,03533	nőtt	1,67	Mus musculus olfactory receptor 139 (Olfr139), mRNA [NM_147003]
	0,03540	nőtt	2,27	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 1 Gene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:97303] [ENSMUST00000120689]
Prkaa1	0,03540	csökkent	2,15	Mus musculus protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit (Prkaa1), mRNA [NM_001013367]
Eif3c	0,03555	csökkent	1,94	Mus musculus eukaryotic translation initiation factor 3, subunit C (Eif3c), mRNA [NM_146200]
Copb2	0,03562	nőtt	1,98	Mus musculus coatomer protein complex, subunit beta 2 (beta prime) (Copb2), mRNA [NM_015827]
Nrbp1	0,03568	nőtt	2,08	Mus musculus nuclear receptor binding protein 1 (Nrbp1), mRNA [NM_147201]
	0,03572	nőtt	2,20	Putative uncharacterized protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q3TPK5] [ENSMUST00000057427]
Oscar	0,03578	nőtt	1,56	Mus musculus osteoclast associated receptor (Oscar), mRNA [NM_175632]
Sltm	0,03601	nőtt	1,85	Mus musculus SAFB-like, transcription modulator (Sltm), transcript variant 2, mRNA [NM_026337]
C6	0,03615	nőtt	1,96	Mus musculus complement component 6 (C6), mRNA [NM_016704]
2510003E04Rik	0,03624	nőtt	2,22	Mus musculus RIKEN cDNA 2510003E04 gene (2510003E04Rik), mRNA [NM_028197]
Gm6607	0,03624	csökkent	1,52	Mus musculus predicted gene 6607 (Gm6607), non-coding RNA [NR_033622]
Nup88	0,03632	csökkent	1,61	Mus musculus nucleoporin 88 (Nup88), transcript variant 1, mRNA [NM_172394]
Nek9	0,03651	csökkent	1,92	Mus musculus NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 9 (Nek9), mRNA [NM_145138]
Gpr153	0,03666	nőtt	2,20	Mus musculus G protein-coupled receptor 153 (Gpr153), mRNA [NM_178406]
Rpl7a	0,03674	csökkent	2,21	Mus musculus ribosomal protein L7A (Rpl7a), mRNA [NM_013721]
Nin	0,03679	csökkent	2,06	Mus musculus ninein (Nin), transcript variant 2, mRNA [NM_008697]
Actr3	0,03686	nőtt	1,76	Mus musculus ARP3 actin-related protein 3 homolog (yeast) (Actr3), mRNA [NM_023735]

A négysejtes embriókban szignifikáns változást mutató gének

Nktr	0,03698	csökkent	1,89	Mus musculus natural killer tumor recognition sequence (Nktr), mRNA [NM_010918]
D930015E06Rik	0,03704	nőtt	1,87	Mus musculus RIKEN cDNA D930015E06 gene (D930015E06Rik), mRNA [NM_172681]
H19	0,03708	nőtt	2,04	Mus musculus 18-day embryo whole body cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:1100001A04 product:Mus musculus H19 fetal liver mRNA (H19), mRNA, full insert sequence. [AK003142]
Sec63	0,03723	nőtt	1,87	Mus musculus 11 days embryo spinal cord cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:G630026F06 product:unclassifiable, full insert sequence. [AK090248]
Tlk1	0,03746	nőtt	1,64	Mus musculus tousled-like kinase 1 (Tlk1), mRNA [NM_172664]
4930583H14Rik	0,03748	csökkent	1,89	Mus musculus RIKEN cDNA 4930583H14 gene (4930583H14Rik), transcript variant 1, mRNA [NM_026358]
Alkbh5	0,03748	nőtt	1,80	Mus musculus alkB, alkylation repair homolog 5 (E. coli) (Alkbh5), mRNA [NM_172943]
Kif2c	0,03750	csökkent	1,52	Mus musculus kinesin family member 2C (Kif2c), mRNA [NM_134471]
Depdc1b	0,03766	nőtt	1,62	Mus musculus DEP domain containing 1B (Depdc1b), mRNA [NM_178683]
Limk2	0,03778	nőtt	1,88	Mus musculus LIM motif-containing protein kinase 2 (Limk2), transcript variant 1, mRNA [NM_010718]
Tspo2	0,03798	nőtt	2,10	Mus musculus translocator protein 2 (Tspo2), mRNA [NM_027292]
Kdm1b	0,03820	nőtt	3,82	Mus musculus lysine (K)-specific demethylase 1B (Kdm1b), mRNA [NM_172262]
	0,03822	csökkent	1,54	PREDICTED: Mus musculus predicted gene, EG666668 (EG666668), mRNA [XM_985281]
Trrap	0,03831	csökkent	4,11	Mus musculus transformation/transcription domain-associated protein (Trrap), mRNA [NM_001081362]
Mrps24	0,03835	csökkent	1,51	Mus musculus mitochondrial ribosomal protein S24 (Mrps24), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_026080]
Lrrc8e	0,03836	nőtt	1,78	Mus musculus leucine rich repeat containing 8 family, member E (Lrrc8e), mRNA [NM_028175]
Adpgk	0,03848	csökkent	2,29	Mus musculus ADP-dependent glucokinase (Adpgk), mRNA [NM_028121]
	0,03849	nőtt	1,61	Q7TNL7_MOUSE (Q7TNL7) Dual-specificity MAP kinase phosphatase-4 (Dual specificity phosphatase 9), partial (19%) [TC1708273]
Kif18b	0,03856	csökkent	2,06	Mus musculus kinesin family member 18B (Kif18b), mRNA [NM_197959]
Aqp12	0,03861	nőtt	2,20	Mus musculus aquaporin 12 (Aqp12), transcript variant 1, mRNA [NM_177587]
Fgfr4	0,03876	nőtt	1,58	Mus musculus fibroblast growth factor receptor 4 splice variant 17b (Fgfr4) mRNA, partial cds. [AF127140]
Rps5	0,03879	csökkent	2,55	Mus musculus ribosomal protein S5 (Rps5), mRNA [NM_009095]
Slc35b2	0,03884	nőtt	1,62	Mus musculus solute carrier family 35, member B2 (Slc35b2), mRNA [NM_028662]
Il34	0,03899	nőtt	1,56	Mus musculus interleukin 34 (Il34), transcript variant 2, mRNA [NM_029646]
C1qbp	0,03909	csökkent	1,54	Mus musculus complement component 1, q subcomponent binding protein (C1qbp), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_007573]
Il17c	0,03912	nőtt	1,56	Mus musculus interleukin 17C (Il17c), mRNA [NM_145834]
Gna15	0,03918	nőtt	1,97	Mus musculus guanine nucleotide binding protein, alpha 15 (Gna15), mRNA [NM_010304]
Bphl	0,03928	nőtt	1,86	Mus musculus biphenyl hydrolase-like (serine hydrolase, breast epithelial mucin-associated antigen) (Bphl), mRNA [NM_026512]
Rpl7	0,03955	csökkent	1,66	Mus musculus ribosomal protein L7 (Rpl7), mRNA [NM_011291]
Rlf	0,03957	nőtt	2,13	Mus musculus rearranged L-myc fusion sequence (Rlf), mRNA [NM_001081013]
Med13l	0,03957	nőtt	1,83	Mus musculus mediator complex subunit 13-like (Med13l), mRNA [NM_172424]
Dusp14	0,03964	nőtt	1,76	Mus musculus dual specificity phosphatase 14 (Dusp14), mRNA [NM_019819]
Armxc5	0,03965	nőtt	2,50	Mus musculus armadillo repeat containing, X-linked 5 (Armxc5), mRNA [NM_001009575]
1110003E01Rik	0,03977	nőtt	3,14	Mus musculus RIKEN cDNA 1110003E01 gene (1110003E01Rik), mRNA [NM_133697]
Klhl8	0,04009	nőtt	1,76	Mus musculus kelch-like 8 (Drosophila) (Klhl8), mRNA [NM_178741]
Rps20	0,04014	csökkent	1,50	Mus musculus ribosomal protein S20 (Rps20), mRNA [NM_026147]
Adcy6	0,04020	nőtt	1,81	Mus musculus adenylate cyclase 6 (Adcy6), mRNA [NM_007405]
Rps28	0,04021	csökkent	1,72	Mus musculus ribosomal protein S28 (Rps28), mRNA [NM_016844]
Rpl9	0,04024	csökkent	2,37	Mus musculus ribosomal protein L9 (Rpl9), mRNA [NM_011292]
Sprr2a1	0,04029	csökkent	2,22	Mus musculus small proline-rich protein 2A1 (Sprr2a1), mRNA [NM_011468]

A négysejtes embriókban szignifikáns változást mutató gének

Ptpn21	0,04029	nőtt	1,92	Mus musculus protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 21 (Ptpn21), transcript variant 1, mRNA [NM_011877]
Dnaja2	0,04033	nőtt	1,66	Mus musculus Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2 (Dnaja2), mRNA [NM_019794]
Nup133	0,04054	csökkent	2,88	Mus musculus nucleoporin 133 (Nup133), mRNA [NM_172288]
	0,04054	csökkent	6,39	RIKEN cDNA 2810026P18 gene Gene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1919905] [ENSMUST0000034997]
Lhb	0,04069	nőtt	1,81	Mus musculus luteinizing hormone beta (Lhb), mRNA [NM_008497]
	0,04089	nőtt	2,04	myotubularin related protein 15 Gene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3045266] [ENSMUST0000037476]
Rpl24	0,04092	csökkent	4,65	Mus musculus ribosomal protein L24 (Rpl24), mRNA [NM_024218]
Rps3	0,04095	nőtt	2,13	Mus musculus ribosomal protein S3 (Rps3), mRNA [NM_012052]
E230008N13Rik	0,04096	nőtt	2,13	Mus musculus RIKEN cDNA E230008N13 gene (E230008N13Rik), mRNA [NM_198660]
Strap	0,04097	nőtt	1,80	Mus musculus serine/threonine kinase receptor associated protein (Strap), mRNA [NM_011499]
Test2	0,04103	nőtt	2,08	Mus musculus testis-specific kinase 2 (Test2), mRNA [NM_146151]
Dnajb9	0,04106	nőtt	1,53	Mus musculus Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9 (Dnajb9), mRNA [NM_013760]
Snai1	0,04110	nőtt	2,05	Mus musculus snail homolog 1 (Drosophila) (Snai1), mRNA [NM_011427]
Ostf1	0,04114	csökkent	2,65	Mus musculus osteoclast stimulating factor 1 (Ostf1), mRNA [NM_017375]
Hipk3	0,04114	csökkent	2,01	Mus musculus homeodomain interacting protein kinase 3 (Hipk3), transcript variant 1, mRNA [NM_010434]
Smg7	0,04135	nőtt	1,77	Mus musculus Smg-7 homolog, nonsense mediated mRNA decay factor (C. elegans) (Smg7), transcript variant 3, mRNA [NM_001005507]
Csf2rb	0,04144	nőtt	2,26	Mus musculus colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage) (Csf2rb), mRNA [NM_007780]
Ncoa1	0,04152	nőtt	1,89	Mus musculus nuclear receptor coactivator 1 (Ncoa1), mRNA [NM_010881]
Hsp90aa1	0,04153	csökkent	1,50	Mus musculus heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1 (Hsp90aa1), mRNA [NM_010480]
Rps3	0,04155	csökkent	1,71	Mus musculus ribosomal protein S3 (Rps3), mRNA [NM_012052]
Oc90	0,04172	nőtt	1,63	Mus musculus otoconin 90 (Oc90), mRNA [NM_010953]
	0,04180	nőtt	1,59	Mus musculus 16 days embryo head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:C130099L17 product:unclassifiable, full insert sequence. [AK082067]
Mllt10	0,04190	nőtt	1,53	Mus musculus myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 10 (Mllt10), mRNA [NM_010804]
Srebf1	0,04203	csökkent	2,34	Mus musculus sterol regulatory element binding transcription factor 1 (Srebf1), mRNA [NM_011480]
Polr1a	0,04229	csökkent	2,58	Mus musculus polymerase (RNA) I polypeptide A (Polr1a), mRNA [NM_009088]
Spryd3	0,04231	nőtt	1,58	Mus musculus SPRY domain containing 3 (Spryd3), mRNA [NM_001033277]
Sycp3	0,04244	nőtt	2,82	M. musculus mRNA for synaptonemal complex protein. [Y08485]
Zcrb1	0,04272	csökkent	2,30	Mus musculus zinc finger CCHC-type and RNA binding motif 1 (Zcrb1), mRNA [NM_026025]
Psmc6	0,04274	csökkent	5,58	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 6 Gene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1914339] [ENSMUST0000022380]
Rps11	0,04278	csökkent	1,74	Mus musculus ribosomal protein S11, mRNA (cDNA clone MGC:13737 IMAGE:4019309), complete cds. [BC012641]
Fem1a	0,04287	nőtt	4,39	Mus musculus feminization 1 homolog a (C. elegans) (Fem1a), mRNA [NM_010192]
Rab3il1	0,04295	csökkent	3,09	RAB3A interacting protein (rabin3)-like 1 Gene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1922010] [ENSMUST00000144788]
Idh3a	0,04330	nőtt	2,50	Mus musculus isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha (Idh3a), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_029573]
Cltc	0,04344	nőtt	1,81	Mus musculus clathrin, heavy polypeptide (Hc) (Cltc), mRNA [NM_001003908]
	0,04349	nőtt	1,71	Mus musculus adult male tongue cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:2310057K05 product:hypothetical protein, full insert sequence. [AK009963]
Klk4	0,04378	nőtt	1,82	Mus musculus kallikrein related-peptidase 4 (prostase, enamel matrix, prostate) (Klk4), mRNA [NM_019928]
Ndufb7	0,04382	csökkent	3,14	Mus musculus NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 7 (Ndufb7), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_025843]

A négysejtes embriókban szignifikáns változást mutató gének

Lima1	0,04390	nőtt	3,68	Mus musculus LIM domain and actin binding 1 (Lima1), transcript variant b, mRNA [NM_023063]
Mtfr1	0,04392	csökkent	1,87	Mus musculus mitochondrial fission regulator 1 (Mtfr1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_026182]
Rps3a	0,04415	csökkent	1,76	Mus musculus ribosomal protein S3A (Rps3a), mRNA [NM_016959]
Stam	0,04440	nőtt	2,18	Mus musculus signal transducing adaptor molecule (SH3 domain and ITAM motif) 1 (Stam), mRNA [NM_011484]
Fam109a	0,04453	nőtt	2,10	Mus musculus adult male hypothalamus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A230106M15 product:hypothetical Pleckstrin homology (PH) domain containing protein, full insert sequence. [AK039192]
Rbm26	0,04462	csökkent	3,09	Mus musculus adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:1700009P03 product:RIKEN cDNA 1700009P03 gene, full insert sequence. [AK005802]
Tjp1	0,04483	nőtt	2,01	Mus musculus tight junction protein 1 (Tjp1), transcript variant 1, mRNA [NM_009386]
3110062M04Rik	0,04501	nőtt	1,55	Mus musculus RIKEN cDNA 3110062M04 gene (3110062M04Rik), transcript variant 1, mRNA [NM_199145]
Slc25a33	0,04501	nőtt	3,07	Mus musculus solute carrier family 25, member 33 (Slc25a33), mRNA [NM_027460]
Slc34a2	0,04502	nőtt	2,16	Mus musculus solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2 (Slc34a2), mRNA [NM_011402]
Zfp677	0,04506	nőtt	1,54	Mus musculus zinc finger protein 677 (Zfp677), mRNA [NM_172486]
Wdr38	0,04518	nőtt	1,85	WD repeat domain 38 Gene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1923896] [ENSMUST0000039535]
Zbtb11	0,04531	nőtt	1,76	Mus musculus zinc finger and BTB domain containing 11 (Zbtb11), mRNA [NM_173026]
Rpl7a	0,04597	csökkent	2,38	Mus musculus ribosomal protein L7A (Rpl7a), mRNA [NM_013721]
Glrx5	0,04599	nőtt	2,94	Mus musculus glutaredoxin 5 homolog (S. cerevisiae) (Glrx5), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_028419]
Tmem50b	0,04611	csökkent	1,78	Mus musculus transmembrane protein 50B (Tmem50b), mRNA [NM_030018]
Slc31a1	0,04619	nőtt	2,43	Mus musculus solute carrier family 31, member 1 (Slc31a1), mRNA [NM_175090]
Syng1	0,04620	csökkent	2,59	Mus musculus synaptogyrin 1 (Syng1), transcript variant 1b, mRNA [NM_009303]
BC048355	0,04620	csökkent	3,58	Mus musculus cDNA sequence BC048355 (BC048355), mRNA [NM_207161]
Dgat2	0,04621	nőtt	2,46	Mus musculus diacylglycerol O-acyltransferase 2 (Dgat2), mRNA [NM_026384]
Rnf130	0,04648	csökkent	3,00	Mus musculus ring finger protein 130 (Rnf130), mRNA [NM_021540]
Sp110	0,04660	csökkent	2,00	Mus musculus Sp110 nuclear body protein (Sp110), mRNA [NM_175397]
Raf1	0,04675	nőtt	1,88	Mus musculus v-raf-leukemia viral oncogene 1 (Raf1), mRNA [NM_029780]
Rps28	0,04692	csökkent	1,84	Mus musculus ribosomal protein S28 (Rps28), mRNA [NM_016844]
C1qb	0,04696	nőtt	1,52	Mus musculus complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide (C1qb), mRNA [NM_009777]
Rmnd5a	0,04699	nőtt	2,63	Mus musculus required for meiotic nuclear division 5 homolog A (S. cerevisiae) (Rmnd5a), mRNA [NM_024288]
2610020H08Rik	0,04700	nőtt	1,62	Mus musculus RIKEN cDNA 2610020H08 gene (2610020H08Rik), transcript variant 2, mRNA [NM_028129]
Syn3	0,04713	nőtt	1,73	Mus musculus synapsin III (Syn3), transcript variant 1, mRNA [NM_013722]
Osgepl1	0,04714	csökkent	1,82	Mus musculus O-sialoglycoprotein endopeptidase-like 1 (Osgepl1), mRNA [NM_028091]
Ppic	0,04716	csökkent	2,92	Mus musculus peptidylprolyl isomerase C (Ppic), mRNA [NM_008908]
Zbtb8a	0,04717	csökkent	1,77	Mus musculus zinc finger and BTB domain containing 8a (Zbtb8a), mRNA [NM_028603]
LOC100047599	0,04719	nőtt	1,51	PREDICTED: Mus musculus similar to gag protein (LOC100047599), mRNA [XM_001478148]
Cdc25a	0,04728	csökkent	1,73	Mus musculus cell division cycle 25 homolog A (S. pombe) (Cdc25a), mRNA [NM_007658]
Pml	0,04737	csökkent	1,72	Mus musculus promyelocytic leukemia (Pml), transcript variant 1, mRNA [NM_008884]
Rps21	0,04742	csökkent	1,74	Mus musculus ribosomal protein S21 (Rps21), mRNA [NM_025587]
6330416L07Rik	0,04750	nőtt	2,14	Mus musculus RIKEN cDNA 6330416L07 gene (6330416L07Rik), mRNA [NM_176962]
Nisch	0,04759	nőtt	2,12	Mus musculus nischarin (Nisch), mRNA [NM_022656]

A négysejtes embriókban szignifikáns változást mutató gének

Usp4	0,04790	nőtt	3,88	Mus musculus ubiquitin specific peptidase 4 (proto-oncogene) (Usp4), mRNA [NM_011678]
Mllt3	0,04803	nőtt	1,79	Mus musculus myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 3 (Mllt3), transcript variant 1, mRNA [NM_027326]
Mef2b	0,04806	nőtt	1,81	Mus musculus mRNA for myocyte enhancer factor 2B type B-3, complete cds. [D87834]
Pacs2	0,04807	nőtt	2,51	Mus musculus phosphofurin acidic cluster sorting protein 2 (Pacs2), mRNA [NM_001081170]
Pthlh	0,04812	nőtt	1,78	Mus musculus parathyroid hormone-like peptide (Pthlh), mRNA [NM_008970]
Lst1	0,04831	csökkent	1,97	Mus musculus B144 mRNA, m17r splice variant, complete cds. [AF000427]
Mrpl35	0,04853	csökkent	1,54	Mus musculus mitochondrial ribosomal protein L35 (Mrpl35), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_025430]
Dnajb9	0,04857	nőtt	1,55	Mus musculus DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9 (Dnajb9), mRNA [NM_013760]
Kif16b	0,04864	csökkent	3,14	Mus musculus kinesin family member 16B (Kif16b), mRNA [NM_001081133]
Rpl35a	0,04876	csökkent	1,84	Mus musculus ribosomal protein L35A (Rpl35a), transcript variant 1, mRNA [NM_021338]
	0,04877	nőtt	1,68	Rho family GTPase 1 Gene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2444878] [ENSMUST00000120997]
1700120K04Rik	0,04882	nőtt	1,51	Mus musculus RIKEN cDNA 1700120K04 gene (1700120K04Rik), non-coding RNA [NR_027915]
Rpl5	0,04884	csökkent	2,28	Mus musculus ribosomal protein L5 (Rpl5), mRNA [NM_016980]
Skap2	0,04886	nőtt	3,00	Mus musculus src family associated phosphoprotein 2 (Skap2), mRNA [NM_018773]
Rab11b	0,04889	csökkent	1,87	Mus musculus RAB11B, member RAS oncogene family (Rab11b), mRNA [NM_008997]
Sys1	0,04899	nőtt	2,01	Mus musculus SYS1 Golgi-localized integral membrane protein homolog (S. cerevisiae) (Sys1), mRNA [NM_025575]
Gsto1	0,04904	csökkent	3,22	Mus musculus glutathione S-transferase omega 1 (Gsto1), mRNA [NM_010362]
Oosp1	0,04907	nőtt	2,88	Mus musculus oocyte secreted protein 1 (Oosp1), mRNA [NM_133353]
Gls2	0,04909	csökkent	1,97	Mus musculus glutaminase 2 (liver, mitochondrial) (Gls2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_001033264]
Fam13c	0,04923	nőtt	1,60	Mus musculus family with sequence similarity 13, member C (Fam13c), transcript variant 1, mRNA [NM_024244]
Naa50	0,04932	nőtt	1,82	Mus musculus N(alpha)-acetyltransferase 50, NatE catalytic subunit (Naa50), mRNA [NM_028108]
Synpo	0,04933	nőtt	1,54	Mus musculus synaptopodin (Synpo), transcript variant A, mRNA [NM_177340]
Mast1	0,04934	csökkent	4,77	Mus musculus microtubule associated serine/threonine kinase 1 (Mast1), mRNA [NM_019945]
Wdr92	0,04941	nőtt	1,69	Mus musculus WD repeat domain 92 (Wdr92), mRNA [NM_178909]
Dub1	0,04959	nőtt	1,97	Mus musculus deubiquitinating enzyme 1 (Dub1), mRNA [NM_007887]
Gsdmc3	0,04970	nőtt	2,72	Mus musculus gasdermin C3 (Gsdmc3), mRNA [NM_183194]
	0,04975	nőtt	1,78	syntrophin, gamma 1 Gene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1918346] [ENSMUST00000140295]
Ss18	0,04981	csökkent	1,74	Mus musculus synovial sarcoma translocation, Chromosome 18 (Ss18), transcript variant 1, mRNA [NM_009280]
Ano6	0,04981	csökkent	1,78	Mus musculus anoctamin 6 (Ano6), mRNA [NM_175344]
C030046E11Rik	0,04991	nőtt	1,99	Mus musculus RIKEN cDNA C030046E11 gene (C030046E11Rik), mRNA [NM_001081319]
Nipsnap3b	0,04998	csökkent	1,64	Mus musculus nipsnap homolog 3B (C. elegans) (Nipsnap3b), mRNA [NM_025623]

9.4. A négysejtes embriókban DAVID programmal végzett funkcionális kategorizálás során azonosított szignifikáns Gene Ontology kategóriák részletes bemutatása

GO elnevezés: Gene ontology elnevezés és azonosító. Db: a szignifikáns expresszióváltozást adó gének száma, amelyeket adott kategóriához rendelt az elemzés. %: az adott kategóriához sorolt gének aránya az ugyanezen kategóriába tartozó összes génhez viszonyítva.

Kategória	GO elnevezés	db	%	P-érék	Gén azonosítók
Biológiai folyamat	transzláció: GO:0006412~translation	37	8,0	6,55E-15	76808, 105083, 20103, 56347, 19934, 268449, 279067, 57808, 16898, 67160, 20005, 54217, 20091, 54127, 20068, 19921, 19988, 22186, 66483, 64660, 270106, 108989, 19989, 14109, 66481, 27050, 66845, 66489, 19983, 68735, 27207, 20055, 68193, 68436, 59054, 27393, 67427
Molekuláris funkció	a riboszóma szerkezeti alkotórésze: GO:0003735~structural constituent of ribosome	33	7,2	4,96E-22	76808, 20103, 19934, 268449, 279067, 16898, 57808, 20005, 54217, 20091, 54127, 20068, 19921, 19988, 22186, 66483, 64660, 270106, 19989, 14109, 66481, 27050, 66845, 66489, 19983, 68735, 20055, 27207, 68193, 68436, 59054, 27393, 67427
Molekuláris funkció	szerkezeti építés: GO:0005198~structural molecule activity	39	8,5	4,77E-12	76808, 20103, 19934, 268449, 279067, 50797, 57808, 16898, 16905, 20005, 54217, 20755, 20091, 54127, 20068, 19921, 19988, 22186, 66483, 64660, 270106, 19989, 14109, 66481, 27050, 66845, 66489, 19983, 71995, 68735, 27207, 20055, 68193, 68436, 67300, 59054, 18256, 27393, 67427
Molekuláris funkció	RNS kötés: GO:0003723~RNA binding	34	7,4	4,01E-05	20534, 53379, 70044, 56200, 19934, 268449, 16898, 100535, 74213, 72692, 20005, 70930, 68564, 11428, 66660, 66094, 230082, 66249, 67197, 56403, 19989, 67710, 27050, 59013, 18813, 74778, 22608, 19983, 116848, 18459, 27207, 69724, 81897, 67427
Molekuláris funkció	nukleotid kötés: GO:0000166~nucleotide binding	78	16,9	7,34E-05	72162, 53379, 19877, 70044, 56200, 108143, 268449, 76108, 228012, 74213, 170755, 72692, 26425, 70930, 15259, 216877, 69737, 192292, 217718, 333789, 110157, 74117, 14676, 14186, 74355, 16574, 56403, 67834, 11821, 53323, 380664, 59013, 70218, 236539, 19356, 18459, 67487, 218214, 268756, 67184, 217342, 73804, 107476, 230661, 100535, 56228, 69719, 19326, 71389, 67089, 66660, 110208, 11512, 18103, 22235, 12465, 56520, 67197, 19769, 29869, 108989, 12144, 70099, 57815, 106344, 229841, 56527, 105787, 16886, 18080, 16558, 13139, 268930, 15519, 27393, 67121, 27204, 69159
Sejt alkotórész	riboszóma: GO:0005840~ribosome	38	8,2	5,42E-24	76808, 20103, 19934, 268449, 279067, 57808, 16898, 20005, 57312, 54217, 68564, 20091, 54127, 20068, 66223, 19921, 19988, 22186, 66483, 64660, 270106, 19989, 27176, 14109, 66481, 27050, 66845, 66489, 19983, 75617, 68735, 27207, 20055, 68193, 68436, 59054, 27393, 67427

A négysejtes embriókban végzett funkcionális kategorizálás részletes adatai

Sejt alkotórész	ribonukleofehérje egység: GO:0030529~ribonucleoprotein complex	51	11,1	1,73E-20	76808, 53379, 269470, 20103, 19934, 268449, 16898, 72692, 20005, 54217, 20091, 67973, 230082, 19921, 56403, 66483, 22186, 270106, 27176, 14109, 66481, 59013, 66489, 66845, 75617, 55989, 68735, 68193, 68436, 59054, 52830, 279067, 57808, 57312, 68564, 54127, 66094, 20068, 66223, 67197, 64660, 19988, 19989, 20901, 27050, 18813, 19983, 27207, 20055, 27393, 67427
Sejt alkotórész	nem-membrán kapcsolt szervecske: GO:0043228~non-membrane-bounded organelle	86	18,7	5,35E-10	66884, 18541, 76808, 269470, 19877, 70044, 20103, 19934, 56200, 268449, 268996, 16898, 16905, 70930, 20005, 216877, 54217, 69737, 20091, 67973, 230082, 74117, 66249, 74355, 65970, 19921, 27362, 16574, 67936, 234865, 22186, 66483, 270106, 14109, 27176, 66481, 24000, 67938, 70218, 20962, 66845, 66489, 55989, 75617, 68734, 68735, 68193, 68436, 59054, 240514, 73804, 279067, 57808, 57312, 71389, 53598, 20755, 104027, 68564, 68040, 54127, 20068, 66223, 18854, 19988, 231452, 64660, 19989, 12144, 70099, 229841, 106344, 27050, 30932, 56527, 18813, 12315, 18080, 16558, 19983, 116848, 20055, 27207, 20019, 27393, 67427
Sejt alkotórész	sejten belüli nem-membrán kapcsolt szervecske: GO:0043232~intracellular non-membrane-bounded organelle	86	18,7	5,35E-10	66884, 18541, 76808, 269470, 19877, 70044, 20103, 19934, 56200, 268449, 268996, 16898, 16905, 70930, 20005, 216877, 54217, 69737, 20091, 67973, 230082, 74117, 66249, 74355, 65970, 19921, 27362, 16574, 67936, 234865, 22186, 66483, 270106, 14109, 27176, 66481, 24000, 67938, 70218, 20962, 66845, 66489, 55989, 75617, 68734, 68735, 68193, 68436, 59054, 240514, 73804, 279067, 57808, 57312, 71389, 53598, 20755, 104027, 68564, 68040, 54127, 20068, 66223, 18854, 19988, 231452, 64660, 19989, 12144, 70099, 229841, 106344, 27050, 30932, 56527, 18813, 12315, 18080, 16558, 19983, 116848, 20055, 27207, 20019, 27393, 67427
Sejt alkotórész	riboszóma alegység: GO:0033279~ribosomal subunit	12	2,6	2,79E-07	20005, 20103, 19921, 20055, 64660, 68193, 19989, 16898, 20068, 27393, 67427, 27050
Sejt alkotórész	riboszóma kis alegység: GO:0015935~small ribosomal subunit	7	1,5	4,31E-05	20103, 20055, 64660, 16898, 20068, 67427, 27050
Sejt alkotórész	citoplazmatikus riboszóma: GO:0022626~cytosolic ribosome	6	1,3	4,19E-05	20005, 20103, 19921, 68193, 19989, 20068
Sejt alkotórész	sejtmagvacska: GO:0005730~nucleolus	20	4,3	1,03E-04	66249, 269470, 70044, 56200, 27362, 67936, 18854, 231452, 19988, 30932, 18813, 70930, 216877, 19983, 116848, 55989, 68040, 67973, 20019, 230082
Sejt alkotórész	citoplazmatikus riboszóma nagy alegység: GO:0022625~cytosolic large ribosomal subunit	4	0,9	3,95E-04	20005, 19921, 68193, 19989

A négysejtes embriókban végzett funkcionális kategorizálás részletes adatai

Sejt alkotórész	mitokondrium: GO:0005739~mitochondrion	49	10,6	9,29E-04	72320, 217893, 66536, 66077, 66834, 68493, 72692, 70556, 68021, 212647, 11428, 67834, 66845, 216456, 210148, 68735, 68436, 59054, 11957, 67300, 12261, 68197, 67472, 228033, 67184, 52123, 107476, 57808, 19326, 57312, 66916, 16832, 66594, 216151, 18103, 78830, 66223, 56520, 53381, 74239, 64660, 67892, 57815, 52637, 14707, 66925, 72085, 27393, 73046
Sejt alkotórész	membránnal-körülzárt lumen: GO:0031974~membrane-enclosed lumen	45	9,8	8,20E-04	53379, 269470, 70044, 67184, 21416, 56200, 108143, 12812, 217893, 13819, 16905, 20020, 14712, 70930, 15259, 212647, 216877, 67500, 68040, 67973, 230082, 66249, 67197, 56520, 100683, 27362, 56406, 18854, 67936, 19988, 231452, 64660, 67710, 30932, 69920, 18813, 59013, 76199, 19983, 116848, 55989, 66967, 20019, 27393, 12261
Sejt alkotórész	citoszol: GO:0005829~cytosol	26	5,6	9,14E-04	68440, 21416, 20103, 26440, 66536, 64652, 69719, 72692, 26425, 20005, 19188, 67089, 20091, 26446, 11428, 74155, 18576, 20068, 110157, 12465, 19921, 19989, 26430, 13139, 68193, 15519
Sejt alkotórész	sejtmag lumen: GO:0031981~nuclear lumen	36	7,8	1,12E-03	53379, 269470, 70044, 67184, 21416, 56200, 108143, 12812, 13819, 16905, 20020, 70930, 15259, 216877, 68040, 67973, 230082, 66249, 67197, 100683, 27362, 56406, 18854, 67936, 19988, 231452, 67710, 30932, 59013, 69920, 18813, 76199, 19983, 55989, 116848, 20019
Sejt alkotórész	szervecske lumen: GO:0043233~organelle lumen	43	9,3	1,42E-03	53379, 269470, 70044, 67184, 21416, 56200, 108143, 12812, 217893, 13819, 16905, 20020, 14712, 70930, 15259, 212647, 216877, 68040, 67973, 230082, 66249, 67197, 100683, 27362, 56406, 18854, 67936, 19988, 231452, 64660, 67710, 30932, 69920, 18813, 59013, 76199, 19983, 116848, 55989, 66967, 20019, 27393, 12261
Sejt alkotórész	sejten belüli szervecske lumen: GO:0070013~intracellular organelle lumen	43	9,3	1,35E-03	53379, 269470, 70044, 67184, 21416, 56200, 108143, 12812, 217893, 13819, 16905, 20020, 14712, 70930, 15259, 212647, 216877, 68040, 67973, 230082, 66249, 67197, 100683, 27362, 56406, 18854, 67936, 19988, 231452, 64660, 67710, 30932, 69920, 18813, 59013, 76199, 19983, 116848, 55989, 66967, 20019, 27393, 12261
Sejt alkotórész	riboszóma nagy alegység: GO:0015934~large ribosomal subunit	6	1,3	1,90E-03	20005, 19921, 64660, 68193, 19989, 27393

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok témavezetőmnek **Dr. Dinnyés Andrásnak**, hogy megteremtette a lehetőséget a kutatásaimhoz és, hogy munkám során végig támogatott.

Köszönöm **Dr. Pribenszky Csabának**, hogy megismertette velem találmányát, az ivarsejteken és embriókon alkalmazott magas hidrosztatikus nyomáskezelést, új ötleteket adott és kutatásaim során rengeteg segítséget nyújtott.

Köszönöm **Dr. Fehér Anitának**, a folyamatos támogatást a kísérleteim során és a sok szakmai segítséget, amellyel hozzájárult a sikeres eredményekhez.

Köszönöm **Dr. Solomon Mamonak**, hogy nélkülözhetetlen segítséget nyújtott a real-time PCR mérések elvégzéséhez.

Köszönöm **Dr. Polgár Zsuzsanna**, **Dr. Losonczy Eszter** és **Dr. Ana Claudia Carstea** rendkívül hasznos segítségét a kísérleti minta előállításához.

Köszönöm **Dr. L. Éder Katalin** értékes munkáját a microarray kísérletek során. Továbbá köszönöm **Dr. Johannes Beckersnek**, **Dr. Martin Irmlernek** és **Barbara Susanne Fridrichnek**, hogy részletesen megismertették velem a génexpressziós microarray technikát, mind elméleti, mind gyakorlati téren.

Köszönöm munkatársaimnak: **Dr. Kobolák Juliannának**, **Dr. Hadas Raveh-Amitnak**, és **Tolnainé Csákány Hajnalkának** a sok támogatást, amellyel hozzájárultak munkám elvégzéséhez.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm feleségemnek **Dr. Csadó Kingának** és lányaimnak, **Bock Enikőnek** és **Tündének**, amiért támogató és inspiratív környezetet nyújtottak nekem, és **szüleimnek**, akik szintén mellettem álltak és támogattak, hogy munkámat sikeresen befejezhessem.

Külön köszönet illeti az alábbi projekteket, amelyek anyagi és képzési segítséget nyújtottak munkám során: OMFB-00364/2007, NKFP07_1-EGG_CARE-HU - OM-00069/2008, NKTH/KPI Kozma F. TUDAS-1-2006-0005, EU FP6 CLONET (MRTN-CT-2006-035468), EU FP6 MED-RAT (LSHG-CT-2006-518240), Research Centre of Excellence - 8526-5/2014/TUDPOL, Bonus-Resolve OMFB-01660/2009, EpiConcept COST Action FA1201, EU FP7 Anistem PIAPP-GA-2011-286264, EU FP7 EpiHealth HEALTH-2012-F2-278418, EU FP7 EpiHealthNet PITN-GA-2012-317146, EU FP7 IDPbyNMR PITN-GA-2010-264257, EU FP7 RESOLVE FP7-HEALTH-F4-2008-202047.