10.14751/SZIE.2015.052

SZENT ISTVÁN EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR
ÁLLATTENYÉSZTÉS TUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

PLURIPOTENCIA GÉNEK IZOLÁLÁSA ÉS *IN VITRO* VIZSGÁLATA NYÚLBAN

Doktori (PhD) értekezés

Majorné Táncos Zsuzsanna

Gödöllő
2015

10.14751/SZIE.2015.052

A doktori iskola

megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Állattenyésztés-tudomány

vezetője: Dr. Mézes Miklós
egyetemi tanár, MTA doktora, akadémikus
SZIE-Állattudományi Alapok Intézet,
Takarmányozástani Tanszék

témavezető: Dr. Dinnyés András
egyetemi tanár, MTA doktora
SZIE-Állattudományi Alapok Intézet,
Molekuláris Állatbiotechnológiai Laboratórium

……..…… ……
Az iskolavezető jóváhagyása A témavezető jóváhagyása

10.14751/SZIE.2015.052

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK ***3***

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE ***5***

1 BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK 9

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS 13

2.1 A nyúl, mint modellállat 13
2.2 A pluripotencia 15
2.2.1 A pluripotencia fogalma 15
2.2.2 A pluripotencia fenntartásában résztvevő legfontosabb jelátviteli útvonalak 16
2.2.3 A pluripotencia igazolása 21
2.3 Pluripotens őssejtek 23
2.3.1. Embrionális őssejtek 23
2.3.2 Indukált pluripotens őssejtek 27
2.4 Újraprogramozó rendszerek 30
2.4.1 Integratív és nem integratív újraprogramozó rendszerek 30
2.4.2 Sleeping Beauty Transzpozon Rendszer 31
2.4.3 Lentivírus Expressziós Rendszer 32
2.5 Transzkripciós faktorok 33
2.5.1 Újraprogramozó faktorok 33
2.5.2 Pluripotencia-asszociált faktorok 40

3 ANYAG ÉS MÓDSZER 43

3.1 Állatkísérleti engedélyek 43
3.2 Alkalmazott nyúlfajta és tartása 43
3.3 Donor állatok szuperovulációja 43
3.4 In vivo embrió előállítás 44
3.5 Petesejtek gyűjtése 44
3.6 Blasztociszta stádiumú embriók gyűjtése 44
3.7 Szöveti minta gyűjtése 44
3.8 Oligonukleotid primerek tervezése 44
3.9 Gének izolálása, szekvencia meghatározása 45
3.10 Szekvencia analízis és komparatív genomika 46
3.11 Sleeping Beauty plazmid konstrukciók létrehozása 46
3.11.1 Egér pluripotencia géneket tartalmazó újraprogramozó vektor előállítása 47
3.11.2 Humán pluripotencia géneket tartalmazó újraprogramozó vektor előállítása 47
3.11.3 Nyúl pluripotencia géneket tartalmazó újraprogramozó vektor előállítása 47
3.11.4 Gibson Assembly klónozás 48
3.12 Lentivírus plazmid konstrukciók 49
3.12.1 Egér újraprogramozó kazettát tartalmazó lentivírus vektor létrehozása 49
3.12.2 Humán újraprogramozó kazettát tartalmazó lentivírus konstrukció létrehozása 50
3.13 Sejtek tenyésztése 50
3.13.1 Máj sejtek tenyésztése 50
3.13.2 Nyúl fibroblaszt sejtek és HEK293T sejtek tenyésztése 51
3.13.3 Nyúl ES és iPS sejtek tenyésztése 51
3.13.4 Nyúl iPS sejtek létrehozása és tenyésztése 51
3.14 Alkalikus foszfatáz aktivitás detektálása 53
3.15 Immunofluoreszcens analízis 53
3.16 In vitro differenciálódási képesség vizsgálata 54
3.17 In vivo differenciálódási képesség vizsgálata 55
3.18 Kariotipizálás 55

4 EREDMÉNYEK 57

4.1 A nyúl pluripotens őssejt markerek klónozása és karakterizálása 57

10.14751/SZIE.2015.052

4.1.1 A nyúl OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC és NANOG pluripotencia faktorok teljes kódoló régiójának izolálása 57
4.1.2 A nyúl pluripotencia gének embriogenezis során betöltött szerepének vizsgálata 65
4.1.3 A nyúl pluripotencia gének felnőtt szövetekből történő kimutatása 66
4.1.4 A nyúl pluripotencia faktor fehérjék expressziója 67
4.1.5 A nyúl FGF4, REX1, FBX15, UTF1 pluripotencia faktorok cDNS részletének izolálása 68
4.2 Nyúl indukált pluripotens sejtek létrehozása egér génekkel 69
4.2.1 Nyúl indukált pluripotens sejtek létrehozása egér génekkel, Sleeping Beauty vektorral 69
4.2.2 Nyúl indukált pluripotens sejtek létrehozása egér génekkel, Lentivírus vektorral 72
4.3 Nyúl indukált pluripotens sejtek létrehozása humán génekkel 73
4.3.1 Nyúl indukált pluripotens sejtek létrehozása humán génekkel, Sleeping Beauty vektorral 73
4.3.2 Nyúl indukált pluripotens sejtek létrehozása humán génekkel, Lentivírus vektorral 75
4.4 Nyúl iPS sejtek létrehozására alkalmas faj-specifikus újraprogramozó konstrukció előállítása és funkcionalitásának tesztelése 79
4.5 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK 82

5 EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE ÉS JAVASLATOK 83
5.1 Nyúl pluripotencia gének azonosítása 83
5.2 Nyúl indukált pluripotens őssejtek generálása 87

6 ÖSSZEFOGLALÁS 91
6.1 Nyúl pluripotencia gének azonosítása 91
6.1.1 Pluripotens sejtek szelektálásához, vizsgálatához, generálásához használt főbb faktorok 91
6.1.2 Pluripotens sejtek szelektálásához, vizsgálatához használható egyéb faktorok 92
6.2 Nyúl indukált pluripotens sejtek generálása 92

7 SUMMARY 93
7.1 Identification of rabbit pluripotency genes 93
7.1.1 Main factors for selection, analysis and generation of pluripotent cells 93
7.1.2 Other factors for selection and analysis of pluripotent cells 94
7.2 Generation of rabbit iPS cells 94

8 MELLÉKLETEK 95
8.1 M1 Irodalomjegyzék 95
8.2 M2 Szakmai publikációk jegyzéke 117
8.3 M3 Ábrák és táblázatok jegyzéke 121
8.4 M4 Felhasznált oldatok/tenyésztő médiumok 134

9 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 137

10.14751/SZIE.2015.052

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AKT	AKT1 szerin-treonin kináz fehérje
AP	Alkalikus foszfatáz (*Alkaline Phosphatase*)
BMP	Csont Morfogenetikus Protein (*Bone Morphogenic Protein)*
BSA	Szarvasmarha szérum albumin *(Bovine Serum Albumin)*
BTE	Alapvető Transzkripciós Elem (*Basic Transcription Element*),
CD	Differenciációs klaszter (*Cluster of Differentiaton*)
CYP1A1	P-450IA1 citokróm
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DE	Disztális enhanszer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNS	Dezoxiribonukleinsav
Dppa	Fejlődési pluripotenciával kapcsolt (*Developmental Pluripotency Associated)*
EB	Embrionális testecske *(Embryoid Body)*
EBAF	Endometrial Bleeding- Associated Factor (nincs magyar megfelelője)
EDTA	Etilén Diamin Tetraecetsav
EF1α	Elongation Factor 1-alpha
EGC	Embrionális csírasejt (*Embryonic Germ Cell*)
EGFP	Zöld Fluoreszcens Fehérje (*Enhanced Green Fluorescens Protein*)
ERK1/2	Extracelluláris Szignál Regulált Kináz ½ (*Extracellular Signal Regulated Kinase ½)*
ESC	Embrionális őssejt (*Embryonic Stem Cell*)
FBS	Magzati szarvasmarha savó (*Fetal Bovine Serum*)
FCS	Magzati borjú savó (*Fetal Calf Serum*)
FGF4	4-es fibroblaszt növekedési faktor fehérje (*Fibroblast Growth Factor-4*)
FoxD	Forkhead box (*Forkhead Box*)
GATA	Globin Transzkripciós factor (*Globin Transcription Factor*)
GC-box	GC-nukleotidokban gazdag DNS szakasz
Gp130	130-as transzmembrán glikoprotein
hATIII	Humán antitrombin III
hCG	Humán choriális gonadotropin (*Human Chorion Gonadotropin*)

10.14751/SZIE.2015.052

hEPO	Humán eritropoetin
hFVIII	Humán VIII véralvadási faktor
hSA	Humán szérum albumin
ICM	Embriócsomó (*Inner Cell Mass*)
iPSC	Indukált pluripotens őssejt (*Induced Pluripotent Stem Cells*)
ICC	Immuncitokémia
JAK	Janus tirozin kináz (*Janus – associated tyrosine kinase*)
LIF	Leukémia inhibitor faktor (*Leukaemia Inhibitory Factor*)
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast (egér embrionális fibroblaszt)
MEK/ERK	Mitogén-aktivált protein kináz/Extracelluláris signál-regulált Kináz
mRNS	Hírvivő RNS (*messenger RNS*)
OPN	Oszteopontin
PCR	Polimeráz láncreakció (*Polymerase Chain Reaction*)
PE	Proximális enhancer
PFA	Paraformaldehid
PI3-K	Foszfatidil-inozitol 3-kináz
PMSG	Vemhes kanca szérum gonadotropin (*Pregnant Mare Serum Gonadotropin*)
PORE	Palindrom Oct-faktort felismerő elem (*Palindromic Oct Factor Recognition Element*)
POUh	POU homeodomén
POUs	POU specifikus régió
REX1	Csökkent expresszió-1 fehérje (*Reduced Expression-1 Protein*)
RNSpol	RNS polimeráz
RTK	Receptor Tirozin Kináz (*Receptor Tyrosine Kinase*)
RT-PCR	Reverz-Transzkripció PCR
SB	Sleeping Beauty
SOX	Sry-related HMG box containing gene family (nincs magyar megfelelője)
SOX2	Sox géncsalád kettes fehérje
SSEA	Stádium-Specifikus Embrionális Antigén (*Stage Specific Embryonic Antigen)*
STAT	Signal transducer and activator of transcription (nincs magyar megfelelője)

10.14751/SZIE.2015.052

TDGF	Teratokarcinóma derivált növekedési factor (*Teratocarcinoma-derived growth factor*)
TE	Trofektoderma
Terc	Telomeráz RNS komponens (*Telomerase RNA component*)
TFIIIA	Transzkripciós faktor IIIA
TGF-ß	Transzformáló növekedési faktor ß (*Transforming growth factor β*)
TRA	Tumor Rejekciós Antigén (*Tumor Rejection Antigen)*
tRNS	Transzfer RNS
UTF1	1-es differenciálatlan embrionális sejt transzkripciós faktor fehérje (*Undifferentiated Embryonic Cell Transcription Factor-1*)
UTF1	UTF1 gén
UTR	Nem transzlálódó régió (*Untranslated Region*)
WNT	*Wingless-type MMTV integration site family member* (nincs magyar megfelelője)

10.14751/SZIE.2015.052

1 BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A NAIK MBK-ban több éve folynak nyúl embriológiai és ős-sejtvonal alapítási kísérletek. A kísérletek előrehaladását jelentősen segítené, ha a pluripotencia kialakításában szerepet játszó gének működése vizsgálható lenne. Ehhez azonban először a gének azonosítása szükséges. Kísérletünk egyik fő célja ezért a pluripotencia kialakításában fontos szerepet játszó transzkripciós faktorok, *OCT4, NANOG, SOX2, C-MYC, KLF4, FGF4, UTF1, REX1* és *FBX15* nyúlban történő azonosítása és az azokat kódoló gének kódoló régiójának illetve mRNS részletének izolálása volt.

Az emlősembrió fejlődését számos gén koordinálja. Ide tartoznak az általunk vizsgált gének is, amelyek egy-egy transzkripciós faktor fehérjét kódolnak és az embrionális fejlődés barázdálódási szakaszában fontos szerepet játszó más fehérjék termelődésének elindítását, valamint az embrionális csíralemezek kialakulásának irányítását szabályozzák. Molekuláris szinten a toti-, illetve pluripotencia jelenleg egyetlen ismert faktorhoz sem köthető egyértelműen. Ma úgy véljük, hogy a pluripotencia több gén együttes kölcsönhatásának eredményeként létrejövő állapotként írható le. Számos, a pluripotencia kialakításában fontos szerepet játszó gén aktivitása került leírásra, amelyek együtt irányítják az embrionális fejlődés korai szakaszában lejátszódó folyamatokat, valamint felelősek a pluripotens sejtek, mint például a szöveti őssejtek, vagy primordiális őssejtek potenciájának fentartásáért. Ilyen fehérjék kimutathatóak az embrionális eredetű, *in vitro* izolálható őssejtekben (ES sejtek) is. Az ES sejtek ún. pluripotens sejtek, amelyek megőrzik differenciálódási képességüket az *in vitro* tenyésztés során. Képesek arra is, hogy hólyagcsíra állapotú gazdaembrió blasztocölbe injektálva, illetve 8-sejtes embrióval aggregáltatva, *in vivo* a kiméra embrió szöveteinek részévé fejlődjenek. Mind *in vitro,* mind pedig *in vivo* mindhárom csíralemez valamennyi szövet- és sejttípusának létrehozására képesek.

A vizsgálatainkba bevont gének kiválasztása más fajokban, mint például egér, patkány, sertés, szarvasmarha, illetve humán kísérletek publikált adataira alapozva történt. Ennek megfelelően, az általunk kiválasztott gének izolálásához, az irodalomban eddig leírt más fajokból származó szekvenciákat analizáltuk, majd primereket terveztünk a szekvencia hasonlóságok alapján. Az így tervezett primereket felhasználva blasztociszta stádiumú embriókból izoláltunk totál RNS-t, majd reverz transzkripció segítségével cDNS klónokat izoláltunk és szekvenáltunk. Az így azonosított szekvenciák alapján további, immár faj- és génspecifikus primereket terveztünk a gének izolálásához.

10.14751/SZIE.2015.052

Az így izolált gének funkciójának vizsgálatához az egyik legalkalmasabb rendszert az *in vitro* pluripotens sejtvizsgálatok jelenthetik. Ezért vizsgálatainkat nyúl őssejteken (ES és iPS sejteken) folytattuk. Úgy gondoljuk, hogy fajspecifikus gének újraprogramozó faktorként való felhasználásával stabilabb nyúl iPS sejtvonalat tudnánk létrehozni, ezért kísérleti rendszerünkben nyúl iPS sejtek előállítását és az ehhez szükséges nyúl pluripotencia gének izolálását tűztük ki fő célként. A nyúl modellállatként történő kiválasztására azért került sor, mert ebben a nem rágcsáló laborállatban elért eredményekből az egérnél lényegesen jobban lehet következtetéseket levonni a gazdasági haszonállatokban várható génműködésre és fejlődésbiológiai folyamatokra. Ezen túl számos humán betegség vizsgálatára is jobb modellt biztosít, mivel a keringési rendszer- és a fiziológiás paraméterek jobban hasonlítanak az emberéhez, mint az egér, vagy patkány modelleké, valamint transzgénikus törzsek előállítása révén akár ún. bioreaktorként is használható.

A továbbiakban tehát a pluripotencia kialakításában szerepet játszó gének detektálása és azonosítása volt a fő célunk a nyúlban. Mindemellett célul tűztük ki, hogy egér és humán pluripotencia gének felhasználásával indukált pluripotens őssejteket hozzunk létre nyúl esetében is, amely egy olyan komparatív rendszert eredményez, ahol az egyes fajok közötti eltérések és hasonlóságok is jól vizsgálhatóak. Ezáltal a génszabályozásban bekövetkezett evolúciós változásokra vonatkozóan is információt nyerhetünk. Az általunk izolált nyúl pluripotencia gének felhasználásával pedig egy olyan újraprogramozó konstrukciót hoztunk létre, amely a fajspecifikus faktorok révén hatékonyabb visszaprogramozásra lehet alkalmas.

Főbb célkitűzéseink:

1. Pluripotencia markerek (*OCT4, NANOG, SOX2, C-MYC, KLF4, FGF4, UTF1, REX1* és *FBX15)* detektálása preimplantációs korú nyúl embriókon, a konszenzus szekvenciára tervezett primerekkel.
2. Faj-specifikus primerek tervezése és faj-specifikus RT-PCR reakciók kidolgozása a pluripotencia gének nyúlban történő expressziójának kimutatására.
3. Egér és humán pluripotencia gének újraprogramozó faktorként való felhasználásával, nyúl indukált pluripotens (iPS) sejtek transzpozon (Sleeping Beauty) rendszerrel történő létrehozása és karakterizálása.
4. Egér és humán pluripotencia gének újraprogramozó faktorként való felhasználásával, nyúl indukált pluripotens (iPS) sejtek lentivirális technológiával történő létrehozása és karakterizálása.

10.14751/SZIE.2015.052

5. Az általunk elsőként izolált nyúl pluripotencia génekkel újraprogramozó konstrukció létrehozása nyúl iPS sejtek létrehozásának céljából.

10.14751/SZIE.2015.052

10.14751/SZIE.2015.052

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A nyúl, mint modellállat

A transzgénikus állatoknak nagy jelentőségük lehet valamely gén mutációjának, ill. idegen gén kifejeződésének *in vivo* vizsgálatában. Modellállatként a kutatók általában kistestű, rövid generációs idejű és nagy utódszámot biztosító állatokat (pl.: egér, patkány vagy nyúl) alkalmaznak, mivel a transzgénikus haszonállatok előállítása idő, ill. költségigényes. A nyúl, mint modellállat az alábbi érvek miatt alkalmazható:

- Genetikailag közelebb áll az emberhez, mint az igen közkedvelt modell, az egér.
- Viszonylag kistestű, olcsón tartható, generációs ideje rövid; így elérhetőbb modell, mint a főemlősök.
- A keringési rendszer- és a fiziológiás paraméterek jobban hasonlítanak az emberéhez, mint az egér, vagy patkány modelleké.

Ezeket az állatokat terápiás céllal vagy ún. bioreaktorként is felhasználhatjuk fehérje alapú gyógyszerek termeltetésére. Ennek a módszernek az elnevezése "gene farming" (gén v. molekulagazdálkodás). A „bioreaktorok” által termeltetett gyógyszereket általában a genetikailag módosított állat véréből vagy tejéből nyerik ki (Pinkert et al. 1999), majd hasznosítják. Így például már a klinikai kipróbálás fázisába jutottak az α1-antitripszin, a szöveti plazminogén aktivátor (tPA), az α-glukozidáz, a laktoferrin, a VIII véralvadási faktor (hFVIII) és a humán szérum albumin (hSA) esetében. Bíztató kísérletek folytak eritropoetin (hEPO) termeltetésére is egérben és nyúlban egyaránt (Rodrigues et al. 1995), habár a későbbiekben sikertelen kísérletről is számolt be publikáció szarvasmarha és nyúl fajokban a géntermék toxicitása miatt (Várkuti et al. 2013). Humán antitrombint (ATIII) viszont sikerrel termeltettek 2006-ban, az erre a célra előállított transzgénikus kecskékben. Elsőként az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerhatósága engedélyezte az amerikai székhelyű GTC Biopharmeceuticals humán antitrombinját, az ATrynt öröklött antitrombin-hiányban szenvedő betegek vénás trombózisának megelőzésére és kezelésére. Ebben az esetben, a termeltetett antitrombin mennyiségét olyannyira képesek voltak maximalizálni, hogy aránylag kis létszámú (körülbelül 80 állatból álló) kecskeállomány is elegendő lenne, amely fedezné egész Európa antitrombin szükségletét (Jones. 2006). Ezt követően 2010-ben került piacra a Ruconest vagy másnéven Rhucin, egy olyan

10.14751/SZIE.2015.052

rekombináns humán C1 inhibitor, amelyet transzgénikus nyulak tejében termeltetnek és az örökletes angioödéma kezelésében tölt be fontos szerepet (Major et al. 2013).

A humán gyógyászat számára azonban azoknak a génmódosított állatoknak lehet jelentőségük, amelyeket szervátültetésnél lehet donorként felhasználni (xenotranszplantáció). Nyúl esetében a keringési rendszer, amely a vérkeringési rendszert és nyirokkeringési rendszert foglalja magába, nagyfokú hasonlóságot mutat a humánéval, sokkal inkább, mint más kisebb testű modellállat esetében, mint például az egér vagy a patkány. A vérkeringési rendszer, ezen belül a szív felépítése és funkciója nagyon hasonló az emberéhez, éppen ezért humán szívbetegségek tanulmányozására alkalmaztak már transzgénikus nyulakat is (Marian et al. 1999; Baczkó et al. 2014).

A hatékony transzgénikus állat előállításhoz a mikroinjektálás nyitotta meg az utat, amikor is vékonyra húzott üvegkapillárissal mikroszkóp alatt juttatják be az idegen DNS-t a zigótába, ott is hím előmagba. Ezzel a mikroinjektálásos módszerrel transzgénikus nyulakat is sikerrel hoztak létre (Hammer et al. 1985). A modellállatok, köztük a nyúl használata a transzgenezis kísérletekben elsősorban a fejlődési és szabályozási mechanizmusok *in vivo* vizsgálata szempontjából jelentős.

Ahhoz azonban, hogy a nyúl embriológiai kísérletek új lendületet vehessenek, szükséges lenne egy pluripotens embrionális őssejtvonal. Az *in vitro* differenciálódás során lejátszódó folyamatokat megismerve, feltérképezve az ES sejtek nélkülözhetetlen eszközzé válhatnak a gyógyszerkutatásokban, illetve a sejt-transzplantációs kísérletekben.

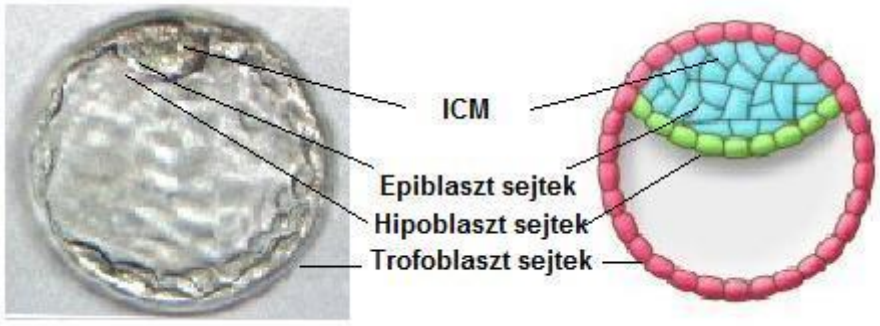
További, nagyon fontos előrelépést jelentene, ha ezzel együtt a nyúl genom ismerete is eljutna az egér szintjére, hiszen így, megfelelő genetikai ismeret birtokában nagyobb előrehaladás lenne elérhető. Éppen ezért 2005 májusában megkezdődött a nyúl genomkutatási projekt, melynek keretében a házi nyúl (*Oryctolagus cuniculus*) *in silico* genom meghatározását tűzték ki célul. Ennek során a Broad Institute (USA), számítógépes analízis segítségével, a nyúl genom már majdnem egészét prediktálta. Itt kell megjegyeznünk, hogy a genomszekvenálások során meghatározott szekvencia egy ún. nyers szekvencia, ahol számos esetben predikció alapján történik a feltételezett gének beazonosítása, amely nem feltétlenül egyezik a funkcionális génnel. Ezért nagyon fontos a funkcionális génszakaszok azonosítása és validálása a továbbiakban.

10.14751/SZIE.2015.052

2.2 A pluripotencia

2.2.1 A pluripotencia fogalma

A pluripotencia kialakításában mai tudásunk szerint több gén együttes kölcsönhatása játszik szerepet (Niwa et al. 2000; Mitsui et al. 2003; Chambers et al. 2003; Boyer et al. 2005). A korai elköteleződés és differenciálódás első momentuma, a hólyagcsíra, vagy más néven blasztociszta stádiumú embrió kialakulása. Ez az első fejlődési stádium, amikor az addig még totipotens blasztomerek a morula stádiumban bekövetkező kompaktizálódást követően elkülönülnek egymástól, különböző sejttípusokat hozva létre (a teljességhez hozzá tartozik, hogy génexpressziós szinten úgy tűnik már korábban, a morula stádium során, a kompaktizációt megelőzően zajlik differenciál génexpresszió és elindul a kompartmentalizáció, azonban ennek látható és egyértelműen beazonosítható jelei a hólyagcsíra kialakulása során eredményezik a sejttípusok első elkülönülését). A hólyagcsíra állapotban lévő emlős embrió háromféle sejttípusból áll. A blasztociszta külső trofoblaszt sejtrétegéből, (amely a magzat méhlepényének illetve külső magzatburkának képzésében vesz részt) a belső sejtcsomót (ICM) alkotó sejtekből, amely nem mást, mint a blasztocöl felől az ICM-et borító egysejt rétegű hipoblaszt sejtréteg, valamint a blasztociszta embriócsomójának epiblaszt sejtjei (Cockburn et al. 2010) **(1. ábra).**



1.ábra. A hólyagcsíra állapotú emlős embrió sejttípusai (Cockburn et al. 2010 alapján)

Az implantációt követően az epiblaszt egyik részéből alakul ki maga az embrió szövete, míg az epiblaszt másik részéből az amnion formálódik. A hipoblaszt sejtek a szikzacskó kialakításában vesznek részt. Az embrionális őssejtek (ES sejt, embryonic stem cell) két legfontosabb ismertetőjele, és egyben a pluripotencia tulajdonságának ismérve, hogy korlátlan számú osztódásra képesek, és differenciálódásuk során a szervezet valamennyi sejtje kialakulhat belőlük.

10.14751/SZIE.2015.052

Az embriógenezis során az embrió sejtjei kezdetben totipotensek, majd vagy extra-embrionális szöveti (a méhlepény és magzati extra-embrionális membránok kialakításában résztvevő sejtek) progenitor sejtté válnak, vagy pluripotens progenitor sejtként létrehozzák az embrió három csíralemezének (ektoderma, mezoderma és endoderma) sejtjeit, amiből az embrió minden sejtje származik (Loebel et al. 2003). Az embrióból izolált sejtekből származó pluripotens őssejtek *in vitro* korlátlan ideig fenntarthatóak és megőrzik pluripotens tulajdonságukat. Az embrionális fejlődés különböző időpontjaiban eltérő tulajdonságú és morfológiájú őssejteket izolálhatunk, ezekből az őssejtekből eltérő differenciálódási képességgel rendelkező őssejtvonalakat hozhatunk létre. Ez arra utal, hogy a sejtek a differenciálódás különböző lépcsőit érték el, de még pluripotensnek tekinthetők. Ezek a különböző tulajdonságú embrionális őssejtek a transzkripciós faktorok közel azonos hálózatát működtetik, így képesek arra, hogy megfelelő körülmények között egymásba átalakuljanak. Az embrionális őssejtek e tulajdonságának jelentősége az elveszett/sérült sejtek pótlásában, valamint a szövetek regenerálódásában lehet (Weissman. 2000).

2.2.2 A pluripotencia fenntartásában résztvevő legfontosabb jelátviteli útvonalak

Egér pluripotens őssejtek esetében a legfontosabb útvonalak a *TGF-β* (Transforming Growth Factor β), MEK/ERK (Mitogén-aktivált protein kináz/Extracelluláris szignál-regulált Kináz), *WNT* (Wingless-type MMTV integration site family member), *LIF* (Leukemia Inhibitory Factor) és *JAK-STAT* (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) jelátviteli útvonalak **(2. ábra)**.

A ***LIF*** fehérje aktiválja a *JAK-STAT* jelátviteli útvonalat ES sejtekben, amely egér ES sejtek esetében nélkülözhetetlenek a pluripotencia fenntartásához. A LIF aktiválódása szérumfüggő, de a szérum helyettesíthető *BMP* (Bone Morphogenic Protein*)* faktorokkal, vagy kis szintetikus molekulák (small inhibitor molecules) kombinációjával, melyek gátolják a MAP-kináz (Mitogen-Activated Protein Kinase) útvonalat (Ying et al. 2008). A STAT3 gátlása egér ES sejtekben az endodermális és mezodermális gének aktivációját eredményezi, alátámasztva ezzel aktivitásának szerepét a differenciáció megelőzésében (Bourillot et al. 2009). Humán ES sejtekben a LIF szintén indukálja a STAT3 foszforilációját és sejtmagi transzlokációját, azonban e jelátviteli útvonal aktiválódása önmagában nem elegendő a pluripotens állapot fenntartásához (Dahéron et al. 2004).

10.14751/SZIE.2015.052

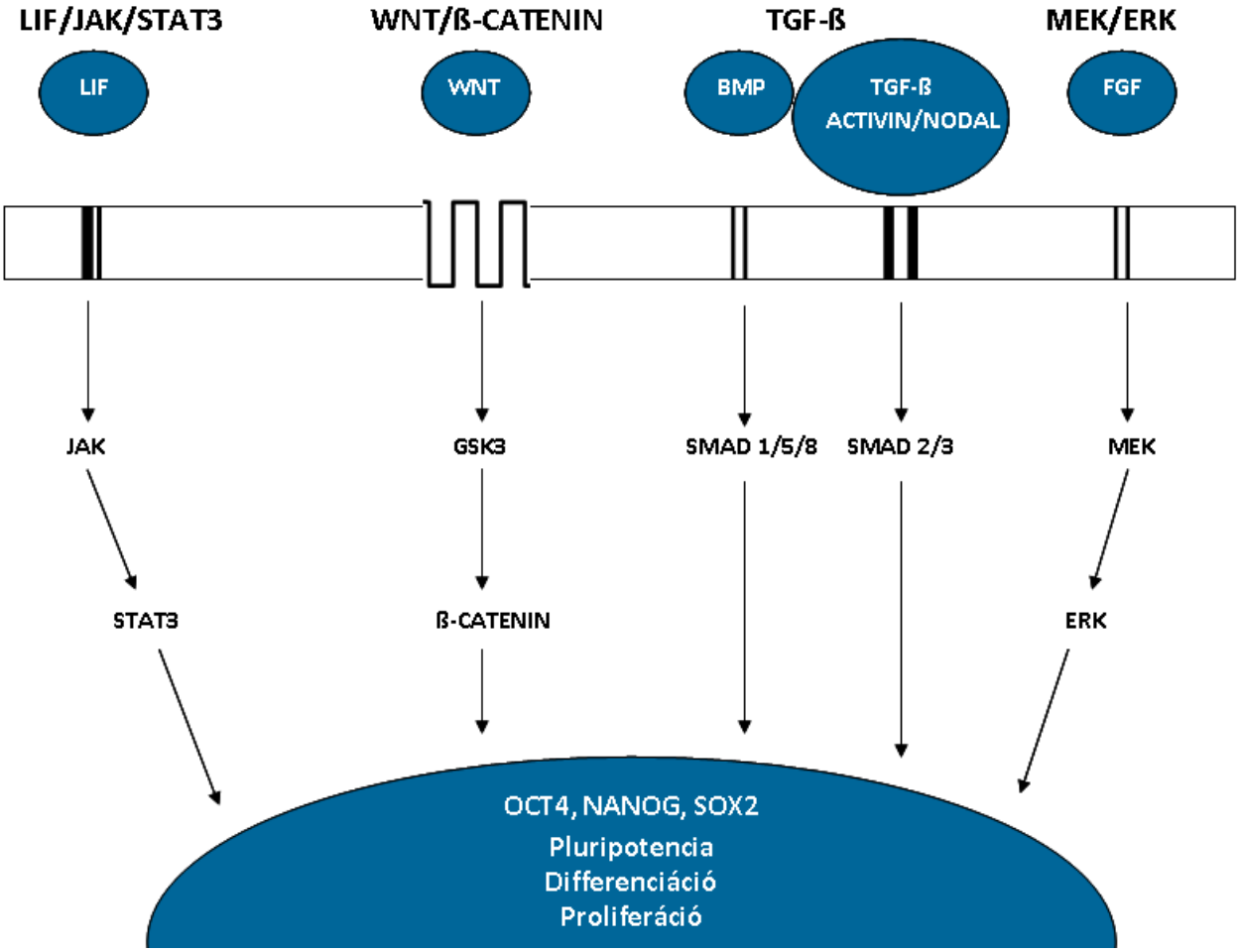
A **WNT** jelátvitelnek kisebb szerepet tulajdonítanak a pluripotencia megtartásában, mint az FGF és TGF útvonalaknak. Egyes tanulmányok szerint a WNT útvonal sokkal inkább a sejtek osztódásának aktiválásában játszik szerepet, mintsem a pluripotencia megtartásában (Dravid et al. 2005). Erre példa, hogy az *in vitro* WNT3 hiányos egér embriók továbbra is expresszálják az *OCT4*-et és nem differenciálódnak. Az egér ES sejtek esetén a WNT/β-CATENIN útvonal aktiválható volt a GSK-3 gátlásával, amely a sejtek differenciálatlan állapotát tartotta fenn rövidtávon. Amikor pedig ennek az útvonalnak az aktivációját kombinálták a LIF/JAK/STAT3 aktivációjával és a MEK/ERK gátlásával a sejtek hosszú távú önmegújulását érték el (Ten Berge et al. 2011). Humán ES sejtek esetén pedig azt mutatták ki, hogy a WNT/β-CATENIN útvonal önmagában feltételezhetően nem elegendő a pluripotencia fenntartásához, azonban az irodalmi adatok igen eltérőek, így valódi szerepük tisztázásához a szerzők az útvonal további tanulmányozását javasolják (Wray és Hartmann 2012).

A **TGF-ß** család magába foglalja a TGF-β fehérjéket, az AKTIVIN és NODAL fehérjét, növekedési differenciációs faktorokat (growth differentiation factor, GDF), és BMP faktorokat. A TGF-β családhoz kapcsolódó jelátviteli útvonalaknak komplex szerepük van a pluripotencia szabályozásában, amelyek a SMAD (Contraction of SMA (Second mitochondria-derived activator) fehérjék sejtmagi transzlokációján keresztül a célgének expressziójának szabályozásában jutnak érvényre. A NODAL-AKTIVIN útvonal aktiválja a SMAD 2/3 és MAD (Mothers against decapentaplegic) 2/3) transzkripciós faktorokat, ami *NANOG* expresszióhoz vezet (Vallier et al. 2009). A SMAD-1, 5 és 8 pedig a BMP útvonalon keresztül aktiválódik (Wrana et al. 1992). A BMP pedig a DNS kötést gátló fehérjék aktiválásával gátolja a sejtek neurális differenciálódását LIF jelenlétében. A GDF3 szintén a TGF-β család tagja, szerepe azonban az egér- és humán ES sejtekben eltérő. Egér ES sejtekben a GDF3 csökkenése a pluripotencia fenntartását eredményezi, míg humán ES sejtekben a GDF3 túlexpresszáltatásával lehet elérni hasonló hatást. A GDF3 tehát BMP antagonistaként alkalmazható, alacsony koncentrációban az egér ES sejtek pluripotenciájának fenntartásában van szerepe, míg magas koncentrációban alkalmazva a humán ES sejtek pluripotens állapotát támogatja (Levine et al. 2009).

Az **MEK/ERK** útvonalon keresztül történik az FGF faktorok jelátvitele. Ennek a fontos útvonalnak a gátlása humán ES sejtek differenciálódásához vezet (Li et al. 2007), miközben az egérben az ERK1/2 aktiválódása okoz differenciálódást (Burdon et al. 1992). Az MEK/ERK útvonal aktiválása egér ES sejtekben csökkenti *NANOG* expresszióját, miközben az *FGF4* gátlása pedig a pluripotencia megtartását segíti elő (Hamazaki et al. 2006). Azt bebizonyították, hogy míg az endogén FGF2 jelátvitel (tápláló fibroblaszt réteg által termelt) a humán ES sejtek

10.14751/SZIE.2015.052

differenciálatlan állapotát tartotta fenn, addig a tenyésztőmédiumhoz adagolt FGF2 indirekt módon a sejt halál és apoptótikus gének gátlásával járult hozzá a pluripotens állapothoz (Eiselleova et al. 2009).



2. ábra. Az egér ES sejtek önmegújulásához szükséges LIF, WNT, TGF-ß, MEK/ERK jelátviteli útvonal kölcsönhatásai

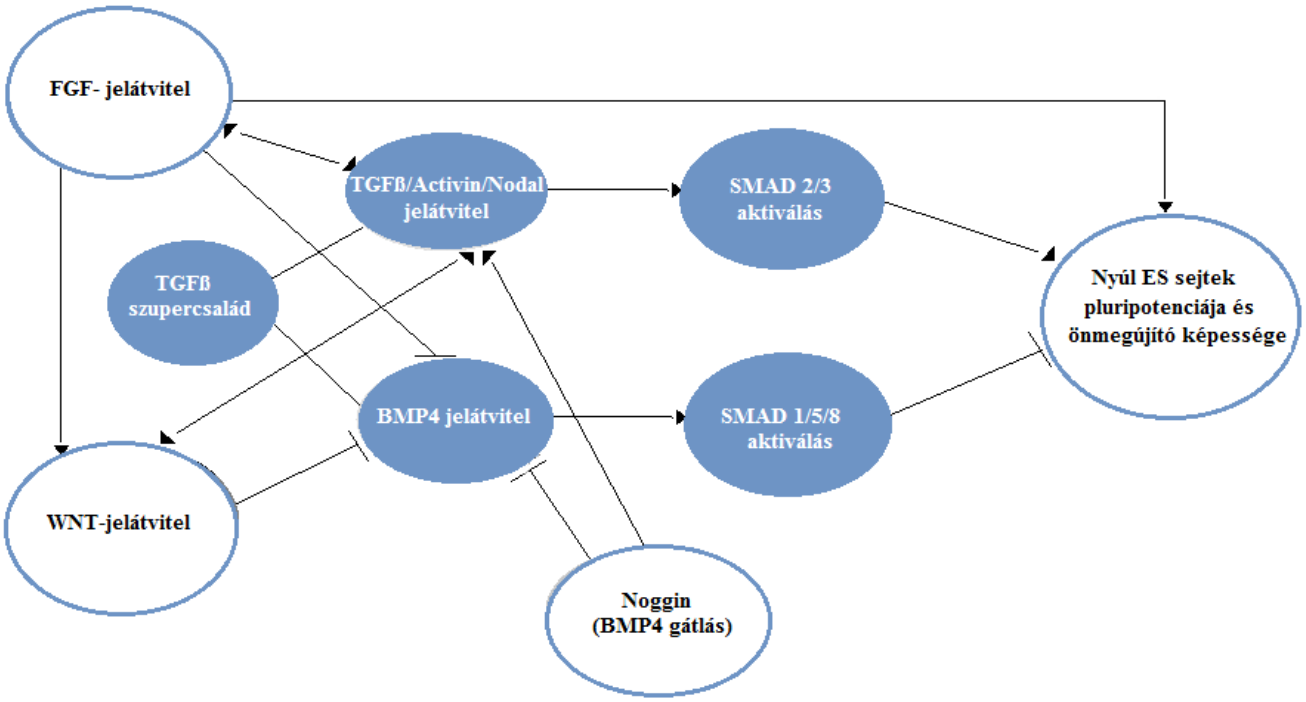
A nyúl esetében is a pluripotencia és az önmegújulásra való képesség teszi lehetővé az embrionális őssejtek számára a differenciálatlan állapotban való folyamatos osztódást vagy a szervezet valamely sejttípusává történő differenciálódást. Ezeket a tulajdonságokat számos jelátviteli útvonal szabályozza. A nyúl embrionális őssejtek közelebb állnak a főemlősök ES sejtjeihez, mint az egéréhez (Wang et al. 2008). A legfontosabb jelátviteli útvonalak, amelyek a főemlősök esetében, így a humán ES sejtek esetében is, a pluripotencia és a megújulásra való képesség megőrzésében vesznek részt, az *FGF4* által aktivált MAPK, Akt jelátviteli útvonalak és a TGF-ß, amely a SMAD 2/3/4-en keresztül hat. A WNT útvonal szintén részt vesz a pluripotencia megtartásában a ß-catenin aktiválásán keresztül. Az ezeken az útvonalakon

10.14751/SZIE.2015.052

keresztüli jelátvitel eredményezi az aktivációját és az expresszióját a három nélkülözhetetlen pluripotencia faktornak: *OCT4, SOX2* és *NANOG*. Ezek a transzkripciós faktorok rendkívül fontosak az embrionális őssejtek pluripotens állapotának fenntartásában. A *SOX2* és az *OCT4* közötti kölcsönhatás révén indul be a pluripotencia-specifikus célgének expressziója, amely mellett saját expressziójukat is szabályozzák egy ún. feed-back és feed-forward mechanizmus együttes keretében (Schöler et al. 1991). A *NANOG*, amely szintén betársul ebbe az *OCT4-SOX2* komplexbe, elengedhetetlen faktor az ICM és az abból izolált ES sejtek pluripotenciájának fenntartásában (Rodda et al. 2005). A *NANOG* gátolja az ES sejtek differenciálódását extraembrionális endoderma és trofektoderma irányba. A SMAD1-el való együttműködés során pedig meggátolja az ES sejtek BMP-indukált mezoderma irányú differenciálódását.

Bár a jelátviteli útvonalak, amelyek a nyúl ES sejtek pluripotenciáját szabályozzák, még nem teljes mértékben ismertek. Wang és munkatársai (2008) kimutatták, hogy a transzformáló növekedési faktor, a fibrobaszt növekedési faktor és a WNT/CATENIN útvonalak gátlása a nyúl ES sejtek differenciálódását eredményezik. Ezt a differenciálódási folyamatot pedig a SMAD 2/3 foszforilációjának és a ß-catenin expressziójának alultermelése és SMAD1 és CATENIN túltermelése követi. Az FGF és TGF útvonalak együtt fontos szerepet játszanak a nyúl ES sejtek pluripotenciájának megtartásában, a SMAD 2/3 jelátvitel aktiválásában és a SMAD 1/5/8 jelátvitel gátlásában. Az FGF aktivitás főként a TGF útvonaltól függ, habár az FGF-nek önmagában is van direkt vagy indirekt hatása a nyúl ES sejtek önmegújító képességére. Ugyan a WNT jelátvitelnek kisebb szerepe van, mint az FGF és TGF útvonalaknak az egér ES sejtek esetében tapasztalt hatásánál, de szintén részt vesz a nyúl ES sejtek pluripotens állapotának megtartásában. Wang és munkatársai azt is (2008) kimutatták, hogy a TGF, FGF és WNT útvonalak együttes hatása nélkülözhetetlen a nyúl ES sejtek pluripotenciájának megtartásában és hogy a MAPK/ERK és PI3K/AKT (Phosphoinositide 3-Kinase/AK mouse strain thymoma) jelátvitel gátlása megkönnyíti a nyúl ES sejtek differenciálódását (Wang et al. 2008) **(3. ábra).**

10.14751/SZIE.2015.052



3. ábra. A nyúl ES sejtek önmegújulásához szükséges kölcsönhatások ábrázolása az FGF, TGF, BMP és WNT jelátviteli útvonal között (Wang et al. alapján. 2008)

A nyúl ES és iPS sejtek esetében a jelátviteli útvonalak során kialakított és megtartott pluripotencia különböző szintjét állapították meg.

Egér esetében, egyes feltevések szerint kétféle pluripotens állapot különböztethető meg, amelyeket az ún. naiv- és az aktivált- („primed”) pluripotencia névvel illetnek. A naiv pluripotenciával rendelkező sejtek a pre-implantált epiblasztot reprezentálják. Míg a másik sejttípus egy előrehaladottabb, ún. aktivált pluripotens állapotot képvisel és a késői post-implantációs epiblasztot reprezentálják. A kétféle pluripotencia eltérő jelátviteli útvonalak aktiválásával/blokkolásával tartható fenn.

Nyúl esetében két csoport is vizsgálta ezt a jelenséget. Osteil és munkatársai kimutatták, hogy a nyúl iPS sejtek pluripotenciája közelebb áll a naiv állapotban lévő sejtek pluripotens képességéhez, míg a nyúl ES sejtek inkább akitvált „primed” állapotban vannak (Osteil et al. 2013). Ugyanaz a japán munkacsoport először Honda, majd Honsho vezetésével ugyanakkor kimutatta, hogy a differenciálódási képesség a nyúl iPS sejtek esetén a passzázs számok növelésével egyre növekszik, valamint ha ezeket a sejteket egy *OCT4* gént tartalmazó vektor segítségével naiv állapotba programozzák vissza, ez a képesség tovább növelhető és az iPS sejtek sokkal könnyebben differenciáltathatóak neurális irányba, mint a nyúl ES sejtek (Honda et al 2013, Honsho et al. 2015).

10.14751/SZIE.2015.052

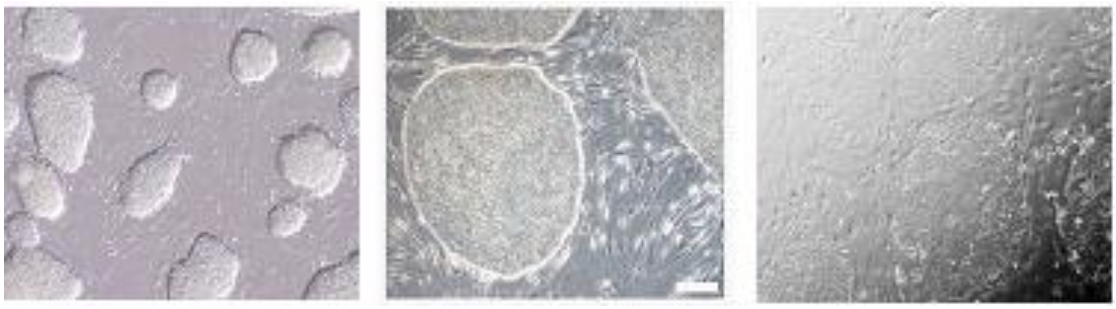
2.2.3 A pluripotencia igazolása

Az újonnan létrehozott ES és iPS vonalak pluripotenciájának igazolására több eljárás kombinált elvégzése szükséges. Jelenleg sajnos nem létezik olyan egységesített protokoll, amely rögzítené, hogy mely eljárásokat kell alkalmazni ahhoz, hogy egy vonal pluripotens állapotát egyértelműen igazoljuk. A leggyakrabban alkalmazott módszereket a következőkben egy táblázatban is összefoglaltuk **(1. táblázat).**

1. táblázat. A pluripotencia igazolására használt módszerek

Nyúl pluripotens sejtek pluripotenciájának igazolása	
In vitro	***In vivo***
Morfológiai jellemzők	**Teratóma teszt**
Alkalikus foszfatáz festés	**Kiméra teszt**
Immuncitokémiai festés • Oct4 • Sox2 • SSEA-1 • SSEA-4	
Reverz Transzkripciós PCR (RT-PCR)	
***In vitro* differenciáció** • spontán (mindhárom csíralemez megfigyelhető) • irányított (pl. kardiális, neurális)	

Morfológiai kritériumok: Míg az egér ES/iPS kolóniák világos, lekerekedett szélű kolóniákat hoznak létre, addig a humán ES/iPS kolóniák kerek, olykor ovális szélű kolóniák, kilapultak és nagyobb terjedelműek. A nyúl ES/iPS kolóniák a humán ES morfológiához hasonlóak, kilapultak és nagyobb terjedelműek, a mag aránya a citoplazmához viszonyítva nagy (**4. ábra**).



4. ábra. Embrionális őssejtek kolónia formája. A) egér, B) humán, C) nyúl ES kolóniák tápláló sejtrétegen tenyésztve (saját felvételek)

10.14751/SZIE.2015.052

Alkalikus foszfatáz festés: Az alkalikus foszfatáz olyan enzim, amely lúgos környezetben hidrolizálja a foszfát tartalmú molekulákat és expresszálódik a pluripotens sejtekben, ideális markerként szolgálva így a pluripotencia ellenőrzésére. Azonban ez a festés önmagában még nem elegendő, így szükséges kiegészíteni a karakterizáció egy másik szerves részével, az immuncitokémiai festésekkel.

Immuncitokémiai festés (ICC): Az immuncitokémiai festések során a pluripotencia markerekre (fehérjék és preteoglikánok) specifikus ellenanyaggal jelöljük a sejteket. A nyúl ICC során leggyakrabban alkalmazott markereket a **2. táblázat** ismerteti.

2. táblázat. A nyúl ICC során leggyakrabban alkalmazott markerek

Marker	Típus	Funkció	Referencia
OCT4	Transzkripciós faktor	Pluripotencia fenntartásában résztvevő gének aktiválása a sejtmagban	Schöler et al. 1991
SOX2			Avilion et al. 2003
SSEA1	Szénhidrát adhéziós molekula	Sejtfelszíni kölcsönhatások szabályozása preimplantációs korú embriókban, ES és EC sejtekben	Solter és Knowles 1987
SSEA4			Kannagi et al. 1983

Reverz Transzkripciós PCR (RT-PCR): Ezzel a módszerrel a pluripotenciáért felelős gének expresszióját lehet vizsgálni. A primerek megfelelő tervezésével elkülöníthetőek egymástól az exogén- (visszaprogramozás során kívülről bevitt), illetve az endogén- (a sejtek által aktivált saját pluripotencia gének) faktorok expressziója az iPS sejtek vizsgálatakor.

***In vitro* differenciáció**: Az *in vitro* differenciációval a sejtek azon tulajdonsága vizsgálható, hogy képesek-e mindhárom csíraréteg (ekto-, mezo- és endoderma) irányába differenciálódni (Eiges et al. 2002). A differenciáció során a sejtek aggregátumokat, ún. Embrionális Testecskéket (EB) képeznek. Az EB-k megfelelő felületre való kiültetésével, azok differenciációja érhető el. A differenciálódott sejtek azonosítása általában ICC-festésekkel történik a megfelelő fehérje markerek alkalmazásával.

Teratóma teszt: A teratóma teszt során a pluripotens egér/humán/nyúl sejteket immun-deficiens egerek bőre alá injektálják (Gertow et al. 2007; Wesselschmidt 2011). A sejtek spontán

10.14751/SZIE.2015.052

differenciálódnak és tumorokat, teratómákat formálnak. Ha az injektált sejt valóban pluripotens, akkor a három csíraréteg bármely sejttípusát képes létrehozni a teratómában, amelyet hisztokémiai festéssel ellenőrizhetünk.

Kiméra teszt: A csíravonal kompetens kimérák formációjának képessége a pluripotencia meglétének legszigorúbb kritériuma. A fent említett *in vitro*/*vivo* differenciációs tesztekkel szemben e teszttel ellenőrizhető az is, hogy a pluripotens sejtek részt vesznek-e a csírasejtek kialakításában is. A kimérákat a sejtek gazda embriókba való injektálásával és azok anyaállatba való ültetésével lehet létrehozni. A született állatok szőrszíne utalhat kimérizmus mértékére. Az első generációs kimérák keresztezésével pedig az ivarsejtekbe történő átadás, vagyis az ivari kimérizmus tesztelhető.

2.3 Pluripotens őssejtek

A pluripotens őssejtek bemutatásakor elsőként az embrióból izolált, ún. embrionális őssejteket, majd pedig külön fejezetben a genetikai újraprogramozással, szöveti sejtekből létrehozott ún. indukálható pluripotens őssejteket mutatjuk be fajonkénti bontásban.

2.3.1. Embrionális őssejtek

2.3.1.1 Egér embrionális őssejtek

Az egér volt az első állatfaj, amelynek embrióit felhasználva sikerült ES sejtvonalat alapítani (Evans és Kaufman. 1981, Martin et al. 1981). Olyan *in vitro* kondíciókat hoztak létre, amelyek között az egérembrió-eredetű sejtek fenntarthatóak voltak, szaporodni is tudtak és domború felszínű, kerek kolóniákat hoztak létre. Ezeket az embrionális őssejteket más genetikai háttérrel rendelkező egérembrióba ültették, majd vizsgálták a születő egereket és azok utódait. Azt vették észre, hogy a kiméra egerek sejtjei között, mind a recipiens állatból, mind a beültetett ES sejtekből származó sejtek jelen voltak, még az ivarsejtekben is. Ez azt is jelenti, hogy az így létrehozott ún. ivari kimérákban az ES-sejtekből származó genetikai információ képes továbböröklődni. Vagyis, ha idegen géneket juttattak be, vagy bizonyos géneket „kiütöttek” (knock-out) homológ rekombináció segítségével, az így létrehozott kimérákban és utódaikban is megfigyelhető volt az idegen gén által kódolt információ, ill. a knock-out technika alkalmazását követően a saját gén hiánya. Ennek a génkiütési technikának elsősorban a gének funkciójának

10.14751/SZIE.2015.052

vizsgálatában, illetve az egyes genetikai betegségek modellezésében lehet nagy jelentősége (Pilcher. 2003)

Az egér ES sejtekre jellemző az általunk vizsgált *OCT4, NANOG* és *SOX2* együttes aktivitása. Ezek a transzkripciós faktorok együtt szabályozzák azokat a célgéneket, amelyek részt vesznek a pluripotencia vagy a korai elköteleződés szabályozásában, ezáltal biztosítják a pluripotencia fenntartását és szabályozzák a differenciálódást.

2.3.1.2 Humán embrionális őssejtek

Elsőként 1998-ban sikerült humán ES sejtvonalakat létrehozni olyan fel nem használt hólyagcsíra állapotú embriókból, amelyeket az *in vitro* megtermékenyítést követően nem ültettek vissza az *in vitro* fertilizációs (IVF) programokban, hanem kutatási célokra adományoztak. A humán ES sejtvonal létrehozásának módja az egér ES sejtek esetében alkalmazottakhoz nagyon hasonlított, de a létrejött ES sejtvonalak, a majom ES sejtvonalakra jellemző morfológiával és tulajdonságokkal rendelkeztek (Thomson et al. 1998), vagyis határozott körvonalú, lapos felszínű kolóniák jöttek létre. Szintén 1998-ban pluripotens EG (Embrionális csírasejt, Embryonic Germ Cells) sejtvonalat hoztak létre abortált öt-kilenchetes magzatok ivarmirigyeiben található ősivarsejtekből (Shamblot et al. 1998). Mind a humán ES, mind a humán EG sejtvonalak megtartották normál kariotípusukat és telomeráz aktivitást is mutattak, ami azt jelzi, hogy az izolált sejtvonalak immortalizált sejtvonalak voltak. Humán ES sejtvonalakat hosszú ideje sikeresen tartanak fenn sejttenyészetekben, széles *in vitro* differenciálódási képességgel rendelkeznek, míg a humán EG sejtvonalak sejtjei lassabban osztódnak, nehezebben differenciáltathatók *in vitro*, így inkább a humán ES sejtvonalak alkalmazása terjedt el. Ma már az egér sejtvonalakhoz hasonlóan, jó hatékonysággal lehet humán ES sejtvonalakat létrehozni kutatási célokra. Mindazonáltal a humán ES sejtek kinyeréséhez szükséges embriók felhasználása a mai napig komoly etikai viták kiváltója. Az alapvető álláspont szerint minden olyan embrió vagy embrionális őssejt, amelyből egy teljes emberi lény kifejlődhet, védelemre szorul az emberi méltóság és élet jogán. Jelenleg a kutatásban vagy gyógyításban alkalmazott embrionális őssejteket kizárólag megsemmisítésre szánt embriókból állítják elő. Részleges megoldást jelenthet még az a módszer is, mikor az embrióból úgy vesznek ki egy sejtet (blasztomert), hogy az nem akadályozza a további növekedését. De az alapvető dilemma, hogy mennyire védendő és védhető a humán embrió, így sem megoldott (Sarkadi 2012). A humán embrionális ES sejtek fontos szerepet játszhatnak a szövetpótlás területén, illetve hasznos eszközt jelenthetnek a korai embrionális fejlődés tanulmányozásában is.

10.14751/SZIE.2015.052

2.3.1.3 Nyúl embrionális őssejtek

Az utóbbi években több, egymástól független kutatócsoport számolt be nyúl ES sejtvonal létrehozásáról. Ezeket a **3. táblázatban** foglaltuk össze.

A nyúl ES sejtek minden olyan kardinális tulajdonsággal rendelkeznek, amelyekkel általában a pluripotens őssejtek: korlátlan önmegújulásra képesek (vagy legalábbis magas passzázs számot érhetnek el az *in vitro* tenyésztés során). Képesek arra, hogy hólyagcsíra állapotú gazdaembrió blasztocölbe injektálva, illetve 8-sejtes embrióval aggregáltatva, *in vivo* az embrió szöveteinek részévé fejlődjenek. Valamennyi szövet- és sejttípus létrehozására képesek *in vitro* és *in vivo* is, így az egér és emlős ES sejtekhez hasonlóan, a nyúl ES sejteket immundeficiens egérbe injektálva azok teratómát képeznek.

A nyúl ES sejtek a humán ES sejtekhez hasonló, lapos kolóniákat képeznek. Kollagenáz vagy Tripszin/EDTA enzimkezelést és óvatos disszociáltatást követően passzálhatóak. Az eddigi irodalmi adatok alapján úgy tűnik, a nyúl ES sejtek esetében a *bFGF* az *ERK* és P13 aktiváción, míg az ACTIVIN/NODAL szignál útvonal a *SMAD* 2/3 aktiváción keresztül nélkülözhetetlen a pluripotencia fenntartásához (Wang et al. 2008; Honda et al. 2009).

Stabil nyúl ES sejtvonalak létrehozásával, amelyek nem csak korlátozott számú passzázson át tarthatóak fenn és ivari kimérák létrehozására is alkalmasak, több munkacsoport is próbálkozik több-kevesebb sikerrel. Ennek megfelelően, a sejtek fenntartásához szükséges tápoldatok összetétele is laboratóriumonként változik. Az alap médium a legtöbb esetben a Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) vagy ennek kiegészített verziói, mint a DMEM/F12 vagy a Knock-Out DMEM. Az összes médiumban megtalálható közös kiegészítő a glutamin, a ß-mercaptoethanol és a nem esszenciális aminosavak. Ami a tápoldatok egyéb kiegészítését illeti, a legtöbb csoport használ vagy *LIF*-et vagy *bFGF*-et, mivel a kérdés, hogy a nyúl ES sejteknek szükségük van-e ezek közül az egyik vagy esetleg mindkét faktorra a pluripotencia fenntartásához, még vitatott kérdés (Táncos et al. 2012). A helyzet hasonló a szérumtartalom esetében is. A médium tartalmazhat magzati borjú savót (Fetal Calf Serum, FCS) vagy Knock-Out Serum Replacement-et (KO-SR) is. A mai napig nem született teljes egyetértés arról, melyik módszer is a leghatékonyabb.

2.3.1.4 Egyéb gazdasági haszonállatok

Az embrionális eredetű pluripotens őssejtvonalak egérben viszonylag könnyen előállíthatóak és emberben, valamint rhesus- vagy bundermajomban is sikerült ilyen sejtvonalak alapítása. Gazdasági haszonállatokban azonban az ilyen stabil, nem differenciálódó őssejtvonalak előállítása igen nehéz, és noha szarvasmarhában, nyúlban, valamint sertésben

10.14751/SZIE.2015.052

sikerült néhány utódot nyerni ilyen sejtekből, a sejtvonalak fenntartása és az eredmények megismételhetősége nem megbízható (Dinnyés. 2004).

Ahhoz, hogy a gazdasági haszonállatokban embrionális őssejt-vonalakat alapíthassunk, ismernünk kell a meglévő embrionális őssejt-vonalak közti különbségeket, a beágyazódás előtti embriófejlődés menetét, a sejtek pluripotenciájának megtartásában, szabályozásában résztvevő fontos jelátviteli útvonalakat, valamint az optimális sejttenyésztési körülményeket. Mezőgazdasági szempontból ezeknek a sejtvonalaknak fontos szerepük lehet az állatállomány előnyös génjeinek javításában, melynek egyrészt gazdasági jelentősége van, másrészt a betegségekkel szembeni ellenállás szempontjából is fontos. Nagy jelentőséggel bírhatnak a génmegőrzés területén, és jól használhatóak lennének az emlős funkcionális genomikai kutatásaihoz is (Németh és Gócza. 2014).

10.14751/SZIE.2015.052

3. táblázat. Publikált nyúl pluripotens ES sejtvonalak

PUBLIKÁLT NYÚL PLURIPOTENS ES SEJTVONALAK							
	Év	Referencia	Cím	Speciális médium kiegészítők	Tesztelt markerek	Pluripotencia szintje	Kiméraképzés szintje
1	1993	Graves et al. 1993	Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos	Egér Leukemia inhibitor faktor	Desmin	Differenciáció *in vivo* és *in vitro*	Nincs kiméraképzés
2	1996	Schoonjans et al. 1996	Pluripotential rabbit embryonic stem cells are capable of forming overt coat color chimeras following injection into blastocyst	Egér Leukemia inhibitor faktor	AP	Alkalikus foszfatáz aktivitás Differenciáció *in vivo* és *in vitro*	A kiméraképzés hatékonysága kisebb (5%-a az élve születetteknek), de a kimérizmus foka szőrszín alapján magas (10-50%)
3	2006	Fang et al. 2006	Rabbit embryonic stem cell lines derived from fertilized, parthenogenetic or somatic cell nuclear transfer embryos	Humán recombináns basic fibroblast growth faktor	SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 TRA-1-81 OCT4, AP	Normál kariotípus Alkalikus foszfatáz aktivitás Differenciáció *in vivo* és *in vitro*	Nincs kiméraképzés
4	2007	Wang et al. 2007	Generation and Characterization of Rabbit Embryonic Stem Cells	Nincs kiegészítő	SSEA-1, SSEA3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, OCT4, AP	Normál kariotípus Alkalikus foszfatáz aktivitás	Nincs kiméraképzés
5	2008	Intawicha et al. 2008	Culture and characterization of presumptive embryonic stem cell line isolated from New Zealand White rabbit embryos	Egér Leukemia inhibitor faktor	SSEA-1OCT4, AP	Alkalikus foszfatáz aktivitás Differenciáció *in vivo* és *in vitro*	Nincs kiméraképzés
6	2008	Catunda et al. 2008	Characterization, Chromosomal Assignment, and Role of LIFR in Early Embryogenesis and Stem Cell Establishment of Rabbits	Egér Leukemia inhibitor faktor growth faktor	OCT4, SSEA-1, NANOG, CD9, AP	Alkalikus foszfatáz aktivitás Differenciáció *in vivo* és *in vitro*	Nincs kiméraképzés
7	2008	Honda et al. 2008	Stable embryonic stem cell lines in rabbits: potential small animal models for human research	Egér Leukemia inhibitor faktor Humán recombináns basic fibroblast	NANOG, SSEA-1, SSEA-4, OCT4, SSEA-3, AP	Alkalikus foszfatáz aktivitás Differenciáció *in vivo* és *in vitro*	A kiméraképzés hatékonysága magas volt (az élve születettek 36%-a), bár a GFP fluorescens detektálás során az ES sejtek nem minden szövettípusban voltak megtalálhatóak
8	2009	Gócza et al. 2009	Derivation and characterization of rabbit embryonic stem cells	Egér Leukemia inhibitor faktor	SNANOG, OCT4, SSEA-1,CD19, AP	Alkalikus foszfatáz aktivitás Differenciáció *in vitro*	Nincs kiméraképzés
9	2010	Zakhartchenko et al. 2011	Cell-mediated transgenesis in rabbits: chimeric and nuclear transfer animals	Humán Leukémia inhibitor faktor Humán recombináns basic fibroblast	OCT4, REX1, NANOG, TERC, NODAL, FOXD3, DPPA5, BMP4, AP	Alkalikus foszfatáz aktivitás Differenciáció *in vivo* és *in vitro*	Az egyetlen megszülető utód alacsony szintű szőrszín kimérizmust mutatott.

10.14751/SZIE.2015.052

2.3.2 Indukált pluripotens őssejtek

Különböző módszerek felhasználásával, már számos fajból sikerült iPS sejteket generálni: egér (Takahashi et al. 2006, Woltjen et al. 2009, Yusa et al. 2009) ember (Anokye-Danso et al. 2011, Soldner et al. 2009, Warren et al. 2010, Takahashi et al. 2007, Yu et al. 2007, Park et al. 2008b), patkány (Li et al. 2009), rhesus majom (Liu et al. 2008), kutya (Luo et al. 2011), ló (Nagy et al. 2011) és sertés (Zhou et al. 2011).

Az indukált pluripotens őssejteket (iPS sejtek) szomatikus sejtekből generálják genetikai újraprogramozással. Az így létrejött sejtek a pluripotens sejtekhez hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek, őssejtekre jellemző géneket, fehérjéket expresszálnak, kiméra létrehozására alkalmasak és differenciáltathatóak. Takahashi és munkatársai (2006, 2007) egér és humán fibroblasztokból *OCT4, SOX2, KLF4* és *C-MYC* gének retrovirális bejuttatásával hoztak létre indukált pluripotens őssejteket egérben és emberben (Takahashi et al. 2006, 2007). Az előbb említett géneket ezt követően „Yamanaka faktoroknak" (rövidítve OSKM faktorok) nevezték el. Az előzőekben bemutatott *OCT4*-ről és *SOX2*-ről már tudjuk, hogy egymással együttműködve fontos szerepet játszanak a pluripotencia kialakításában és megtartásában. Ami pedig a Yamanaka és kutatócsoportja által kiválasztott két másik faktort illeti, az egyik, a *C-MYC* egy jól ismert proto-onkogén. Ez a gén kódolja azt a transzkripciós faktort, amely részt vesz a sejtek proliferációjának, növekedésének, differenciációjának, apoptózisának és malignus transzformációjának szabályozásában. A *KLF4* (másnéven EZF (Epithelial Zinc Finger protein) vagy GKLF (Gut-enriched Krueppel-Like Factor)) pedig a pluripotencia kialakításában transzkripcionális aktivátor és represszor szerepet egyaránt betölt.

2.3.2.1 Egér indukált pluripotens őssejtek

Yamanaka és munkacsoportja (Takahashi et al. 2006, 2007) egér fibroblasztokból *OCT4, SOX2, KLF4* és *C-MYC* gének retrovirális bejuttatásával hoztak létre indukált pluripotens őssejteket (Takahashi et al. 2006).

Az iPS technológiát több betegségmodellben (sarlósejtes anémia, hemophilia-A, Parkinson kór és iszkémiás szívbetegség) is sikeresen alkalmazták már (Nelson et al. 2010). Nelson és munkatársai egér fibroblasztokból humán faktorokkal (*OCT4, SOX2, KLF4 és C-MYC*) embrionális őssejtekre jellemző fenotípusú sejteket hoztak létre. Ezen sejtek alkalmazása 8-12 hetes egerekben miokardiális infarktus után helyreállította a szívfunkciót, csökkentette a hegszövet és a falvastagodás mértékét (Nelson et al. 2009).

10.14751/SZIE.2015.052

A továbbiakban egér sérült retinába az egér iPS sejtek közvetlen beinjektálását követően szintén regenerálódást vettek észre. Kimutatták, hogy a sejtek megtapadtak, szaporodtak és a regenerálták a sérült hajszálereket (Mullin. 2014; Zambidis et al. 2014).

2.3.2.2 Humán indukált pluripotens őssejtek

A humán embrionális őssejtekre alapozott terápiás elképzelések az utóbbi években jelentősen háttérbe szorultak, elsősorban etikai és immunológiai nehézségek kapcsán. A 2006 óta tudományos köztudatba került iPS sejtek viszont alapvetően képesek lennének megváltoztatni ezt a helyzetet. Az embrionális őssejtekkel ellentétben, amelyek csak embrionális szövetekből nyerhetőek, az iPS sejtek nagy előnye, hogy akár felnőttek sejtjeiből és egyénre szabottan hozhatóak létre. Ennek lényege, hogy egy már differenciálódott felnőtt humán sejtet vissza lehet programozni őssejt-szerű, pluripotens állapotba. A humán indukált pluripotens őssejtek alkalmazása előnyt jelenthet a gyakorlatban az embrionális őssejtekkel szemben, mivel nem támaszt etikai aggályokat, autológ módon használható, vagyis a páciens saját testi sejtjeiből előállítható.

Elsőként a Yamanaka faktorok használatával hoztak létre ilyen sejteket, majd később olyan faktor kombinációkat is alkalmaztak, amelyből például kihagyták a *C-MYC*-et, hogy annak tumorigenikus hatását elkerüljék és helyette csak 3 faktor (*OCT-4, KLF4, SOX2*) bejuttatásával is generáltak már ilyen stabil iPS sejtvonalakat (Nakagawa et al. 2008).

Annak érdekében, hogy elkerüljék az eddig használt retro- és lentivirális génbevitelt és ennek káros következményeit az iPS sejtek humán gyógyászatban való felhasználásra nézve, a kutatók igyekeztek olyan módszert találni, amely vírus, illetve integráció mentes. Ide tartoztak az adenovírus-, fehérje-, mRNS-, „Minicircle” vektor-, episzómális vektor- és Sendai-vírus- alapú újraprogramozási rendszerek (Stadtfeld et al. 2008; Kim et al. 2009; Zhou et al. 2009; Yu et al. 2009; Fusaki et al. 2009; Warren et al. 2010; Jia et al. 2010; Ban et al. 2011).

2.3.2.3 Nyúl indukált pluripotens őssejtek

Honda és munkatársai (2010) voltak az elsők, akik humán újraprogramozó faktorok nyúl hepatocita és gyomorból származó epithél sejtek lentivirális transzdukciójával iPS vonalakat generáltak. Az újonnan létrehozott nyúl indukált pluripotens őssejtek (rbiPS) a humán iPS sejtekre hasonlítottak a leginkább, azaz bFGF jelenlétében lapos, határozott körvonalú kolóniákat hoztak létre. Expresszálták az endogén nyúl pluripotencia markereket. *In vitro* ezek a sejtek gyorsan differenciálódtak ekto−, endo−, és mezodermális irányba. *In vivo* teratómát képeztek, azonban nem voltak képesek kiméraképzésre.

10.14751/SZIE.2015.052

Később egy francia csoportnak is sikerült nyúl iPS sejteket generálnia humán újraprogramozó faktorok (*OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC*) felhasználásával, nyúl fibroblasztból kiindulva, mely bFGF jelenlétében, az előzőhöz hasonló, stabil, folyamatosan osztódó nyúl iPS vonalat eredményezett. A sejtek ebben az esetben is differenciálódtak ekto−, endo−, és mezodermális irányba és *in vivo* teratómát is képeztek (Osteil et al. 2013).

2.3.2.4 Egyéb gazdasági haszonállatok

A gazdasági állatokból létrehozott iPS sejtvonalak az őssejt alapú génterápiás eljárások tesztelésére lehetnek alkalmasak, amelyek értékes információval szolgálnak a humán gyógyászat számára, emellett terápiás alternatívát nyújthatnak az állatorvoslás számára is (Cebrian-Serrano et al. 2013).

Sertésben számos iPS sejtvonal alapításáról számoltak már be betegségek modellezése céljából (Cebrian-Serrano et al. 2013), a későbbiekben pedig West et al. (2010) és Fujishiro et al. (2013) iPS sejtek által történő transzgénikus sertések előállítását közölte. Szarvasmarha iPS sejtvonalak sikeres alapításáról több kutatócsoport is beszámolt. Ebben az esetben úgy találták, hogy az OSKM faktorok mellett további faktorok bevitele volt szükséges stabil vonalak alapításához (Han et al. 2011). A madárfajokból történő iPS sejt alapításnak a transzgénikus állatok előállítása mellett fejlődésbiológiai tanulmányokban lehet jelentősége. Például japán fürjből származó testi sejteket programoztak újra a humán pluripotencia faktorok alkalmazásával, ahol az iPS sejtvonalak képesek voltak kimérák formálására is (Lu et al. 2012). Az eddigi eredmények tehát azt sugallják, hogy az embrionális őssejteknél nagyobb hatékonysággal lehetett iPS sejtvonalakat létrehozni, a korlátokat azonban továbbra is az embrionális fejlődés során a pluripotens sejtekben aktív gének és szerepük ismeretének hiánya okozza. Vagyis a pluripotencia kialakításában szerepet játszó fajspecifikus sajátságok ismerete elengedhetetlen a kutatások további előrelépéséhez.

2.4 Újraprogramozó rendszerek

2.4.1 Integratív és nem integratív újraprogramozó rendszerek

2.4.1.1 Integrálódó DNS alapú vektorral való újraprogramozás

Az integratív rendszerek használata hatékonyságuk miatt a legelterjedtebbek. A genomba integrálódó vektorral való genetikai újraprogramozás során a visszaprogramozó faktorokat tartalmazó vektor stabilan beépül a visszaprogramozott sejt DNS állományába. Ilyenkor

10.14751/SZIE.2015.052

problémát jelenthet a transzgén jelenléte, amely nem csak terápiás alkalmazás esetén nem kívánatos, de jelenléte negatívan befolyásolhatja a generált iPS sejtek molekuláris és funkcionális tulajdonságait is. Ez a zavar megmutatkozhat a sejtek differenciációs képességeinek csökkenésében is (Soldner et al. 2009). A faktorok bejuttatása történhet retrovirális, lentivirális és transzpozon alapú vektorokkal egyaránt.

Yamanaka és munkacsoportja elsőként **retrovirális** vektorral juttatta be az újraprogramozó faktorokat, amellyel sikeresen hozott létre egér iPS sejteket (Takahashi et al. 2006). Habár a rerovirális génbevitel gyorsnak és hatékonynak bizonyult, az aktív transzgén jelenlétének káros hatását elkerülendő, egyes kutatócsoportok inkább integrálódó/kivágható rendszereket dolgoztak ki. Ennek folyamán jelent meg a Cre/LoxP-rendszerrel eltávolítható **lentivírus** alapú technika (Chang et al. 2009; Soldner et al. 2009; Sommer et al. 2010; Somers et al. 2010). A vírus bevitel nélküli, **transzpozonokkal** történő újraprogramozás pedig a lentivírushoz hasonló hatékonysággal működött, ahol a transzpozáz enzim hozzáadásával a transzgén kivágása egér iPSC-kből sikeres volt (Woltjen et al. 2009).

2.4.1.2 Nem integrálódó DNS alapú vektorral való újraprogramozás

A nem integratív rendszerek ugyan kevésbé bizonyulnak hatékonynak az előzőekkel szemben, viszont fontos előnyük, hogy azok az újraprogramozó faktorok, amelyeket ezzel a módszerrel juttatnak a sejtekbe, rövid expressziójuk után kihígulnak a rendszerből, így a sejtek genomjába ezek a génszakaszok nem integrálódnak, éppen ezért terápiás alkalmazásuk ebből a szempontból sokkal ígéretesebbnek látszik. Ide tartoznak az **episzómális-, minicircle-** és **adenovírus- vektort** alkalmazó újraprogramozási eljárások.

A továbbiakban csak a vizsgálataink szempontjából fontos rendszereket mutatjuk be részletesen. Nem ejtünk szót továbbá a nem DNS alapú visszaprogramozó rendszerekről sem, amelyek nem képezték vizsgálataink tárgyát.

2.4.2 Sleeping Beauty Transzpozon Rendszer

1997-ben magyar kutatók hozták létre a Sleeping Beauty (SB) névre keresztelt transzpozont, a molekuláris genetika módszereivel (Ivics et al. 1997). A SB egy szintetikus mobilis elem, amit 8 lazac faj genomjában talált 12 transzpozon szekvenciából generáltak PCR mutagenezissel. Miután a SB-ről bebizonyosodott, hogy jól lehet használni különböző sejttenyészetek vagy állatok transzgeneziséhez, a kutatók szerettek volna létrehozni egy jobban működő, még nagyobb hatékonyságú transzpozázt. Ezért vizsgálták különböző Tc1 transzpozázok szekvenciáját, keresve a konzervált régiókat. A filogenetikai összehasonlítás után,

10.14751/SZIE.2015.052

helyspecifikus PCR mutagenezis segítségével hiperaktív transzpozázokat hoztak létre (Geurts et al. 2003). Közülük a legsikeresebbnek talált SB100X elnevezésű transzpozáz, az eredetinél százszor hatékonyabb (Matés et al. 2009), amely az amúgy nehezen transzfektálható HeLa sejteken is 35−50%−os hatékonysággal működik. Egér esetében a transzgenezis hatékonyságát akár 40%−ra is megemelheti (Matés et al. 2009; Carlson et al. 2011).

A SB transzpozáz kötőhelyei egy körülbelül 230 bp hosszú repetitív szekvenciában találhatóak (IRDR) a transzpozon szekvencia mindkét végén (Izsvák et al. 2000). Ezek az IRDR szekvenciák tartalmazzák a két 32 bp hosszúságú transzpozáz kötőhelyet (Cui et al. 2002).

Ez a transzpozon alapú transzgenezis technológia hatékonynak bizonyult már egér, patkány, nyúl, sertés és birka esetében (Eickbush 1992; Esnault et al. 2000; Katter et al. 2013, Geurts et al. 2006). Napjainkban több kutatás folyik olyan humán sejtvonalakon (Chénais et al. 2012), amelyeken ezzel a technológiával végeztek valamilyen genetikai módosítást, továbbá génterápiás kísérletekben is gyakorta használt eszköz (Levin és Moran 2011).

2.4.3 Lentivírus Expressziós Rendszer

A lentivírusok a retrovírusok egy génuszát alkotják. Általában gerinceseket fertőznek, azon belül is elsősorban emlősöket, így gazdasági haszonállataink jelentős fertőző ágensei. A lentivírusok különböző szervekben okozhatnak maradandó fertőzést és elváltozásokat, egyik fő jellemzőjük a hosszú inkubációs idő. (A „lenti” szó latinul lassút jelent). RNS genomjukban a *gag, pol* és *env* géneket kódolják (Goff. 2001), amelyek a retrovírusokkal hasonló funkciójúak. A *gag* a belső szerkezeti fehérjéket kódolja, a mátrixot, a kapszidot, és a nukleokapszid komplexet. A *pol* a replikációs enzimeket (reverz transzkriptáz és integráz), míg az *env* a burokfehérjéket kódolja. További szabályozó gének is támogatják sikerességüket (pl. *tat, rev*) (Desrosiers et al. 2001), amelyek segítségével irányítani tudják expressziójukat. A lentivírusok a komplex retrovírusok általános génjein kívül tartalmaznak még szabályozó fehérjéket is, amik az életciklusukat befolyásolják.

A lentivírus vektorokat laboratóriumi körülmények között tranziens vagy stabil transzfekciós rendszerekben hozzák létre. Az úgynevezett összepakoló sejtvonalba (például HEK 293 (T) sejtvonal) különböző plazmidokat kotranszfektálnak (Amado és Chen 1999). Egyrészt egy vektort, amely tartalmazza a vírus két LTR (Long Terminal Repeat, Hosszú Terminálisan Ismétlődő) szekvenciái közé klónozott transzgént a megfelelő promoterrel, másrészt az összeszerelő plazmidot, amelyben megtalálhatóak a vektor egyszeri összepakolásához szükséges fehérjék génjei (*gag, pol*). Az összeszerelő plazmid szekvenciái közül hiányoznak azok a

10.14751/SZIE.2015.052

szignálok, amelyek az új vírusok létrejöttét indukálják. Szintén nem szerepel benne a burokfehérje génje, mert azt egy külön burokplazmidon juttatják a rendszerbe. A burokfehérje gén egy heterológ vírusból származik, általában a VSV-G (vesicular stomatitis virus) G glycoprotein env génje vagy a MLV burokfehérje génje. Az összepakolt vektor a lentivírustól eltérő burokfehérje következtében nem csak a T-sejtek fertőzésére lesz képes. A vektorokat ezek után a sejtekből kitisztítják és titerüket dúsítással beállítják.

A külön plazmidok használata és az, hogy a plazmidok szekvenciái közötti hasonlóság nagyon csekély, biztosítja a váratlan rekombinációs események alacsony gyakoriságát a vektor készítés folyamán. Az összepakoló sejtvonalban végbemenő tranziens expresszió eredményeként létrejönnek olyan transzfer vektorok, amelyek képesek bejutni osztódó és nem osztódó sejtekbe egyaránt, és ott a magukkal hozott enzimek segítségével integrálják a gazda genomjába a transzgént (Naldini et al. 1996), amely révén a kívánt genetikai változtatás elvégezhető.

2.5 Transzkripciós faktorok

A transzkripciós faktorok olyan fehérjemolekulák, melyek a transzkripció aktiválásában, vagy represszálásában játszanak fontos szerepet. Nagy jelentőségük van az embrionális fejlődés során. Sok transzkripciós faktor közös DNS-kötő doménnel rendelkezik, és így részt vehetnek egyes gének aktiválásában, illetve represszálásában, így a korai fejlődési stádiumban lévő gének szabályozásában is. A transzkripciós faktor fehérjék fő jellemzője, hogy egy ún. DNS-kötő doménnel rendelkeznek és általában homo- vagy heterodimer formában aktívak, így rendelkeznek ún. dimerizációs doménnel is.

2.5.1 Újraprogramozó faktorok

Pluripotencia faktoroknak nevezzük azon fehérjéket, amelyek a pluripotencia fenntartásában, mint transzkripciós faktor fehérjék játszanak szerepet. Fehérjéik nem struktúrális fehérjeként, hanem kis mennyiségben termelődve, más gének és saját expressziójuk szabályozása, regulációja révén fejtik ki hatásukat. DNS és fehérje kötő doménjeik révén fizikai kapcsolatba kerülnek a szabályozandó gén és/vagy fehérje molekulával a reguláló funkció betöltéséhez. A következőkben e fehérjék részletes bemutatásán keresztül igyekszünk közelebbről is elemezni a pluripotencia fenntartásának folyamatait.

10.14751/SZIE.2015.052

2.5.1.1 Az OCT4 transzkripciós faktor

Az OCT4 fehérje az ún. hélix-hurok-hélix csoportba tartozik. A családon belül az aminosav szekvencia hasonlóság, ill. funkcionális hasonlóság alapján pedig az ún. POU (Pit, Oct, Unc) transzkripciós faktorcsaládba sorolható. Az e családba tartozó transzkripciós faktorok fő sajátossága az, hogy rendelkeznek egy úgynevezett POU-doménnel, amely két szerkezetileg független aldoménből áll. A 75 aminosavból álló N-terminális POU specifikus régióból (POUs) és a 60 aminosavból álló C-terminális homeodoménből (POUh). Mindkét domén specifikus kapcsolat kiépítésére képes a hélix-hurok-hélix struktúrának köszönhetően. Egymástól egy 15-56 aminosavból álló variábilis szakasz választja el őket. A POU doménen kívüli régiók nem kulcsfontosságúak a DNS-kötés szempontjából. Az N-terminális domén prolinban gazdag. Míg a C-terminális domén prolinban, szerinben és treoninban gazdag. Jelenlegi ismereteink szerint, mindkét doménnek a transzaktivációban van szerepe. A különbség az, hogy az OCT4 C-terminális domén sejtspecifikus és a foszforiláción keresztül regulált, míg az N-domén nem (**5. ábra**). A 352 aminosavból álló egér OCT4 fehérjét az *OCT4* gén kódolja (Pan et al. 2002).

5. ábra. Az OCT4 fehérje felépítése és az egyes domének funkciója (Pan et al. 2002)

A POU transzkripciós faktor családba tartozó transzkripciós faktorok (mint az OCT4 is) úgy aktiválják a célzott gének expresszióját, hogy nyolc bázispárnyi (octamer), ún. transzkripciós motívumokhoz (ATGCAAAT) kötődnek (Schöler et al. 1991). Az OCT4 elengedhetetlen a pluripotens sejtpopulációk fenntartása szempontjából. Aktivitásának szigorú szabályozására van szükség, amely biztosítja a csíravonal folytonosságát és a különböző szövetek és szervek megfelelő kialakulását.

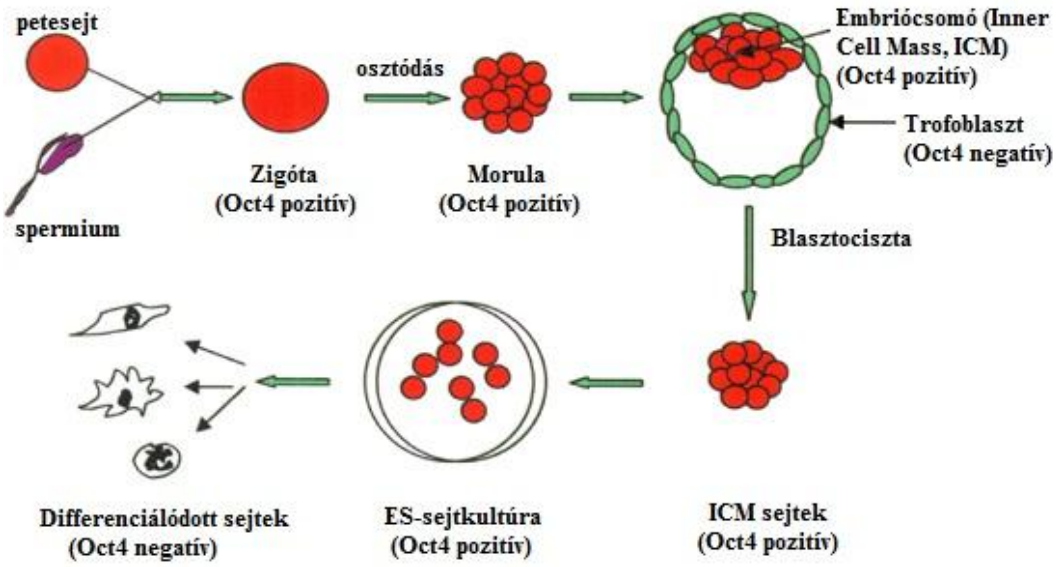
A még nem termékenyült petesejtben anyai eredetű OCT4 mRNS és fehérje található. A termékenyülést követően a fehérje az előmagban (pronucleus) lokalizálódik (Schöler et al. 1989; Rosner et al. 1990; Yeom et al. 1991; Palmieri et al. 1994). Termékenyülés után az OCT4 mRNS szintje lecsökken, és a gén zigotikus expressziója csak a nyolcsejtes stádiumot megelőzően kezdődik, amikor a sejtmagokban az mRNS és a fehérje szintje megemelkedik (Yeom et al. 1991). A kompakt morula állapotig az OCT4 mRNS és fehérje szintje magas és egyenlő marad

10.14751/SZIE.2015.052

minden sejtben egészen a blasztocöl kialakulásáig, amikor is a morula külső sejtjei a trofektodermát, mely az implantálódáshoz és a placenta kialakulásához szükséges, belső sejtjei pedig az ICM-et hozzák létre, melyből később az embrió fejlődik ki. Az *OCT4* gén expressziója ekkor már csak az ICM sejtjeiben detektálható, a trofektoderma sejtjeiben nem. Ez a jelenség fajtól függ, mivel a szarvasmarha és a sertés blasztocisztájában az *OCT4* expressziója a trofektoderma sejtekben is kimutatható (Kirchhof et al. 2000). Ez az expresszió azonban csak az implantáció ideje alatt marad fent, azt követően megszűnik. Az implantációt követően az ICM-ből kialakul a primitív endo- és ektoderma. Az *OCT4* expressziója ezek után már csak a primitív endoderma sejtjeire korlátozódik. Közép-gasztrula stádiumban pedig már csak a primordiális őssejtek azok, amelyekben fennmarad az *OCT4* expressziója a gasztruláció után is, egészen a gaméták ivari differenciálódásáig (Schöler et al. 1989).

Hansis és munkatársai (2001) humán blasztocisztákban vizsgálták az *OCT4* expresszióját. Humán blasztocisztákban szeparálták az ICM és trofektoderma sejtjeit, majd az mRNS szintjét RT-PCR segítségével vizsgálták. Az eredmény demonstrálta, hogy az *OCT4* expresszió szintje harmincszor magasabb a totipotens ICM sejtekben, mint a differenciálódott trofektoderma sejtekben (Hansis et al. 2000; Hansis et al. 2001).

A **6. ábra** az egér preimplantációs fejlődése során detektált *OCT4* expressziót mutatja be egy sematikus ábra segítségével. Az ábrán megfigyelhető továbbá az ICM eredetű pluripotens sejtek *OCT4* expressziója is.



6. ábra. Az OCT4 expresszió egérembrióban való alakulása a termékenyüléstől a preimplantációs korú embrióig, illetve az abból izolált pluripotens in vitro kultúrákban (Pan et al. 2002)

10.14751/SZIE.2015.052

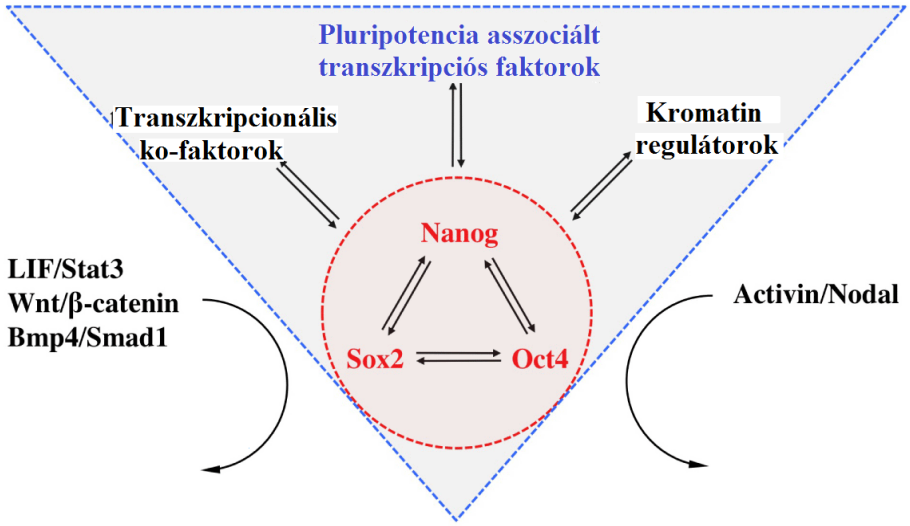
Az őssejtek toti-, illetve pluripotenciája részben az OCT4 transzkripciós faktor aktivitására vezethető vissza. A fejlődő embrióban az OCT4 faktor kifejeződése és aktivitása meggyőző párhuzamot mutat a sejtek fejlődési potenciáljával. Egy idő után az OCT4 jelenléte csak a pluripotens sejtekben mutatható ki, a gasztruláció után pedig aktivitása a germinális sejtekre korlátozódik, elnémul a szomatikus sejtekben.

Az OCT4 termelését az anyai szervezet kezdi meg, hogy ellássa vele a megtermékenyítetlen petesejteket, majd az embrió sejtjei veszik át a szintézist az embrionális genom aktivációt követően (egérben 2 sejtes állapot). A fehérjét kódoló *OCT4* gén null-mutánsaiban (knock-out mutáns) az *OCT4* hiányában az embrió nem tud a blasztociszta állapotnál tovább fejlődni, és az embrionális őssejtek elvesztik pluripotenciájukat. Az őssejtek differenciálódása az extraembrionális trofoblasztok irányára korlátozódik, ugyanakkor, az OCT4-termelő őssejtek hiányában a trofoblasztok osztódása is korlátozódik. Ez utóbbi folyamat megfordítható, ha az OCT4 által bekapcsolt egyik gén termékét, a fibroblaszt növekedési faktort (FGF4) a sejtek rendelkezésére bocsátjuk (Nichols et al. 1998).

A differenciálódást kiváltó szabályozó elemek és faktorok hatását általában bináris rendszernek tekintik (kikapcsol/bekapcsol). Ez az OCT4 esetében is igaz, viszont ehhez fehérjeszintjének pontos kontrollja szükséges. Az OCT4 hiánya, az őssejt-jelleg elvesztését okozza, viszont a normális pluripotenciát fenntartó koncentrációjánál két-háromszor magasabb szintek a sejtek differenciálódását váltják ki primitív endodermális és mezodermális irányba. (Kemény és Duda 2004).

A pluripotens őssejtekre jellemző az *OCT4, NANOG* és *SOX2* együttes jelenléte. Ez a három transzkripciós faktor együtt kötődik azon gének promotereihez, amelyek részt vesznek a pluripotencia vagy a korai elköteleződés szabályozásában, ezáltal biztosítják a pluripotencia fenntartását és gátolják a differenciálódást. Ilyen target elemek, a pluripotencia asszociált transzkripciós faktorok, a transzkripcionális ko-faktorok és a kromatin regulátor elemek, melyeket az *OCT4, NANOG, SOX2* triász meghatározott jelátviteli útvonalak segítségével aktivál illetve represszál (Chen et al. 2012a) **(7. ábra)**.

10.14751/SZIE.2015.052



7. ábra. OCT4, NANOG, SOX2 szabályozás (Chen et al., 2012a)

2.5.1.2 A NANOG transzkripciós faktor

Az egér *NANOG* gén 305 aminosavból álló fehérjét kódoló transzkripciós faktor. A homológia keresés megállapította, hogy a NANOG fehérje magába foglal egy homeobox domént. Aminosav azonosságot fedeztek fel más olyan homeoproteinekkel is, amelyek ES sejtekben expresszálnak, mint például az *OCT4* és az *EHOX* (Jackson et al. 2002). Mindazonáltal a kutatások kimutatták, hogy a NANOG is egy olyan homeodomén protein, amely pluripotens sejtekben expresszál (Wang et al. 2003).

Az expresszió vizsgálatára ß-geo kettős riporter/szelekciós marker-rendszert (neomicin-rezisztenciát és lacZ riporter gént kódoló fúziós gén) alkalmaztak ES sejtekben, a homológ rekombináció módszerét kiaknázva (Mountford et al. 1994). A kísérlet során kimutatható volt, hogy a *NANOG* expresszál a még nem differenciálódott ES sejtekben.

A gén transzkripcióját 12 felnőtt szövetben (például petefészekben) nem tudták még kimutatni Nothern-blot, vagy RT-PCR technikával sem. DNS microarray analízissel pedig megállapították, hogy a *NANOG* expresszál az ES sejtekben, de a neurális és hematopoetikus őssejtekben nem (Ramalho-Santos et al. 2002).

Egy kísérlet során kimutatták, hogy a *NANOG*-ot nem tartalmazó ICM nem tartja meg pluripotens képességét, hanem rövid időn belül differenciálódni kezd. Ezek a megfigyelések arra engednek következtetni, hogy a *NANOG* nélkülözhetetlen a pluripotencia fenntartásában (Mitsui et al. 2003).

Több eredmény is azt sugallja, hogy a *NANOG* valószínűleg más gének reguláláséval az embrió őssejtek önmegújító képességét befolyásolja.

10.14751/SZIE.2015.052

A NANOG független a LIF/GP130/STAT3 jelátviteli úttól (Mitsui et al. 2003), de mégis fenn tudja tartani az ES-sejtek pluripotenciáját. Gátolja a mezoderma irányú differenciációt, mivel fizikálisan kölcsönhatásba képes lépni a *SMAD1* génnel az 5'-TAAT[GT][GT]-3' vagy 5'-[CG][GA][CG]C[GC]ATTAN[GC]-3' konszenzus szekvencián keresztül. Más feltételezett mechanizmus szerint pedig a NANOG gátolja azon gének transzkripcióját, amelyek elindítják a differenciálódást (pl. *GATA4, GATA6*). Az ES sejtekben ezen gének expressziója extraembrionális endoderma differenciálódáshoz vezet (Fujikura et al. 2002). Azt is kimutatták, hogy a *GATA6* inaktiválása, a *GATA4* represszióját is kiváltja, viszont a fordítottja nem igaz. Sőt ellenkezőleg: a *GATA4* inaktivációja a *GATA6* expresszió növekedését idézi elő. Ezért azon a sejtek esetében, melyek nem expresszálnak *NANOG*-ot, a *GATA4* és *GATA6* expresszió hatására a differenciálódás megkezdődik.

2.5.1.3 A SOX2 transzkripciós faktor

A SOX2 fehérje, mint a SOX család többi tagja is, tartalmaz egy DNS kötő domént (HMG, High Mobility Group domén) az N-terminális, és egy transzaktivációs domént (TAD) a C-terminális végen. A HMG domént három alfa-hélix alkotja, amelyek részt vesznek a DNS megkötésében, valamint az OCT1 és OCT4 fehérje partnerekkel való együttműködésben (Reményi et al. 2003). Tanulmányok kimutatták, hogy a SOX2 HMG doménje szükséges és egymagában is elegendő a DNS megkötéséhez (Ambrosetti et al. 1997). A SOX2 TAD doménjéről pedig kimutatták, hogy pluripotens sejtekben részt vesz egyes gének repressziójában (Boer et al. 2007). Valamint kimutatták azt is, hogy a SOX2 fehérje C-terminális része, amely tartalmaz egy szerin-gazdag régiót és a C-terminális vég elengedhetetlen a transzaktivációhoz (Nowling et al. 2000).

Az emlős embriógenezis korai állapotában, a zigotikus *SOX2* expresszió anyai transzkripciós faktorok, valamint az *OCT4* hatására aktiválódik. A preimplantációs korú emlős embriókban, a *SOX2* expressziója az ICM-ben éri el a legmagasabb szintet, valamint az epiblasztban is expresszálodik (Avilion et al. 2003). Később az expressziója a neurális fejlődés elindítására irányul. A *SOX2* expressziója állandósul a felnőtt neurális őssejtekben, de *SOX2* expressziót észleltek különböző tumorokban vagy tumorokból izolált sejtekben is (Chen et al. 2008, Park et al. 2008a).

A SOX2 szerepe, hogy gátolja a mezodermális és elősegítse a neurális, ektoderma irányú differenciálódást (Thomson et al. 2011). A LIF jelátviteli útvonal, amely egér esetében a pluripotencia megtartásáért felelős, a JAK-STAT jelátviteli útvonalon keresztül aktiválja a *SOX2*−t, majd a későbbiekben a *KLF4*-et. Az *OCT4*-el és a *NANOG*-gal együtt a *SOX2* is

10.14751/SZIE.2015.052

pozitívan szabályozza a LIF útvonalban résztvevő pluripotencia fehérjéket (Niwa et al., 2009). Humán embrionális őssejtekben a SOX2 szerepe az egér őssejtekben betöltött funkciójával megegyező, ezenkívül még elősegíti a felnőtt szövetekben található őssejtek pluripotenciájának fenntartását. Főként az agy és nyelőcső szöveteiben mutattak ki magasabb SOX2 expressziót (Liu et al. 2013). A neurogenezisben a *SOX2* expresszálódik az idegcsőben található fejlődő sejtekben, amilyenek a CNS progenitorok. Azok a sejtek, melyek expresszálják a *SOX2*-t, képesek egyszerre magukkal azonos és neurális irányba elkötelezett sejtek létrehozására is.

Indukált pluripotens sejtek létrehozására felhasználhatóak a felnőtt neurális őssejtek is, amelyek nagyobb mértékben expresszálják a *SOX2* és *C-MYC* transzkripciós faktor géneket, mint az embrionális őssejtek. Ezért csak két exogén faktor, amelyek közül az egyik az OCT4, hozzáadása elegendő lehet a neurális őssejtek visszaprogramozásához (Kim et al. 2008).

2.5.1.4 A C-MYC transzkripciós faktor

A humán *MYC* gén a 8. humán kromoszómán lokalizálódik és három exont tartalmaz. Transzkripciója a három promoter közül az egyiken inicializálódhat. Alternatív startkodonnal rendelkezik. A második exonon található AUG start helyről induló transzláció egy 439 aminosavas és 64kDa-os fehérjét eredményez (Myc proto-oncogén protein, azonban számtalan esetben C-MYC fehérje néven szerepel, holott a humán fehérje MYC névre hallgat). Az alternatív transzlációs iniciációs start helynek köszönhetően egyszerre hosszabb és rövidebb fehérjeforma is létrejön, ezeket a p67 MYC és a MYCS megnevezéssel különböztetik meg egymástól. A MYC szekvencia tartalmaz több konzervált N-terminális domént, amelyek a MYC box nevet kapták (Gardner et al. 2002).

A *MYC* expressziója a normál sejtekben külső szignálok által szigorúan szabályozott, úgy, mint a növekedési faktorok, az extracelluláris mátrix elemei és a sejtciklus. A normál embrionális fejlődéshez elengedhetetlen a MYC és a MYC transzkripciós faktor család többi tagjának szabályozott expressziója (Gardner et al. 2002).

A *MYC* proto-onkogén az emlősöknél játszik szerepet a sejt növekedésben és proliferációban, az apoptózisban, a differenciálódásban. Kimutatták, hogy a MYC mutációk jelentős szerepet játszanak a tumorok kialakulásában is (Jemal et al. 2008). Felfedezték azt is, hogy a MAX elnevezésű fehérje a MYC dimerizációs partnere és alapvető a két molekula dimerjének szerepe az apoptózisban és az átírásban (Gleason et al. 1974). A MYC/MAX heterodimer az E-box-hoz kapcsolódik, a konszenzus 5’CACGTG szekvenciákhoz és az átírást szabályozza (Walsh et al. 1975). A MYC funkciójának a kutatása a mai napig folyik, pontos funkciói és kifejeződésének mechanizmusait még nem ismerjük pontosan.

10.14751/SZIE.2015.052

2.5.1.5 A KLF4 transzkripciós faktor

Az egér *KLF4* gén 483 aminosavból álló polipeptidet kódol és a KLF család többi tagjához hasonlóan, a C-terminális végén három Kruppel típusú cink-ujjas motívumot tartalmaz. Az N- terminális régiót és a 3 cink-ujjas motívumot 20 aminosavból álló peptid választja el, amelynek elengedhetetlen szerepe van a fehérje nukleáris lokalizációjában (Shields et al. 1997).

A *KLF4* sejten belüli elhelyezkedése két nukleáris lokalizációs szignáltól függ. A *KLF4* expressziója a fejlődés szerint szabályozott. A humán és egér embrionális fejlődés során a *KLF4* expressziója már petesejtben kimutatható, és ez végig fent is marad egészen a hólyagcsíra stádiumig. Az implantáció után a differenciálódás következtében a *KLF4* szintje drámaian lecsökken, majd újra magasabb szintet ér el az epitheliális szövetek, mint a bőr-, tüdő- és a bélszövet sejtjeiben. A béltraktusban, a *KLF4* főleg a már teljesen differenciálódott, posztmitotikus epitheliális sejtekben van jelen, melyek a vékonybél falán lévő villusokhoz és a vastagbél felső szakaszához kötődnek. A *KLF4* expressziója több más szerv esetében is kimutatható volt úgy, mint a tüdő, here, bőr, csecsemőmirigy és az ér endotheliális sejtjei (Ghaleb et al. 2007).

A *KLF4* a GC-ben gazdag DNS szekvencia elemekhez képes kötődni. Létezik egy olyan konszenzus DNS kötő szekvencia, amely számos gén promoterében megtalálható, magába foglalva egy „CACCC” elemet és egy ún. Alapvető Transzkripciós Elemet (BTE, basic transcription element), amely a gén alapszinten történő átíródásáért felelős. A KLF4 a BTE szekvenciához való kötődés révén képes gátolni a P-450IA1 citokróm egységet (CYP1A1), amely az eukarióta sejtekben mikroszómák és mitokondriumok membránjába ágyazottan fordul elő és az oxidációs funkciót tölti be. A *KLF4* magas expressziója a tenyésztett sejtekben a DNS szintézis gátlását eredményezi. A *KLF4* elengedhetetlen a p21 expressziójának beindításában, amely az egyik legkritikusabb gén a sejtciklus szabályozásában. A KLF4 képes a p21 specifikus cis-DNS eleméhez kötődni, amely a p21 proximális promoterén található és így aktiválni tudja annak expresszióját. A KLF4 transzkripciós profiljának cDNS microarray vizsgálata kimutatta, hogy a KLF4 gátolja a sejt ciklust, számos, a sejt ciklus szabályozásában résztvevő gén expressziójának koordinált szabályozásával (Ghaleb et al. 2007).

2.5.2 Pluripotencia-asszociált faktorok

2.5.2.1 Az FGF4 transzkripciós faktor

Az *FGF4* gén által kódolt fehérje a Fibroblaszt Növekedési Faktor (Fibroblast Growth Factor (FGF)) család tagja. Az FGF család tagjai széleskörű mitogenetikus és sejttúlélési

10.14751/SZIE.2015.052

aktivitással rendelkeznek, valamint részt vesznek az embrionális fejlődéssel, sejtnövekedéssel, morfogenezissel, szövetregenerációval, tumornövekedéssel és terjedéssel összefüggő különböző biológiai folyamatokban. Ezt a gént onkogén átalakító képessége révén fedezték fel. Az egér *FGF4* és az *FGF3*, egy másik onkogén egymáshoz közel, a 11. kromoszómán lokalizálódnak. Fontos szerepet játszanak az embrionális fejlődés szabályozásában a sejt proliferáció és differenciálódás során. Elengedhetetlenek a normál végtagok és a szívbillentyű kialakulása során is (Ornitz et al. 2001). Ezeknek a géneknek a ko-amplifikációja található meg számos humán tumorban.

2.5.2.2 Az UTF1 transzkripciós faktor

Az *UTF1* (Undifferentiated Embryonic Cell Transcription Factor) egy olyan transzkripciós koaktivátor, amely főként a pluripotens sejtekben expresszál (Okuda et al. 1998). Az *FGF4* hez hasonló pozitív szabályozás jellemzi. A transzkripciós faktort az *UTF1* gén kódolja, amely a 10. kromoszómán lokalizálódik (Fukushima et al. 1998, Niwa et al. 2001, Richards et al. 2004). Az UTF1 kiütésével az egér embrionális őssejtekben és embrionális karcinóma sejtekben késleltethető vagy blokkolható a sejtdifferenciálódás (Van den Boom et al. 2007). Az embrionális őssejtekben az *UTF1*, az *OCT4* és a *SOX2* szinergisztikus együttműködés által szabályozott (Nishimoto et al. 1999, 2005).

2.5.2.3 Az REX1 transzkripciós faktor

A REX1 (Reduce Expression-1) egy ismert pluripotencia marker. A *REX1* szabályozása szintén kritikus a pluripotens állapot megtartásában (Shi et al. 2006). Ahogy a sejtek differenciálódni kezdenek, a REX1 expressziója hirtelen lecsökken (Wang et al. 2006). Az egér REX1 fehérjét a *REX1* (vagy más néven *Zfp42*) gén kódolja (Henderson et al. 2002). A REX1 fehérjét 310 aminosav alkotja, ahol egymáshoz igen közel 4 cink-ujj motívum található (Hosler et al. 1989). A *REX1* gént Hosler és munkatársai fedezték fel 1989-ben, az F9 egér teratokarcinómák vizsgálatakor. Ezekben a teratokarcinóma őssejtekben (vagy más néven EC sejtek), amelyek nagyon hasonlóak az ICM-ben található embrionális őssejtekhez, a *REX1* gén magas expresszióját tapasztalták (Hosler et al. 1989). Hosler és munkatársai úgy találták, hogy ezek a teratokarcinóma őssejtek retinsav jelenlétében differenciálódni kezdenek nem-tumorigenikus irányba és a korai egér embrió extraembrionális endodermájára hasonlítanak. REX1-nek, azaz Csökkent expresszió-1-nek (Reduce Expression-1) nevezték el ezt a gént, mivel azt detektálták, hogy retinsav hozzáadásakor a *REX1* mRNS szintje drámaian lecsökken.

10.14751/SZIE.2015.052

2.5.2.4 Az FBX15 transzkripciós faktor

Az FBX15 vagy más néven FBXO15 egy a differenciálatlan embrionális őssejtekben, az OCT4, C-MYC, KLF4 és SOX2 fehérjékkel párhuzamosan expresszálódó fehérje. Az FBX15-öt kódoló gén tartalmaz egy oktamer-kötő és egy SOX2-kötő motívumot, amelyhez az OCT4 és a SOX2 transzkripciós faktorok hozzákapcsolódva képesek a transzkripció szabályozására (a transzkripciós egységhez kötődve), így a transzkripció elindítására (transzaktiváció).

Habár az FBX15 hiánya normális embrionális fejlődést eredményez, gyakran használják őssejt pluripotencia és az *OCT4* aktiváció vizsgálatára, mivel az *OCT4* deaktiváció az FBX15 expresszió teljes hiányát idézi elő. Szövetspecifikus expresszióját tapasztalták, egér esetében, herékben és petefészekben. Embrionális expressziója 2-sejtes állapotban kezdődik majd 4- és 8-sejtes, valamint blasztociszta állapotban is kimutatható az egér embriókban (Tokuzawa et al. 2003).

10.14751/SZIE.2015.052

3 ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 Állatkísérleti engedélyek

A kísérletek a XXVIII/1998 törvény - Az állatok védelméről és kíméletéről §25 és a 243/1998 (XII. 31) és 36/1999 (IV. 2) Kormányrendelet előírásainak figyelembe vételével zajlottak. Az állatkísérleteket a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont (767/002/2003) és a BioTalentum Tudásfejlesztő Kft (22.1/1970/003/2008) Állatkísérleti engedélyeiben foglaltaknak megfelelően végeztük.

3.2 Alkalmazott nyúlfajta és tartása

A Hycole hibrid fajtájú anyanyulak mesterséges szellőztetéssel ellátott külön teremben, háromszintes fém rácsketrecekben voltak elhelyezve **(8. ábra)**. A fényprogram 12 óra világos (reggel 7-től este 7 óráig), 12 óra sötét periódusra volt beállítva a kísérlet ideje alatt. Az állatszobában a hőmérséklet 17-20˚C volt. Vizet szopókás önitatóból, takarmányként pedig a kereskedelmi forgalomban kapható hízónyúl tápot önetetőből kapták az állatok, *ad libitum*.

8. ábra. Hycole hibrid anyanyúl (fotó: Polgár Zsuzsanna)

3.3 Donor állatok szuperovulációja

Az ivarérett, 19-22 hetes Hycole hybrid nőstény nyulakat intramuszkulárisan beadott 120 IU PMSG (Folligon, International B.V., Boxmeer, Holland), majd 72 órával később fülvénába injektált 180 IU hCG (Human Chorion Gonadotropin) (Choragon, Ferring GmbH, Kiel, Germany) alkalmazásával szuperovuláltattuk.

10.14751/SZIE.2015.052

3.4 In vivo embrió előállítás

Az *in vivo* embriókat a 3.3 fejezetben leírt szuperovuláltatott anyanyulak természetes termékenyítéséből nyertük. A hCG beadása után az anyát kontroll hím állattal pároztattuk.

3.5 Petesejtek gyűjtése

A petesejteket 16 órával a hCG beadása után, a donor állatok euthanáziáját követően M2 medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) felhasználásával mostuk ki a petevezetőből. A kumulusz réteg eltávolításához a petesejteket 0.1% hyaluronidázt tartalmazó M2 médiummal kezeltük. Ezt követően M2 médiumban és Diethylpyrocarbonate (DEPC) kezelt Milli-Q (MQ) vízben mostuk át őket, majd 10 petesejtből álló poolt helyeztünk a 200µl-es PCR csövekben található DEPC-MQ cseppekbe, amelyeket további felhasználásig -80°C- on tároltunk.

3.6 Blasztociszta stádiumú embriók gyűjtése

Az *in vivo* expandálódott blasztocisztákat 86 órával a hCG beadása után, a donor állatok euthanáziáját követően 20% FCS tartalmú PBS-sel mostuk ki a méhből.

A blasztociszta stádiumú embriókat a zona pellucida eltávolítása érdekében 5-8 percig 37°C-on pronáz enzimmel (Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA) kezeltük. A zona eltávolítása után M2 médiumban és DEPC kezelt MQ vízben mostuk át őket, majd 10 embrióból álló poolt helyeztünk a 200µl-es PCR csövekben található DEPC-MQ cseppekbe, amelyeket rögtön egy -80°C-os tároló edénybe helyeztünk és további felhasználásig -80°C-on tároltuk.

3.7 Szöveti minta gyűjtése

A donor állatok (felnőtt nőstény Hycole hibrid nyúl) eutanáziát követően nyúl szöveti mintákat (máj, szív, vese, agy, lép, gyomor, petefészek, tüdő) izoláltunk, és a mintákat szikével kisebb, körülbelül 25 miligrammos darabokra vágtuk. Az így kapott szövetdarabokat szárazjégen fagyasztottuk és felhasználásig -80°C-on tároltuk.

3.8 Oligonukleotid primerek tervezése

A kísérletekben alkalmazott primereket *Primer3* programmal (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi) terveztük, a szekvenciák a GeneBank

10.14751/SZIE.2015.052

adatbázisából, illetve saját vizsgálataink szekvenálási eredményeiből származtak (http://www.ncbi.nih.gov/nucleotid). Az *OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC* és *NANOG* teljes kódoló régiójának izolálásához a primereket a transzlációs start és stop helyekre terveztük. A kísérletek során használt primereket a **4. táblázat** mutatja be.

4. táblázat. Felhasznált oligonukleotid primerek

Név	Leírás	Génbanki azonosító	Forward primer	Reverse primer	PCR termék (bp)
Primerek a teljes kódoló régió izolálásához					
OCT4/ POU5F1	POU class 5 homeobox 1	NM_001099957.1	5'CATGGCGGGACACCTGGCC	5'CCGTTGAGTCTCAGGCTTCT	1083
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2	XM_008266557.1	5'TAATTAGAATTCATGTACA ACATGATGGAGACG	5'TAATTAGGTACCTCACATGT GTGAGAGGGGCAGTGTGC	950
KLF4	Kruppel-like factor 4 (gut)	XM_008255400.1	5'TTCTGGGCCCCCACATTA	5'TTCTGGCAGTGTGGGTCATA	1490
C-MYC	V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	XM_008255902.1	5'ATGCCCCTCAACGTCAGCTT	5'CTTATGCACAAGAGTTCCGTAGCT	1360
NANOG	Nanog homeobox	XM_002712762	5'CATGAGTGTGGATCCAGCTTGT	5'TCACACATTTTCAGGCTGCATGTTC	920
Primerek az RT-PCR analízishez					
OCT4/ POU5F1	POU class 5 homeobox 1	KJ_708484	5'AAGCGGGGACCCTCGTGCAG	5'TCTGGCGCCGGTTACA	186
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2	KJ_939365	5'AGCCCCAAGATGCACAACTC	5'CTCCGGGAAGCGTGTACTTA	202
KLF4	Kruppel-like factor 4 (gut)	KM_267140	5'AGCGGGAAGGGAGAAGACAC	5'AGGACGAGGAAGAGGCAGAC	320
C-MYC	V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	KJ_708483	5'TCGGACTCTCTGCTCTCCTC	5'CTTGTCGTTCTCCTCGGTGT	402
NANOG	Nanog homeobox	KJ_708482	5'CATGGCGGGACACCTGGCCT	5'CGGTGTCTGTAAGAGGCACCT	263
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_001082253.1	5'CAAGTTCCACGGCACGGTCA	5'CTCGGCACCAGCATCACCC	118
Primerek a pluripotencia igazolásához					
REX1	ZFP42 zinc-finger protein	NM_009556.3	5'CAGGTTCTGGAAGCGAGTTC	5'GACAAGCATGTGCTTCCTCA	255
FGF4	Fibroblast growth factor	NM_025995.2	5'TACCGACGAGTGTAAATTCAAAGA	5'GTCTAGGAAGGAAGTGGGTTACCT	164
FBX15	F-box protein 15	NM_010202.5	5'CTATGATTGGCTGCGACAGA	5'GTAGTGTCGGGAGGCAATGT	202
UTF1	Undifferentiated Embryonic Cell Transcription Factor	NM_009482.2	5'CGCATTACCAGCTCTCCTCCT	5'CGAAGGAACCTCGTAGATGC	181

3.9 Gének izolálása, szekvencia meghatározása

A gének izolálásához Reverz-Transzkripciós PCR-t (RT-PCR) alkalmaztunk. A reakció során felnőtt szövet, embrionális őssejt és indukált pluripotens sejt esetében 30 ng totál RNS-t, a petesejt- és embrióminták esetében pedig 0.5 petesejt/embrió ekvivalens mRNS-t használtunk. A totál RNS-t RNS izoláló kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével a

10.14751/SZIE.2015.052

gyártó előírásának megfelelően izoláltuk. Az RNS-t Superscript Vilo kit segítségével írtuk át cDNS-é, a gyártó protokolljának megfelelően. Az amplifikációs reakció 20 µl térfogatban, Go Taq Green Master Mix (Promega, Wisconsin, United States) felhasználásával történt, a gyártó instrukciói alapján. Referencia génként a nyúl *GAPDH* szekvenciát használtuk. A használt primereket a **4. táblázatban** tüntettük fel. A PCR termékeket agaróz gélen választottuk el és detektáltuk és gélből tisztítottuk. A gének azonosítását követően, a további vizsgálatok érdekében, azokat pcDNA3.1 plazmid vektorba (Invitrogen) klónoztuk.

Az embrionális és szöveti expresszió elemzéséhez az Image J software-t (Wayne Rasband, NIH, USA) használtuk, amelyhez a relatív expresszót a *GAPDH* expressziós szinthez normalizáltuk.

3.10 Szekvencia analízis és komparatív genomika

A szekvenciák leolvasási minőségének ellenőrzése a CLC Main Workbench 5 szoftver segítségével történt (CLC Bio, Aarhus, Denmark). Az izolált szekvenciák leolvasási keretének vizsgálatát és így a prediktált fehérje meghatározását az *OCT4, SOX2, C-MYC, KLF4* és *NANOG* gének esetében az ApE szoftver (M. Wayne Davis) segítségével végeztük el. Az így meghatározott fehérjék szekvenciáit az NCBI adatbázisban számítógépes analízissel (Gnomon, Souvorov et al. 2010) meghatározott szekvenciákhoz illesztettük az EMBOSS Needle software (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) segítségével (SOX2: XP_002716497.1, KLF4: XP_008253622.1, C-MYC: XP_002710590.1, NANOG: XP_002712808.1.) Az OCT4 esetében az izolált szekvenciánkat a már leírt OCT4 szekvenciával is összehasonlítottuk (Shi et al. 2008, NP_001093427.1).

3.11 Sleeping Beauty plazmid konstrukciók létrehozása

A Sleeping Beauty (SB) transzpozon alapú vektort Ivics és munkatársai (Ivics et al. 1997) bocsájtották a rendelkezésünkre kísérleteink elvégzéséhez. Az SB vektor egy EF1α promotert által szabályozott IRES/eGFP kazettát tartalmazott a pT2PH traszpozon vektorban (Ivics et al. 1997). Kísérleteink során ebbe az alapkonstrukcióba építettük be az újraprogramozáshoz használt szekvenciákat és hoztuk létre a policisztronos kazettát tartalmazó újraprogramozó vektort.

10.14751/SZIE.2015.052

3.11.1 Egér pluripotencia géneket tartalmazó újraprogramozó vektor előállítása

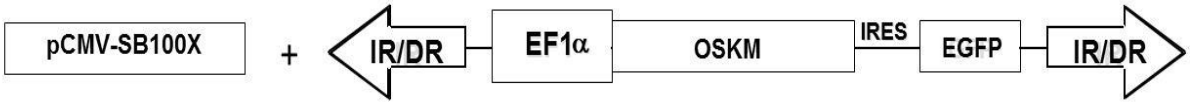
Az egér OSKM kazettát (mOSKM) a FUW-OSKM konstrukcióból (Carey et al. 2009) (Addgene plasmid 20328) EcoRI-el hasítottuk ki (Muenthaisong et al. 2012), majd ezt az egér OSKM kazettát jutattuk be a Sleeping Beauty transzpozon alapú konstrukcióba az EcoR1 hasítási helyek mentén.

3.11.2 Humán pluripotencia géneket tartalmazó újraprogramozó vektor előállítása

A humán OKSM kazettát pedig a pRRL.PPT.SF.hOKSMco.idTomato.preFRT konstrukcióból vágtuk ki és illesztettük az SB alapkonstrukcióba egy új, restrikciós emésztés helyett PCR technikát alkalmazó módszer, a Gibson Assembly reakció segítségével, melynek során a 3.11.4 pontban ismertetett protokoll alapján jártunk el (Gibson *et al.* 2009).

3.11.3 Nyúl pluripotencia géneket tartalmazó újraprogramozó vektor előállítása

Végül a saját tervezésű nyúl OSKM kazettát, amelyet az általunk izolált génekből állítottunk össze, szintén Gibson Assembly reakció segítségével juttattuk az SB alap konstrukcióba **(9. ábra)**.



9. ábra. SB (Sleeping Beauty) transzpozon alapú konstrukció és a transzpozáz konstrukció (pCMV-SB100x). jelölések: IR/DR (inverted repeats containing direct repeats, direkt ismétlődéseket tartalmazó fordítottan ismétlődő szekvenciák), EF1α promoter (elongation factor-1 alpha promoter, elongációs faktor-1 alfa promoter), OSKM (*OCT4, SOX2, KLF4, MYC* pluripotencia géneket tartalmazó kazetta), IRES (internal ribosome entry site, belső riboszóma bekapcsolódási hely), EGFP (enhanced green fluorescent protein, zöld fluorescens fehérje)

10.14751/SZIE.2015.052

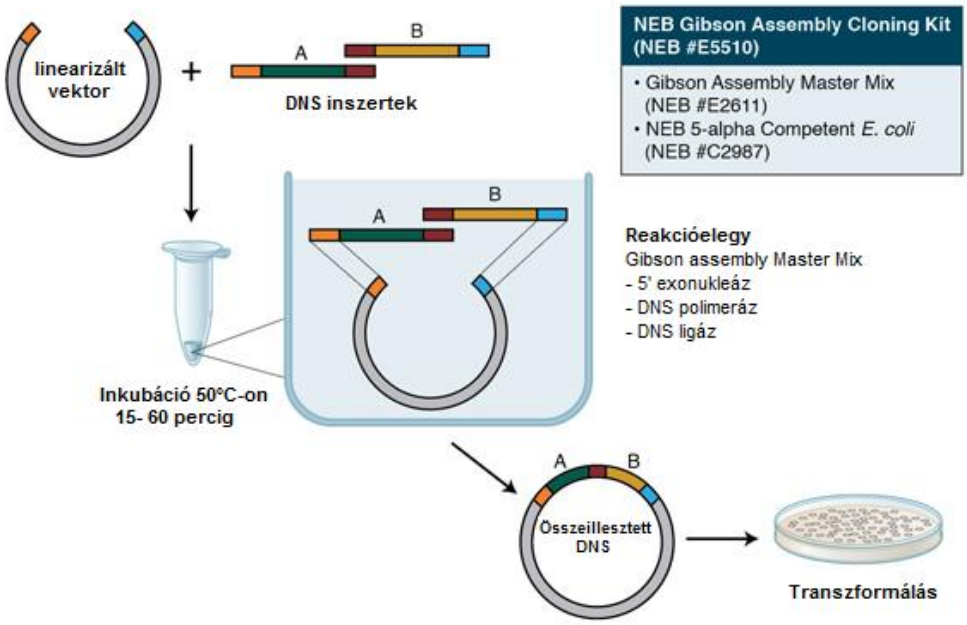
3.11.4 Gibson Assembly klónozás

A Gibson Assembly technika esetében egy izotermális enzim reakció során csatlakoztatjuk egymáshoz a megfelelő fragmenteket. Ez a módszer több (> 10) komplementer végű DNS fragment kombinálására ad lehetőséget, miután a szükséges fragmenteket egy 3 enzimből álló „koktél" (exonukleáz, DNS polimeráz és DNS ligáz) keverékével vegyítjük. Az exonukleáz feladata, hogy az 5' végtől kiindulva egy egyszálú DNS régiót hozzon létre, melynek mentén a DNS polimeráz egyesíteni képes a nukleotidokat, amelyeket végül a DNS ligáz fog kovalens kötéssel egymáshoz kapcsolni.

A humán újraprogramozó faktorokat tartalmazó Sleeping Beauty konstrukció létrehozásakor a dTomato konstrukcióból (amelynek felépítése részletesen a 3.11.2. fejezetben kerül ismertetésre) kihasított humán újraprogramozó kazettát és az egér génektől megfosztott, linearizált Sleeping Beauty vektort egyesítettük. A nyúl újraprogramozó faktorokat tartalmazó Sleeping Beauty konstrukció esetében pedig ugyanezzel a technikával elsőként az újraprogramozó kazettát hoztuk létre az általunk izolált nyúl pluripotencia fragmentekből, majd ezt egyesítettük az egér génektől megfosztott, linearizált Sleeping Beauty vektorral.

Az inkubálás minden esetben 10 µl-es reakcióban történt, melynek során 2x Gibson Assembly Master Mix (New England Biolabs, UK) jelenlétében inkubáltuk a 0.05 pmol mennyiségű DNS fragmenteket, 50°C-on, 60 percig. Ezt követően a reakció elegyből 2ul-nyi mennyiséget NEB 5-alpha kompetens sejtbe (New England Biolabs, UK) transzformáltunk és a megfelelő klónokat restrikciós endonukleáz hasítás segítségével választottuk ki (Gibson *et al.* 2009) **(10. ábra).**

10.14751/SZIE.2015.052



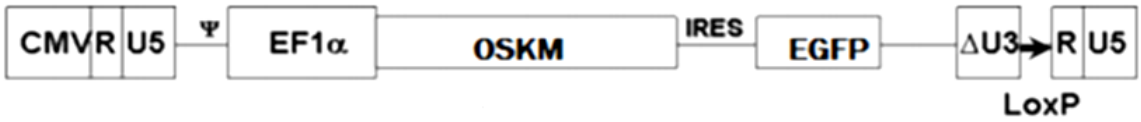
10. ábra. Gibson Assembly technika sematikus ábrázolása

3.12 Lentivírus plazmid konstrukciók

3.12.1 Egér újraprogramozó kazettát tartalmazó lentivírus vektor létrehozása

Az egér újraprogramozó faktorok lentivirális bevitelét a pF-EF1-α/OSKM/IRES/EGFP-W konstrukció segítségével oldottuk meg (Varga et al. 2014). A konstrukció tartalmazza a 4 egér újraprogramozó faktort (*OCT4, SOX2, KLF4* és *C-MYC*), amelyek 2A peptid szekvenciákkal vannak elszeparálva egymástól, egy IRES (Internal Ribosome Entry Site) szekvenciát, és az EF1-α (Elongation factor 1-alpha) promotert, valamint a zöld fluoreszcens EGFP riporter gént. A plazmid tartalmaz LoxP szekvenciát is. Ez a LoxP szekvencia az 5'LTR régióba másolódik, körülvéve így a transzgént két LoxP hellyel. A transzgén kivágását a Cre-rekombináz sejtekbe való transzfekciójával lehet elérni, mivel a plazmid magába foglalja a kivágáshoz szükséges Lox-P helyeket, amelyeket a Cre-rekombináz enzim felismer, így a konstrukció az újraprogramozást követően eltávolítható a genomból **(11. ábra)**.

10.14751/SZIE.2015.052



11. ábra. A egér pluripotencia génekkel való újraprogramozáshoz használt lentivírus konstrukció. jelölések: EF1α promoter (elongation factor-1 alpha promoter, elongációs faktor-1 alfa promoter), OSKM (*OCT4, SOX2, KLF4, MYC* pluripotencia géneket tartalmazó kazetta), IRES (internal ribosome entry site, belső riboszóma bekapcsolódási hely), EGFP (enhanced green fluorescent protein, zöld fluorescens fehérje)

3.12.2 Humán újraprogramozó kazettát tartalmazó lentivírus konstrukció létrehozása

A humán újraprogramozó faktorok lentivirális bevitelét a pRRL.PPT.SF.hOKSMco.idTomato.preFRT vektorral oldottuk meg (Voelkel et al. 2010; Warlich et al. 2011). A konstrukció hordoz egy SSFV retrovirális promotert és a 4 humán újraprogramozó faktort (*OCT4, SOX2, KLF4* és *C-MYC*), amelyek 2A peptid szekvenciákkal vannak elszeparálva egymástól. A konstrukció ezenkívül magába foglalja még a vörösen fluoreszkáló dTomato proteint. A promoter, egy SSFV retrovírus promoter, amely 7-11 nap után teljesen elcsendesül. A konstrukció FRT szekvenciákkal is ki van egészítve, így Flp rekombináz enzim segítségével később eltávolítható a genomból **(12. ábra)**.

12. ábra. A humán pluripotencia génekkel való újraprogramozáshoz használt lentivírus konstrukció. jelölések: IR/DR (inverted repeats containing direct repeats, direkt ismétlődéseket tartalmazó fordítottan ismétlődő szekvenciák), SSFV promoter (spleen focus-forming vírus promoter), hOSKM (humán *OCT4, KLF4, SOX2, MYC* pluripotencia géneket tartalmazó kazetta), IRES (internal ribosome entry site, belső riboszóma bekapcsolódási hely), dTomato (dTomato vörös fluorescens fehérje)

3.13 Sejtek tenyésztése

3.13.1 Máj sejtek tenyésztése

A nyulak eutanáziáját követően a májat kimetszettük, és HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) oldatban (összetétel: **Mellékletek M4** fejezet) mostuk, majd apró darabokra vágtuk és 1mg/ml kollagenáz, 1.4 mg/ml DNáz, valamint 0.2 % tripszin enzimek keverékével emésztettük. 30 perc elteltével az enzimeket magzati borjú savó (fetal bovine serum, FBS) hozzáadásával semlegesítettük, majd óvatos pipettázással a szövetet kisebb aggregátumokká és

10.14751/SZIE.2015.052

egyedi sejtekké szedtük szét, végül májsejt tenyésztő médiumban (összetétel: **Mellékletek M4** fejezet) 37 °C-on, 5% CO_2 mellett tenyésztettük. (Honda et al. 2010).

3.13.2 Nyúl fibroblaszt sejtek és HEK293T sejtek tenyésztése

A nyúl fibroblaszt és HEK293T sejtek tenyésztése 75 cm^2-es flaskákban, 37°C-on és 5% CO_2 koncentráció mellett történt. A fibroblaszt sejteket REF (Rabbit Embryonic Fibroblast) médiumban, a HEK293T sejteket pedig a HEK293T médiumban (összetétel: **Mellékletek M4** fejezet) tartottuk. Passzáláskor a médium eltávolítását követően a sejteket PBS-el mostuk és tripszin-EDTA oldat segítségével választottuk fel őket a tenyésztőedény felületéről.

Az emésztést savó-tartalmú médiummal állítottuk le, a sejtszuszpenziót centrifugacsőbe töltöttük, majd lecentrifugáltuk (1000 rpm, 3 min, 4°C). A felülúszó eltávolítása után a sejteket REF/HEK293T médiumban szuszpendáltuk fel, végül új 75cm^2 flaskákba osztottuk szét.

3.13.3 Nyúl ES és iPS sejtek tenyésztése

Kísérleteinkhez kontrollként nyúl embrionális őssejteket használtunk, melyeket Prof. Arata Honda (RIKEN Laboratory, Japán) bocsájtott a rendelkezésünkre (Honda et al. 2010). A sejtvonalakat az azokat előállító laboratórium által publikált paraméterek szerint tenyésztettük (Honda et al. 2010), a tenyésztés során alkalmazott médium összetételét a **Mellékletek M4** fejezetében részleteztük.

3.13.4 Nyúl iPS sejtek létrehozása és tenyésztése

3.13.4.1 Lipofekció

A transzfekciót megelőző napon a fibroblaszt sejteket 24 lyukú sejttenyésztő edénybe szélesztettük (0,5-2x 10^5 sejt/lyuk), 0,5ml/lyuk antibiotikum-mentes tenyésztő médiumban.

Két órával a transzfekciót megelőzően a sejtek tenyésztő médiumát szérum-mentes médiumra cseréltük. A transzfekcióhoz a DNS-t szérum-mentes médiumban hígítottuk (1µg/50µl médium). A transzpozáz-vektor/transzpozon-vektor aránya 1/10, azaz ebben az esetben 4µg SB-OSKM és 0.4µg SB100x volt. A Lipofectamint szintén szérum-mentes médiumban hígítottuk ki. A használt DNS (µg) és Lipofectamin (µl) aránya 1:1 volt. A kihígított DNS-t illetve Lipofectamint 5-5 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd a két cső tartalmát óvatosan összekevertük, és ugyancsak szobahőmérsékleten további 20 percig inkubáltuk az elegyet. Az inkubáció után a transzfekciós mixet a sejtekhez adtuk (100µl

10.14751/SZIE.2015.052

komplex/lyuk), majd 6 órán át inkubáltuk őket 38°C-on, CO_2 inkubátorban. Az inkubáció után a transzfekciós mixet tartalmazó szérum-mentes médiumot lecseréltük és a sejteket további 48 órán át tenyésztettük normál tenyésztő médiumban. A transzfekciót követő második napon a sejteket 6 lyukú tenyésztő edénybe passzáltuk át, Mitomicin-C kezelt egér fibroblaszt rétegre, antibiotikumot tartalmazó, a fent már ismertetett nyúl ES/iPS tenyésztő médiumban.

3.13.4.2 Lentivírus transzdukció

A lentivírus-preparátum előállításához $4x10^6$ HEK293T sejtet 40µg expressziós plazmiddal, 16µg „envelope" VSV-G plazmiddal (Addgene, Cambridge, USA; plazmid szám: 12259), 8µg „packaging" gag-pol plazmiddal (Addgene, Cambridge, USA; plazmid szám: 12251; Dull et al. 1998) és 8µg „packaging" Rev plazmiddal (Addgene, Cambridge, USA; plazmid szám: 12253; Dull et al. 1998) ko-transzfektáltunk, a kálcium-foszfátos transzfekciós eljárás alkalmazásával (Kingston et al. 2001). Két és három nappal a transzfekciót követően a vírust tartalmazó felülúszót összegyűjtöttük, 0,22µm-es membránon átszűrtük, és a kisebb adagokra szétosztott vírus-preparátumokat használatig -80°C-on tároltuk.

A lentivírus transzdukcióhoz a nyúl sejteket 24 lyukú tenyésztőedénybe ültettük ki, $3x10^4$sejt/lyuk denzitásban, és egy éjszakán át a saját tenyésztő médiumukban (összetétel: **Mellékletek M4** fejezet) tartottuk őket, 37°C-on, 5% CO_2 mellett (Honda *et al.* 2010).

Másnap a sejtek tápoldatához polybrane-t adtunk, 8 µg/ml végkoncentrációban, majd hozzáadtuk a vírust is, különböző vírus/sejt arányok alkalmazásával; 0.5, 1, 2 és 4.5 MOI (multiplicity of infection, vírus/sejt arány) értékeket beállítva. A tenyésztőedényt 30 percig 1000g-vel centrifugáltuk 32°C-on, majd egy éjszakán át 38°C-on inkubáltuk. Másnap lecseréltük a médiumot, s a negyedik nap a transzdukált sejteket $6x10^3$ sejt/cm^2 sűrűségű Mitomicin-C kezelt egér embrionális fibroblaszt (MEF, Mouse Embryonic Fibroblast) sejtek rétegére szélesztettük ki, nyúl iPS médiumot használva (összetétel: **Mellékletek M4** fejezet).

A megjelenő klónokat pipettahegy vagy üvegkapilláris segítségével felvettük, tripszin enzim használatával és pipettázással kisebb sejtcsomókká szedtük szét és új Mitomicin-C kezelt tápláló sejtrétegre helyeztük őket. A felszaporítást követően a sejteket 90% FCS és 10% DMSO keverékében fagyasztottuk le, egy éjszakán át -80°C- on tartottuk, majd a tartós tárolás céljából folyékony nitrogénbe helyeztük át őket.

10.14751/SZIE.2015.052

3.14 Alkalikus foszfatáz aktivitás detektálása

Az alkalikus foszfatáz aktivitás detektálásához kétféle protokollt használtunk: a fixált nyúl iPS sejteket Alkalikus foszfatáz kit alkalmazásával (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA, az ehhez elkészített oldatok összetétele a **Mellékletek M4** fejezetében található), míg az élő sejteket az AP live stain kit (Life Technologies) segítségével festettük, amely az alkalikus foszfatáz enzim aktivitása esetén zöld fluorescens jelet ad. A festések során a gyártók protokollja szerint jártunk el. Az alkalikus foszfatáz aktivitást OLYMPUS IX71 fluoreszcens mikroszkóp használatával tanulmányoztuk.

3.15 Immunofluoreszcens analízis

Nyúl fehérjére specifikus ellenanyagok hiányában elsőként az általunk használni kívánt humán ellenanyagok specifikusságát ellenőriztük. Több ellenanyagot is teszteltünk markerenként. Ehhez a humán és az általunk izolált nyúl gének fehérje szekvenciáit, valamint az ellenanyagok epitóp régióinak hasonlóságát vizsgáltuk meg, annak érdekében, hogy megállapítsuk, a használt anti-humán ellenanyagok felismerhetik-e a nyúl fehérjét **(Mellékletek 1-4.ábra)**. A szekvencia analízishez a ClustalW szoftvert (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) használtuk fel.

Immunocitokémiához a sejteket fedőlemezeken tenyésztettük, majd a médium eltávolítását követően PBS-el mostuk őket. Ezután 4% paraformaldehiddel (PFA, Sigma) történő 10 perces fixálás következett szobahőmérsékleten; majd PBS oldattal (**Mellékletek M4** fejezet) mostuk és 0,2% TRITON-X-et (Sigma) tartalmazó PBS-ben permeabilizáltuk a sejteket 5 percen keresztül. Permeabilizálást követően PBS-sel mostuk, majd 30 percig 1% BSA-t (bovine serum albumin, Sigma) tartalmazó PBS-ben blokkoltuk a sejteket. A mintákat ezután egy éjszakán át inkubáltuk az elsődleges antitesttel 4ºC-on; míg másnap a másodlagos antitesttel történő 1 órás inkubálást végeztük el. A felhasznált elsődleges és másodlagos ellenanyagok listája a **Mellékletek M3 1. táblázatában** található. A sejtmagokat DAPI tartalmú Vectashield mounting médiummal (Vector Laboratories) jelöltük, és végül a megfestett sejteket fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk (AxioImager system with ApoTome, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany, AxioVision 4.8.1. microscope software).

10.14751/SZIE.2015.052

3.16 In vitro differenciálódási képesség vizsgálata

A nyúl ES és iPS sejtek neurális irányú differenciáltatásához a humán ES sejtek neurális differenciáltatási protokollját vettük alapul. Neurális indukciót megelőzően a sejteket egy éjszakára NIM (Neurális Indukáló Médium; *Neural Induction Medium*) (**Mellékletek M4** fejezet) médiumban inkubáltuk. Következő napon a sejteket tripszineztük, majd 6cm-es tenyésztő edénybe (Nunc) tettük ki őket, melynek speciális bevonata megakadályozza a sejtek letapadását. Ezekben a speciális Petri-csészékben, a sejtek szuszpenziós kultúrában sejtaggregátumokat, úgynevezett embrionális testecskéket (EB, Embryoid Body) alkotnak. A médiumot (NIM) 2 naponta cseréltük. Az ötödik napon az EB-ket 0,05% tripszinnel óvatosan disszociáltattuk és polyornitin/laminin (Sigma-Aldrich) bevonatú Petri-csészékbe passzáltuk, NDM (neurális differenciáltató médium, *neural differentiation medium*, összetétel: **Mellékletek M4** fejezet) médiumban. A médiumot 2 naponta cseréltük, majd a differenciáció 14. és 21. napján a sejteket fixáltuk és ellenanyaggal jelöltük. A felhasznált elsődleges és másodlagos ellenanyagok a **Mellékletek M3 1. táblázatában** találhatóak. A sejtmagokat DAPI tartalmú Vectashield mounting médiummal (Vector Laboratories) festettük, és végül fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk a megfestett sejteket (AxioImager system with ApoTome, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany, AxioVision 4.8.1. microscope software).

A nyúl ES és iPS sejtek kardiális irányú differenciáltatásához a humán ES sejtek kardiális differenciáltatási protokollját vettük alapul. Az EB formálódáshoz függő cseppes módszert (Hanging Drop, HD) alkalmaztunk (Rungarunlert *et al.* 2009). Az első napon a sejteket feltripszineztük, 0.05% Trypsin/0.1% EDTA oldat használatával. Az EB-k függő cseppekben formálódtak 800 sejtet helyezve 20µl-es cseppekbe. A kardiális differenciációs médium összetétele a **Mellékletek M4** fejezetben található. Két nap múlva az EB-ket zselatinozott fedőlemezt tartalmazó 24 lyukú tenyésztőedénybe helyeztük, minden egyes lyukba 1-1 EB-t. A médiumot kétnaponta cseréltük. A differenciáltatás 14. és 21. napján immunfestéssel ellenőriztük a kardiális differenciáltatás eredményességét. A felhasznált elsődleges és másodlagos ellenanyagok a **Mellékletek M3 1. táblázatában** találhatóak. A sejtmagokat DAPI tartalmú Vectashield mounting médiummal (Vector Laboratories) festettük, és a mintákat végül fluoreszcens mikroszkóppal analizáltuk/tanulmányoztuk (AxioImager system with ApoTome, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany, AxioVision 4.8.1. microscope software).

A nyúl ES és iPS sejtek spontán differenciáltatásához a humán ES sejtek spontán differenciáltatási protokollját vettük alapul. Az első napon a sejteket 0.05% Trypsin/0.1%

10.14751/SZIE.2015.052

EDTA oldattal feltripszineztük. Az EB formálódáshoz szuszpenziós kultúrát alkalmaztunk. A spontán differenciációs médium összetétele a **Mellékletek M4** fejezetben található. Az EB-ket 2 nap múlva, zselatinozott fedőlemezt tartalmazó 24 lyukú tenyésztőedénybe tettük ki, minden egyes lyukba 1-1 EB-t. A médiumot kétnaponta cseréltük. A differenciáltatás 14. és 21. napján immunfestéssel ellenőriztük a spontán differenciáltatás eredményességét, amellyel a három csíralemez (endoderma, ektoderma, mezoderma) kilalakulását igazoltuk. A felhasznált elsődleges és másodlagos ellenanyagok a **Mellékletek M3 1. táblázatában** találhatóak. A sejtmagokat DAPI tartalmú Vectashield mounting médiummal (Vector Laboratories) jelöltük, és a megfestett sejteket fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (AxioImager system with ApoTome, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany, AxioVision 4.8.1. microscope software).

3.17 In vivo differenciálódási képesség vizsgálata

1.5-2 x 10^6 számú nyúl iPS sejtet 1:1 arányban Matrigéllel (Corning, USA) kevertünk, majd immundeficiens egér bőre alá injektáltuk. Két és fél hónap múlva a formálódott teratómát az állat euthanáziáját követően, kimetszettük, majd 4% paraformaldehiddel (PFA, Sigma) történő 24 órás fixálás következett szobahőmérsékleten. Ezt követően a szöveti metszeteket hemotoxilin-eozin oldattal festettük.

3.18 Kariotipizálás

A sejtkultúra metafázisban való leállítása kolhicinnel, az interfázisú sejtmagok és metafázisú kromoszómák nyerése standard módszerrel (hipotonizálás: 0,075 M KCl és fixálás: metanol: ecetsav 3:1 arányú keveréke, Carnoy fixáló) történt. A Giemsa sávozás (G-sávozás) során a tárgylemezeket néhány másodpercre 0,005% tripszin oldatba helyeztük, majd 5 percig Giemsa festékkel festettük. A Giemsa festék az AT-gazdag, későn replikálódó, többnyire inaktív géneket tartalmazó kromoszómarészekhez kötődik (sötét sáv). A GC-gazdag, korán replikálódó, aktív génekkel bíró kromoszómarészek pedig világos sávként jelennek meg. A metafázisok értékeléséhez Leica, Leitz Diaplan mikroszkópokat és Lucia Citogenetics System szoftvert használtunk.

10.14751/SZIE.2015.052

10.14751/SZIE.2015.052

4 EREDMÉNYEK

4.1 A nyúl pluripotens őssejt markerek klónozása és karakterizálása

Kutatási stratégiánk szerint, két megközelítést is alkalmaztunk a nyúl pluripotencia gének azonosításához. Az egyik megközelítés szerint az irodalomban már eddig más állatfajokon közölt szekvenciák filogenetikai összehasonlítását alkalmaztuk a primertervezéshez. Ezért BLAST program segítségével kerestük meg az általunk vizsgált pluripotencia gének ortológjait, és ClustalW program segítségével illesztettük egymáshoz a szekvenciákat. Erre azért volt szükség, hogy az egyes szekvencia egyezések és hasonlóságok alapján olyan génszakaszt keressünk, amelyre magas specifitással rendelkező primer tervezhető. Míg a másik megközelítés szerint a nyúl gének azonosításához az ún. Rabbit Genome Resource adatbázist és az ott eddig közölt szekvenciákat használtuk (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/guide/rabbit/).

Vizsgálataink során abból az *a priori* feltevésből indultunk ki, hogy a nyúl genom eddig ismert adatai szerint közelebb áll a humán genom szekvenciához, mint más rágcsálókhoz. Emellett az egér és a szarvasmarha szekvencia adatait is figyelembe véve konszenzus régiókat kerestünk a kérdéses géneken. Ugyanis több, rokon szekvencia egymáshoz való illesztésénél (multiple alignment) információt kaphattunk arról, hogy a konzerválódott, feltehetően funkcionálisan is fontos részek hol helyezkednek el, és a szekvenciák milyen rokonsági fokban állnak egymással.

Az így meghatározott szekvenciák illetve szekvencia részleteket figyelembe véve primereket terveztünk **(4. táblázat)**, majd PCR reakciók segítségével kezdtük meg a gének azonosítását. A specifikus PCR termékeket izoláltuk, szubklónoztuk és Sanger módszer segítségével szekvenáltattuk. Szekvencia illesztésekre alapozva meghatároztuk a gének kódoló régióit, amelyekből később fehérje szekvenciákat prediktálunk. Eredményeinket a következőkben gének szerint ismertetjük.

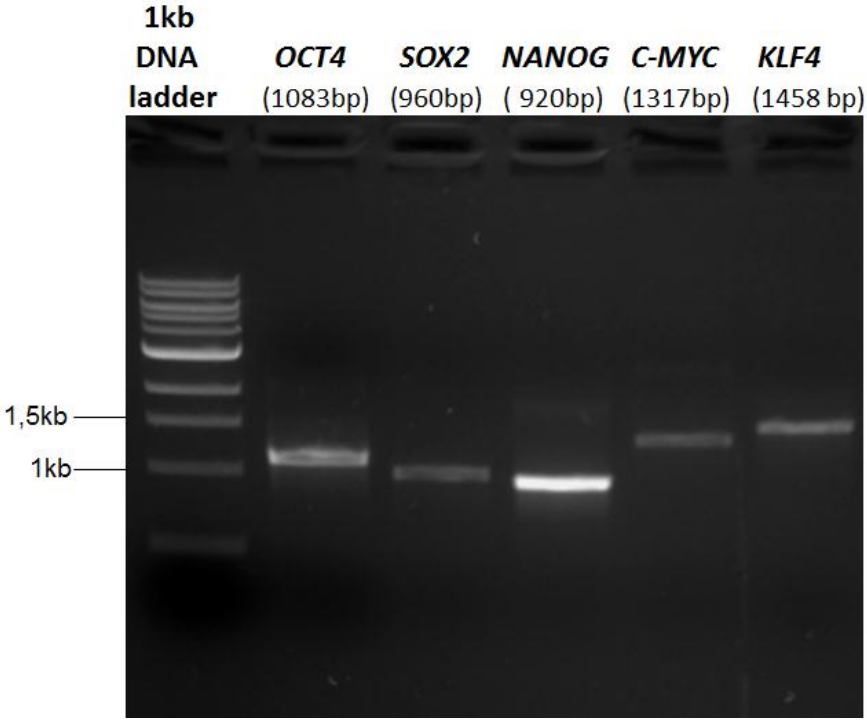
4.1.1 A nyúl OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC és NANOG pluripotencia faktorok teljes kódoló régiójának izolálása

A pluripotencia gének azonosításához és izolálásához olyan kiindulási mintára volt szükségünk, ahol feltételezéseink szerint a keresett gének aktívak lehettek. Ezért a humán és egér adatokat értékelve és figyelembe véve a pluripotencia gének azonosításához blasztociszta

10.14751/SZIE.2015.052

stádiumú nyúl embriókat használtunk, mert várakozásaink szerint feltételezhető volt, hogy a pluripotencia kialakításában szerepet játszó gének az implantáció előtti stádiumban aktívak és így sikerrel amplifikálhatóak, mRNS termékük izolálható, majd cDNS-ük szekvenciája meghatározható.

Ezért hólyagcsíra fejlődési stádiumú nyúl embriók poolozott (10 embrió/pool) mintáiból RNS-t izoláltunk, majd cDNS-t szintetizáltunk. Az előző szakaszban részletezett módon tervezet primereket azután ezeken a mintákon teszteltük. Mind az öt gén esetében sikerült a várt fragmentméretnek megfelelő termékek amplifikációja **(13. ábra)**. A PCR termékeket izoláltuk, majd szekvenáltuk. A kapott cDNS szekvenciákat aminosav szekvenciákra fordítottuk le **(Mellékletek M3 6-8. ábra)** és a homológia kimutatása érdekében, egér és humán szekvenciával is illesztettük **(Mellékletek M3 9-13. ábra)**. Az összehasonlítást mind nukleotid szinten, mind aminosav szinten elvégeztük.



13. ábra. A pluripotencia gének szekvenciáira tervezett primerekkel izolált nyúl *OCT4, SOX2, NANOG, C-MYC, KLF4* és teljes kódoló régiók.

A sikeresen izolált szekvenciákat pcDNA3.1 (-) plazmid vektorba klónoztuk, majd szekvenáltuk. A klónozás sikerességét elsőként EcoR1 restrikciós enzim segítségével ellenőriztük le, amely a pcDNA3.1 (-) plazmid esetében pontosan a beklónozott PCR terméket fogja közre és hasítja ki a vektorból. Az emésztett mintákat ezt követően agaróz gélelektroforézis segítségével analizáltuk.

10.14751/SZIE.2015.052

Az eredményeink azt mutatják, hogy a restrikciós emésztést követően az amplifikált és beklónozott pluripotencia gének méretükben megfelelnek a várt fragment méreteknek. Ezt az eredményt szekvenálással is igazoltuk az *OCT4, C-MYC, KLF4 NANOG és SOX2* gének esetében. Az egér és humán ortológokkal való összehasonlítás során ezen gének esetében a homológia a következő volt: az *OCT4* esetében nukleinsav szinten 79%-os hasonlóság az egér *OCT4* szekvenciával, 85%-os egyezés a humán *OCT4* szekvenciával, aminosav szinten: 81% homológia az egér *OCT4* szekvenciával, 90%-os azonosság a humán *OCT4* szekvenciával. A *KLF4* esetében nukleinsav szinten 98%-os hasonlóság az egér KLF4 szekvenciával, 85%-os egyezés a humán KLF4 szekvenciával, aminosav szinten: 95% homológia az egér KLF4 szekvenciával, 84%-os azonosság a humán KLF4 szekvenciával. A *C-MYC* esetében nukleinsav szinten 88%-os hasonlóság az egér C-MYC szekvenciával, 92%-os egyezés a humán C-MYC szekvenciával, aminosav szinten: 91% homológia az egér C-MYC szekvenciával, 94%-os azonosság a humán C-MYC szekvenciával. A *NANOG* esetében Nukleinsav szinten: 71%-os homológia az egér *NANOG* szekvenciával, 78%- os hasonlóság a humán *NANOG* szekvenciával, Aminosav szinten: 55%-os homológia az egér NANOG szekvenciával, 66%-os egyezés a humán NANOG szekvenciával. A *SOX2* esetében nukleinsav szinten 94%-os hasonlóság az egér SOX2 szekvenciával, 96%-os egyezés a humán SOX2 szekvenciával, aminosav szinten: 98% homológia az egér SOX2 szekvenciával, 96%-os azonosság a humán SOX2 szekvenciával (**Mellékletek M3 7-13.ábra**). Elmondhatjuk, hogy az izolált fragmentek analízise során, jelentős különbségeket vettünk észre mind nukleinsav, mind pedig aminosav szinten a már publikált ortológokkal való összehasonlítás során.

A szekvencia analízisek bizonyították, hogy sikeresen azonosítottuk az *OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC és NANOG* gének kódoló régiójának részletét. Ezek alapján az egyes gének teljes kódoló régiójának meghatározása következett, amelyet az alábbiakban génenként részletezünk.

4.1.1.1 Az OCT4 izolálása és karakterizálása

Az *OCT4* teljes kódoló régiójának izolálásához PCR reakciókat végeztünk blasztociszta stádiumú nyúl embriókon, a kódoló régióra tervezett primerek felhasználásával. Ezt követően az izolált génspecifikus fragmentet plazmid vektorba klónoztuk és 6 alkalommal szekvenáltuk.

Az ennek alapján azonosított mRNS szekvencia az alábbi azonosító számmal: (accession number: KJ708484) került feltöltésre a GenBank-ba.

Az *OCT4* genomi szekvenciája a 12-es kromoszómán lokalizálódik, ahogyan azt korábban már publikálásra került (Shi et al. 2008). A következő lépésben az *OCT4* gén exon-

10.14751/SZIE.2015.052

intron szerkezetét vizsgáltuk, melynek során 5 exon jelenlétét prediktáltuk az azonosított kódoló régión belül **(14. ábra, 5. táblázat).**

A továbbiakban az újonnan meghatározott *OCT4* szekvenciát fehérje szekvenciára fordítottuk le, amelyet összehasonlítottunk a már publikált referencia szekvenciával (Shi et al. 2008). Az analízis során 11 aminosavnyi eltérést állapítottunk meg a publikált szekvenciához képest, amely alapján feltételezhető, hogy az általunk azonosított szekvencia, a nyúl *OCT4* egy új génvariánsa **(Melléklet M3 14. ábra)**.

Ezt követően az NCBI (http://www.ncbi.nih.gov/nucleotid) és UCSC (https://genome.ucsc.edu/) adatbázisokban megtalálható szekvencia-adatok, EST-k (Expressed Sequence Tags, Kifejeződő Szekvencia Részek) keresésével is próbáltuk megerősíteni szekvenciánk valódiságát. A már lepublikált teljes szekvencián kívül az adatbázisokban talált szekvenciákat fehérje szinten hasonlítottuk össze az általunk izolált nyúl OCT4-el. Ennek során a 134 aminosav hosszúságú BAF911355.1 azonosító számú OCT4 fehérje szekvenciarészlet 97%-os egyezést, össszesen 4 aminosavnyi különbséget mutatott az általunk izolált nyúl OCT4 fehérje szekvenciával és teljes hosszában a nagymértékű konzerváltságot mutató POU- és Homeo domén régióra illeszkedett. Az ezt követően talált ABW24661.1 azonosító számú 135 aminosav hosszúságú nyúl *OCT4* szekvenciarészlet, amely éppen a POU domént előzi meg, 5 aminosavnyi eltéréssel 96%-os homológiát mutatott az általunk izolált nyúl OCT4-el való illesztésnél.

Annak érdekében, hogy meghatározzuk a nyúl OCT4 evolúciós konzerváltságát, filogenetikai analízist végeztünk. Az azonosított nyúl fehérje és mRNS szekvenciákat a humán, egér, macska és szarvasmarha ortológokkal hasonlítottuk össze. A vizsgálat során megállapítottuk a nyúl OCT4 nagymértékű konzerváltságát, és hogy rokonságban leginkább a humán és macska szekvenciákhoz áll a legközelebb (**6. táblázat**).
Mindazonáltal a macska szekvenciával való nagymértékű mRNS szintű homológia leginkább a hasonló kodon használatra enged következtetni.

Ezt követően a humán OCT4 fehérje doménjainak szerkezetét figyeltük meg, és kifejezetten ezeket a régiókat hasonlítottuk össze a nyúl szekvenciára vetítve. Ennek eredményeképpen felfedeztük, hogy a POU- és Homeo domén nagymértékű konzerváltságából kifolyólag, a nyúlban éppúgy jelen van, mint a humán fehérje szekvenciában **(7. táblázat)**.

A tény, hogy a vizsgált *OCT4* szekvenciák evolúciósan jól megőrzött felépítést mutatnak, arra enged következtetni, hogy a funkciójuk is hasonló. A nyúl *OCT4*–el kapcsolatban publikálásra került az is, hogy a promoter régió igen konzervatív és a transzkripcionális szabályozás is a humánhoz nagyon hasonló (Kobolak et al. 2009).

10.14751/SZIE.2015.052

5. táblázat. Az izolált pluripotencia gének fő jellemzői

Gének	Genomi lokáció (kromoszóma)	CDS hossza (bp)	A fehérje termék hossza (aa)	Az exonok száma
OCT4	12	1083	360	5
SOX2	14	960	319	1
KLF4	1	1458	485	5
C-MYC	3	1317	438	2
NANOG	8	771	256	4

4.1.1.2 A SOX2 karakterizálása

Az *SOX2* teljes kódoló régiójának izolálásához is blasztociszta stádiumú nyúl embriókon végeztük a PCR reakciót, a kódoló régióra tervezett primerek felhasználásával. Ezt követően az izolált génspecifikus fragmentet plazmid vektorba klónoztuk és 6 alkalommal szekvenáltuk.

Az azonosított *SOX2* mRNS szekvencia a GenBank-ba az alábbi azonosító számmal: (accession number: KJ939365) került feltöltésre a GenBank-ba.

A nyúl *SOX2-t,* az ortológokhoz hasonlóan, egy exonos génként azonosítottuk, amely nyúlban a 14-es kromoszómán lokalizálódik **(14. ábra, 5. táblázat)**.

Az újonnan izolált és a Gén Bank által prediktált szekvencia összehasonlítása során 18 aminosavnyi eltérést állapítottunk meg, amelynek felét az általunk azonosított szekvenciában nem található 9 aminosav hosszúságú glycin ismétlődés adja a prediktált szekvencia N-terminusán **(Melléklet M3 15. ábra)**.

Ezt követően az NCBI (http://www.ncbi.nih.gov/nucleotid) és UCSC (https://genome.ucsc.edu/) adatbázisokban megtalálható szekvencia-adatok, EST-k keresésével is próbáltuk megerősíteni szekvenciánk valódiságát. A már lepublikált teljes szekvencián kívül az adatbázisokban talált szekvenciákat fehérje szinten hasonlítottuk össze az általunk izolált nyúl SOX2-vel. Ennek során a 207 aminosav hosszúságú NP_001164619.1 azonosító számú SOX2 fehérje szekvenciarészlet 48%-os egyezést, összesen 79 aminosavnyi különbséget mutatott az általunk izolált nyúl SOX2 fehérje szekvenciával.

A nyúl *SOX2* emlős ortológokkal való összehasonlításakor nagymértékű konzerváltágot fedeztünk fel minden egyes vizsgált faj esetében. **(6. táblázat)**. Az egér *SOX2* 99%-ban mutatott hasonlóságot a nyúl szekvenciával mind aminosav, mind nukleotid szinten. A fehérje

10.14751/SZIE.2015.052

domének vizsgálatakor szintén nagymértékű hasonlóságot véltünk felfedezni a humán SOXp és SOX-TCF_HMG-box doménekkel való összehasonlításkor **(7. táblázat)**.

Eredményeinket egy már publikált cikk is igazolja, amely a SRY-box gének erős konzerváltságát írja le emlősök esetében (Malas et al. 1997). Ez a nagymértékű konzerváltság a *SOX2*-nél is az emlős ortológoknál leírt funkcióra enged következtetni.

4.1.1.3 A KLF4 karakterizálása

A *KLF4* teljes kódoló régiójának izolálásához PCR reakciókat végeztünk blasztociszta stádiumú nyúl embriókon, a kódoló régióra tervezett primerek felhasználásával. Ezt követően az izolált génspecifikus fragmentet plazmid vektorba klónoztuk és 6 alkalommal szekvenáltuk.

Az azonosított *KLF4* mRNS szekvencia a GenBank-ba az alábbi azonosító számmal: (accession number: KM267140) került feltöltésre a GenBank-ba.

Ebben az esetben, a GenBankban, számítógépes analízis segítségével előjelzett KLF4 mRNS szekvenciája hiányos volt. Ennek ellenére, a nem teljes prediktált (178 aminosav hiány) és a kísérletesen meghatározott *KLF4* szekvencia összehasonlításakor az N- és C- terminus tökéletes egyezést mutatott **(Mellékletek M3 16. ábra)**. A nyúl *KLF4* kódoló régió 5 exonból áll és az 1-es kromoszómán lokalizálódik. **(14. ábra, 5. táblázat)**.

Ezt követően az NCBI (http://www.ncbi.nih.gov/nucleotid) és UCSC (https://genome.ucsc.edu/) adatbázisokban megtalálható szekvencia-adatok, EST-k keresésével is próbáltuk megerősíteni szekvenciánk valódiságát. Ennek során a 160 aminosav hosszúságú NP_001075522.1 azonosító számú KLF4 fehérje szekvenciarészlet 59%-os egyezést, összesen 55 aminosavnyi különbséget mutatott az általunk izolált nyúl KLF4 fehérje szekvenciával és teljes hosszában a konzervált Zinc-finger dupla domén régióját fedte.

A filogenetikai analízis során erős konzerváltságot mutattunk ki a vizsgált fajok között. A legmagasabb homológiát mRNS szinten a macska szekvenciával fedeztük fel, aminosav szinten pedig a szarvasmarha szekvenciával **(6. táblázat)**. Fontos megjegyezni azt is, hogy a KLF4 fehérje humán és nyúl Zinc- finger dupla doménje 100%-os egyezést mutatott **(7. táblázat)**, amely ismét a humánhoz hasonló funkcióra enged következtetni.

10.14751/SZIE.2015.052

6. táblázat. A nyúl pluripotencia gének evolúciós konzerváltsága. A nyúl és négy emlős faj szekvenciái közötti azonosság (%) mRNS (CDS, Coding Region) és fehérje (Protein) szinten. A legmagasabb homológia szinteket kiemeléssel jelöltük. szinten Oc, *Oryctolagus cuniculus (nyúl)*; Hs, *Homo sapiens (ember)*; Mm, *Mus musculus (egér)*; Bt, *Bos taurus (szarvasmarha)*; Fc, *Felis catus (macska)*.

CDS					Protein				
Oc	**Hs**	**Mm**	**Bt**	**Fc**	**Oc**	**Hs**	**Mm**	**Bt**	**Fc**
OCT4	85.6	79.6	84.7	**86.3**	OCT4	**87.2**	80.8	86.1	**87.2**
SOX2	94.1	**99.4**	93.6	94.3	SOX2	97.2	**99.4**	97.5	97.2
KLF4	90.9	88.3	91.1	**91.7**	KLF4	94.0	92.0	**95.3**	95.0
C-MYC	88.6	85.0	90.4	**92.2**	C-MYC	90.5	88.6	94.3	**96.3**
NANOG	**77.2**	65.6	73.4	70.7	NANOG	**58.9**	48.9	57.0	52.9

4.1.1.4 A C-MYC szekvencia karakterizálása

A *C-MYC* teljes kódoló régiójának izolálásához PCR reakciókat végeztünk blasztociszta stádiumú nyúl embriókon, a kódoló régióra tervezett primerek felhasználásával. Ezt követően az izolált génspecifikus fragmentet plazmid vektorba klónoztuk és 6 alkalommal szekvenáltuk.

Az azonosított *C-MYC* mRNS szekvencia a GenBank-ba az alábbi azonosító számmal: (accession number: KJ708483) került feltöltésre a GenBank-ba.

A *C-MYC* esetében a genomi szekvencia predikció során a prediktált és újonnan meghatározott szekvencia összehasonlításakor nem találtunk különbséget **(Mellékletek M3 17. ábra)**. A nyúl *C-MYC* kódoló régió 2 exonból áll és genomi szekvenciája a 3-as kromoszómán foglal helyet **(14. ábra, 5. táblázat).**

Ezt követően az NCBI (http://www.ncbi.nih.gov/nucleotid) és UCSC (https://genome.ucsc.edu/) adatbázisokban megtalálható szekvencia-adatok, EST-k keresésével is próbáltuk megerősíteni szekvenciánk valódiságát. Ennek során a 154 aminosav hosszúságú AAN03876.1 azonosító számú C-MYC fehérje szekvenciarészlet 100%-os egyezést mutatott az általunk izolált nyúl C-MYC fehérje szekvenciával és teljes hosszában a nagymértékű konzerváltságot mutató MYC-N, Helix-Loop-Helix és C-MYC Leucin Zipper domén régióra illeszkedett. Az ezt követően talált CAB94839.1 azonosító számú 107 aminosav hosszúságú nyúl C-MYC szekvenciarészlet, amely a MYC-N domént előzi meg, 4 aminosavnyi eltéréssel 96%-os homológiát mutatott az általunk izolált nyúl C-MYC-el való illesztésnél.

10.14751/SZIE.2015.052

A nyúl *C-MYC* az eddigi génekhez hasonlóan szintén nagymértékű evolúciós konzerváltságot mutatott az ortológ szekvenciákkal való összehasonlítás során. Az mRNS és fehérje szekvenciája a macska és a szarvasmarha szekvenciákhoz áll a legközelebb, mivel ezek szintén nélkülözik azt a 15 aminosav hosszúságú részt, amely a humán és egér N-terminuson jelen van **(6. táblázat)**. Struktúrálisan a nyúl C-MYC MYC-N, Helix-Loop-Helix és C-MYC Leucin Zipper domént tartalmaz, amelyek mindegyike nagymértékű homológiát mutat főként a humán ortológban megtalálható doménekkel **(7. táblázat)**, amely ismét a hasonló jellegű funkcióra enged következtetni.

4.1.1.5 A NANOG szekvencia karakterizálása

A *NANOG* teljes kódoló régiójának izolálásához PCR reakciókat végeztünk blasztociszta stádiumú nyúl embriókon a kódoló régióra tervezett primerek felhasználásával. Ezt követően az izolált génspecifikus fragmentet plazmid vektorba klónoztuk és 6 alkalommal szekvenáltuk.

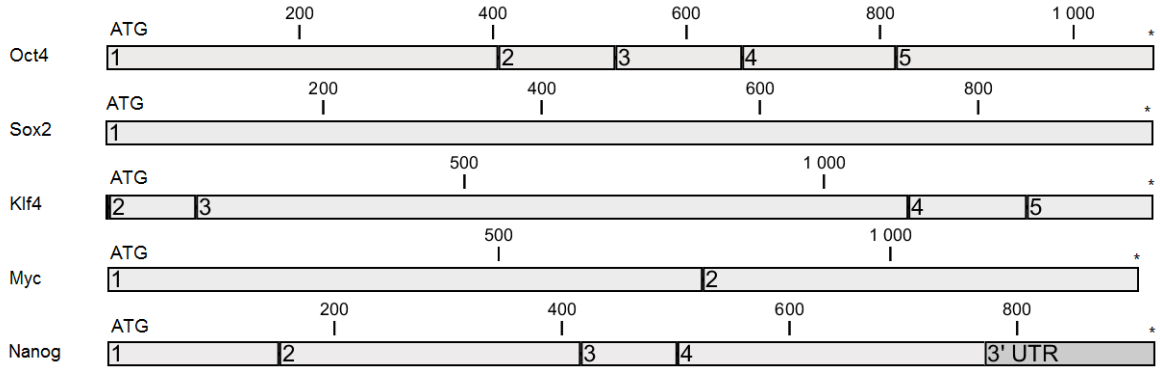
Az azonosított *NANOG* mRNS szekvencia a GenBank-ba az alábbi azonosító számmal: (accession number: KJ708482) került feltöltésre a GenBank-ba. A *C-MYC*-hez hasonlóan a nyúl NANOG prediktált fehérje szinte tökéletes egyezést mutat az általunk azonosított NANOG szekvenciával, azzal a különbséggel, hogy mi a stop kodont (TGA) 50 aminosavval előbb határoztuk meg **(Melléklet M3 18. ábra)**. Ezen gén esetében 4 exont állapítottunk meg, a *NANOG* genomi szekvenciája pedig a 8-as kromoszómán lokalizálódik **(14. ábra, 5. táblázat)**.

Ezt követően a *NANOG* esetében is próbáltuk megerősíteni szekvenciánk valódiságát az NCBI (http://www.ncbi.nih.gov/nucleotid) és UCSC (https://genome.ucsc.edu/) adatbázisokban megtalálható szekvencia-adatok, EST-k keresésével, de ebben az esetben a számítógépesen prediktált adatokon kívül nem találtunk nyúlban az erre a célra használható, már izolált szekvenciarészleteket.

A nyúl *NANOG* nagy eltéréseket mutatott mind nukleotid, mind aminosav szinten a vizsgált fajok között. A legnagyobb mértékű homológiát mRNS és fehérje szinten a humán szekvenciával való összehasonlításkor véltük felfedezni (77.2 és 58.9%) **(6. táblázat)**.

A fehérje domének vizsgálatakor megállapításra került, hogy a nyúl Homeodomén 91.4%-os hasonlóságot mutat **(7. táblázat)** a humán ortológhoz képest, amely az azonos funkciót is feltételezi.

10.14751/SZIE.2015.052



14. ábra. A vizsgált gének meghatározott mRNS szekvenciájának sematikus bemutatása. A számok a bázispárok pozícióját mutatják a transzkripciós starthelytől számítva. A prediktált exonok a szekvenciákon megszámozva találhatóak. ATG – start kodon, * – stop kodon. 3'UTR szekvencia a *NANOG* gén végén jelölve

7. táblázat. Elhelyezkedés és hasonlóság a nyúl izolált és humán publikált szekvenciák konzerválódott régiói között. Oc, *Oryctolagus cuniculus (nyúl)*; Hs, *Homo sapiens (ember)*.

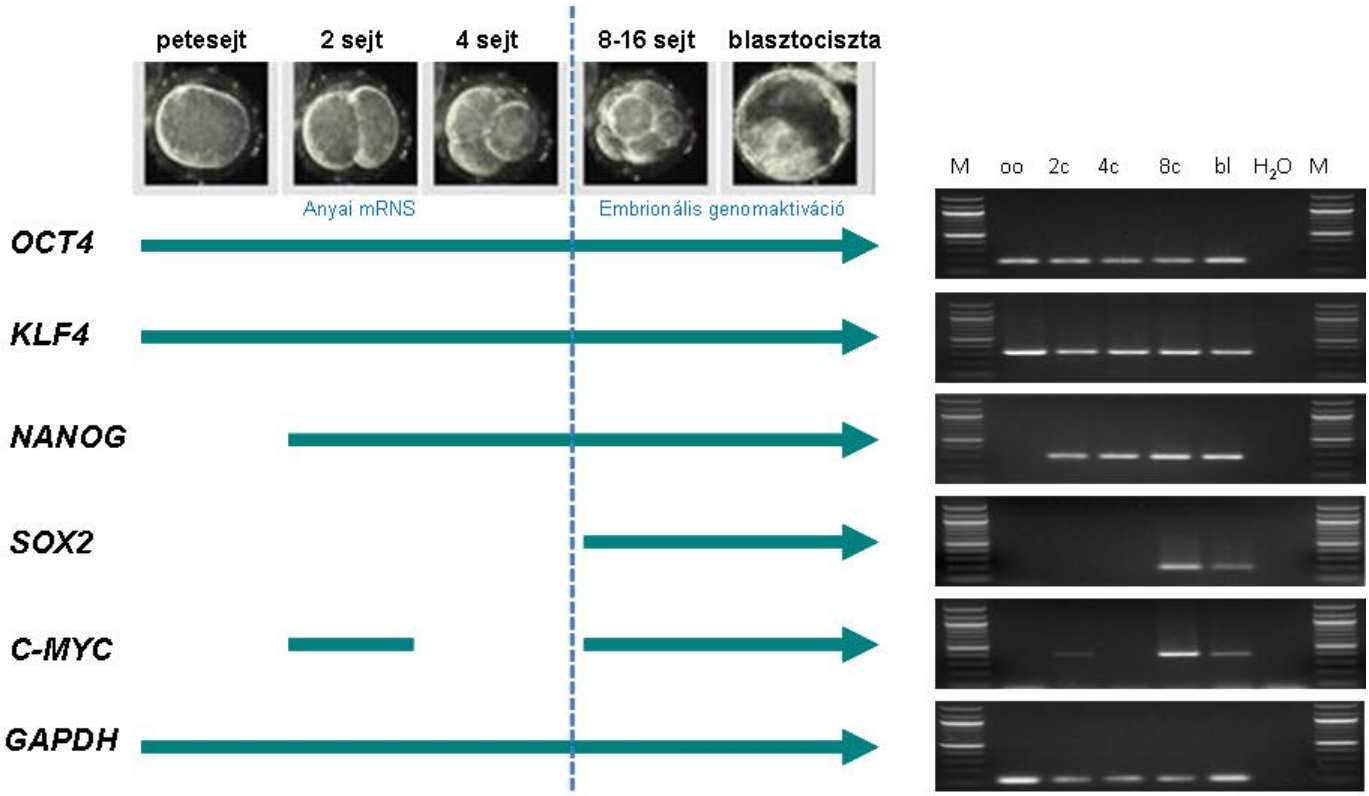
Gén	Domén leírás	Lokáció		Identitás (%)
		Hs	Oc	
OCT4	POU	138-212	138-212	96.0
	Homeodomén	231-289	231-289	96.6
SOX2	SOX-TCF_HMG-box	40-111	42-113	98.6
	SOXp	110-200	112-202	98.9
C-MYC	Myc_N	16-360	1-344	92.8
	Helix-loop-helix domén	370-426	354-410	98.2
	Myc leucine zipper domén	423-454	407-438	96.9
KLF4	Zinc-finger double domén	412-429	418-435	100
	Zinc-finger double domén	442-467	448-473	100
NANOG	Homeodomén	97-154	97-154	91.4

4.1.2 A nyúl pluripotencia gének embriogenezis során betöltött szerepének vizsgálata

A nyúl pluripotencia gének embriógenezis során betöltött szerepének vizsgálatához, ezen gének expressziós mintázatát analizáltuk RT-PCR segítségével, a fejlődés különböző preimplantációs stádiumaiban **(15. ábra)**. Vizsgálatainkhoz az előzőekben azonosított és

10.14751/SZIE.2015.052

szekvenált gének alapján tervezett immár nyúl specifikus szekvenciákat használtunk. Eredményeink szerint mind az *OCT4* és *KLF4* mRNS-e kimutatható volt már a petesejtben és az embrionális fejlődés minden általunk vizsgált stádiumában. A petesejtben és a zigótában detektált mRNS valószínűsíthetően anyai mRNS-ként van jelen, miután az embrionális genomaktiváció csak 4 sejtes stádiumot követően indul el 8-16 sejtes periódusban. A *SOX2* transzkripcióját 8 sejtes és blasztociszta stádiumban detektáltuk. Alacsony *C-MYC* expressziót tapasztaltunk 2 sejtes embrióban, majd 8 sejtes stádiumban újra, amely fennmaradt egészen a blasztociszta állapotig. A *NANOG* a 2 sejtes embrionális stádiumtól a peimplantációs fejlődés teljes periódusa alatt kimutatható volt.



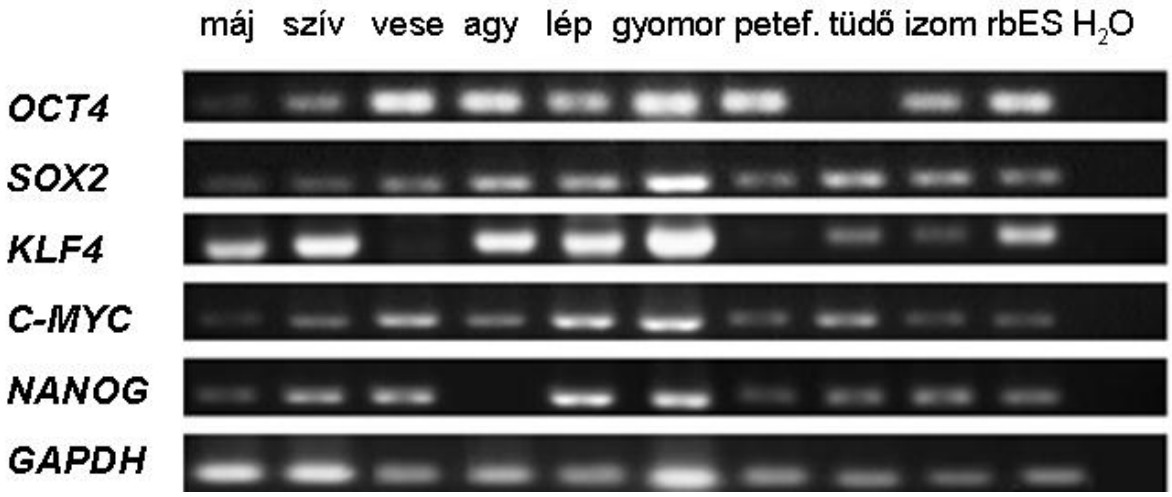
15. ábra. *OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC* és *NANOG* expresszió RT-PCR analízise nyúl petesejtben és preimplantációs stádiumú embriókban. M, 100bp-os molekulasúly marker; oo, petesejt; 2c, 2 sejtes stádium; 4c, 4 sejtes stádium; 8c, 8 sejtes stádium; bl, blasztociszta stádium; H2O, víz kontroll.

4.1.3 A nyúl pluripotencia gének felnőtt szövetekből történő kimutatása

Az *OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC* és *NANOG* pluripotencia gének expresszióját felnőtt szövetekben is vizsgáltuk RT-PCR segítségével, amelyhez pozitív kontrollként nyúl embrionális őssejteket használtunk fel. A vizsgált gének különböző expressziós szintjét detektáltuk az egyes szövetekben **(16. ábra)**. A gének expresszója alacsonynak bizonyult a

10.14751/SZIE.2015.052

májban, kivéve a *KLF4* esetében, amely viszont alulszabályozott vesében és petefészekben, ellentétben az *OCT4* magas szintű expressziójával ezekben a szövetekben. A *SOX2* magasan expresszál a tüdőben, a *KLF4, C-MYC* és *NANOG* gének pedig a lépben expresszálnak a leginkább.



16. ábra. *OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC* és *NANOG* expresszió RT-PCR analízise nyúl felnőtt szövetekben és nyúl ES sejtekben (rbES)

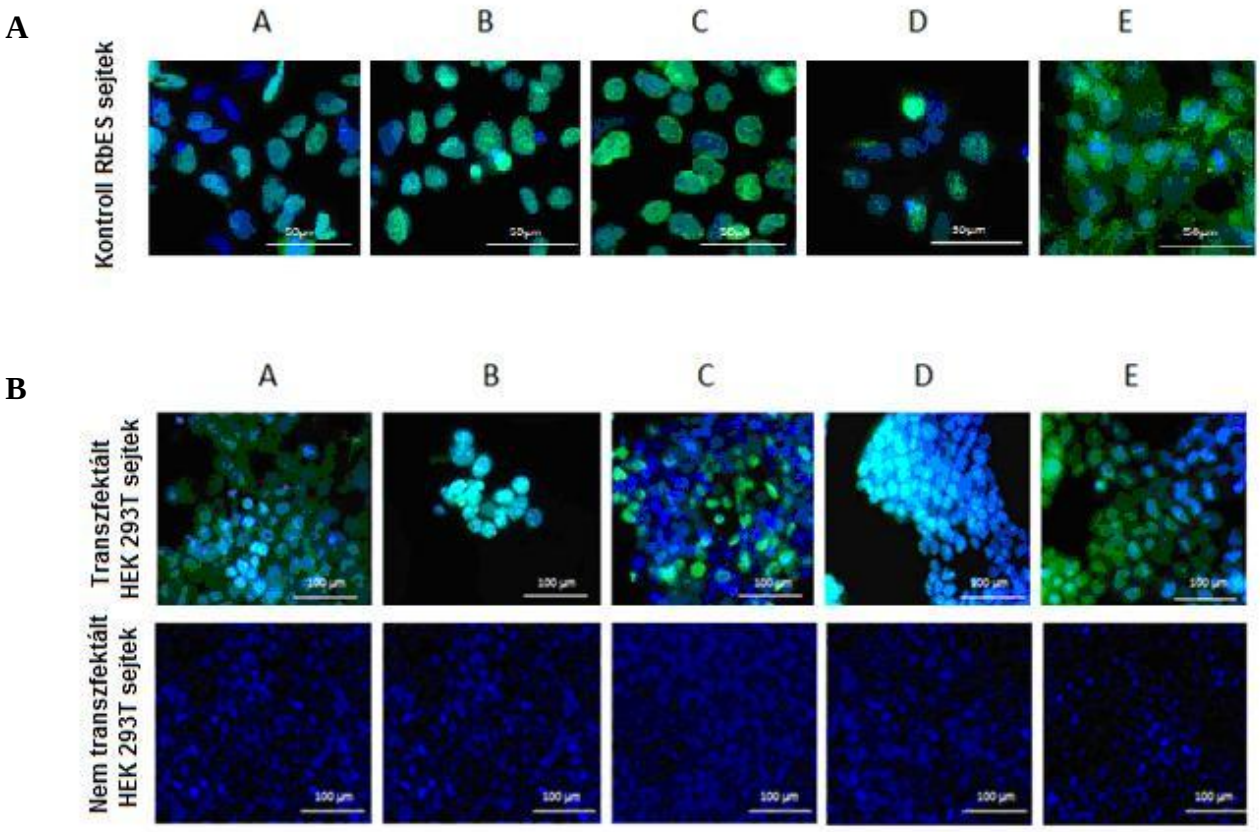
4.1.4 A nyúl pluripotencia faktor fehérjék expressziója

Az izolált nyúl gének expressziójának kimutatásához a teljes kódoló régiót tartalmazó géneket pcDNA3.1 (-) expressziós vektorba klónoztuk. Az expresszió immunfluorescens festéssel történő kimutatásához először megfelelő ellenanyagokat kellett keresnünk. Ehhez az általunk használt humán ellenanyagok specifikusságát vizsgáltuk, elsőként az „Anyag és Módszer" részben már ismertetett epitóp régiók vizsgálatával. Nagymértékű homológiát tapasztaltunk a humán és nyúl OCT4, SOX2, KLF4 és C-MYC fehérje szekvenciák epitóp régiói között és valamivel kisebb mértékű hasonlóságot a NANOG szekvenciák között **(Mellékletek M3 1-5 ábra)**. Több ellenanyagot teszteltünk, majd az ellenőrzést követően a legjobbnak talált ellenanyagokat nyúl ES sejteken is teszteltük. Várakozásainknak megfelelően, specifikust festést kaptunk OCT4, SOX2, KLF4 C-MYC és NANOG ellenanyagok esetében **(17/A ábra)**

Miután meggyőződtünk arról, hogy ezeket az ellenanyagok használhatóak nyúl pluripotens sejtekben is a keresett markerek kimutatására, a pcDNA3.1 (-) vektorba klónozott gének cDNS szekvenciáit külön-külön HEK 293T sejtekbe juttattuk, kálcium foszfát transzfekciós ágens felhasználásával. 72 óra elteltével a transzfektált HEK 293T sejteket immunfestettük a fehérjetermék kimutatásának céljából. Vizsgálataink szerint mind az 5 izolált

10.14751/SZIE.2015.052

gén expressziója kimutatható volt a sejtekből, és mindegyik transzkripciós faktor nukleáris lokalizációt mutatott **(17/B ábra)**.



17. ábra. (A) RbES sejtek immunfluorescens festése (B) A transzfektált HEK 293T sejtek vizsgálata immunfestéssel. A: α-humán OCT4 antitest, B: α-humán C-MYC antitest, C: α-humán KLF4 antitest, D: α-humán SOX2 antitest, E: α-humán NANOG antitest

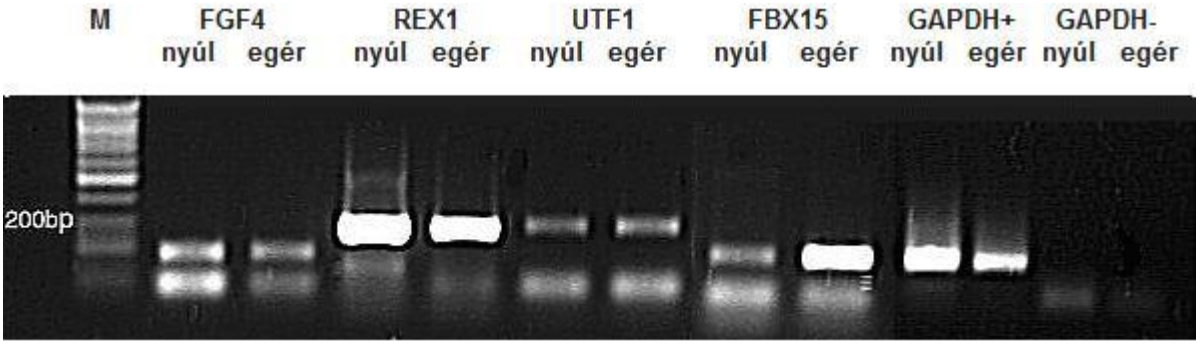
4.1.5 A nyúl FGF4, REX1, FBX15, UTF1 pluripotencia faktorok cDNS részletének izolálása

A pluripotens sejtek vizsgálatához használt gének *FGF4, REX1, FBX15, UTF1* esetében az azonosítás technikája megegyezett az előzőekben leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben nem a teljes kódoló régiót izoláltuk, hanem cDNS részleteket. Kutatási stratégiánk itt is a homológ szekvenciák keresésén alapult, tehát a keresett gének izolálása érdekében az irodalomban közölt, eddig sikeresen izolált szekvenciákat kellett megvizsgálnunk. A szekvencia hasonlóságok, egyezések alapján pedig olyan génszakaszt kellett keresnünk, amelyre várhatóan magas specifitással rendelkező primer tervezhető. A keresett gének egy-egy szakaszának sikeres azonosítását követően a géntermék ismételhető kimutatásához immár faj- és génspecifikus primereket tudtunk tervezni.

10.14751/SZIE.2015.052

Az előbbiekben leírt módon, konszenzus szekvenciákra tervezett primerekkel a pluripotens sejtek endogén génjeinek vizsgálatához használt gének izolálása a **18. ábrán** látható. A nyúl pluripotens sejtek vizsgálatához tervezett primerekkel izolált nyúl *FBX15, FGF4, REX1 és UTF1* szekvenciákat a homológia kimutatása érdekében, egér és humán szekvenciával illesztettük **(Mellékletek M3 19-22. ábra).**

Az *FGF4* esetében a homológia 93% az egér ortológgal, 88% a humán ortológgal; a *REX1* esetében az egyezés 97% az egér ortológgal és 76% a humán ortológgal az *UTF1* esetében a hasonlóság 95% az egér ortológgal és 69% a humán ortológgal; az *FBX15* esetében a homológia pedig 100%-os volt az egér ortológgal, 77%-os a humán ortológgal.



18. ábra. A konszenzus szekvenciára tervezett primerekkel izolált nyúl és egér FGF4, REX1, UTF1, FBX15 cDNS részletek. M: 100bp-os molekulasúly marker, Nyúl: nyúl blasztociszta stádiumú embrióból származó cDNS templát, Egér: egér blasztociszta stádiumú embrióból származó cDNS templát. GapDh+: egér és nyúl GapDh housekeeping primerek pozitív kontrollként való használata, egér és nyúl blasztociszta stádiumú embrióból származó cDNS templát felhasználásával; GAPDH-: egér és nyúl GAPDH housekeeping primerek negatív kontrollként való használata, templát hosszáadása nélkül.

4.2 Nyúl indukált pluripotens sejtek létrehozása egér génekkel

4.2.1 Nyúl indukált pluripotens sejtek létrehozása egér génekkel, Sleeping Beauty vektorral

Első kísérleti megközelítésben, nyúl embrionális fibroblaszt sejteket használtunk, kiinduló, újraprogramozandó szomatikus sejtvonalként. Mivel kísérletünk megkezdésekor a nyúl pluripotencia gének még nem voltak elérhetőek, ezért egér géneket terveztünk használni a sejtek újraprogramozásához, amelyhez először az úgynevezett Sleeping Beauty transzpozon/transzpozáz rendszert használtuk. Ebben az időszakban, nyúl iPS sejtek terén még nem jelent meg publikáció, amire támaszkodhattunk volna, ezért először az egyes sejttenyésztő médiumokat kellett tesztelnünk. Első körben a patkány iPS sejtek tenyésztési körülményeit alkalmaztuk a nyúl iPS sejtek létrehozásához (Li et al. 2009). Ennek érdekében először 10-féle

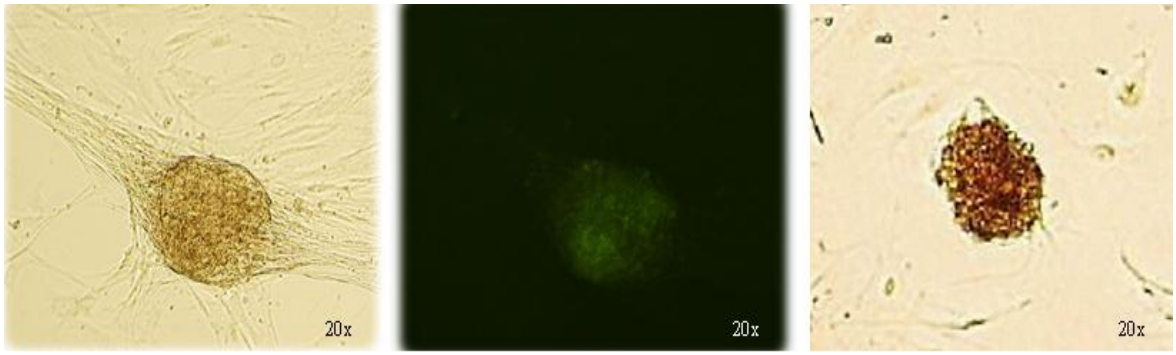
10.14751/SZIE.2015.052

különböző, speciális összetételű médiumot állítottunk össze és teszteltünk **(Mellékletek M3 2. táblázat; M3 3. táblázat)**.

A teszteléshez -mint referenciát- egy francia laboratórium által biztosított nyúl őssejtet (Savatier et al., INRA, Franciaország) alkalmaztuk. A sejteket minden egyes passzálás után Mitomicin-C kezelt, úgynevezett „letapadó tápláló sejtréteget" (egér embrionális fibroblaszt, MEF) tartalmazó Petri-csészébe helyeztük. A 10-féle különböző, speciális összetételű médiumból 4 bizonyult megfelelőnek ES/iPS sejtek fenntartásához, így az iPS sejtek izolálására a továbbiakban ezt a 4 médiumot használtuk és teszteltük **(Mellékletek M3 4. táblázat)**.

Ennek eredményeképpen, a transzfekciót követő 15-20 napon belül az embrionális őssejtek morfológiájához hasonló telepek (iPS sejttelepek) jelentek meg, amelyek növekedésnek indultak **(19. ábra)**.

Napi médiumcserét követően, a megnövekedett telepet pipettahegy vagy üvegkapilláris segítségével felvettük, collagenase II vagy tripszin enzim használatával és pipetázással kisebb sejtcsomókká szedtük szét és új Mitomicin-C kezelt tápláló sejtrétegre helyeztük. A felvett, új MEF-re helyezett sejtcsomók letapadtak és embrionális őssejtszerű kolóniákat hoztak létre. Annak igazolására, hogy valóban pluripotens őssejt vonalakat kaptunk-e, meg kell győződnünk azok pluripotens állapotáról, ezért először ellenőriztük a sejtvonalak alkalikus foszfatáz (AP) aktivitását **(19. ábra)**.

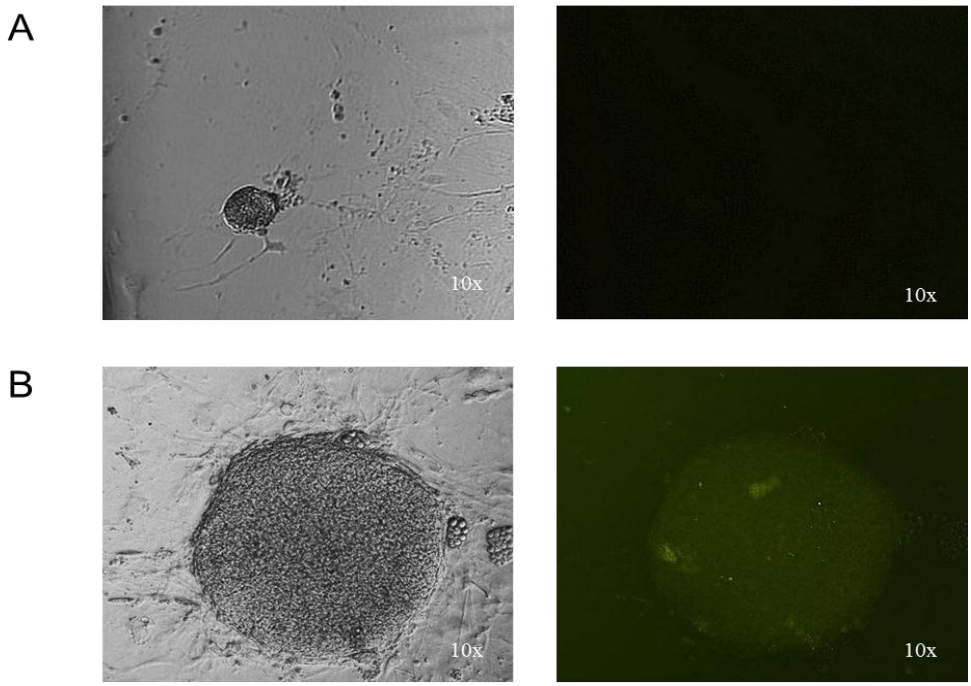


19. ábra: Nyúl GFP-pozitív iPS-like kolónia. rbiPS kolónia morfológiája (bal panel), GFP-pozitív rbiPS kolónia (középső panel), nyúl alkalikus foszfatáz pozitív iPS-like kolónia (jobb panel)

Az izolált klónok alkalikus foszfatáz pozitivitást mutattak, azonban a további szaporítás, passzálás során eldifferenciálódtak, illetve osztódásuk leállt, egy esetben sem élték túl az ötödik passzálást. Mindez azt jelenti, hogy a pluripotencia egyik fő kritériumát, a folyamatos osztódást nem voltak képesek teljesíteni, osztódási potenciájukat elveszítették. Éppen ezért a tenyésztési

10.14751/SZIE.2015.052

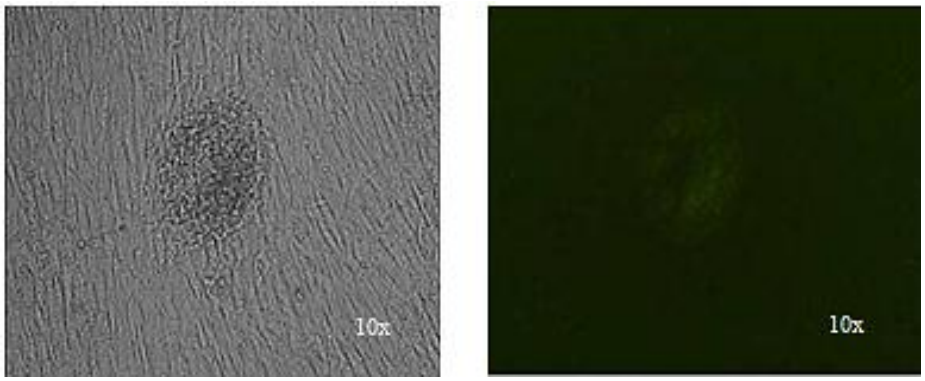
kondíciókon próbáltunk változatni. Teszteltünk különböző típusú inkubátorokat, amelyekkel normál O_2 (21%) és alacsony O_2 (5%) szintű tenyésztési körülményeket biztosítottunk a sejtek számára. A tapasztalatunk az volt, hogy míg a kontrollként használt nyúl ES sejtek az alacsony O_2 szintű inkubátort részesítették előnyben, az iPS sejtek inkább a normál (légköri, 21%) O_2 szintet preferálták **(20. A és B ábra)**.



20. ábra: Nyúl iPS kolónia 5%-os O_2-szintű inkubátorban (A) Nyúl iPS kolónia 21%-os O_2-szintű inkubátorban (B)

A jobb hatékonyság elérése érdekében, a tápláló sejtréteg típusán is változtattunk. Mitomicin-C kezelt egér embrionális fibroblaszt helyett Mitomicin-C kezelt nyúl embrionális fibroblasztot (REF) készítettünk és használtunk (**21. ábra**). A kolóniák ebben az esetben is hamar kialakultak, de a sejtek ismét csak az 5. passzázsig voltak fenntarthatóak, mivel ezt követően differenciálódni kezdtek, így további pluripotencia karakterizálásra már nem adódott lehetőségünk.

10.14751/SZIE.2015.052

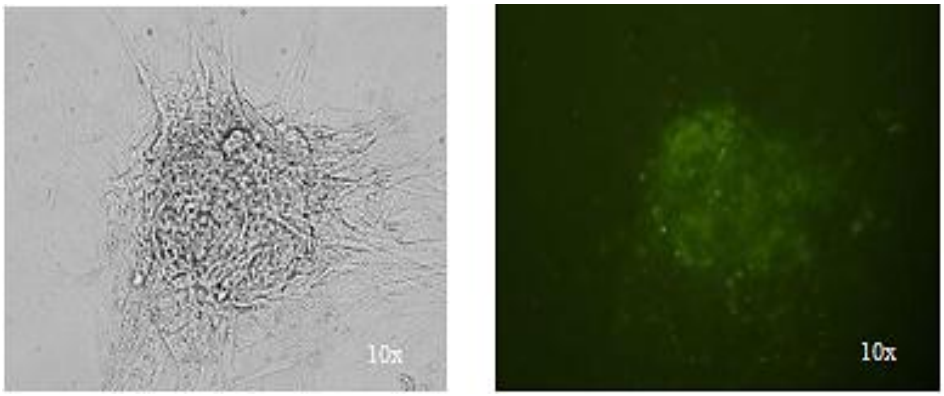


21. ábra: Nyúl iPS kolónia Mitomicin-C kezelt nyúl embrionális fibroblaszt rétegen

4.2.2 Nyúl indukált pluripotens sejtek létrehozása egér génekkel, Lentivírus vektorral

Világszerte verseny folyik egy alacsony kockázatú, nem-retrovirális eredetű, ugyanakkor magas hatásfokú, a pluripotencia gének bejuttatására alkalmas génbeviteli eljárás megtalálására. Célunk egy új rendszer kifejlesztése volt nyúlban, egy ún. policisztronikus, eltávolítható (deletálható) lentivírus konstrukció alkalmazásával, amely jelentősen lecsökkenti a génfunkciók befolyásolásának és malignus transzformációk kialakulásának kockázatát. A nyúl iPS sejteket nyúl fibroblaszt sejtek transzdukciójával kívántuk előállítani egy policisztronikus lentivírus konstrukciót felhasználva (Carey *et al.* 2009), amely mind a négy szükséges pluripotencia gént expresszálja (*OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC*) egy ún. egyszeri integrálódású provirális génkópiáról. A lentivírus konstrukciók 3' LTR régiójában LoxP szekvenciákat is elhelyeztünk, amely lehetővé teszi a teljes konstrukció későbbi eltávolítását.

A transzdukció eredményeképpen, a transzfekciót követő 15-20 napon belül az embrionális őssejtek morfológiájához hasonló telepek (iPS sejttelepek) jelentek meg, amelyek növekedésnek indultak **(22. Ábra)**.



22. ábra: Nyúl GFP-pozitív iPS-like kolónia

10.14751/SZIE.2015.052

Napi médiumcserét követően a megnövekedett telepet pipettahegy vagy üvegkapilláris segítségével felvettük, collagenase II-vel vagy tripszinnel és pipetázással kisebb sejtcsomókká szedtük szét és új Mitomicin-C kezelt tápláló sejtrétegre helyeztük.

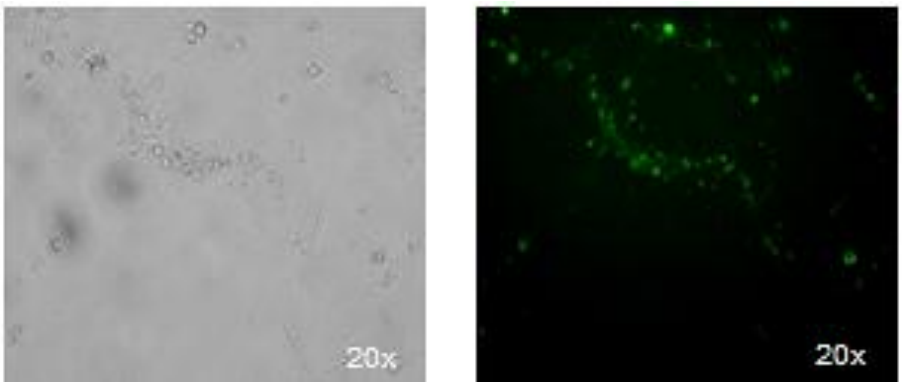
Kolóniák ebben az esetben a Mitomicin-C kezelt tápláló sejtrétegre helyezés után már nem alakultak ki. A legtöbb sejt elpusztult, a letapadó sejtcsomók pedig differenciálódásnak indultak, így elmondható, hogy lentivírus transzdukcióval és egér gének használatával nem tudtunk sikeresen nyúl iPS vonalat alapítani.

4.3 Nyúl indukált pluripotens sejtek létrehozása humán génekkel

Az előző kísérletsorozatot értékelve elmondható, hogy az egér pluripotencia gének alkalmazása az újraprogramozás során sem SB, sem pedig lentivírus alapú újraprogramozó rendszerrel nem vezetett eredményre. Az eredményességet a tenyésztési paraméterek adaptálása, finomítása sem hozta meg. Ezért az újraprogramozó faktorok humán szekvenciára történő cseréje mellett döntöttünk. Mivel a humán újraprogramozó faktorok szekvenciái a nyúl ortológokkal nagyobb homológiát mutatnak, mint az egér génekkel, azt reméltük, hogy e faktorok használatával nagyobb sikerrel járhatunk.

4.3.1 Nyúl indukált pluripotens sejtek létrehozása humán génekkel, Sleeping Beauty vektorral

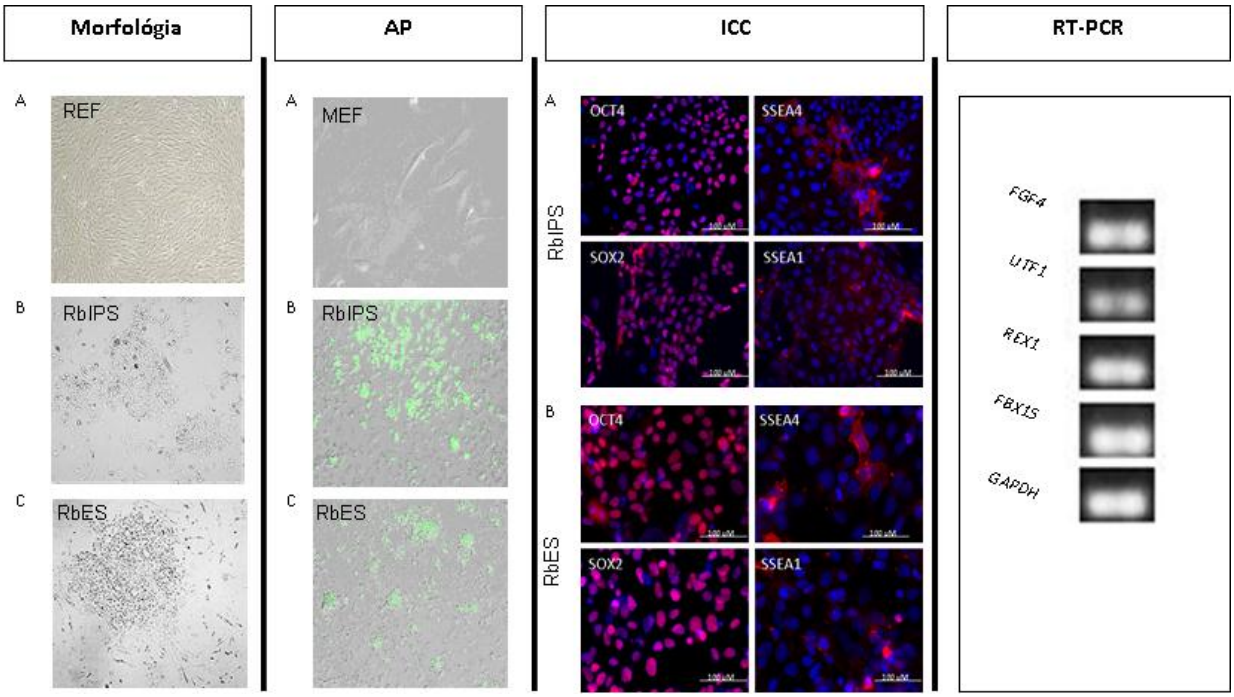
Ebben az esetben is nyúl fibroblaszt sejteket használtunk újraprogramozandó szomatikus sejtekként. A transzdukció hatékonyságát a konstrukcióban lévő eGFP riporter gén segítségével is detektálni tudtuk az iPS-szerű kolóniakezdeményeknél **(23. ábra)**.



23. ábra. GFP expresszió a visszaprogramozott nyúl fibroblaszt sejtekben 2 nappal a transzdukciót követően

10.14751/SZIE.2015.052

Ezt követően, 6 héttel a transzfekció után a sejtek kolóniaformát kezdtek felvenni. A sejtvonalat több mint 30 passzázson keresztül tartottuk fent. A pluripotencia igazolását alkalikus foszfatáz festéssel igazoltuk az élő sejteken. További karakterizálás céljából mRNS-t izolálunk a nyúl iPS sejtekből és az endogén pluripotencia markerek expresszióját RT-PCR módszerrel teszteltük. Minden vizsgálatba vont pluripotens sejtvonal pozitív festődést mutatott alkalikus foszfatázra és az OCT4, SOX2, SSEA4 pluripotencia markerek esetében is, de nem volt specifikus az SSEA1 esetében. RT-PCR analízis során pedig az endogén gén expresszió vizsgálatakor, a RbiPS sejtvonal pozitív expressziót mutatott az *FGF4, UTF1, REX1, FBX15* gének esetében is. **(24 ábra)**.



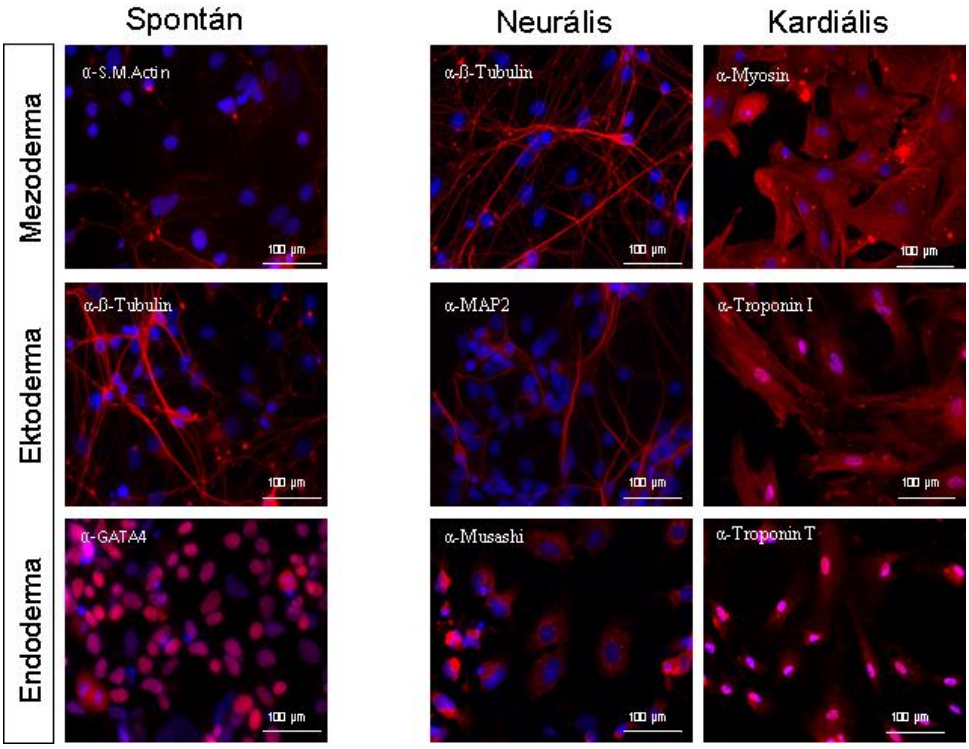
24. ábra. Nyúl iPS sejtek karakterizálása. Morfológia. A még transzdukálatlan sejtek morfológiája (A), a generált nyúl iPS sejtek morfológiája (B) a kontroll nyúl ES sejtek morfológiája (C); Alkalikus foszfatáz festés (AP). Negatív kontrollként egér embrionális fibroblasztot használtunk (Mouse Embryonic Fibroblast, MEF) (A) A generált rbiPS vonal sejtjei a pozitív kontrollként használt rbES sejtekhez hasonló kolóniákat formálnak és alkalikus foszfatáz festésre is pozitívak (B). Pozitív kontrollként nyúl ES sejteket használtunk (C); Immunofluorescens festés (ICC) A rbiPS sejtek immuncitokémai festése (A) Pozitív kontroll rbES sejtvonal immuncitokémai festése (B). Minden vizsgálatba vont sejtvonal pozitív festődést mutatott az OCT4, SOX2, SSEA4 pluripotencia markerek esetében, de nem volt specifikus az SSEA1 esetében.; RT-PCR analízis az endogén gén expresszió vizsgálatára. A sejtvonal pozitív expressziót mutatott az FGF4, UTF1, REX1, FBX15 gének esetében. Pozitív kontrollként GAPDH primereket alkalmaztunk.

Sikeresen izoláltunk 4 klónt, amelyeket felszaporítottunk és ezekből 1 klónt kiválasztottunk, melyet pluripotencia markerekre karakterizáltunk.

A sejtek *in vitro* differenciálódási potenciálját spontán és irányított differenciáltatási kísérletekben került meghatározásra, ahol a sejtek mind spontán, mind pedig indukált neurális

10.14751/SZIE.2015.052

és szívizom irányú differenciációt mutattak. A sejtek a spontán differenciáció során pozitívak voltak Smooth-Muscle Actin-ra (mezoderma marker), βIII-tubulinra (ektoderma marker), GATA4-ra (endoderma marker), irányított differenciáció során ßIII-tubulinra (korai neurális marker), MAP-2-ra (kései neurális marker), Musashira (osztódó neurális progenitor marker), Myosin-ra (kardiális marker) Troponin I-re (kardiális marker), Troponin T-re (kardiális marker) **(25. ábra)**.



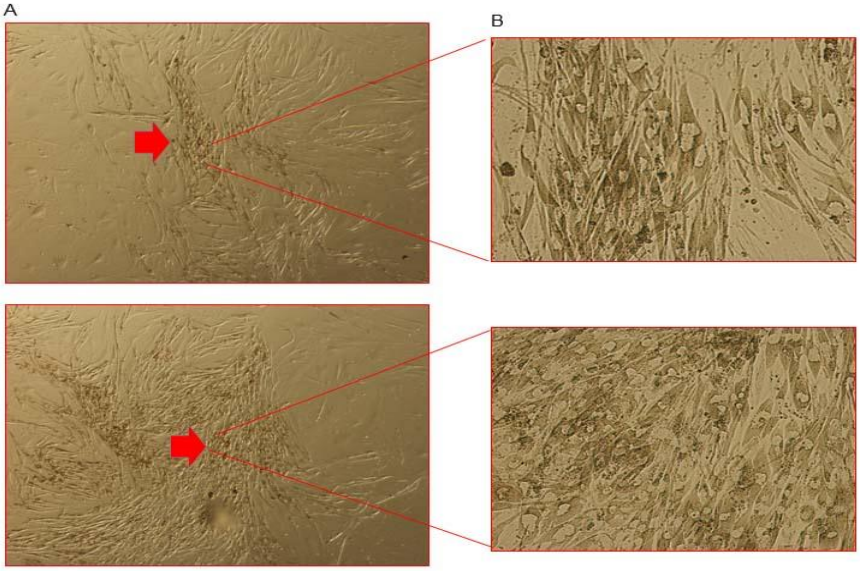
25. ábra: Immunfluorescens festés. A rbiPS vonalakat spontán és irányítottan neurális és kardiális irányba differenciáltattuk. A sejtek a spontán differenciáció során pozitívak voltak Smooth-Muscle Actin-ra (mezoderma marker), βIII-tubulinra (ektoderma marker), GATA4-ra (endoderma marker), irányított differenciáció során ßIII-tubulinra (korai neurális marker), MAP-2-ra (kései neurális marker), Musashira (osztódó neurális progenitor marker), Myosin-ra (kardiális marker) Troponin I-re (kardiális marker), Troponin T-re (kardiális marker)

4.3.2 Nyúl indukált pluripotens sejtek létrehozása humán génekkel, Lentivírus vektorral

Nyúl iPS sejtek generálásáról időközben 2010 során jelent meg publikáció egy japán csoport, Honda és munkatársai által, így következő kísérleti megközelítésben, ennek a kutatócsapatnak a protokollját próbáltuk megismételni. Ebben az esetben, a kísérleteinkben eddig is alkalmazott fibroblaszt sejteket, illetve a Honda csoport által is alkalmazott máj sejteket használtuk újraprogramozandó, szomatikus sejtekként. A két különböző sejttípus használatakor különbséget nem tapasztaltunk. A transzdukciót követő két héten belül a sejtek

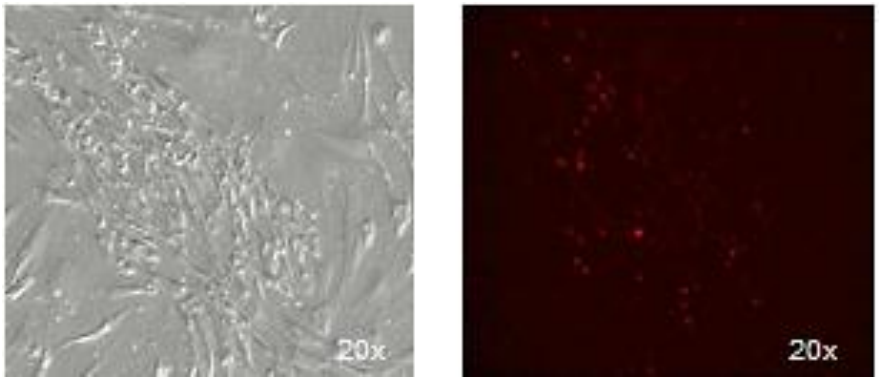
10.14751/SZIE.2015.052

az ES/iPS sejtekre jellemző morfológiát kezdtek felvenni és kolóniát formáltak **(26. ábra)**. A sejtvonalat több mint 30 passzázson át tartottuk fent.



26. Ábra. Nyúl iPS sejtvonal generálása humán pluripotencia markerekkel. Két héttel a transzdukciót követően a sejtek elkezdtek clustereket képezni (piros nyíl az A ábrán) illetve az eredeti morfológiájuk is megváltozott a sejtmag/citoplazma aránya (B) amely az embrionális őssejtekre jellemző

A transzdukció hatékonyságát a konstrukcióban lévő dTomato riporter gén segítségével is detektálni tudtuk az iPS-szerű kolóniakezdeményekben **(27. ábra)**.

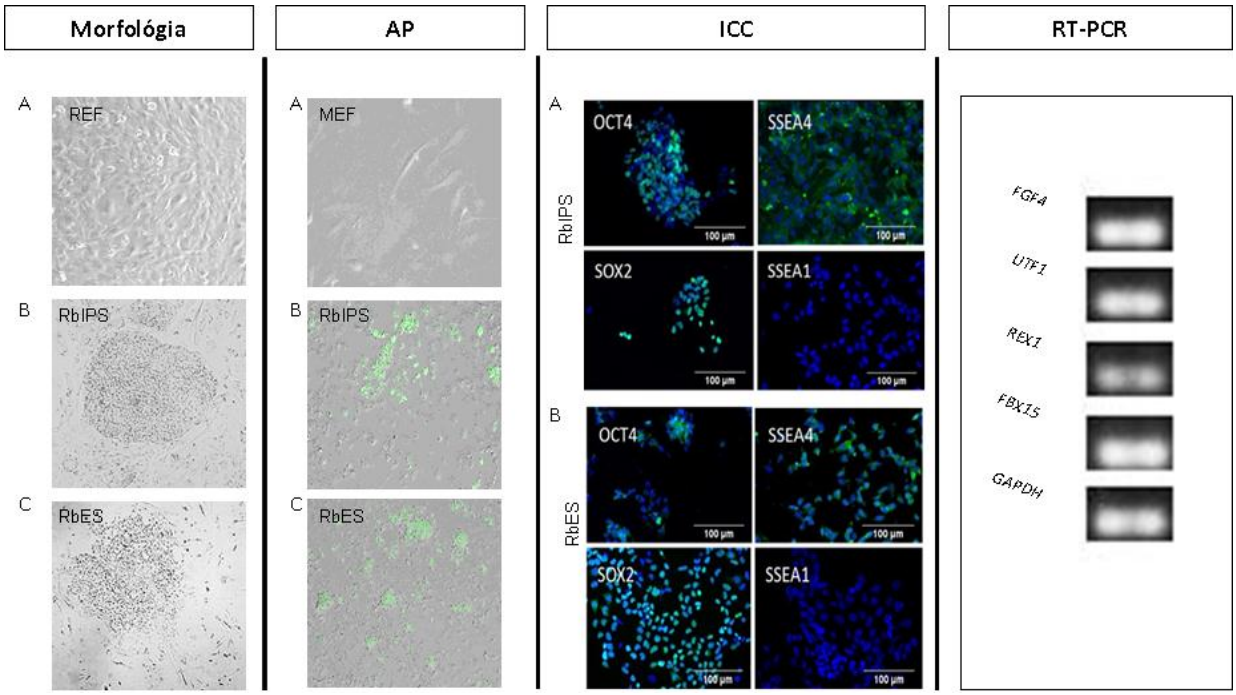


27. ábra: dTomato-pozitív iPS-like kolónia kezdemény. Nyúl máj sejtek morfológiája 2 nappal a transzdukciót követően (bal panel), dTomato expresszió a nyúl máj sejtekben 2 nappal a transzdukciót követően (jobb panel)

Ezt követően immunhisztokémiai módszerekkel ellenőriztük, hogy a sejtek expresszálják-e az őssejtekre jellemző pluripotencia géneket. Elsőként alkalikus foszfatáz festést alkalmaztunk az élő sejteken. További karakterizálás céljából mRNS-t izoláltunk a nyúl iPS sejtekből, valamint ezzel párhuzamosan a pluripotencia markerek expresszióját immunfluorescens festéssel teszteltük. Minden vizsgálatba vont pluripotens sejtvonal pozitív festődést mutatott alkalikus foszfatázra és az OCT4, SOX2, SSEA4 pluripotencia markerek

10.14751/SZIE.2015.052

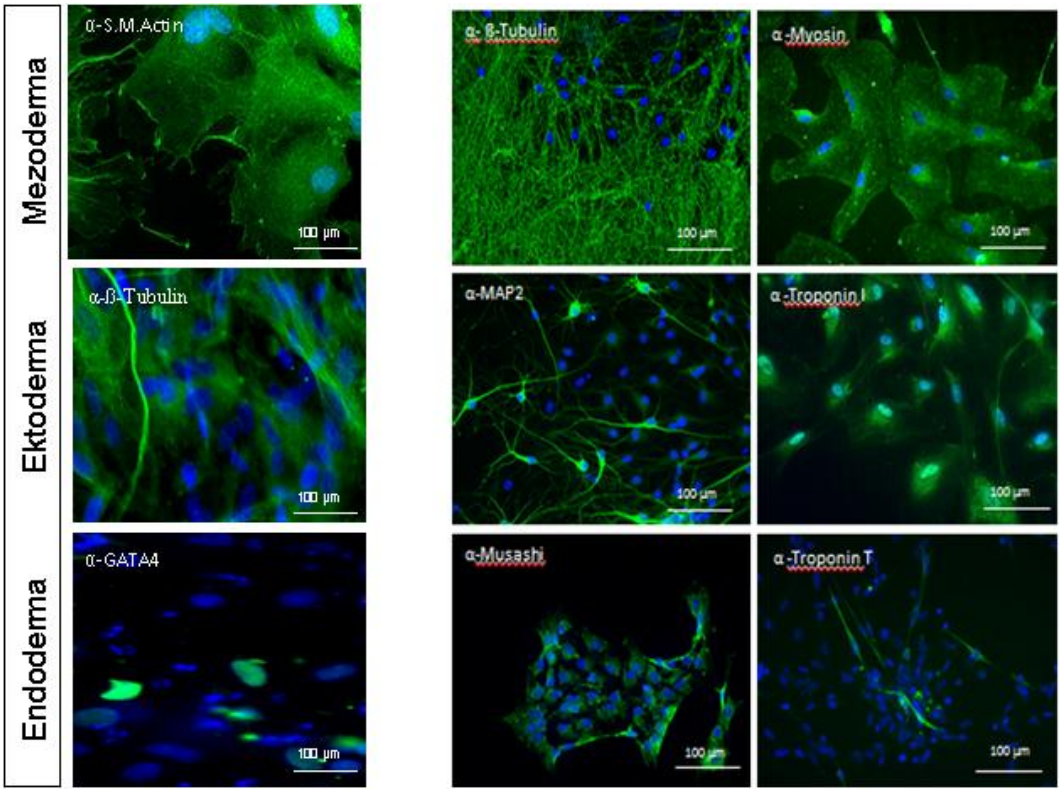
esetében is, de nem volt specifikus az SSEA1 esetében. RT-PCR analízis során pedig az endogén gén expresszió vizsgálatakor, a RbiPS sejtvonal pozitív expressziót mutatott az *FGF4, UTF1, REX1, FBX15* gének esetében is. **(28. ábra)**.



28. ábra. Nyúl iPS sejtek karakterizálása. Morfológia. A még transzdukálatlan sejtek morfológiája (A), a generált nyúl iPS sejtek morfológiája (B) a kontroll nyúl ES sejtek morfológiája (C); Alkalikus foszfatáz festés (AP). Negatív kontrollként egér embrionális fibroblasztot használtunk (Mouse Embryonic Fibroblast, MEF) (A) A generált rbiPS vonal sejtjei a pozitív kontrollként használt rbES sejtekhez hasonló kolóniákat formálnak és alkalikus foszfatáz festésre is pozitívak (B). Pozitív kontrollként nyúl ES sejteket használtunk(C); Immunofluorescens festés (ICC) A rbiPS sejtek immuncitokémai festése (A) Pozitív kontroll rbES sejtvonal immuncitokémai festése (B). Minden vizsgálatba vont sejtvonal pozitív festődést mutatott az OCT4, SOX2, SSEA4 pluripotencia markerek esetében, de nem volt specifikus az SSEA1 esetében.; RT-PCR analízis az endogén gén expresszió vizsgálatára. A sejtvonal pozitív expressziót mutatott az FGF4, UTF1, REX1, FBX15 gének esetében. Pozitív kontrollként GAPDH primereket alkalmaztunk.

A sejtek *in vitro* differenciálódási potenciálja spontán, valamint indukált szívizom és neurális irányú differenciáltatási kísérletekben határoztuk meg, a korábbiakkal megegyező módon. A sejtek a spontán differenciáció során pozitívak voltak Smooth-Muscle Actin-ra (mezoderma marker), βIII-tubulinra (ektoderma marker), GATA4-ra (endoderma marker), irányított differenciáció során ßIII-tubulinra (korai neurális marker), MAP-2-ra (kései neurális marker), Musashira (osztódó neurális progenitor marker), Myosin-ra (kardiális marker) Troponin I-re (kardiális marker), Troponin T-re (kardiális marker) **(29. ábra)**.

10.14751/SZIE.2015.052



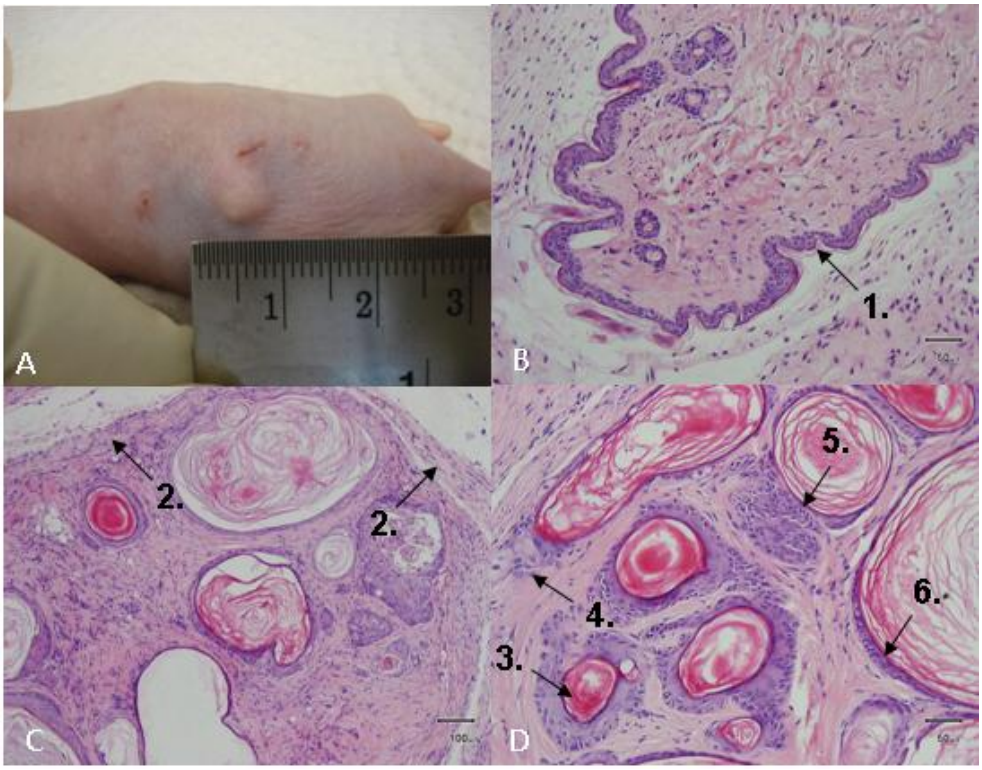
29. ábra: Immunfluorescens festés. A rbiPS vonalakat spontán és irányítottan neurális és kardiális irányba differenciáltattuk. A sejtek a spontán differenciáció során pozitívak voltak Smooth-Muscle Actin-ra (mezoderma marker), βIII-tubulinra (ektoderma marker), GATA4-ra (endoderma marker), irányított differenciáció során ßIII-tubulinra (korai neurális marker), MAP-2-ra (kései neurális marker), Musashira (osztódó neurális progenitor marker), Myosin-ra (kardiális marker) Troponin I-re (kardiális marker), Troponin T-re (kardiális marker)

Ebben az esetben a sejtvonal kromoszómaszámát és kariotípusát is sikeresen meghatároztuk, amely bizonyította, hogy az alapított sejtvonal a nyúlra jellemző normális kariotípust mutat, 44-es diploid kromoszómaszámmal **(30. ábra)**.

30. ábra: RbiPS sejtvonal kariotipizálása. A sejtvonal megfelelő számú kromoszómával rendelkezik (*Oryctolagus cuniculus*, 2n = 44)

10.14751/SZIE.2015.052

A teratóma formálódás képességének vizsgálatakor a teratóma az injektálást követően két és fél hónap alatt fejlődött ki, és ezután került izolálásra. A teratóma hisztológiai feldolgozása során Hematoxilin-eozin festésekkel igazoltuk a három csíravonal (endoderma, mezoderma, ektoderma) irányú *in vivo* differenciálódást, vagyis a három csíralemezre jellemző sejttípusok megjelenését **(31. ábra)**.



31. ábra: A nyúl iPS sejtek teratóma formálódási képessége.
A formálódott teratóma két és fél hónappal az injektálást követően (A); Hematoxilin-eozin festéssel kimutatott endodermális (1. légúti csillós hám) (B), mezodermális (2. harántcsíkolt izom) (C) és ektodermális (3. elszarusodó laphám, 4. faggyúmirigy, 5. leváló szarurétegek, 6. keratohialin granulumok) (D) réteg.

4.4 Nyúl iPS sejtek létrehozására alkalmas faj-specifikus újraprogramozó konstrukció előállítása és funkcionalitásának tesztelése

Az egér és humán szekvenciák alkalmazásával végzett újraprogramozási kísérletek megmutatták, hogy több különböző újraprogramozási rendszer használatával sem sikerült egér géneket használva, iPS sejtvonalakat létrehoznunk nyúl sejtekből, mivel az izolált iPS-szerű kolóniák instabilak voltak. Ezzel szemben a humán faktorok alkalmazása sikerre vezetett mindkét újraprogramozó módszer esetében. Ugyanakkor a két módszer irodalomban közölt hatékonysága egér és humán kísérleti rendszerben (vagyis egér géneket használva egér sejtek újraprogramozására, illetve humán géneket használva humán sejtek újraprogramozására), jóval nagyobb hatékonyságú az általunk nyúlon tapasztaltnál.

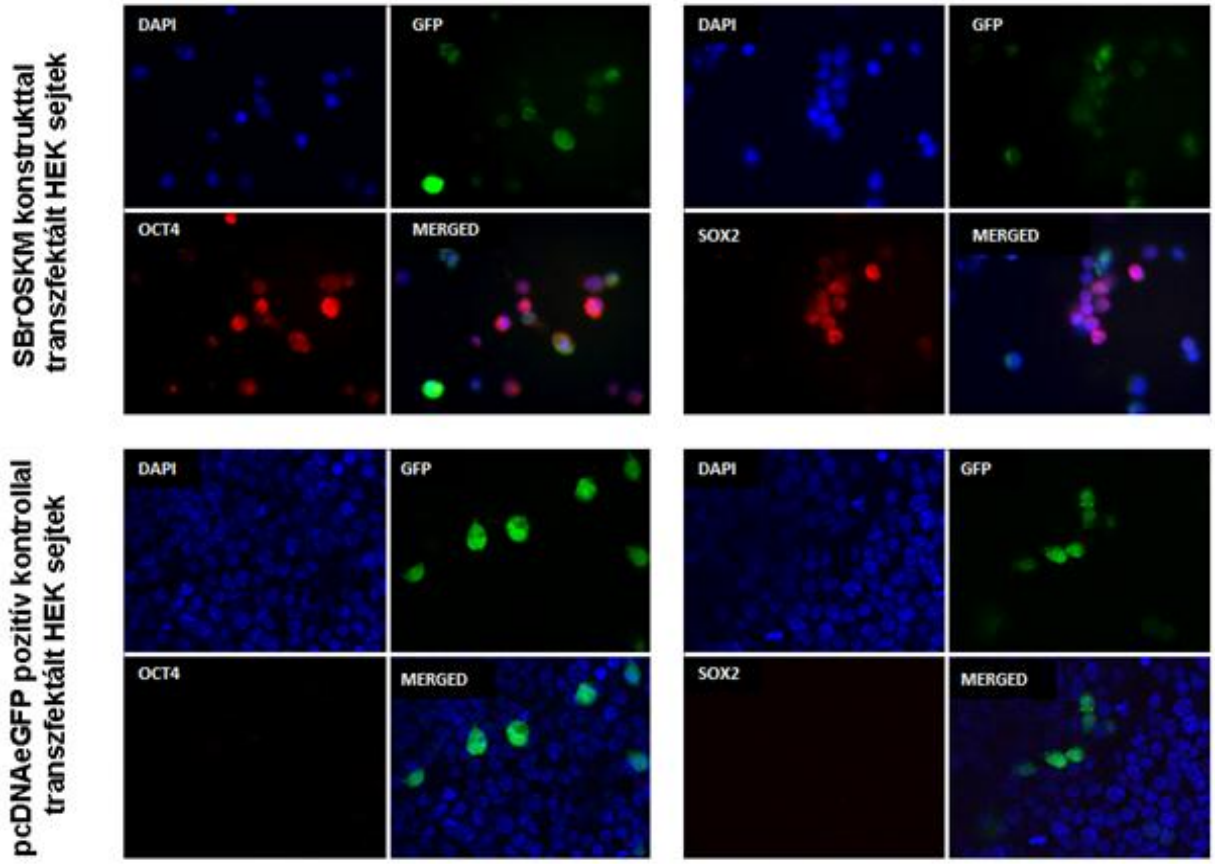
10.14751/SZIE.2015.052

Ezért felmerül a kérdés, vajon faj-azonos nyúl szekvenciákat használva az újraprogramozáshoz hatékonyabb és stabilabb újraprogramozó rendszer nyerhető-e.

Az általunk újonnan izolált nyúl újraprogramozó faktorokat tartalmazó konstrukciót az „Anyag és Módszer" részben már ismertetett Gibson Assembly technikával hoztuk létre. Ehhez alapként az egér és humán génekkel már alkalmazott Sleeping Beauty konstrukciót használtuk fel, melyből az addigi újraprogramozó kazettát eltávolítva, az általunk izolált nyúl *OCT4, SOX2, KLF4* és *C-MYC* génekkel helyettesítettük azokat.

A konstrukció szekvenciáját szekvenálással ellenőriztük, hatékonyságát pedig HEK293T sejtekbe való transzfektálás során tanulmányoztuk, majd ennek pozitív eredményét immunfestés segítségével bizonyítottuk. Az immunfestéshez a karakterizálás során már eddig is alkalmazott OCT4 és SOX2 ellenanyagokat használtuk. Pozitív kontrollként a sejteket pcDNAeGFP vektorral is transzfektáltuk. Az immunfestés során egyértelműen kimutatható volt az OCT4, SOX2 és az SB konstrukcióban található eGFP riporter gén expressziója az általunk létrehozott SBrOSKM konstrukcióval transzfektált HEK sejtekben. Ahogyan vártuk, nem észleltünk OCT4 és SOX2 expressziót a csak pcDNAeGFP plazmiddal transzfektált sejtek esetében. A transzfektálás hatékonyságát bizonyító eGFP expresszió viszont ebben az esetben is kimutatható volt **(32. ábra)**.

10.14751/SZIE.2015.052



32. ábra: SBrOSKM és pcDNAeGFP (pozitív kontroll) vektorokkal transzfektált HEK293T sejtvonal az SBrOSKM konstrukció funkcionalitásának ellenőrzésére.

10.14751/SZIE.2015.052

4.5 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Sikeresen izoláltam és határoztam meg a nyúl *SOX2, NANOG, KLF4, C-MYC* gének kódoló régióját, amelyet a Génbank adatbázisában regisztráltak a következő azonosító számokkal: KJ939365, KM267140, KJ708483, KJ708482.

2. Elsőként azonosítottam a *SOX2, NANOG, KLF4, C-MYC* nyúl pluripotencia markerek teljes kódoló régióját preimplantációs korú nyúl embriókon, a konszenzus szekvenciára tervezett primerekkel. Ezen gének lehetővé tehetik nyúl testi sejtek újraprogramozását.

3. Sikeresen azonosítottam az *FGF4, UTF1, REX1, FBX15* nyúl pluripotencia markerek mRNS részletét preimplantációs korú nyúl embriókon, a konszenzus szekvenciára tervezett primerekkel. Ezen gének lehetővé teszik nyúl iPS sejtek endogén génexpressziójának kimutatását.

4. Faj-specifikus primereket terveztem és faj-specifikus RT-PCR reakciókat dolgoztam ki a pluripotencia gének nyúlban történő expressziójának kimutatására, *OCT4, SOX2, NANOG, KLF4, C-MYC, FGF4, FBX15, UTF1 és REX1* gének esetében. Ezen RT-PCR reakciók felhasználásával, sikerrel vizsgáltam az *OCT4, SOX2, NANOG, KLF4, C-MYC* gének expresszióját nyúl preimplantációs korú embrióban és felnőtt szövetekben is.

5. Egér és humán pluripotencia gének policisztronos vektor általi bejuttatásával a világon először hoztam létre nyúl iPS sejteket transzpozonos (Sleeping Beauty) és lentivirális technológiával egyaránt. A létrehozott sejtvonalakat karakterizáltam és tulajdonságaikat összehasonlítottam pluripotens ES sejtekkel.

6. Az általam azonosított nyúl pluripotencia gének felhasználásával elsőként faj-specifikus újraprogramozó konstrukciót hoztam létre.

10.14751/SZIE.2015.052

5 EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE ÉS JAVASLATOK

5.1 Nyúl pluripotencia gének azonosítása

Kísérleti rendszerünkben azokat a transzkripciós faktorokat vizsgáltuk, amelyek a pluripotens sejtek differenciálódásának megakadályozásában, a pluripotencia megőrzésében, az önmegújulásban játszanak szerepet. Napjainkra már számos ilyen gén és szabályozó fehérje ismert. Ezek közül mi az OCT4, NANOG, SOX2, KLF4, C-MYC, FGF4, REX1, UTF1, FBX15 fehérjéket választottuk vizsgálataink tárgyává.

Ahhoz, hogy az említett fehérjéket vizsgálni tudjuk, hólyagcsíra állapotú nyúl embrióból származó mRNS pool cDNS-é történő átírását követően specifikus primerek segítségével PCR reakció során amplifikáltuk majd izoláltuk az *OCT4, NANOG, SOX2, KLF4, C-MYC, FGF4, REX1, UTF1, FBX15* szekvenciákat. A kimutatáshoz a primereket az eddig ismert és publikált ortológ szekvenciák összehasonlítását követően, valamint a Rabbit Genom Resources adatbázisban elérhető szekvenciákat felhasználva terveztük.

A PCR termékeket izoláltuk, plazmid vektorba klónoztuk és szekvenáltuk, majd az *OCT4, NANOG, SOX2, KLF4, C-MYC* cDNS-t expressziós vektorba klónoztuk.

Munkánk során sikeresen azonosítottuk minden kiválasztott gént a nyúl genomban, kidolgoztunk egy a gének expresszióját kimutató eljárást és faj- és génspecifikus primereket. Így a fajspecifikus primerekkel lehetőségünk nyílt a gének expressziójának szövet és fejlődési stádium specifikus vizsgálatára egyaránt. Vizsgáltuk a gének preimplantációs fejlődés során és felnőtt szövetekben betöltött szerepét RT-PCR technika felhasználásával.

A szekvenciák, az ellenőrzéseket követően, az NCBI adatbázisába kerültek feltöltésre a következő azonosító számokkal: *OCT4*: KJ708484, *SOX2*: KJ939365, *KLF4*: KM267140, C-*MYC*: KJ708483, *NANOG*: KJ708482.

Az OCT4-nél a fehérje szekvenciát idő közben egy független csoport publikálta, ezért ebben az esetben már ezt a referenciát használtuk (Shi et al. 2008). A leközölt szekvenciát összehasonlítva a saját magunk által izolált és meghatározott szekvenciával 11 (3%) aminosav eltérést detektáltunk (Shi et al. 2008).

Hasonló eltérést tapasztaltunk a SOX2 esetében is, ahol 18 aminosavnyi eltérést mutattunk ki az adatbázisban prediktált szekvenciához képest. Meglepő módon a Gnomon szoftver által biztosított számítógépes analízis 9 aminosav hosszúságú glicin ismétlődést

10.14751/SZIE.2015.052

mutatott a prediktált SOX2 szekvencia N-terminuszán, amely a mi szekvenciánkban nem volt megtalálható.

A C-MYC és NANOG szekvenciák szinte teljes egyezést mutattak az adatbázisban található, prediktált változatokkal, habár a NANOG esetében a kódoló régió hosszában találtunk eltérést, mivel mi 50 aminosavval előbb detektáltuk a stop kodont (TGA), mint azt a számítógépes analízis tette.

Elsőként sikerült azonosítanunk a nyúl *KLF4*-et, amelynél csak szekvenciatöredék volt található, predikcióként is az adatbázisban (GenBank). Habár több mint 200 aminosav hiányzott a prediktált szekvenciából, a prediktált és a kísérletesen meghatározott *KLF4* szekvenciarész az összeillesztés során teljes homológiát mutatott az N- és C- terminuson is.

Annak érdekében, hogy az exon-intron határokat is meg tudjuk határozni, a már azonosított kódoló régiókat az adatbázisban található genomi szekvenciához illesztettük, és ezáltal az *OCT4, SOX2, C-MYC és NANOG* gének splicing struktúráját is sikerült determinálnunk. A splicing struktúrák az *OCT4, SOX2, C-MYC* gének esetén nagy hasonlóságot mutatott a humán ortológokkal.

A KLF4 esetében a nyúl mRNS szekvenciát a humán és egér ortológ genomi DNS-hez illesztettük. Az illesztés és a splicing szignálok további manuális ellenőrzésének segítségével prediktáltuk az exon-intron határokat ezen gén esetében is.

Ezt követően beazonosítottuk az *OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC és NANOG* gének kromoszómán való elhelyezkedését a Rabbit Genom Resources Adatbázis számítógépes analízisének segítségével. Az OCT4 esetében, a már lepublikált adatokkal (Shi et al. 2008) egyetértésben, az *OCT4* gént a 12-es kromoszómán helyeztük el. A többi gén esetében pedig, vizsgálatunk során a nyúl *SOX2* a 14-es kromoszómán, a *KLF4* az 1-es kromoszómán, a *C-MYC* a 3-as kromoszómán és a *NANOG* a 8-as kromoszómán foglal helyet, elhelyezkedésükben nagy hasonlóságot mutatva a humán ortológokkal.

A továbbiakban az evolúciós konzerválódás mértékét is vizsgáltuk filogenetikai analízis segítségével. A nyúl kódoló és fehérje szekvenciák humán, egér és szarvasmarha ortológokkal való összehasonlítása során kiderült, hogy a *SOX2* gén olyan erősen konzerválódott, hogy csupán csak 0.6-2.85 %-os különbséget fedeztünk fel a vizsgált fajok fehérje szekvenciái között, azaz csak 6 nukleotidnyi és 2 aminosavnyi eltérést. Az OCT4, KLF4 és C-MYC esetében is észrevettük az evolúciós konzerváltságot, mindeközben a NANOG jelentősen eltér, mind nukleotid és aminosav szinten, részben a nyúlban előrébb található stop kodonnak köszönhetően. Ami a kódoló szekvenciákat illeti, a macska mutatja a legmagasabb hasonlóságot a nyúllal, kivéve a nyúl KLF4 esetében, ahol a legmagasabb homológiát a

10.14751/SZIE.2015.052

szarvasmarha szekvenciával találtunk. A humán és macska fehérje szekvencia ebben az esetben egyenlő mértékben hasonlít a nyúl OCT4-hez. A *NANOG* gén esetében a legkisebb a különbség a humán és nyúl szekvenciák között volt. A nyúl C-MYC evolúciósan közelebb áll a szarvasmarha és macska ortológokhoz, mivel mindegyik N-terminusáról hiányzik egy 15 aminosav hosszúságú túlnyúló rész, amely a humán és egér esetében viszont megtalálható.

Hogy megvizsgáljuk az újonnan azonosított gének funkcióját, rákerestünk azokra a konzerválódott doménekre, amelyeket a humán fehérjéknél is publikáltak már. Minden egyes domén, amely jelen van a humán gének esetében, erősen konzerváltan a nyúl géneknél is megtalálható. Érdekes módon, a humán és nyúl Cink-ujjas dupla domén (Zink-finger domain) a KLF4 esetében tökéletesen (100%-ban) megegyezik. Ezen felül majdnem teljes homológia vehető észre a SOX2 SOXp és SOX-TCF HMG-box és a C-MYC Helix-loop-helix doménjének esetében. Az utolsó, de még mindig magasnak mondható hasonlóságot a NANOG homeodomén esetében vettünk észre, amely 91.4% volt.

A gének preimplantációs fejlődésben betöltött szerepének vizsgálatakor elmondható, hogy a humán pluripotens génexpresszióhoz hasonló mintázatot kaptunk. A humán és egér *OCT4* esetében eleinte az anyai mRNS expressziója jellemző, majd az embrionális genomaktivációt követően folyamatosan jelen van a transzkriptum egészen a blasztociszta stádium eléréséig, ahol az ICM-ben és az epiblasztból differenciálódó sejtekben detektálható (Palmieri et al. 1994; Ovitt és Schöler, 1998; Adjaye et al. 1999; Cauffman et al. 2005; Kimber et al. 2008).

Az egér *SOX2* elsőként 2 sejtes állapotban detektálható, majd ezt követően a blasztociszta stádium eléréséig expresszál (Avilion et al. 2003). Ezzel szemben az emberben az anyai *SOX2* csak 4 sejtes stádiumban aktiválódik, majd expressziós mintázata az egérhez hasonló a genom aktivációt követően (Kimber et al. 2008; Cauffman et al. 2009).

A *NANOG* expressziója emberben elsőként 8 sejtes stádiumban, egérben morula stádiumban detektálható (Hatano et al. 2005; Kimber et al. 2008; Cauffman et al. 2009).

Korábbi tanulmányok a nyúl OCT4 embrionális fejlődés során betöltött szerepének fontosságát már bebizonyították (Mamo et al. 2008; Kobolak et al. 2009; Chen et al. 2012a; Chen et al. 2012b. Chen et al. 2013). Míg egy másik publikációban a nyúl *OCT4, SOX2, NANOG* és *KLF4* expressziós szintjét vizsgálták kvantitatív PCR-rel a preimplantációs fejlődés során (Henderson et al. 2014). Eredményeink a korábban közölt eredményeket igazolták (Táncos et al. 2015).

A szöveti expresszió vizsgálatakor szintén a humán pluripotencia génexpresszióhoz hasonló mintázatot kaptunk.

10.14751/SZIE.2015.052

Eredményeinkhez hasonlóan, a humán *OCT4* expressziója is leírásra került már különböző felnőtt szövetekben (Tai et al. 2005; Zangrossi et al. 2007; Atlasi 2008). Az egér *OCT4* expresszióját kimutatták már vesében (Gupta et al. 2006; Sagrinati et al. 2006), tüdőben (Ling et al. 2006) agyban (Davis et al. 2006; Okuda et al. 2004) és májban (Beltrami et al. 2007).

A humán *SOX2* jelen van az agyban, tüdőben, hasnyálmirigyben, prosztatában, herében, vékonybélben és gyomorban (Nakatsugawa 2011).

A *KLF4* expressziója humán epidermiszben került leírásra (Bieker et al. 2001; Zheng et al. 2009). Az egér *SOX2* és *KLF4* jelenlétét kimutatták számtalan felnőtt epitheliális szövetben (Arnold et al. 2011; Li et al. 2012).

A humán és egér *C-MYC* minden aktívan proliferáló sejtet tartalmazó szövetben kimutatható volt (pl.: bőr), viszont nem osztódó sejtekben nem volt jelen (Semsei et al. 1989; Mattsson 2006).

A humán és egér *NANOG* expressziója szintén számos felnőtt testi sejtben kimutatásra került (Hart et al. 2004; Ambady et al. 2010).

Így azt a következtetést vonhattuk le, hogy a vizsgált nyúl pluripotencia gének expressziójának mintázata a humán expressziós mintázathoz hasonlít leginkább. A jövőben tervezzük az expresszió vizsgálatát kvantitatív Real-Time PCR segítségével is megvizsgálni, a még hatékonyabb összehasonlítás érdekében.

Az általunk izolált pluripotencia szekvenciák lehetőséget adhatnak nyúl fehérjére specifikus ellenanyagok előállítására is, hiszen ezidáig ilyen antitestek még nem jelentek meg kereskedelmi forgalomban. Ezeknek az ellenanyagoknak nagy jelentőségük lehetne a nyúl pluripotencia és embrionális fejlődés vizsgálatakor, mivel a jelenleg erre a célra használt humán specifikus antitestek, az epitóp régiók nagymértékű homológiája ellenére sem minden esetben működnek megfelelően.

Ezentúl az általunk izolált pluripotencia faktoroknak fontos szerepük lehet még a nyúl pluripotens őssejtek vizsgálatában, szelektálásában, valamint a megfelelő minőségű, stabil nyúl indukált pluripotens sejtvonalak létrehozásában.

A pluripotens sejtek vizsgálatához használt gének *FGF4, REX1, FBX15, UTF1* esetében az azonosítás technikája megegyezett az előzőekben leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben nem a teljes kódoló régiót izoláltuk, hanem a cDNS részleteket.

A pluripotencia igazolására és az endogén génexpresszió vizsgálatára tervezett *FGF4, UTF1, REX1, FBX15* primereket sikeresen alkalmaztuk a humán újraprogramozó faktorokkal

10.14751/SZIE.2015.052

generált nyúl indukált pluripotens sejtek esetében, ahol a sejtvonal nagyobb stabilitása és hosszabb fenntarthatósága miatt már volt lehetőségünk nagyobb mennyiségű mintagyűjtésre és ennek az RT-PCR vizsgálatnak az elvégzésére is. Egér és humán pluripotens sejtek esetében is, az *OCT4, NANOG, SOX2, KLF4, C-MYC* faktorok mellett ezek a gének a leginkább ismert és éppen ezért a leggyakrabban használt pluripotencia asszociált faktorok, amelyek megbízható markerek lehetnek az újraprogramozott sejtvonalak endogén génexpressziójának kimutatása során.

5.2 Nyúl indukált pluripotens őssejtek generálása

Nyúl iPS vonalaink generálásának megkezdésekor még nem létezett erre a fajra vonatkozó publikáció, mely munkánkat segítette volna, ezért elsőként az egér és patkány iPS sejtek előállításának módszerét vettük alapul (Takahashi et al. 2006; Li et al. 2009). Ezt követően már egy japán kutatócsoport által leközölt eredményre is támaszkodhattunk (Honda et al. 2010), majd pedig egy francia kutatócsoport is publikált sikerrel előállított nyúl iPS vonalakról (Osteil et al. 2013). Mindkét publikációban humán újraprogramozó faktorokat alkalmaztak nyúl iPS sejtek előállításához, hasonlóan a mi stratégiánkhoz. A humán faktorokat tartalmazó konstrukcióink viszont annyiban különböztek a már leírtaktól, hogy a lentivirális és transzpozonos rendszer esetén is mi policisztronos kazettát alkalmaztunk, szemben a tanulmányokban megjelent individuális génbejuttatással. A policisztronos kazetta előnye, hogy használata biztosítja az ekvimolárisan közel azonos fehérje expressziót és így elkerülhető lehet a sejtek részleges visszaprogramozása (Zhang et al. 2011).

Nyúl indukált pluripotens őssejt előállítási kísérleteink eredményeinket alapul véve azt a következtetést vonhatjuk le, miszerint az egér szekvenciát tartalmazó újraprogramozó faktorokkal való újraprogramozás nyúl esetében nem bizonyult hatékonynak. Igaz ugyan, hogy nyúl iPS-szerű kolóniák 2-3 héten belül, tehát viszonylag hamar megjelennek az újraprogramozás során, de morfológiájukban leginkább az egér őssejtekhez hasonlítanak (kerek, domború felszínű, kompakt kolóniák) és néhány passzázs után eldifferenciálódnak. Humán újraprogramozó faktorokkal való visszaprogramozás esetén a hatékonyság már szembetűnően nagyobb. A kolóniák megjelenése ugyan hosszabb időt, 5-6 hetet vett igénybe, azonban a sejtkolóniák morfológiájukban a humán őssejtekhez hasonlítottak (ovális, éles határvonalú, lapos felszínű, kevésbé kompakt kolóniák) és minimum 30 passzázson át fenntartathatóak voltak, bár a sejtpopuláció a passzálások növelésével egyre heterogénebbnek bizonyult. Ezen megfigyelések alapján arra következtettünk, hogy nem az újraprogramozó

10.14751/SZIE.2015.052
rendszer, hanem leginkább az újraprogramozó faktorok „származása” az, ami fontos szerepet játszik a létrehozott nyúl indukált sejtvonalak stabilitásában. Mivel a humán újraprogramozó faktorok szekvenciái a nyúl ortológ szekvenciákkal nagyobb hasonlóságot mutatnak, mint az egér esetében, így nem meglepő, hogy a humán faktorokkal újraprogramozott sejtvonalak sokkal nagyobb stabilitást mutattak és tovább voltak differenciálódás nélkül fenntarthatóak, mint az egér faktorokkal újraprogramozott vonalak.

Elmondható, tehát hogy az egér újraprogramozó faktorok használatával, visszaprogramozó rendszertől függetlenül nem sikerült stabil nyúl iPS sejtvonalat létrehoznunk, míg humán faktorok használatával, lentivirális és transzpozonos rendszer alkalmazása során is stabil nyúl iPS sejtvonalakat generáltunk.

A lentivirális módszer esetén, az egér és humán faktorokat tartalmazó újraprogramozó vektor hatékonyságát pontosan összehasonlítani nem lehet, mivel a kétféle konstrukció, melynek használatára lehetőségünk nyílt, eltérő promoterrel rendelkezett. Ezzel szemben a Sleeping Beauty transzpozonos rendszernél a befogadó plazmid felépítése azonos volt és a kísérletek során csak a policisztronos kazettát változtattuk. Ezért ebben az esetben a három, különböző fajból származó újraprogramozó kazettával történő visszaprogramozás hatékonysága sokkal inkább összevethető egymással.

A policisztronos nyúl újraprogramozó faktorokat tartalmazó konstrukció megalkotásánál azért is választottuk a Sleeping Beauty rendszert, mert egyrészt a stabil sejtvonalakat eredményező humán faktorok bejuttatása során nem találtunk hatékonyságbeli különbséget a transzpozonos és lentivirális módszer között, másrészt a Sleeping Beauty-transzpozon újraprogramozó technológia előnyei közé sorolható még, hogy nem vírus alapú, így alkalmazása során nincs szükség speciális biztonsági eljárásokra. Emellett a transzpozon vektor egy DNS molekula, amely előállítása egyszerűbb és olcsóbb, mint a jelenlegi vírus előállítási protokollok. Habár az integrálódó rendszerek negatív tulajdonságai közé sorolható, hogy azok random módon integrálódnak a genomba, azonban egy korábbi tanulmány azt mutatta, hogy a lentivírussal szemben az SB-transzpozon nagy valószínűséggel nem aktív transzkripciós egységekbe épül be (Mátés et al. 2009; Schröder et al. 2002; Wilson et al. 2007; Wu et al. 2003).

Eredményeink alapján a végső következtetésünk az volt, hogy indukált pluripotens sejtek generálásakor, fajazonos gének használatával a hatékonyság valószínűsíthetően tovább növelhető. Ennek érdekében az általunk elsőként izolált nyúl *OCT4, SOX2, KLF4* és *C-MYC* teljes kódoló régióját felhasználva, fajspecifikus újraprogramozó konstrukciót hoztunk létre. Reményeink szerint ezen konstrukció felhasználásával a későbbiekben lehetőségünk nyílik

10.14751/SZIE.2015.052

hosszú távon stabil, nem differenciálódó nyúl indukált pluripotens őssejtvonalak létrehozására is, amelyek talán nagyobb hatékonysággal formálhatnak teratómát valamint ivarsejt kimérák létrehozására is alkalmasabbak lennének, hiszen ezt idáig egyetlen kutatócsoportnak sem sikerült elérnie nyúl iPS sejtek felhasználásával.

A jövőben tervezzük még a létrehozott sejtvonalakban a transzgén eltávolítását is, mivel tapasztalatunk szerint a transzgén jelenléte pluripotens sejtvonalakban sok esetben negatívan befolyásolhatja a sejtek proliferációját, valamint differenciálódási képességét.

10.14751/SZIE.2015.052

10.14751/SZIE.2015.052

6 ÖSSZEFOGLALÁS

6.1 *Nyúl pluripotencia gének azonosítása*

Az emlős embrió fejlődésében és a pluripotencia kialakításában mai tudásunk szerint több gén együttes kölcsönhatása játszik szerepet. Az általunk vizsgált fehérjék, illetve az azokat kódoló gének géntermékei (mRNS) nem csak a preimplantációs korú embriókban mutathatóak ki, de detektálhatóak az embrionális eredetű őssejtekben is. Az embrionális eredetű őssejtvonalak alkalmas *in vitro* modell-rendszerként szolgálhatnak a sejtek differenciálódása során lejátszódó folyamatok mechanizmusainak megfigyelésére, amelyet az általunk vizsgált gének kimutatásával is tanulmányozhatunk.

6.1.1 Pluripotens sejtek szelektálásához, vizsgálatához, generálásához használt főbb faktorok

Az iPS sejtek generálásához primereket terveztünk a szekvencia hasonlóságok alapján nyúl *OCT4, KLF4, SOX2* és *NANOG* kódoló régiókra, és PCR reakcióval, sikerrel amplifikáltuk a megfelelő fragmenteket.

A nyúl pluripotencia gének magasfokú konzerváltsága miatt feltételezhetjük, hogy a humán pluripotencia génekhez hasonló szerepet töltenek be az embriogenezis során. Ennek érdekében vizsgáltuk az újonnan identifikált gének expressziós mintázatát először preimplantációs korú nyúl embriókban, RT-PCR technika segítségével. A vizsgálat során mind az öt, általunk vizsgált génről megállapítottuk, hogy mindegyik magasan expresszál a preimplantációs fejlődés során. Az *OCT4* és *KLF4* már petesejt stádiumtól expresszál és a korai fejlődés során, miközben a *NANOG* expressziója csak a fertilizáció után aktiválódik. A *C-MYC* és *SOX2* 8 sejtes stádiumban kezd el expresszálni, majd ez megmarad a blasztociszta stádiumú embrióban is. Érdekes módon, a *C-MYC* esetében észleltünk még expressziót 2 sejtes stádiumban is.

A következő lépés a gének expressziós mintázatának megfigyelése volt felnőtt nyúl szövetekben. Ebben az esetben nyúl embrionális őssejtet használtunk pozitív kontrollként (Honda et al. 2008). A nyúl szöveti expressziós vizsgálatakor, mind az öt gén esetében különböző expressziós szintet figyelhettünk meg. Különösen igaz ez az *OCT4* esetében, amely a tüdő kivételével, minden általunk vizsgált szövetben megtalálható volt, bár a májban gyenge jelet mutatott. A *SOX2* és *C-MYC* expresszióját minden általunk vizsgált szövetben

10.14751/SZIE.2015.052

megfigyeltük, míg a *NANOG* az agyban, a *KLF4* pedig vesében és petefészekben nem mutatott expressziót.

Eredményeink világosan mutatják, hogy a pluripotencia gének vizsgálatát nem szabad csak és kizárólag az embrionális fejlődésre korlátozni, hiszen jelentős szerepet töltenek be a felnőtt szövetek regenerálódása során is.

6.1.2 Pluripotens sejtek szelektálásához, vizsgálatához használható egyéb faktorok

Az *FGF4, UTF1, REX1* és *FBX15* gének esetében az ismert fajokból származó szekvenciákat analizálva PCR-primereket terveztünk a szekvencia hasonlóságok alapján. A vizsgálatokhoz az mRNS-t preimplantációs korú embriókból nyertük.

A gének expresszióját RT-PCR segítségével vizsgáltuk. Eddig elért eredményeinket összefoglalva: elsőként azonosítottuk sikeresen ezen géneket nyúl fajban, kidolgoztunk egy RT-PCR reakciót, amivel a gének expressziója faj- és génspecifikusan kimutatható, valamint a generált nyúl indukált pluripotens sejtvonalakban az endogén génexpresszió kimutatására is alkalmazhatjuk.

6.2 Nyúl indukált pluripotens sejtek generálása

Nyúlban elsőként egy japán csoport publikált indukált pluripotens sejtek létrehozásáról (Honda et al. 2010). Ezeket a sejteket humán pluripotencia gének (*OCT4, KLF4, C-MYC, SOX2*) felhasználásával lentivirális géntranszferrel hozták létre és képesek voltak többféle sejttípussá differenciálódni, de a sejtek pluripotens állapotát kiméraképzéssel eddig még nem bizonyították. A mi célunk az volt, hogy bebizonyítsuk, az újonnan izolált nyúl pluripotencia gének alkalmazásával esetlegesen hatékonyabban programozzuk át a nyúl testi sejteket, mint egér vagy humán gének felhasználásával.

10.14751/SZIE.2015.052

7 SUMMARY

7.1 Identification of rabbit pluripotency genes

The embryogenesis of mammalian embryos and the pluripotency of the cells are coordinated by several genes. The proteins and the gene products which are coding them are detected not only in the pre-implantation stage embryos, but also in the embryonic stem cells. Embryonic stem cell lines can be used as an *in vitro* model of the cell differentiation process which we can study by the isolation of the genes we detected.

7.1.1 Main factors for selection, analysis and generation of pluripotent cells

The goal of the our rabbit iPS work was to close the gap in knowledge with regard to the molecular biological background for rabbit iPS work by isolating the putative pluripotency genes from the rabbit, based on the sequences published for other species. The sequence of known pluripotency genes (*OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC, NANOG*) were analysed and primers designed based on the similarity of sequences. Sequences of each individual rabbit pluripotency gene was compared to other vertebrates (e.g. human, mouse, bovine) phylogenetically. Rabbit ESCs and blastocyst stage embryos were collected from superovulated rabbits to isolate total RNA. Genes of interest were amplified using RT-PCR and electrophoretically separated for cDNA fragment isolation.

In conclusion, we have revealed differences at both nucleic acid and amino acid level in all four major rabbit pluripotency gene sequences in comparison to their mammalian orthologs which might partially explain difficulties in generation of rabbit iPSCs capable of germline transmission.

Based on the high conservation observed for the rabbit pluripotency-associated genes we speculated they may have a similar role as their human orthologs during the embryogenesis. For this, we examined the expression patterns of the newly identified genes during rabbit preimplantation development by RT-PCR. All the five investigated genes were determined to be highly expressed during pre-implantation development. Particularly, *OCT4* and *KLF4* express constantly in oocytes and during the early development, while *NANOG* is activated only after fertilization. *C-MYC* and *SOX2* are transcribed from the 8 cell stage that is maintained in the blastocysts. Interestingly, we also observed a minor activation of *C-MYC* at the 2 cell stage. Next, the specific expression patterns of the pluripotency-associated genes

10.14751/SZIE.2015.052

were determined in different adult rabbit tissues and in rabbit embryonic stem cells as a positive control (Honda et al. 2008). We found varying levels of expression of all the five investigated genes in most of the rabbit tissues. Particularly, *OCT4* was expressed in all tissues excluding the lung and showed very low expression level in the liver. *SOX2* and *C-MYC* were expressed throughout. *NANOG* expression was lacking in the brain and *KLF4* expression in kidney and ovary.

Our results clearly demonstrate that the studied rabbit pluripotency-associated genes are not restricted to the embryonic development. Based on the gene expression data, it can be assumed that the studied genes possess conserved roles in the maintenance and renewal of different organs of the rabbit.

7.1.2 Other factors for selection and analysis of pluripotent cells

In case of *UTF1, REX1* and *FBX15* genes, the goal of this work was to isolate these genes from rabbit, based on the sequences of other species published so far. The sequence of known genes has been analyzed, and primers have been designed based on similarity of sequences. Oocyte-to-blastocyt-stage embryos were collected from superovulated rabbits.

The expression of these genes was analysed by RT-PCR. At this point, it can be stated that, that all of these genes have been successfully identified in rabbit genome, a method has been developed to detect their expression and these genes are suitable for detecting of endogen genes in generated induced pluripotent cell lines.

7.2 Generation of rabbit iPS cells

Honda et al. were the first group to report the establishment of rbiPSC lines which they produced from adult rabbit liver and stomach cells using lentiviral vectors carrying the human reprogramming genes: *C-MYC, KLF4, SOX2* and *OCT4.* The newly generated rbiPSCs resembled human iPSCs; they formed flattened colonies with sharp edges and proliferated indefinitely in the presence of FGF2. They expressed the endogenous pluripotency markers *C-MYC, KLF4, SOX2, OCT4* and *NANOG*, while the exogenous human genes were completely silenced. *In vitro,* rbiPSCs rapidly differentiated into ectoderm, mesoderm and endoderm. *In vivo* they formed teratomas, but they were unable to form chimeras.

Our goal was to verify that applification of rabbit specific pluripotency genes to reprogram somatic cells and generate iPSCs might be more efficiently than by using mouse or human genes.

10.14751/SZIE.2015.052

8 MELLÉKLETEK

8.1 M1 Irodalomjegyzék

1. Adjaye J, Bolton V, Monk M. (1999) Developmental expression of specific genes detected in high-quality cDNA libraries from single human preimplantation embryos. *Gene*. 1999; 237 (2): 373–383

2. Amado RG, Chen ISY. (1999) Lentiviral Vectors--the Promise of Gene Therapy Within Reach? *Science.* 1999; 285 (5428): 674-676.

3. Ambady S, Malcuit C, Kashpur O, Kole D, Holmes WF, Hedblom E, Page RL, Dominko T (2010) Expression of NANOG and NANOGP8 in a variety of undifferentiated and differentiated human cells. *Int J Dev Biol*. 2010; 54(11): 1743-1754

4. Ambrosetti DC. Basilico C, Dailey L. (1997) Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by SOX2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. *Mol Cell Biol*. 1997; 17 (11):6321-9.

5. Anokye-Danso F, Trivedi CM, Juhr D, Gupta M, Cui Z, Tian Y, Zhang Y, Yang W, Gruber PJ, Epstein JA, Morrisey EE. (2011) Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*. 2011; 8 (4): 376-388.

6. Arnold K, Sarkar A, Yram MA, Polo JM, Bronson R, Sengupta S, Seandel M, Geijsen N, Hochedlinger K (2011) SOX2+ adult stem/progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell Stem Cell*. 2011; 9 (4): 317–329

7. Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Gokhale PJ, Andrews PW (2008) OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells. *Stem Cells*. 2008; 26 (12): 3068-3074.

8. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*. 2003; 17(1): 126-40.

10.14751/SZIE.2015.052

9. Baczkó I, Juhász V, Major P, Kovács M, Hornyik T, Kerekes A, Hiripi L, Bosze Zs, Papp JGY, Varro, A. (2014) 278LQT5 transgenic rabbits are characterized by increased repolarization instability and arrhythmia susceptibility. *Cardiovascular research*. 2014; *103*(suppl 1), S50-S50.

10. Ban H, Nishishita N, Fusaki N, Tabata T, Saeki K, Shikamura M, Takada N, Inoue M, Hasegawa M, Kawamata S, Nishikawa S. (2011) Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 23; 108(34):14234-9.

11. Beltrami AP Cesselli D, Bergamin N, Marcon P, Rigo S, Puppato E, D'Aurizio F, Verardo R, Piazza S, Pignatelli A, Poz A, Baccarani U, Damiani D, Fanin R, Mariuzzi L, Finato N, Masolini P, Burelli S, Belluzzi O, Schneider C, Beltrami CA. (2007) Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver and bone marrow). *Blood.* 2007; 110 (9): 3438-3446

12. Bieker JJ (2001) Krüppel-like factors: three fingers in many pies. *J Biol Chem.* 2011; 276 (37): 34355-34358

13. Boer B, Kopp J, Mallanna S, Desler M, Chakravarthy H, Wilder PJ, Bernadt C, Rizzino A. (2007) Elevating the levels of SOX2 in embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells inhibits the expression of SOX2:Oct-3/4 target genes. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(6) 1773-86.

14. Bourillot PY, Aksoy I, Schreiber V, Wianny F, Schulz H, Hummel O, Hubner N, Savatier P. (2009) Novel STAT3 target genes exert distinct roles in the inhibition of mesoderm and endoderm differentiation in cooperation with Nanog. *Stem Cells*. 2009 Aug; 27(8):1760-71.

15. Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. 2005; 122, 947-956.

16. Burdon T, Stracey C, Chambers I, Nichols J, Smith A. (1999) Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol.* 1992; 210 (1): 30-43.

10.14751/SZIE.2015.052

17. Carey BW, Markoulaki S, Hanna J, Saha K, Gao Q, Mitalipova M, Jaenisch R. (2009) Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106 (1): 157-62.

18. Carlson DF, Geurts AM, Garbe JR, Park CW, Rangel-Filho A, O'Grady SM, Jacob HJ, Steer CJ, Largaespada DA, Howard J, Jacob, David AL, Fahrenkrug SC (2011). Efficient mammalian germline transgenesis by cis-enhanced Sleeping Beauty transposition. *Transgenic research*. 2011; *20*(1), 29-45.

19. Catunda AP, Gocza E, Carstea BV, Hiripi L, Hayes H, Rogel-Gaillard C, Bertaud M, Bosze Z. (2008) Characterization, chromosomal assignment, and role of LIFR in early embryogenesis and stem cell establishment of rabbits. *Cloning Stem Cells*. 2008; 10 (4): 523-534.

20. Cauffman G, Van de Velde H, Liebaers I, Van Steirteghem, A (2005) Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development. *Mol Hum Reprod*. 2005; 11 (3): 173-181

21. Cauffman G, De Rycke M, Sermon K, Liebaers I, Van de Velde H (2009) Markers that define stemness in ESC are unable to identify the totipotent cells in human preimplantation embryos. *Hum Reprod*. 2009; 24 (1): 63-70

22. Cebrian-Serrano A, Stout T, Dinnyes A. (2013) Veterinary applications of induced pluripotent stem cells: regenerative medicine and models for disease? *Vet J.* 2013 Oct; 198(1):34-42.

23. Chambers I, Colby D, Robertson M., Nichols, J., Lee, S., Tweedle, S., and Smith, A. (2003) Functional Expression Cloning of NANOG a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. 2003; *Cell.* 113 (5): 643-655

24. Chang CW, Lai YS, Pawlik KM, Liu K, Sun CW, Li C, Schoeb TR, Townes TM. (2009) Polycistronic lentiviral vector for "hit and run" reprogramming of adult skin fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells.* 2009 May; 27(5):1042-9.

25. Chen CH, Chang WF, Liu CC, Su HY, Shyue SK, Cheng WT. (2012b) Spatial and temporal distribution of Oct-4 and acetylated H4K5 in rabbit embryos. *Reprod Biomed*

10.14751/SZIE.2015.052

Online. 2012; 24 (4): 433–442

26. Chen CH, Du F, Xu J, Chang W F, Liu CC, Su HY , Lin TA , Ju JC, Cheng WTK, Wu SC, Chen YE, Sung LY (2013) Synergistic effect of trichostatin A and scriptaid on the development of cloned rabbit embryos. *Theriogenology*. 2013; 79 (9): 1284-1293

27. Chen L, Zhang L.F (2012a) A Balanced Network: Transcriptional Regulation in Pluripotent Stem Cells. *J Stem Cell Res. Ther S.* 2012; 10:004.

28. Chen X, Xu H, Yuan P, Fang F, Huss M, Vega VB, Wong E, Orlov YL, Zhang W, Jiang J, Loh YH, Yeo HC, Yeo ZX, Narang V, Govindarajan KR, Leong B, Shahab A, Ruan Y, Bourque G, Sung WK, Clarke ND, Wei CL, Ng HH. (2008) Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell.* 2008; 133 (6) 1106-17.

29. Chénais B, A Caruso (2012). The impact of transposable elements on eukaryotic genomes: From genome size increase to genetic adaptation to stressful environments. *Gene.* 2012; 509 (1): 7-15.

30. Cockburn, K., & Rossant, J. (2010). Making the blastocyst: lessons from the mouse. *The Journal of clinical investigation*, 2010; *120*(4), 995.

31. Cui, Z., Geurts, A. M., Liu, G., Kaufman, C. D., Hackett, P. B. (2002). Structure–function analysis of the inverted terminal repeats of the Sleeping Beauty transposon. *Journal of molecular biology*, 2002; *318*(5), 1221-1235.

32. Dahéron L, Opitz SL, Zaehres H, Lensch MW, Andrews PW, Itskovitz-Eldor J, Daley GQ. (2004) LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2004; 22(5):770-8.

33. Davis SF, Hood J, Thomas A, Bunnell BA (2006) Isolation of adult rhesus neural stem and progenitor cells and differentiation into immature oligodendrocytes. *Stem Cells Dev.* 2006; 15(2): 191–199

34. Desrosiers R. (2001). Nonhuman lentiviruses. *Fields Virology* 2001; 2095-2121

35. Dinnyés A. (2004) Őssejtek és a klónozás lehetőségei. *Magyar Tudomány* 2004; 3; 292

10.14751/SZIE.2015.052

36. Dravid G, Ye Z, Hammond H, Chen G, Pyle A, Donovan P, Yu X, Cheng, L. (2005) Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2005; 23 (10): 1489-1501.

37. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. (1998) A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol.* 1998 Nov; 72(11):8463-71.

38. Eickbush TH. (1992) Transposing without ends: the non-LTR retrotransposable elements. *The Newbiologist*. 1992; 4(5): 430-440.

39. Eiges R, Benvenisty N. (2002) A molecular view on pluripotent stem cells. *FEBS Lett*. 2002; 529(1): 135–141.

40. Eiselleova L, Matulka K, Kriz V, Kunova M, Schmidtova Z, Neradil J, Tichy B, Dvorakova D, Pospisilova S, Hampl A, Dvorak P. (2009) A complex role for FGF-2 in self-renewal, survival, and adhesion of human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2009 Aug; 27(8):1847-57.

41. Esnault C, Maestre J, Heidmann T. (2000) Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nat Genet.* 2000; 24(4):363-7

42. Evans MJ, Kaufman MH. (1981) Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos. *Nature.* 1981; 292 (5819): 154-156

43. Fang ZF, Gai H, Huang YZ, Li SG, Chen XJ, Shi JJ, Wu L, Liu A, Xu P, Sheng HZ. (2006) Rabbit embryonic stem cell lines derived from fertilized, parthenogenetic or somatic cell nuclear transfer embryos. *Exp Cell Res.* 2006; 312 (18): 3669-3682.

44. Fujikura J, Yamato E, Yonemura S, Hosoda K, Masui S, Nakao K., Miyazaki JJ, Niwa H. (2002) Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. *Genes Dev.* 2002; 16(7): 784-789

45. Fujishiro SH, Nakano K, Mizukami Y, Azami T, Arai Y, Matsunari H, Ishino R, Nishimura T, Watanabe M, Abe T, Furukawa Y, Umeyama K, Yamanaka S, Ema M, Nagashima H, Hanazono Y. (2013) Generation of naive-like porcine-induced pluripotent stem cells capable of contributing to embryonic and fetal development. *Stem Cells Dev.*

10.14751/SZIE.2015.052

2013 Feb 1; 22(3):473-82.

46. Fukushima A, Okuda A, Nishimito M. (1998) Characterization of functional domains of an embryonic stem cell coactivator UTF1 which are conserved and essential for potentiation of ATF-2 activity. *J Biol Chem.* 1998; 273 (40): 25840-25849.

47. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. (2009) Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2009; 85(8):348-62.

48. Gardner L, Lee L, Dang C (2002) The C-MYC Oncogenic Transcription Factor. *Encyclopedia of Cancer 2*. 2002

49. Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA Smith HO. (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods.* 2009; 6 (5): 343–345.

50. Ghaleb AM, Katz JP, Kaestner KH, Du JX, Yang VW. (2007) Kruppel-like factor 4 exhibits antiapoptotic activity following gamma-radiation-induced DNA damage. *Oncogene.* 2007; 26(16): 2365–2373.

51. Gleason DF, Mellinger GT. (1974) Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol*. 1974; 111(1):58-64.

52. Gocza E, Bosze Z. (2009) Derivation and characterization of rabbit embryonic stem cells. *Rabbit Biotechnology.* 2009; Pp. 77-104.

53. Graves KH, Moreadith RW. (1993) Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos. *Molecular Reproduction and Development* 1993; 36(4): 424-433.

54. Gertow K, Przyborski S, Loring JF, Auerbach JM, Epifano O, Otonkoski T, Damjanov I, Ahrlund-Richter L. (2007) Isolation of human embryonic stem cell-derived teratomas for the assessment of pluripotency. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2007; Chapter 1: Unit1B.4.

55. Geurts AM, Wilber A, Carlson CM, Lobitz PD, Clark KJ, Hackett PB, McIvor RS,

10.14751/SZIE.2015.052

Largaespada DA. (2006) Conditional gene expression in the mouse using a Sleeping Beautygene-trap transposon. *BMC Biotechnology* 2006; 6(1): 30.

56. Geurts AM, Yang Y, Clark KJ, Liu G, Cui Z, Dupuy AJ, Bell JB, Largaespada DA, Hackett PB (2003) Gene transfer into genomes of human cells by the sleeping beauty transposon system. *Mol Ther.* 2003; 8(1):108-17.

57. Goff, S. (2001). Retroviridae: the retroviruses and their replication. *Fields Virology* 2011; 1871-1939.

58. Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, Kren S, Eidman K, Connaire J, Heremans Y, Lund T, Blackstad M, Jiang Y, Luttun A, Rosenberg ME (2006) Isolation and Characterization of Kidney-Derived Stem Cells. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(11): 3028–3040

59. Hamazaki T, Kehoe SM, Nakano T, Terada N. (2006) The Grb2/Mek pathway represses NANOG in murine embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 2006; 26(20): 7539-7549.

60. Hammer, R. E., Pursel, V. G., Rexroad, C. E., Wall, R. J., Bolt, D. J., Ebert, K. M., Palmiter R.D., Brinster, R. L. (1985) Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*. 1985; 315: 680- 683.

61. Han X, Han J, Ding F, Cao S, Lim SS, Dai Y, Zhang R, Zhang Y, Lim B, Li N. (2011) Generation of induced pluripotent stem cells from bovine embryonic fibroblast cells. *Cell Res.* 2011 Oct; 21(10):1509-12.

62. Hansis C, Grifo J, Krey L. (2000) OCT4 expression in inner cell mass and trophectoderm of human blastocyst. *Mol Hum Reprod.* 2000; 6(11): 999-1004

63. Hansis C, Tang Y, Grifo J, Krey L. (2001) Analysis of OCT4 expression and ploidy in individual Human blastomeres. *Mol Hum Reprod*. 2001; 7(2): 155-61

64. Hart AH, Hartley L, Ibrahim M, Robb L. (2004) Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting NANOG genes in mouse and human. *Dev Dyn.* 2004; 230(1): 187-198

65. Hatano SY, Tada M, Kimura H, Yamaguchi S, Kono T, Nakano T, Suemori H, Nakatsuji N, Tada T (2005) Pluripotential competence of cells associated with NANOG

10.14751/SZIE.2015.052

activity. *Mech Dev.* 2005; 122(1): 67-79

66. Henderson GRW, Brahmasani SR, Yelisetti UM, Konijeti S, Katari VC, Sisinthy S. (2014). Candidate gene expression patterns in rabbit preimplantation embryos developed in vivo and in vitro. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *31*(7), 899-911.

67. Henderson JK, Draper JS, Baillie HS, Fishel S, Thomson JA, Moore H, Andrews PW (2002). Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells.* 2002; 20(4):329–37.

68. Honda A, Hirose M, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Shimozawa N, Hatori M, Shimizu N, Murata T, Katayama K, Wakisaka N, Miyoshi H, Yokoyama KK, Sankai T, Ogura A. (2008) Stable embryonic stem cell lines in rabbits: potential small animal models for human research. *Reprod Biomed Online.* 2008; 17(5): 706-715.

69. Honda A, Hirose M, Ogura A. (2009) Basic FGF and Activin/Nodal but not LIF signaling sustain undifferentiated status of rabbit embryonic stem cells. *Exp Cell Res.* 2009; 315(12): 2033-2042.

70. Honda A, Hirose M, Hatori M, Matoba S, Miyoshi H, Inoue K (2010) Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine.*J Biol Chem*. 2010; 285(41): 31362–9.

71. Honda A., Hatori M., Hirose M., Honda C., Izu H., Inoue K., Hirasawa R., Matoba S., Togayachi S., Myoshi H., Ogura, A. (2013). Naive-like conversion overcomes the limited differentiation capacity of induced pluripotent stem cells. Journal of Biological Chemistry, 2013; 288(36), 26157-26166.

72. Honsho K., Hirose M., Hatori M., Yasmin L., Izu H., Matoba S., Togayachi S, Miyoshi H., Snkai T., Ogura A., Honda, A. (2015). Naïve-like conversion enhances the difference in innate in vitro differentiation capacity between rabbit ES cells and iPS cells. *The Journal of reproduction and development*, 2015; *61*(1), 13.

73. Hosler, B. A.; Larosa, G. J.; Grippo, J. F.; Gudas, L. J. (1989). Expression of REX1, a gene containing zinc finger motifs, is rapidly reduced by retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells. *Molecular and cellular biology.* 1989; 9 (12): 5623-5629

10.14751/SZIE.2015.052

74. Intawicha P, Ou YW, Zhang SC, Su HL, Guu HF, Chen MJ, Lee KH, Ju JC. (2008) Culture and characterization of presumptive embryonic stem cell line isolated from New Zealand White rabbit embryos. *Cell Research.* 2008; 18:s38

75. Izsvák, Z., Ivics, Z., & Plasterk, R. H. (2000). Sleeping Beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *Journal of molecular biology*, 2000; *302*(1), 93-102.

76. Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvák Z. (1997) Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell.* 1997; 91(4): 501-510.

77. Jackson M, Baird JW, Cambray N, Ansell JD, Forrester LM, Graham GJ. (2002) Cloning and characterization of Ehox, a novel homeobox gene essential for embryonic stem cell differentiation. *J. Biol.Chem*. 2002; 277(41): 38683-38692

78. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. (2008) Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2008; 58(2): 71-96.

79. Jia F, Wilson KD, Sun N, Gupta DM, Huang M, Li Z, Panetta NJ, Chen ZY, Robbins RC, Kay MA, Longaker MT, Wu JC. (2010) A Nonviral Minicircle Vector for Deriving Human iPS Cells. *Nat Methods*. 2010 Mar; 7(3):197-9.

80. Jones, P. B. European Regulators Curdle Plans for Goat Milk Human Antithrombin. Retrieved 2006-06-23.

81. Katter K, Geurts, AM, Hoffmann O, Mátés L, Landa V, Hiripi L, Moreno C, Lazar J, Bashir S, Zidek V, Popova E, Jerchow B, Devaraj A, Walter I, Grzybowksi M, Corbett M, Filho AR, Hodges MR, Bader M, Ivics Z, Jacob HJ, Pravenec M, Bosze Z, Rülicke T, Izsvák, Z. (2013). Transposon-mediated transgenesis, transgenic rescue, and tissue-specific gene expression in rodents and rabbits. *The FASEB Journal*. 2013; *27*(3); 930-941.

82. Kannagi R, Cochran NA, Ishigami F, Hakomori S, Andrews PW, Knowles BB, Solter D. (1983) Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *EMBO J.* 1983; 2(12):2355-61.

10.14751/SZIE.2015.052

83. Kemény A, Duda E. (2004) Az őssejtek különleges tulajdonságai: pluripotencia és sajátos sejtciklusszabályozás. *Magyar tudomány.* 2004; (3) 276

84. Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS. (2009) Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins. *Cell Stem Cell*. 2009 Jun 5; 4(6):472-6.

85. Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, Araúzo-Bravo MJ, Ruau D, Han DW, Zenke M, Schöler HR (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature.* 2008*;* 454 (7204): 646–50.

86. Kimber SJ, Sneddon SF, Bloor DJ, El-Bareg AM, Hawkhead JA, Metcalfe AD, Houghton FD, Leese HJ, Rutherford A, Lieberman BA, Brison DR. (2008) Expression of genes involved in early cell fate decisions in human embryos and their regulation by growth factors. *Reproduction.* 2008; 135(5): 635-647

87. Kingston RE, Chen CA, Okayama H. (2001) Calcium phosphate transfection. *Curr Protoc Immunol.* 2001 May;Chapter 10:Unit 10.13.

88. Kirchhof, N., Carnwath, J. W., Lemme, E., Anastassiads, K., Schöler H. R., Niemann H. (2000) Expression pattern of OCT4 in preimplantation embryos of different species. *Biology of Reproduction*. 2000; 63(6): 1698-1705.

89. Kobolak J, Kiss K, Polgar Z, Mamo S, Rogel-Gaillard C, Tancos Z, Bock I, Baji AG, Tar K, Pirity MK, Dinnyes A. (2009) Promoter analysis of the rabbit POU5F1 gene and its expression in preimplantation stage embryos. *BMC Mol Biol.* 2009; 10(1): 88

90. Levine AJ, Levine ZJ, Brivanlou AH. (2009) GDF3 is a BMP inhibitor that can activate Nodal signaling only at very high doses. *Dev Biol*. 2009 Jan 1; 325(1):43-8.

91. Levin HL, Moran JV. (2011). Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. *Nat Rev Genet*. 2011; 12(9): 615-627.

92. Li W, Wei W, Zhu S, Zhu J, Shi Y, Lin T, Hao E, Hayek A, Deng H, Ding S. (2009) Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell.* 2009; 4(1): 16-19.

93. Li J, Wang G, Wang C, Zhao Y, Zhang H, Tan Z, Song Z, Ding M, Deng H. (2007)

10.14751/SZIE.2015.052

MEK/ERK signaling contributes to the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. *Differentiation*. 2007; 75(4): 299-307.

94. Li J, Zheng H, Wang J, Yu F, Morris RJ, Wang TC, Huang S, Ai W (2012) Expression of Kruppel-Like Factor KLF4 in Mouse Hair Follicle Stem Cells Contributes to Cutaneous Wound Healing. *PLoS ONE*. 2012; 7(6): e39663

95. Ling TY, Kuo MD, Li CL, Yu AL, Huang YH, Wu TJ, Lin YC, Chen SH, Yu J (2006) Identification of pulmonary Oct-4+ stem/progenitor cells and demonstration of their susceptibility to SARS coronavirus (SARS-CoV) infection *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(25): 9530-9535

96. Liu H, Zhu F, Yong J, Zhang P, Hou P, Li H, Jiang W, Cai J, Liu M, Cui K, Qu X, Xiang T, Lu D, Chi X, Gao G, Ji W, Ding M, Deng H. (2008) Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 2008; 3(6): 587-590

97. Liu K, Lin B, Zhao M, Yang X, Chen M, Gao A, Liu F, Que J, Lan, X. (2013). The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. *Cellular signalling*.2013; *25*(5), 1264-1271.

98. Loebel, D. A., Watson, C. M., De Young, R. A., & Tam, P. P. (2003). Lineage choice and differentiation in mouse embryos and embryonic stem cells.*Developmental biology*. 200; *264*(1), 1-14.

99. Lu Y, Mumaw JL, West FD, Stice SL. (2012) Livestock induced pluripotent stem cells. *Reprod Domest Anim*. 2012 Aug; 47 Suppl 4:72-6.

100. Luo J, Suhr ST, Chang EA, Wang K, Ross PJ, Nelson LL, Venta PJ, Knott JG, Cibelli JB. (2011) Generation of leukemia inhibitory factor and basic fibroblast growth factor-dependent induced pluripotent stem cells from canine adult somatic cells. *Stem Cells Dev*. 2011; 20(10): 1669-1678.

101. Major P, Kerekes A, Skoda G, Hiripi L, Bősze Z. (2013). Genetically modified animals AS potential genetic resources. *Slovak Journal of*, 2013; 155.

102. Malas S, Duthie SM, Mohri F, Lovell-Badge R, Episkopou, V (1997) Cloning and

10.14751/SZIE.2015.052

mapping of the human SOX1: a highly conserved gene expressed in the developing brain. *Mamm Genome. 1997;*8:866-868

103. Mamo S, Gal AB, Polgar Z, Dinnyes A (2008) Expression profiles of the pluripotency marker gene POU5F1 and validation of reference genes in rabbit oocytes and preimplantation stage embryos. *BMC Mol Biol*. 2008; 9(1): 67

104. Marian AJ, Wu Y, Lim DS, McCluggage M, Youker K, Yu QT. (1999) A transgenic rabbit model for human hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 1999; 104(12): 1683–92.

105. Martin, Gail R. (1981): Isolation of a Pluripotent Cell Line from Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1981; 78(12): 7634-7638

106. Matés L, Chuah MK, Belay E (2009). Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat. Genet*. 2009; 41(6): 753–761.

107. Mattsson G, Pelengaris S, Khan M. (2006). The Role of c-Myc in Beta Cell Mass Homeostasis. *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine and Metabolic Agents)*, *6*(2), 179-189.

108. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. (2003) The Homeoprotein NANOG Is Required For Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblaszt and ES Cells. *Cell*. 2003; 113(5): 631-642

109. Mountford, P., Zevnik, B., Duwel, A., Nichols, J., Li,M., Dani, C., Robertson,M., Chambers, I., and Smith, A. Dicistronic targeting constructs:reporters and modifiers of mammalian gene expression. Proc.Natl.Acad. (1994): Sci. USA; 91(10): 3651-3658

110. Muenthaisong S, Ujhelly O, Polgar Z, Varga E, Ivics Z, Pirity MK, Dinnyes A. (2012). Generation of mouse induced pluripotent stem cells from different genetic backgrounds using Sleeping beauty transposon mediated gene transfer. *Exp Cell Res.* 2012 Nov 15; 318(19): 2482-9.

10.14751/SZIE.2015.052

111. Mullin, Emily (2014). Researchers repair retinas in mice with virus-free stem cells. fiercebiotech.com. Retrieved 17 February 2014

112. Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K, Mochiduki Y., Takizawa N., Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology*. 2008; *26*(1), 101-106.

113. Nakatsugawa M, Takahashi A, Hirohashi Y, Torigoe T, Inoda S, Murase M, Asanuma H, Tamura Y, Morita R, Michifuri Y, Kondo T, Hasegawa T, Takahashi H, Sato N (2011) SOX2 is overexpressed in stem-like cells of human lung adenocarcinoma and augments the tumorigenicity. *Lab Invest* 2011; 91(12): 1796-1804

114. Naldini, L., Blomer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage FH., Verma IM., Trono D (1996). *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; 272 (5259): 263-267.

115. Nagy K SH, Zhang P, Laflamme S, Vincent P, Agha-Mohammadi S, Woltjen K, Monetti C, Michael IP, Smith LC, Nagy A. (2011) Induced pluripotent stem cell lines derived from equine fibroblasts. *Stem Cell Rev*. 2011; 7(3): 693-702.

116. Nelson, T.J., A. Martinez-Fernandez, S. Yamada, Y. Ikeda, C. Perez-Terzic, A. Terzic (2009) Induced pluripotent stem cells: advances to applications. *Stem cells and cloning: advances and applications*. 2009; 3: 29.

117. Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, Perez-Terzic C, Ikeda Y, Terzic A. (2010) Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 2010; 120(5): 408–416.

118. Németh K, Gócza E. (2014) Őssejtek-e az embrionális őssejtek. A kutatás harminc éve. *Természet Világa*. 2014; 145 (9) 389.

119. Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H. R., Smith, A. (1998) Formation of plurypotent stem cells in the mammalian emryo depends on the POU transcription factor OCT4. *Cell.* 1998; 95(3): 379-91

120. Nishimoto M, Fukishima A, Okuda A. (1999) The gene for the embryonic stem cell

10.14751/SZIE.2015.052

coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and SOX2. *Mol Cell Biol.* 1999;19(8): 5453-5465.

121. Nishimoto M, Miyagi S, Yamagishi T. (2005) Oct-3/4 maintains the proliferative embryonic stem cell state via specific binding to a variant octamer sequence in the regulatory region of the UTF1 locus. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(12): 5084-5094.

122. Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K (2009). A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature.* 2009; 460 (7251): 118–22.

123. Niwa, H., Miyazaki, J. and Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. Nat. Genet. 2000; 24, 372-376.

124. Niwa H. (2001) Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct.* 2001; 26(3): 137-148.

125. Nowling TK. Johnson LR, Wiebe MS, Rizzino A. (2000) Identification of the transactivation domain of the transcription factor SOX2 and an associated co-activator. J Biol Chem 2000; 275(6):3810-8

126. Okuda A, Fukushima A, Nishimoto M. (1998) UTF1, a novel transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells and extra-embryonic cells. *EMBO J.* 1998; 17(7): 2019-2032.

127. Okuda T, Tagawa K, Qi ML, Hoshio M, Ueda H, Kawano H, Kanazawa I, Muramatsu M, Okazawa H (2004) Oct-3/4 repression accelerates differentiation of neural progenitor cells *in vitro* and *in vivo*. *Mol Brain Res.* 2004; 132(1): 18–30

128. Ornitz, D. M., & Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biol*, *2*(3), 1-12.

129. Osteil. P, Tapponier Y, Markossian S, Godet. M, Schmaltz-Panneau B, Jouneau L, Cabau C, Joly T, Blachere T, Gócza E, Bernat A, Yerle M, Acloque H, Hidot S, Bosze Zs, Duranthon V, Savatier P, Afanassieff M (2013). Induced pluripotent stem cells derived from rabbits exhibit some characteristics of naïve pluripotency. *Biol Open.* 2013; 2(6): 613–628.

130. Ovitt CE, Schöler HR (1998) The molecular biology of Oct-4 in the early mouse

10.14751/SZIE.2015.052

embryo. *Molecular human reproduction*. 1998; 4(11): 1021-1031

131. Palmieri, S. L., Peter, W., Hess, H., Schöler, H. (1994) R. OCT4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishement of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev. Biol*. 1994; 166(1): 259-267

132. Pan, G. J., Chang, Y. Z., Schöler, H. R., and Pei, D. (2002) Stem cell plurypotency and transcription factor OCT4. *Cell Research*. 2002; 12 (5-6): 321-329

133. Park ET, Gum JR, Kakar S, Kwon SW, Deng G, Kim YS. (2008a) Aberrant expression of SOX2 upregulates MUC5AC gastric foveolar mucin in mucinous cancers of the colorectum and related lesions. *Int. J. Cancer*. 2008; 122(6):1253-60.

134. Park IH, Lerou PH, Zhao R, Huo H, Daley GQ. (2008b) Generation of human-induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* 2008; 3(7): 1180-1186.

135. Pilcher, H. R. (2003). It's a knockout. Nature. 2003; doi, 10.

136. Pinkert CA, Murray JD. (1999) Transgenic farm animals. In Transgenic Animals in Agriculture. *CABI Publishing*; 1999; 1-18.

137. Ramalho-Santos, M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. (2002) “Stemness”:transcriptional profiling of emryonic and adult stem cells. *Science.* 2002; 298 (5593): 597-600

138. Reményi A. Lins K, Nissen LJ, Reinbold R, Schöler HR, Wilmanns M. (2003) Crystal structure of a POU/HMG/DNA ternary complex suggests differential assembly of OCT4 and SOX2 on two enhancers. *Genes Dev.* 2003; 17(16) 2048-59.

139. Richards M, Tan SP, Tan TH (2004) The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem Cells.* 2004; 22(1): 51-64.

140. Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, Robson P. (2005) Transcriptional regulation of NANOG by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem* 2005; 280(26): 24731-24737.

141. Rodriguez A, Castro FO, Aguilar A, Ramos B, Del Barco, D. G., Lleonart, R, De la Fuente, J. (1995). Expression of active human erythropoietin in the mammary gland of

10.14751/SZIE.2015.052

lactating transgenic mice and rabbits. Biological research, 28, 141-141.

142. Rosner MH, Viganao MA, Ozato K, Timmons PM, Poirier F, Rigby PW, Staudt LM. (1990) A POU- domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature*. 1990; 345(6277): 686-692

143. Rungarunlert S, Techakumphu M, Pirity MK, Dinnyes A. (2009). Embryoid body formation from embryonic and induced pluripotent stem cells: Benefits of bioreactors. *World J Stem Cells*. 2009; 1(1): 11-21.

144. Sarkadi, B. (2012). Mi lehet az őssejtekkel foglalkozó kutatók felelőssége az emberi jólét érdekében? *Magyar Tudomány*. 2012; 8, 912

145. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, Liotta F, Frosali F, Ronconi E, Meini C, Gacci M, Squecco R, Carini M, Gesualdo L, Francini F, Maggi E, Annunziato F, Lasagni L, Serio M, Romagnani S, Romagnani P. (2006) Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17(9): 2443–2456

146. Schoonjans L, Albright GM, Li JL, Collen D, Moreadith RW. (1996) Pluripotential rabbit embryonic stem (ES) cells are capable of forming overt coat color chieras following injection into blastocyst. *Molecular Reproduction and Development*. 1996; 45(4): 439-443.

147. Schöler, H. R. (1991) Octamania: the POU factors in murine development. *Trends Genet*. 1991; 7(10): 323-329

148. Schöler, H. R., Hatzopoulos, A. K., Balling, R., Suziki, N., Gruss, P. (1989) A family of octamer-specific proteins presents during mouse embrryogenesis: evidence for germ- line-specific expression of an Oct factor. *EMBO J*. 1989; 8(9): 2543-2550

149. Schröder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F. (2002) HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*. 2002; 110(4): 521-9.

150. Semsei I, Ma SY, Cutler RG. (1989). Tissue and age specific expression of the myc proto-oncogene family throughout the life span of the C57BL/6J mouse strain. *Oncogene*, *4*(4), 465-471.

10.14751/SZIE.2015.052

151. Shamblott MJ, Axelman, J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. (1998) Derivation of Pluripotent Stem Cells from Cultured Human Primordial Germ Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1998; 95(23): 13726-13731

152. Shi, J. J., Cai, D. H., Chen, X. J., & Sheng, H. Z. (2008). Cloning and characterization of the rabbit POU5F1 gene: Full Length Research Paper. DNA Sequence, 19(1), 56-61.

153. Shi W, Wang H, Pan G, Geng Y, Guo Y, Pei D. (2006). Regulation of the Pluripotency Marker REX1 by NANOG and SOX2. *J Biol Chem.* 2006; 281 (33): 23319–23325.

154. Shields JM, Yang VW. (1997) Two potent nuclear localization signals in the gut-enriched Krüppel-like factor define a subfamily of closely related Krüppel proteins. *J Biol Chem.* 1997; 272(29):18504-7.

155. Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O, Jaenisch R. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. Cell 2009; 136(5): 964-977.

156. Solter D, Knowles BB. (1987) Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). Proc Natl Acad Sci U S A. 1978 Nov; 75(11):5565-9.

157. Somers A, Jean JC, Sommer CA, Omari A, Ford CC, Mills JA, Ying L, Sommer AG, Jean JM, Smith BW, Lafyatis R, Demierre MF, Weiss DJ, French DL, Gadue P, Murphy GJ, Mostoslavsky G, Kotton DN. (2010) Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells*. 2010 Oct; 28(10):1728-40.

158. Sommer CA, Sommer AG, Longmire TA, Christodoulou C, Thomas DD, Gostissa M, Alt FW, Murphy GJ, Kotton DN, Mostoslavsky G. (2010) Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. *Stem Cells*. 2010 Jan; 28(1):64-74.

159. Souvorov A, Kapustin Y, Kiryutin B, Chetvernin V, Tatusova T, Lipman D. 2010 Gnomon–NCBI eukaryotic gene prediction tool. *National Center for Biotechnology Information*. 2010

10.14751/SZIE.2015.052

160. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. (2008) Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*. 2008 Nov 7; 322(5903):945-9.

161. Tai MH, Chang CC, Olson LK, Trosko JE (2005) OCT4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005; 26(2): 495-502

162. Takahashi K, Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126(4): 663-676.

163. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 2007; 131 (5): 861–872.

164. Tancos Z, Nemes C, Polgar Z, Gocza E, Daniel N, Stout TAE, Maraghechi P, Pirity MK, Osteil P, Tapponnier Y, Markossian S, Godet M, Afanassieff M, Bosze Z, Duranthon V, Savatier P, Dinnyes A. (2012) Generation of rabbit pluripotent stem cell lines. *Theriogenology*. 2012; 78(8): 1774-1786.

165. Táncos Z, Bock I., Nemes C, Kobolák J, Dinnyés A. (2015). Cloning and characterization of rabbit POU5F1, SOX2, KLF4, C-MYC and NANOG pluripotency-associated genes. *Gene*.

166. Ten Berge D, Kurek D, Blauwkamp T, Koole W, Maas A, Eroglu E, Siu RK, Nusse R. (2011) Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblaszt stem cells. *Nat Cell Biol*. 2011 Aug 14; 13(9):1070-5

167. Thomson M, Liu SJ, Zou LN, Smith Z, Meissner A, Ramanathan S. (2011). Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell.* 2011; 145 (6): 875–89.

168. Thomson, JA, Itskovitzeldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145-1147.

169. Tokuzawa Y, Kaiho E, Maruyama M, Takahashi K, Mitsui K, Maeda M, Niwa H, Yamanaka S. (2003). FBX15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic

10.14751/SZIE.2015.052

stem cell self-renewal and mouse development. *Mol. Cell. Biol.* 2003; 23(8): 2699–2708.

170. Vallier, L, Mendjan S, Brown S, Cheng Z, Teo A, Smithers LE, Trotter MW, Cho CH, Martinez A, Rugg-Gunn P, Brons G, Pedersen, R.A. (2009) Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling NANOG expression. *Development*. 2009; 136(8): 1339-1349.

171. Van den Boom V, Kooistra SM, Boesjes M (2007) UTF1 is a chromatin-associated protein involved in ES cell differentiation. *J Cell Biol.* 2007; 178(6): 913-924.

172. Walsh PC. (1975) Histologic basis for hormonal therapy in carcinoma of the prostate *Urol Clin North Am*.1975; 2(1): 125-40

173. Wang S, Shen Y, Yuan X, Chen K, Guo X, Chen Y, Niu Y, Li J, Xu RH, Yan X, Zhou Q, Ji W. (2008) Dissecting signaling pathways that govern self-renewal of rabbit embryonic stem cells. *J Biol Chem.* 2008; 283(51): 35929-35940.

174. Wang S, Tang X, Niu Y, Chen H, Li B, Li T, Zhang X, Hu Z, Zhou Q, Ji W. (2007) Generation and characterization of rabbit embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2007; 25(2): 481-489.

175. Wang J, Rao S, Chu J, Shen X, Levasseur D N, Theunissen T W, Orkin, S. H. (2006). A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 2006; 444 (7117): 364–368.

176. Wang, S. H., Tsai, M. S., Chiang, M. F., and Li, H. (2003) A novel NK-type homeobox gene, ENK (early embryo specific NK), preferentially expressed in embryonic stem cells. *Gene Expr.Patterns*; 2003; 3(1): 99-103

177. Varga E, Nemes C, Davis RP, Ujhelly O, Klincumhom N, Polgar Z, Muenthaisong S, Pirity MK, Dinnyes A (2014). Generation of transgene-free mouse induced pluripotent stem cells using an excisable lentiviral system. *Exp Cell Res.* 2014; 1;322(2):335-44.

178. Várkuti B , Alexa A , Fodor K , Garai Á , Glatz G , Radnai L , Rapali P , Szakács D. (2013) Géntechnológia és fehérje mérnökség. Elektronikus jegyzet. http://ttktamop.elte.hu/sites/ttktamop.elte.hu/files/tananyagok/gentechnologia.pdf

179. Warlich E, Kuehle J, Cantz T, Brugman MH, Maetzig T, Galla M, Filipczyk AA, Halle

10.14751/SZIE.2015.052

S, Klump H, Schöler HR, Baum C, Schroeder T, Schambach A. (2011) Lentiviral Vector Design and Imaging Approaches to Visualize the Early Stages of Cellular Reprogramming. *Molecular Therapy* 2011; 19(4): 782-789

180. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, Rossi DJ. (2010) Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 2010; 7(5): 618-630.

181. Weissman, I. L. (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, 2000; *100*(1), 157-168.

182. Wesselschmidt RL. (2011) The teratoma assay: an *in vivo* assessment of pluripotency. *Methods Mol Biol*. 2011; 767(1): 231-41.

183. West FD, Terlouw SL, Kwon DJ, Mumaw JL, Dhara SK, Hasneen K, Dobrinsky JR, Stice SL. (2010) Porcine induced pluripotent stem cells produce chimeric offspring. *Stem Cells Dev.* 2010 Aug;19(8):1211-20.

184. Wilson MH, Coates CJ, George AL Jr. (2007) PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells. *Mol Ther*. 2007; 15(1):139-45.

185. Voelkel C, Galla M, Maetzig T. (2010) Protein transduction from retroviral Gag precursors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010; 107, 17, 7805–7810.

186. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hamalainen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A. (2009) PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2009; 458(7239): 766-770.

187. Wrana JL, Attisano L, Cárcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF, Massague, J.(1992). TGFβ signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell*. 1992; *71*(6), 1003-1014.

188. Wray J, Hartmann C. (2012) WNTing embryonic stem cells. *Trends Cell Biol.* 2012 Mar; 22(3):159-68.

10.14751/SZIE.2015.052

189. Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM. (2003) Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science*. 2003; 300(5626): 1749-51.

190. Yeom, Y. I., Ha, H. S., Balling, R., Shöler, H. R., Artzt, K. (1991) Structure, expression and chromosomal location of the OCT4 gene. *Mech. Dev*. 1991; 35(3): 171-179

191. Ying, Q.L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008) The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature.* 2008; 453(7194): 519-523.

192. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II, Thomson JA. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007; 318(5858): 1917-1920.

193. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. (2009) Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*. 2009 May 8; 324(5928):797-801.

194. Yusa K, Rad R, Takeda J, Bradley A. (2009) Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods* 2009; 6(5): 363-369.

195. Zakhartchenko V, Flisikowska T, Li S, Richter T, Wieland H, Durkovic M, Rottmann O, Kessler B, Gungor T, Brem G, Kind A, Wolf E, Schnieke A. (2011) Cell-mediated transgenesis in rabbits: chimeric and nuclear transfer animals. *Biol Reprod*. 2011; 84(2): 229-237.

196. Zangrossi S, Marabese M, Broggini M, Giordano R, D'Erasmo M, Montelatici E, Lazzari, L (2007) Oct-4 Expression in Adult Human Differentiated Cells Challenges Its Role as a Pure Stem Cell Marker. *Stem Cells.* 2007; 25(7): 1675-1680

197. Zambidis, Elias; Lutty, Gerard; Park, Tea Soon; Bhutto, Imran et al. (2014). Vascular Progenitors From Cord Blood-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Possess Augmented Capacity for Regenerating Ischemic Retinal Vasculature. *Circulation* (American Heart Association) 2014; 129 (3): 359–372..

198. Zhang Z, Gao Y, Gordon Y, Wang Z.Z, Qian Z, Wu W.S. (2011) Efficient Generation

10.14751/SZIE.2015.052

of Fully Reprogrammed Human iPS Cells via Polycistronic Retroviral Vector and a New Cocktail of Chemical Compounds. *PLoS One*. 2011; 6(10): e26592.

199. Zheng H, Pritchard DM, Yang X, Bennett E, Liu G, Liu C, Ai W (2009) KLF4 gene expression is inhibited by the notch signaling pathway that controls goblet cell differentiation in mouse gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009; 296:G490-G498

200. Zhou L, Wang W, Liu Y, de Castro JF, Ezashi T, Telugu BP, Roberts RM, Kaplan HJ, Dean DC. (2011) Differentiation of induced pluripotent stem cells of swine into rod photoreceptors and their integration into the retina. *Stem Cells.* 2011; 29(6): 972-980

201. Zhou W, Freed CR. (2009) Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2009 Nov;27(11):2667-74.

10.14751/SZIE.2015.052

8.2 M2 Szakmai publikációk jegyzéke

Az értekezés témakörében megjelent lektorált magyar és idegen nyelvű publikációk felsorolása:

Könyvfejezet:

1. Meng, Q., Z. Polgar, Z. Tancos, X. Tian, and A. Dinnyes, Cloning of Rabbits, in Principles of Cloning. 2013. p. 227-244.

Impakt faktorral rendelkező, idegen nyelvű folyóirat:

2. **Zsuzsanna Táncos,** István Bock, Csilla Nemes, Julianna Kobolák and András Dinnyés (2015): Cloning and characterization of rabbit *POU5F1*, *SOX2*, *KLF4*, *C-MYC* and *NANOG* pluripotency-associated genes. *GENE*. doi:10.1016/j.gene.2015.04.034
   IF.: 2.246

3. **Zs. Tancos**; Cs. Nemes; Zs. Polgar; E. Gocza; N. Daniel; T.A.E Stout; P. Maraghechi; M. K. Pirity; P. Osteil; Y. Tapponnier; S.Markossian; M. Godet; M. Afanassieff; Zs. Bosze; V. Duranthon; P. Savatier; A. Dinnyes (2012): Generation of rabbit pluripotent stem cell lines. Theriogenology. Published by Elsevier Inc: http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.017
   IF.: 2.045

4. Kiss, K., Kobolak, J., **Tancos, Zs.,** Mamo, S., Polgar, Zs., Rogel-Gaillard, C., Baji Gal, A., and Dinnyes, A. (2008): Promoter analysis of the rabbit pou5f1 gene and its expression in pre-implantation stage embryos. BMC Mol Biol. 2009; 10: 88. Published online 2009 September 4. doi: 10.1186/1471-2199-10-88
   IF.: 2.848

Impakt faktorral rendelkező, magyar nyelvű folyóirat:

5. **Táncos, Zs.** Kobolák, J., Baji Gál, Á., Dinnyés, A. (2010): Pluripotencia gének azonosítása preimplantációs korú nyúlembriókban. Magyar Állatorvosok Lapja, 132. évf. 12. sz. / 2010 707-710 o.
   IF.: 0.300

10.14751/SZIE.2015.052

Impakt faktorral nem rendelkező, hazai, magyar nyelvű folyóiratok:

6. **Táncos Zsuzsanna**, Kobolák Julianna, Baji Gál Árpád, Dinnyés András (2006): Az OCT4 és NANOG transzkripciós faktor gének azonosítása preimplantációs korú nyúl embriókban. Állattenyésztés és Takarmányozás 2006.55.6. 577-589 p.

Egy oldalas abstract, alkalmi kongresszusi kiadványban, magyar nyelven:

7. **Táncos Zsuzsanna**, Kobolák Julianna, Baji Gál Árpád, Polgár Zsuzsanna, Dinnyés András: Az OCT4 és NANOG transzkripciós faktor gének azonosítása preimplantációs korú nyúl embriókban. **Előadás:***12. Szaporodásbiológiai Találkozó*, Hajdúszoboszló, 2005. november 4-5.

8. **Táncos, Zs.**, Kobolák, J., Baji Gál, Á., Dinnyés, A. (2010): Pluripotencia gének azonosítása preimplantációs korú nyúlembriókban. **Előadás:**16. *Szaporodásbiológiai Találkozó*, Visegrád, 2010. október 29.

9. **Táncos, Zs.**; Ujhelly, O.; Pirity, M.; Dinnyés, A. (2011): Nyúl pluripotencia gének izolálása és felhasználása indukált pluripotens sejtek létrehozása céljából. **Előadás:** *Doktoranduszok Kaposvári Workshopja*, Kaposvár, 2011. június 8.

10. **Táncos, Zs.**, Polgár, Zs., Varga, E., Ujhelly, O., Pirity, M., Dinnyés, A. (2010): Nyúl pluripotencia gének izolálása és jövőbeni felhasználási lehetőségeik. **Előadás:** *MBK Napok,* Gödöllő, 2011. november 10-11.

Egy oldalas abstract, alkalmi kongresszusi kiadványban, idegen nyelven:

11. **Táncos, Zs.**; Pirity, M.; Dinnyés, A. (2011): Progress and bottlenecks towards generating germline chimera forming induced pluripotent stem cells in rabbit, *„Novel findings in rabbit ES and iPS cell establishment”.* **Előadás:** *4th International Rabbit Biotechnology Meeting*, Budapest, 2011. július 1. 4th International Rabbit Biotechnology Meeting abstract book, p.33

10.14751/SZIE.2015.052

12. Dinnyes, A., M.K. Pirity, E. Gocza, P. Osteil, N. Daniel, **Z. Tancos**, Z. Polgar, P. Maraghechi, O. Ujhelly, C. Nemes, T. Stout, Y. Tapponnier, Z. Bosze, A. Jouneau, M. Afanassieff, and P. Savatier, Generation of rabbit pluripotent stem cell lines. Reproduction Fertility and Development, 2012. 24 (1): p. 286-286. (abstr)

13. **Tancos, Z**., O. Ujhelly, M.K. Pirity, and A. Dinnyes, Isolation of rabbit pluripotency genes to generate rabbit induced pluripotent stem cells. Reproduction Fertility and Development, 2012. 24(1): p. 223-224.

Egy oldalas abstract, alkalmi kongresszusi kiadványban, magyar nyelven (poszter):

14. **Táncos Zsuzsanna**, Kobolák Julianna, Baji Gál Árpád, Dinnyés András (2005): Az OCT4 és NANOG transzkripciós faktor gének izolálása nyúlban. **Előadás:** *VI. Magyar Genetikai Kongresszus és XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok közös konferenciája*, Eger, 2005. Április 10-12, Absztraktkönyv, P048

Egy oldalas abstract, alkalmi kongresszusi kiadványban, idegen nyelven (poszter):

15. **Tancos, Zs.,** Kobolak, J., Baji Gal, A., Polgar, Zs. and Dinnyes, A. (2006): Identification of OCT4 and NANOG, the two pluripotency marker genes in rabbit pre-implantation stage embryos. **Poszter:** Poster #266, Reproduction, Fertility and Development. Vol.18(2) 240-241 **IF.: 0.920**

16. **Táncos, Zs.;** Ujhelly, O.; Pirity, M.; Dinnyés, A. (2012): Isolation of rabbit pluripotency genes for more efficiently rabbit induced pluripotent stem cell generation. **Poszter:** 2012 Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (IETS), Phoenix, Arizona, 2012. január 7-10., Reproduction, Fertility and Development, Vol.24 (1) 2012, P223

17. **Tancos, Z**., A. Ochalek, C. Nemes, E. Varga, I. Bock, and A. Dinnyes. Generation of rabbit induced pluripotent stem cells (iPSCs) by human reprogramming factors. in Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája (FIBOK 2014). 2014. Szeged, Hungary. 7. March 2014. p. 86.

10.14751/SZIE.2015.052

Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó publikációk:

Impakt faktorral nem rendelkező, hazai, magyar nyelvű folyóiratok:

18. Polgár Zsuzsanna, Bodó Szilárd, Kobolák Julianna, Solomon Mamo, **Táncos Zsuzsanna**, Tóth Szabolcs, Görhöny Botond, Dinnyés András (2006): Egér kiméra utódok létrehozása injektált és mélyhűtött blasztocisztákból. Állattenyésztés és Takarmányozás 2006.55.5. 493-499 p.

Egy oldalas abstract, alkalmi kongresszusi kiadványban, idegen nyelven (poszter):

19. Dinnyes, A., C. Nemes, S. Muenthaisong, N. Klincumhom, S. Rungarunlert, E. Varga, **Z. Tancos**, A. Lauko, R. Tosoki, M. Jakus, Z. Polgar, S. Berzsenyi, H. Raveh-Amit, K. A. Kovacs, and A. Feher. Pluripotent stem cell-derived differentiated cells for toxicity testing and regenerative medicine. in *Resolve International Meeting*. 27-28. March 2012. Vienna, Austria.

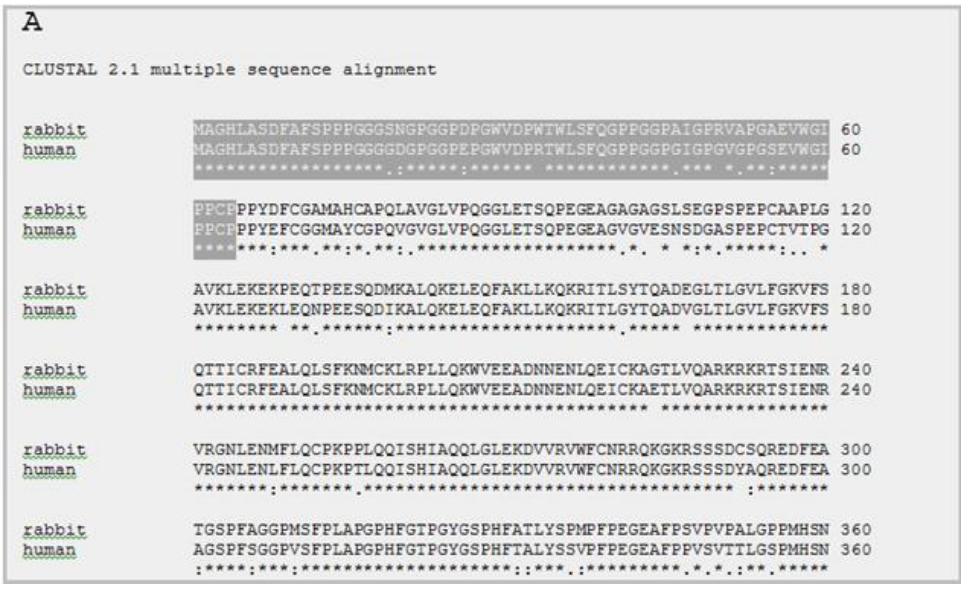
20. Dinnyes, A., C. Nemes, T. Li, P. Phanthong, E. Varga, **Z. Tancos**, Z. Polgar, S. Berzsenyi, H. Raveh-Amit, and A. Feher. Induced Pluripotent stem cells for toxicity testing and regenerative medicine of aging-related diseases. in 8th European Congress of Biogerontology (ECB) joint with the 2nd international RESOLVE meeting Healthy Ageing and Regenerative Medicine. p. 21., 11. March 2013. Beer-Sheva - Dead Sea, Israel.

Egy oldalas abstract, alkalmi kongresszusi kiadványban, magyar nyelven (előadás):

21. Polgár Zsuzsanna, Bodó Szilárd, Kobolák Julianna, Solomon Mamo, **Táncos Zsuzsanna**, Tóth Szabolcs, Görhöny Botond, Dinnyés András (2005): Egér kiméra utódok létrehozása injektált és mélyhűtött blasztocisztákból. **Előadás:** 12. *Szaporodásbiológiai Találkozó,* Hajdúszoboszló, 2005. november 4-5

10.14751/SZIE.2015.052

8.3 M3 Ábrák és táblázatok jegyzéke

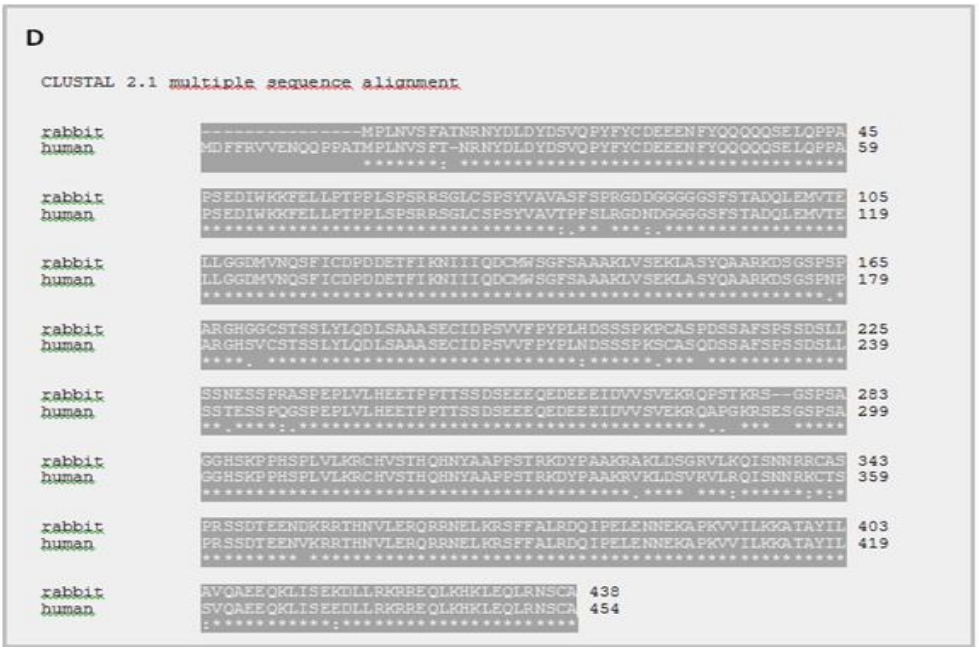


1. **ábra: Fehérje szekvencia illesztés a nyúl (rabbit) és ember (human) OCT4 (A) szekvenciák esetében. Az immunfestéshez használt ellenanyagok epitóp régióit szürke színnel jelöltük.**

2. **ábra: Fehérje szekvencia illesztés a nyúl (rabbit) és ember (human) SOX2 (B) szekvenciák esetében. Az immunfestéshez használt ellenanyagok epitóp régióit szürke színnel jelöltük.**

10.14751/SZIE.2015.052

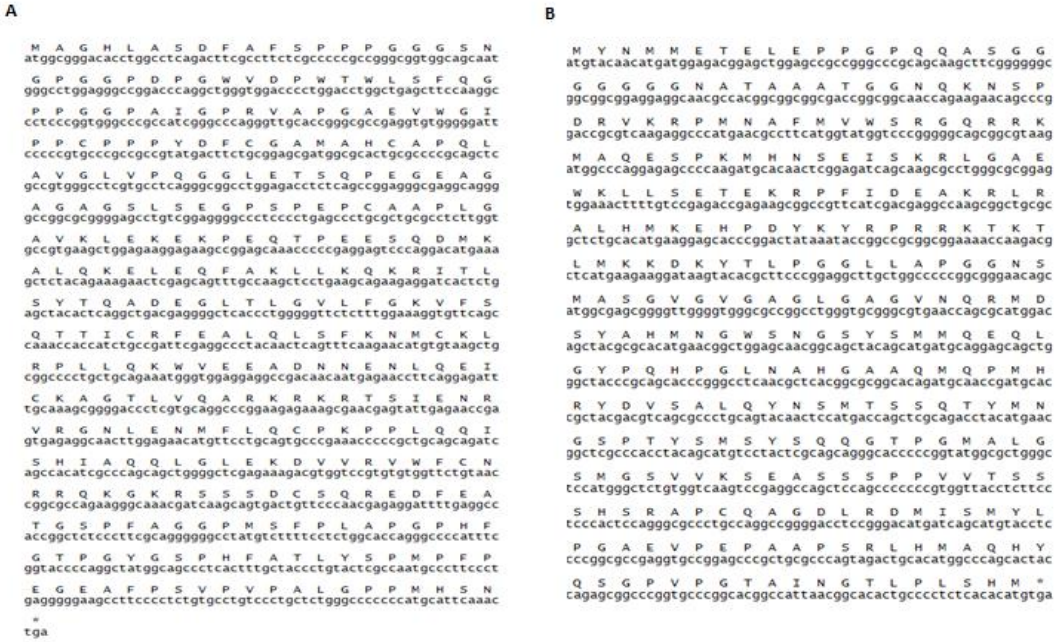
3. ábra: Fehérje szekvencia illesztés a nyúl (rabbit) és ember (human) KLF4 (C) szekvenciák esetében. Az immunfestéshez használt ellenanyagok epitóp régióit szürke színnel jelöltük.



4. ábra: Fehérje szekvencia illesztés a nyúl (rabbit) és ember (human) MYC (D) szekvenciák esetében. Az immunfestéshez használt ellenanyagok epitóp régióit szürke színnel jelöltük.

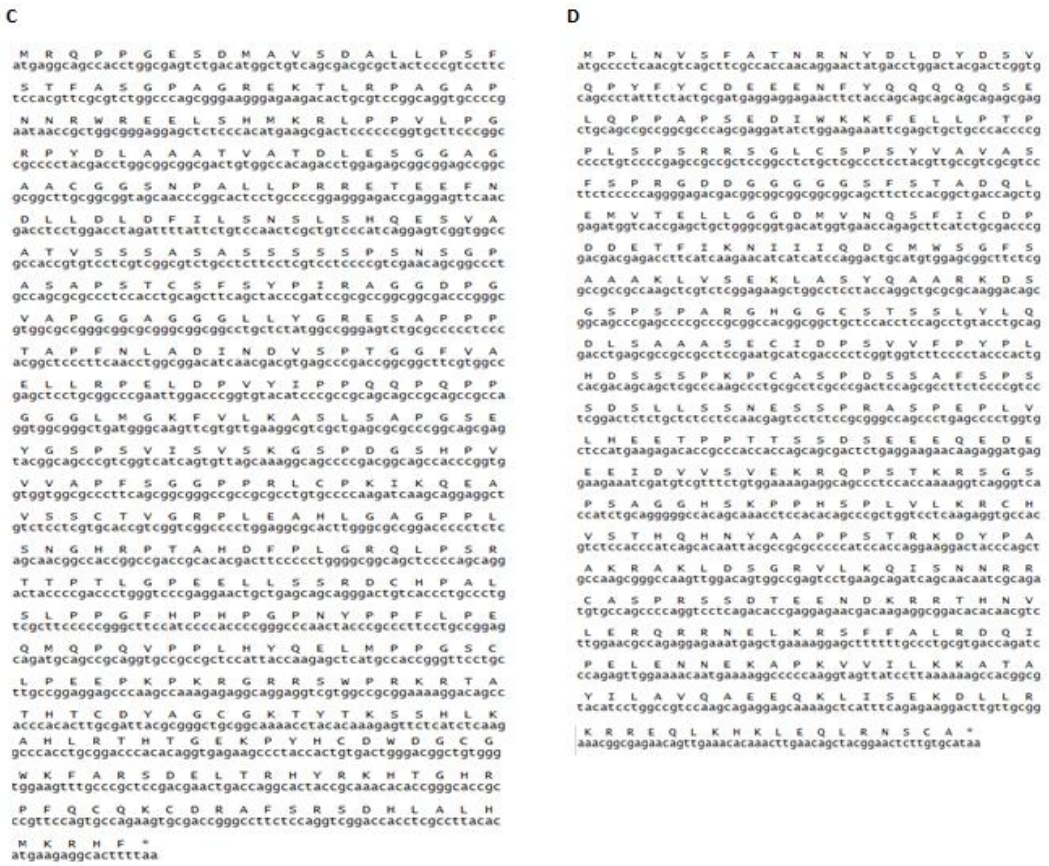
10.14751/SZIE.2015.052

5. ábra: Fehérje szekvencia illesztés a nyúl (rabbit) és ember (human) NANOG (E) szekvenciák esetében. Az immunfestéshez használt ellenanyagok epitóp régióit szürke színnel jelöltük.

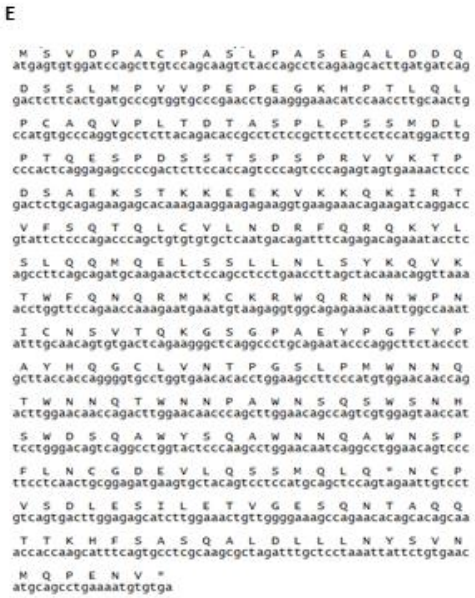


6. ábra: A nyúl *OCT4* (A) és *SOX2* (B) gének kódoló és lefordított fehérje szekvenciái. A fehérje szekvenciákat az *OCT4* és *SOX2* gének kódoló szekvenciái alatt tüntettük fel.

10.14751/SZIE.2015.052

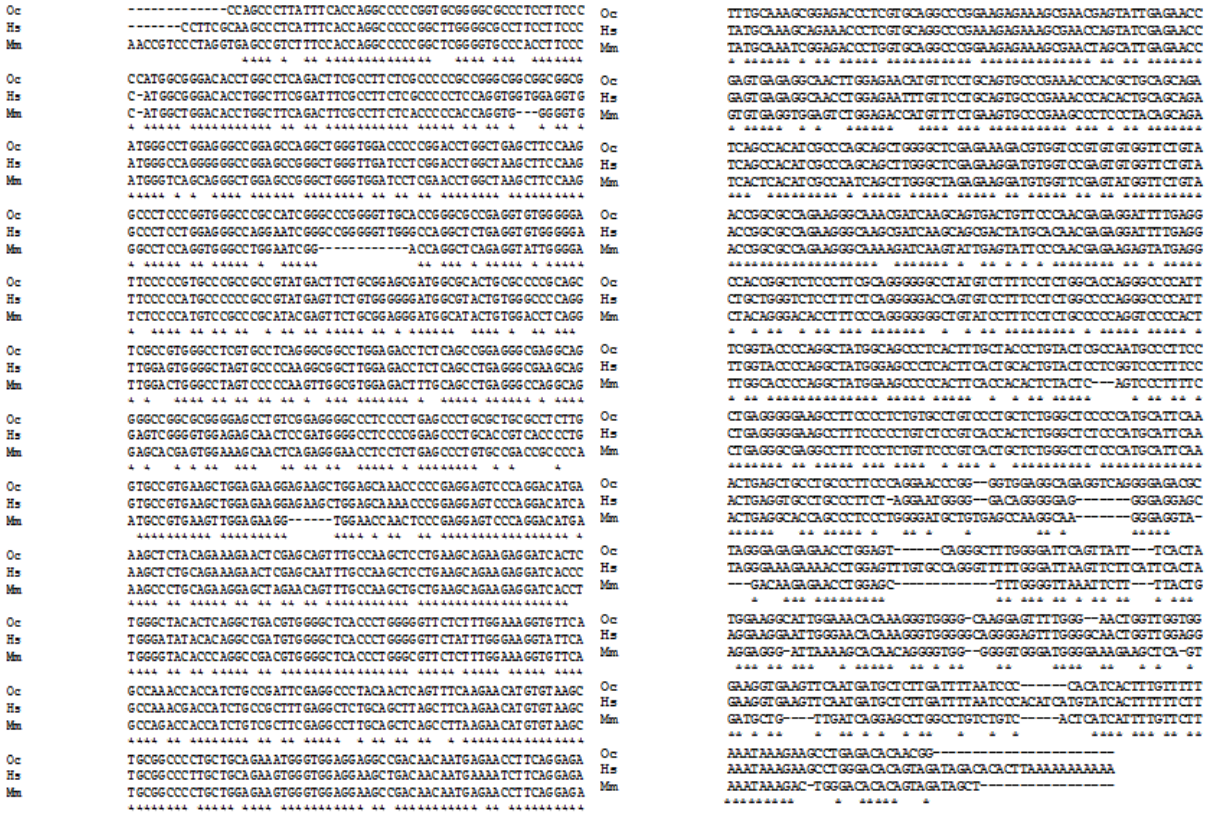


7. ábra: A nyúl *KLF4* (C) és *C-MYC* (D) gének kódoló és lefordított fehérje szekvenciái. A fehérje szekvenciákat az *KLF4* és *C-MYC* gének kódoló szekvenciái alatt tüntettük fel.

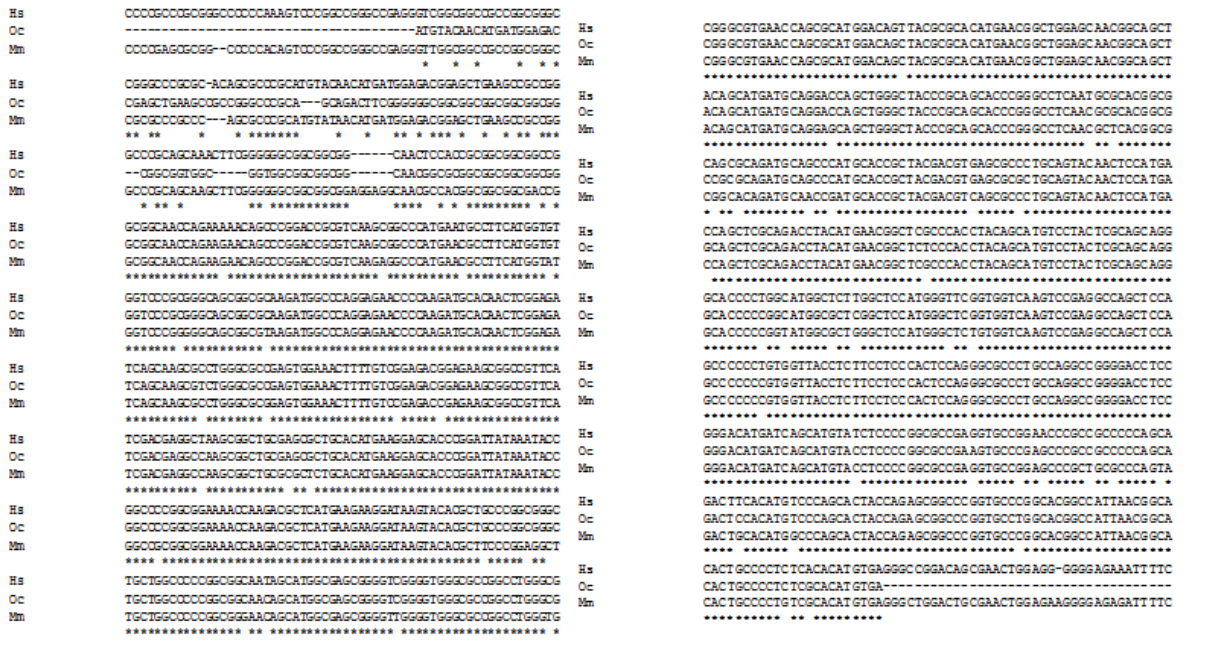


8. ábra: A nyúl *NANOG* (E) gén kódoló és lefordított fehérje szekvenciája. A fehérje szekvenciát az *NANOG* gén kódoló szekvenciája alatt tüntettük fel.

10.14751/SZIE.2015.052

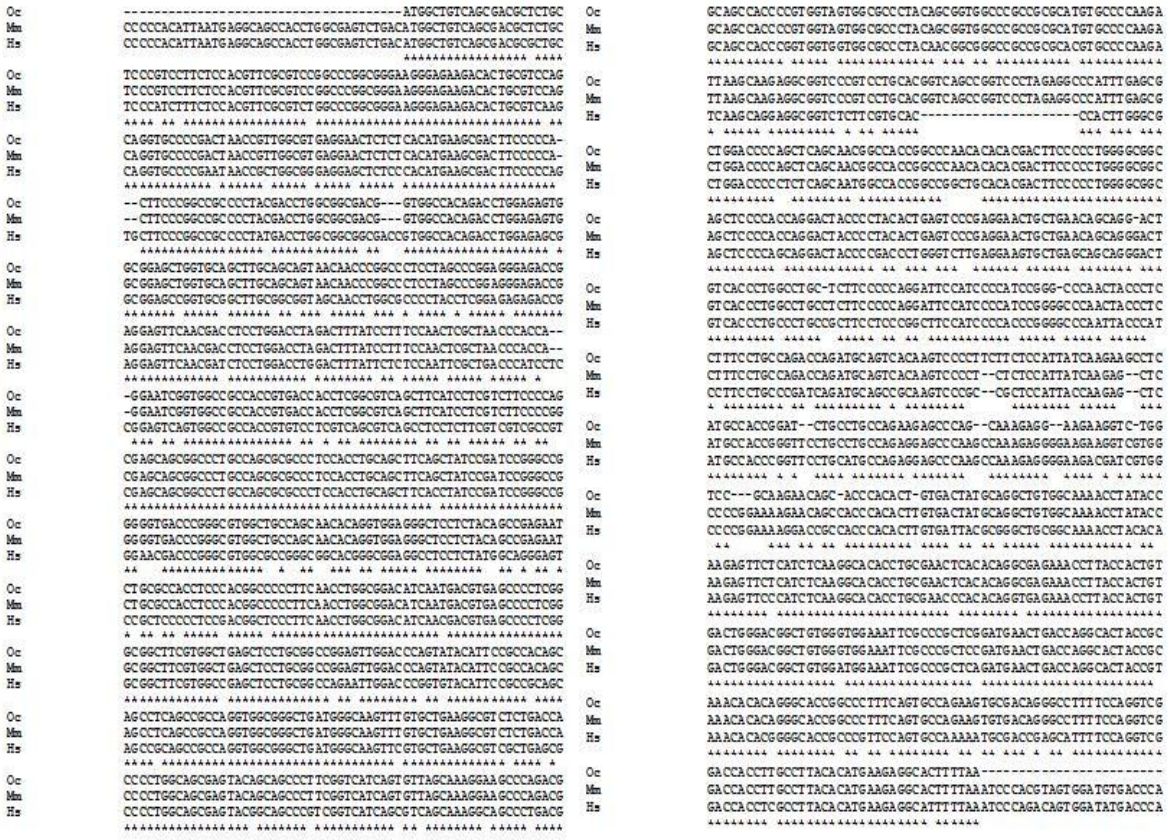


9. ábra: Az izolált nyúl *OCT4* cDNS szekvencia illesztése az egér és humán *OCT4* szekvenciákhoz
Nukletotid szintén: 79% homológia egérrel, 85% homológia emberrel; Aminosav szinten: 81% homológia egérrel, 90% homológia emberrel

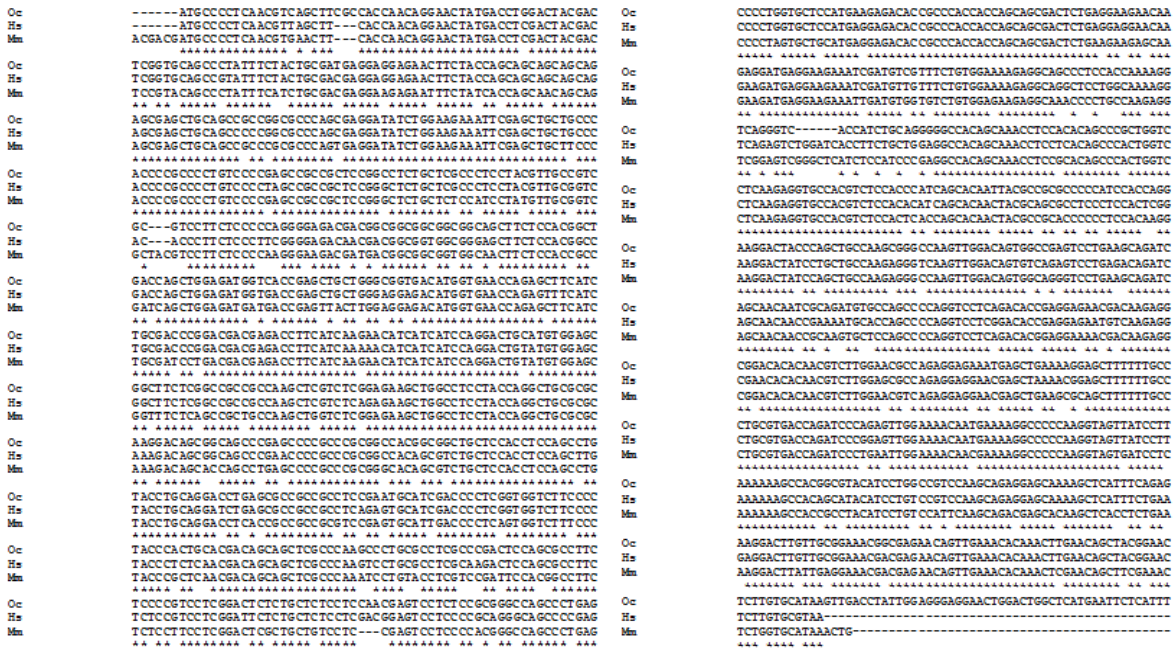


10. ábra: Az izolált nyúl *SOX2* cDNS szekvencia illesztése az egér és humán SOX2 szekvenciákhoz
Nukletotid szintén: 98% homológia egérrel, 85% homológia emberrel; Aminosav szinten: 95% homológia egérrel, 84% homológia emberrel

10.14751/SZIE.2015.052

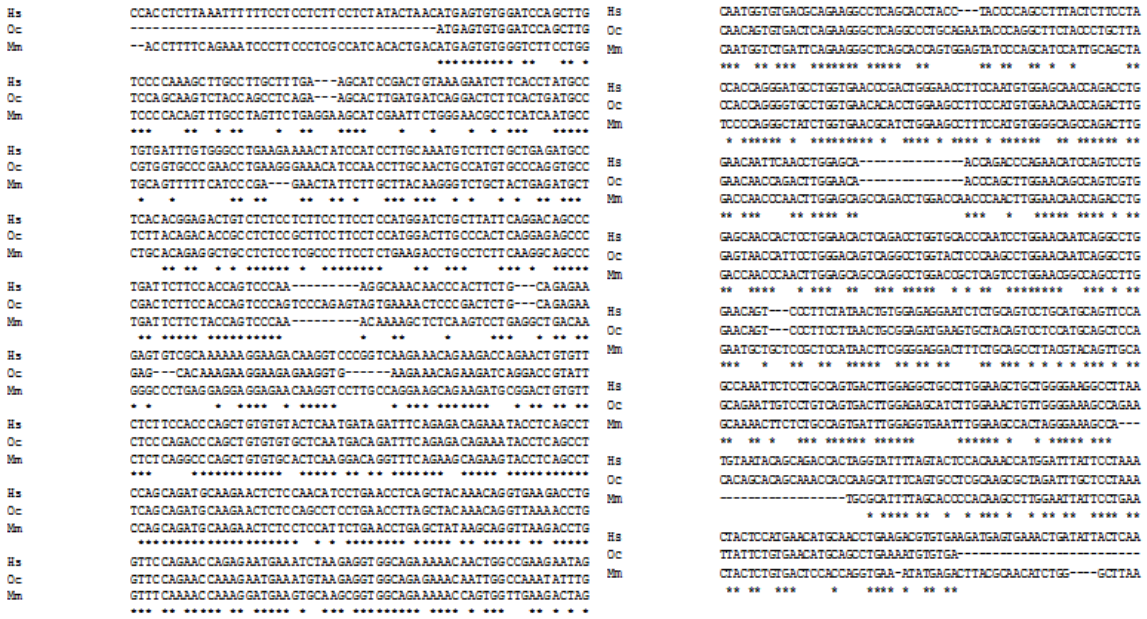


11. ábra: Az izolált nyúl *KLF4* cDNS szekvencia illesztése az egér és humán KLF4 szekvenciákhoz
Nukletotid szintén: 98% homológia egérrel, 85% homológia emberrel; Aminosav szinten: 95% homológia egérrel, 84% homológia emberrel

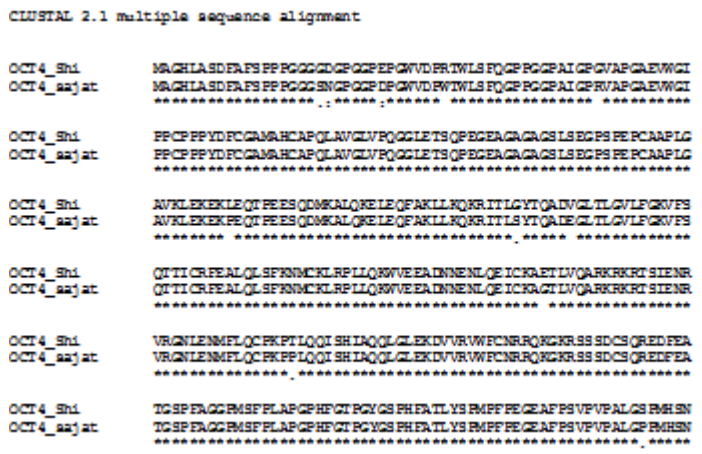


12. ábra: Az izolált nyúl *C-MYC* cDNS szekvencia illesztése az egér és humán C-MYC szekvenciákhoz
Nukletotid szintén: 88% homológia egérrel, 92% homológia emberrel; Aminosav szinten: 91% homológia egérrel, 94% homológia emberrel

10.14751/SZIE.2015.052



13. ábra: Az izolált nyúl *NANOG* cDNS szekvencia illesztése az egér és humán *NANOG* szekvenciákhoz
Nukletotid szintén: 71% homológia egérrel, 78% homológia emberrel; Aminosav szinten: 55% homológia egérrel, 66% homológia emberrel



14. ábra: Az izolált nyúl OCT4 fehérje szekvenciájának illesztése a publikált OCT4 szekvenciákhoz (Shi et al. 2008) (accession number: EF062856.1)

10.14751/SZIE.2015.052

```
CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment


SOX2_prediktalt     MYNMMETELKPPGPQQTSGGGGGGGGGGGGGGGGGNGAAAAAGGNQKNSPDRVKRPMNAFM
SOX2_sajat          MYNMMETELEPPGPQQASGGG--------GGGGNATAAATGGNQKNSPDRVKRPMNAFM
                    ********:******:****         *****.:***:******************

SOX2_prediktalt     VWSRGQRRKMAQENPKMHNSEISKRLGAEWKLLSETEKRPFIDEAKRLRALHMKEHPDYK
SOX2_sajat          VWSRGQRRKMAQESPKMHNSEISKRLGAEWKLLSETEKRPFIDEAKRLRALHMKEHPDYK
                    ************.**********************************************

SOX2_prediktalt     YRPRRKTKTLMKKDKYTLPGGLLAPGGNSMASGVGVGAGLGAGVNQRMDSYAHMNGWSNG
SOX2_sajat          YRPRRKTKTLMKKDKYTLPGGLLAPGGNSMASGVGVGAGLGAGVNQRMDSYAHMNGWSNG
                    ************************************************************

SOX2_prediktalt     SYSMMQDQLGYPQHPGLNAHGAAQMQPMHRYDVSALQYNSMSSSQTYMNGSPTYSMSYSQ
SOX2_sajat          SYSMMQEQLGYPQHPGLNAHGAAQMQPMHRYDVSALQYNSMTSSQTYMNGSPTYSMSYSQ
                    *****:**********************************:*****************

SOX2_prediktalt     QGTPGMALGSMGSVVKSEASSPPVVTSSHSRAPCQAGDLRDMISMYLPGAEVPEPAAP
SOX2_sajat          QGTPGMALGSMGSVVKSEASSPPVVTSSHSRAPCQAGDLRDMISMYLPGAEVPEPAAP
                    ************************************************************

SOX2_prediktalt     SRLHMSQHYQSGPVPGTAINGTLPLSHM
SOX2_sajat          SRLHMAQHYQSGPVPGTAINGTLPLSHM
                    *****:**********************
```

15. ábra: Az izolált nyúl SOX2 fehérje szekvenciájának illesztése a prediktált SOX2 szekvenciákhoz (accession number: XP_008264779.1)

```
CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment


KLF4_prediktalt     MRQPPGESDMAVSDALLPSFSTFASGPAGREKTLRPAGAPNNRWREELSHMKRLPPVLPG
KLF4_sajat          MRQPPGESDMAVSDALLPSFSTFASGPAGREKTLRPAGAPNNRWREELSHMKRLPPVLPG
                    ************************************************************

KLF4_prediktalt     RPYDLAAATVATDLESGGAGALCGGSNPALLPRREDRGSSTTFLNLDFISVQFGCPHQEV
KLF4_sajat          RPYDLAAATVATDLESGGAGAACGGSNPALLPRRE-TEEFNDLLDLDFILSNSLSHQESV
                    ******************** *************   . . :*:****  :  . ::.*

KLF4_prediktalt     GGRQPGPSSG-------------------------------------------------
KLF4_sajat          AATVSSSASASSSSSPSNSGPASAPSTCSFSYPIRAGGDPGVAPGGAGGGLLYGRESAPP
                    ..  ...:*.

KLF4_prediktalt     ------------------------------------------------------------
KLF4_sajat          PTAPFNLADINDVSPTGGFVAELLRPELDPVYIPPQQPQPPGGGLMGKFVLKASLSAPGS


KLF4_prediktalt     ----------------------VLPSSFGPPRSKKRPLPGGPSNLAVFRLPRSGAGGNPG
KLF4_sajat          EYGSPSVISVSKGSPDGSHPVVVAPFSGGPPRLCPKIKQEAVSSCTVGRPLEAHLGAGPP
                                          * * * ****   :    . *. :* *  .:  *..*

KLF4_prediktalt     DRARGRVCRASGAHGTVLTPPSSPSP---------------------------------
KLF4_sajat          LSNGHRPTAHDFPLGRQLPSRTTPTLGPEELLSSRDCHPALSLPPGFHPHRGPNYPPFLP
                         *    . . *  *.. ::*:

KLF4_prediktalt     -------------ELMPPGSCLPEEPKPKRGRRSWPRKRTATHTCDYAGCGKTYTKSSHL
KLF4_sajat          EQMQPQVPPLHYQELMPPGSCLPEEPKPKRGRRSWPRKRTATHTCDYAGCGKTYTKSSHL
                                  *********************************************

KLF4_prediktalt     KAHLRTHTGEKPYHCDWDGCGWKFARSDELTRHYRKHTGHRPFQCQKCDRAFSRSDHLAL
KLF4_sajat          KAHLRTHTGEKPYHCDWDGCGWKFARSDELTRHYRKHTGHRPFQCQKCDRAFSRSDHLAL
                    ************************************************************

KLF4_prediktalt     HMKRHF
KLF4_sajat          HMKRHF
                    ******
```

16. ábra: Az izolált nyúl KLF4 fehérje szekvenciájának illesztése a prediktált KLF4 szekvenciákhoz (accession number: XP_008253622.1)

10.14751/SZIE.2015.052

```
CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

C-MYC_prediktalt      MPLNVSFATNRNYDLDYDSVQPYFYCDEEENFYQQQQQSELQPPAPSEDIWKKFELLPTP
C-MYC_aajat           MPLNVSFATNRNYDLDYDSVQPYFYCDEEENFYQQQQQSELQPPAPSEDIWKKFELLPTP
                      ************************************************************

C-MYC_prediktalt      PLSPSRRSGLCSPSYVAVASFSPRGDDGGGGSFSTADQLEMVTELLGGDMVNQSFICDP
C-MYC_aajat           PLSPSRRSGLCSPSYVAVASFSPRGDDGGGGSFSTADQLEMVTELLGGDMVNQSFICDP
                      ************************************************************

C-MYC_prediktalt      DDETFIKNIIIQDCMWSGFSAAAKLVSEKLASYQAARKDSGSPSPARGHGGCSTSSLYLQ
C-MYC_aajat           DDETFIKNIIIQDCMWSGFSAAAKLVSEKLASYQAARKDSGSPSPARGHGGCSTSSLYLQ
                      ************************************************************

C-MYC_prediktalt      DLSAAASECIDPSVVFPYPLHDSSSPKPCASPDSSAFSPSSDSLLSSNESSPRASPEPLV
C-MYC_aajat           DLSAAASECIDPSVVFPYPLHDSSSPKPCASPDSSAFSPSSDSLLSSNESSPRASPEPLV
                      ************************************************************

C-MYC_prediktalt      LHEETPPTTSSDSEEEQEDEEEIDVVSVEKRQPSTKRSGSPSAGGHSKPPHSPLVLKRCH
C-MYC_aajat           LHEETPPTTSSDSEEEQEDEEEIDVVSVEKRQPSTKRSGSPSAGGHSKPPHSPLVLKRCH
                      ************************************************************

C-MYC_prediktalt      VSTHQHNYAAPPSTRKDYPAAKRAKLDSGRVLKQISNNRRCASPRSSDTEENDKRRTHNV
C-MYC_aajat           VSTHQHNYAAPPSTRKDYPAAKRAKLDSGRVLKQISNNRRCASPRSSDTEENDKRRTHNV
                      ************************************************************

C-MYC_prediktalt      LERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKATAYILAVQAEEQKLISEKDLLR
C-MYC_aajat           LERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKATAYILAVQAEEQKLISEKDLLR
                      ************************************************************

C-MYC_prediktalt      KRREQLKHKLEQLRNSCA
C-MYC_aajat           KRREQLKHKLEQLRNSCA
                      ******************
```

17. ábra: Az izolált nyúl C-MYC fehérje szekvenciájának illesztése a prediktált C-MYC szekvenciákhoz (accession number: XP_008254124.1)

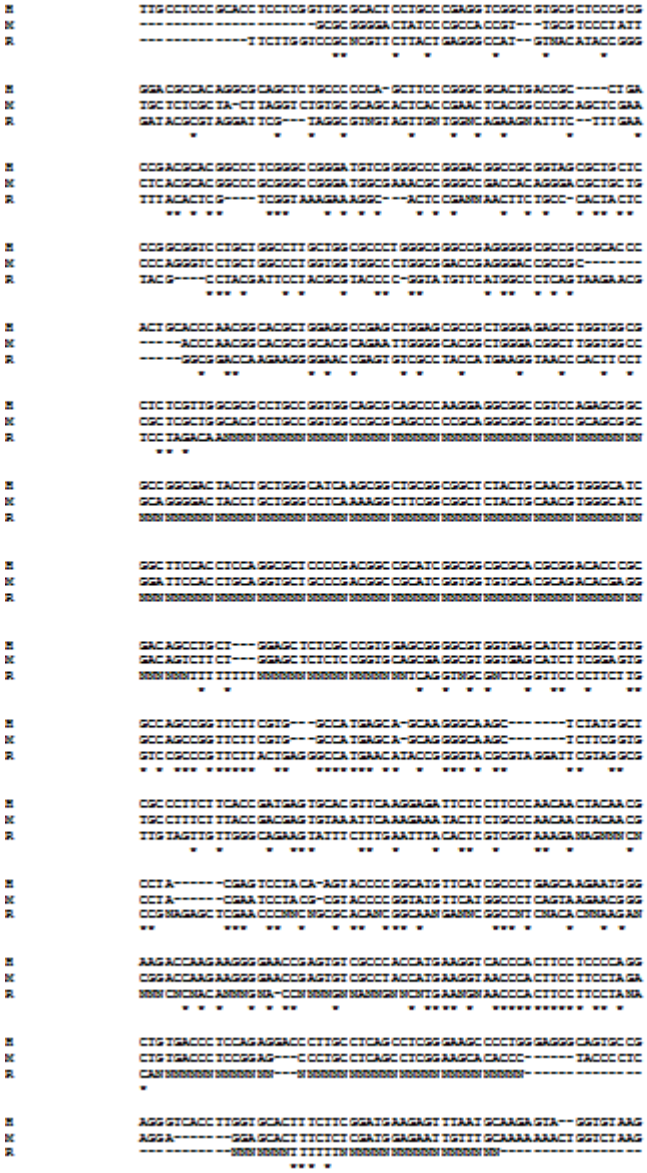
```
CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

NANOG_predicted       MSVDPACPASLPASEALDDQDSSLMPVVPEPEGKHPTLQLPCAQVPLTDTASPLPSSMDL
NANOG_aajat           MSVDPACPASLPASEALDDQDSSLMPVVPEPEGKHPTLQLPCAQVPLTDTASPLPSSMDL
                      ************************************************************

NANOG_predicted       PTQESPDSSTSPSPRVVKTPDSAEKSTKKEEKVKKQKIRTVFSQTQLCVLNDRFQRQKYL
NANOG_aajat           PTQESPDSSTSPSPRVVKTPDSAEKSTKKEEKVKKQKIRTVFSQTQLCVLNDRFQRQKYL
                      ************************************************************

NANOG_predicted       SLQQMQELSSLLNLSYKQVKTWFQNQRMKCKRWQRNNWENICNSVTQKGSGPAEYPGFYP
NANOG_aajat           SLQQMQELSSLLNLSYKQVKTWFQNQRMKCKRWQRNNWENICNSVTQKGSGPAEYPGFYP
                      ************************************************************

NANOG_predicted       AYHQGCLVNTPGSLPMWNNQTWNNQTWNNPAWNSQSWSNHSWDSQAWYSQAWNNQAWNSP
NANOG_aajat           AYHQGCLVNTPGSLPMWNNQTWNNQTWNNPAWNSQSWSNHSWDSQAWYSQAWNNQAWNSP
                      ************************************************************

NANOG_predicted       FLNCGDEVLQSSMQLQQNCFVSDLESILETVGESQNTAQQTTKHPSASQALDLLLNYSVN
NANOG_aajat           FLNCGDEVLQSSMQLQ-------------------------------------------
                      ***************

NANOG_predicted       MQPENV
NANOG_aajat           ------
```

18. ábra: Az izolált nyúl NANOG fehérje szekvenciájának illesztése a prediktált NANOG szekvenciákhoz (accession number: XP_002712808.1)

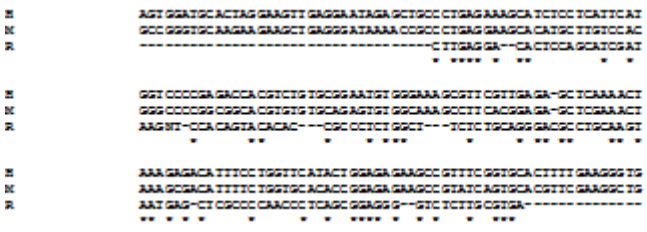
10.14751/SZIE.2015.052

19. ábra: Izolált nyúl FBX15 szekvencia összehasonlítása az egér és humán FBX15 szekvenciával
ClustalW programmal. Jelmagyarázat: H: human (ember), M mouse (egér), R: rabbit (nyúl)∗ konszenzus

10.14751/SZIE.2015.052

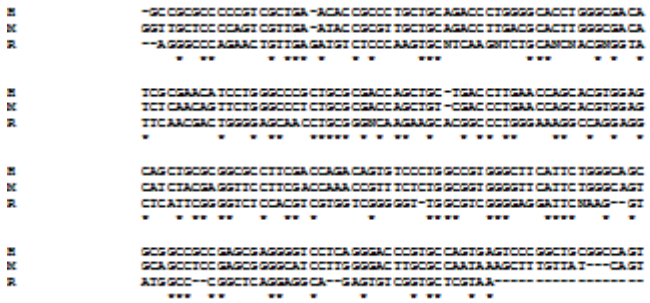


20. ábra: Izolált nyúl FGF4 szekvencia összehasonlítása az egér és humán FGF4 szekvenciával
ClustalW programmal. Jelmagyarázat: H: human (ember), M: mouse (egér), R: rabbit (nyúl)∗ konszenzus



21. ábra: Izolált nyúl REX1 szekvencia összehasonlítása az egér és humán REX1 szekvenciával
ClustalW programmal. Jelmagyarázat: H: human (ember), M: mouse (egér), R: rabbit (nyúl)∗ konszenzus

10.14751/SZIE.2015.052



22. ábra: Izolált nyúl UTF1 szekvencia összehasonlítása az egér és humán UTF1 szekvenciával
ClustalW programmal. Jelmagyarázat: H: human (ember), M: mouse (egér), R: rabbit (nyúl)∗ konszenzus

1. táblázat. Felhasznált ellenanyagok listája

Elsődleges ellenanyagok	Gyártó	Hígítás
Pluripotencia markerek		
Egér anti-humán OCT4 ellenanyag	Santa Cruz, SC-8628	1:50
Kecske anti- humán NANOG ellenanyag	R&D, AF3158	1:50
Kecske anti-humán KLF4 ellenanyag	R&D, AF2729,	1:50
Kecske anti-humánSOX2 ellenanyag	Santa Cruz, sc-17319	1:50
Nyúl anti-humán C-MYC ellenanyag	Cell Signaling, D84C12	1:800
Egér anti- humán SSEA-4	Cell Signaling, MC813	1:200
Egér anti- humán SSEA1	Santa Cruz, sc-21702	1:200
Spontán differenciációs markerek		
Nyúl anti-humán ßIII Tubulin	Covance, PRB-435P	1:2000
Nyúl anti- humán smooth muscle actin	Abcam, ab5694	1:100
Kecske anti-humán GATA4	Santa Cruz, sc-1237	1:50
Kardiális differenciációs markerek		
Egér anti-humán California, USA, 1/2000),	Abcam, ab10214	1:400
Kecske anti-humán Troponin-I	Abcam, ab19615	1:50
Egér anti-humán heavy chain cardiac Myosin	Abcam, ab15	1:100
Neurális differenciációs markerek		
Nyúl anti-humán neuronal class III ß-Tubulin	Covance, PRB-435P	1:2000
Nyúl anti-humán MAP2	Abcam, ab32454	1:2000
Nyúl anti-humán Musashi	Millipore, AB5977	1:1000
Másodlagos ellenanyagok		
AlexaFluor 488 szamár anti-kecske IgG (H+L)	Life Technologies, California	1:2000
AlexaFluor 488 szamár anti-egér IgG (H+L)	Life Technologies, California	1:2000
AlexaFluor 488 szamár anti-nyúl IgG (H+L)	Life Technologies, California	1:2000
AlexaFluor 594 szamár anti egér IgG (H+L)	Life Technologies, California	1:2000
AlexaFluor 594 szamár anti kecske IgG (H+L)	Life Technologies, California	1:2000
AlexaFluor 594 szamár anti nyúl IgG (H+L)	Life Technologies, California	1:2000

10.14751/SZIE.2015.052

2. táblázat. Nyúl iPS sejtek tenyésztésekor tesztelt, szérummentes médiumváltozatok

SRFREEM-1	SRFREEFM3I	SRFREEM2I	SRFREEM3I+LIF	SRFREEM2I+LIF
DMEM/F12	DMEM/F12	DMEM/F12	DMEM/F12	DMEM/F12
KO-SR -20%	KO-SR -20%	KO-SR -20%	KO-SR -20%	KO-SR -20%
PS 100X – 1%	PS 100X - 1%	PS 100X – 1%	PS 100X - 1%	PS 100X – 1%
Glutamin 100x -1%	Glutamin 100x -1%	Glutamin 100x -1%	Glutamin 100x -1%	Glutamin 100x -1%
NEEA 10mM – 1%	NEEA 10mM – 1%	NEEA 10mM – 1%	NEEA 10mM - 1%	NEEA 10mM - 1%
Pyruvate 100x – 1%	Pyruvate 100x - 1%	Pyruvate 100x – 1%	Pyruvate 100x – 1%	Pyruvate 100x - 1%
ß-Me – 100 uM	ß-Me - 100 uM	ß-Me – 100 uM	ß-Me - 100 uM	ß-Me - 100 uM
human bFGF-13ng/ml	human bFGF-13ng/ml	human bFGF-13ng/ml	human bFGF-13ng/ml	human bFGF-13ng/ml
	MEK inhibitor (10Mm) - 0.5 uM	MEK inhibitor (10mM) – 0.5 uM	MEK inhibitor (10mM) - 0.5 uM	MEK inhibitor (10mM) - 0.5 uM
	ALK5 inhibitor (10mM) - 0.5 uM	GSK3 inhibitor (10mM) – 3uM	ALK5 inhibitor (10mM) - 0.5 uM	GSK3 inhibitor (10mM) – 3uM
	GSK3 inhibitor (10mM) – 3uM		GSK3 inhibitor (10mM) – 3uM	20ng/ml mouse LIF
			20ng/ml mouse LIF	

3. táblázat. Nyúl iPS sejtek tenyésztésekor tesztelt, szérumot tartalmazó médiumváltozatok

SRM	SRM3I	SRM2I	SRM3I+LIF	SRM2I+LIF
KO-DMEM: Iscove's MDM	KO-DMEM: Iscove's MDM	KO-DMEM: Iscove's MDM	KO-DMEM: Iscove's MDM	KO-DMEM: Iscove's MDM
FCS- 15%	FCS- 15%	FCS- 15%	FCS- 15%	FCS- 15%
NEEA 10mM – 1%	NEEA 10mM – 1%	NEEA 10mM – 1%	NEEA 10mM - 1%	NEEA 10mM - 1%
Glutamin 100x – 1	Glutamin 100x - 1%	Glutamin 100x – 1%	Glutamin 100x – 1%	Glutamin 100x – 1%
Nucleosides – 1%	Nucleosides - 1%	Nucleosides - 1%	Nucleosides - 1%	Nucleosides – 1%
Insulin-transferrin-sodium selenite – 1%	Insulin-transferrin-sodium selenite – 1%	Insulin-transferrin-sodium selenite – 1%	Insulin-transferrin-sodium selenite - 1%	Insulin-transferrin-sodium selenite – 1%
ß-Me (G8540) (Sigma)-450mM	ß-Me (G8540) (Sigma)-450mM	ß-Me (G8540) (Sigma)-450mM	ß-Me (G8540) (Sigma)-450mM	ß-Me (G8540) (Sigma)-450mM
PS 100x- 1%	PS 100x- 1%	PS 100x- 1%	PS 100x- 1%	PS 100x- 1%
20ng/ml mouse LIF	40ng/ml human bFGF	40ng/ml human bFGF	20ng/ml mouse LIF	20ng/ml mouse LIF
40ng/ml human bFGF	MEK inhibitor (10mM) - 0.5 uM	MEK inhibitor (10mM) – 0.5 uM	40ng/ml human bFGF	40ng/ml human bFGF
	ALK5 inhibitor (10mM) - 0.5 uM	GSK3 inhibitor (10mM) – 3uM	MEK inhibitor (10mM) - 0.5 uM	MEK inhibitor (10mM) - 0.5 uM
	GSK3 inhibitor (10mM) – 3uM		ALK5 inhibitor (10mM) – 0.5 uM	GSK3 inhibitor (10mM) – 3uM
			GSK3 inhibitor (10mM) – 3uM	

4. táblázat. Nyúl iPS sejtek tenyésztésekor tesztelt szérumot tartalmazó médiumváltozatok

SRM	SRM3I	SRM2I	SRFREEM-1
KO-DMEM: Iscove's MDM	KO-DMEM: Iscove's MDM	KO-DMEM: Iscove's MDM	DMEM/F12
FCS- 15%	FCS- 15%	FCS- 15%	KO-SR -20%
NEEA 10mM - 1%	NEEA 10mM – 1%	NEEA 10mM – 1%	PS 100X - 1%
Glutamin 100x – 1	Glutamin 100x - 1%	Glutamin 100x - 1%	Glutamin 100x -1%
Nucleosides – 1%	Nucleosides – 1%	Nucleosides - 1%	NEEA 10mM - 1%
Insulin-transferrin-sodium selenite - 1%	Insulin-transferrin-sodium selenite – 1%	Insulin-transferrin-sodium selenite – 1%	Pyruvate 100x - 1%
ß-Me (G8540) (Sigma)- 450mM	ß-Me (G8540) (Sigma)- 450mM	ß-Me (G8540) (Sigma)- 450mM	ß-Me – 100 uM
PS 100x- 1%	PS 100x- 1%	PS 100x- 1%	human bFGF-13ng/ml
20ng/ml mouse LIF	40ng/ml human bFGF	40ng/ml human bFGF	
40ng/ml human bFGF	MEK inhibitor (10mM) – 0.5 uM	MEK inhibitor (10mM) - 0.5 uM	
	ALK5 inhibitor (10mM) – 0.5 uM	GSK3 inhibitor (10mM) – 3uM	
	GSK3 inhibitor (10mM) – 3uM		

10.14751/SZIE.2015.052

8.4 M4 Felhasznált oldatok/tenyésztő médiumok

1. HEK293T médium

DMEM-GlutaMaxI

FBS_____10% (v/v)

Pen/Strep (10.000 U/ml)_____1% (v/v)

2. Máj sejtek tenyésztő médiuma

DMEM high glucose

ES FBS_____10% (v/v)

Insulin-Transferrin-Sodium Selenite_____1% (v/v)

Penicillin/Streptomycin_____1% (v/v)

EGF (epidermal growth factor)_____20ng/ml

2. REF (Rabbit Embryonic Fibroblast-médium)

DMEM-GlutaMaxI

FBS_____10% (v/v)

Pen/Strep (10.000 U/ml)_____1% (v/v)

bFGF _____40 ng/ml

3. mES médium

DMEM-GlutaMaxI

FBS (Stem Cell Qualified, West Sacramento, USA)_____15% (v/v)

Non-essential amino acids (100x)_____1% (v/v)

Pen/Strep (10.000 U/ml)_____1% (v/v)

β-mercaptoetanol_____100 μM

LIF (ESGRO, Chemicon/Millipore, Billerica, MA, USA)_____1000 U/ml

10.14751/SZIE.2015.052

4. RbES /RbiPS médium

DMEM/F12

Knockout Serum Replacement 20 % (v/v)

Non-essential amino acids (100x) 1% (v/v)

β-mercaptoetanol 100 μM

Pen/Strep (10.000 U/ml) 1 % (v/v)

bFGF 8 ng/ml

5. HBSS mosó puffer

Na_2Cl_2 135 mM

HEPES 20 mM

KCl 4 mM

Na_2HPO_4 1 mM

$CaCl_2$ 2 mM

$MgCl_2$ 1 mM

Glucose 10 mM

6. Mosó-puffer

PBS

$CaCl_2$ 0,1 mM

Mg Cl_2 1 mM

7. Alkalikus foszfatáz-oldat (pH 8.5-9.0)

Trizma® base 29,7 mM

Maleic acid 6 mM

$MgCl_2$ 0,08 % (v/v)

Naphtol-As MX Foszfát 10,8 mM

Fast Red TR Salt 23 μM

10.14751/SZIE.2015.052

8. Kardiális és Spontán differenciációs médium

DMEM/F12

Knockout Serum Replacement_____20 % (v/v)

Non-essential amino acids (100x)_____1% (v/v)

β-mercaptoetanol_____100 μM

Pen/Strep (10.000 U/ml)_____1 % (v/v)

9. Neurális Indukáló médium

DMEM/F12/ Neurobasal medium

1xN2 supplement (100x)_____1% (v/v)

1xB27 supplement (50x)_____1% (v/v)

Glutamax (100x) _____2mM

Pen/Strep (10.000 U/ml)_____1 % (v/v)

10. Neurális differenciációs médium

Neurobasal medium

1xN2 supplement (100x)_____1% (v/v)

1xB27 supplement (50x)_____1% (v/v)

Glutamax (100x) _____2mM

Pen/Strep (10.000 U/ml)_____1 % (v/v)

10.14751/SZIE.2015.052

9 KÖSZÖNETNYiLVÁNÍTÁS

A dolgozatom elkészítéséhez szükséges kísérleteket a Szent István Egyetem Állattudományi Alapok Intézet, Molekuláris Állatbiotechnológiai Laboratóriumában és a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Mikromanipulációs és Genetikai Újraprogramozási csoportjában illetve a Biotalentum Kft-nél végeztem.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Dinnyés Andrásnak, a munkám során nyújtott folyamatos és nélkülözhetetlen támogatásáért.

Nagy köszönettel tartozom Dr. Nemes Csillának, Dr. Kobolák Juliannának, Dr. Pirity Melindának és Dr. Ujhelly Olgának, akik a munkámat irányították, segítették és felügyelték.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Bősze Zsuzsannának és Dr. Gócza Elennek hasznos szakmai tanácsaiékért, illetve a kísérleteimhez szükséges nyulak beszerzésében és elhelyezésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért. Valamint köszönetet szeretnék mondani Dr. Hoffmann Orsolya Ivettnek, aki a nyúl szöveti minták izolálásában volt segítségemre.

Köszönöm az MBK munkatársainak, Dr. Bucsy László állatorvosnak, Lengyel Lászlóné, Basa Judit és Fülöp László állatgondozóknak a kísérleteim során használt állatok gondozásában nyújtott segítségüket.

Hálával tartozom kollegáimnak Dr. Polgár Zsuzsannának, Dr. Fehér Anitának, Dr. Suchitra Muenthaisong, Dr. Varga Eszternek, Dr. Bock Istvánnak a kísérleteimhez és dolgozatom megírásához nyújtott segítségükért és nélkülözhetetlen szakmai tanácsaikért.

Köszönöm továbbá Dr. Baj-Gál Árpádnak, Kungl Györgyinek, Tolnainé Csákány Hajnalkának, Kovács Lászlónak, Serbana Getanak, Baráné Katalinnak, Dr. Adorján Mártának, Kovács Eszternek, Juhász Biankának, Bódi-.Jakus Máriának és a BioTalentum Kft. minden munkatársának a segítségét.

Külön köszönettel tartozom szüleimnek, férjemnek, kisfiamnak és a családom minden tagjának, barátaimnak, akik végig mellettem álltak és bíztak abban, hogy eljutok idáig.

Munkám anyagi fedezetét az EU FP7 (PartnErS, PIAP-GA-2008-218205; RabPstem, PERG07-GA-2010-268422; PluriSys, HEALTH-2007-B-223485; AniStem, PIAP-GA-2011-286264), EU COST Action FA0702 „GEMINI”; NKTH-OTKA-EU-7KP HUMAN-MB08-C-80-205; NKFP_BONUS HU_08/2-2009-0008; Plurabbit, OMFB-00130-00131/2010 ANR-NKTH/ 09-GENM-010-01; OTKA K77913; Hypharm company; Région Rhône-Alpes

10.14751/SZIE.2015.052

(CIBLE) és a “Kutató Kari Kiválósági Támogatás– Research Centre of Excellence- 8526-5/2014/TUDPOL” pályázatok biztosították.