



**Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola**

**PLURIPOTENCIA GÉNEK IZOLÁLÁSA ÉS *IN VITRO* VIZSGÁLATA  
NYÚLBAN**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Majorné Táncos Zsuzsanna**

Gödöllő

2015

**A doktori iskola**

**megnevezése:**

**Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola**

**tudományága:**

**Állattenyésztés-tudomány**

**Vezetője:**

**Professzor Dr. Mézes Miklós CMHA, akadémikus**

Tanszékvezető, egyetemi tanár

Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és

Környezettudományi Kar, Állattudományi Alapok Intézet,

Takarmányozástani Tanszék

**Témavezető:**

**Professzor Dr. Dinnyés András D.Sc.**

Laboratóriumvezető, egyetemi tanár

Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és

Környezettudományi Kar, Állattudományi Alapok Intézet,

Molekuláris Állatbiotechnológiai Laboratórium

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

## 1. AZ ÉRTEKEZÉS ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

Kísérletünk egyik fő célja 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. 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. 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 sejt vonalat 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 transzgenikus 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.

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

## 2. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 2.1 Donor állatok szuperovulációja

Az ivarérett, 19-22 hetes Hycote 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.

### 2.2 Petesejtek gyűjtése

A petesejteket 16 órával a hCG beadása után, a donor állatok eutanáziáját követően M2 medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) felhasználásával mostuk ki a petevezetőből. A kumulusz réteg eltávolításához a petesejteket 0.1% hialuronidázt tartalmazó M2 médiummal kezeltük. Ezt követően M2 médiumban és Dietilpirokarbonát (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.

### 2.3 *In vivo* embrió előállítás

Az *in vivo* embriókat a 2.3 fejezetben leírt szuperovuláltatott anyanyulak természetes termékenyítéséből nyertük. A hCG beadása után az anyát kontroll hím állattal pároztattuk.

### 2.4 Blasztociszta stádiumú embriók gyűjtése

Az *in vivo* expandálódott blasztocisztákat 86 órával a hCG beadása után, a donor állatok eutanáziáját 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.

### 2.5 Szöveti minta gyűjtése

A donor állatok (felnőtt nőstény Hycote 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.

## 2.6 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 adatbázisából, illetve saját vizsgálataink szekvenálási eredményeiből származtak (<http://www.ncbi.nih.gov/nucleotide>). Az *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *C-MYC* és *NANOG* teljes kódoló régiójának izolálásához a primereket a transzlációs start és stop helyekre terveztük.

## 2.7 Gének izolálása, szekvencia meghatározása

A gének izolálásához Reverz-Transzkripció 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 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 PCR termékeket agaróz gélen választottuk el és detektáltuk és gélből tisztítottuk.

## 2.8 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/](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).

## **2.9 Sleeping Beauty plazmid konstrukciók létrehozása**

A Sleeping Beauty (SB) transzpozon alapú vektort Ivics és munkatársai (Ivics et al. 1997) bocsájtották a rendelkezésünkre kísérleteink elvégzéséhez. Kísérleteink során ebbe az alapkonstrukcióba építettük be az újraprogramozáshoz használt szekvenciákat és hoztuk létre a policisztronos kazettát tartalmazó újraprogramozó vektort.

## **2.10 Egér pluripotencia géneket tartalmazó újraprogramozó vektor előállítás**

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 juttattuk be a Sleeping Beauty transzpozon alapú konstrukcióba az EcoRI hasítási helyek mentén.

## **2.11 Humán pluripotencia géneket tartalmazó újraprogramozó vektor előállítás**

A humán OSKM kazettát pedig a pRRL.PPT.SF.hOKSMco.idTomato.preFRT konstrukcióból vágtuk ki és illesztettük az SB alapkonstrukcióba Gibson Assembly reakció segítségével (Gibson *et al.* 2009).

## **2.12 Nyúl pluripotencia géneket tartalmazó újraprogramozó vektor előállítás**

A saját tervezésű nyúl OSKM kazettát, amelyet az általunk izolált génekből állítottunk össze, szintén Gibson Assembly reakció segítségével juttattuk az SB alap konstrukcióba.

## **2.13 Gibson Assembly klónozása**

A Gibson Assembly technika esetében egy izotermális enzim reakció során csatlakoztatjuk egymáshoz a megfelelő fragmenteket. A humán újraprogramozó faktorokat tartalmazó Sleeping Beauty konstrukció létrehozásakor a dTomato konstrukcióból kihalásított 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.

## **2.14 Lentivírus plazmid konstrukciók**

### **2.14.1 Egér és humán újraprogramozó kazettát tartalmazó lentivírus vektor**

Az egér újraprogramozó faktorok lentivirális bevitelét a pF-EF1- $\alpha$ /OSKM/IRES/EGFP-W konstrukció segítségével oldottuk meg (Varga et al. 2014).

A humán újraprogramozó faktorok lentivirális bevitelét a pRRL.PPT.SF.hOKSMco.idTomato.preFRT vektorral oldottuk meg (Voelkel et al. 2010; Warlich et al. 2011).

## **2.15 A nyúl máj, fibroblaszt és HEK293T sejtek tenyésztése**

A májsejtek tenyésztése 75 cm<sup>2</sup>-es flaskákban, 37°C-on és 5% CO<sub>2</sub> koncentráció mellett történt.

## **2.16 Nyúl ES és iPS sejtek tenyésztése**

Az általunk alapított és kísérleteinkhez használt kontroll sejtek tenyésztése Honda és mtsai protokollja alapján történt (Honda et al 2010). Kísérleteinkhez kontrollként nyúl embrionális őssejteket használtunk, melyeket Prof. Arata Honda (RIKEN Laboratory, Japán) bocsájtott a rendelkezésünkre (Honda et al. 2010).

## **2.17 Nyúl iPS sejtek létrehozása és tenyésztése**

### **2.17.1 Lipofekció**

A transzfekeiót megelőző napon a fibroblaszt sejteket 24 lyukú sejttenyésztő edénybe szélesztettük (0,5-2x 10<sup>5</sup> sejt/lyuk). A transzfekeióhoz a DNS-t szérum-mentes médiumban hígítottuk (1 $\mu$ g/50 $\mu$ l médium). A transzpozáz-vektor/transzpozon-vektor aránya 1/10, azaz ebben az esetben 4 $\mu$ g SB-OSKM és 0.4 $\mu$ g SB100x volt. A használt DNS ( $\mu$ g) és Lipofectamin ( $\mu$ l) aránya pedig 1:1 volt. A transzfekeiót követő második napon a sejteket 6 lyukú tenyésztő edénybe passzáltuk át, Mitomicin-C kezelt egér fibroblaszt rétegre.

### **2.17.2 Lentivírus transzdukeió**

A lentivírus transzdukeióhoz a nyúl sejteket 24 lyukú tenyésztőedénybe ültettük ki, 3x10<sup>4</sup>sejt/lyuk denzitásban, és egy éjszakán át a saját tenyésztő médiumukban tartottuk őket, 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> mellett (Honda *et al.* 2010). Másnap a sejtek tápoldatához polybrane-t adtunk, 8  $\mu$ g/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.

### **2.18 Alkalikus foszfatáz aktivitás detektálása és immunfluoreszcens analízis**

Az alkalikus foszfatáz aktivitás detektálásához kétféle protokollt használtunk: a fixált nyúl iPS sejteket Alkalikus foszfatáz kit alkalmazásával (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA, míg az élő sejteket az AP live stain kit (Life Technologies) segítségével festettük. A festések során a gyártók protokollja szerint jártunk el. Az alkalikus foszfatáz aktivitást OLYMPUS IX71 fluoreszcens mikroszkóp használatával tanulmányoztuk.

Immunocitokémiához a mintákat mosást és szükség esetén permeabilizálást követően, egy éjszakán át inkubáltuk az elsődleges antitesttel, így másnap a másodlagos antitesttel történő 1 órás inkubálást végeztük el. A sejtmagokat DAPI tartalmú Vectashield mounting médiummal (Vector Laboratories) jelöltük, és végül a megfestett sejteket fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

### **2.19 In vitro differenciálódási képesség vizsgálata**

**In vitro spontán/kardiális differenciáció:** A nyúl ES és iPS sejtek kardiális irányú differenciáltatásához a humán ES sejtek kardiális differenciáltatási protokollját vettük alapul. Az EB formálódáshoz függő cseppezes módszert (Hanging Drop, HD) alkalmaztunk (Rungarunlert *et al.* 2009).

**In vitro neurális differenciáció:** A nyúl ES és iPS sejtek neurális irányú differenciáltatásához a humán ES sejtek neurális differenciáltatási protokollját vettük alapul. Az EB formálódáshoz szuszpenziós módszert alkalmaztunk (Klincumhom *et al.* 2012).

A sejtsomókat mindegyik esetben a differenciáció 14. és 21. napján fixáltuk és ICC festéseket végeztünk.

### **2.20 In vivo differenciálódási képesség vizsgálata**

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

### 3. EREDMÉNYEK

#### 3.1 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 lejátszó folyamatok mechanizmusainak megfigyelésére, amelyet az általunk vizsgált gének kimutatásával is tanulmányozhatunk.

#### 3.2 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 vizsgálatokor, 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 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.

### **3.3 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.

### **3.4 Nyúl indukált pluripotens sejtek generálása**

Célunk az volt, hogy egér és humán pluripotencia gének felhasználásával iPS sejteket hozzunk létre nyúl esetében is, amely egy olyan komparatív rendszert eredményez, ahol az egyes fajok közötti eltérések és hasonlóságok is jól vizsgálhatóak. Az újraprogramozás során alkalmazott SB és Lentivirális vektor hatékonyságában különbséget nem tapasztaltunk.

Egér újraprogramozó faktorok használatakor a nyúl iPS-szerű morfológiájukban leginkább az egér őssejtekhez hasonlítottak (kerek, domború felszínű, kompakt kolóniák) és néhány passzázs után eldifferenciálódtak.

Humán újraprogramozó faktorokkal való visszaprogramozás esetén a hatékonyság már szembetűnően nagyobb volt. A sejt kolóniák morfológiájukban a humán őssejtekhez hasonlítottak (ovális, éles határvonalú, lapos felszínű, kevésbé kompakt kolóniák) és minimum 30 passzázsra át fenntartathatók voltak.

Eredményeink alapján a végső következtetésünk az volt, hogy rbiPS 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.

## 4. 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 sejtvonalatokat karakterizáltam és tulajdonságaikat összehasonlítottam pluripotens ES sejtekkel.
6. Az általam azonosított nyúl pluripotencia gének felhasználásával elsőként faj-specifikus újraprogramozó konstrukciót hoztam létre.

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

### 5.1 Nyúl pluripotencia gének azonosítása

A munkánk során sikeresen azonosított 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 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.

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 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 vizsgálatok elmondható, hogy a humán pluripotens génexpresszióhoz hasonló mintázatot kaptunk.

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 vizsgálatok. Ezen túl 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 generált nyúl indukált pluripotens sejtek esetében.

## **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 közölt 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.

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 sejt kolóniák morfológiájukban a humán őssejtekhez hasonlítottak (ovális, éles határvonalú, lapos felszínű, kevésbé kompakt kolóniák) és minimum 30 passzázsra át fenntartathatók voltak, bár a sejtpopuláció a passzálások növelésével egyre heterogénebbnek bizonyult.

Ezen megfigyelések alapján arra következtettünk, hogy nem az újraprogramozó rendszer, hanem leginkább az újraprogramozó faktorok „származása” az, ami fontos szerepet játszik a létrehozott nyúl indukált sejt vonalak 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 sejt vonalak sokkal nagyobb stabilitást mutattak és tovább voltak differenciálódás nélkül fenntarthatóak, mint az egér faktorokkal újraprogramozott vonalak.

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 hosszú távon stabil, nem differenciálódó nyúl indukált pluripotens őssejt vonalak létrehozására is, amelyek talán nagyobb hatékonysággal formálhatnák 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.



## 6. PUBLIKÁCIÓS LISTA

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 faktoral 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. Purity; 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., Kobolák, 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 preimplantation stage embryos. *BMC Mol Biol*. 2009; 10: 88. Published online 2009 September 4. doi: [10.1186/1471-2199-10-88](https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-88)

**IF.: 2.848**

### **Impakt faktoral 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**

### **Impakt faktoral nem rendelkező, hazai, magyar nyelvű folyóiratok:**

6. **Táncos Zsuzsanna**, Kobolák Julianna, Baji Gál Árpád, Dinnyés András (2006): Az OCT4 és NANOG transzkripció 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.; Purity, 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., Purity, 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.**; Purity, 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
12. Dinnyes, A., M.K. Purity, 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. Purity, 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.; Purity, 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 Fialat Biotechnológusok Országos Konferenciája (FIBOK 2014). 2014. Szeged, Hungary. 7. March 2014. p. 86.

**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. Berzsényi, 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. Berzsényi, 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

## 7. 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. Purity Melindának és Dr. Ujhelly Olgának, akik a munkámat irányították, segítették és felügyelték.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Bősze Zsuzsannának és Dr. Gócza Elennek hasznos szakmai tanácsaikért, 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 ideig.

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, OMF01-00130-00131/2010 ANR-NKTH/ 09-GENM-010-01; OTKA K77913; Hypharm company; Région Rhône-Alpes (CIBLE) és a “Kutató Kari Kiválósági Támogatás– Research Centre of Excellence- 8526-5/2014/TUDPOL” pályázatok biztosították.