

ZÁRÓJELENTÉS 2005

Témavezető neve: Dr. Kovács András

A téma címe: “Kiméra-technikák kidolgozása klónozás, hímesítés és genetikai manipulációk céljára”

A kutatás időtartama: 2002-2005.

A 2002-2005 KÖZT ELÉRT EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE

1. EGÉR KIMÉRÁK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA

2003-ban eltérő eredetű transzgénikus egér ES-sejtvonalak (embrionális eredetű őssejtvonalak) kiméra alkotó képességét vizsgáltuk. Eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy mind a bevitt ES-sejtek száma, mind a passzázs szám befolyásolja a kiméra utódok arányát. A legjobb hatásfokot akkor értük el, amikor 10-15 sejtet tartalmazó ES-sejtcsomót használtunk fel a kiméra készítéshez. Adatsorunkból kiderült, hogy a passzázs szám növekedésével csökken a kapott újszülöttek száma, illetve az azok közt található kimérák aránya, ami azzal magyarázható, hogy az ES-sejtvonalak a folyamatos passzálások során veszítenek pluripotenciájukból (1).

2004-ben az R1 sejtvonalból származó transzgénikus ES-sejtvonalak kiméra alkotó képességét vizsgáltuk. Az ES sejteket nyolcsejtes CD1 egértörzsből származó gazdaembrióval aggregáltatva hoztuk létre a kiméra embriókat. A legtöbb általunk vizsgált ES-sejtvonal esetében kaptunk kiméra utódokat is, azonban csak néhány ES-sejtvonal esetében születtek ivarsejt kimérák. A sejtek pluripotenciájában bekövetkező változásokat követhetjük a pluripotens sejtekre jellemző Oct4, Sox2, LIFR és FGF4-R markerek expresszió szintjében bekövetkező változásokkal, illetve a telomeráz expresszió szintjében bekövetkező változással, azonban úgy gondoljuk, hogy egy sejtvonal kiméra alkotó képességét leginkább az adott sejtvonalban található euploid sejtek aránya befolyásolja. Az R1 sejtvonalból létrehozott transzgénikus ES-sejtvonalak sejtjei között nagy arányban találhatóak 39 kromoszómát tartalmazó, valószínűleg XO kariotípusú sejtek. Ezek az aneuploid sejtek ugyan képesek beépülni az embriók szövetei közé, kiméra embriókat, kiméra állatokat létrehozni, azonban nem alkalmasak életképes ivarsejtek képzésére, így nem kapunk ivarsejt kiméra utódokat sem (1. ábra)(2).

2005-ben sikerült FISH módszerrel kimutatni az X- és az Y-kromoszómák jelenlétét, illetve hiányát az X0 kariotípusú ES-sejtekben. Az így kapott adatok azt mutatják, hogy az R1 ES-sejtvonal sejtei között található 39 kromoszómát tartalmazó ES-sejtek valóban X0 kariotípusú sejtek, mivel ezekben nem tudtuk kimutatni az Y-kromoszóma jelenlétét.

2. NYÚL KIMÉRÁK LÉTREHOZÁSA ÉS VIZSGÁLATA

2003-ban a nyúl kimérák előállításához egy vad típusú nőstény és a humán VIII. véralvadási faktorra homozigóta transzgenikus bak pároztatásából nyert nyolcsejtes kompaktálódás előtti morula egyetlen blasztomerjét juttattuk be mikroinjektálással egy vad típusú 16 sejtes morula perivitellináris terébe. Az élve született állatok közül a PCR eredmények alapján négy kiméra volt (ezek kódja: 16, 334, 374 és 375). A fenotípusos és kromoszóma-vizsgálatok szerint kimérák közül kettő XX/XX nősténynek (16, 374) egy XY/XY hímnek (334), illetve egy fiatalon hipogonádiás, de később normális XX/XY hímnek bizonyult (375). Mind a négy állat termékeny és kettő germinális (ivarsejt) kiméra is volt. A kimérák szöveti analízisét elvégezve Real Time PCR-rel, a 334-es hím spermiumainak 1,2 százaléka hordozta a markergént. A 374. nőstény kevés számú utódja közül egy transzgenikusnak bizonyult. Tehát a 374. nőstény is germinális kiméra, petefészek-sejtjeinek 3,4 százaléka tartalmazta a transzgént (3).

2004-ben tovább folytattuk a nyúl ES-sejtvonal alapítási munkát is. Olyan új tápfolyadékot dolgoztunk ki, melynek alkalmazása lehetővé tette „ES-like” sejtkolóniák létrehozását. Ezeket a tenyészetek 6-7 passzázsra keresztül fenn tudtuk tartani. Igazolni tudtuk, hogy az ES-like kolóniákat alkotó sejtek ebben a tenyésztő rendszerben, 5-6 hétig, (6-7 passzázs) megőrzik pluripotenciájukat, vagyis, hogy a sejtek megőrizték alkalikus foszfatáz (AP) aktivitásukat, és a kolóniákon belül a sejtek egy része a pluripotens sejtekre jellemző Oct4 és SSEA-1 expressziót mutatott (2. ábra)(4).

2005-ben kidolgoztuk az ES-kiméra létrehozásához szükséges technikát is (3. ábra). Mivel a nyúl-ES sejtek differenciálódni kezdenek zselatinos felszínen, az ES-sejteket a kiméra előállítás előtt GFP-t expresszálló zöld fibroblaszt sejteken növesztettük, így az ES-sejtek a fibroblaszt sejtektől elkülöníthetőek voltak. Az ES-sejteket transzgenikus nyúlból származó embrióból alapítottuk, így az ES-sejtekből származó utódsejtek a kimérákban is kimutathatók. A nyúl ES-kiméra embriók fejlődését először in vitro vizsgáltuk. A kiméra embriók nagy része tovább fejlődött, a 16-sejtes embrióba injektált sejtek nem befolyásolták a kiméra

embriók fejlődését (3. ábra). A kísérletek következő részében a kiméra embriók recipiens anyába való beültetését terveztük.

Tetraploid nyúl embriók előállításához az egér esetében használt paraméterek nem megfelelők, azt gondoltuk, hogy a nyúl embriók körülvevő vastag zona pellucida következtében. A zona pellucidát az embriók egy részéről pronázos emésztéssel eltávolítottuk és a fúziós paraméterek változtatásával igyekeztünk megtalálni a tetraploid nyúl embriók előállításához szükséges optimális feltételeket. A zona pellucida nélküli tetraploid embriók *in vitro* továbbfejlődése nem megfelelő, ezért visszatértünk zona pellucidát tartalmazó embriók vizsgálatára. Sikerült megtalálni az optimális fúziós paramétereket a zona pellucidát tartalmazó nyúl embriók esetében is (4. ábra). A tetraploid nyúl embriókat felhasználva a továbbiakban $2n/4n$ kiméra embriókat is szeretnénk létrehozni (5).

3. EGÉR SPERMATOGÓNIUM IZOLÁLÁS

2003-ban az A-spermatogóniumok izolálásakor négy-napos, CD-1 egerek heréit MEM+5 $\mu\text{g/ml}$ Dnáz oldatba tettük. A Percoll-grádiensek egyes grádienseit különválasztottuk és mikroszkóppal értékeltük. Előzetes eredményeink azt mutatták, hogy a 4-es és 5-ös frakció tartalmazott A-spermatogóniumokat.

2004-ben feladatunk az egyes frakciókból származó sejt-szuspenziókban található A-single spermatogóniumok intakt állapotban történő kinyerésre és további manipulációkra alkalmas státuszban való azonosítása volt. A spermatogenezis során az A-spermatogóniumok számos fejlődési stádiumon mennek keresztül, és a vonatkozó szakirodalom szerint csak az A-single spermatogóniumok tekinthetők ős-sejtnek. Differenciál-interferencia kontraszt mikroszkóp segítségével értékeltük a megfelelő Percoll-rétegekből kinyert sejt szuszpenziókat. A sejteket hármass fluorokróm-kombinációval is jelöltük, remélve ettől a pontosabb sejt azonosítást: az élő sejteket DNS-specifikus festékekkel (Hoechst 33342, kék fluoreszcencia), az elhalt sejteket szintén DNS-specifikus festékekkel (propidium-jodid, vörös fluoreszcencia), a mitokondriumokat a mitokondriumok lipid állományában akkumulálódó Mitotracker Green FM próbával (zöld fluoreszcencia) jelöltük. Külföldi szakértőkkel való konzultáció során azonban be kellett látnunk, hogy az A-single spermatogóniumok sejt-szuspenzióban nem azonosíthatók morfológiai bélyegek alapján. Továbbá, mivel eleve kis hányadban vannak jelen a herékben (újszülött egérben mintegy 10%-a az összes spermatogónium állománynak), kinyerésük határfoka még biztos azonosítás mellett is

nagyon alacsony lenne. Mindezekén túl, mivel az A-spermatogóniumok altípusai még azonos fajon belül is eltérnek ivaréres előtt és után az a reményünk, hogy az újszülött egereken, mint modellen kidolgozott A-single spermatogónium-kinyerési technika adaptálható lenne más fajok kifejlett egyedeire (pl. sérülést szenvedett tenyészbikákra) nem kecsegtethetett sikerrel, ezért úgy döntöttünk, a továbbiakban más alternatívák keresésére koncentrálnunk.

4. SZARVASMARHA EMBRIÓK ELŐÁLLÍTÁSA, FEJLŐDÉSI POTENCIÁLJÁNAK VIZSGÁLATA IN VITRO ÉS IN VIVO

Szarvasmarhák esetében in vitro termékenyítésből származó diploid és tetraploid embriók, illetve különböző meghatározott ivarú embrióból származó blasztomerek, illetve embrió eredetű sejtek felhasználását terveztük kiméra embriók létrehozására. Céljaink eléréséhez azonban ki kellett dolgoznunk egy hatékonyan működő in vitro embrió előállítási rendszert, illetve meg kellett teremteni a lehetőségét a szarvasmarha embrióknak recipiens állatokba történő beültetéséhez.

Az embriók tenyésztésére félig definiált tenyésztő médiumot alkalmaztunk. Az embriókat SOFaaci médiumba helyeztük, amit 5, vagy 10% FCS-sel egészítettünk ki. A kultiváció hetedik napján megszámloltuk a hólyagcsíra állapotú embriókat. Szignifikánsan nagyobb arányban kaptunk blasztocisztákat abban az esetben, ha a tenyésztő médiumot 10% FCS-el egészítettük ki (6).

Kétsejtes szarvasmarha embriók sejtszeteinek elektrofúziója révén lehet tetraploid szarvasmarha embriókat létrehozni. A tetraploid egér embrió előállításkor is alkalmazott paramétereket felhasználva történtek a kísérletek. A felhasznált kétsejtes embriók 10 percen belül 70%-a hatékonysággal fuzionáltak, 10% FCS-t tartalmazó tenyésztőmédiumot alkalmazva a fúzió átesett embriók közül 65% fejlődött tovább, 25%-uk fejlődött hólyagcsíra állapotú embrióvá.

2004-ben az aradi Research and Production Station Center for Bovine Breeding-Arad (at Research Institute for Bovine Breeding Balotesti) együttműködőink segítségével sikerült szuperovuláltatott donor tehenekből is embrió kimosnunk. Edwin Robertson protokollját alkalmaztuk a szuperovuláció indukálásához. Az ösztroz utáni 8. napon kimosott 26 embrió 13 recipiens nőstény méhébe ültettük vissza. A recipienssek közül négy esetben lehetett vemhességet megállapítani a vemhesség harmadik hónapjában. A négy vemhességből egy megszületett borjút kaptunk.

A 2004 évi munkatervben szereplő szarvasmarha embriókkal végzett kísérleteket az RO-3/2002 román magyar Tét pályázat keretében a temesvári szarvasmarha IVF laboratóriumban tudtuk elvégezni, (szarvasmarha embriók ivar-meghatározásának kidolgozása), mivel 2004 kezdetétől az MBK, Állatbiológiai Intézetében - az MBK főigazgatója, illetve az IT (Igazgató Tanácsa) határozatának értelmében - megszűnt a szarvasmarha IVF laboratórium, így a munkánkhoz szükséges szarvasmarha embriókhoz nem juthattunk hozzá. 2004. novemberében a román-magyar együttműködés befejeződött, így az általunk 2005 évre vállalt feladat teljesítése, vagyis a kiméra szarvasmarha embriók in vivo vizsgálatának elvégzése nem állt módunkban. Ennek értelmében kértük, hogy a 2005-re vállalt szarvasmarha kiméra előállítás helyett, az eddigi eredményeink alapján ígéretesnek mutakozó egér és nyúl kiméra előállítási munkát folytathassuk.

5. SZEX DETERMINÁCIÓ VIZSGÁLATA EGÉR KIMÉRÁKBAN

2005-ben a szex-determináció folyamatának kezdeti lépéseit vizsgáltuk egér kimérákat alkalmazva. A kimérák fontos szerepet töltenek be az embrionális fejlődés tanulmányozásában, a sejtek fejlődési potenciáljának vizsgálatában, a determináció folyamatának nyomon követésében, az embrionális korban ható mutációk feltárásában, ill. transzgénikus egyedek létrehozásában.

A kísérletekben a CD1, illetve CD1/EGFP, 1,5 napos, két-sejtes egér embriókat szuperovuláltatott nőstény petevezetőjéből mostuk ki. Az embriókat 2,5 napos korig tovább tenyésztettük KSOM médiumban. A kimérák előállítása során egy nyolc-sejtes embrió egyetlen sejtjét aggregáltattuk egy nyolc-sejtes embrió hét sejtjével. A nyolc-sejtes (2,5 napos) embriókat körülvevő zona pellucidát savas Tyrode's (pH: 2,5) oldattal távolítottuk el. A zona mentes 8-sejtes embriókat Ca- és Mg-mentes 0,1% BSA-val kiegészített PBS oldatba helyeztük 10 percre. Az embriókat alkotó blasztomereket egy vékony kapillárisal történő pipettázással választottuk el egymástól. Minden embrióból egyetlen blasztomert PCR csőbe helyeztük, a többi blasztomert egyenként, kis KSOM médium cseppben ásványi olaj alatt tartva tenyésztettük tovább.

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

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

A kísérlet első felében, egy EGFP-t expresszáló nyolc-sejtes, XY genotípusú embriónak egyetlen sejtjét aggregáltattuk egy EGFP-t nem expresszáló, XX genotípusú embrió hét sejtjével (a nyolc-sejtes embrió egy sejtjét a genotípus megállapításához használtuk fel). Az így létrejött kimérák közül 84-et ültettünk vissza, ebből 12 kiméra utód született. A megszületett utódok közt csak egy nőtényt találtunk (5. ábra). A normális fenotípusú termékeny nőtény szöveti sejtjeinek 10%-a expresszálta az EGFP-t, a PCR teszt és a FISH alapján XX/XY genotípusú, fertilis szex kiméra volt, de az utódai közt nem találtunk EGFP-t expresszálókat.

Kísérletünk folytatásaként olyan kimérákat állítottunk elő, ahol egy tetraploid embriót (4n) aggregáltattunk egyetlen diploid (2n) blasztomerrel (6. ábra). 36 olyan 2n/4n kimérát ültettünk be, ahol XY kromoszómát tartalmazó blasztomerrel aggregáltattuk a tetraploid embriót. 5 élő utódot kaptunk. Az azonos embrióból származó, XX blasztomerek, és egy-egy tetraploid embrió felhasználásával létrehozott 4 kiméra embrióból három nőtény utód, identikus hármás ikrek születtek.

Eredményeink azt mutatják, hogy egyetlen, az ICM-be beépülő XY blasztomer jelenléte is elégséges lehet az XX embriók nemének átfordításához, azonban nem minden esetben kapunk hím fenotípusú szex-kimérákat. Igazoltuk, hogy tetraploid gazda embrióval aggregáltatva egy nyolcsejtes embrió egyetlen blasztomerjéből is életképes utód születhet. Az általunk kidolgozott módszert alkalmazva előre meghatározott nemű, identikus ikreket lehet létrehozni (8).

IRODALOMJEGYZÉK

1. Carstea, V.B., Kobolák, J., Licskó, A., Kovács, A., Góczy, E. (2003): Comparison of the effect of host embryo genotype on the efficiency of chimera production from inbred and outbred mouse strains derived ES cell lines. Buletinul USAMV-CN, 58/2003, ISSN 1454-2382. pp. 275-278.
2. Carstea, C.V., Kobolák, J., Licskó, A., Góczy, E., Kovács, A. (2004): The effect of different level of FCS and LIF in ES cell culture medium on efficiency of mouse

- chimera production. Annual Scientific Session, Banat's University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Timisoara.
3. Bodó, Sz., Gócza, E., Révay, T., Hiripi, L., Carstea, B., Kovács, A., Bodrogi, L., Bősze, Zs. (2004): Production of transgenic chimeric rabbits and transmission of the transgene through the germline. *Molecular Reproduction and Development* 68, pp. 435-440.
 4. Gócza, E., Hiripi, L., Bodó, Sz., Révay, T., Carstea, V.B., Kovács, A., Bodrogi, L., Lemos, A.P.C., Bősze, Zs. (2005): Characterization of rabbit ES like cells and creation of rabbit germline chimeras from preimplantation embryos. *Transgenic Research*, 14, p. 523.
 5. Carstea, VB, Bodó, Sz., Hiripi, L., Bodrogi, L., Lemos, APC, Bősze, Zs., Gócza, E. (2004): Producing chimeras: A rapid and efficient tool for obtaining transgenic organisms. *Buletinul USAMV-CN 60/2004*. pp. 286-291.
 6. Ipate, I., Bodó, Sz., Gócza, E., Gras, M. (2003): Effects of supplementation IVF medium with fetal calf serum (FCS) and Bovine albumin serum (BSA) on first cleavage bovine embryos. *Scientific Papers of Animal Sciences and Biotechnologies, Timisoara* 36 pp. 512-514.
 7. Carstea, V. B., Ilie, D., Ghișă, G., Lemos, A. P. C., Bodó, Sz., Kovács, A., Gócza, E. (2005): Masculinisation phenomenon in chimeric organisms. *Lucrări științifice Zootehnie și Biotehnologii*, vol. XXXVIII (2005), ISSN 1221-5287, Timișoara, pp. 757-762.
 8. Carstea, V. B., Lemos, A.P.C., Ilie, D., Bodó, Sz., Kovács, A., Gócza, E. (2006): Mouse triplets developed from single blastomeres of an 8-cell stage embryo supported with tetraploid embryos. *Reproduction, Fertility and Development* 18(1,2) 198-199.

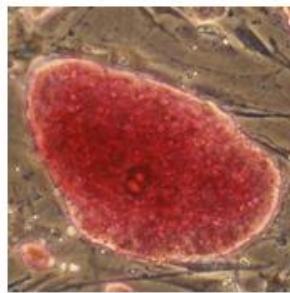
Herceghalom, 2006. 02. 23.

.....
Dr. Kovács András

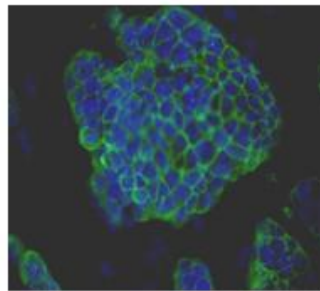
Témavezető

1. ábra: R1/E/P14 ES SEJTEK JELLEMZÉSE

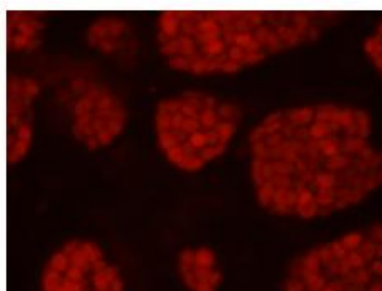
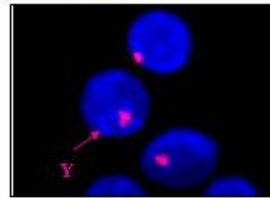
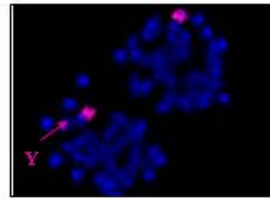
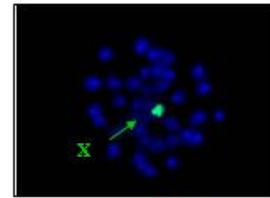
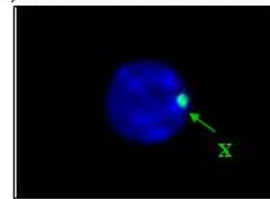
X, Y KROMOSZÓMA FISH



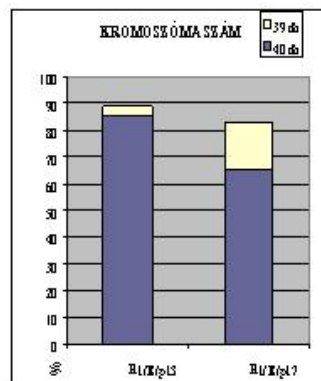
Alkalikus foszfatáz festés



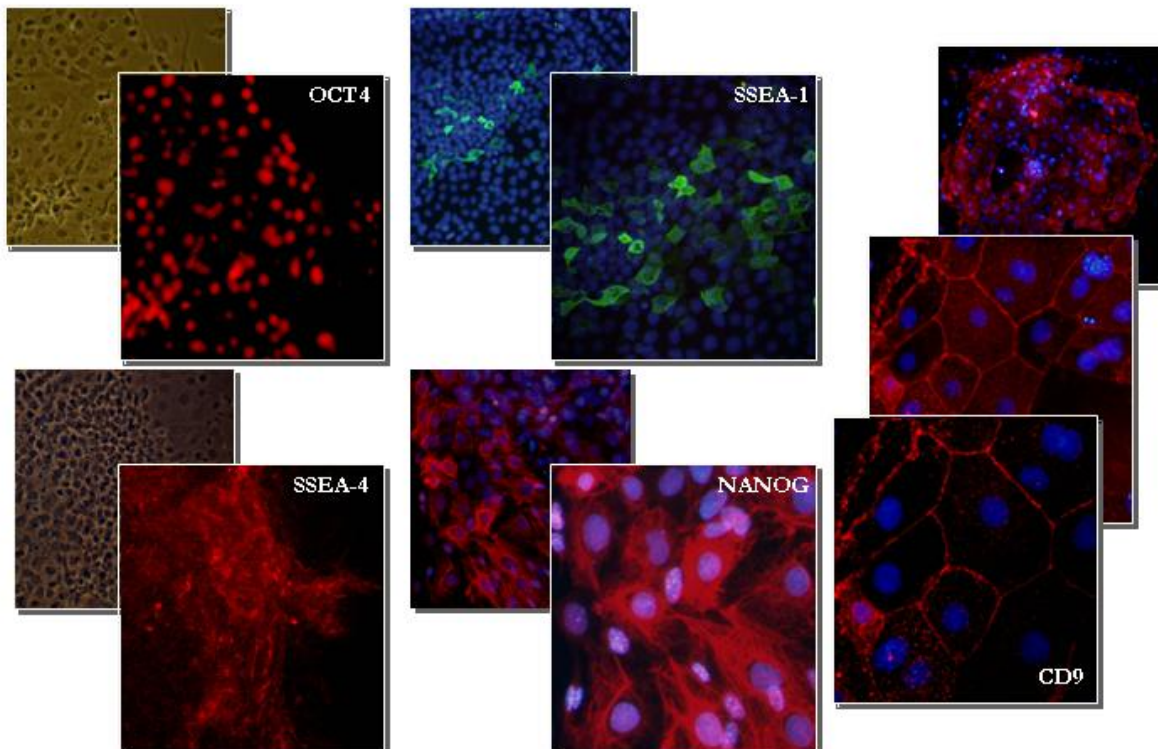
SSEA1-FITC immunfestés



Oct4-Cy3 immunfestés

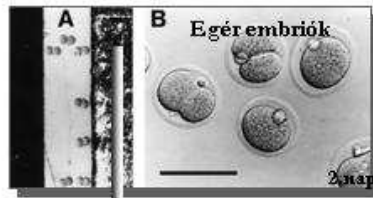
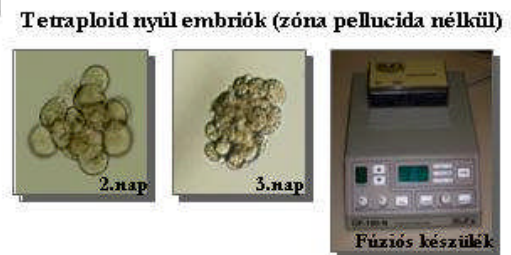
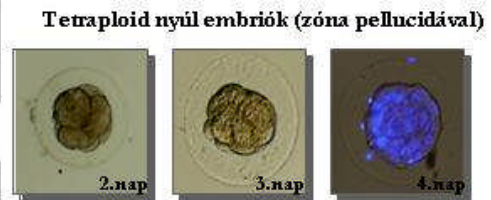
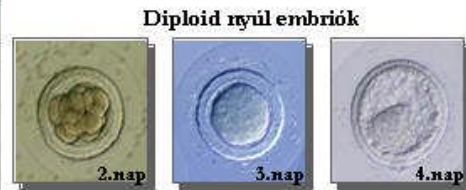


2. ábra: NYÚL ES SEJTVONALAK JELLEMZÉSE

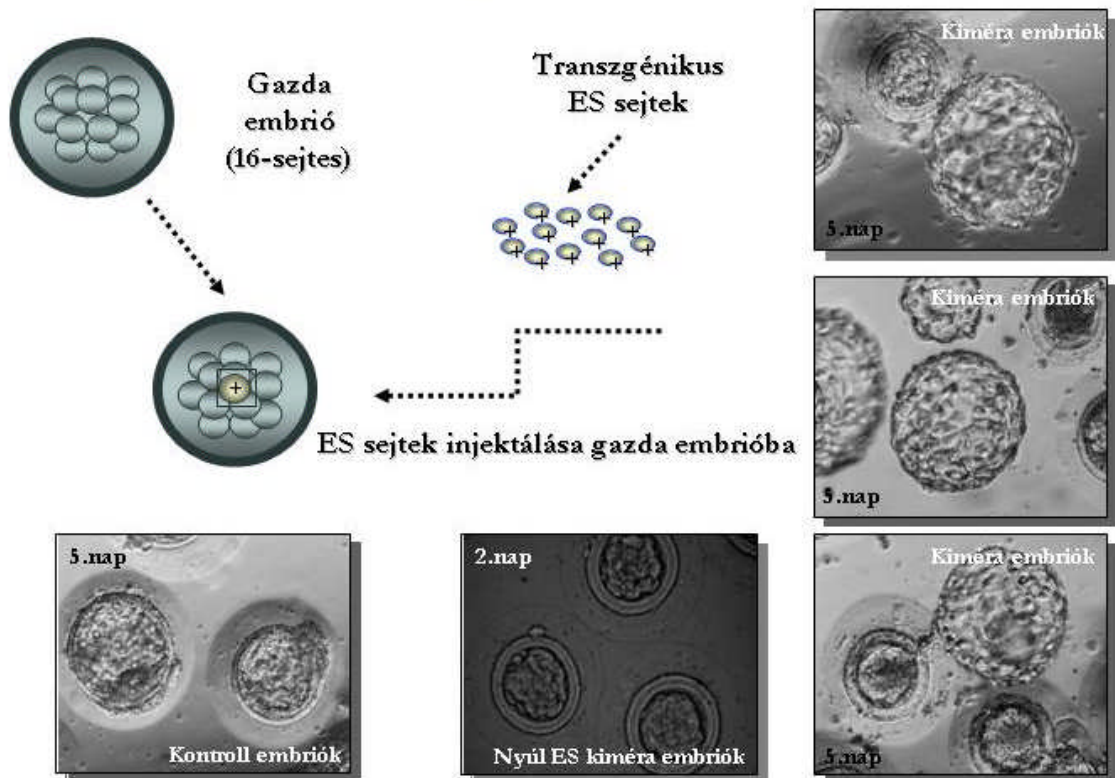


3. ábra: TETRAPLOID NYÚL EMBRIÓK LÉTREHOZÁSA

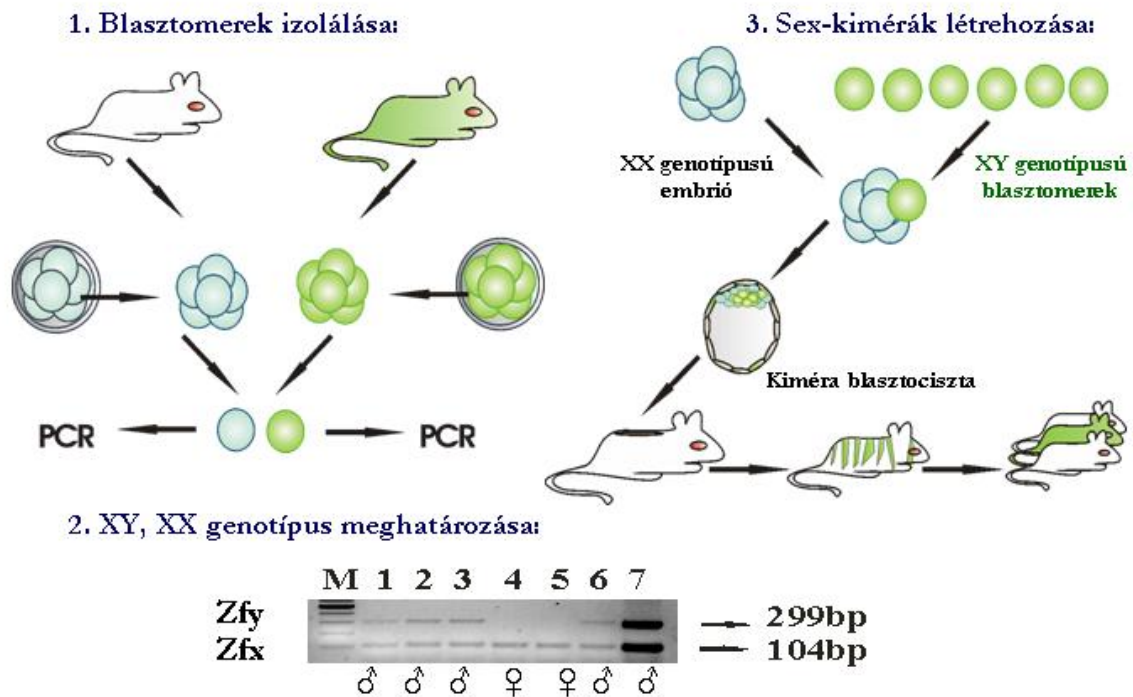
Fúziós készülék	CF-150B pulse generator (BLS, Hungary)				
médium	0,3M mannitol MQ vízben + 0,3% BSA				
elektród	GSS-250				
feszültség	30V	30V	40V	30V	40V
amplitúdó	40msec	50msec	50msec	50msec	50msec
AC feszültség	1,5V	1,5V	1,5V	1,5V	1,5V
impulzusok száma	2	2	2	2	2
Törzs	egér	nyúl	nyúl	nyúl	nyúl
Időpont (nap/idejűpont)	2.nap (14 óra)	1.nap (18óra)	1.nap (18óra)	1.nap (18óra)	1.nap (18óra)
zóna pellucida	+	+	+	-	-
hatékonyság	90%	80%	20%	40%	20%



4. ábra: NYÚL ES SEJT KIMÉRÁK LÉTREHOZÁSA



5.A. ábra: SZEXDETERMINÁCIÓ VIZSGÁLATA KIMÉRÁKBAN [XY(2n)(1-sejt)]/[XX(2n)(7-sejt)]



5.C. ábra: SZEXDETERMINÁCIÓ VIZSGÁLATA KIMÉRÁKBAN [XY(2n)(1-sejt)]/[XX(2n)(7-sejt)]

Kimérák típusa	[XY(2n)(1-sejt)]/ [XX(2n)(7-sejt)]
Beültetett embriók száma	84
Felszívódások aránya (Felszívódás / beültetett %)	39 (46,4)
Újszülöttek aránya (Újszülöttek száma / beültetett %)	22 (26,2)
Élő egerek száma (Élő egerek / beültetett embriók %)	14 (16,7)
Kimérák száma	12 (85,7)
Élő kimérák száma	12
Élő hím kimérák száma (Hím / Kiméra %)	11 (91,7)

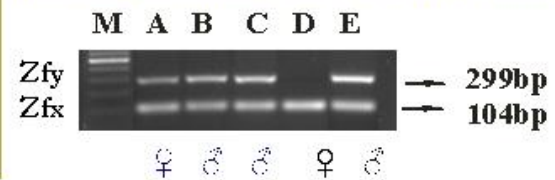
5.D. ábra: SZEXDETERMINÁCIÓ VIZSGÁLATA KIMÉRÁKBAN

[XY(2n)(1-sejt)] / [XX(2n)(7-sejt)]

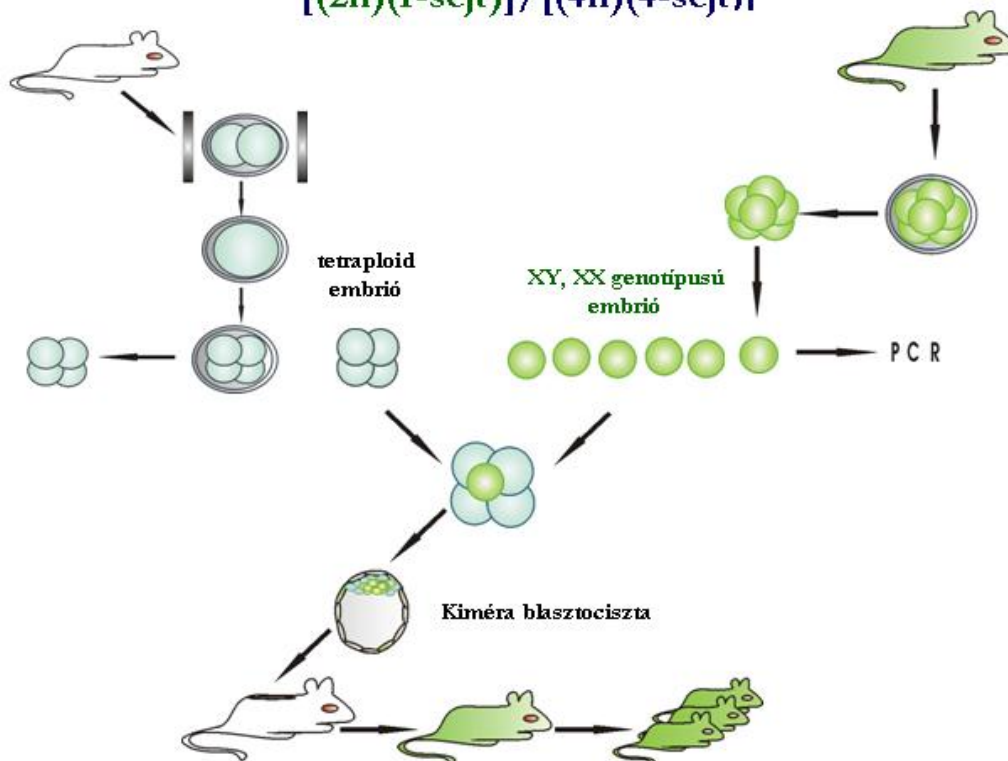
Kimérák	Nem	EGFP pozitív sejtek aránya a szövetekben (%)	Utódok száma	EGFP pozitív utódok aránya %		EGFP negatív utódok aránya %	
				hím	nőtény	hím	nőtény
A.	nőtény	10	31	0,0	0,0	32,3	67,7
B.	hím	10	14	28,6	14,3	28,6	28,6
C.	hím	30	13	46,2	7,7	15,4	30,8



Kimérák genomiális DNS-ének vizsgálata:



6.A. ábra: SZEXDETERMINÁCIÓ VIZSGÁLATA KIMÉRÁKBAN [(2n)(1-sejt)] / [(4n)(4-sejt)]

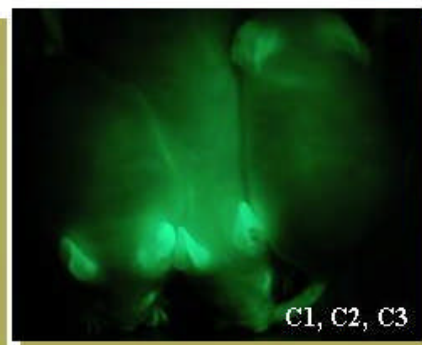


6.B. ábra: SZEXDETERMINÁCIÓ VIZSGÁLATA KIMÉRÁKBAN [(2n)(1-sejt)]/[(4n)(4-sejt)]

Kimérák típusa	[XY(2n)(1-sejt)]/ [(4n)(4-sejt)]	[XX(2n)(1-sejt)]/ [(4n)(4-sejt)]
Beültetett embriók száma	36	4
Felszívódások aránya (Felszívódás / beültetett %)	11 (30,6)	1 (25)
Újszülöttek aránya (Újszülöttek száma / beültetett %)	11 (30,6)	3 (75)
Élő egerek száma (Élő egerek / beültetett embriók %)	5 (13,9)	3 (75)
Kimérák száma	5 (100)	3 (100)
Élő kimérák száma	5	3
	(A1, A2, B1, B2, B3)	(C1, C2, C3)
Élő him kimérák száma (Hím / Kiméra %)	5 (100)	0
Élő nő kimérák száma (Hím / Kiméra %)	0	3 (100)



6.C. ábra: SZEXDETERMINÁCIÓ VIZSGÁLATA KIMÉRÁKBAN [(2n)(1-sejt)]/[(4n)(4-sejt)]



Mikroszatellit vizsgálatok: 19 kromoszóma, 65 marker

