

Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont

AZ IZOM DIFFERENCIÁLÓDÁST BEFOLYÁSOLÓ GÉNEK *IN VITRO* VIZSGÁLATA EMBRIONÁLIS EREDETŰ ŐS-SEJTVONALAKBAN EGÉR MODELLRENDSZERBEN

Doktori értekezés

Készítette: Kobolák Julianna

> 2004 GÖDÖLLŐ

A doktori iskola:

Megnevezése: Tudományága:	Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola Mezőgazdaságtudomány				
Vezetője:	Dr. Horváth László egyetemi tanár, PhD, DSc., SZIF Mezőgazdaságtudományi Kar				
	Halgazdálkodási Tanszék				
Témavezető:	Dr. Gócza Elen				
	tudományos munkatárs, PhD				
	Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont				
	Allatbiológiai Intézet				

Az iskolavezető jóváhagyása

Az iskolavezető jóváhagyása A témavezető jóváhagyása A témavezető jóváhagyása

1. Tartalomjegyzék

1.	Tartalomjegyzék	3
2.	Jelölések, rövidítések jegyzéke	5
3.	Bevezetés	9
4.	Irodalmi áttekintés	13
4.1	A muszkuláris hipertrófia jelensége	13
4.2	A Cmpt egértörzs	15
4.3	Az izom felépítése és kialakulása	16
4.3.1	A vázizomszövet struktúrája	16
4.3.2	Rosttípusok az izomzatban	17
4.3.3	A miogenezis kezdeti szakasza: myotom determináció	19
4.3.4	Miogenezis: az izmok determinációja	21
4.4	A miosztatin	24
4.4.1	A miosztatin gén és szerkezete	24
4.4.2	A miosztatin fehérje és funkciója	25
4.4.3	A miosztatin expresszió különböző állatfajokon mutatott eltérései	29
4.4.4	A miosztatin szerepe a húsminőségben	31
4.5	Embrionális eredetű ős-sejtvonalak	34
4.5.1	Pluripotens embrionális sejtvonalak gerinces fajokban	37
4.5.2	Pluripotens embrionális sejtvonalak alapítása	38
4.5.3	Az ES sejtek in vitro differenciáltatása	40
4.5.4	Embrionális ős-sejtvonalak in vitro differenciáltatása vázizom sejtekké	41
4.5.5	A korai differenciálódásban szerepet játszó fehérjék	42
4.6	Szöveti őssejtek	48
4.6.1	Izomszövet őssejtek	49
5.	Anyag és módszer	55
5.1	Egérembriók nyerése és in vitro tenyésztése	55
5.1.1	A felhasznált egértörzsek és tenyésztésük	55
5.1.2	Embriók nyerése és in vitro tenyésztése	56
5.1.3	Aggregációs kimérák készítése	56
5.2	Az ES sejtek tenyésztése	56
5.2.1	ES sejtek tenyésztése, fenntartása	57
5.2.2	ES sejtvonalak alapítása	58
5.3	Az ES sejtek differenciáltatása	58
5.3.1	Az EB csomók létrehozása	58
5.3.2	ES sejtek differenciáltatása vázizom-sejtekké	59
5.4	Izomszövet őssejt tenyészetek	59
5.5	Primer sejttenyészetek	60
5.5.1	Primer egér izomszövet tenyésztés	60
5.5.2	Szarvasmarha izomszövet tenyésztés	60
5.6	A Génexpresszió vizsgálata	61
5.6.1	Miosztatin gén szabályozó régiójának szekvencia szintű vizsgálata	61
5.6.2	Oligonukleotid primerek tervezése	62
5.6.3	RNS preparálás	62
5.6.4	Minták gyűjtése	62
5.6.5	RT-PCR analízis	62

5.7	A pluripotencia in vitro vizsgálata ES sejtekben	63
5.7.1	Immunhisztokémia	63
5.7.2	Hoechst festés	64
5.7.3	Alkalikus foszfatáz aktivitás detektálása	64
5.7.4	Kariotípus analízis	64
5.7.5	Ivar meghatározása ES sejteken PCR eljárással	64
5.8	Morfológiai izomszövet vizsgálatok	65
5.8.1	Fénymikroszkópos hisztotechnika	65
5.8.2	Elektronmikroszkópia	66
5.8.3	Izom filament tipizálás és morfometriai értékelés	66
5.8.4	Tömegmérési kísérletek	68
5.9	Statisztikai analízis	68
6.	Eredmények	69
6.1	Embrionális ős-sejtvonalak alapítása mstn-/- mutáns egértörzsből	69
6.1.1	Keresztezések	69
6.1.2	Sejtvonal alapítás	69
6.1.3	A kondícionált tápoldat hatásának vizsgálata más egértörzseken	71
6.2	Az új sejtvonalak pluripotenciájának vizsgálata	72
6.3	A törzsfüggőség genetikai okának vizsgálata	73
6.4	ES sejtvonalak vázizom irányú differenciáltatása	75
6.4.1	A differenciáltatási módszer beállítása R1 sejtvonalra	75
6.4.2	Az mstn-/- sejtvonalak izomdifferenciálódási képességének vizsgálata	76
6.4.3	A génexpressziós vizsgálatba bevont gének	78
6.4.4	Az MRF faktorok expressziójának változása	79
6.4.5	A sejtciklus szabályozásában részt vevő fehérjék	79
6.4.6	Az izomdifferenciálódást reguláló egyéb fehérjék	79
6.4.7	Izom struktúrgének	81
6.4.8	Izomszövet őssejtek: szatellita sejtek és differenciáltatásuk	83
6.4.9	Primer egér izomszövet tenyészetek	83
6.5	Hisztopatológiai analízis	
6.5.1	Morfológiai vizsgálatok	
6.5.2	Rosttípus vizsgálatok	
6.5.3	Fénymikroszkópos szövettani analízis	
6.5.4	Elektronmikroszkópos vizsgálat	
6.6	Miosztatin mutáns fehér-kék belga szarvasmarha izomszövet tenyés	zeteken
	végzett vizsgálatok	93
7.	Következtetések és javaslatok	
8.	Összefoglalás	
9.	Mellékletek	111
	M1. Irodalomjegyzék	111
	M2. Internetes oldalak	127
	M3. Oldatok összetétele	
	M4. Táblázatok	131
	M5. Ábrák jegyzéke	139
	M6. Táblázatok jegyzéke	142
	M7. Állatvédelmi rendszabályok	143
	M8. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó tudományos publikációk	144
10.	Köszönetnyilvánítás	147

2. Jelölések, rövidítések jegyzéke

А	adenin							
AChR	acetilkolin receptor fehérje (<i>Acetylcholin Receptor</i>)							
ActRIIB	aktivin IIB típusú receptor							
AP	alkalikus foszfatáz (<i>Alkaline Phosphatase</i>)							
ATP	adenozintrifoszfát							
BCRP1/ABCG2	emlőrák rezisztencia fehérie (korábban ABCG? néven írták le mint							
	ABC transzmembrán fehériét, mindkét elnevezése megmaradt) (<i>Breast</i>							
	Cancer Resistance Protein-1)							
bHLH	basic Helix-loop-helix trascription factor family (nincs magyar							
	megfelelőie)							
BMDC	csontvelő-eredetű seitek (Rone Marrow-Derived Cells)							
BMP-4	4-es csont morfogenetikus fehérie (<i>Bone Mornhogenetic Protein-4</i>)							
bn	házisnár							
BSA	szarvasmarha vérsavó albumin (<i>Bovine serum albumin</i>)							
C/EBP alpha	CCA AT/enhancer kötő fehérie-alfa							
CAM	seitadhéziós molekula (<i>Cell Adhesion Molecule</i>)							
CD	monoklonális antitesttel megkülönhöztethető seitfelszíni antigén (<i>cluster</i>							
CD	of differentiation)							
CD34	34-es seitfelszíni antigén							
CD45	45-ös seitfelszíni antigén							
Cdk2	2-es ciklin-függő kináz fehérie							
cDNS	mRNS-ről reverz transzkrincióval átírt DNS szál							
CFM	kondícionált FS tápoldat (Conditioned ES medium)							
cM	centimorgan (a gének közötti térkéntávolság mértékegysége amely a							
CIVI	közöttük megfigyelt rekombinációs gyakoriság alanján adható meg-							
	egyezményesen a rekombináció gyakoriságának 0 01-át nevezzük 1 cM-							
	nak vagy egy térkénegységnek)							
Cmnt	compact egértörzs (Varga et al. 1997)							
CNTE	Ciliary Neurotrophic Factor (nincs magyar megfelelője)							
CR3	3-as konstans régió (Constant Region 3)							
dnc	a párzás után eltelt papok száma (davs post coitum)							
Da	dalton							
DF	disztális enhancer							
DEPC	dietil-nirokarbonát							
DM	embrionális ősseit differenciáltató tánoldat (Differentiating Medium)							
DMM	izomseit differenciélteté tépoldet (Differentiation Medium for Musele)							
DMSO	dimetil-szulfovid							
DNS	dezoviribonukleinsav							
FR	arbrianális őssait aggragátum (Embrasid Pada)							
EC	teratokarcinoma tumorok pluripotens seitiei (Embryonic Carcinoma							
LC	Colle)							
ECMA-7	embrionális ősseit specifikus seitfelszíni antigén-7 (embryonic stam call							
	specific surface antigen)							
FDL	hosszi lábujinyújtó jzom (extensor digitorum longus)							
FDTA	etilén_diamin_tetra_ecetsav							

EG	ős csírasejtek (Embryonic Germ Cell)							
EGFP	erősített intenzitású zöld fluoreszcens fehérje (Enhanced Green							
	Fluorescein Protein)							
Egfp	erősített intenzitású zöld fluoreszcens fehérjét kódoló gén							
ELMI	elektronmikroszkóp							
EM	embrionális őssejt tenyésztő tápoldat (ES medium)							
EMA	epithelium membrán antigén (<i>Epithelial Membrane Antigene</i>)							
ES	embrionális ősseit (<i>Embrvonic Stem Cell</i>)							
F10-MGM	F10 myoblast tenyésztő tápoldat (F10-Myoblast Growing Medium)							
FACS	fluoreszcenciával aktivált sejtválogató eljárás, más néven áramlási							
	citofluorimetria (Fluorescence Activated Cell Sorting)							
FCS	magzati borjúsavó (Foetal Calf Serum)							
FGF4	4-es fibroblaszt növekedési faktor fehérje (Fibroblast Growth Factor 4)							
Fgf4	4-es fibroblaszt növekedési faktor gén							
FGF5	fibroblaszt növekedési faktor 5 fehérje (Fibroblast Growth Factor 5)							
FISH	Fluoreszcens in situ hibridizáció (Fluorescence In situ Hybridisation)							
FM	fibroblaszt tápoldat (Fibroblast medium)							
G	guanin							
G1	sejtciklus G1 fázis (<i>phase Gap1</i>)							
G2	sejtciklus G2 fázis (<i>phase Gap2</i>)							
GC-box	GC nukleotidokban gazdag DNS szakasz							
GDF8	8-as növekedési differenciálódási faktor fehérje (growth differentiatin							
	factor 8)							
GPDH	glicerol-3-foszfát-dehidrogenáz							
hCG	humán koriogonadotropin (human choriogonadotropin)							
HIV	AIDS vírus (Human Immunodeficiency Virus)							
HMG	nagy mobilitású csoport (<i>High Mobility Group</i>)							
HMM	nehéz meromiozin (Heavy Meromiozin)							
HSC	hematopoetikus őssejt (Hematopoetic Stem Cell)							
ICM	embriócsomó vagy belső sejtcsomó a blasztocisztában (Inner Cell Mass)							
IGF-1	inzulin-szerű növekedési faktor-1 fehérje (Insulin-like growth factor-1)							
Igf-1	inzulin-szerű növekedési faktor-1 gén							
IL-6	interleukin 6 fehérje							
I-mf	<i>I-mf</i> fehérje (nincs magyar megfelelője)							
k	kilo							
LIF	leukémia inhibitor faktor fehérje (Leukemia Inhibitory Factor)							
LIFR	leukémia inhibitor faktor receptor (Leukemia Inhibitory Factor							
	Receptor)							
LMM	könnyű meromiozin (Light meromiozin)							
М	sejteiklus M fázis, mitotikus osztódási fázis							
MADS	MADS domén (nincs magyar megfelelője)							
MAPC	mesenchymalis felnőtt progenitor sejtek (Mesenchymal Adult Progenitor							
	Cells)							
MCK	izomspecifikus kreatin-kináz (Muscle Creatin Kinase)							
MDSC	izomeredetű őssejtek (Muscle Derived Stem Cells)							
mdx	mutáns disztrofin gén							
Mef2	Izomsejt enhancer 2-es fehérje gén (Myocyte Enhancer Factor-2)							
MEF2	Mef2 fehérje (Myocyte Enhancer Factor-2)							

MFM	izomseit fúziós tápoldat (Mvoblast Fusion Medium)							
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex (<i>Maior Histocompatibility Complex</i>)							
MHPC	izomeredetű vérkénző seitek (<i>Muscle Hematopoetic Potential Cells</i>)							
MNF	izomseit seitmagi faktor (<i>Mvocvte Nuclear Factor</i>)							
MP	minimál promóter							
MRF	izom reguláló faktor (Myoganic Regulatory Factor)							
MRE4	Izoni regulato laktor (Myogenic Regulatory Factor)							
mPNS	4-es miogenikus regulaio taktor (<i>Myogenic Regulator Factor 4</i>)							
mstn	miosztatin gén rövidítése							
MuliC	miosztatili geli tövtüttése							
Mync mucD	muoD cán (o cán novánolt ninos mogyor mogfololőio)							
myoD MyoD	myoD gen (a gen nevenek nincs magyar megreieloje)							
	niyoD gen anar kodon tenerje							
	nikounamin-adenozin-dinukleoud-nidrogen							
NADH-IK	tetrazolium reduktaz iestes roviditese							
NCS	idegi ossejtek (Neural Stem Cells)							
NE	nemzetkozi egyseg							
NT-3	neutropin 3 fehérje							
Oct-4	4-es oktamer kötő fehérje (Octamer binding protein 4)							
oct-4	Oct-4 fehérjét kódoló gén							
OPN	oszteopontin							
OSM	oncostatin M							
p21	<i>p21</i> fehérje vagy gén (nincs magyar megfelelője)							
Pax1	paired box 1-es fehérje (nincs magyar megfelelője)							
Pax3	paired box 3-as fehérje (nincs magyar megfelelője)							
Pax7	paired box 7-es fehérje (nincs magyar megfelelője)							
PBS	foszfát puffer oldat (Phosphate Buffer Solution)							
PCR	polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)							
PE	proximális enhancer							
PFA	paraformaldehid							
PGC	primordiális őssejt (Primordial Germ Cell)							
pН	mértékegység, a disszociált hidrogénion koncentráció egysége							
PMSG	vemhes kanca szérumgonadotropin (Pregnant Mare Serum							
	Gonadotropin)							
PORE	palindrom Oct faktort felismerő elem (Palindromic Oct Factor							
	Recognition Element)							
POU	Pit, Oct, Unc transzkripciós faktor család (nincs magyar megfelelője)							
PPAR gamma	peroxiszóma proliferátor által aktivált receptor-gamma nukleáris							
0	receptor fehérie (<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma</i>)							
PPSC	pluripotens ősseit (<i>Pluripotent Stem Cell</i>)							
RARE	retinsav-érzékeny elem (<i>Retionic Acid Response Element</i>)							
Rb	retinoblasztóma fehérie							
RB7	riboszómális 7-es fehérie (<i>Ribosomal protein</i> L7)							
Rb7	riboszómális 7-es fehériét kódoló gén							
RNS	ribonukleinsav							
RT	reverz transzkrinció							
RXR	retinsav X recentor (retinoid X Recentor)							
Scal	1-es tínusú spinocerebelláris ataxia fehérie (spinocerebellar ataxia l							
5041	homolog)							

SCID egér	hiányos immunrendszerrel rendelkező egértörzs						
SEM	scanning elektronmikroszkóp						
SHH	Sonic hedgehog fehérje (nincs magyar megfelelője)						
Shh	Sonic hedgehog fehérjét kódoló gén						
Smad3	Smad 3-as gén (nincs magyar megfelelője)						
SMAD3	SMAD3 fehérje (nincs magyar megfelelője)						
Sox	Sry-related HMG box containing gene family (nincs magyar megfelelőie)						
Sox2	Sox géncsalád kettes fehérje (nincs magyar megfelelője)						
SP	Side population (nincs magyar megfelelője)						
Sp1	Specificity protein 1 (nincs magyar megfelelője)						
SSEA	fejlődési stádium-specifikus antigén (Stage-Specific Embryonic Antigen)						
ТА	tubuláris aggregátum						
TGF-β	TGF-β géncsalád (Transforming Growth Factor-β)						
TRA-1-60	nagy molekulasúlyú glikoprotein (60 kDa molekulasúlyú család)						
TRA-1-81	nagy molekulasúlyú glikoprotein (80 kDa molekulasúlyú család)						
Utf1	1-es differenciálatlan embrionális sejt transzkripciós faktor fehérje						
	(Undifferentiated Embryonic Cell Transcription Factor 1)						
utf1	Utf1 fehérjét kódoló gén						
UTR	nem transzlálódó régió (Untranslated Region)						
UV	ultraibolya						
Wnt1	Wingless 1 fehérje (nincs magyar megfelelője)						
Wnt3a	Wingless 3a fehérje (nincs magyar megfelelője)						

3. Bevezetés

Az állati termékek előállításának legjelentősebb hányadát a mai napig a hústermelés teszi ki. A minőségi hústermelés szempontjából mindig kiemelt szerepet kaptak azon fajták, amelyek valamely, a húsminőséget vagy mennyiséget érintő tulajdonságban kimagasló eredményeket mutattak. Az ún. *culard* fenotípus, vagy dupla farúság jelensége régóta foglalkoztatja az állattenyésztőket, hiszen az ilyen fenotípusú állatok jelentősen nagyobb húskihozatala mindig is kívánatos tulajdonságnak számított az állattenyésztésben. Ezzel a jelenséggel találkozhatunk például a *fehér-kék belga* vagy *piemonti* szarvasmarha fajtáknál is. A minőségi hústermelés szempontjából kiemelkedő tulajdonságról van szó, mivel ezek az egyedek nem csak több húst termelnek, hanem annak minősége is jobb. A *fehér-kék belga* fajtával történt keresztezések pedig azt mutatják, hogy bár a gén recesszív, monofaktoriális, még a heterozigóta állatokban is kifejezett a hatása: a vágásnál a csont/hús arány és a színhús kihozatal jobb, mint a keresztezésben szereplő bármely más fajta egyedeinél.

A *culard* fenotípusú állatokban e tulajdonság ugyanakkor más sajátságokkal is együttjár: a csöves csontok megrövidülésével, kevesebb zsír és faggyú lerakódásával, valamint az izmok közötti kötőszövetes állomány mennyiségének csökkenésével. Jelenleg még nem tisztázott, hogy a hipertrófiáért felelős génben bekövetkező mutáció-e az, amely ezeket a hatásokat közvetlenül kiváltja, vagy más faktorok is szerepet játszanak a folyamatban.

A miosztatin fehérje a normális izomzatban található regulátor, amely gátolja az izomszövet differenciálódása során ható gének expresszióját, meghatározva ezzel az adott faj felnőttkori izomtömegét. Mutációjakor a negatív szabályozás nem valósulhat meg, így fokozott izomnövekedés megy végbe, izomhipertrófia alakul ki. A miosztatin génben bekövetkező mutáció tehát a *culard* jelleg kialakulásához vezet.

A húsmarhatenyésztés szempontjából fontos tenyésztési kérdések merülnek fel a *culard* jelleget hordozó egyedek, mint kiváló hústípusú egyedek szélesebb körben való elterjesztésével kapcsolatban. Két, világviszonylatban is jelentős fajtát, a *fehér-kék belgát* és a *piemontit* hazánkban jelenleg a végtermék-előállító keresztezések befejező fajtájaként alkalmazzák. Azonban a fajtatiszta populációk számának növelését és széles körben való elterjesztését ma még vegyes megítélés illeti, elsősorban a *fehér-kék belgánál* tapasztalható nehéz ellés, valamint a magasabb fehérjetartalmú takarmány iránti igény miatt. A *piemonti* fajtánál ezek a problémák ritkábban jelentkeznek.

Felmerül a kérdés: miből adódnak a különbségek? Hogyan alakul ki ez a termelési szempontból fontos és értékes tulajdonság? Milyen tényezők befolyásolják a miosztatin gén mutációja mellett az izomhipertrófia kialakulását?

A miosztatin gén mutációját hordozó ún. *compact* egértörzs (*Cmpt*) a fenti kérdések tökéletes modelljeként szolgálhat. A mutáció genetikai térképezését Dr. Varga László és csoportja végezte el a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézetben, így a miosztatin génmutáció pontos genetikai ismerete adott kutatásainkhoz.

Célunk az volt, hogy a *compact* egértörzs embrióiból alapítandó embrionális eredetű ős-sejtvonalak sejtjeinek izomszövet irányú *in vitro* differenciáltatása révén meghatározzuk azokat a faktorokat, amelyek szerepet játszanak a tulajdonság kialakításában. Azért választottuk ezt a rendszert, mert az egér embrionális fejlődésének ideje igen rövid, a magzatok a vemhesség 20. napján jönnek a világra. Az embrionális fejlődés során az izomszövetet alkotó sejtek első hullámának differenciálódása a 7,5 napon indul meg és 8 nappal később az első szakaszban kialakuló, ún. elsődleges prekurzorsejtek kialakulása le is zárul.

Az izomdifferenciálódást meghatározó folyamatok részletei nem teljesen ismertek és még kevésbé az embriogenezis alatti génaktiválódások pontos időpontjai. Így szinte lehetetlen az olykor igen csekély génaktivitásbeli különbségek egyértelmű detektálása *in vivo* rendszerben. Másrészt még az egy anyaállattól származó magzatok fejlődési sebessége között is lehetnek különbségek, ami csak nagy számú magzat együttes vizsgálatával egyenlíthető ki. Ráadásul az egyes, a gének aktivitásának szabályozásáért felelős faktorok, több mechanizmus irányításáért is felelősek lehetnek az embrionális fejlődés során. Így szükséges, hogy a korai differenciálódás során, a magzaton belül egyértelműen el tudjuk különíteni az izomszövet irányba elkötelezett sejteket és csak azok génexpressziós változásait kövessük nyomon. Ez a korai és igen aktív sejtvándorlás alatt szinte megoldhatatlan feladat.

Az embrionális eredetű ős-sejtvonalak (ES sejtvonalak) hólyagcsíra fejlődési állapotú egérembrió embriócsomójából származó sejtek, melyek optimális tenyésztési feltételek mellett folyamatosan osztódnak. Gazdaembrióba injektálva beépülnek annak embriócsomójába, differenciálódni kezdenek, és a normális embrionális fejlődés folyamatába bekapcsolódva a legkülönbözőbb sejttípusokká képesek alakulni. Ha a tenyésztő tápoldathoz különböző differenciálódást előidéző anyagokat, növekedési faktorokat adunk, akkor a legkülönbözőbb differenciálódott sejttípusok megjelenése érhető el. Így az embrionális eredetű ős-sejtvonalak alkalmas *in vitro* modell-rendszerként szolgálhatnak a sejtek differenciálódása során lejátszódó folyamatok mechanizmusainak tanulmányozására, többek között az izom-differenciálódás kezdeti lépéseinek tanulmányozására is. Az *in vivo* folyamatokhoz képest lassabb differenciálódást mutatnak, így hosszabb időt biztosítanak a vizsgálni kívánt folyamatok elemzésére.

Kísérleti rendszerünkben az izomszövet differenciálódás nyomon követésével lehetőség nyílik a miosztatinhoz hasonló regulátor fehérjék szerepének vizsgálatára a hipertrófia kialakulásában. Így megválaszolhatók azok a kérdések, amelyek a miosztatinnak az izom differenciálódási kaszkádban betöltött szerepére irányulnak. A *fehér-kék belga* izomszövet tenyészeteiben végzendő vizsgálataink pedig, az egéren, mint modellállaton elvégzett kutatás eredményeit adaptálhatják közvetlenül a fajtára. Kísérleti rendszerünkben, ahol a differenciálódás kezdeti szakaszától tudjuk nyomon követni az izomzat kialakulását, lehetőségünk nyílik arra, hogy megfigyelhessük e szabályozó fehérjék hatásmechanizmusát és feltárhassuk a közöttük fennálló kölcsönhatásokat. Így közelebb juthatunk az izomzat kialakulásáért felelős faktorok hatásmechanizmusának megértéséhez, amely gazdasági állatokban közvetve hatással van a hústermelés alakulására. Az izomhipertrófiát kialakító tényezők megismerése és megértése közvetlenül hozzájárulhat a *culard* jelleget hordozó fajták és egyedek tenyészértékének egyértelműbb megítéléséhez. A húsminőség javítására ható tényezők jobb ismerete pedig a jövedelmező húsmarhatenyésztés előmozdítását segítheti.

A dolgozatban tárgyalt kísérleti munka főbb célkitűzései:

- 1. A miosztatin gén mutációját hordozó, pluripotens embrionális őssejtvonalak kialakítása, azok pluripotenciájának *in vitro* és *in vivo* igazolása
- 2. A sejtvonal alapítási metodika fejlesztése *non-permisszív* egértörzsekből történő sejtvonalak sikeres létrehozása érdekében.
- 3. A miosztatin gén mutáns változatát hordozó ES sejtvonalak *in vitro* vázizom irányú differenciálódása során detektált génexpressziós mintázat összehasonlítása kontroll, a mutációt nem hordozó embrionális őssejtvonallal.
- 4. Izomszövet eredetű őssejtek izolálása, *in vitro* vázizom differenciáltatása miosztatin mutáns és kontroll egyedekből, a differenciálódás során zajló génexpresszió összehasonlító vizsgálata.
- 5. Az ES és szöveti őssejtek sejtek izomszövet irányba történő *in vitro* differenciáltatása révén a miosztatin hatásmechanizmusának felderítése, az izomszövet kialakulásában szerepet játszó gének hatásmechanizmusának együttes vizsgálata.
- 6. A miosztatin mutáció okozta *compact* fenotípus részletes, hisztológiai vizsgálata, a már kifejlett izomzatban bekövetkező morfológiai változások detektálására.
- Hipertrófiás (*fehér-kék belga*) és kontroll (*holstein-fríz*) szarvasmarha szöveti őssejt és primer izomtenyészetek izolálása, azok *in vitro* differenciáltatása. A kapott eredmények összehasonlítása az egér vizsgálatokból származó eredményekkel.

Bevezetés

4. Irodalmi áttekintés

4.1 A muszkuláris hipertrófia jelensége

Számos szarvasmarhafajtánál került már leírásra a muszkuláris hipertrófia jelensége (Szabó 1998, 46., 64-71. p.). Olyan állatokról van szó, amelyeknél a felnőttkori vázizomzat mennyisége jóval meghaladja a fajtára jellemző mennyiséget. Így a muszkuláris hipertrófiát mutató egyedek fenotípusa igen jellegzetes: izomzatuk túlfejlett, testtömegük jelentősen megnő. A fenotípus nemzetközi szakirodalomban használatos megnevezése a *culard* jelleg (szószerinti magyar fordításban: dupla farúság), amely az erőteljes far- és hátizmokra utal. Itt kell megjegyeznünk, hogy a muszkuláris hipertrófiát mutató egyedeknél a vázizomzat tömegének mintegy 20%-os növekedése az izmokat alkotó filamentumok átmérőjének változására (hipertrófia) csak kevésbé, inkább az egyes izom filamentumok számának növekedésére (hiperplázia) vezethető vissza. Ennek ellenére a köztudatban hipertrófia néven vált ismertté a jelenség.

A *culard* jelleg a húsmarhatartásban régóta ismert (Culley, 1807, cit. Ménissier, 1982; Kaiser, 1888, cit. Ménissier, 1982). Az ilyen egyedek a tenyésztés során előtérbe kerültek, hiszen általuk jóval nagyobb mennyiségű hús volt előállítható. Így az egyes mutációk konzerválódtak a fajtákban, és nemzedékről nemzedékre továbbadódtak (Dohy, 1979; 43-44. p.). Kiváló példa erre a *fehér-kék belga* (1. ábra), amelynek hústípusú —belga kifejezéssel élve "*viande*" típusú— egyedei, szinte 100%-ban túlizmolt fenotípust mutatnak. E fajtánál ugyanis az évek során a szelekció egyik fő szempontja a muszkuláris hipertrófiát hordozó egyedek kiválogatása volt (Arthur, 1992; Hanset, 1997). A *culard* jelleg nagyobb gyakorisággal fordul elő még a francia *charolais* és az olasz *piemonti* (1. ábra) fajtákban is (Westhusin, 1997).



1. ábra. Miosztatin mutáns szarvasmarha fajták (A) *fehér-kék belga* szarvasmarha bika az Ostffyasszonyfai Petőfi MgTSz tenyészetéből (Bölcskey K. szívességéből), (B) *piemonti* szarvasmarha bika¹

¹ A felvétel az olasz Piemonti Szarvasmarha Tenyésztők Egyesületének honlapjáról származik.

A hosszú időn keresztül folytatott vizsgálatok ellenére sokáig nem sikerült feltárni a hiperizmoltság genetikai okát. Bár az első írásos dokumentum 1807-ből való a "dupla izomzatú" egyedekről (Culley, 1807, cit. Ménissier, 1982), a tulajdonság öröklődését megfigyelve sokáig csak annyit feltételeztek róla, hogy valószínűleg monogénes, autoszómális és részlegesen recesszív (Ménissier, 1982). Csak 1995-ben sikerült a TGLA44 marker segítségével a szarvasmarha kettes kromoszómájának q karján, mintegy 2 cM távolságra megközelíteni a feltételezett gént. Az adott kromoszómarégiót *mh lókusznak* (muszkuláris hipertrófiáért felelős lókusz) nevezték el (Charlier et al. 1995). Később ezt a megállapítást fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) segítségével is igazolták (Smith et al. 1997).

Bár a térképezést tovább folytatták, mégis egy véletlen vezetett a muszkuláris hipertrófia genetikai hátterének megismeréséhez. Az egéren, mint genetikai modellállaton végzett kísérletek során a TGF- β (*Transforming Growth Factor*) növekedési faktor család tagjait vizsgálták. Az ún. génkiütés (*knockout*) technikáját alkalmazva, a fehérjecsalád GDF-8, vagy más nevén miosztatinként ismert fehérjéjét távolították el az egér genomjából. A megszületett "nulla mutáns" (a fehérjét nem hordozó) egerek izomhipertrófiát mutattak, azaz izomzatuk teljes mennyisége jelentősen megnőtt (McPherron et al. 1997). E kísérlet kapcsán kezdték el vizsgálni, hogy vajon nem ugyanazon gén mutációjáról van-e szó más állatfajok, így a szarvasmarha izomhipertrófiát mutató egyedeinél is.

A vizsgálatokat két olyan szarvasmarhán kezdték meg, ahol nagy gyakorisággal fordulnak elő izom-hipertrófiás egyedek. Így a *fehér-kék belga* és a *piemonti* (1. ábra) fajták egyedeinek DNS-mintáit vizsgálva, pozícionális géntérképezéssel sikerült meghatározni a keresett gént. A fenti fajtákban megjelenő muszkuláris hipertrófia egy autoszómális, recesszív allél által meghatározott tulajdonság. Az allél az *mh lókuszban* lokalizálható, a szarvasmarha kettes kromoszómájának q-karján, a centromer-régióhoz közel (BTA2q12-22 régió) (Charlier et al. 1995; Smith et al. 1997). Kambadur és mtsai 1997-ben a gén klónozását követően direkt szekvenálás módszerével egy 11 bp nagyságú deléciót azonosítottak a miosztatin gén kódoló régiójában [nt821(del11)] *a fehér-kék belga* esetében, míg a *piemonti* fajtánál egy G \rightarrow A tranzíciót a 941-es pozícióban [nt941(G-A)]. Bizonyítást nyert tehát, hogy az oly régóta ismert és a húsmarhatenyésztés során előnyben részesített *culard* jelleg kialakításáért a miosztatin génben bekövetkező mutációk a felelősek (Grobet et al. 1997; McPherron és Lee, 1997; Kambadur et al. 1997).

Muszkuláris hipertrófiát mutató egyedeket számos fajtában leírtak: a francia *blonde d'Aquitaine, charolais, gasconne, limousine, maine-anjou* és *parthenaise*; valamint a spanyol *asturiana* és *rubia gallega* egyedeiben is. Ezekben a fajtákban a hipertrófia csak szórványos jelenségként fordul elő, megjelenésének gyakorisága alacsony. Azonban igen kedvelt tulajdonság, így jól dokumentált. A miosztatin génben bekövetkező és hipertrófiát okozó mutációk leírását követően így több kutatócsoport is széleskörű vizsgálatokat kezdett: a fenti nyolc fajtát bevonva a vizsgálatokba, a miosztatinban bekövetkező mutációk több variációját írták le (Georges et al. 1998; Kocamis és Killefer, 2002).

4.2 A Cmpt egértörzs

A túlizmolt fenotípust mutató egyedeknél az elváltozást okozó gének keresése már a miosztatin felfedezése előtt megindult. A tulajdonság, ahogy a szarvasmarhánál, úgy az egéren (annak egy laboratóriumi törzsén) is leírásra került. Az úgynevezett "compact" egér a fehér-*kék belgához* hasonló fenotípust hordozott (2. ábra). A kontrollokhoz viszonyítva szignifikáns különbség mutatkozott a carcass %-ban illetve az izom:csont arányban. Az egértörzset eredetileg nagy testtömeg gyarapodásra és a 60 napos korban mért, a carcass tesstömegre vonatkoztatott magas fehérje %-ra szelektálták (Bünger et al. 2001), amikor az izom hipertrófiát mutató egyedek megjelentek a populációban. Ezeket az egyedeket különválasztották, majd alvonalként tenyésztették tovább. A fenotípust Varga és munkatársai nevezték el Hungarian Compact Subline néven, amelyet *Cmpt* rövidítéssel jelöltek (1997). Munkájuk során a mutációért felelős gént az 1-es kromoszómán sikerült lokalizálniuk, kapcsoltsági géntérképezés (*linkage mapping*) technikát alkalmazva (Varga et al. 1997).



2. ábra. Miosztatin mutáns és kontroll egér (A) 18 hetes korú *Cmpt* egér hím, (B) 18 hetes kontroll, BalbC egértörzsből származó hím (saját felvétel).

Amikor a miosztatin gén és a génben bekövetkező mutáció által okozott fenotípus publikálásra került, Szabó és munkatársai az általuk régóta vizsgált *Cmpt* egértörzsben is a miosztatinban létrejött mutációt detektáltak. Vizsgálataik szerint a miosztatin gén kódoló régiójában bekövetkező 12 bp nagyságú deléció a felelős a kialakult fenotípusért. A deléció 5 aminosav kiesését és egy új aminosav megjelenését okozza a peptidláncban, amely a fehérje szerkezetében a TGF- β prekurzorok dimerizációért felelős fehérje régiót érinti, így a fehérje 3D szerkezete sérül. A mutáció a fehérje érése során olyan változást idéz elő, amely a fehérje 98%-os funkcióvesztését eredményezi (Szabo et al. 1998). Az egértörzs analízise során a fenotípus ivar szerinti szegregációját is megfigyelték a térképezési populáció F₂ nemzedékében. A fenotípust Varga és munkatársai a miosztatin gén mellett lévő modifikátor gének hatásával magyarázták, amely gének térképezését jelenleg is végzik (Varga et al. 1997; 2003).

4.3 Az izom felépítése és kialakulása

Mielőtt a miosztatin szerepéről bővebben szó esne, át kell tekintenünk az izomzat szerkezeti (hisztológiai) felépítését és kialakulásának (miogenezis) folyamatát. Az izomszövet a négy alapszövet egyike. Az izomszövetnek három típusát különítjük el, így beszélhetünk vázizomról vagy harántcsíkolt izomról, simaizomról és szívizomról. Mindhárom izomtípus megnyúlt, orsó alakú ún. fúzionált sejtekből felépülő többsejtmagvú sejt, vagyis izomsejt, más néven izomrost. Az energia mindhárom esetben ATP hidrolízisével szabadul fel és az izomrostok kontrakciója során alakul át mechanikai energiává, lehetővé téve az erőkifejtést és a mozgást.

4.3.1 A vázizomszövet struktúrája

A vázizom, vagy másik nevén harántcsíkolt izom sejtjei hosszú, többsejtmagvú, szinciciális sejtek, ahol az izomsejteket kötőszövet veszi körül és szervezi egységbe. Az izom makroszkopikus felépítésének alapegysége az izomrost. A rostok, vagyis maguk az izomsejtek a megnyúlt, fúzionált myoblastok utódai. Miden rostot (sejtet) a sejt plazmamembránja, a szarkolemma vesz körül, amely ujjszerű, ún. transzverzális- más néven T tubulusokat bocsát a citoplazmába (szarkoplazma), mely a sejt szarkoplazmás retikuláris hálózatához kapcsolódik. A szarkolemmán kívül található a bazális membrán. Az izomsejt nukleuszait általában a perifériális, szarkolemma alatti területen találjuk. A mitokondriumok jelentős része szintén a szarkolemma alatt találhatók, azonban a mitokondriumok a miofibrillumok között is előfordulnak (3. ábra).



3. ábra. Az izom makroszkopikus felépítése (Kierszenbaum, 2002 nyomán) Az egyes izomsejtek csoportokba, ún. kötegekké szerveződnek. Egy-egy ilyen köteget (izomrost csoportosulást) újabb kötőszövetes tok zár körül, ez az ún. perimízium. A kötegen belül az egyes rostokat szinte egymáshoz fűzi az endomízium, amely szorosan kapcsolódik minden sejt szarkolemmájához. Az izomrost kötegek izmokká szerveződnek, amelyet kívülről újabb kötőszövetes tok véd, az epimízium. Szerkezetét elekronmikroszkóppal vizsgálva, az izomsejt kétféle filamentumból, vastag és vékony izom filamentumokból épül fel. A gerinces izmokban általában egy 15 nm vastag és 1,5 µm hosszú ún. vastag filamentumot, hat darab 7 nm vastag és 1 µm hosszú ún. vékony filamentum vesz körül (4. ábra).

A filamentumok nem mások, mit ún. motorproteinek, ahol a vastag filamentum könnyű és nehéz meromiozinból valamint titinből áll, míg a vékony filamentumok elsősorban aktin molekulákból épülnek fel, de troponin, és nebulin is található a komplexben.



4. ábra. A szarkomer felépítése, és az izomfilament miofibrillum szerkezete (Kierszenbaum, 2002 nyomán)

A harántcsíkolt izomban megkülönböztethető egy anizotróp (kettős fénytörésű), ún. A-csík, és egy izotróp (egyszeres fénytörésű), ún. I-csík. Az I-csík közepén húzódik a Z-vonal, más néven telofragma, míg az A-csík közepén a világosabb H zóna rajzolódik ki. A H zónában főként kreatin kináz lokalizálható. A H zóna közepén az ún. M-vonal látható, amely a miozin molekulák farki részét összekötő kereszthidakból áll. A harántcsíkolt izom egysége az ún. szarkomer, melyet két Z-vonal határol. Az izomrost tehát a szarkomer egységek ismétlődéseként is felfogható. A kétféle filamentum típus az A-csík területén jól kivehető, azonban az I-csík területén csak a vékony filamentumok helyezkednek el.

4.3.2 Rosttípusok az izomzatban

A végtagok izomzatát vizsgálva, az izomrostok tekintetében, —így az őket alkotó miozin nehézlánc (MyHC, Myosin Heavy Chain) izotípusok esetében is az egyes izmok heterogének. Az izomrostokat alapvetően két szempont alapján különítik el: az összehúzódás sebessége alapján (gyors és lassú típus), valamint az ATP termelés módja szerint (oxidatív, illetve glikolitikus). Azokat a rostokat, amelyek magas ATP-áz aktivitással rendelkeznek "vörös", míg az alacsony ATP-áz aktivitásúakat "fehér" típusnak nevezzük.

Az izom összehúzódásához szükséges energia nagy energiájú foszfátkötésekből (ATP) szabadul fel, amely zsírsavak vagy glükóz metabolizmusa

során keletkeznek. Általában a keringéssel az izomba kerülő glükóz, vagy az izomsejtek citoplazmájában nagy mennyiségben raktározott (az izom száraztömegének 1%-át kitevő) glikogén szolgál energiaforrásul a sejtek számára. A glikogén formájában tárolt energia oxidatív foszforiláció révén a citrát-körön keresztül alakulhat át ATP-vé, ez a folyamat zajlik az oxidatív izomrostokban, míg anaerob glikolízissel, jelentős tejsavtermelés mellett az ún. glikolitikus rostokban. Mindez összefüggésbe hozható az egyes izomsejteket (rostokat) alkotó fő motorprotein, a miozin filament nehéz láncának típusával. A miozin ugyanis egy 450-500 kDa molekulatömegű, 150 nm hosszúságú, fibrilláris és globuláris részeket is tartalmazó, így két részből felépülő motorprotein, amely az ATP foszfátkötéseiben raktározott kémiai energiát mechanikai energiává képes alakítani hidrolízis segítségével. Egyik része a fibrilláris típusú könnyű meromiozin (Light meromiozin, LMM), míg a másik része a fibrilláris és globuláris részeket is tartalmazó nehéz meromiozin (Heavy Meromiozin, HMM). A könnyű meromiozin kétféle fehérjeláncból áll (16 és 20 kDa), míg a nehézlánc két 200 kDa-os azonos láncból áll. A két, egymással spirált alkotó nehézlánc egyik végén elágazik, és egyegy fejben végződik, amelyek mindegyikéhez hozzákapcsolódik mindkét könnyű meromiozin lánc (5. ábra).



5. ábra. A miozin molekula felépítése (Kierszenbaum, 2002 nyomán)

A miozin nehézláncának számos izotípusát ismerjük az emlős izomzatban, amely a fejlődés során átalakulásra képes. Így ismerünk MyHC I, (más néven MyHC β), IIA, IIB, és IIX/D izotípusú nehézláncokat. A miozin nehézláncok izotípusa az élet során változik. Az öregedéssel a gyors típusú rostok pusztulnak, illetve intermedier rostokon keresztül lassú típusúvá tranzícionálódnak. Azonban a tranzíciót nem csak az öregedés, hanem a mechanikai ingerek, a hormonális és neurális faktorok is befolyásolják (Pette és Staron, 2000). Az átalakulás iránya, aktivitása mindig a kiváltó stimulus függvénye. Habár az átalakulás meghatározott formák között zajlik csak le (IIA \rightarrow IIB \rightarrow IIX/D), annak iránya fordított is lehet. A tranzíció eredményeként léteznek az izomban ún. hibrid vagy más néven intermedier filamentumok (Staron és Pette, 1993). A vázizomzatot alkotó rostokat ezek alapján három fő típusba lehet besorolni. Az ún. I-es típus (MyHC I típus alapján) lassú oxidatív izomrost, amely oxidatív foszforiláción keresztül állít elő energiát, alacsony ATP-áz aktivitással rendelkezik, lassan fárad ki. Glikogéntartalma viszonylag alacsony, míg mioglobin tartalma magas (vörös rost). Az ún. IIA típus (MyHC IIA izotípus alapján) gyors oxidatív izomrost, ATP-áz aktivitása magas, szintén a vörös típusú rostokhoz tartozik. A harmadik típus az ún. IIB (MyHC IIB) típus, amely gyors glikolitikus izomrost. Kevés mitokondriumot tartalmaz, mioglobintartalma alacsony (fehér rost), ugyanakkor ATP-áz aktivitása magas. Gyorsan kimerülő izomrostról van szó, így a fehér rostok elsősorban a rövid ideig tartó, nagy erőkifejtésre szolgáló izmokra jellemzők.

Több munka is készült az egér, mint genetikai modellállat izomzatának roststruktúrájára vonatkozóan, azonban teljes, az összes izom életkor és ivar szerinti rostösszetétele nem ismert.

4.3.3 A miogenezis kezdeti szakasza: myotom determináció

A miogenezis az izomszövet differenciálódásnak az embrionális fejlődés során zajló folyamata. Nem más, mint pontosan megtervezett molekuláris szignálok sorozata, amelyek egy heterogén izomzat kialakulását eredményezik.

Az embrionális fejlődés során a vázizom differenciálódás röviddel a gasztruláció megindulását követően kezdődik el. A mezoderma laterális régiójában, az ún. somitákból (ősszelvények) alakul ki az izomzat, a somitát körülvevő területekről érkező szignálok révén. A somita kezdetben több sejtcsoportból áll, amelyből jelentős sejtkivándorlás révén alakulnak ki a sclerotom (gerincoszlop), myotom (végtagváz, végtagizmok, axiális izmok) és dermotom [irha (cutis) és bőralja (subcutis)] prekurzor sejtcsoportjai. A sclerotom sejtcsoport válik el elsőként a somita ventrális-mediális területéről, amely legközelebb esik a velőcsőhöz. Ezek a sejtek mesenchymalis sejtekké alakulnak, majd a gerincoszlop és a bordák egy részének chondrocyta sejtjeivé differenciálódnak. Differenciálódásukat elsősorban a gerinchúr és a velőcső fenéklemeze által szekretált parakrin szignál, a Sonic hedgehog (SHH) fehérje váltja ki. A levált sclerotom sejtekben a Pax-1 fehérje termelődése indul meg, amely a sejtek porcsejtekké való differenciálódásához, így a gerincoszlop kialakulásához szükséges. Szintén megindul egy ún. I-mf fehérje termelése, amely faktor a bHLH (részletesen ld. később) transzkripciós faktorok izomszövet differenciálódást elindító hatását akadályozza meg e fehérjék termelődésének gátlása révén.

A somita többi része ezalatt lassan tovább differenciálódik, korábbi kerek formája ellaposodik, ventro-laterális irányban megnyúlik. A somita két laterális régiójában az izomformálódásért felelős epithelium található. Osztódásuk révén a somita síkja alatt (dorso-laterálisan) alakulnak ki az izom prekurzor sejtek, a myoblastok. A myoblastok lefűződése után fennmaradó kétrétegű struktúra a dermomyotom, amelynek alsó (ventrális) rétege a myotom. Azokat a myoblastokat, amelyek a velőcsőhöz közeli területből alakultak ki, epimer izomzatnak nevezzük (ezek alkotják majd a mély hátizmokat), míg a velőcsőtől legtávolabbi oldalon kialakult izmokat hypomer izmoknak nevezzük (ezek alkotják a későbbi testfal, a végtagok és a nyelv izomzatát). A dermomyotom dorzális lemezének középső régiója a dermatom, amely a mesenchymalis kötőszövetet képezi a hát bőrében: ez a dermisz. (A test más tájainak bőr kötőszövete nem a somitákból alakul ki, azaz nem a laterális mezodermából származik.)

A myotom determinációjának folyamatában legalább két fontos parakrin szignált kell megemlíteni. Így az epimer izomsejtek elkülönülésében a velőcső által elválasztott Wingless 1 (*Wnt1*) és Wingless 3a (*Wnt3a*) játszik szerepet. További hatással van az SHH alacsonyabb koncentrációja, amely a velőcső fenéklemeze által szekretálódik, így a somita dorso-mediális területén, ami viszonylag távol esik a fenéklemeztől, az SHH koncentráció a diffúzió miatt már alacsonyabb. A hypomer izomsejtek kialakulásában az epidermisz által termelt Wnt szignál és a mezoderma oldallemeze által termelt 4-es csont morfogenetikus fehérje (BMP4) és fibroblaszt növekedési factor 5 fehérje (FGF5) játszanak meghatározó szerepet. E szignálok teszik lehetővé, hogy a sejtek elkülönülése után az izomszövet differenciációs programot aktivizáló és "levezénylő" szabályozó transzkripciós- és növekedési faktor gének aktiválódjanak, majd meginduljon a myoblast determináció 6. ábra.



6. ábra. Az emlős somitogenezis korai szakasza, a laterális mezoderma differenciálódás a dermomyotom kialakulásáig (A) A velőcső zárodást követő somita formálódás, (B) a dermomyotom és sclerotom lefűződése, (C) az epimer és hypomer dermomyotom lemezek kialakulása, (D) a dermomyotom és sclerotom sejtcsoportok teljes elkülönülése (Gilbert, 2000 nyomán).

Az aktiváló faktorok mellet inhibitor fehérjék is szekretálódnak, amelyek feladata a környező sejtekből érkező szignálok hatásának gátlása. Így például az SHH fehérje a somita ventrális régióját védi a mezoderma oldallemeze által termelt BMP4-től, így akadályozva meg a sclerotom myotom irányú differenciációját. Ugyanígy, a *nogging* nevű fehérje, amely a dermomyotom mediális régiójában termelődik, a BMP4 szignáltól védi a sejteket, hogy ne induljon meg azok hypomer izommá történő laterális vándorlása, hanem mindvégig mediális pozícióban maradjanak. A folyamat könnyebb megértését a 6. ábra segíti (Gilbert 2000, 447-458. p.).

4.3.4 Miogenezis: az izmok determinációja

Az izomszövet differenciálódásában, így az izomzat kialakulásában szerepet játszó gének közül mára már számos ismert. Zömében transzkripciós-, vagy növekedési faktorokat kódolnak, azaz az izomzatot alkotó fehérjék génjeinek expresszióját szabályozzák, meghatározzák az izomzat kialakulását és szerveződését. E faktorok génjei a célpontjai azon szignáloknak is, amelyek az izomszövet differenciálódását indítják el (Molkentin és Olson, 1996a, 1996b). Az 1. táblázat a myotom determinációban részt vevő legfontosabb fehérjéket sorolja fel, azok hatásának ismertetésével.

Fehérje neve	Fehérje- család	Jellemző fehérje- domén	Hatás	Referencia
MyoD Myogenin Myf5 MRF4	bHLH	bHLH domén	 gének <i>E-box</i>ához képesek kötődni <i>homo-</i> és <i>heterodimer</i>eket alakítanak ki más fehérjékkel izom struktúrgének aktiválása 	Emerson 1993 Arnold és Winter 1998 Olson és Klein 1998
MEF2	MEF	MADS domén MEF domén	 izom struktúrgének A/T-gazdag régiójához kötődnek <i>homo-</i> és <i>heterodimer</i>eket alakítanak ki más fehérjékkel izom struktúrgének aktiválása 	Pollock és Treisman 1991 Edmonson et al. 1994 Olson et al. 1995
GDF-8	TGF-β	TGF domén	 szérumba szekretált fehérje ActR receptoron keresztül sejtproliferációt gátol a myoblastokban 	McPherron et al. 1997 Grobet et al. 1997
Pax3 Pax7	Pax	paired domén homeodomén	 embriogenezis irányítása miogenezis irányítása szatellita sejtek kialakulása 	Rawls et al. 1995 Borycki et al. 1999 Buckingham 2001 Seale et al. 2000
IGF-1	GF	Tirozinkináz receptor-kötő domén	 izomdifferenciálódás szabályozása az embriogenezis és a növekedés stádiumában egyaránt sejtproliferáció indukciója (felnőtt korban is) 	Liu et al. 1993 Quinn et al. 1994
MNF-α . MNF-β	winged- helix	(CCAC)-box kötő domén	 Myotom determináció az embriogenezis során felnőtt állatokban szatellita sejt proliferáció 	Cornelison és Wold, 1997

1. táblázat. A myotom determinációban részt vevő szabályozó fehérjék és szerepük

A somitát körülvevő sejtcsoportok által termelt parakrin szignálok hatására különül el a myotom és alakulnak ki a hypomer és epimer izomkezdemények. E szignálok hatására indul meg hypomer izomban az előbb már ismertetett Pax3 fehérje termelése. A Pax3 azután aktiválja az izomszövet-specifikus transzkripciós faktorok két, a myoblast proliferációért felelős tagját, a MyoD és Myf5 fehérjéket. Ezek termelődése a sejtekben az izommá alakulás első fontos lépése. Az epimer izomban ezzel szemben a MyoD más útvonalon aktiválódik, de itt is megjelenik a Myf5 és MyoD fehérje. A MyoD termelődésének megindulását követően a MyoD önmagát is aktiválja, azaz saját génjének upstream régiójába is beköt, így további termelődését már maga is szabályozza. Ezen kívül képes direkt DNS-fehérje kölcsönhatáson keresztül aktiválni számos izomszövet-specifikus gént is [pl: izomspecifikus kreatin-kináz (MCK), izom acetilkolin receptor fehérje (muscle AChR)]. A kutatások mai állása szerint a *bHLH* és a *MEF2* transzkripciós faktorok kooperációjaként következik be az izomszövet-specifikus gének aktivációja (Molkentim és Olson, 1996).

A determincióban szerepet játszó faktorokat és termelődésük fő helyét az embriogenezis alatt a 7. ábra szemlélteti.



7. ábra. A dermomyotom determinációban szerepet játszó transzkripciós- és növekedési faktor fehérjék (Gilbert, 2000 nyomán)

A myotom bHLH faktorokat termelő sejtjeit immár myoblastoknak, azaz izom prekurzor sejteknek nevezzük. Ezek az ún. elkötelezett sejtek az izomszövet differenciálódás irányába indultak fejlődésnek. A sejtek a determinációt, vagyis a myoblasttá alakulást követően egy aktív osztódási fázison mennek keresztül, ahol számuk megsokszorozódik. Ebben a szakaszban főként az FGF fehérjék hatására nincs differenciáció, csak ploriferáció. Ezt követi a sejtek elrendeződése, vándorlása, amelynek során a majdani rostok formáját veszik fel a sejtek és sorokba rendeződnek. Ekkor az osztódás teljesen leáll, a sejtek fibronektint választanak ki az extracelluláris mátrixba, amely az egyik legfőbb fibronektin receptorhoz, az α 5 β 1 integrinhez kötődik. Ezzel az integrin-fibronektin kapcsolattal végleg lezárul az osztódás, így ez a lépés elengedhetetlen a differenciálódás bekövetkezéséhez (Boettiger et al. 1995). A sorba vagy láncokba rendeződés a sejtmembrán glikoprotein molekulái által közvetített. Számos *cadherin* (Ca-függő adhéziós fehérje; *Ca-dependent adhesion molecules*) és egyéb sejtadhéziós molekula (*Cell Adhesion Molecules*; CAM) vesz részt a folyamatban. A felismerés és kapcsolódás mindig csak két myoblast sejt között mehet végbe, vagyis az identitás fontos a membránmolekulák közötti kapcsolat létrejöttében. A sejtvándorlást a fúziós szakasz követi, amikor a myoblastok egybeolvadásával kialakulnak a rostok. A sejtmembránok egybeolvadása kálciumion-függő folyamat, így a folyamat mediációjában metalloproteinek, más néven meltrinek vesznek részt. Az utolsó szakaszban a fúzionált izomsejtek végdifferenciálódnak, vagyis érési folyamat zajlik le. Ennek eredményeként épül fel és alakul ki az izomrost fimomstruktúrája, az izomfilamentumok, és szerveződnek izmokká a rostok a korábban már ismertetett struktúra szerint (8. ábra; Gilbert 2000, 447-458. p.).



8. ábra. A miogenezis folyamatának szakaszai a determinációt követően (Gilbert, 2000 nyomán)

Az izomzat kialakulása igen összetett folyamat. Hosszadalmas és bonyolult lépések sorozataként alakul ki a laterális mezoderma területén a myotom és dermomyotom parakrin szignálok hatására. A hypomer és epimer izmokban és a myotomban azután meglehetősen hasonló módon történik a genetikai program transzkripciós- és növekedési faktorok által vezényelt aktiválódása, amely a myoblastok kialakulását, osztódását, majd pedig az izomrostok kialakulását eredményezi. Azonban a szervezetben a myoblastok formálódása nem csak időben, hanem térben is zajlik, vagyis jelentős sejtvándorlás történik a végtagok kialakulásáig és a megfelelő izomzat kifejlődéséig. Habár az egyes myoblastok differenciálódása a fenti séma szerint zajlik, további folyamatokat is át kell tekintenünk, hogy az izmok kialakulását megérthessük. Jelenlegi ismereteink szerint az izomzat kialakulása három hullámban történik, amelyből az első kettő még embrionális szakaszban, míg a harmadik a megszületést követően zajlik le.

Az emlősökben a primer izomrostok a korai embriogenezis szakaszában alakulnak ki az előbb vázolt útvonalat követve, majd hamarjában lassú típusú rostokká alakulnak. Az első szakasz mai ismereteink szerint az egér embriogenezis 9. napján (d.p.c.) kezdődik és körülbelül a 13,5 napig (d.p.c.) tart. A miogenezis második hulláma a foetális fejlődés későbbi szakaszába zajlik, körülbelül a 14. naptól (d.p.c.) számítjuk, amikor már az elsődleges rostok mintegy állványzatul szolgálnak a másodlagos rostok kialakulása számára. A másodlagos rostok képezik tulajdonképpen a kialakuló izomzat fő részét és elsősorban gyors típusú rostokká alakulnak, immár a korai újszülött stádiumban. A másodlagos rostok kialakulása egybeesik az izmok beidegződésével, azaz az ideg-izom kapcsolatok, más néven neuromuszkuláris junkciók kialakulásával. Ugyanekkor nyernek "identitást" is az egyes rostok, vagyis végbemegy a mikrofilamentumok kialakulása és a gyors és lassú rostok is elkülönülnek. A fejlődő izomrostok először számos kontraktilis protein izoformát expresszálnak, ami csak a későbbi fejlődési stádiumban válik specifikussá. Vagyis a kezdeti izoformák közül több az érés során nem expresszál tovább, így alakul ki az adott rost karektere, vagyis hogy lassú, gyors, esetleg intermedier formát ölt-e.

A szatellitasejtek, vagyis izomszövet őssejtek csak ezt követően vándorolnak az izomba és tapadnak meg a rostokon. A szatellitasejtek az izomregenerációban vesznek rész. Az izomrostok bazális membránjához tapadnak. Az izomszövet őssejtekről bővebben a szöveti őssejtek ismertetésekor szólunk (ld. 4.6.1 alfejezet).

A megszületést követően még jelentős érés és növekedés zajlik az izomban, ami a felnőttkorra sem ér véget. Jól tudjuk, hogy az izomzat tömege felnőtt korban is megváltoztatható: megnőhet az aktív sejtosztódás és növekedés révén (pl: erőkifejtés, hozamfokozók, hormonális hatások, stb.), vagy akár csökkenhet mennyisége pusztulás révén (betegség, mozgásszegény életmód, stb.).

4.4 A miosztatin

4.4.1 A miosztatin gén és szerkezete

A miosztatin gén szerkezetét valamint az arról transzkriptálódó RNS legfontosabb adatait az egér, a szarvasmarha és az ember esetében a 2. táblázat tartalmazza.

Röviddel a miosztatin felfedezését követően McPherron és Lee (1997) a szarvasmarha (*fehér-kék belga*) mellett számos fajban azonosították a miosztatin gént. Vizsgálataik eredményeként napvilágot látott a galléros pávián (*Papio hamadryas*), a tyúk (*Gallus gallus*), a pulyka (*Meleagris gallopavo*), a patkány (*Rattus norvegicus*), a sertés (*Sus scrofa*), a juh (*Ovis aries*), a zebradánió (*Danio rerio*) és természetesen a humán miosztatin gén szekvenciája is. Ezen vizsgálatoknak köszönhetően derült ki, hogy a miosztatin transzkripciós faktor aminosav sorrendje nagyon erősen konzerválódott a fajok között. A proteolitikus módosítási hely után a szekvencia 100 %-ban konzerválódott az egér, a patkány a sertés a csirke a pulyka és az ember között, míg csupán 1-3 aminosav különbség volt kimutatható a galléros pávián, a juh és a szarvasmarha fehérje között. Egyedül a zebradánió fehérjéje tért el jelentősebben a vizsgált régióban, mintegy 88%

azonosságot mutatva a többi faj miosztatin fehérjével (McPherron és Lee 1997). Jelenleg már 43 faj miosztatin génjének szekvenciája ismert az állatvilágban (M4 Melléklet 14. táblázat). Ezek az adatok tovább erősítik a miosztatin gén és fehérjeszekvencia erős evolúciós konzerváltságának tényét.

Faj	Egér	Szarvasmarha	Humán	
Adatok	(Mus musculus)	(Bos taurus)	(Homo sapiens)	
Génbanki azonosító (GeneID ²)	17700	281187	2660	
Kromoszóma	Chr1;	Chr2;	Chr2;	
lokalizáció	1 27,8 cM	2q14-q15	2q33.2	
Gén mérete (bp)	6417	6640	5270	
Exon 1 (bp)	479	506	372	
Intron 1 (bp)	1741	1840	1789	
Exon 2 (bp)	374	374	373	
Intron 2 (bp)	1994 bp	2033	2400	
Exon 3 (bp)	1829	1701/1812/ 1887 ³	379	
transzkripciós iniciációs hely (bp)	-127	-133	-76, -116 és -166	
mRNS mérete (kb) (GeneBank ²)	2,7 (NM 010834)	2,9 (AF019620)	3,1 (NM 005259)	
3' UTR (bp)	104	127	140	
5' UTR (bp)	1448	1890	1975	
Aminosavak száma (db) (GeneBank ²)	377 (NP 034964).	375 (AAB86687)	375 (NP 005250)	

2. táblázat. A miosztatin gén szerkezete néhány fajban

4.4.2 A miosztatin fehérje és funkciója

A miosztatin, mint fehérje a növekedési faktorok közé tartozik. A TGF-β család egyik, a közelmúltban felfedezett tagjáról van szó, amely jelentős szerepet játszik az izomzat kialakulásának szabályozásában. A TGF-β növekedési faktor család tagjai a növekedés és szöveti differenciálódás során játszanak szerepet a génexpresszió szabályozásában, mind az embrionális, mind pedig a kifejlett szervezet homeosztázisának fenntartása során. Az ebbe a családba tartozó növekedési faktor fehérjék jellemzője, hogy aminosav-sorrendjük jelentősen konzerválódott az egyes fajok között. A TGF-β család fehérjéi mindig tartalmaznak egy ún. szekréciós domént, egy proteolitikus módosítási helyet, és a C-terminális régióban a családra jellemző cisztein aminosavban gazdag régiót. A ciszteingazdag régión keresztül a fehérje diszulfid hidak kialakítására képes, így homodimert képez. A fehérje tehát dimer formában aktív, így valósítja meg

² www.ncbi.nih.gov adatbázisból származó azonosítók

³ alternatív poliadenilációs szignált révén (1301, 1401 és 1477 bp-nál) a harmadik exon eltérő hosszúságú lehet

szabályozó funkcióját (Kingsley, 1994; McPherron és Lee, 1996; McPherron et al. 1997).

A miosztatin, vagy más néven GDF-8 (growth/differentiation factor-8) az izomszövet kialakulása során negatív regulátorként funkcionál, azaz meghatározza a vázizom maximális mennyiségét. Mutációja esetén túlizmolt fenotípus alakul ki, amely izom hyperpláziát és hipertrófiát eredményez (Lee és McPherron, 1999). Expressziójára jellemző, hogy normális egér embriókban a vázizom-szövetre korlátozódva jelenik meg. Először embrionális korban, a 9,5 napon (d.p.c.) tapasztalható a gén termékének megjelenése. A géntermék ebben az időpontban az éppen formálódó elülső somitákban figyelhető meg, míg később a myotom kompartmentre korlátozódik az érintett somitákban. Az izmok folyamatos formálódása során az expresszió szinte az összes izomra kiteried (McPherron et al. 1997). Felnőttkorban szintén a vázizomzatban megjelenő expresszió a jellemző, kiegészítve a zsírszövetben előtűnő, de igen alacsony aktivitással. Bár a mechanizmus még nem tisztázott, a feltételezések szerint ez az expressziós mintázat adhat magyarázatot a csökkent mennyiségű zsírtermelésre a mutációt hordozó szarvasmarhafajtáknál. Zsírszövet tenyészeteken végzett in vitro vizsgálatok azt mutatják, hogy a miosztatin fehérjének preadipocita tenyészetekhez való adagolása gátolja azok osztódását és differenciálódását. Közvetlenül csökkenti a glicerol-3-foszfát dehidrogenáz (GPDH) és a CCAAT/enhancer kötő fehérje alpha (C/EBP alpha), valamint a peroxiszóma proliferátor által aktivált receptorgamma (PPAR gamma) szintjét. Mindez a miosztatin rágcsálókban betöltött zsírszövet differenciálódásban való szerepére utal (Kim et al. 2001).

Hamrick és mtsai (2000) miosztatin null mutáns egér csontozatának vizsgálatakor, nem találtak különbséget a csontozat alakulásában. Lokális eltérést tapasztaltak a megnövekedett izomkötegek csonthoz való tapadásánál, ilyenek például a hátsó végtag izmai, amelyek közel kétszeres tömeget mutattak. Így a combcsonton (*femur*) a csont fejétől laterálisan található, az izmok tapadására szolgáló nagy forgató (*trochanter major*); a fej alatti mediális kis forgató (*trochanter minor*); és a külső oldali, nagy forgató alatt található ún. harmadik forgató (*trochanter tertius*), amelyek együtes növekedése volt kimutatható. Mindez azonban nem okoz további kortikális csontdepozíciót a diaphysisben. Eredményeik tehát azt mutatják, hogy hiába növekszik meg a testtömeg, azt nem követi a csontozat erőteljes növekedése. Ezért összességében nem a csontozat lesz kevesebb a hipertrófiás állatoknál, hanem nem növekszik együtt a testtömeggel. Ez a jelenség okozza a vágásnál tapasztalt kedvezőbb hús:csont arányt is. A miosztatin tehát nem gyakorol befolyást a csontfejlődés alakulására (Hamrick et al. 2000).

A közelmúltban egy neuromuscularis betegség, az izomdisztrófia esetében több kutatócsoport is szignifikáns izomszövet gyarapodást és a disztrófiás izom izomerő növekedését mutatták ki dystrophin mutáns (*mdx*) egerekben, amennyiben a beteg egereket miosztatin "null mutáns" egerekkel keresztezték (Wagner et al. 2002), vagy normális szérum-miosztatin szintjét lecsökkentették a protein blokkolása által (Bogdanovich et al. 2002). A kísérletekből az a következtetés vonható le, hogy a miosztatin a myoblastok osztódását befolyásoló, szabályozó fehérje; aktív gátlása az izomsejtek osztódását serkenti. A dystrophin mutáció által érintett beteg egerekben a miosztatin szintjének csökkentése az izomfunkciók egyértelmű javulását idézte elő, így terápiás alkalmazási lehetőséggel kecsegtet. A miosztatin egészséges, felnőtt egerekben történő blokkolása igazolta, hogy negatív regulációs hatása felnőtt korban is érvényesül: gátlása révén izomtömeg növekedés volt elérhető. Ez a kísérleti eredmény alátámasztani látszik a miosztatin blokkolás izomdisztrófiás megbetegedésekben való terápiás alkalmazásának lehetőségét (Grobet et al. 2003; Whittemore et al. 2003).

A miosztatin szintjének a disztrófia tünetegyüttesével való összefüggését korábban már kimutatták. HIV fertőzött betegek csoportját vizsgálva, az izomsorvadásos tüneteket mutató csoportban magasabb miosztatin szintet mértek (Gonzalez-Cadavid et al. 1998). Más vizsgálatokban szívinfarktust követően a fehérje szintjének növekedését mutatták ki az érintett területek szívizom sejtjeiben (Sharma et al. 1999). Ugyanakkor az öregedéssel együtt megjelenő izomvesztésnél több ízben sem volt kimutatható a miosztatin szintjének változása fiatal és idős csoportok összehasonlító vizsgálatában (Marcell et al. 2001; Welle et al. 2002).

A miosztatinnal kapcsolatos kutatások lendületében és feltételezéseink szerint irányvonalában is új változást hozhat egy 2004-ben megjelent közlemény, amely elsőként közöl miosztatin gén mutáció által létrejött emberi izom hipertrófiát. A normális lefolyású terhesség után megszületett fiúgyermek a világrajövetelekor szemmel látható izom hipertrófiát mutatott, amely főként a végtagok izomzatára tertjedt ki. A gyermek genetikai vizsgálata során a miosztatin génben bekövetkezett mutációt ($g.IVS1+5g\rightarrow a$) azonosítottak a gén szekvenálását követően. A tranzíció következtében missplicing következik be az mRNS érésében, így csonka, funkcióképtelen fehérje transzlálódik a hibásan átíródott mRNS-ről. A gyermek jelenleg 4 és fél éves, egészséges (a hipertrófián kívül eddig semmilyen szervi elváltozásban nem szenved), izmoltsága és izomereje jelentősen meghaladja kortársaiét (Schuelke et al. 2004).

Thomas és munkatársai (2000) a miosztatin sejtosztódás szabályozásában betöltött szerepét vizsgálták. Kimutatták, hogy a miosztatin mint gátló faktor működik az izom proliferációra nézve és ez a hatás egyben dózisfüggő is. Amikor ugyanis izomszövet kultúrákhoz miosztatin fehérjét adagoltak, rövid inkubációt követően a sejtek osztódásának csökkenése volt kimutatható. A csökkenés mértéke megegyezett az adagolt miosztatin mennyiségével, vagyis a gátlás dózisfüggő volt. Ha a miosztatint tartalmazó tápoldatot miosztatin-mentesre cserélték, a proliferáció ismét megindult az in vitro kultúrákban. A kapott eredmények láttán Thomas és munkatársai a sejtciklus vizsgálatába kezdtek. Megállapításuk szerint a miosztatin adagolás idején a sejtek csak kis százaléka volt S fázisban, ami azt jelenti, hogy a miosztatin a sejtciklust a G1 és a G2/M fázisban blokkolta. A sejtciklusban ható szabályozó fehérjék expressziójának vizsgálatakor a p21 fehérje, amely ciklinfüggő kináz inhibítor (Cdk-I; Cyclin dependent kinase inhibitor), szintje megemelkedett, azonban a hatás más p21 családbeli fehérjékre, vagy a p16 fehérjecsalád tagjaira nem terjedt ki. További hatást detektáltak a Cdk2 esetében is, a miosztatin kezelés ideje alatt: a Cdk2 szintje szignifikánsan csökkent. Változás

volt észlelhető a retinoblastoma (Rb) fehérje foszforilációjában is: a foszforilációs ráta csökkent. Ez összefüggést mutat a Cdk2 szintjének változásával, hiszen régóta ismert, hogy a Cdk2 legfőbb szubsztrátja a sejtciklus G1 fázisában éppen az Rb fehérje.



9. ábra. A miosztatin fehérje feltételezett hatásmechanizmusa Thomas és munkatársai (2000) szerint

Ezek alapján úgy tűnik, hogy a miosztatin a sejtciklus blokkolásán keresztül fejti ki a myoblast proliferációt gátló hatását, mégpedig úgy, hogy megnöveli a p21 fehérje szintjét. Az inhibítor fehérje szintjének növekedése révén a p21 fehérje Cdk2 molekulákat köt meg, így a cyclin-Cdk2 komplexek legfőbb hatása, vagyis az Rb fehérje foszforilációja jelentősen lecsökken. Ez a hypofoszforilált Rb fehérjék akkumulációját eredményezi. Bekövetkezik a G1 fázis blokkolása, és a sejtciklus, így az osztódás is leáll (Thomas et al. 2000; 9. ábra).

Nemrégiben megjelent közlemények adatai szerint a jól ismert izomszövetspecifikus transzkripciós faktor a MyoD a miosztatin célmolekulája. Ezek szerint a miosztatin képes csökkenteni a MyoD szintjét a Smad3 szignálútvonal aktiválásán keresztül (Langley et al. 2002). Az már ismert volt korábbról, hogy a miosztatin az aktivin IIB típusú receptorhoz (ActRIIB) képes kötődni, amely egy kettes típusú Szerin/Treonin kináz receptor, és azon keresztül szignalizálni. A miosztatin ActRIIB–hez kötődése a receptor alegység ActRIIA alegységével való dimerizációt indít el. A dimerizáció aktiválja a receptort, vagyis foszforilálódik a II-es alegység által. A foszforiláció térszerkezeti változást idéz elő, ami az I-es típus foszforilációs aktivitását indukálja, így annak intracelluláris doménje révén Smad fehérjéket képes foszforiláli (Lee és McPherron, 2001; 10. ábra).



Ugyanakkor nem csak a MyoD aktiválását sikerült kimutatni, de a szarvasmarha miosztatin génen végzett szekvenciaanalízis bebizonyította, hogy MyoD-kötőhelyek azonosíthatók a gén szabályozó régiójában. Ez azt jelenti, hogy a MyoD képes szabályozni a miosztatin-szintet. A részletes vizsgálat a MyoD-nek a miosztatin gén E-boxához való kötődését is igazolta (Spiller et al. 2002). A két mechanizmus közötti látszólagos ellentmondást, vagyis hogy a MyoD szabályozza- e a miosztatint vagy éppen fordítva, eddig még nem sikerült feloldani.

Rosttípus-specifikus miosztatin expressziót detektáltak egér hátulsó végtagjának tehermentesítési kísérletében— ilyenkor az állat egyik oldali hátulsó végtagját rögzítik a testhez úgy, hogy az állat azt a végtagot ne tudja használni a kísérlet ideje alatt (*hindlimb unloading*). A MyHC IIB izoforma és a miosztatin szint között szoros korreláció volt kimutatható a vizsgált izmokban (Carlson et al. 1999), vagyis a miosztatin magas szintje esetén alacsony MyHC IIB szint volt mérhető.

4.4.3 A miosztatin expresszió különböző állatfajokon mutatott eltérései

Az egéren és a szarvasmarhán került feltárásra a legtöbb adat a miosztatinról és annak szerepéről, azonban más fajokon is végeztek és végeznek vizsgálatokat a miosztatint illetően, így egyre több szövetnél sikerül kimutatni a miosztatin mRNS-t és/vagy fehérjét.

A patkányon például több kutatócsoport vizsgálta a miosztatinnak az izom regenerálódása során betöltött szerepét és az izomregenerálódás során kifejtett hatását. A kísérletek a miosztatin-szint emelkedéséről számoltak be a regenerációs periódusban, ami a miosztatin expresszió fokozódását jelenti (Kirk et al. 2000; Mendler et al. 2000; Sakuma et al. 2000; Yamanouchi et al. 2000; Taylor et al. 2001).

Az egér miosztatin expressziónál előzőekben említett izomrost típussal összefüggő miosztatin expressziót patkányon és csirkén is vizsgálták. Patkányokban a miosztatin szintén rosttípus függő expresszót mutatott: a miosztatin mRNS hiányzott a lassú típusú rostokból (MyHC I-es típus) (Kirk et al. 2000). Ezt cáfolandó, csirkeizom prekurzor sejtekkel végzett vizsgálatokban nem találtak szignifikáns eltérést a vörös vagy fehér rostokat tartalmazó izmok miosztatin mRNS szintjében, sőt a miosztatin szint állandónak mutatkozott az osztódási fázisban is (Kocamis et al. 2001). A korábbi publikációk mind azt állították, hogy a miosztatin gátolja az osztódást, így a csirke tenyészeteken kapott eredmények komoly ellentmondást jelentenek. Kocamis és munkatársai véleménye szerint a különbség egyrészt a különböző kísérleti rendszernek tudható be. Carlson és munkatársai (1999) ugyanis nem tiszta szatellita tenyészeteket használtak az egereken, hanem vegyes myoblast populációt. Kocamis véleménye szerint a szatellitasejtek miosztatin szintje eltérhet a felnőtt sejtekétől, másrészt a patkánynál korábban leírt, a miosztatin izomrost típusonként eltérő, alternatív poszttranszlációs modifikációja lehet a felelős a különbségért. Ez utóbbi állítást azonban azóta sem sikerült igazolniuk a csirkénél (Wehling et al. 2000). Ezért a csirke izomtenyészeteken kapott eredményeket a mai napig kétség övezi, nincs ugyanis szekvencia szintű magyarázat az ellentétes szabályozásra.

A sertésen végzett vizsgálatok a vázizom mellett az emlőszövetben is kimutatták a gén fehérjetermékét. Ennek szerepe azonban teljes mértékben tisztázatlan (Shaoquan et al. 1998).

Patkány szívizomszövet tenyészetekkel végzett kísérletek a miosztatin expresszióját szívizom prekurzor és Purkinje-típusú sejteken mutatták ki (Sharma et al. 1999). A miosztatin funkciója ebben az esetben is ismeretlen.

Halaknál a miosztatin szerepe még ennyire sem egyértelmű. Rodgers és munkatársai (2001) két halfaj: a *tilápia (Oreochromis mossambicus)* és a *fehér sügér (Morone chrysops)* miosztatin gén szekvenciáját is meghatározták. Eredményeik szerint a fehérje nagy homológiát mutatott a korábban izolált és meghatározott fajokéval. Ugyanakkor az expressziós mintázat jelentős eltérést mutatott, a gén termékét több szövetre kiterjedően lokalizálták. A géntermék megtalálható volt az agyban, a szemben, az ováriumban, a herékben, a bélcsőben, és a kopoltyúlemezekben (Rodgers et al. 2001). Az előzőzővel szinte egy időben jelent meg Roberts és Goetz közleménye, amely beszámolt a miosztatin két izoformájának elkülönítéséről: a két izoforma 92%-os szekvencia azonosságot mutatott (2001). A pataki szajblingot (*Salvenilus fontinalis*) vizsgálva az agyban (látólebeny, hátsóagy, hipotalamusz) és az izomban detektálták az egyik, míg az ováriumban a másik izoformát. A petefészekben azonosított forma expressziója az

ovuláció alatt emelkedést mutatott a nőstényekben. Ezek után négy újabb halfajt vontak be a vizsgálatokba, ahol azonos eredményeket kaptak (Roberts és Goetz, 2001). A másik érdekes adat szerint a miosztatin fehérje vörös izom specifikus lokalizációja volt megfigyelhető három halfajban is. Azoban további két fajnál eltérő mintázat volt kimutatható (Roberts és Goetz, 2001). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a halakban más szerepe van a miosztatinnak, mint a magasabbrendű gerincesekben.

A zebradánióval végzett hasonló vizsgálatok a miosztatin embriogenezis során betöltött szerepét igazolták. A gén 5' szabályozó régiójának tranziens expressziós rendszerben történő analízise bizonyította, hogy az izomszövetspecifikus expressziót biztosító reguláló elemek ezen a szekvencián helyezkednek el. További transzgénikus kísérletekkel igazolták, hogy a miosztatin gátlása halakban is a rostok számának növekedését eredményezi, azonban nem jár együtt a rostok megvastagodásával (Xu et al. 2003). A zebradánión kapott erdmények azonban csak részben képesek megválaszolni a miosztatin halakon betöltöt funkcióját, hiszen a zebradánióban tapasztalt expressziós mintázat némileg eltér a többi ismertetett halfajon kimutatott eredményektől. Így további kísérletek szükségesek a miosztatin szerepének tisztázására az alacsonyabbrendű gerinces osztályokban. A sokszor igen eltérő expressziós eredményeket az 3. táblázat foglalja össze.

Miosztatin expresszió egér megjelenése	\$79rv95-				halak			
	egér	marha	sertés	csirke	patkány	tilápia	szajbling	zebradánió
vázizom	+	+	+	+	+	+	+	+
zsírszövet	+	+	+	+	+			
emlőszövet			+					
agy						+	+	
szem						+		
here						+		
ovárium						+	+	
bélcső						+		
kopoltyúlemez						+	+	+

3. táblázat. A miosztatin expressziós mintázata különböző állatfajokban

4.4.4 A miosztatin szerepe a húsminőségben

A muszkuláris hipertrófiát mutató egyedeknél a vázizomzat tömegének mintegy 20%-os növekedése tapasztalható. A növekedés minden testtájra kiterjed. Az izomzat növekedése a vizsgálatok alapján főként az izmokat alkotó izomfilamentek számának növekedésével (hiperplázia) jár. Ennek ellenére a fenotípus elterjedt neve továbbra is izomhipertrófia maradt. A hiperplázia a magzati élet során alakul ki, azaz a megszületést követően a kontroll (miosztatin mutációt nem hordozó) egyedekhez képest nem változik a sejtosztódás aránya (McPherron és Lee, 1997).

Az izomzat mennyiségének növekedése mellett számos kedvező tulajdonság is megjelenik ezeknél az állatoknál: csökken a lerakódott zsír és

testüregi faggyú (az összes zsírtartalom mintegy 50%-al, míg az intramuszkuláris zsír közel 70%-al csökken), illetve a kötőszöveti állomány mennyisége. Így soványabb és porhanyósabb a hús, márványozottsága igen jó, amely a fogyasztók számára jelentősen javítja élvezeti értékét (Bölcskey et al. 1995a). Sajnálatos módon azonban az izomhipertrófiás egyedeknél több nehézség adódik a tenyésztés során. Iigen gyakran ellési nehézségekkel kell szembenézni a nagy borjú élőtömeg, illetve az anya anatómiai adottságai miatt. Ennek tudható be, hogy hazánkban a fajta nem terjedt el széles körben és nagyüzemi tartástechnológiája sem alakult ki (Bölcskey et al. 1995a).

A culard jelleg, habár recesszív, monofaktoriális, részleges dominanciával és nem teljes penetranciával jelenik meg. Így a *fehér-kék belga* vagy *piemonti* fajtával történt keresztezések azt mutatják, hogy még a heterozigóta (azaz egyetlen mutáns allélt hordozó) állatokban is kifejezett a hatása: a csont/hús arány és a színhús kihozatal a vágásnál jobb, mint a keresztezésben szereplő másik fajta egyedeinél, annak ellenére, hogy a hízlalási végtömeg nem mutat jelentős növekedést a heterozigótákban. A pozitív hatás anélkül jelenik meg, hogy az allél jelenléte negatívan befolyásolná a fertilitást vagy az ellést. A tapasztalatok szerint a penetrancia további szelekcióval fokozható (Dohy, 1989; 42. p.). Ezért jelenleg ezeket a fajtákat elsősorban a hízómarha-végtermék előállító (terminál) fajtaként alkalmazzák a keresztezésekben (Bölcskey et al. 1995b; 1996).

A húsminőség a fogyasztó számára a hús élvezeti értékét takaró fogalom. Azonban húsminőségen nem csak a hús élvezeti értékét, hanem a hűtési és tárolási tulajdonságait is meghatározó, a vágás utáni biokémiai változások révén kialakuló fizikai tulajdonságokat is értjük. Ilyenek a szín, a víztartóképesség és az állomány (reológiai tulajdonságok). A reológiai, azaz mechanikai tulajdonságokat elsősorban a puhaság, a porhanyósság és a konzisztencia határozza meg. Kialakulása tényezők több csoportjától függ: befolyásolják a biológiai és genetikai tulajdonságok (fajta, ivar, életkor, izomtípus stb.), a már említett post mortem folyamatok és a technológiai műveletek (hűtés, tárolás, fagyasztás, érlelés, feldolgozás), továbbá a mechanikai, kémiai és fizikai műveletek (elektromos stimulálás, nyújtás, masszírozás, tenderizálás; Vadáné 1996a).

A *fehér-kék belga szarvasmarhában* (és természetesen más, a miosztatin mutációját hordozó túlizmolt fajtában is) kimutatható az MyHC IIB fehérjék túlsúlya, amely a IIA típus rovására következik be. Ez biokémiai szempontból azt jelenti, hogy ezen állatok izomzatában több gyors típusú, azon belül pedig több glikolítikus izomrostot találunk. Így az energia felszabadulása során először a glikogén raktárak ürülnek ki, nagyobb arányban anaerob glikolízis útján.

A hús minőségét jelentősen befolyásoló porhanyósság strukturális alapja a következő tényezőkre vezethető vissza:

- kötőszöveti kollagén típusa, mennyisége, eloszlása;
- intramuszkuláris zsír mennyisége és eloszlása;
- víztartó képesség;
- rövidülés mértéke;
- érés (proteolízis sebessége).

A folyamatban több enzimrendszer vesz részt. Sokáig kiemelt jelentőségűnek tartották a lizoszómákba zárt katepszineket (ATP- és ubiquitin-függő proteáz enzimek), amelyek pH-csökkenés hatására szabadulnak fel, és bontják a miozin és aktin fehérjéket. Ma inkább azt feltételezik, hogy a proteoszóma enzimei csak közbülső lépésként "kapcsolódnak be" a fehérjebontásba (Vadáné 1996b).

Eddigi ismereteink szerint a porhanyósodás a vázfehérjék lebomlásával függ össze, amelyet a citoszólban lévő kalpain enzimek végeznek. A kalpainok a miofibrilláris fehérjéket bontják le (titin, nebulin, dezmin, gelsolin, vinculin, tropomiozin), amelyek a Z-vonalban, az izomrostokban helyezkednek el. Így a kalpainok nagy része is itt lokalizálható és csak kis hányad található az A- és az Izónában. A kalpainok a vágást követő pH-változás hatására felszabaduló kalciumionok által aktiválódnak. A halál beálltával ugyanis megszűnik az izomzat oxigénellátása, így az energianyerés glikogénből anaerob módon történik. Az izomzatban ennek következtében felhalmozódó tejsav gyors savasodást idéz elő (pH=5,5). A pH csökkenésével párhuzamosan ATP-hiány alakul ki, mivel a glikogén tejsavas bomlása következtében felszabaduló alacsonyabb mennyiségű ATP nem képes pótolni a vágás hatására lebomlott ATP-t. ATP hiányában az izomfilamentumokat legnagyobb hányadban alkotó miozin és aktin irreverzibilisen aktomiozinná kapcsolódik össze. Ilyenkor az izom fizikai tulajdonságai is megváltoznak: beáll a hullamerevség (rigor). A rigor állapotának megszűnése a fehérjebontó enzimek működésének köszönhető. A porhanyósodás folyamata a kezdeti szakaszban, azaz a vágást követő 24 órában igen gyors, a továbbiakban lelassul. A porhanvósodás mértéke az aktív kalpainok mennyiségének függvénye. Mivel a kalpainok (m-kalpain és µ-kalpain) közel semleges pH-viszonyok mellett aktívak, így a halált követően a pH lecsökkenéséig műkődnek, majd a pH visszaállását követően újra aktivizálódnak. Működésük további lényeges feltétele a megfelelő mennyiségű kalciumion jelenléte (Vadáné 1996a, 1996b).

A *fehér-kék belgán* leírt puhább, porhanyósabb hús a lecsökkent mennyiségű intramuszkuláris zsír, valamint a megnövekedett számú rostokat alkotó MyHC IIB fehérjetípussal függ össze. A gyors IIB típusú filamentek túlsúlya azt is jelenti, hogy az ilyen állatok izmai zömében fehér izomrostokat tartalmaznak, azaz mioglobin-tartalmuk alacsonyabb. A húsminőség egy másik tényezőjét, a hússzínt a mioglobin és származékai által meghatározott színárnyalat és azok koncentrációjától függő világossági fok adja. Magasabb mioglobin-tartalom sötétebb hússzínt eredményez. A marhahús elvárt színe sötétebb, mint a sertéshúsé, azonban a túl sötét szín nem kedvelt a fogyasztók körében (ismert, hogy a kor előrehaladtával a szín sötétebb). Ezért kedvező a miosztatin mutáció következtében létrejövő fehér izomtípus, amely az idősebb állatokban is világosabb, ún. borjúhússzínt eredményez.

4.5 Embrionális eredetű ős-sejtvonalak

Az egérembrióból származó embrionális eredetű ős-sejtvonalak (ES sejtvonalak) alkalmas *in vitro* modell-rendszerként szolgálhatnak a sejtek differenciálódása során lejátszódó folyamatok mechanizmusainak tanulmányozására, így akár egy konkrét differenciálódási útvonalban szerepet játszó fehérje hatásmechanizmusának feltárására is.

A pluripotens őssejtek létezéséről 1975 óta tudunk (Martin és Evans 1975). Először az úgynevezett EC sejteket (Embryonic Carcinoma Cells) fedezték fel, melyek ivarszerv-eredetű teratokarcinóma tumorok pluripotens sejtpopulációiból származtathatók (Bradley et al. 1984). E sejteken kívül még két másik, embrionális eredetű őssejttípus is ismert: a magzat ivarszervkezdeményeiben található ősivarsejtekből származó EG sejtek (Embryonic Germ Cell; Matsui és mtsai 1992), valamint a hólyagcsíra (blasztociszta) állapotban lévő embrió embriócsomójából izolálható, ún. embrionális őssejtek, vagy ES sejtek (Embryonic Stem Cell; Evans és Kaufman 1981; Martin 1981). Az egyes őssejtek eredetét a 11. ábra szemlélteti.



11. ábra. A pluripotens őssejtek származásának sematikus ábrája (Donovan és Gearhart, 2001 nyomán)

Mind az ES, mind az EG sejtek pluripotensek: ha hólyagcsíra állapotú embrióba injektálják ezeket a sejteket, azok képesek beépülni a gazdaembrió embriócsomójába, ott differenciálódni kezdenek, s a legkülönbözőbb sejt-, illetve szövetféleségekké képesek alakulni, és így ivarsejteket is képesek létrehozni. Az ES sejtekbe a kívánt génkonstrukciót elektroporációval (vagy más módszerrel) bejuttatva transzgénikus ES sejtvonalakat lehet létrehozni. *In vivo* az ES sejteket kiterjedten alkalmazzák az embriófejlődés folyamatának megismerésére, valamint az ES sejtvonalakból létrehozott transzgénikus állatokban az egyes gének funkciójának felderítésére. A génkiütéssel (knockout) létrehozott transzgénikus egerek vizsgálatával az ES sejtekben létrehozott célzott mutációk hatása *in vivo* körülmények között nyomon követhető (Nagy et al. 2003).

Az ES sejtek és EG sejtek *in vitro* differenciálódását is évek óta vizsgálják. Különböző differenciáltató faktorok alkalmazásával a legkülönbözőbb sejttípusokat lehet létrehozni, így idegsejtek, vérképző ős-sejtek, szívizom-sejtek, vázizomsejtek létrehozásáról is beszámoltak. Ez az oka annak, hogy a szervátültetésekben és a sérült szövetek pótlásában, regeneráltatásában az egyik legígéretesebb terápiás lehetőség az embrionális őssejtek differenciáltatása.

A hólvagcsíra állapotban lévő emlősembrió háromféle seittípusból áll. A blasztociszta külső trofoblaszt sejtrétegéből, (amely a magzat méhlepényének illetve külső magzatburkának képzésében vesz részt), a belső sejtcsomót (ICM) alkotó sejtekből, vagyis a blasztocöl felől az ICM-et borító egysejt rétegű hypoblast sejtrétegből, valamint az blasztociszta embriócsomójának epiblast sejtjeiből. Az epiblast embrionális epiblast részéből alakul ki a továbbiakban maga az embrió szövete, az epiblast másik része az amniont alakítja ki, míg a hypoblast a szikzacskó kialalkításában vesz részt. (Itt kell megjegyeznünk, hogy az extraembrionális szövetek kialakításában az eredetileg az epiblastból differenciálódó ún. extraembrionális mezoderma is részt vesz.)

Mivel az embrionális eredetű őssejtek az ICM-ből származtathatók és ebben az állapotban az embriót háromféle sejttípus építi fel, ezért ezek a sejtek már nem totipotensek, hanem pluripotensek. Már nem fejlődhet belőlük mindaz a sejt- és szövettípus, ami még egy 4-8 sejtes állapotú embrió bármely sejtjéből (*blastomer*) kialakulhat. Ezek a sejtek csak azokat a sejttípusokat tudják létrehozni, amelyek az ICM-ből származnak, tehát az embrionális szöveteket és az extraembrionális szövetek bizonyos sejttípusait (belső magzatburok). A hólyagcsíra állapotú egér embrió ICM és trofoblaszt sejtjeit a 12. ábra mutatja be.



12. ábra. Preimplantációs korú egér embriók (A) 4,5 napos, hólyagcsíra állapotú egér embrió ICM sejtjei, (B) a peteburokból (*zona pellucida*) kibújt embrió trofoblaszt sejtjei (saját felvételek).

Az őssejtek definíciója korántsem egyértelmű. A leginkább elfogadott definíció szerint az őssejtek:

- nem végdifferenciálódott sejtek (nem történt még meg az ún. terminális differenciáció),
- osztódási kapacitásuk végtelen,
- osztódásukkor a leánysejtek őssejtkén fennmaradhatnak (önmegújulás), vagy differenciálóhatnak, ez az ún. asszinkron osztódás.

Az embrionális őssejtek legfőbb és azokat más sejttípusoktól elkülönítő jellemzői az előbb felsorolt, minden őssejtre vonatkozó definíción kívül az alábbiak lehetnek:

- Magas sejtmag: citoplazma arány.
- Morfológiailag egymáshoz szorosan kapcsolódó sejtekből álló kompakt, többrétegű kolóniák.
- Optimális tenyésztési körülmények között állandóan osztódnak; LIF (Leukémia Inhibitor Factor) adagolása mellett nem differenciálódnak.
- A tenyésztési feltételek megváltozásával a legkülönbözőbb típusú sejtekké képesek differenciálódni.
- Immunhiányos (SCID) egerekbe injektálva daganatokat alakítanak ki, melyekben mindhárom embrionális csíralemezből származó sejtek megtalálhatók (Evans és Kaufman 1981).
- Magas telomeráz aktivitást mutatnak (Thomson et al. 1998).
- Sejtciklusuk G1-es fázisa rövid (Rohwedel et al. 1996).
- Hólyagcsíra állapotú gazdaembrióba injektálva (Bradley et al. 1984) vagy két nyolcsejtes gazdaembrióval aggregáltatva a sejteket (Nagy et al. 1990), beépülnek a gazdaembrió embriócsomójába és a normális embrionális fejlődés folyamatába bekapcsolódva ún. kimérákat képeznek. Képesek ivarsejt kimérát létrehozni. Tetraploid embriókkal történő aggregáltatásuk során kizárólag az ES sejtekből alakul ki a felnőtt szervezet, a tetraploid gazdaembrió sejtjei kizáródnak az ICMből (Nagy et al. 1990; Rossant et al. 1993), így ES eredetű egereket kaphatunk.
- Jellemző sejtfelszíni markerekkel rendelkeznek (Tian et al. 1997). Ezek közül a legjelentősebbek az SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4 (Solter és Knowles, 1978; Thomson et al. 1998), a TRA-1-80, TRA-1-81 (Shamblott et al. 1998), EMA-1; EMA-6, ECMA-7 (Hahnel és Eddy, 1986, 1987).
- Alkalikus foszfatáz (AP) aktivitást mutatnak (Wobus et al. 1984).
- Egyes transzkripciós faktorok expressziója is jellemző (pl: Oct-4; Schöler et al. 1989).
Hangsúlyozzuk, hogy a fenti lista inkább csak általános, mintsem minden ES sejtvonalra igaz. Nehezíti a helyzetet, hogy az előzőekben felsorolt markerek egy része fajonként eltérő aktivitást mutat, így nem általánosítható. Másrészt a listában felsorolt markerek egy része nem kizárólag embrionális őssejt marker (pl: SSEA-1; Oct-4; AP, stb.) Mégis, ezen markerek egyidejű megléte az ICM-eredetű ES sejtvonalakon mindmáig a pluripotencia elfogadott in vitro igazolására szolgál. Ugyanakkor a mai napig az egyetlen és széles körben elfogadott megállapítás a pluripotencia igazolására az ES sejtek esetében az ivari kimérizmus képzése. Számos törekvés van arra nézve, hogy ennél egyszerűbb, gyorsabb és olcsóbb, ugyanakkor egyértelmű eljárás szülessen az ES (vagy más szöveti) őssejtvonalak pluripotenciájának detektálására, igazolására. A pluripotencia fogalmának ma még nincs egyértelműen és egyöntetűen elfogadott definíciója, amely tovább hátráltatja a területen folyó kutatási eredmények összevethetőségét és a fejlődést (Smith 2001, Edwards 2004, Conley et al. 2004).

4.5.1 Pluripotens embrionális sejtvonalak gerinces fajokban

Az egér volt az első állatfaj, amelynek embrióit felhasználva sikerült ES sejtvonalat alapítani (Evans és Kaufman 1981, Martin 1981). Az 1990-es évek során számtalan állatfajban hoztak létre ES vagy EG sejtvonalakat, azzal a reménnyel, hogy azok az egér kísérletekben tapasztalt hatékonysággal és sikerrel lesznek felhasználhatók. Az M4 Melléklet 15. táblázatában összefoglalva ismertetjük az egyes gerinces fajokból történt embrionális sejtvonal alapítási kísérleteket, és azok eredményeit. Ezek a sejtvonalak folyamatosan passzálhatók, tenyészetben fenntarthatók, megtartják differenciálatlan fenotípusukat és az ES sejtekre jellemző morfológiát mutatnak. Közülük csak a csirke és zebradánió ES sejtvonalak felhasználásával sikerült ivarsejt kiméra állatokat létrehozni, ami azt jelenti, hogy eddig csak az egér, a csirke és a zebradánió sejtvonalaknál beszélhetünk valódi ES sejtvonalak létezéséről.

Ha pluripotens ős-sejtvonalakról beszélünk, ma már nem kerülhető meg a humán eredetű őssejtvonalak kérdése sem. Emberi eredetű őssejtvonalakat heredaganatokból, vagyis teratokarcinómákból több ízben hoztak létre kutatási célokra. Azonban először 1998-ban izolált két kutatócsoport pluripotens sejteket abortált magzatokból származó primordiális őssejtekből (Shamblott et al. 1998), illetve preimplantációs stádiumú humán embriókból (Thomson et al. 1998; 4. táblázat). A sejtvonalakat in vitro differenciáltatási kísérletekben pluripotensnek találták. Az ES sejt alapú génterápia és szövetpótlás tudományos kísérletei a közlemények megjelenése után új lendületet vettek. Ugyanakkor komoly társadalmi, etikai és jogi vitákat is maguk után vontak a sejtvonalak létrehozásával és alkalmazásával kapcsolatos kérdések (Mckay 2000, Guenin 2001⁴).

⁴ További, a humán ES sejtek etikai és jogi vonatkozásait ismertető adatok és az EU-ban elfogadott szanbályok olvashatók az alábbi Internet oldalakon: http://europa.eu.int/comm/research/conferences/2003/bioethics/pdf/sec2003-441report_en.pdf

http://www.isser.org/public/ethics.htm; http://stemcells.nih.gov/info/ethics.asp

Humán sejtvonalak	Származása	In vitro vizsgálatok	In vivo vizsgálatok	Referencia
ES	Blasztociszta ICM	AP+; SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-80, TRA-1-81; Oct-4, telomeráz	Egér embrió	Thomson et al. (1998)
EC	Heredaganat	AP+; SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-80, TRA-1-81; Oct-4; telomeráz	Egér embrió	Andrews (2002)
EG	PGC	AP+; SSEA-1; SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-80, TRA-1-81; telomeráz	Csirke embrió	Shamblott et al. (1998)

4. táblázat. Pluripotens humán sejtvonalak

4.5.2 Pluripotens embrionális sejtvonalak alapítása

Az ES sejtvonalak létrehozása —amint azt a fenti példák is mutatják— nem könnyű feladat. Így több kutatócsoport próbálkozott már hatékonyabb módszerek kidolgozásával. Leírásra került az ún. ICM kultivációs (Robertson 1987), immunkomplementációs (*immunosurgery*, Pease et al. 1990), a beágyazódásban akadályoztatott hólyagcsíra embriókat alkalmazó (*delayed blastocyst*, Brook és Gardner 1997), *Oc4-neomicin* transzgénikus (McWhir et al. 1996), őssejt szelekciós (*stem cell selection*, Mountford et al. 1998), valamint az ún. permisszív egértörzsekkel való visszakeresztezéses (Kress et al. 1998) ES sejtvonal alapítási eljárás is. Kísérletek folytak 8-sejtes, (Wobus et al. 1984; Delhaise et al. 1996) és morula állapotú embrió blasztomerjeinek disszociációjával (Eistetter 1989) történő ES sejt alapításra, de a legelterjedtebb módszer mindmáig az ICM-ből való ES sejtvonal alapítás maradt (Evans és Kaufman 1981, Martin 1981). A felsorolt módszerek széles palettája jól tükrözi, hogy az ES sejtvonal alapítás a mai napig igen körülményes, költség- és időigényes feladat. Az új sejtvonalak létrehozásának jelentős biológiai és technikai korlátai vannak.

Az ICM kultiváción alapuló módszer lényege a következő: a blasztocisztát embrionális eredetű fibroblaszt tápláló sejtrétegre helvezve a blasztociszta letapad a fibroblaszt rétegre, a külső trofoblaszt réteg óriás sejtjei pedig, szinte "ránőnek" arra, míg az ICM sejtjei szorosan együtt maradnak, s az úgynevezett ICM-csomót hozzák létre. Ha a blasztocisztát hagyjuk továbbfejlődni, az ICM-csomó sejtjei differenciálódni kezdenek. Ha azonban az ICM-csomót izoláljuk a tenyészetből, s ezt tripszin-cseppben kisebb sejtcsomókra disszociáltatjuk, majd ezeket az aggregátumokat újabb fibroblaszt rétegre helyezzük, a kis csomók letapadnak, s különböző morfológiájú kolóniákat hoznak létre. Olyan kolóniák is létrejönnek, amelyek továbbra sem differenciálódó, az ICM sejtjeivel homológ sejtekből állnak. Ezeket a kolóniákat ismét izolálni lehet a tenyészetből. A kolóniákat aztán tripszincseppben sejtjeire disszociáltatjuk, s ezt a sejtszuszpenziót helyezzük ismét új fibroblaszt sejtrétegre, azaz átpasszáljuk. Ha a keletkező újabb kolóniák morfológiailag azonosak lesznek, s a további passzálások során sem változnak meg, akkor mondhatjuk, hogy rendelkezésünkre áll egy aktívan osztódó, pluripotens sejtpopuláció. A sejtpopuláció egyetlen sejtjéből kiindulva ezek után egy valódi, egysejt eredetű sejtvonalat kell izolálnunk. Ezt követheti a sejtvonal karakterizálása, amely azoknak a tulajdonságoknak a vizsgálatát jelenti, amelyek egy ES sejtvonalat jellemeznek (AP, SSEA-1, Oct-4, kariotípus analízis, *in vitro* differenciálódás, ivari kimérák képzése stb.). A pluripotens embrionális sejtvonalak alapításának folyamatát a 13. ábra mutatja be.



13. ábra. Az embrionális őssejtvonal alapítás menete (saját felvételek)
(A) 4,5 napos egér blasztociszta fibroblaszt sejtrétegen, letapadás előtt, a *zona pellucida*-ból kikelten; (B) letapadt embrió ICM 6,5 napos korban, fénymikroszkóppal, ahol az ICM csomót óriás trofoblaszt sejtek veszik körül; (C) letapadt embrió ICM 6,5 napos korban, fáziskontraszt mikroszkóppal; (D) ES kolóniák az alapítás 25. napján, tápláló sejtrétegen.

Az ivari kiméra képzésre alkalmas pluripotens ES setvonalak létrehozása mai tudásunk szerint törzsfüggő. Csak néhány egértörzs alkalmas ES sejtvonal alapításra és azokból is csak néhány sejtvonal létezik. A legtöbb jól működő plutipotens sejtvonal 129SV egértörzs eredetű. Csak korlátozott számú ES sejtvonal érhető el C57BL/6 egértörzsből, bár e sejtvonalak csak kis százalékban képeznek ivari kimérát és csak alacsony hatásfokkal alkalmazhatók tetraploid embrióval történő aggregáltatásra (Auerbach et al. 2000, Schoonjans et al. 2003). Mindazonáltal néhány hibrid ES sejtvonal 129SV és C57BL/6 egértörzs keresztezésekből elérhető, amelyek hatékonysága és alkalmazhatósága technikailag megfelel a 129SV sejtvonalaknak, azonban e sejtvonalak genetikailag nem homogének, így nem képesek a beltenyésztett törzsekből származó előnyök biztosítására sem (Gardner és Brook 1997, Nagy et al. 2003).

A differenciálatlan állapot fenntartásához az ES sejtvonalakat optimális tenyésztési körülmények között kell tartani, így állandóan osztódó, nem differenciálódó sejtek populációi maradnak. A kolóniák tápláló sejtrétegre letapadva növekednek (egér embrionális fibroblaszt: Wobus et al. 1984; STO sejtek: Evans és Kaufman 1981). Pluripotenciájuk fenntartásához azonban nélkülözhetetlen a tápoldat leukémia-inhibítor faktorral (LIF) való kiegészítése (Smith et al. 1988, Williams et al. 1988). A LIF a citokinek interleukin-6 (IL-6) családjának a tagja. A LIF és az IL-6 család más citokinjei (úgymint az IL-6, a CNTF, vagy az OSM) képesek az egér ES sejtek differenciálatlan állapotát fenntartani a gp130-as szignál transzdukciós útvonalon keresztül (Metcalf 2003). Amikor a tápláló sejtréteget vagy a LIF-et a sejtektől megvonják (Pedersen 1994), és lecsökken a magzati borjú savó (FCS) mennyisége, vagy speciális differenciálódást indukáló anyagokkal (például retinolsavval) (Wobus et al. 1994, 1997; Rohwedel et al. 1999) egészítik ki a tápoldatot, akkor azok differenciálódni kezdenek.

4.5.3 Az ES sejtek in vitro differenciáltatása

Az ES-sejtek tehát nem csak *in vivo* embrionális környezetben (tehát egy embrióba juttatva) differenciálódnak, hanem *in vitro*, Petri-csészében is. Ehhez azonban megfelelő feltételeket kell teremteni. Az egéreredetű embrionális őssejtek specializációja spontán is lezajlik, de kimenetele nem jósolható meg: nem tudhatjuk előre, hogy mely szövettípus és milyen arányban alakul ki a tenyészetben. Ezért a kutatók több eljárást is kidolgoztak, hogy a folyamat minél jobban irányítható legyen. Ma már számtalan molekula és növekedési faktor ismert, amely szerepet játszik az egyes szövetek kialakulásában. E faktorok tenyésztő tápoldathoz adagolásával a sejtek a kívánt szöveti sejtekké alakíthatók.

Az ES seiteket szuszpenziós tenvészetekben vagy függőcseppben tartva, azok embriójellegű aggregátumokká, úgynevezett EB csomókká (embryoid body, EB) állnak össze (Doetschman et al. 1985). A differenciáció specializált vonalak létrejötte felé is irányítható a már említett növekedési faktorok adagolásával. Az EB csomóknak tehát azért van jelentős szerepe, mert segítségükkel lehetséges a különféle differenciálódási lépések in vitro tanulmányozása azáltal, hogy a korai génexpressziós vizsgálatok hosszabb időre kitolhatók és így az embrionális fejlődés nyomon követhető (O'Shea, 1999). Ez számos esetben lehetővé teszi az embrionális őssejtek in vitro differenciáltatásának modellként való eredményes felhasználását, pl. az idegi (Bain et al. 1995; Fraichard et al. 1995; Okabe et al. 1996; Lee et al. 2000), a korai primitív ektoderma-szerű (*EPL*;Rathien és Rathien, 2003), a szívizom (Wobus et al. 1991; Klug et al. 1996), a vázizom (Rohwedel et al. 1994, 1998; Wobus et al. 1997; Hirsch et al. 1998; Myer et al. 2001), a simaizom (Drab et al. 1997), a zsírszövet (Dani et al. 1997) vagy a hematopoetikus irányú differenciáció tanulmányozásában (Wiles és Keller 1991). Az embrionális őssejtek in vitro differenciáltatásának modellként való felhasználásáról bővebben ld. Pedersen (1994), valamint Wobus és Boheler (1999) közleményeit.



14. ábra. Az ES sejt differenciáltatás függőcseppes módszerének sematikus ábrája (Gócza, 1999)

Az embrionális őssejtek differenciálódási képessége felfedezésük óta jól ismert. Ezt azonban inkább a sejtvonal jellemzésében használták fel (Mummery et al. 1990), direkt differenciáltatásokat hosszú időn keresztül nem végeztek. Az első célzott vizsgálat 1991-ben a *haematopoesis*, azaz a vérsejtek specializálódásának kutatása volt (Wiles és Keller, 1991). Ennek során a haematopoesisben ható faktorok szerepét vizsgálták a kutatók. A kísérletekhez igen sok magas költségű anyagra volt szükség, így azokat nem folytatták olyan intenzitással, mint azt a kísrletek megindulásakor várni lehetett.

Újabb eredmények csak az évtized második felében születtek, de az igazi áttörés a humán ES-sejtvonalak létrehozása volt 1998-ban. A kutatók felismerték, hogy a differenciáltatási kísérleteknek nemcsak a differenciálódás folyamatában szerepet játszó molekulák és kölcsönhatásaik felderítésében van szerepe, hanem a terápiás célú alkalmazások kutatásában is. Egyre inkább elterjedt az a nézet, hogy a sejtek mesterséges differenciáltatásával szövetek és talán szervek is létrehozhatók a jövőben (Thomson et al. 1998). A 15. ábra az embrionális őssejtek differenciáltatásának és terápiás célú felhasználásának lehetőségét szemlélteti.



15. ábra. Az ES sejtek transzplantációs terápiában való felhasználásának lehetősége

4.5.4 Embrionális ős-sejtvonalak *in vitro* differenciáltatása vázizom sejtekké

Az EB csomókban a váz-, illetve a szívizom embrionális fejlődésére jellemző folyamatok tanulmányozása is lehetővé válik. Lehetséges az izomképződésben szerepet játszó faktorok hatásának *in vitro* vizsgálata, illetve, az izomfejlődés során szerepet játszó új faktorok felfedezése is (Cossu et al. 1996). Az *in vitro* vizsgálatok során szerzett információk jól kiegészíthetik a transzgénikus állatmodellek alkalmazásával szerzett információinkat. Az ES sejtek vázizom sejtekké történő differenciáltatása történhet ún. differenciáltató faktorok hozzáadásával, amikor az endogén szignálokkal azonos transzkripciós faktor fehérjék keverékét alkalmazzuk. Ez azonban igen költséges és az optimális keverék kialakítása nagyon bonyolult. Megfigyelések alapján egy másik módszer az elterjedt, amikor is lószérum adagolásával indítjuk el a mezoderma irányú differenciálódást, majd bFGF és csirke embrió kivonat adagolásával segítjük elő a vázizom prekurzor sejtek kialakulását. Az EB csomók kialakítása már egy ún. differenciáltató tápoldatban történik. Ez a tápoldat az ES sejtek szokásos tenyésztő tápfolyadékától annyiban tér el, hogy nem tartalmaz LIF-faktort (*Leukemia Inhibitor Factor*), amely a sejtek pluripotenciájának fenntartását hivatott elősegíteni, illetve szérumtartalma eltérő (a szokásos 15% helyett 10% borjúsavót tartalmaz). A vázizom sejtek differenciálódásának elősegítésére 5% lószérumot adunk a tenyésztőfolyadékhoz, amely a differenciálódáshoz szükséges növekedési faktorokat tartalmazza (Hirsch et al. 1998).

A differenciáltatás kezdeti lépéseként függőcsepp kultúrában kialakított EB csomókat két nap aggregáltatás után 8 napra szuszpenziós kultúrába helyezzük, majd ezt követően egyedileg, zselatinnal kezelt 24-lyukú tenyésztőedénybe kerülnek. A differenciálódás vizsgálata ezt követően mikroszkópos megfigyeléssel, immuncitokémiával és RT-PCR-el történhet. Az előzőekben ismertetett módszert több esetben alkalmazták a vázizomban megjelenő fehérjék szerepének tisztázására (Rohweder et al. 1994; Baker és Lyons 1996; Hirsch et al. 1998; Wobus és Boheler, 1999)

4.5.5 A korai differenciálódásban szerepet játszó fehérjék

A transzkripciós- és növekedési faktorok az embrionális fejlődés minden szakaszában igen fontos szerepet töltenek be. Vannak köztük olyanok, melyek a korai fejlődési stádiumok kialakításában résztvevő gének aktiválásában, vagy éppen represszálásában játszanak fontos szerepet. Mások a később kialakuló szöveteket, szerveket és különféle struktúrákat meghatározó gének szabályozását végzik. A transzkripciós faktorokra jellemző, hogy hetero- vagy homodimerek formájában kötődnek a DNS-hez és fejtik ki hatásukat közvetlenül, a gének szabályozó régiójához kapcsolódva. Míg a növekedési faktorok a sejtek felszínén található receptorokon keresztül szignál útvonalakat képesek aktiválni. Egy-egy növekedési faktor a fejlődés különböző stádiumaiban több útvonalban is szerepelhet.

A transzkripciós faktorok aminosav-szekvenciabeli hasonlóságai és néhány esetben a funkcionális hasonlóságok alapján családokba sorolhatók. Ez jellemzi többek között az Oct-4 (korábbi elnevezései: Oct-3; POU5F1) transzkripciós faktort is, amely a POU transzkripciós faktor család tagja. Az Oct-4 egy azon faktorok közül, amelyek képesek számos gén promóter vagy enhancer régiójában jelenlévő nyolc bázispárnyi octamer motívumhoz (ATGCAAAT) kötődni (Ruvkin és Finney 1991).

Az oct-4 gén öt exonból áll (Okazawa et al. 1991, Yeom et al. 1991), amely egy 1,5 kb nagyságú mRNS-t kódol (Okamoto et al. 1990, Rosner et al. 1990 Schöler et al. 1990b). Ez egy 352 aminosavból álló fehérjét kódol, amely magába foglalja a mintegy 150 aminosavból álló konzerválódott régiót, az ún. POU domént. Ezt a régiót még két alegységre lehet osztani: a POU-specifikus doménre (N-terminális régió) és a POU homeodoménre (C-terminális régió). A POU homeodomént és a POU-specifikus domént 15-56 aminosavból álló variábilis régió választja el.

Minden POU fehérjénél sértetlen homeodoménre van szükség a DNS-hez való kötődéshez, ami az octamer motívumon (ATGCAAAT) keresztül megy végbe. A POU specifikus domén a kötődési specifitás felét adja, azonban nem rendelkezik eddig ismert DNS-kötő struktúrával, bár ez nem zárja ki azt, hogy más DNS motívumokhoz nem lenne képes kötődni (Schöler, 1991).

Az Oct-4 molekula az egér embrióban, illetve a még nem termékenyült oocytában anyai eredetű mRNS és fehérje formájában már megtalálható. A termékenyülést követően a fehérje az előmagban (pronucleusban) lokalizálódik (Schöler et al. 1989, Rosner et al. 1990, Yeom et al. 1991, Palmieri et al. 1994). Ahogyan a legtöbb anyai mRNS, úgy az Oct-4 mRNS szintje is drámaian csökken a termékenyülés után (Yeom et al. 1991; Palmieri et al. 1994). A gén zigótikus expressziója a nyolcsejtes stádiumot megelőzően kezdődik, amikor a sejtmagokban mind az mRNS, mind pedig a fehérje mennyisége szignifikánsan megemelkedik (Yeom et al. 1991, Palmieri et al. 1994). Nyolcsejtes stádiumban nagy mennyiségű fehérje található a blasztomerek sejtmagjában. A morula kompaktálódásáig az Oct-4 mRNS és fehérje mennyisége minden sejtben magas és egyenlő. A 16. ábra az oct-4 gén expresszióját mutatja az embrióban és a korai embriogenezis során.



16. ábra: Az oct-4 gén expressziójának alakulása a korai embriófejlődés során (Pesce et al. 1998) A vörös szín az Oct-4 pozitív sejteket jelöli az embrióban.

Az emlős embriogenezisében a blasztocöl formálódása során válik szét először az embrionális és az extraembrionális fejlődési útvonal. A morula külső sejtjei alkotják a trofektodermát, ami az implantációhoz és a placenta fejlődéséhez szükséges, a belső sejtek pedig az ICM-et formálják, amiből többek között maga az embrió is fejlődik. Az Oct-4 expresszió az ICM sejtjeire korlátozódik, míg a trofektoderma sejtekben megszűnik (Pesce et al. 1998, Pesce és Schöler 2000). Valószínűleg az oct-4 represszálása sejtadhézió-függő szignálokon keresztül valósul meg. Azokban a külső sejtekben, amelyekbe helyzetükből adódóan elegendő szignál jutott az oct-4 gén represszálódik, és megindul a differenciálódás. A belső sejtekben viszont ezzel ellentétes folyamat játszódik le (Pesce és Schöler 2000). Az implantáció után az ICM-ből kialakult epiblast (primitív ektoderma) és hypoblast (primitív endoderma) közül az epiblast sejtekben marad fenn az oct-4 expressziója (Rosner et al. 1990, Schöler et al. 1990a, Yeom et al. 1996).

A közép-gasztrula stádiumban az extraembrionális mezodermában kialakuló primordiális őssejtek (PGC) az egyedüli embrionális sejtek, amelyek fenntartják az Oct-4 expresszióját a gasztruláció után is, egészen a gaméták nemi differenciálódásának a kezdetéig, azaz nőivarban a termékenyülést követő 13-14. napig, míg az újszülött hímekben a spermatogenezis kezdetéig (Pesce et al. 1998, Pesce és Schöler 2000). Mivel különböző fajokban (egér, szarvasmarha, ember) az oct-4 gén nagyfokú homológiát mutat, ezért feltételezik, hogy hasonló expressziós mintázatot kapnánk ES és PGC sejtek esetében is (Pesce és Schöler 2000). Az egér és a szarvasmarha ill. sertés blasztocisztájában azonban különbség van az Oct-4 expressziós mintázatát tekintve: az egérben csak az ICM-ben találunk Oct-4 fehérjét, míg a szarvasmarha és a sertés blasztocisztájában mind az ICM, mind pedig a trofektoderma expresszál Oct-4 faktort (Kirchhof et al. 2000).

Emlősembrióban az Oct-4 elengedhetetlen a pluripotens sejtpopulációk fenntartásában. Az oct-4 homozigóta mutáns embriók, bár *in vitro* elérik a blasztociszta stádiumot, de az ICM populáció nem marad pluripotens. Valódi ICM hiányában a trofoblasztok osztódása megáll, és óriás trofoblaszt sejtek keletkeznek. A trofoblaszt sejtek osztódását az FGF-4 helyre tudja állítani, azonban az ICM pluripotenciáját már nem tudja megmenteni (Nichols et al. 1998).

Az oct-4 gén expressziója három upstream cis-szabályozó régiótól függ. Ezek közül az első a minimál promóter (MP), amely a gén upstream régiójában található. A második régió a proximális enhancer (PE), amely az oct-4 gén retinsav-függő repressziójáért felelős (Okazawa et al. 1991). A harmadik régió, mely az implantálódás előtt álló embrióban az Oct-4 expressziójára ügyel, a disztális enhancer (DE). A gén e három szakasza a gén szerkezetét bemutató 17. ábrán látható.



17. ábra. Az oct4 gén szerkezete (Ovitt és Schöler 1998)

A minimál promóter egymással átfedő kötőhelyeket tartalmaz. Ide tartozik egy GC box, ami az Sp1 transzkripciós faktorcsalád tagjait képes megkötni, valamint háromszor ismételve a konszenzus hormon-érzékeny elem (HRE) (Schoorlemmer et al. 1994, Sylvester és Schöler 1994), amely hasonlít a retinsav-

érzékeny régióra (RARE). Ez a régió a szteroid-tiroid hormon receptor család számos tagját képes felismerni, beleértve a retinsavat és a retinsav X receptort is (RXR; Okazawa et al. 1991, Pikarsky et al. 1994; Schoorlemmer et al. 1994; Sylvester és Schöler 1994).

A proximális enhancer az epiblaszt-specifikus és az epiblaszt-eredetű EC sejtvonal-specifikus expresszióért felel (Yeom et al. 1996). A preimplantációs embrió differenciálatlan sejtjeiben a proximális enhancer aktivitása nagyon alacsony (Minucci et al. 1996, Yeom et al. 1996). Az enhancer tartalmaz egy *cisz* elemet, amely kapcsolatban áll a retinolsav általi represszióval, bár nem tartalmaz retinolsav receptor kötőhelyet. Ezen az elemen belül két hely található: az 1A és az 1B (17. ábra), melyek különböző faktorokat kötnek (Okazawa et al. 1991), de csak az 1A hely represszált *in vivo* a differenciálatlan ES és EC sejtekben (Minucci et al. 1996).

A disztális enhancer a morula stádiumú embrióban, az ICM-ben, a primordiális őssejtekben (PGCs) (Yeom et al. 1996), az ES és EG sejtekben az oct-4 expressziójáért felelős. Ezen belül is található egy 2A nevezetű hely (17. ábra), mely hasonlít a proximális enhancer 1A helyére, de azzal ellentétes irányultságú. A disztális enhancer aktivitását az extraembrionális ektodermában és az allantoisz sejtekben expresszáló csont morfogenetikus fehérje-4 (BMP-4) szabályozza (Pesce és Schöler 2000).

Az Oct-4 transzkripciós faktor többféle módon is képes befolyásolni a különböző gének expresszióját. A következőkben az irodalomban eddig leírt transzkripcionális aktiválás három modellje kerül bemutatásra. Azért fontos e modellek ismertetése, mert így válik érthetővé a transzkripciós faktorok kooperációja révén megvalósuló génaktivációs kaszkád. Ez a séma ill. sémák nem csak az Oct-4 esetén igazak: számos transzaktivációs mechanizmus hasonlóan működik, csak éppen más fehérjék vesznek részt a modellben.

Az első modell az Oct-4 és az E1A fehérje közötti kölcsönhatáson alapul. Az E1A fehérje volt az első fehérje, amelyről megállapították, hogy funkcionális kapcsolatba kerül az Oct-4 fehérjével (Schöler et al. 1991). Differenciálódott sejtekben az E1A képes helyettesíteni az ES sejt-specifikus kötő faktorokat, lehetővé téve ezzel a távolság-függő transzaktivációt. Az Oct-4 POU doménje és az E1A fehérjének a konstans hármas régiójában (CR3) található cink-ujj motívum interakciója eredményezi ezt a funkcionális együttműködést (Schöler et al. 1991). Az E1A és az E1A jellegű fehérjék (E7, HMG-1) azáltal, hogy az Oct-4 molekulákat a transzkripciós mechanizmushoz kapcsolják anélkül, hogy önmaguk a DNS-hez kötődnének, lehetővé teszik az Oct-4 általi transzaktivációt (Pesce et al. 1998, Pesce és Schöler 2000). Ezt a modellt a 18. ábra A része szemlélteti.

Az Oct-4 pozitív transzaktiválásának a másik modellje (18. ábra B) olyan faktorokon alapul, amelyek az oktamer motívum közelében kötődnek a DNS-hez. Erre a modellre a legjobb példa az őssejt-specifikus fgf-4 gén aktivitásának elemzése során született. Az FGF-4 mRNS már mint anyai transzkriptum jelen van az embrióban, bár kétsejtes állapotban mennyisége lecsökken, blasztociszta stádiumban újra megemelkedik, ahol jelenléte már csak az ICM-re korlátozódik. Ezen kívül a posztimplantációs fejlődésben, a végtagok formálódásában és növekedésében, valamint a fogak kialakulásában játszik fontos szerepet (Fraidenraich et al. 1998; Rappolee et al. 1994).

Az FGF-4 őssejt specifikus expressziójáért a 3' UTR-régióban található enhancer elem a felelős (Curatola és Basilico 1990). Ez az enhancer elem tartalmazza az Oct-4 kötődéséhez szükséges octamer motívumot és annak közelében a nagy mobilitású csoport (HMG) transzkripciós faktorának, a Sox-2 fehérjének a kötőhelvét (Yuan et al. 1995). Ez a két kötőhelv szükséges a második modell szerint ahhoz, hogy az Oct-4 és a Sox-2 közötti szinergizmus közvetlen fehérje-fehérje interakcióként működjön az FGF-4 esetében, ami az Oct- és Soxkötőhelyek közötti távolságtól függ (Ambrosetti et al. 1997). Tehát az Oct-4 és a Sox-2 transzkripciós faktorok az fgf-4 gén fentiekben meghatározott kötőhelyeihez kapcsolódva képesek a konformációváltozásuk révén а transzkripciós mechanizmushoz kötődni és a transzkripciót elindítani, azaz transzaktiválni (18. ábra B).



18. ábra. Az Oct4 transzaktiváció ismert modelljei (Pesce és Schöler 2001 közleménye alapján)
 (A) E1A aktivációs modell, (B) Fgf4-típusúaktivációs modell,
 (C) osteopontin modell.

Hasonló Oct/Sox pozitív szabályozást találtak a kutatók az ES és EC sejtekben, az ICM-ben, epiblasztban és az embrionális ill. extraembrionális ektodermában expresszáló Utf1 transzkripciós koaktivátor esetében is (Nishimoto et al. 1999). Az utf1 gén szabályozó régiójában található két transzkripciós faktor kötő motívumon, az octamer motívumon és a Sox kötőhelyen keresztül kapcsolódva az Oct-4—Sox-2 fehérjekomplex képes az FGF-4 esetéhez hasonlóan a transzkripciós mechanizmushoz kötődni és ezáltal elindítani az utf1 gén expresszióját.

A harmadik modellnél (18. ábra C) csak az Oct-4 kötődik a DNS-hez, méghozzá dimer formában. Erre példa az osteopontin (OPN) sejtadhéziós/migrációs fehérje, amely a primitív endoderma sejtekben nagy mennyiségben van jelen, az ICM-ben és az ES sejtekben viszont gyengén expresszál. A modell szerint az OPN első intronjában lévő palindrom Oct faktor felismerő elemhez (PORE) képes az Oct-4 dimer formában kötődni. Ezt a komplexet még eddig ismeretlen, feltételezett koaktivátorok kapcsolják a transzkripciós komplexhez (Botquin et al. 1998). Ezt a formát azonban az előbbi modellel ellentétben a Sox-2 nem segíti, hanem éppen semlegesíti azáltal, hogy a PORE egyik feléhez képes kapcsolódni, így megakadályozza az Oct-4 dimerek kialakulását és így nem jön létre a transzkripcionális aktiválás.

Az eddigieket összegezve elmondható, hogy a totipotens embrionális sejtekben és őssejtekben expresszáló Oct-4 transzkripciós faktor nélkülözhetetlen az embrionális sejtek pluripotens fenotípusának fenntartásában és szomatikus sejtekké történő differenciálódásukat megelőzően fontos szerepet játszik az őssejtek totipotenciájának meghatározásában. Olyan génként jellemezhető, melynek segítségével lehetővé válhat a differenciálatlan és a differenciálódott sejtek elkülönítése.

Az ismertetett modellek révén bemutatásra került számos, az Oct4 kaszkádban részt vevő faktor (Sp1, Sox2, Fgf4, Utf1, stb.) amely a pluripotencia állapotának fenntartásához elengedhetetlen. Általuk a pluripotens-multipotens állapotok közötti átmenet, vagyis a korai szöveti elköteleződés vizsgálható. Véleményünk szerint, ha az ES sejtvonal alapítás törzsfüggő jelensége genetikai és nem pedig technikai okokra vezethető vissza, akkor ugyanezen géneknek és kölcsönhatásoknak a törzsek közötti összehasonlító vizsgálata adhat választ a genetikai okokra.

A Rex-1 fehérje (*zinc finger protein-42; Zfp-42*) a cinkujjas fehérjék családjába tartozó transzkripciós faktor fehérje, amely a nem differenciálódott teratokarcinóma és ES sejtekben expresszál. Génjének promóter régióját megvizsgálva az Oct-4 génnél ismertetett oktamer kötő motívumot (POU kötődomén) azonosítottak, mely régiónak a Rex-1 expresszió szabályozásában van funkcionális szerepe. Ezek alapján feltételezhető, hogy az Utf-1 fehérjéhez hasonlóan a Rex-1 is az Oct-4 kaszkád részze, így a pluripotencia meghatározásában fontos szereppel bír (Hosler et al. 2003).

Régóta közismert, hogy a sejttenyészeti körülmények között a fibroblasztok proliferációs képessége alapvetően attól függ, hogy milyen korú egyedből származnak a sejtek. A humán eredetű embrionális sejtek kb. 50x, a felnőtt szervezetből származó sejtek korukkal arányosan kevesebbszer képesek osztódni (Hayflick, 1965). Adott számú osztódás után a sejtek morfológiája megváltozik, többé nem osztódnak, majd elpusztulnak. Ez a tumorsejtek és a pluripotens sejtek esetében nem igaz, azok osztódási potenciálja végtelen. A jelenség az ún. genetikai óra, vagyis a kromoszóma végek teloméra régióira vezethető vissza. A DNS szintézis specialitásából következően minden egyes duplikációkor a DNS egyik lánca rövidebb lesz. Tehát minél többet osztódik a sejt, annál kisebb és kisebb lesz a telomér régió. A vizsgálatok szerint azonban ez a rövidülés csak az egyedfejlődés későbbi szakaszában kezdődik el. Az ún. ősivarsejtekben —amelyekből a későbbi ivarsejtek származnak— és az embrionális sejtekben ugyanis van egy enzim, a telomeráz (telomeráz reverz transzkiptáz), amely képes a DNS rövidülő szálát meghosszabbítani.

Az egyedfejlődés egy bizonyos pontján azonban a telomeráz működése abbamarad, ekkor kezdenek el rövidülni a telomérák. Egy bizonyos hossz elérése után a sejtek morfológiája megváltozik, többé nem osztódnak, bekövetkezik a sejtek öregedése. A telomeráz a legtöbb egészséges sejtben nem működik, azonban kimutatták, hogy a legtöbb tumorsejtben viszont aktív, és valószínűleg ez magyarázza a tumorsejtek korlátlan szaporodóképességét (Takahashi et al. 2000). A gén működésének jelentősége az ES tenyészetek esetében is fontos, mivel az enzim aktivitása révén korlátlan osztódási képességgel rendelkeznek az ES sejtek.

4.6 Szöveti őssejtek

A szöveti őssejtek, vagy angol nevükön stem sejtek (stem cells, SC) olyan sejtek, amelyek osztódásuk során önmegújításra és differenciált utódsejtek létrehozására egyaránt képesek. Az embrionális fejlődés során szerveink a sejtek osztódása (proliferáció) és különböző feladatok ellátására való specializálódása (differenciáció) révén jönnek létre. A két folyamat egymással párhuzamosan, egész életünkben zajlik. Az őssejtek esetében tehát olyan sejtekről van szó, amelyek egyszerre mindkét folyamatra képesek: mind önmegújulásra, azaz proliferációra, mind pedig differenciálódott utódsejtek létrehozására. Itt kell megjegyeznünk, hogy az utódsejteken nem végdifferenciálódott sejteket kell érteni (mint pl. májsejt), hanem ún. *prekurzor* sejteket. A prekurzor sejtek egy bizonyos fejlődési útvonal irányába elkötelezett sejtek, amelyekből azonban még több sejttípus is kialakulhat.

Az őssejtek számos szövetre kiterjedő jelenléte bizonyított, így ma már azt feltételezzük, hogy kivétel nélkül minden szövet tartalmaz őssejteket, csak azok osztódási aktivitása eltérő. Ha azonban megfelelő szignálok érik, akkor osztódásuk révén új szövetet képesek létrehozni.

A szöveti őssejtekről hosszú ideig azt gondolták, hogy csak a szöveti környezetüknek megfelelő szövettípusra jellemző sejteket képesek létrehozni, azaz unipotensek. Ma úgy gondoljuk, hogy a mikrokörnyezet, azaz a szöveti őssejtet körülvevő sejtek, szövetek által termelt faktorok határozzák meg a fejlődés irányát. A sejt nem veszíti el fejlődési potenciálját a differenciálódás során, van mód a fejlődési irányok befolyásolására, megváltoztatására.

Az elmúlt néhány év kísérletei azt mutatták, hogy az egyes szövetekben található és izolálható őssejtek a szervezetbe visszajuttatva különböző sejtekké, szövetekké képesek differenciálódni (transzdifferenciáció). Így nem csak a saját szövet növekedésében és regenerációjában vesznek részt, hanem számos, vagy minden szövetspecifikus őssejt izolátum tartalmazhat olyan pluripotens őssejtpopulációt, ami a befogadó szövetek által kibocsátott növekedési faktorok és jelek hatására a megfelelő módon képes differenciálódni (transzdifferenciálódni). A szöveti őssejtekkel végzett kutatások üteme az ezredfordulón gyorsult fel. Szinte elképzelhetetlen ütemben szaporodnak a legkülönbözőbb őssejtek felfedezéséről szóló közlemények és azok terápiás célú alkalmazási lehetőségei (5. táblázat).

Szöveti őssejtek elnevezése	Milyen szövetből izolálták?	Terápiás alkalmazási lehetőség
köldökvér őssejtek	köldökvér	immunhiányos betegségek, leukemia
hematopoetikus őssejtek	csontvelő	immunhiányos betegségek, leukemia
mesenchymalis őssejtek	csontvelő	immunhiányos betegségek, leukemia,
		stroke, Parkinson-kór, Alzheimer-kór,
		gerincvelői sérülések
neurális őssejtek	központi idegrendszer	stroke, Parkinson-kór, Alzheimer-kór,
		gerincvelői sérülések, Sclerosis multiplex
szatellita sejtek	vázizom szövet	izom disztrófia
epidermális őssejtek	bőrszövet	égés, vágás okozta sérülések
intestinalis őssejtek	vékonybél	?
retina őssejtek	szem	retina sejtek pótlása

5.	táblázat.	Az egyes	szöveti őss	ejtek sz	ármazása (és terápiá	ás célú f	felhasználásuk	lehetőségei

Ma még úgy tűnik, hogy az embrionális eredetű őssejtek azok, amelyek nagyobb fejlődési potenciállal rendelkeznek. Azonban etikai okok miatt, az ES sejtekkel szemben igen komoly ellenállás figyelhető meg a társadalom részéről. A kérdés korántsem dőlt el. A következő évek, vagy akár évtizedek kutatási eredményei és vitái fogják eldönteni, hogy az embrionális őssejtek (ES-sejek), vagy a szöveti őssejtek (stem sejtek) hozzák-e meg az áttörést a transzplantációsés génterápiában.

4.6.1 Izomszövet őssejtek

Az izomszövet eredetű (izomszövetből izolálható) szöveti őssejtek olyan, önmegújulásra képes sejtpopulációt képviselnek, amelyek a születés utáni izomnövekedés és izomzat regenerációjában résztvevő utódsejteket képesek

létrehozni. Azonban, ahogy azt a tudományos közlemények egyre növekvő száma is bizonyítja, az egymástól izomszövet több. jelentősen eltérő karakterisztikájú, eltérő differenciálódási így képességgel rendelkező őssejtpopulációt tartalmaz. Az ún. myogen szatellitasejtek az izomrost mellett kifejlett а alaphártyája alatt vázizom találhatók. А szatellitasejtek normális esetben mitotikusan inaktívak, de a születés utáni növekedés és izomregenerálódás igényének megfelelően osztódást indítanak el és prekurzor sejteket hoznak létre.



19. ábra. Szatellita sejt az izomrost bazális membránja alatt A felvételen a kék sejt M-cadherin specifikus ellenanyaggal jelölt szatellita sejt, míg a zöld fluoreszcens partikulumok az izomrost sejtmagjai (Terry Partridge felvétele)

Ezek a myogen prekurzor sejtek a terminális differenciáció előtt többszöri sejtosztódáson mennek keresztül. Az inaktív szatellitasejtek száma a kifejlett izomban viszonylag állandó a regeneráció és a degeneráció többszöri ciklusa során, ami a szatellitasejtek önmegújító képességét sugallja. A szatellitasejteket régóta unipotens őssejteknek tartják, amelyek csak a myogen sejtek előállítására képesek. Valóban, az inaktív szatellitasejtek a myogen sejtekre jellemző markereket, pl. M-cadherin, Pax7 és Myf5 fehérjéket termelnek. Mindazonáltal a legújabb vizsgálatok szerint a szatellitasejtek *in vitro* körülmények között zsírsejtté (adipocyta) és csontsejtté (osteocyta) is képesek fejlődni. Így továbbra sem egyértelmű, hogy a szatellitasejtek "igazi" őssejteknek tekinthetők-e.

Azt az elképzelést, hogy kizárólag a szatellitasejtek vesznek részt a felnőtt izomsejtek regenerálódásában, az újabb kutatások megcáfolták. Ezek azt mutatják, hogy a felnőttkori izomzat multipotens őssejt populációt is tartalmaz. A felnőtt izom őssejtjei, intravénásan bejuttatva szubletális mértékben besugárzott egérbe, képesek az egész vérképző (hematopoetikus) rendszer újraépítésére (Jackson et al. 1999). Mindemellett természetesen izomsejtekké is képesek differenciálódni.

Goodell és munkatársai (1996) voltak az elsők, akik bebizonyították, hogy fluoreszcens sejtválogatással (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) több faj csontvelői őssejtje is elkülöníthető az SP (Side Population) sejtektől. (Az SP sejtpopuláció azon sejteket jelenti, amelyek Hoechst 33342 fluoreszcens festés során a festéket aktívan "kipumpálják" a sejtből, ennélfogva a FACS szelekció során negatív populációt képeznek.) Gussoni és munkatársai kimutatták, hogy szubletálisan besugárzott egérbe történő intravénás beinjektálást követő regeneráció során, a csontvelőből szelektált SP sejtek vázizom létrehozására képesek. Ugyanezen csoport azt is kimutatta, hogy a felnőtt vázizom is tartalmaz SP populációt, amely vérképző sejtek létrehozására képes, ill. besugárzott egérbe történő intravénás injektálását követően izomrostok regenerációjára is képes volt, ami azt bizonyítja, hogy az izom SP frakciója izomeredetű vérképző sejteket (Muscle Hematopoetic Potential Cells, MHPC) is tartalmaz. Számos kísérlet tanúsága szerint az izomból származó tenyésztett sejt besugárzott egérbe intravénásan bejuttatva képes az egész vérképző szervrendszer újraépítésére, ami azt jelenti, hogy az MHPC sejtek tenyészetben is megtartják e képességüket (Jackson et al. 1999). Sőt, in vitro vizsgálatok szerint, az izom figyelemreméltóan nagy mennyiségben tartalmaz vérképző progenitorokat, amelyek többféle vérképző kolóniát hoznak létre (Asakura és Rudnicki 2002). Ezek a vérképző progenitor sejtek magas számban találhatók az izom SP populációban, mint ahogy a csontvelői SP sejtek között is.

Az a megfigyelés, hogy az izom SP sejtek intravénásan a szervezetbe juttatva új izomrostok létrehozásában vesznek részt és szatellitasejteket hozhatnak létre, felvetette annak a lehetőségét, hogy az MHPC sejtek valójában szatellitasejtek. Azonban újabb adatok megcáfolták ezt a feltevést, és bebizonyították, hogy a szatellitasejtek és MHPC sejtek különböző sejttípusok, külön populációt alkotnak az izomszövetből izolálható őssejtek között (Asakura et al. 2002). Így például az izom SP sejtek a *Sca-1* vérképző őssejtmarkerre pozitívak,

de szatellitasejt markerekre nem, továbbá *in vitro* körülmények között soha nem képesek izomsejteket létrehozni. Ezzel szemben a szatellitasejtek *Sca-1* fehérjére negatívak, és *in vitro* körülmények között nem képesek hematopoetikus kolóniákat létrehozni. Ráadásul ezek a populációk nem izolálhatók együtt FACS/Hoechst szelekcióval.

A Pax7-hiányos mutáns egerek szatellitasejtjei teljesen hiányoznak, bár izmaikban találunk vérképző potenciállal rendelkező sejteket és normális arányban tartalmaznak SP sejteket (Seale et al. 2000). Továbbá, csak a CD45⁺ izomeredetű sejteknek van az egész vérképző rendszert újraépítő képességük (McKinney-Freeman et al. 2002). A szatellitasejtek nem expresszálnak CD45 fehérjét, míg azok az izomsejtek, amelyek in vitro körülmények között vérképző kolóniákat képesek létrehozni, $CD45^+$ eredetűek. Mindezeket egybevéve, az adatok azt sugallják, az MHPC sejtek képesek hematopoetikus sejtvonal hogy differenciációjára és a szatellitasejtektől elkülönült populációt alkotnak.

Az ok, amiért az izmok ilyen figyelemreméltó vérképzőrendszeri rekonstrukciós képességgel rendelkező sejteket tartalmaznak, izgalmas kérdés. Az újabb kutatások rávilágítottak, hogy az izom és több más felnőtt szövet —mint pl. az agy, a szív, a tüdő, a lép, a vese és a vékonybél— $CD45^+$ vérképző progenitorokat tartalmaznak, amelyek nagyszámban találhatók az SP-frakcióban. Számos kísérlet zárta ki annak a lehetőségét, hogy ezek a szöveti eredetű, hematopoetikus differenciációs képességgel bíró sejtek kontamináció útján kerültek volna a preparátumba, és valójában csak perifériális hematopoetikus sejtekről lenne szó (Asakura és Rudnicki 2002). Ez azt jelenti, hogy a hematopoetikus fejlődési potenciállal rendelkező őssejtek normális "lakói" az egyes szöveteknek.

Fontos kérdés, hogy vajon az izom SP sejtek között vannak-e sejtek, amelyek hozzájárulnak az izomregenerálódáshoz és szatellitasejtek létrejöttéhez. Tisztított, izomeredetű SP sejtek önmagukban képtelenek izomsejtekké differenciálódni, jelezve, hogy az izom SP sejtek alapvető differenciációs útja nem myogen (Asakura et al. 2002). Azonban intravénás és intramuszkuláris transzplantációs kísérletek világosan megmutatták, hogy az izom SP sejtek között vannak olyanok, melyek képesek regenerálódott rostokká differenciálódni. Az újabb kutatások minden kétséget kizáróan megmutatták, hogy transzplantációt követően az izom SP sejtek szatellitasejteket képesek létrehozni regenerálódó izomban (Asakura et al. 2002; Gussoni et al. 1999). Így, az izom felnőtt őssejtjeinek megvan a kapacitásuk, hogy az izomregenerációban részt vegyenek, és szatellitasejteket hozzanak létre. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a felnőtt őssejtek a fejlődés és a regeneráció során valójában a szatellitasejtek normál progenitorai.

A beültetett őssejtpopulációk az izomzat környezeti hatására myogen differenciáción mennek keresztül. Érdekes módon, az izom SP sejtek myogen specifikációja és az izomsejtek kialakulása (az egysejtmagvú myoblastokat is beleértve) volt megfigyelhető *in vitro* körülmények között, elsődlegesen myoblastokkal történő kokultivációt követően (Asakura et al. 2002). Így az, hogy az izom SP sejtek csak a myogen sejtek jelenlétében képesek myogen

differenciálódásra, azt sugallja, hogy a folyamatot egy izomsejt által közvetített induktív interakciót is magában foglaló mechanizmus szabályozza.

A *Pax7*-deficiens izomból teljes mértékben hiányoznak a myogen szatellitasejtek, ami a *Pax7*-nek a szatellitasejtek fejlődésében játszott nélkülözhetetlen szerepére utal (Seale et al. 2000). Érdekes módon, a *Pax7*^{-/-} egérből nyert izom SP sejtek primer myoblastokkal történő kokultiváció során többmagvú izomsejtet hoznak létre (Asakura et al. 2002). A *MyoD*, egy miogenezisért felelős fő szabályozó transzkripciós faktor is képes a *Pax7*^{-/-} izom SP sejtekből származó myoblastokban a *Pax7* nem indukálható MyoD által. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az izom SP sejtek terminális myogen differenciációja független a *Pax7*-től.

A legfrissebb eredmények szerint különböző sejtpopulációk izolálhatók a nyugalomban lévő és az éppen regenerálódó izomból. Míg a nyugalomban lévő izomból izolált *CD45⁺/Sca1⁺* sejtek in vitro alig mutatnak myogen differenciációt, addig a regenerálódó izomból tisztított $CD45^+/Sca1^+$ sejtpopuláció erőteljes myogen differenciációt mutat. Ráadásul a regenerálódó izomból mintegy tízszer több $CD45^+$ sejt tisztítható, összehasonlítva a nyugalomban lévő szövettel. Mindez azt jelenti, hogy a CD45⁺ sejteknek fiziológiás szerepük van az izomzatban, nem "véletlenül kerültek oda". Érdekes kérdés, hogy hogyan történik ezen sejtek aktivációja a sérülés/regeneráció során. In vitro kísérletek során lítium adagolása, vagy Wnt fehérjéket ektopikusan expresszáló sejtekkel történő kokultiváció egyaránt képes volt kiváltani a Wnt szignálútvonal aktivációját és így a myogen differenciációt. Az in vivo szerep bizonvítására kardiotoxin injekciót követően Wnt antagonista fehérjét (sFRP2) injektáltak egerek regenerálódó lábizmába. A Wnt blokkolót nem kapott, de kardiotoxin injekción átesett csoporthoz képest, a kezelt egyedek izmaiból csökkent mennyiségű aktivált $CD45^+/Sca1^+$ sejtet lehetett izolálni. Mindez egyértelmű bizonyítékot szolgáltat a Wnt útvonalon keresztül történő aktiváció szerepére.

A csontvelő és a csontvelői SP sejtek transzplantációja szintén vázizomrostok képződését eredményezte (LaBarge és Blau 2002). Jóllehet, a csontvelői SP-származású szatellitasejtek nem mutathatók ki intravénás transzplantációt követően (Gussoni et al. 1999), újabb kísérletek azonban megmutatták, hogy a csontvelő-eredetű sejtek (BMDC) transzplantáció után képesek szatellitasejtekké differenciálódni (LaBarge és Blau, 2002). Az is bebizonyosodott, hogy az izomeredetű *CD45*⁺ SP alpopuláció képes myogen sejtekké válni elsődleges myoblastokkal végzett kokultivációt követően. Amennyiben ezeket a sejteket intramuszkulárisan injektálták, azok beépültek a regenerálódó izomrostokba (McKinney-Freeman et al. 2002). Mindent összevetve, úgy tűnik, hogy az izomszövetből izolált hematopoetikus sejtek (MHPC), a csontvelő-eredetű sejtek (BMDC) —és talán a hematopoetikus őssejtek (HSC)—hasonló biológiai tulajdonságokkal bírnak, míg a csontvelő-átültetési kísérletek azt sejtetik, hogy az MHPC sejtek valóban a csontvelőből származhatnak.

Egy fontos kérdés az MHPC sejtek vázizmon belüli elhelyezkedése. A *Sca-1*⁺ sejtek az izomrostok között helyezkednek el, különösen a vérerekhez kapcsolódva. A megfigyelések azt sugallják, hogy az MHCP sejtek, mint az erekhez kívülről szorosan kötődő, azzal kapcsolatban álló sejtek az izomban, a szatellitasejtek progenitor sejtjei, vagy izom-prekurzor sejtek.

Ezeket a sejteket izolálva és besugárzott egerekbe ültetve, szintén kimutatták, hogy hematopoetikus rekonstrukciós aktivitással rendelkeznek (Howell et al. 2002). Ezek a potenciálisan hematopoetikus sejtek in vitro körülmények között jól felszaporíthatók, anélkül, hogy hematopoetikus újraépítő képességüket elvesztenék. A $CD45^-$ és a $CD45^+$ hematopoetikus potenciálú sejtek közötti rokonsági viszony még tisztázatlan.

Elképzelhető, hogy a myogen szatellitasejtek érrendszerrel kapcsolatban levő progenitorjai, amelyeket embriókban mesoangioblastoknak neveznek, felnőtt izomszöveti őssejtként, továbbra is szoros kapcsolatban maradnak az érrendszerrel. Ráadásul bizonyítást nyert, hogy a vázizom kötőszövetei elemei tartalmaznak mesenchymalis progenitor sejteket (Young et al. 2001).

Torrente és munkatársai (2001) izomeredetű őssejteknek (*Muscle Derived Stem Cells, MDSC*) nevezett őssejt populációt különítettek el újszülött izomból. Az MDSC sejtek mind a Sca-1, mind a *CD34*-et expresszálják, de a vázizom jellegzetes markerét, a *dezmint*, nem. Ez a populáció olyan sejteket tartalmaz, melyekből hematopoetikus sejtkolóniák jöhetnek létre in vitro. Amikor ezeket a sejteket artérián keresztül izomba injektálták, a sejtek először az endotheliumhoz kötődtek, majd a befogadó izomszövetbe vándoroltak, hogy ott részt vegyenek az izomrostok regenerációjában. Mások hasonló eljárással az izolált embrionális MDSC sejtek transzplantációt követő transzdifferenciációjáról számoltak be: a transzplantált sejtek vázizomsejtekké, gliasejtekké és endotheliális sejtekké fejlődtek.

Hasonlóképpen, FACS eljárás alkalmazásával felnőtt izomból CD34⁺/CD45⁻ frakciót tartalmazó myogen-endotél progenitor sejteket izoláltak. A sejtek Sca-1, c-met és BCRP1/ABCG2 pozitívak voltak, de endotheliális vagy myogen markerre (mint pl. CD31, Flk-1, MyoD vagy Myf5) negatívnak mutatkoztak. Kísérletekkel kimutatták, hogy e sejtek három sejtvonallá képesek differenciálódni: adipocitákká, endothel sejtekké, valamint myogen sejtekké. Ezek a sejtek a vázizom intersticiális üregeiben találhatók, és izomba ültetve endotheliális sejtekké és izomrostokká differenciálódnak. Mivel ezek a sejtek SP sejtmarkereket (BCP1/ABCG2) és Sca-1-et expresszálnak, az SP sejtektől Hoechstfestéssel és FACS analízissel különböztethetők meg. Érdekes módon, felnőtt vázizomból izolált Sca- $l^+/C45^-$ SP sejtek képesek adipocyták, osteocyták és myocyták létrehozására. Jiang és munkatársai (2002) nemrég adtak hírt mesenchymalis felnőtt progenitor sejteknek (Mesenchymal Adult Progenitor Cell, MAPC) nevezett pluripotens őssejtek felnőtt csontvelőből való elkülönítéséről. A MAPC sejtek számos markert hordoznak, azonban nem expresszálnak hematopoetikus vagy endotheliális markert mint pl. a CD45 vagy CD31. A MAPC sejtek sokféle sejtté képesek differenciálódni in vitro és in vivo. Ugyanez a csoport azonosított felnőtt izomban MAPC-szerű sejteket, melyek endotheliummá, idegsejtekké, gliasejtekké és májsejtekké képesek differenciálódni (Jiang et al. 2002). Romero-Ramos és munkatársai (2002) érdekes, pluripotens őssejtnek (*Pluripotent Stem Cell, PPSC*) nevezett őssejt-szerű sejteket különítettek el felnőtt vázizomból, és kimutatták, hogy a sejtek vimentinre pozitívak, de *CD45*-re negatívak voltak, és neurális őssejt marker nestin-pozitív szigeteket alkotnak. Ezek a PPSC-eredetű "szigetek" idegsejtekké, astrocytákká és oligodendrocytákká képesek fejlődni.

Így, a szatellitasejteken és hematopoetikus képességgel rendelkező $CD45^+$ sejteken kívül az izom számos más őssejtpopulációja képes részt venni az izomregeneráció folyamatában, bár az e sejtpopulációk közötti rokonsági viszony még tisztázásra vár. Az izom újabb őssejtpopulációi —mint pl. a $CD45^+$ MHPC sejtek és a $CD45^-$ mesenchymalis típusú sejtek— más felnőtt szövetben is gyakran előfordulnak (Asakura és Rudnicki, 2002; Jiang et al. 2002). Ennélfogva megengedhetjük azt a hipotézist, hogy minden felnőtt szövetnek van egy általános típusú őssejtje, mint pl. hematopoetikus és a mesenchymalis-szerű őssejtek, valamint progenitor-típusú őssejtek, mint pl. a vázizom szatellitasejtjei és a központi idegrendszer idegi őssejtjei (NSC). Az ilyen pluripotens őssejtek, a progenitor típusú őssejtekkel együtt felelősek a szövetgyógyulásért.

Lu és munkatársainak kísérlete (2003) ugyanakkor arra hívják fel a figyelmet, hogy nem csak sejteknek közvetlenül a gyógyítandó szövetbe való bejuttatására gondolhatunk. Izomeredetű őssejteket (MDSC) sejtmentes submucosa mátrixba ültettek, amit a sejtek hamarosan benépesítettek és az in vitro rendszerben izomkontrakció volt mérhető.

Végigkövetve az izomszövetben található számos őssejtpopulációt és az eddig velük végzett kísérletek eredményeit, világosan látszik, hogy sok még a tennivaló. Tisztázásra vár, hogy a különböző eljárásokkal, különböző eredményességgel izolált populációk —amelyeket szinte minden kutatócsoport más és más névvel illet—, valójában milyen származási kapcsolatban állnak egymással. Szükséges, hogy kiderüljön, mikor, milyen stádiumban, milyen eljárással és milyen hatékonysággal izolálhatók őssejtek a vázizomzatból. Ahogy az előzetes eredmények sejtetik, arra is szükség van, hogy a különböző izmok eltérő regenerációs kapacitását is megvizsgálják, és ennek figyelembevételével határozzák meg, mely izmok, izom-típusok szolgálhatnak megfelelő őssejtforrásul. Mindezeket egybevetve, számos vizsgálatra van még szükség a terápiás céllal történő izomszövet eredetű őssejtek klinikai alkalmazásáig.

5. Anyag és módszer

Az anyag és módszer fejezetben ismertetett oldatok pontos összetételét az M3 Melléklet tartalmazza.

5.1 Egérembriók nyerése és in vitro tenyésztése

5.1.1 A felhasznált egértörzsek és tenyésztésük

A kísérletekben felhasznált regértörzseket a Charles River Magyarország Kft (Budapest, Hungary) laboratóriumi állatokat előállító és forgalmazó cégtől vásároltuk. A kísérletek során felhasznált egértörzsek adatait a 6. táblázat tartalmazza.

Törzs neve	Stock Number	Szőrszín	Beltenyésztettség	Referencia
mstn ^{-/-} Hungarian Compact Subline (HCS)	nincs forgalomban ⁵	bézs	beltenyésztett (7. generáció)	Varga et al. 1997
C57Bl/6J	000664	fekete	beltenyésztett	www.jaxmice.jax.org
CBA/J	000656	aguti	beltenyésztett	www.jaxmice.jax.org
F1 (CBA♂xC57BL/6 ♀)	-	aguti	heterozigóta	saját keresztezés
Balb/C	000651	albino	beltenyésztett	www.jaxmice.jax.org
Tg(GFPU)5Nagy/J	003115 ⁶	aguti	beltenyésztett, transzgénikus egértörzs	www.jaxmice.jax.org
CD1	Crl: CD-1 (ICR) BR	albino ⁷	kültenyésztett	www.criver.com
NMRI	Crl: NMRI BR	albino	kültenyésztett	www.criver.com

6. táblázat. A kísérletekben felhasznált egértörzsek adatai

A miosztatin mutáns (*mstn-/-; HCS*) egerek hetedik generációjából 8 genoés fenotipizált alapító egyedet homozigóta *Egfp* transzgénikus törzzsel (*Tg(GFPU)5Nagy/J*) kereszteztük. Az így kapott F₁ heterozigóta *mstn^{+/-}/Egfp^{+/-}* egyedeket testvérpárosítottuk. A keresztezés eredményeként kapott utódokat egyedileg genotipizáltuk, Varga és munkatársai (1997) módszere szerint, PCR reakciót alkalmazva. A genotipizálást Dr. Varga László és munkacsoportja segítségével végeztük el. Az utódok *Egfp* genotípusát keresztezési tesztekben határoztuk meg – a homozigóták kontroll egyeddel történő pároztatás után mind EGFP expresszáns utódokat hoznak világra, míg a heterozigóták nem–. A genotipizálást követően kiválasztott *mstn^{+/+}/Egfp^{-/-}* alvonalat tovább tenyésztettük, mint kontroll csoportot, amelyet **mstn^{+/+}/C** névre kereszteltünk. Míg a miosztatin mutáns, *mstn^{-/-}/Egpf^{+/+}* alvonal új neve **mstn^{-/-}/Egfp^{+/+}** lett. Az így kialakított új egértörzseket beltenyésztési programban tenyésztettük tovább. Az itt leírt kísérletekhez a 4. 5. és 6. nemzedék egyedeinek embrióit és utódait használtuk fel.

⁵ Dr. Müller Géza (EGIS, Budapest) és Dr. Varga László felajánlása (MBK, Gödöllő)

⁶ Dr. Nagy András adománya (Mount Sinai Hospital, Torontó, Kanada)

⁷ black aguti gént hordoz az albino gén mögött

5.1.2 Embriók nyerése és in vitro tenyésztése

Az állatokat a megfelelő embriónyerés és szuperovuláltatás miatt 12 h világos (6:00-18:00), 12 h sötét (18:00-6:00) mesterséges fényprogram mellett tartottuk, a Kutatóközpont Állatházában, a vonatkozó előírásokat betartva (M7 Melléklet).

Szuperovuláció: Megfelelő mennyiségű embrió nyeréséhez az egereket szuperovuláltatni szükséges. A szuperovuláltatáshoz Hogan módszerét alkalmaztuk: a fényprogrammal összhanngban az állatok foszfát pufferben feloldott 5 NE vemhes kanca szérumgonadotropin (PMSG; Folligon[®], Intervet International B.V. Boxmeer, Holland), majd 48 óra múlva 5 NE humán koriogonadotropin (HCG; Werfachor®; Alverta und Werfft AG, Wien, Austria) injekciót kaptak. Egy egértől így átlagosan 25-30 embrió nyerhető (Nagy et al. 2003; 141-159. p.).

Preimplantációs korú embriók kimosása: Az embriók kimosása során Hogan módszerét követtük. A kiméra kísérletekhez a 2-8 sejtes stádiumú embriókat (1,5-2,5 d.p.c.), míg az ES sejtvonal alapítási kísérletek számára a blasztociszta stádiumú embriókat (3,5 d.p.c) nyertünk ki (Nagy et al. 2003; 161-208. p.).

In vitro tenyésztés: A kinyert embriókat Hogan módszere szerint, mikrocsep kultúrában, 37°C-on, 5% CO₂ koncentráció mellett, termosztátban (Heraeus BB6220 CU; Heraeus Instruments, Hanau, Germany) tenyésztettük. Az embriók fejlődési állapotát fénymikroszkópos vizsgálattal állapítottuk meg (Nagy et al. 2003; 161-208. p.).

5.1.3 Aggregációs kimérák készítése

A kíméra kísérleteket Nagy és munkatársai közleményében leírt protokoll szerint végeztük (1990; 2003, 453-506. p.). A kiméra kísérletek kivitelezését Dr. Gócza Elen laborvezető, Valer Bogdan Carstea PhD hallgató és Laczkó László szakdolgozó végezte Laboratóriumunkban.

5.2 Az ES sejtek tenyésztése

A sejttenyésztés egyik szükséges feltétele, hogy az egyes kísérletek ismételhetősége és az eredmények összehasonlíthatósága érdekében azonos sejtvonalakkal dolgozzunk. Így mind az embrionális fibroblaszt sejtekből, mind pedig az ES sejtek esetében nagy számú, azonos sejtvonalból származó, jellemzett klón került fagyasztásra és tárolásra (folyékony nitrogénben, -196 °C-on).

A sejttenyésztéshez használt speciális. ún. *tissue culture grade*, egyszer használatos műanyag esztközöket (pipetták, centrifugacsövek), tenyésztőedényeket, fagyasztó csöveket stb. a Greiner Bio-One cég hazai forgalmazójától szereztük be (Greiner Müanyagtechnika Kft; Mosonmagyaróvár, Hungary).

5.2.1 ES sejtek tenyésztése, fenntartása

Az ES sejtek számára ún. tápláló sejtréteget kell biztosítanunk, amely az ES sejtek letapadásához és növekedéséhez szükséges faktorokat szekretál, valamint megfelelő adhéziós felszínt biztosít a számukra. A tenyésztéshez egér-eredetű embrionális fibroblaszt (MEF) sejteket használtunk, melyeket 14 napos embriókból izoláltunk, Nagy és mtsai. módszere szerint (2003; 359-397. p.). Az így nyert primer fibroblaszt tenyészeteket felhasználásig aliquotokban, ampullázva, folyékony nitrogénben tároltuk.

A fibroblaszt nyeréséhez F_2 embriókat használunk fel, amelyeket (CBA $c_xC57BL/6$) F_1 egerek pároztatását követően nyertünk. A miosztatin mutáns egértörzseknél a saját törzs embrióiból izolált embrionális fibroblasztot használtunk. Az $mstn^{+/+}/C$ blasztociszta embriók számára $mstn^{+/+}/C$ anyák magzatait, míg az $mstn^{-/-}/Egfp^{+/+}$ embriók számára $mstn^{-/-}/Egfp^{+/+}$ anyák magzatait használtuk Az izolálás módszere megegyezett az F_2 fibroblaszt preparálásánál követett eljárással (Nagy et al. 2003; 359-397. p.).

Az ES sejtek tenyésztéséhez a fibroblasztot először osztódásában gátolni szükséges, ehhez mitomycin C antibiotikum kezelést alkalmaztunk. A MEF sejtek előkészítésekor 150 percig tartó 10 μ g/ml koncentrációjú mitomycin C (M4287, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA) kezelést alkalmaztunk, a tápoldathoz adagolva. A kezelést követően a sejteket $4x10^5$ sejt/ml koncentrációban szuszpendáltuk fel, majd az ES sejtek tenyésztéséhez használatos tenyésztőedényekbe helyeztük. Az így elkészített, osztódásban gátolt fibroblaszt sejtréteget 12 h múlva használtuk fel (Nagy et al. 2003; 371-375. p.).

A munkákhoz az egyik legszélesebb körben használt és jellemzett ES sejtvonalat használtuk, amelyet R1 néven Dr. Nagy András laboratóriumában alapítottak és jellemeztek, 1993-ban (Nagy et al. 1993). A sejtek tenyésztésbe vételekor a folyékony N₂-ből kivett és 37° C-os vízfürdőben felolvasztott sejtszuszpenziót ES tenyésztő tápoldattal (összetételét ld. M3 Melléklet) ötszörösére hígítjuk, majd centrifugacsőbe pipettázzuk. A folyadékot a fagyasztáshoz használt védőanyag (20% DMSO; D2650, Sigma) eltávolítása miatt lecentrifugáljuk (1200 rpm, 7 min, 4°C). A centrifugálás ideje alatt előkészítjük a mitomycin C-vel kezelt (sejtosztódásban gátolt) MEF sejtréteget az ES sejtek számára: a fibroblaszttenyésztő tápoldatot (FM) ES tenyésztő tápoldatra (EM) cseréljük a tenyésztőedényben. A lecentrifugált sejtekről a felülúszót eltávolítjuk Pasteur-pipetta és víz-lég szivattyú segítségével, majd a sejteket ES tenyésztő tápoldatban szuszpendáljuk fel. A sejtszám meghatározást követően a sejteket a kívánt sejtkoncentrációban az előkészített fibroblaszt rétegre tesszük és 37° C -on 5% CO₂ koncentráció mellett növesztjük (Nagy et al. 2003; 379. p.).

A sejtek normális kultivációja során a tápoldat 48 óránkénti cseréje szükséges. Az ES sejteket 50-75% konfluenciáig tenyésztjük, így elkerülhető kolóniák összenövése, a spontán differenciáció és sejtpusztulás. A megfelelő kolóniaméret és kolóniasűrűség elérését követően a sejtek új fibroblasztra történő átoltása (passzázs) szükséges. Az átoltást rutinszerűen minden harmadik napon el kell végezni. Átoltáskor a sejtek által elhasznált tápoldatot Pasteur-pipetta

segítségével távolítjuk el. Ezután a sejteket steril PBS oldattal mossuk, amely segít fellazítani a sejt-sejt közötti kapcsolatokat és eltávolítja a tápoldatból ott maradt savófehérjéket. sejtek szétválasztása tripszines kezeléssel történik, А szobahőmérsékleten, 5-8 percig. A tripszines kezelés hatására a sejtek lekerekednek, a fibroblaszt sejtekkel együtt elválnak a Petri-csésze aljától. Ezt követően 2 ml FM tápoldat hozzáadásával leállítjuk az emésztést és lecentrifugáljuk a sejteket (1200 rpm, 7 min, 4°C). Centrifugálás után a felülúszót eltávolítjuk, a sejteket ES tenyésztő tápoldatban szuszpendáljuk fel, majd a kívánt seitsűrűségben megfelelő tenyésztőedénybe, mitomycin C-vel kezelt fibroblaszt rétegre helyezzük. A sejteket 37°C-on 5 % CO₂ koncentráció mellett növesztjük (Nagy et al. 2003; 376-377. p.).

A kísérletekhez ar R1 sejtvonal #15 és #16 passzázsát, míg az ujjonnan alapított sejtvonalaknál a #10 és #11 passzázst használtuk fel.

5.2.2 ES sejtvonalak alapítása

Az ES sejtvonal alapítási kísérletekben a blasztociszta stádiumú embriókat 3,5 napos korban mostuk ki az anyaállatok méhből a korábban ismertetett módon. A kimosott embriókat ES sejtvonal alapító tápoldatba, mitomycin C-vel kezelt embrionális fibroblasztra helyeztük (összetételét és leírását lásd az Eredmények 6.1.2 fejezetben). A új sejtvonalak rutintenyésztését Nagy és munkatársai módszere szerint végeztük (2003; 359-397. p.).

5.3 Az ES sejtek differenciáltatása

5.3.1 Az EB csomók létrehozása

Az ES sejtek differenciáltatásához fontos, hogy a tápláló sejtréteg fibroblaszt sejtjeitől mentes ES szuszpenzióból induljunk ki. Ezért a differenciáltatást megelőző sejtpasszázs során az ES sejteket 0,1 % zselatinnal (Sigma: G9391) kezelt tenyésztőedényre szélesztjük, amely nem tartalmaz tápláló sejtréteget. A passzálás során az ES sejtek kultivációjakor ismertetett eljárást alkalmazzuk (Nagy et al. 2003; 376-377. p.).

Az ES sejtek differenciáltatásához Doetschman et al. (1985) ún. *függőcseppes aggregációs* módszerét alkalmaztuk. Ennek során a passzálásnál alkalmazott tripszines kezeléssel azonos módon egysejtes szuszpenziót készítünk az ES sejtekből, amelyet centrifugálást követően differenciáltató tápoldat (DM; összetétele ld. M3 Melléklet) ismert térfogatában (1 ml) szuszpendálunk fel, majd tripánkék (Sigma: T8154) festés segítségével meghatározzuk az oldat sejtszámát. A sejtszám meghatározását követően az oldatot $3x10^4$ sejtszámra hígítjuk DM oldat segítségével. Az így elkészített sejtszuszpenzióból 20 µl-es függőcseppeket helyezünk egy PBS-t tartalmazó bakteriológiai Petri-csésze fedelére (a PBS megakadályozza a Petri-csésze tetejére helyezett függő cseppek kiszáradását). Az így kialakított cseppeket két napig 37° C-on, 5% CO₂ koncentráció mellett termosztátban hagyjuk, hogy a sejtek csomókká formálódjanak. Két nap elteltével a sejtek azonos sejtszámot tartalmazó embrionális csomókká (EB csomókká) állnak össze.

A második napot követően az EB csomókat 8 ml DM tápoldatban bakteriális Petri-csészébe (Greiner) helyezzük, szuszpenziós kultúrába. Ilyenkor a tápoldat cseréje naponta történik a következők szerint: a sejteket pipettával egy centrifugacsőbe pipettázzuk, majd megvárjuk, amíg az EB csomók leülepednek a cső aljára (5 perc). Ezt követően Pasteur-pipetta segítségével eltávolítjuk az elhasznált tápoldatot és friss tápoldatba helyezzük az EB csomókat. A szuszpenziós tenyésztés során az ún. bakteriális Petri-csésze alkalmazása teszi lehetővé, hogy a sejtcsomók ne tapadjanak le, hanem mindvégig szuszpenzióban maradjanak. A 10 nap elteltével, zselatinnal kezelt tenyésztőedénybe helyezzük az EB csomókat és tovább differenciáltatjuk azokat.

5.3.2 ES sejtek differenciáltatása vázizom-sejtekké

Az ES sejtek vázizom irányú differenciáltatása során a fenti protokoll a következők szerint módosul. A függőcseppes aggregáltatáshoz DM tápoldatot használunk az első két nap. Amint az aggregálódott EB csomók szuszpenziós kultúrába kerülnek a tápoldatot izom differenciációs tápoldatra (DMM) cseréljük. A szuszpenziós kultúrában nyolc napig maradnak az EB csomók, napi tápoldatcsere mellett. Az EB csomók szuszpenziós kultivációját követően a sejteket 0,1% zselatinnal kezelt 24 lyukú tenyésztőedényre helyezve vizsgáljuk a differenciálódást. A vázizom prekurzor sejtek megjelenése a zselatinra helyezést követően 5 nappal várható, míg a teljes differenciálódás további 20-25 napot igényel.

Az ES sejtvonalak differenciációs kapacitásának vizsgálatához az EB csomókat 50-es csoportokban helyeztük 10 cm átmérőjű zselatinnal kezelt felületű Petri csészére. A differenciáltatáshoz az előzőekben közölt DMM tápoldatot használtuk ebben az esetben is. Az ES sejtek differenciációs képességének analíziséhez a kontrakciót mutató EB csomókat (D1 és D15 között), illetve a kialakult vázizom sejteket számoltuk le (D15 és D30 között). A differenciálódó sejteket fáziskontraszt mikroszkópia és Nomarsky interferencia segítségével analizáltuk. A differenciáltatás lezártával a sejteket fixáltuk és Hoechst festést alkalmazva (5.7.2 fejezet) igazoltuk a fáziskontraszt megfigyelések adatait.

5.4 Izomszövet őssejt tenyészetek

Az egér és szarvasmarha izomszövet eredetű szöveti őssejtek (más néven szatellita sejtek) izolálásakor és tenyésztésekor Shannon és munkatársai (2002) módszerének módosított változatát alkalmaztuk az alábbiak szerint. Az izoláláshoz 5 napos korú újszülött egereket illetve felnőtt (ivarérett) a szarvasmarhák izom biopsziáit használtuk (az izombiopszia vételét az 5.5.2 fejezet tartalmazza). Tenyésztő tápoldatként mindkét állatfajon F10 myoblast tápoldatot (F10-MGM; összetételét ld. M3 Melléklet) használtunk. Az osztódási fázisban a megfelelő

myoblast osztódási ráta elérését követően a tápoldatot fúziós tápoldatra (MFM; összetételét ld. M3 Melléklet) cseréltük az izomrostok kialakulásáig.

5.5 Primer sejttenyészetek

5.5.1 Primer egér izomszövet tenyésztés

A primer izomsejt kultúrákat (myoblast kultúrák) 10 hetes korú egerek hátulsó végtagjainak izomzatából készítettük, Freshney (2000, 240-242. p.) módszerét követve. Röviden: a hátsó végtagról az izmok eltávolítását követően, azok mechanikai aprítása, majd kollagenáz és diszpáz enzimes emésztés következett. Az így disszociáltatott sejtek 70 µm-es szűrőn átszűrve tenyésztő tápoldatba, majd kollagénnel kezelt felületű Petri-csészébe kerülnek tenyésztésre. A törmelék és fibroblaszt sejtek eltávolítása céljából 2 h elteltével a sejteket friss kollagénre helyezzük. Ezt a műveletet kétszer ismételjük, majd 24 h múlva tápoldatot cserélünk. A sejteken ezután 3 naponta tápoldatcsere következik. A tenyésztő oldatot Freshney módszerétől eltérően F10 tápoldatra cseréltük. Négy nap tenyésztést követően a sejtek fúziójához a tápoldatot differenciáltató tápoldatra cseréltük (MFM), melynek segítségével történik meg a sejtek fúziója és az izomfilamentek kialakulása.

5.5.2 Szarvasmarha izomszövet tenyésztés

Az izomszövet tenyészetek létrehozásához felnőtt állatokból biopszia segítségével vettünk izomszövetet. A biopsziákat tűbiopszia módszerével, biopsziavevő pisztollyal (Magnum, BARD; Tempe, AZ, USA) állatorvos végezte helyi érzéstelenítést követően. A biopszia a hátulsó végtag középső farizmából (*Musculus glutaeus intermaedius*) történt. A biopsziatű (*18g x 10cm, BardMagnum core tissue biopsy needle*) bevezetéséhez steril szikével ejtett bemetszést végeztünk, majd ezt követően a steril biopsziatűt az izomba szúrtuk kb. 6-8 cm mélyen. Az így vett biopszia egyedileg, steril szállító tápfolyadékba került (összetételt ld.: M3 Melléklet), 37°C-os hordozható termosztátba (G-83E; K-Systems-Kivex Biotech Ltd, Birkerød, Denmark).

A laboratóriumba érkezést követően az egér szatellita tenyészeteknél leírt izolálási módszert követtük, az alábbi módosításokkal. Az izolálás során szatellita és myoblast kultúrákat párhuzamosan izoláltunk. Ehhez először 100 µm membánt használtunk a szűrésnél. Az így kapott sejtpopulációt egy második 70 µm-es szűrésnek is alávetettük. A szűrőn fennmaradt sejtpopuláció törmeléket és myoblastokat tartalmazott, azokat kollagénnel kezelt Petri csészébe helyeztük, majd a már ismertetett *preplating* technikát alkalmaztuk négyszer ismételve azt. Így az ötödik populáció 10 h elteltével 98% tisztaságú myoblast populáció volt. A szatellita sejtek esetében a 70 µm-es szűrést követő populációt használtuk fel (5.4 alfejezet). A tápoldatok összetétele megegyezett az egér tenyészetek megfelelő tápoldataival, azzal a különbségel, hogy az F10 tápoldat bFGF koncentrációját 7 nM-ra növeltük.

Anyag és módszer



20. ábra. Izombiopszia vétel szarvasmarha farizmából (A) fehér-kék belga bika felhajtása mintavételhez, (B) mintavételi karám a kezelőfolyosón, (C) borotvával megtisztított, fertőtlenített felület a faron, (D) mintavétel, (E) mintavevő pisztoly, (E) biopszia tű és tűhüvely.

5.6 A Génexpresszió vizsgálata

5.6.1 Miosztatin gén szabályozó régiójának szekvencia szintű vizsgálata

Az egyes transzkripciós faktorok expressziójának vizsgálata előtt szükséges az adott transzkripciós faktor kötőhelyek vizsgálata a mutáns miosztatin génen. A szekvencia analízishez az egér genom publikált adatait haszáltuk fel. Az ún. BLAST Genom Adatbázis (www.ncbi.nih.gov/BLAST) egér genom szekvenciát tartalmazó adatbázisában a miosztatin gén ismert szekvenciájának segítségével (NM 010834) kiválasztottuk azon genomi contigot, amely a gén 5' és 3' határoló is tartalmazta (ref|NT 039170.1|Mm1 39210 30; Mus musculus régióit chromosome 1 genomic contig, strain C57BL/6J; Length = 53000532 bp). Az így azonosított 50 Mb méretű szekvenciából a kódoló régiót határoló 10 kb méretű upstream és 5 kb méretű downstream szekvenciát választottuk ki és vetettük analízis alá. Az analízishez a TRANSFAC 7.2 adatbázist (www.transfac.gbe.de) és a GenomeNet (www.genome.ad.jp/GenomeNet) 'MOTIF' sequence motif search software-t (http://motif.genome.ad.jp/) használtuk.

A TRANSFAC adatbázisnál a kötőhely központi szekvenciájának egyezését (*core similarity*) 1,0 értékben határoztuk meg (100%), míg a matrix egyezés értéket 0,9 (90%) állítottuk be. Így csak a valóban magas homológiát mutató szekvencia motívumok kerültek analízisre. Az elemzés során csak a gerinces adatbázis elemeit (*vertebrate matrix group*) alkalmaztuk.

A MOTIF programnál a gerinces szekvencia adatok (*vertebrate classification*) figyelembe vételével 0,85 (85%) azonossági értéken (*cut off scores*) vizsgáltuk a szekvenciákat.

5.6.2 Oligonukleotid primerek tervezése

Számos gén esetén az irodalomban közölt, sikeresen alkalmazot primert használtunk. Ezeket az M4 Melléklet 16. táblázat és 17. táblázatában tüntettük fel, irodalmi hivatkozásokkal. Azonban más gének esetében magunk terveztük az oligonukleotid primereket. Sambrook és mtsai (1989) kézikönyvének PCR primerekre vonatkozó utasításait szem előtt tartva, *Primer3* programmal végeztük a primerek tervezését (<u>http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi</u>). A vizsgálathoz felhasznált szekvenciák a GeneBank adatbázisából származtak (<u>http://www.ncbi.nih.gov/nucleotid</u>).

5.6.3 RNS preparálás

A génexpresszió vizsgálatához először mRNS preparálás szükséges. A szövettenyészetekből, embriókból és szövetekből TRI-reagens (Sigma: T9424) alkalmazásával vontuk ki az RNS frakciót, mindenben a gyártó utasítását követve. A minták gyűjtése a kísérletek alatt folyamatosan történt, míg a minták feldolgozása szakaszosan. A minták a gyűjtést követően szárazjégre, majd -70 °C-ra kerültek, ahol hónapokig tárolhatók feldolgozás előtt.

A tisztított RNS mintákat DEPC (Sigma: D5758) kezelt vízben (0,1 v/v% DEPC) eluáltuk, majd –70 °C-on tároltuk felhasználásig. A koncentráció meghatározásához spektrofotométert (Philips PU-8628 UV/VIS spectrophotometer; Philips Scientific, Cambridge, UK) használtunk.

5.6.4 Minták gyűjtése

A minták gyűjtése az ES sejtek korai differenciálódása során ható gének vizsgálatához 10 napon át, minden nap reggelén történ. A pluripotens ES sejtek szuszpenzióba helyezésekor gyűjtött minta D0-ként került megjelölésre.

A minták gyűjtése az ES sejtek izomszövet irányú differenciáltatása során a következő volt: D0: pluripotens ES sejtek szuszpenziójából gyűjtött minta, a függőcsepp készítés napján, a függőcseppekhez használt sejtszuszpenzióból. D5: 5. nap, szuszpenziós tenyészetből gyűjtve. D10: a zselatinra történő kihelyezés napja. Mintákat gyűjtöttünk továbbá a 13. (D13), 16. (D16), 19. (D19), 22. (D22), 26. (D26) és 29. (D29) napokon.

A kísérletekben a minták nagy számára való tekintettel csak az $mstn^{-/-}/Egfp^{+/+}2$ ES sejtvonalat, az $mstn^{+/+}/C7$ kontroll sejtvonalat és az R1 kontroll ES sejtvonalat differenciáltattuk. Negatív kontrollként 4 hónapos kontroll egerek agyszövetéből izolált total-mRNS-t használtunk. Minden gén esetében 3 paralellt analizáltunk, négy ismétlésben (összes mintaszám génenként:12).

5.6.5 RT-PCR analízis

Az RT-PCR reakció elvégzéséhez 'Titan One Tube RT-PCR Kit' (Roche Diagnostics, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland) reagenseket használtunk, a gyártó utasításának megfelelően. Az RNS templátból 1 µg total RNS-t mértünk a reakcióba. Az reakció elegy 50 µl térfogatú volt. A reakciót

Perkin Elmer 9600 thermocycler típusú PCR készülék (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc. Boston, MA, USA) segítségével végeztük az alábbi program szerint:

- Reverz transzkripció: 30 min, 42°C
- A Reverz Transzkriptáz enzim inaktiválása: 10 min, 95°C
- PCR amplifikáció (35 ciklus):
 - 30 sec 95°C (denaturálás)
 - 60 sec 60°C (primer feltapadás)
 - 90 sec 72°C (lánchosszabbítás)
- Végső lánchosszabbítás: 10 min, 72°C

A reakció ciklusszámát kísérletesen határoztuk meg. Eredményeink szerint a 35 ciklus futattása adta a legérzékenyebb eredményeket a PCR reakció exponenciális szakaszában. Az egyes gének termékeinek kimutatásához használt specifikus primerek szekvenciája az M4 Melléklet 16. táblázat és 17. táblázatban található.

A PCR reakcióban keletkező végtermékhez (50 μl-hez) 10 μl 6 x stop puffert adtunk, majd ebből az elegyből 20 μl-t 3 v/v% agaróz (Sigma: A9539), 1xTAE gélre vittünk fel. A futtatást 10V/cm² térerővel, SZBK-300 típusú gélelektroforézis készülékkel végeztük. Az elválasztás időtartama 120 perc volt. A gél a DNS fragmentek kimutatására 0,5 mg/ml etídium bromidot tartalmazott. Az elválasztás befejeztével a mintázat rögzítését Polaroid fotó készítésével végeztük. Ehhez a gélt UV fénnyel világító asztalra helyeztük, majd lefotóztuk. A fényképeket a jegyzőkönyvhöz csatoltuk.

Az amplifikált fragmentumok intenzitása vizuális megfigyeléssel történt. Az intenzitás alapján négy kategóriát állítottunk fel. Ezeket a kategóriákat a szürke különböző árnyalataival jelölve egy táblázatban összesítettük az adatokat. A színek kódolása a következőt jelenti:

fehér: génexpresszió nem detektálható;

- **világos szürke**: a detektált expresszió gyenge, intenzitása a belső kontroll (Rb7) intenzitásánál alacsonyabb;
- **sötét szürke**: a detektált génexpresszió a belső kontroll expressziós intenzitásának megfelelő;
 - **fekete**: a detektált génexpresszió a belső kontroll intenzitásánál erősebb.

5.7 A pluripotencia in vitro vizsgálata ES sejtekben

5.7.1 Immunhisztokémia

A szöveteket, sejteket 4 v/v% PFA fixálóban 15 percig fixáltuk. Ezt követően 3-szor 10 percig mossuk 1% BSA (Sigma: A3111), 0,1% Triton X-100 (Sigma: T4652) tartalmú PBS oldattal. A blokkolást 10 w/w% FBS-t tartalmazó PBS oldattal végeztük 1 órán át. Az immunfestéshez egért monoklonális SSEA-1 primer ellenanyagot használtunk (Hybridoma bank: MC-480; Developmental Studies Hybridoma Bank University of Iowa, Iowa City, IA, USA) 1:200 higításban, 1% BSA, 0,1% Triton X-100 tartalmú PBS oldatban, egy éjszakán keresztül, 4°C -on inkubálva. Másodlagos ellenanyagként nyúl anti-egér IgM-Cy3 konjugátum ellenanyagot használtunk (Cat.No:315-165-020; Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. Cambridgeshire, UK) 1:200 higításban, szobahőmérsékleten, 1 órát inkubálva. A mintákat fluoreszcens inverz mikroszkóp alatt analizáltuk, BP530-550 nm excitációs és BA590 nm barrier filtert használva (IMT-2 Olympus; OLYMPUS Europa GmbH, Hamburg, Germany).

5.7.2 Hoechst festés

Hoechst 33342 (Bis-Benzimide, Sigma: B2261) festék alkalmazásával a sejtmag kromatintartalma láthatóvá tehető. A Hoechst festék a DNS AT-gazdag régiójához kötődik a DNS kis árkában, így UV fénnyel való megvilágításkor (351-364 nm hullámhosszon) fényesen kék színnel fluoreszkál 465 nm hullámhosszon. A festéshez a sejteket 2x PBS mosást követően PBS-ben oldott 1 μ g/ml koncentráciújú Hoechst festékkel festettük 5 percig. Ezt követően a felesleges festéket kimostuk PBS oldattal, majd PBS oldatban a sejteket azonnal fotóztuk.

5.7.3 Alkalikus foszfatáz aktivitás detektálása

Az alkalikus foszfatáz aktivitás vizsgálatához Hogan eljárását alkalmaztuk (Nagy et al. 2003, 359-397. p.).

5.7.4 Kariotípus analízis

A sejtvonalak normális kromoszómaszerelvényének vizsgálatához kariotípus analízist végeztünk, Robertson (1987, 102-104. p.) ES és fibroblaszt sejtekre leírt módszerét követve, Giemsa festést alkalmazva.

5.7.5 Ivar meghatározása ES sejteken PCR eljárással

A sejtvonalak ivarának meghatárosáhához PCR eljárást alkalmaztunk. Az eljárás során X- (mZfx) és Y- (mZfy) kromoszóma specifikus szekvenciák kimutatását végeztük, autoszómális kontroll (mHprt) szekvencia amplifikációval párhuzamosan. A felhasznált primerek adatait az M3 Melléklet 18. táblázat tartalmazza. A PCR reakciót 25 µl reakcióelegyben végeztük, melynek végkoncentrációja a következő volt: 1x PCR pufferben (Promega; Promega Corporation, Madison, USA) 1 mM MgCl₂ (Promega), 0,4 mM dNTP (each, Promega), 1 pM specifikus primer (each, Promega), 1U Taq polimeráz enzim (Promega), 20ng genomiális DNS. A reakciót Perkin Elmer 9600 thermocycler típusú PCR készülék segítségével végeztük az alábbi program szerint:

- PCR amplifikáció (30 ciklus):
 - 30 sec 95°C (denaturálás)
 - 45 sec 60°C (primer feltapadás)

60 sec 72°C (lánchosszabbítás)

Végső lánchosszabbítás: 10 min, 72°C

Az így kapott minták analízisét gélelektroforézissel végeztük A PCR reakcióban keletkező végtermékhez (25 µl-hez) 5 µl 6 x stop puffert adtunk, majd ebből az elegyből 20 µl-t 2 v/v% agaróz 1xTAE gélre vittünk fel. A futtatást 10V/cm² térerővel SZBK-300 típusú gélelektroforézis készülékkel végeztük. Az elválasztás időtartama 80 perc volt. A gél a DNS fragmentek kimutatására 0,5 mg/ml etídium bromidot tartalmazott. Az elválasztás befejeztével a mintázat rögzítését Polaroid fotó készítésével végeztük. Ehhez a gélt UV fénnyel világító asztalra helyeztük, majd lefotóztuk. A fényképeket a jegyzőkönyvhöz csatoltuk.

5.8 Morfológiai izomszövet vizsgálatok

Fénymikroszkópos hisztotechnika 5.8.1

A paraffinos beágyazáshoz a mintákat 6-6 db, 16 hetes hím állat (kontroll és mutáns) izmainak fixálásával biztosítottuk. Az izmok kivétele az eredettől a végződésig történt és teljes egészében került fixálásra. A vizsgálatban mindig a végtagok izmait használtuk fel (m. gastrocnemius, m. gluteus magnus, m. triceps femoris, m. biceps femoris), mégpedig mindig a bal oldali izmokat metszve, a jobb oldaliakat pedig párhuzamos, mintaként eltéve.

Az analízist az Országos Gyógyintézeti Központ, Patológiai Osztályán végeztük, Krutsay módszertani gyűjteményének megfelelő receptjeit használva (1999). Mivel a hipertrófiás izom eltér a normál izomtól, így a szövet rögzítésekor hagyományos, izomszövet rögzítésre alkalmazott eljárás а az anyag megkemnvedését és töredezését vonta maga után. Így számos szövetrögzítési módszer kipróbálását követően a következő módszert találtuk alkalmasnak a hipertrófiás izom rögzítése számára, parafinos beágyazáshoz:

- 24 h 4% PFA fixálás \geq
- \triangleright 30 min csapvizes kimosás
- Víztelenítés:
- 10 min 30% etanol ۶
- \triangleright 1 h 50% etanol
- 10 min 70% etanol I
- 30 min 70% etanol II
- 10 min 90% etanol
- 30 min abs etanol I
- 30 min abs etanol II
- 20 min metilbenzoát I
- 2 h metilbenzoát II
- 30 min Xilol I
- 40 min Xilol II
- 30 min Xilol és paraplast 1:1 arányú keveréke
- AAAAAAAAAAAAAA 2 h paraplast I
 - 6 h paraplast II
 - kiágyazás és orientálás műanyag hisztológiai kazettában

A Paraplast kiágyazást követően a metszeteket Mikrom HM 400 típusú (Microm International GmbH, Walldorf, Germany) mikrotómmal metszettük 10 µm metszetvastagsággal, majd szilanizált tárgylemezre vettük fel. A metszetek rutin deparaffinálását követően Krutsay leírásai szerint végeztük a speciális festéseket (1999). A szövetek általános áttekintéséhez hematoxilin-eozin festést (*ibid.* 148-150. p.) alkalmaztunk. A sejtmagok és a nukleinsavak feltüntetésére metilzöld-pironin eljárást használtunk (*ibid.* 158. p.). Az izomszövet differenciál festéséhez több eljárást alkalmaztunk: így a harántcsíkolat feltüntetésére vashematoxilin-, (*ibid.* 174-175. p.); a kollagénrost feltüntetésére azan-festést (*ibid.* 177-179. p.), és Van Gieson-festést (*ibid.* 176-177. p.) használtunk. A szarkoplazma és kötőszöveti állomány feltüntetésére ezüst impregnációt alkalmaztunk (*ibid.* 179-180. p.).

5.8.2 Elektronmikroszkópia

A minták vétele és kezelése a paraffinos beágyazásnál ismertetett eljárás szerint és történt. Mintákat a *m. gastrocnemius* és *m. biceps femoris* izmokból vettünk a vizsgálatokhoz, 6-6 állatból.

A minták elektronmikroszkópos analízisét az Országos Gyógyintézeti Központ Patológiai Osztályának Elektronmikroszkópos Laboratóriumánban végeztük. A minták feldolgozása és értékelése az Osztályon rutinszerűen alkalmazott eljárás szerint történt (Kiszely és Barka 1958, 37-45. p.). A minták előkészítését és metszését Truszka Ferencné szakaszisztens végezte. A félvékony metszeteket Reichert gyártmányú OM-U3 típusú ultramikrotómmal készítettük. A minták hisztopatológiai értékelését Dr. Arató Gabriella patológus főorvos, elektronmikroszkópos laborvezető végezte, Philips CM10 típusú transzmissziós elektronmikroszkóppal.

5.8.3 Izom filament tipizálás és morfometriai értékelés

A morfometria vizsgálatokhoz 10 db kontroll és 10 db *mstn^{-/-}*, 14-16 hetes hím állatot használtunk fel. A vizsgálatokhoz négy izmot választottunk ki, azok filament típusa és testtájak szerinti megoszlásának megfelelően (*m. biceps femoris, m. gastrocnemius, m. masseter, m. pectoralis*).

A mintavételt a következők szerint standardizáltuk: amikor csak lehetett a teljes izmot kipreparáltuk és kiemeltük az állatból az izom eredetétől a végéig, majd annak hosszanti tengelyére merőlegesen az izmot középen félbevágtuk, hogy keresztmetszeti síkot képezzünk. A mintákat folyékony nitrogénnel hűtött izopentánban fagyasztottuk, majd fagyasztó ampullákban izopentán alatt tároltuk -70 °C-on felhasználásig. A mintákat 3 héten belül feldolgoztuk, 10-12 μm vastagságú fagyasztott metszeteket készítve, MICROM típusú kriosztáttal (MICROM Gmbh, Heidelberg, Germany). A metszeteket szobahőmérsékletű tárgylemezre vettük fel, majd szobahőmérsékleten a tárgylemezre szárítottuk 30 perc alatt. A metszeteket ez után küvettákban -20 °C-on, hűtőszekrényben tároltuk felhasználásig.

A tetrazólium reduktáz (NADH-TR) festést Pearce (1972; 154. p.) módszere szerint végeztük. A vörös (lassú), a fehér (gyors) és intermedier filamentek értékeléséhez Dubovitz (1985) közleményét követtük.

A mutáns ($mstn^{-/-}/Egfp^{-/-}$) egyedek izmaiból készített metszeteket a kontroll törzs ($mstn^{+/+}/C$) megfelelő izmaiból készített metszetekkel hasonlítottuk össze. A különböző rosttípusok időnként egyenlőtlen eloszlást mutattak az egyes vizsgált izmokban. Ezért az egyes izmokon végzett festéseket követően mikroszkópos felvételeket készítettünk az izmok keresztmetszeti képéről, majd a rostokat a fényképeken számoltuk meg. Az összes rost számát 100%-nak véve, a rosttípusokat az összes rost százalékában adtuk meg.

Ahhoz, hogy az egyes rostok arányának változását meg tudjuk határozni, az egyes rostok területét, illetve területének változását hasonlítottuk össze. Ehhez öt random kiválasztott mikroszkópos felvételt választottunk ki minden izom esetében, amelyet felnagyítottunk, majd az egyes rostokat körberajzoltuk a felvételeken. Az így kijelölt és digitalizált területeket számítógépes szoftver segítségével (Scion Image, Win-Release Beta 3b) analizáltuk és meghatároztuk az átlagos rosttátmérőt. Az adott izomra vonatkoztatott teljes terület (vagyis az egy rosttípus által képviselt terület) az alábbi képlet szerint került kiszámításra minden egyes izom és rosttípus esetében. A képlet az I-es típusú rostoknál használt számítást példázza:

$$C_{1} = \frac{A_{1} x N_{1}}{A_{1} x N_{1} + A_{2} x N_{2} + A_{3} x N_{3}}$$

21. ábra. Rosttípus területi megoszlásának számítása

Ahol:

- C₁: a kontroll %-ában kifejezett rosttípus hányad a teljes rossterületre vonatkozóan;
- A1, A2 és A3 az átlagos rosttátmérő (μm² ±SE) az egyes rosttípusokra vonatkoztatva, ahol (1) az I-es típust; (2) az intermedier és (3) a II-es típust jelöli.
- N1, N2, N3 az egyes rostok részarányát jelöli a kontroll izom teljes rosstszámának %-ában.

Az adatok a három rosttípus részarányát a teljes keresztmetszethez viszonyítva adják meg a különböző izmokra vonatkoztatva.

A kísérletben az ELTE Állatszervezettani Tanszékén a metszetek készítését Pálfia Sára szakaszisztens, a metszetek számítógépes analízisét Pálfia Zsolt, míg a morfometriai képlet kidolgozását Dr. Réz Gábor végezte.

5.8.4 Tömegmérési kísérletek

A tömegmérési kísérleteket Sartorius laboratóriumi mérlegen (Sartorius Gmbh, Göttingen, Germany) végeztük, az alábbiak szerint:

Születéskori alomtömeg: születést követő 24 h múlva a teljes alom tömegét lemértük, majd az egyedszámot feljegyeztük és kiszámítottuk az átlagos egyedi tömeget.

Születéskori korrigált alomtömeg: tapasztalataink szerint átlagosan 8 utód születése várható el egy alomban, így a korrigált alom mérésekhez az almokat kiegyenlítettük, vagyis a számon felüli utódokat a születést követő napon elvettük az anyáktól és kiírtottuk azokat, vagy a nyolc utódnál kevesebb utódot ellő anyákhoz dajkásítottuk. Ezt követően a nyolc utód tömegét együttesen mértük, majd átlagos egyedi tömeget számoltunk.

Választáskori alomtömeg: a kiegyenlíett, vagyis azonos létszámú almokat a választáskor (21. nap) mértük, teljes alomtömegre, majd számítással határoztuk meg az átlagos egyedi tömegeket. A méréshez kisméretű kartondobozt használtunk, mert az állatok a sötét dobozban nyugodtak maradtak, így könnyebben lehetett megmérni a tömegüket.

Felnőttkori testtömeg: 16 hetes korban mértük egyedileg az utódokat és rögzítettük tesstömegüket. A felnőttkori mérést cervikális diszlokációt követően végeztük. Az utódok izmait a mérést követően preparáltuk és egyedi izomtömeg méréseket végeztünk. A mérésekhez felhasznált izmokat a továbbiakban RNS preparáláshoz, és a hisztopatológiai vizsgálatokhoz egyaránt felhasználtuk, az egyes vizsgálatoknál részletezett módon.

A testtömeg mérési kísérleteket Nagy Veronika és Licskó Adrienn szakdolgozók végezték.

A tömegmérési kísérletekben nem csak az egyedek tömegét, hanem izomtömeget is meghatároztunk. Az izomtömeg mérési kísérletekben több izom (*m. gastrocnemius, EDL, m. vastus lateralis, m. biceps brachii, m. extensor carpi ulnaris, m masseter*) tömegét határoztuk meg, a paraffinos beágyazásnál ismertetett preparálási elv szerin. A mérésnél 10-10 db 16 hetes korú hím egyedet vizsgáltunk. A mérési kísérletekhez mindig mindkét oldali izom tömegét megmértük és külön adatként rögzítettük. A méréshez ebben as esetben is Sartorius laboratóriumi mérleget használtunk.

5.9 Statisztikai analízis

Statisztikai analízishez az INSTAT programcsomag (GraphPad Software, V2.05) Fischer tesztet (*Fischer's exact-test*) és khi-próbát (χ^2 test) alkalmaztunk. A próbáknál a konfidencia intervallumot 95%-ban határoztuk meg.

6. Eredmények

6.1 Embrionális ős-sejtvonalak alapítása mstn^{-/-} mutáns egértörzsből

6.1.1 Keresztezések

A munka megkezdéséhez először megfelelő számú és genetikailag jelölt állatot kellett létrehozni a kísérletek számára. A keresztezésre azért volt szükség, mert a miosztatin mutáció által okozott fenotípus igazán jól csak felnőtt egyedeken látható. A genotípust egyértelműen azonban csak a 12 bp-os deléció genetikai vizsgálatával lehet bizonyítani. Ha azonban valamilyen más, embrionális korban is detektálható tulajdonsággal összekapcsoljuk, akkor szövettenvészetekben egyszerűbb és gyorsabb a mutáció nyomon követése. Amennyiben egy homozigóta miosztatin mutáns és egyben Egfp transzgénikus törzset hozunk létre, úgy a tenyészetekben a mutáns állatokból származó sejtek és azok leszármazottai zölden fluoreszkálnak. Ugyanígy, kiméra kísérletekben a zöld fluoreszcencia nyomon követésével azonosíthatók a miosztatin mutáns sejtek. Az Anvag és módszer fejezetben ismertetett egértörzsek felhasználásával a nyolc, miosztatin mutáns alapító egyedet Egfp transzgénikus törzzsel kereszteztük, majd a már leírt módon új törzseket hoztunk létre (5.1.1 alfejezet) és beltenyésztettük azokat.

6.1.2 Sejtvonal alapítás

sejtvonal alapítási kísérletekhez kidolgoztunk egy kondícionált А tápoldaton alapuló eljárást. A jól jellemzett, R1 ES sejtvonallal kondícionáltuk az ES tenyésztő tápoldatot. Az EM tápoldat összetételét nem változtattuk meg a kondícionált tápoldat előállítás során. A tápoldatot 24h kultivációt követően gyűjtöttük a passzázst követő első és második napon az aktívan osztódó sejtekről, 70% konfluencia eléréséig. Azt követően a sejteket tovább oltottuk, vagy abbahagytuk a tápoldat gyűjtését. A kondícionált tápoldatot centrifugálást követően (5 min, 2500 rpm, 4°C) 0,22 μm-es steril szűrőn (Millex, Millipore; Billerica, MA, USA) átszűrtük és felhasználásig 4°C-on tároltuk. A tápoldatot nem közvetlenül használtuk fel, hiszen az ES sejtek a tápoldatba nem csak növekedési faktorokat és hormonokat választanak ki, hanem annak amimosav- és cukortartalmát el is használják. Másrészt a tenyésztési hőmérsékleten az antibiotikumok, a Na-piruvát, a NaHCO₃ és az aminosavak önmagukban is gyorsan bomlanak. Így ezek pótlása elengedhetetlen a sikeres temyésztéshez. Ezért a kondícionált ES sejtvonal alapító tápoldatot (továbbiakban CEM= conditioned ES medium) a következők szerint állítottuk össze: az EM tápoldat LIF tartalmát 2000 U/ml-re, míg az FCS-t 20v/v%-ra növeltük. Az így kapott tápoldatot 1:1 arányban vegyítettük a gyűjtött, kondícionált tápoldattal.

A hagyományos ES sejtvonal alapítási módszert a következők szerint módosítottuk:

- A 3,5 napos blasztociszta embriókat nem vettük *in vitro* tenyésztésbe mikrocsepp kultúrában, hanem a kimosás napján mitomycin C-vel kezelt első passzázsú egér embrionális fibroblasztra (továbbiakban MEF) helyeztük CEM tápoldatba, 24-lyukú tenyésztőedényben. A tápoldatot a blasztula letapadásáig nem cseréltük.
- Az ICM növekedés 3. és 4. napján mechanikus-tripszines átoltást végeztünk, első passzázsú mitomycin C-vel kezelt MEF sejtrétegre.
- > Az ES-szerű kolóniák megjelenéséig kétnaponta cseréltük a tápoldatot.
- Legalább 10 napot vártunk a kolóniák megjelenéséig.
- A megjelenő ES kolóniákat mechanikus-tripszines átoltással 12-lyukú tenyésztőedényben, mitomycin C-vel kezelt, első passzázsú MEF sejtrétegre helyeztük CEM tápoldatban.
- A megfelelő kolóniaszám elérését követően 6 cm-es Petri-csészébe tettük át a sejteket. Ezt neveztük el első passzázsnak. Az első fagyasztást szintén e tenyészetekből végeztük.
- A sejtvonal klónozását a második passzázsban, de legkésőbb a harmadikban végeztük el.
- A sejtvonalakat az első 4-5 passzázsig CEM tápoldatban tenyésztettük, majd folyamatosan "szoktattuk" vissza ES tápoldatra.

A CEM tápoldat alkalmazásával végzett miosztatin mutáns ES sejtvonal alapítási kísérletek összesített adatait a 7. táblázat tartalmazza. Az eljárással 5 miosztatin mutáns ($mstn^{-/-}/Egfp^{+/+}$) és 2 kontroll ($mstn^{+/+}/Egfp^{-/-}$) sejtvonalat alapítottunk. Ezek közül három mutáns sejtvonalat ($mstn^{-/-}/Egfp^{+/+}1$; $mstn^{-/-}/Egfp^{+/+}2$; $mstn^{-/-}/Egfp^{-/-5}$) és egy kontroll ($mstn^{+/+}/C7$) vonalat választottunk ki, és vizsgáltuk meg részletesen azok pluripotenciáját. A sejtvonalak analízisekor a miosztatin mutáció genotipizálását újra elvégeztük a sejteken (22. ábra), amelynek kivitelezéséhez Dr. Varga László és kutatócsoportja nyújtott segítséget.

7. táblázat. ES sejtvonal alapítás eredmények R1 kondícionált médium alkalmazásával, mstn^{-/-} és kontroll egértörzsekből

Egértörzs	mstn ^{-/-} /Egfp ^{+/+}	mstn ^{-/-} /Egfp ^{-/-}	mstn ^{+/+} /Egfp ^{-/-}
Felhasznált embriók száma (db)	64	48	48
Kitapadt ICM (% ⁸)	60 (94)	46 (96)	45 (94)
ICM kolóniák megjelenése (% ⁷)	50 (78)	29 (60)	38 (79)
ES-szerű kolóniák megjelenése (% ⁷)	31 (48)	19 (40)	21 (44)
ES- sejtvonalak (% ⁷)	4 (6)	1 (2)	2 (4)

 $^{^{8}}$ A zárójelben közölt értékek mindig a kísérletben felhasznált embriószámra vonatkoztatott %-os értékek



22. ábra. Miosztatin mutáns sejtvonalak genotipizálása Varga és mtsai szerint (1997) 1: mstn^{-/-} kontroll genomiális DNS, 2: mstn^{+/+} kontroll genomiális DNS, <u>Tipizált minták</u> 3: mstn^{+/-}, 4: mstn^{+/+}, 5: mstn^{+/-}, 6: mstn^{-/-}, 7: mstn^{+/-}, 8: mstn^{-/-}, 9: mstn^{-/-}, 10 mstn^{+/+}, 11: mstn^{+/+}

6.1.3 A kondícionált tápoldat hatásának vizsgálata más egértörzseken

Ahogy említettük, a miosztatin mutáns egerek 129SV génhányadot is hordoztak. Így a fenti eredmények önmagukban a kifejlesztett módszer és tápoldat hatásosságát nem képesek bizonyítani. Ezért a tápoldat tesztelésére a vizsgálatokat más egértörzsekre is kiterjesztettük. A kísérletekben F2; CBA; BalbC és NMRI embriókat vizsgáltunk (törzsek leírását ld. részletesen: 5.1.1 alfejezet). A kondícionált tápoldat és módosított ES alapítási eljárást Robertson (1987) klasszikus módszerével hasonlítottuk össze. A kondícionált médium alkalmazásával sikeresen hoztunk létre non-permisszív egértörzs embrióiból is ESsejtvonalakat. Az eredményeket a 8. táblázat és a 9. táblázat tartalmazza.

8. táblázat. ES sejtvonal alapítási eredmények Robertson módszerének alkalmazásával

Egértörzs	129SV	F2 ⁹	CBA	BalbC	NMRI
Felhasznált embriók száma (db)	45	180	18	36	24
Kitapadt ICM (% ¹⁰)	39 (86)	164 (91)	14 (78)	28 (78)	22 (92)
ICM kolóniák megjelenése (% ⁸)	27 (60)	76 (46)	2 (11)	10 (28)	6 (27)
ES-szerű kolóniák megjelenése (% ⁸)	14 (31)	43 (26)	0	1 (3)	3 (14)
ES- sejtvonalak (% ⁹)	0	0	0	0	0

9. táblázat. ES sejtvonal alapítási eredmények CEM tápoldat és módosított ES sejtvonal
alapítás alkalmazásával

Egértörzs	129SV	F2 ⁷	СВА	BalbC	NMRI
Felhasznált embriók száma (db)	48	96	33	50	24
Kitapadt ICM (% ⁸)	45 (94)	92 (96)	32 (97)	48 (969	22 (92)
ICM kolóniák megjelenése (% ⁸)	38 (79)	52 (57)	13 (39)	22 (46)	15 (68)
ES-szerű kolóniák megjelenése (% ⁸)	19 (40)	37 (32)	7 (21)	13 (27)	12 (55)
ES- sejtvonalak (% ⁸)	3 (6)	2 (2)	2 (6)	3 (6)	4 (17)

⁹ F1xF1 egyedek keresztezésével előállított embriók

¹⁰ A kísérletben felhasznált teljes embriószámra vonatkoztatott %-os értékek

6.2 Az új sejtvonalak pluripotenciájának vizsgálata

A sejtvonalak pluripotenciáját a 4.5 alfejezetben felsorolt tényezők vizsgálatával végeztük. A szelektált sejtvonalak vizsgálatakor először a sejtvonalak euploídia fokát határoztuk meg kromoszómaszám meghatározással, Giemsa festést alkalmazva. A kariotípus analízise során a sejtvonalak ivarát is meghatároztuk PCR segítségével (10. táblázat). A sejtvonalak között csupán egyetlen nőivarú vonalat találtunk ($mstn^{-/-}/Egfp^{-/-5}$), minden más sejtvonal hímivarúnak mutatkozot.

10. táblázat. Az ES sejtvonalak kariotípusa és euploídia százaléka

Sejtvonal	Ivar	Euploidia (%)
mstn ^{-/-} Egfp ^{+/+} 1	δ	76%
mstn ^{-/-} Egfp ^{+/+} 2	8	82%
mstn ^{-/-} /Egfp ^{-/-} 5	Ŷ	73%
mstn ^{+/+} /C7	3	75%
СВА	ð	69%
F2	ð	61%
R1	3	81%

Ezt követően az ES sejtek sejtfelszíni marker expresszióját vizsgáltuk SSEA-1 immunfestéssel. Detektáltuk az alkalikus foszfatáz (AP) aktivitást az enzim aktivitásának kimutatására szolgáló reakció segítségével, majd megvizsgáltuk az Oct-4 transzkripciós faktor aktivitását. Minden vizsgált sejtvonal pozitívnak bizonyult mindhárom markerre nézve. A 23. ábra az egyik sejtvonal részletes vizsgálati eredményeit szemlélteti.



23. ábra. Pluripotencia-vizsgálat mstn^{-/-}Egfp^{+/+2} ES sejtvonalban (A) Egfp expressziót mutató ES kolóniák fluoreszcens mikroszkóp alatt (méretvonal: 500 μm); (B) AP pozitív ES kolónia (méretvonal: 25 μm); (C) SSEA-1 immunfestés pozitív ES kolónia (méretvonal: 25 μm); (D) kromoszóma szerelvény Giemsa-festéssel (méretvonal: 5 μm); (E) ES-diploid embrió kiméra blasztociszta stádiumban, beültetés előtt, ahol az ES eredetű sejtek az Egfp expresszió alapján jól elkülöníthetőek (méretvonal: 20 μm); (D) újszülött kiméra egyedek.
A sejtvonalak pluripotenciáját az irodalmi áttekintésben részletesen tárgyalt okok miatt kiméra kísérletekben kellett bizonyítanunk. Így a sejtvonalakat ES—diploid embrió aggregációs kiméra kísérletben teszteltük a kiméra-képző képességet, majd pedig az ivari kimérizmust. Az eredményeket a 11. táblázat tartalmazza.

ES sejtvonal	Gazda- embrió törzse	Beültett embriók (db)	Újszülött (db)	Újszülött/ Beültetett (%)	Kiméra (db)	Kiméra/ beültetett (%)	Kiméra/ megszületett (%)	Ivarsejt- kiméra
mstn ^{-/-} /Fafn ^{+/+} 1	CD1	118	31	26,3	11	9,3	35,5	+
mstn /Egip i	F2	240	73	30,4	11	4,6	15,1	+
mstn ^{-/-} /Egfp ^{+/+} 2	F2	138	60	43,5	11	8,0	18,3	+
mstn ^{+/+} /C7	F2	27	13	48,1	0	-	-	-
СВА	CD1	72	16	22,2	5	6,9	31,3	+
F2	CD1	26	4	15,4	0	-	-	-
R1	CD1	13	4	30,8	1	7,7	25,0	+

11. táblázat. Az ES-diploid embrió kiméra aggregációs kísérletek eredményei

Eredményeink szerint a kiválasztott sejtvonalak közül csak az F2 és az mstn^{+/+}/C7 ES sejtvonalnál nem tudtuk az ivari kimérizmust bizonyítani az aggregációs kiméra kísérletekben. Minden más vizsgált sejtvonalnál ivarsejt kimérákat kaptunk. A kimérizmus aránya azonban eltérést mutatot az egyes sejtvonalak között. Az R1 sejtvonalhoz hasonló kimérizmus gyakoriságot mutatott az mstn^{-/-}/Egfp^{+/+}2 sejtvonal, míg azt R1 kiméraképző képességét jóval meghaladó értéket detektáltunk az *mstn^{-/-}/Egfp^{+/+}1* és CBA sejtvonalaknál. Az *mstn^{-/-}/Egfp^{+/+}1* sejtvonalnál a kiméraképzés azonban erősen gazdaembrió függőnek bizonyult: az F2 partner csökkent kimérizmust eredményezett a CD1 gazdaembrió partnerhez viszonyítva (11. táblázat).

6.3 A törzsfüggőség genetikai okának vizsgálata

A vizsgálatokba az Oct-4 kaszkádban szerepet játszó géneket vontuk be, úgymint az Oct-4, Sox2, Rex-1, Utf-1, Fgf4, valamint két, a pluripotencia biztosításában szerepet játszó gént: a LIF faktor receptorát (LifR), és a szeneszcencia kialakításában fontos telomeráz-reverz transzkriptáz gént. A vizsgálatokat a sejtvonalak 10 napig tartó LIF-megvonásos differenciáltatásával végeztük. A differenciáltatás során a sejtek 2 napig függőcseppben, majd 8 napig szuszpenzióban voltak. A mintákat szemikvantitatív RT-PCR eljárással analizáltuk. Belső kontrollként Rb7 primert használtunk.

Az Oct-4 expressziós mintázata a differenciáció alatt az összes sejtvonalban nagyon hasonló volt. Differenciálódott sejtekből (fibroblasztból) hiányzott, megtalálható volt viszont a nem-differenciálódott sejtekben (pl: ES sejtek). A transzkriptum mennyisége a differenciáció első négy napjában csökkent, és az ötödik napon a differenciálódó EB csomókban már nem volt kimutatható. Az embriókban és az ICM-ben az Oct-4 jelen volt, ami korábbi kísérletekben már kimutatásra került. Az Oct-4 expressziós szintje az F2 és CBA sejtvonalakban magasabb szintet mutatott, mint az R1 sejtvonalban (24. ábra).

A Sox2 mRNS szintjének enyhe csökkenése volt észlelhető az R1, valamint az $mstn^{-/}/Egfp^{+/+}2$ sejtek differenciációja során, míg egyéb sejtvonalak esetében jelentős csökkenést nem lehetett megfigyelni. A Sox2 expressziójának csökkenése ellenére a transzkriptum összes mennyisége jelentősen magasabb volt mint az Oct-4 traszkriptumé és még a tizedik napon is kimutatható volt. A Sox2 transzkriptumok mindkét kontrollban kimutathatók voltak (24. ábra).

Gén	Sejtvonal	F	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10
Rb7	R1 F2 CBA mstn ^{-/-} /Egfp ^{+/+} 1 mstn ^{-/-} /Egfp ^{+/+} 2												
Oct-4	R1 F2 CBA mstn ^{-/-} /Egfp ^{+/+} 1 mstn ^{-/-} /Egfp ^{+/+} 2							e					
Sox2	R1 F2 CBA mstn [/] /Egfp ^{*/+} 1 mstn [/] Egfp ^{*/+} 2												
Fgf4	R1 F2 CBA mstn ^{-/} /Egfp ^{+/+} 1 mstn ^{-/} /Egfp ^{+/+} 2												
LifR	R1 F2 CBA mstn ^{-/} /Egfp ^{+/+} 1 mstn ^{-/-} /Egfp ^{+/+} 2												
Telomerá	R1 F2 Z CBA mstn ⁻⁺ /Egfp ^{+/+} 1 mstn ⁻⁺ /Egfp ^{+/+} 2			-		1							

24. ábra. Korai differenciálódásért felelős gének expressziójának vizsgálata RT-PCR analízissel, in vitro ES differenciáltatás során (reprezentatív RT-PCR felvétel)

Az Fgf4, amit a Sox2 és az Oct-4 komplexek aktiváltak, a differenciálódás során csökkenő expressziós mintázatot mutatott. A 8-10. napon az R1 és a *mstn^{-/-}* $/Egfp^{+/+}2$ sejtvonalban nem, de az F2, valamint a CBA EB csomókban —bár nehezen kimutathatóan, de— jelen volt (24. ábra).

Az összes vizsgált sejtvonal esetében a Rex1, valamint az Utf1 expressziója egymáshoz nagyon hasonló mintázatot mutatott a differenciálódó sejtekben. Az expresszió szintje enyhe csökkenést mutatott. A differenciáció során nem tudtunk különbséget kimutatni az öt vizsgált sejtvonal között.

A Lif receptor gp190-es alegysége, amelyre az RT-PCR primereket terveztük, az összes sejtvonalban jelen volt. Az R1 és F2 sejtvonalaknál ez az expresszió a differenciáltatás utolsó harmadában (7-10. nap) csökkenést mutatott, amely a többi sejtvonalnál nem volt kimutatható (24. ábra).

A telomeráz reverz transzkriptáz enzim mRNS expresszióját szintén megvizsgáltuk. Bár az F2 vonal ES sejtjeiben a telomeráz expressziója nem volt detektálható, a többi négy sejtvonalnál igen. A differenciáció során nem volt kimutatható különbség a sejtvonalak között. A fibroblasztban a telomeráz mRNS expressziója nem volt észlelhető. A 24. ábra reprezentatív eredményeket közöl azon gének esetében, ahol eltérést tapasztaltunk az egyes gének aktivitásában a sejtvonalak között.

6.4 ES sejtvonalak vázizom irányú differenciáltatása

6.4.1 A differenciáltatási módszer beállítása R1 sejtvonalra

Az előzőekben már részletezett differenciáltatási módszerek közül a függőcseppes aggregáltatás és differenciáltatás módszerét adaptáltuk R1 sejtvonal felhasználásával. Az irodalmi adatok igen változó sejtszámot közölnek az EB csomókra vonatkozóan: 400 sejttől egészen 1200-ig találunk leírásokat az ES sejtek függőcseppes differenciáltatásáról szóló közleményekben. Így munkánk megkezdésekor az optimális sejtszám megállapítására külön kísérletet indítottunk. Ebben a kísérletben 600, 800 és 1000 sejtből álló EB-csomók aggregációját és szuszpenziós kultúrában tarthatóságát vizsgáltuk. Mivel ezer sejt felett ugrásszerűen megnő a letapadó csomók aránya, a csomókat nehéz szuszpenzióban tartani, így 1000 sejt felett már nem végeztünk kísérleteket.

A kísérletek eredményei szerint a 600 sejtből álló csomók aggregációja bizonytalanabb volt, az alacsonyabb sejtszám miatt a csomók 30-35 %-a törmelékes vagy aggregálatlan maradt a második nap végére is, amikor a csomókat szuszpenziós kultúrába kellett áthelyezni. Ezenkívül a csomók igen kis mérete miatt nehéz volt a csomók függőcseppekből történő egyedi gyűjtése és szuszpenzióba helyezése. A kis méret és nehéz kezelhetőség miatt a szuszpenzióba helyezéskor a csomók 15-20%-át veszítettük el. Ez az arány nagyon magas, így önmagában ez a tény is a magasabb sejtszám választása felé irányított bennünket. A 600 sejtből álló csomók szuszpenziós tenyésztésük során a folyamatos sejtosztódásnak köszönhetően növekedtek. Azonban a tizedik nap végére sem érték el a 800 vagy 1000 sejtes EB csomók végső méretének felét, ami a kinyerhető mRNS mennyiségében is megmutatkozott.

A 800 és 1000 sejtből álló EB csomók esetében már nem tapasztaltunk ilyen jelentős különbséget, kísérleteink szempontjából mindkét sejtszám megfelelőnek bizonyult. A könnyebb kezelhetőség (sejthigítás), illetve a differenciálódás egyöntetűsége miatt a további kísérletek számára az 1000 sejtből álló csomókat választottuk, amelyeket két napos függőcseppes aggregáltatás után szuszpenziós kultúrába helyeztük, ahol 8 napig tartottuk. A 12. ábra a függőcsepp kultúrát és a szuszpenzióban lévő EB csomókat mutatja be.



25. ábra. ES sejtek függőcseppes differenciáltatása (A) függőcsepp kultúra, (B) szuszpenziós kultúrában tartott EB csomók a differenciáltatás 6. napján (saját felvételek)

6.4.2 Az mstn^{-/-} sejtvonalak izomdifferenciálódási képességének vizsgálata

Az újonnan alapított miosztatin mutáns ES sejtvonalak pluripotenciájának bizonyítását követően a sejtvonalak izomszövet irányú differenciálódási képességét kellett megvizsgálnunk, vagyis, hogy a setjvonalak alkalmas modellrendszerül szolgálnak-e az izom differenciálódás során zajló események vizsgálatára. Ez azért is fontos volt, mert amikor a *Cmpt* egértörzset a munka kezdetén az *Egfp* transzgenikus törzsel kereszteztük, csak az ún. fő-géneket, vagyis csak a miosztatin mutációt és az Egfp transzgént volt módunkban követni. Itt kell ismételten felhívnunk arra a figyelmet, hogy a miosztatin mutáns egértörzs, amely vizsgálataink alanya volt, egy természetes mutáns törzs. A törzs leírói, Dr. Varga László és munkacsoportja több ízben is publikálták, hogy számos modifikátor gén lehet befolyással a fenotípus alakulására (Varga et al. 1997, 2003; Szabo et al. 1998). Azonban a mai napig sem áll rendelkezésre olvan marker, amellyel e gének valamelyike nyomon követhető lenne. Így a genotípus és fenotípus együttes megjelenése alapján szelektáltuk az egyedeket és folytattuk a tenyésztést. Fontos volt meggyőződnünk arról, hogy a keresztezés nem érintett semmi olyan tulajdonságot, amely az őssejtek differenciálódását befolyásolná. Így az egyes sejtvonalak in vitro differenciációs képességét teszteltük először.

Mindhárom miosztatin mutáns, a kontroll és a 129SV genetikai hátterű R1 ES sejtvonalat is differenciáltattuk. Az EB csomókat zselatinozott 10 cm-es Petricsészére helyezve csoportosan differenciáltattuk. Az izomszövet irányú differenciálódást a megjelenő kontraháló sejtcsomók számával, a kontrakció megjelenésének időpontjával és időtartamával, valamint a differenciáltatás végére kialakuló izomsejt-csoportokkal jellemeztük. Az eredményt a 26. ábra szemlélteti.

A sejtvonalak izomszövet differenciációs képességét tekintve nem találtunk különbséget a sejtvonalak között. Itt a 30. napon végdifferenciálódott sejtek számát tekintve nem volt szignifikáns a különbség a magas szórásértékek miatt (26. ábra B/2. oszlop), azonban a differenciálódás lefutását illetően több különbséget észleltünk. Amikor az első kontraháló sejtcsomók megjelenését hasonlítottuk össze, akkor mind azok számában, mind pedig a megjelenés idejében különbséget találtunk. A mutáns sejtvonalaknál a kontrakció később jelentkezett (a 10. napra még nőtt a számuk), és hosszabb ideig kontraháltak, számuk a 15. napon is szignifikánsan magasabb volt (26. ábra). Ez a "késedelem" az $mstn^{+/+}/C$ sejtvonalnál nem volt kimutatható, szinte azonos profilt mutatott az R1 sejtvonallal (12. táblázat).



26. ábra. Miosztatin mutáns sejtvonalak izomszövet differenciálódási képességének vizsgálata in vitro differenciáltatás során: (A) kontrakciós csomók megjelenése a differenciálódás első 15 napján, (B) vázizom sejtek aránya a differenciálódó tenyészetben

12. táblázat. Átlagos kontrakciós idő napokban kifejezett alakulása miosztatin mutáns és
kontroll sejtvonalak <i>in vitro</i> differenciáltatása során

Sejtvonal	mstn ^{-/-} /Gfp ^{+/+} 1	mstn ^{-/-} /Gfp ^{+/+} 2	mstn ^{-/-} /Gfp ^{-/-} 5	mstn ^{+/+} /C7	R1
Átlagos kontrakciós idő napokban	12,2±2,1 a	13,1±1,8 a	10,9±2,3 a	7,2±1,4 b	6.6±1,7 b

6.4.3 A génexpressziós vizsgálatba bevont gének

A vizsgálatokba bevont gének jelentős hányadát az irodalomban közölt adatokra támaszkodva választottuk ki. Az irodalmi adatok elemzésekor a kísérleti rendszerünkben várhatóan kimutatható, inkább a korai sejtdifferenciálódást meghatározó géneket választottuk. Az egyes gének szerepét az irodalmi áttekintés vonatkozó fejezeteiben részletesen tárgyaltuk, így itt csak saját vizsgálataink eredményeit közöljük. A kiválasztott gének listáját az M4 Melléklet 16. táblázat tartalmazza, a génspecifikus primerekkel együtt.

Ezt követően transzkripciós faktor kötőhely-analízist végeztük el a miosztatin gént határoló szekvenciákon. Mivel az egérgenom szekvenciája az Interneten publikálásra került, a miosztatin ismert szekvenciája alapján a megfelelő DNS-szakasz kiválasztása nem okozott gondot. A DNS-szakasz kiválasztását követően 10 kb upstream és 5kb downstream szekvencia analízisére került sor. Célunk az volt, hogy olyan géneket is bevonjunk a vizsgálatokba, amelyeket eddig még nem hoztak kapcsolatba a miosztatinnal, és a feltételezett kapcsolatot egy-egy kötőhely potenciális megléte is erősíti.

Számos MyoD myogenin és Mef2 kötőhelyet azonosítottunk az upstream régióban, azonban jelentős számú downstream myogenin kötőhely is azonosítható volt. Azonban ezekről a faktorokról más vizsgálatok során már bizonyították, hogy összefüggésbe hozható a miosztatin kaszkáddal (Thomas et al. 2000; Langley et al. 2002; Spiler et al. 2002).

Két gén, a Smad3 és Sox5 által kódolt fehérjék kötőhelyeinek azonosítása keltette fel érdeklődésünket. A Smad3 ugyanis egy upstream regulátor az MRF kaszkádban az izomdifferenciálódás során, míg a Sox5 az ivar-determinációval összefüggő hatása miatt lehet számottevő. A miosztatin mutáns állatoknál ugyanis ivarfüggő különbségeket mutattak ki a miosztatin szintet illetően (McMahon et al. 2003). A Cmpt egér leírásakor, ahogy arra már utaltunk, Varga és munkatársai szintén ivari determinációról számoltak be a fenotípus erősségét illetően (1997, 2003). Ezek alapján a Smad3 és Sox5 esetében is primerek tervezése és a vizsgálatokba történő bevonásuk mellett döntöttünk. Az analízis eredményét az M4 Melléklet 19. táblázatában tüntettük fel.

A kísérletekben összesen 17 gén expressziós profilját követtük nyomon egy 29 napos differenciáltatási periódusban. A génexpresszió analíziséhez szemikvantitatív RT-PCR eljárást alkalmaztunk.

Az **a** betűvel jelölt értékek szignifikáns eltérést mutatnak a **b**-vel jelölt értékekhez képest, azonban az **a** (illetve **b**) jelűek egymástól nem térnek el szignifikánsan

6.4.4 Az MRF faktorok expressziójának változása

Az egyik legkorábban megjelenő endogén MRF faktor, a MyoD expressziója az *mstn* mutáns ES sejtekben korábban jelent meg (D5) a differenciálódás során, mint a kontrollokban. Az expresszió ideje hosszabra nyúlt, habár a transzkriptum mennyisége (mRNS szint) nem mutatkozott többnek. Itt kell megjegyeznünk, hogy az R1 kontroll sejtvonalban az $mstn^{+/+}/C7$ sejtvonalhoz képest egy kissé alacsonyabb MyoD expressziót figyeltünk meg. A különbség igen csekélynek mutatkozott, de konzekvensen megjelent minden ismétlésben. (27. ábra és 28. ábra).

A Myf5 transzkripciós faktornál nem találtunk génexpressziós különbséget a sejtvonalak között. A Myf5 a MyoD expresszióval egyidőben jelent meg (D5), azzal szinte megegyező intenzitással és hosszú időn át fennmaradt (27. ábra és 28. ábra). Mérsékelt különbséget fedeztünk fel a két kontroll sejtvonal között a differenciálódás 16. 19. és 22. napján: a Myf5 szint az $mstn^{+/+}/C7$ sejtvonalban magasabb volt, mint az R1 sejtvonalon (27. ábra).

A myogenin és MRF4, mint másodlagos izomdifferenciálódást előidéző faktoroknál az *mstn* mutáns sejtekben magasabb expressziós aktivitás volt megfigyelhető. Az első expressziót csak a 13. napon (D13) detektáltuk, azonban jóval erősebb szinten, mint a kontroll sejtvonalakban. Az MRF expresszió jóval hosszabb ideig volt megfigyelhető, mint a kontroll sejtvonalakban (27. ábra és 28. ábra).

6.4.5 A sejtciklus szabályozásában részt vevő fehérjék

A sejtosztódásban szerepet játszó Cdk2 expressziós szintje megnövekedett, míg a p21 szint jelentősen lecsökkent az *mstn* mutáns sejtvonalban a kontrollokhoz képest. Emellett a Cdk2 magas expressziós aktivitása hosszabb időn keresztül volt detektálható mint a kontrollokban: mintegy 8 nappal hosszabb perióduson keresztül (D10, D13, és D16) tudtuk kimutatni a mutáns sejtekben. Ezzel szemben a kontrollban csak egyetlen időpontban (D10) mértünk hasonlóan magas aktivitást (27. ábra és 28. ábra).

6.4.6 Az izomdifferenciálódást reguláló egyéb fehérjék

A Smad3 transzkripciós faktornál csak egyetlen vizsgált időpontban mutattunk ki eltérést a miosztain mutáns és kontroll ES sejtvonalak izomszövet differenciálódása során. A 16. napon a Smad3 expresszió már nem volt detektálható, amúgy az expressziós mintázat megegyezett a kontrollal. Itt kell megjegyezni, hogy a Smad3 kimutatása az *mstn*^{-/-} sejtvonalban az 5. napon nagyon bizonytalan volt az ismétlések során (27. ábra és 28. ábra).

Mind a Pax3, mind pedig a Pax7 géneknél eltérést tapasztaltunk az expressziót illetően a mutáns és kontroll vonalak között. Mindkét gén aktivitása megnövekedett az *mstn* mutáns ES sejtek izomszövet differenciálódása során (27. ábra és 28. ábra). A Pax3-nál emellett a kontrollok között is eltérés volt

felfedezhető: az 5. és 10. napokon az $mstn^{+/+}/C7$ sejtvonalban alacsonyabb aktivitást mértünk, mint az R1 kontrollban (27. ábra).

Az Igf1 transzkripciós aktivitása erőteljesebb volt a mutáns sejtvonalakban a differenciálódás második szakaszában (D19) a kontrollhoz képest (27. ábra és 28. ábra).

A két MNF izoforma vizsgálatakor semmilyen különbséget sem tudtunk kimutatni az egyes sejtvonalak között, sem az expresszió intenzitását, sem pedig időtartamát illetően (27. ábra és 28. ábra).

Gén	Egértörzs	ES differenciáltatás									
		DO	D5	D10	D13	D16	D19	D22	D25	D28	
Rb 7	Kontroll mstn -/-										
MyoD	Kontroll mstn -/-			*	*	*	*	*	*		
Myf5	Kontroll mstn -/-					*	*	*			
Myogenin	Kontroll mstn -/-										
MRF4	Kontroll mstn -/-										
Myostatin	Kontroll mstn -/-										
Cak2	Kontroll mstp.(2		_	_	
p21	Kontroll mstp./								_		
Smad3	Kontroll mstp./.		-/+								
Pax3	Kontroll		*	*							
Pax7	Kontroll										
IgfI	Kontroll						_				
Desmin	Kontroll		_	_							
MNF a	Kontroll										
MINF B	Kontroll										
MyHC IIB	Kontroll										
MyHC I	Kontroll										
Sox5	Kontroll		*	*	*						
	mstn -/-										

27. ábra. Génexpresszió intenzitása ES sejtvonalak in vitro izomszövet differenciáltatása során. Az ábrán kontrollként az *mstn^{+/+}/C7* sejtvonal, míg mstn^{-/-} sejtvonalként az *mstn^{-/-}/Egfp^{+/+}2* sejtvonal szerepel. A *-al jelzett esetekben a kontroll sejtvonal génexpressziós aktivitása eltért az R1 sejtvonalétól (részletes magyarázatot 6.4 alfejezet tartalmazza).

A Sox5 faktor vizsgálatakor jelentős különbséget detektáltunk a sejtvonalak között. A Sox5 transzkriptumának mennyisége három vizsgált időpontban is magasabbnak mutatkozott az *mstn* mutáns sejtvonalban (D10, D13, és D16; 27. ábra és 28. ábra). A kontroll sejtvonalak között is különbséget detektáltunk, a Sox5 expresszió gyengébb volt az R1 kontrollban, mint az *mstn*^{+/+}/*C*7 sejtvonalban (27. ábra).

6.4.7 Izom struktúrgének

Az izomszövet struktúrfehérjéit kódoló gének aktivitását is megvizsgáltuk. Ezen gének közül két különböző gént választottunk. Az egyik a dezmin, amely már korán felhalmozódik a myoblastokban, míg a másik az MyHC család két tagja, amelyek inkább a későbbi differenciálódás (fúzió utáni szakasz) jellemző fehérjéi.

A dezminnél a késői differenciálódási periódusban (D22, D25 és D29) mutattunk ki nagyobb expresszió növekedést a mutáns sejtekben, míg a korai szakaszban (D10-D19) ez elenyésző volt (27. ábra és 28. ábra).

A miozin izoformáknál már összetettebb volt a kép. Míg az ún. lassú típusú miozin, vagy MyHC I expressziója drámaian megnőtt a mutáns sejtek differenciálódása során a kontrollhoz képest, addig a gyors típusú MyHC IIB alacsonyabb, vagyis csökkent expressziót mutatott. Az MyHC IIB transzkriptum esetében kapott csökkenés kisebb volt, mint az MyHC I esetén kapott növekedés mértéke a transzkriptum szintekben. Az MyHC I magas aktivitása a 19. naptól permanensen fennmaradt a differenciáltatás ideje alatt (27. ábra és 28. ábra).

Eredmények



28. ábra. Génexpresszió változás összehasonlítása mstn mutáns és kontroll ES sejtvonalak izomszövet irányú in vitro differenciáltatása során. Az ábrán kontrollként az *mstn*^{+/+}/C7 sejtvonal, míg mstn^{-/-} sejtvonalként az *mstn*^{-/-}/Egfp^{+/+}2 sejtvonal szerepel (reprezentatív RT-PCR felvétel).

6.4.8 Izomszövet őssejtek: szatellita sejtek és differenciáltatásuk

Vázizom eredetű szöveti őssejteket izoláltunk a miosztatin mutáns $(mstn^{-/-}/Egfp^{+/+})$ valamint a két kontroll $(mstn^{+/+}/C7$ és 129SV) egértörzs egyedeiből. Az izolált szatellita sejteket *in vitro* differenciáltattuk. Ezt követően az ES sejtvonal differenciáltatás során leírt semi-kvantitatív RT-PCR eljárást alkalmazva a korábban már ismertetett és az ES sejtek differenciálódása során analizált 17 gén expresszióját vizsgáltuk meg.

Az izomszövet őssejtek differenciáltatása jóval rövidebb idő alatt lezajlik, mint az ES sejteké: mintegy 10 nap alatt végbemegy. Az expressziós mintázat összehasonlításakor a MyoD, Myf5, Cdk2 és Sox5 géneknél expresszió növekedést detektáltunk a miosztatin mutáns, differenciálódó myoblastokban (D3), míg a p21 és Smad3 szint lecsökkent. A myoblast fúziós fázisban (D7), a miogenin, MRF4, Cdk2, Igf-1, MyHC I, és Sox5 szintje mutatott növekedést a mutáns állatokból izolált sejtkultúrákban. Ezzel párhuzamosan a Smad 3 és Pax7 szint csökkenését detektáltuk. Az utolsó stádiumban, vagyis a fúzió végéhez közeledve, amikor kontraktilis, soksekjtmagvű rostokkal találkozunk a tenyészetben, a tenyészetek közötti expressziós különbségek lecsökkentek: csak a miogenin, MRF4, a dezmin és MyHC I mutatott megasabb expressziót az *mstn* mutás szatellita tenyészetekben a kontrollhoz képest (29. ábra).

6.4.9 Primer egér izomszövet tenyészetek

A primer izomszövet tenyészeteket 10 hetes állatok ($mstn^{-/-}/Egfp^{+/+}$, $mstn^{+/+}/C$ és 129SV). hátulsó végtag izmaiból preparáltuk. Az így létrehozott myoblast tenyészeteket in vitro differenciáltattuk, majd az ES és szatellita tenyészetek esetén kapott mintázattal összehasonlítottuk. A primer tenyészeteknél tapasztalt expressziós mintázat szinte teljesen megegyezett a szatellita sejtek differenciáltatása során kapott eredményekkel (29. ábra). Csupán az alábbi különbségek voltak észlelhetőek: a miogenin expresszió nem mutatott olyan jelentős növekedést, mint a szatellita, vagy ES sejt differenciáltatás során, azonban így is nagyobb volt, mint a kontroll. Ugyanezt tapasztaltuk a dezmin és MyHC IIB expressziója során is. A legnagyobb eltérést a Sox5 expresszió hozta, ahol nem tudtunk génterméket kimutatni sem a kontroll, sem pedig a mutáns sejtvonalakban a differenciálódás során (29. ábra).

		Sa	tellita sejt dit	fferenciált	Primer miob laszt differenciáltatás			
Gén	Egértörzs	DO Satellita	D4 miob laszt	D7 Fúziós szakasz	DIU Fúzionált kontraktilis sejtek	D0 mioblaszt	D5 Fúziós szakasz	D10 Fúzionált kontraktilis sejtek
Rb7	Kontroll							
	mstn -/-							
M yo D	Kontroll					_		
	mstn -/-				-	_	_	
M yf5	mstn -/-							
	Kontroll							
Myogenin	mstn -/-							
MRF4	Kontroll							_
	mstn -/-						_	
M yo sta tin	Kontroll							
	mstn -/-							
Cdk2	Kontroll		_					
	Kontroll							
p21	mstn -/-							
Smad 3	Kontroll							
Smaus	mstn -/-							
Pax3	Kontroll							
	mstn -/-							
Pax7	Kontroll							
	mstn -/-							
IgfI	Kontroll water /			_			-	
	Kontroll				_			_
desmin	mstn -/-							
MNE	Kontroll							
minr u	mstn -/-							
MNF β	Kontroll							
· · ·	mstn -/-							
MyHCIIB	Kontroll							
<u> </u>	mstn -/-							
MyHC I	Kontroll mstn./.							
	Kontroll							
So x5	mstn -/-							

29. ábra. Génexpresszió intenzitása egér szatellita és myoblast sejttenyészetek in vitro izomszövet differenciáltatása során. Az ábrán kontrollként az *mstn*^{+/+}/*C* egértörzs, míg mstn^{-/-}-al az *mstn*^{-/-}/*Egfp*^{+/+} egértörzs került jelölésre.

6.5 Hisztopatológiai analízis

6.5.1 Morfológiai vizsgálatok

A miosztatin mutációt hordozó egértörzs vizsgálatakor testtömeg és izomtömeg méréseket végeztünk. A testtömeg mérésekor három vizsgálatot végeztünk, minden esetben azonos korú mutáns ($mstn^{-/-}/Egfp^{+/+}$) és kontroll ($mstn^{+/+}/C$) egyedek csoportjait összehasonlítva. Vizsgálatokat végeztünk a születéskori alomtömeg, korrigált születéskori alomtömeg, a választáskori alomtömeg, a választáskori átlagos egyedi tömeg és az ivarérettségkori egyedi tömeget illetően. A születéskori alomtömeget és korrigált alomtömeget tekintve, valamint az alomtömegekből számított átlagos testtömeget tekintve nem találtunk szignifikáns eltérést az $mstn^{-/-}$ és kontroll populáció között. Szignifikáns eltérés volt azonban kimutatható a kontroll és miosztatin mutáns egyedek között a korrigált választáskori testtömeg és a 16 hetes életkorban mért testtömeg között (13. táblázat). A 16 hetes testtömeg mérésnél ivar szerinti szignifikáns eltérést tapasztaltunk, miszerint az $mstn^{-/-}$ hímek átlagos 51,57 gramm tömege (±2,18) magasabb volt a kontroll hímek átlagos 43,41 gramm (±3,41) tömegétől. A nőstényeknél ehhez hasonlóan, a kontroll egyedek átlagos 29,24±4,11 gramm tömegét szignifikánsan meghaladta a vizsgált miosztatin mutáns nőstény egyedek átlagos testtömege (38,18±2,31 gramm). Ha azonban ivar szerint nem teszünk különbséget, akkor nincs szignifikáns eltérés a kontroll (34,9±5,8) és mutáns (46,12±5,6) egyedek között.

Faántönze	mstn ^{-/-} /Egfp ^{+/+}	mstn ^{+/+} /C
Egentorzs	Születési tö	imeg (g)
Átlagos születési alomtömeg	25,77±2,09	20,82±2,03
Átlagos születési tömeg	2,64±0,19	2,38±0,34
Almok száma	12	12
Összes vizsgált egyed	118	117
	Korrigált szület	tési tömeg (g)
Korrigált születési alomtömeg	23,35±1,65	19,20±1,58
Korrigált születési tömeg	2,92±0,21	2,40±0,20
Almok száma	12	12
Összes vizsgált egyed	96	96
	Korrigált válasz	tási tömeg (g)
Korrigált választási alomtömeg	85,51±4,41	68,64±4,59
Korrigált választási tömeg	10,69±0,55	8,58±0,57
Almok száma	12	12
Összes vizsgált egyed	96	96
	Egyedi testtömeg 16	hetes korban (g)
Átlagos testtömeg 16 hetes korban (♂)	51,57±2,18	43,41±3,41
Átlagos testtömeg 16 hetes korban (♀)	38,18±2,31	29,24±4,11
Átlagos testtömeg 16 hetes korban (♂+♀)	46,12±5,6	34,9±5,8

13. táblázat. Testtömeg összehasonlítás miosztatin mutáns és kontroll egerek között
különböző életkorokban

Nemcsak a testtömeg tekintetében, hanem az egyes izmok tömegét illetően is végeztünk vizsgálatokat. Az irodalmi adatokból ugyanis kiderült, hogy a miosztatin-szint eltérő az egyes izmokban az egészséges egyedeknél. Ezért feltételezhető volt, hogy a hipertrófia mértéke miosztatin hiányában nem egyforma az egyes izmokban. Ezért 16 hetes hím állatok különböző izmait vizsgáltuk meg. Az adatokat oszlopdiagrammon ábrázoltuk (30. ábra). A 31. ábra reprezentatív összehasonlító felvételeket közöl a hátulsó végtag dorzális és ventrális nézetén, miosztatin mutáns és kontroll egyedek között.

Az oszlopdiagrammból kiderül, hogy minden vizsgált izomnál tömegnövekedést etektáltunk a kontrollhoz képest. A legjelentősebb eltérést a kontroll és mutáns egyedek izmai között a *m. vastus lateralis* (mintegy háromszoros növekedés), illetve a *m. gastrocnemius* (kétszeres növekedés) tapasztaltunk. A többi vizsgált izomnál a változás mértéke másfél-kétszeres értéket mutatott.



30. ábra. Különböző izmok egyedi tömegének összehasonlítása mstn^{-/-} és kontroll állatok között



31. ábra. Összehasonlító izomvizsgálatok *mstn^{+/+}/C* és *mstn^{-/-}/Egfp^{+/+}* egértörzsek között. Az ábra A és B képének bal oldalán mstn^{-/-}/*Egfp^{+/+}*, jobb oldalán *mstn^{+/+}/C* törzsből származó 16 hetes hím látható.

6.5.2 Rosttípus vizsgálatok

Az ES differenciáltatás során kapott RT-PCR adatokra alapozva, ahol az MyHC I izotípus mRNS szintjében szignifikáns különbséget detektáltunk az *mstn* mutáns tenyészetekben, meg kívántuk vizsgálni a miozin nehézlánc eloszlást *in vivo*, az egerek izmaiban is. Ennek során kontroll és mutáns állatok négy különböző izmából fagyasztott metszeteket készítettünk, majd rosstspecifikus enzimhisztokémiai reakció segítségével (NADH-TR festés) azonosítottuk az egyes rosttípusokat az izom keresztmetszetében.

A vizsgálatba bevont izmokat McPherron 1997-es közleménye alapján választottuk ki a normális izmok miosztatin tartalmát figyelembe véve. Ennek alapján egy magas miosztatin fehérje szintet mutató izmot (*M. pectoralis*), két közepes (*m. biceps femoris* és *m. gastrocnemius*), valamint egy miosztatin fehérjét nem tartalmazó izmot (*m. masseter*) választottunk ki. A morfometriai analízis adatait az M4 Melléklet 20. táblázat, valamint a 32. ábra tartalmazza.

Az egyes izmok közötti eltérés volt megfigyelhető a rosttípusok számát illetően a teljes keresztmetszeti rosstszámra vonatkoztatva a kontroll és mutáns egyedek között. Az I-es típusú rostok száma a keresztmetszet teljes rosstszámához viszonyítva nem változott a *m. pectoralis* izomban, csökkent a *m. biceps femorisban*, míg növekedést mutatott a *m. gastrocnemius*, és *m. masseter* izmok esetében. Az intermedier típusú rostoknál ugyanez a paraméter nem változott a *m. gastrocnemius* és m. *pectoralis*, míg növekedétt a *m. biceps femoris* izomban. A IIB típusú rostoknál ugyanakkor csökkenés volt kimutatható a *m. biceps femoris*, míg növekedés volt tapasztalható a *gastrocnemius* és *pectoralis* izmokon a mutáns állatokban (32. ábra).



32. ábra. Izomrost típusok megoszlásának összehasonlítása kontroll és mstn^{-/-} egerek a különböző izmaiban. (A) rosstípusok megoszlása a teljes keresztmetszeti rostszám %-ában;
 (B) rosstípusok megoszlása a teljes keresztmetszet területének %-ában

A rostok egyedi átlagos átmérőjét, illetve a kontrollhoz viszonyított arányát tekintve jelentős különbség volt kimutatható a mutánsok izmaiban (kivételt csak a masseter I-es típusú rostjai képeztek), minden rosttípusra nézve. A növekedés mértéke azonban rosttípusonként eltérő volt, hiszen az egyes rosttípusok átlagos átmérője is különböző. A legtöbb esetében a legnagyobb növekedést az átlagos rostátmérőben az I-es típusú rostoknál mértük (20. táblázat).



33. ábra. NADH-TR festés (A) m. gastrocnemius keresztmetszet mstn^{+/+}/C, és (B) mstn^{-/-}/Egfp^{-/-} egyedek izmában; (C) biceps femoris; mstn^{+/+}/C és (D) mstn^{-/-}/Egfp^{-/-} egyedek izmában.
A felvételen a sötét színnel festődő (sötétkék) rostok I-es típusúak, a világosabb árnyalatú (halványkék) rostok intermedier, míg a leghalványabb (fehér, szürkés-fehér) rostok IIB típusúak. A felvételek 200x-os végső nagyítással készültek (Dr. Réz Gábor felvételei)

A rosttípusok megoszlása a rosstterület tekintetében ismételten jelentős eltéréseket mutatott. A IIB típusú rostok területaránya mutatta a legnagyobb értéket minden izomban. Ezt az intermedier, majd az I-es típusú rostok követték. Ahogy korábban már az egyedi rostátmérőnél kimutattuk, itt is az I-es típusú rostok területének növekedése volt a legjelentősebb a mutáns és kontroll izom keresztmetszetek összehasonlításakor (31. ábra B).

6.5.3 Fénymikroszkópos szövettani analízis

A fénymikroszkópos hisztotechnikai eljárások során az *mstn* mutáns állatok izomzatának szerkezeti, struktúrális felépítését kívántuk megvizsgálni és összehasonlítani kontroll egyedek izommintáival. A mikroszkópos analízis során a szokásos hisztopathológiai eljárásokat kiegészítettük az izomszövet feltüntetésére használt speciális eljárásokkal, amelyek a jobb differenciálást tették lehetővé.

Megvizsgáltuk, hogy van-e bármilyen strukturális eltérés a kontroll és mutáns állatok között. Erre a kérdésre általánosan alkalmazott, és specifikus izomszövet feltüntetési eljárásokat egyaránt alkalmaztunk. A hematoxilin-eozin festéssel az izmok integritását és szerkezetét, valamint a sejtmagok elhelyezkedését vizsgáltuk. A hosszmetszetek emellet a harántcsíkolatot illetően is eligazítást adtak. Az azan-festés, mint trikróm technika az izomszövet feltüntetésére használt speciális festés, a szövet integritását, kötőszöveti eloszlását jelzi, míg a vashematoxilin kifejezetten a harántcsíkolt izom strukturális épségét mutatja meg. Az általánosan alkalmazott ezüst impregnáció a kötőszövetet tünteti fel, míg a PAS festés a szénhidrátok feltüntetésére, így az izomban a glikogén mennyiségére utal. A hisztológiai festések elvégzése és értékelése után az alábbi következtetéseket vontuk le:

- A hematoxilin-eozin festést követően egyértelmű rostátmérő növekedés volt detektálható az *mstn* mutáns állatokban. A rosttátmérő növekedés látszólag minden rostra kiterjedt, azonban ennek mértéke csak specifikus rostfestéssel igazolható.
- A keresztmetszeti szerkezet (filament struktúra) nem mutatott eltérést hematoxilin-eozin festéssel.
- A sejtmagok száma magasabbnak tűnt a keresztmetszeti képek alapján, azonban ez a metszési síkból adódhat, specifikus vizsgálat nélkül nem igazolható.
- ➤ A hiperpláziás izomra jellemző centrális magok és behasadt (ún. split fibers) rostok voltak azonosíthatóak az mstn^{-/-} egerek izmaiban.
- A hosszmetszet normális harántcsíkolatot mutatott. Ezt erősítette a vashematoxilin festés eredménye.
- A trikróm festések (azan, Van Gieson) normális rostszerkezetet igazoltak.
- A trikróm festések a kötőszövet csökkent jelenlétére utaltak az *mstn*^{-/-} állatok izmában, amely megfigyeléseket az ezüst impregnációja igazolta.
- A PAS festés megnövekedett glikogén mennyiséget mutatott a mutáns izmok keresztmetszetén.

A vizsgálatok eredményeit reprezentáló felvételeket a 34. ábra szemlélteti

6.5.4 Elektronmikroszkópos vizsgálat

Az elektronmikroszkópos vizsgálat során kereszt és hosszmetszeteken egyaránt megvizsgáltuk az izmok ultrastruktúráját. A hipertrófiás állatok izmainak kontroll állatokkal történő összehasonlításakor a következő ultrastruktúrális különbségekre derült fény:

- A miofibrillum struktúra nem mutatott kóros eltérés a kontrollhoz viszonyítva egyetlen vizsgált izomban sem.
- A miosztatin mutáns izmokban igen jelentős, főként a szubszarkolemma területre kiterjedő mitokondrium szám növekedést tapasztaltunk. A mitokondriumok helyenként óriási tömegben fordultak elő, szinte kiboltozódtak a memrán alatt.
- A mitokondriumok nem csak számban, de méretben is eltérést mutattak, a miosztatin mutáns egyedek izmaiban számos óriás mitokondriumot találtunk.
- A mitokondriumok struktúrája nem mutatott kóros eltérést a kontrollhoz viszonyítva.
- A metszetekben gyakrabban figyeltünk meg sejtmagokat és szatellita sejteket egyaránt a mutáns egyedek izmaiban. Azonban a megnövekedett sejtmag és szatellita sejtszám igazolására további kísérlet szükséges.
- A keresztmetszeti képek analízisekor ún. tubuláris aggregátumok (TA) voltak megfigyelhetőek a mutánsok izmaiban
 A vizagálatak eredményeit reprezentálá felvátalakat a 25. ábra mutatia

A vizsgálatok eredményeit reprezentáló felvételeket a 35. ábra mutatja.

Eredmények



Eredmények



34. ábra. Fénymikroszkópos hisztológiai analízis miosztatin mutáns és kontroll egerek *m. gastrocnemius* izmán. (A-G) hematoxilin-eozin festések: (A) kontroll és (B) mutáns keresztmetszet 120x, míg (C) és (D) 440x nagyítva; (E) kontroll és (F) mutáns izom hosszmetszet (120x); (G) mutáns izom hosszmetszet 440x nagyítva. A kontroll és mutáns izmok összehasonlítása révén látható a megnövekedett rostátmérő és lecsökkent kötőszövet a mutáns állatok izmában, amelyet az (I) kontroll és (J) mutáns félvékony, toluidinkék festett metszetek is szemléltetnek (440x). (H) Van Gieson trikróm festés mstn^{-/-} izomban: a nyilak az ún. ragged rostokat jelölik (440x). (K) Kontroll és (L) mutáns izom PAS festés (220x) a megnövekedett mioglobin tartalmat és rostátmérőt szemlélteti. (M) kontroll és (N) mutáns izom hosszmetszet Azan (220x), illetve (O) kontroll és (P) mutáns keresztmetszet ezüst impregnáció festése (600x), amely a lecsökkent kötőszöveti állományt szemlélteti a mutánsokban. (R) mutáns izom keresztmetszet Azan festése: ragged rostok és centralizált sejtmag (440x), (S) mutáns izom vas-hematoxilin festés a normális harántcsíkolatot szemlélteti (440x)

Eredmények



35. ábra. Elektronmikroszkópos összehasonlító vizsgálatok miosztatin mutáns és kontroll egerek izmai között: (A) kontroll, (B) mstn^{-/-} izom hosszmetszet; (C) és (D) nagyobb nagyítással mutatja a hosszmetszetet és a normális filamentum struktúrát. (E) kontroll, (F) mstn^{-/-} izom keresztmetszeti képe, amely a normális filamentum szerkezetet szemlélteti. (G) felszaporodott mitokondriumok és (H) azok szerkezete, amely nem mutat patológiás eltérést. A nagy számú mitokondrium a (B), (D), és (F) ábrákon is megfigyelhető a mutáns izomokban. Az (I) és (J) kép a tubuláris aggregátumokat mutatja mstn^{-/-} állatok izmaiban.

6.6 Miosztatin mutáns fehér-kék belga szarvasmarha izomszövet tenyészeteken végzett vizsgálatok

Kísérleti rendszerünkben fehér-kék belga állatokból származó izom prekurzor tenyészeteket izoláltunk, nyílt izombiopszia módszerével, a hátulsó végtag farizmából (*M. glutaeus intermedius*). Kontrollként *holstein-fríz* egyedek mintáit használtuk. Az izolált sejttenyészeteket jellemeztük, majd *in vitro* differenciáltattuk. Az *in vitro* differenciáltatás során 13 gén expressziós mintázatát hasonlítottuk össze, amelyek a miosztatin kaszkáddal kapcsolatban állnak. A gének kiválasztása az egéren megvizsgált gének génexpressziós változásainak eredményeit értékelve történt. Célunk az volt, hogy az egéren, mint genetikai modellállaton nyert információkat a szarvasmarha esetében közvetlenül hasznosítsuk és egyben validáljuk is.

Sikeresen hoztunk létre szatellita sejttenyészetet és primer myoblast sejttenyészetet az izombiopsziák szöveti izolátumából. A *fehér-kék belga* fajta sejttenyészetekben szignifikáns növekedést tapasztaltunk az MRF faktorok, az Igf-1, valamint a Cdk2 gének expressziója esetében, míg jelentős csökkenés volt detektálható a p21 szintben. Az *in vitro* differenciálódó izomrostok esetén az MyHC izotípus vizsgálat a felnőtt egyedekre *in vivo* jellemző MyHC IIB mRNS túlsúlyt mutatott (37. ábra).



36. ábra. Szarvasmarha szatellita sejtek in vitro tenyésztése (A) izolált szatellita sejtek; (B) osztódó és differenciálódó szatellita sejtek, ahol a differenciálódás révén már orsó alakú myoblastok is láthatóak; (C) myoblast sejtek fáziskontraszt mikroszkópiával; (D) a miogenezis sorbarendeződési fázisa; (E) fúziós fázis; (F) többsejtmagvú fúzionált izomrost, hoechst festés után, fluoreszcens mikroszkópiával.

Gén neve	Szarvasmarha	Satellita sejtek differenciálódása							
	fajta	D0	D4	D8	D14				
Aktin	HF BWB								
MyoD	HF BWB								
Myf5	HF BWB								
Myogenin	HF BWB								
GDF8	HF BWB								
Cdk2	HF BWB								
p21	HF BWB								
Smad3	HF BWB								
Igfl	HF BWB								
desmin	HF BWB								
MyHC I	HF BWB								
MyHC IIB	HF BWB								
CD45	HF BWB								

37. ábra. Génexpressziós mintázat szarvasmarha szatellita sejtek in vitro differenciáltatása során. HF: holstein-fríz szarvasmarha minták; BWB: fehér-kék belga szarvasmarha minták.

7. Következtetések és javaslatok

A miosztatin mutáns egerekből történő embrionális ős-sejtvonal alapítása révén igyekeztünk információt nyerni a miosztatin izomszövet differenciálódásban betöltött szerepéről. Hogy a mutáció egyszerűbben és gyorsabban nyomon követhető legyen *in vitro* rendszerben, azaz szövettenyészetekben is, a mutációt hordozó *Cmpt* egértörzset *Egfp* transzgénikus egyedekkel kereszteztük, majd új törzseket hoztunk létre $mstn^{-/-}Egfp^{+/+}$ és $mstn^{+/+}/C$ néven. Ezen egyedek embrióit használtuk fel kísérleteinkben.

Az Irodalmi áttekintés fejezetben számos embrionális őssejt alapítási módszer került ismertetésre, azonban mind a mai napig nem létezik hatékony, könnyen kivitelezhető, és törzsfüggetlen ős-sejtvonal alapítási technika. A tervezett kísérleteink számára az ES sejtvonalakat olyan törzsből kellett létrehoznunk, amely non-permisszív az ES sejtvonal alapítás tekintetében. Az Egfp egértörzzsel történt keresztezés révén a 129SV genetikai hányad, habár elméletileg megkönnyítette az ES sejtvonal alapítást, azonban a kipróbálásig erről nem győződhettünk meg. Ezért az ES sejtvonal alapítási metodika fejlesztésébe fogtunk, azzal a céllal, hogy kidolgozzunk egy olyan ES sejtvonal alapítási eljárást, amely lehetővé teszi nonpermisszív egértörzsek, vagy nem beltenyésztett egértörzsek esetén is az ES sejtvonalak sikeres létrehozását. Ez azért különösen fontos, mert amikor valamely poligénes tulajdonság vizsgálatát tervezzük, nincs mód minden esetben a megfelelő genetikai háttérre való átkeresztezésre. Hiszen sokszor még a tulajdonság (fenotípus) kialakításában szerepet betöltő géneket sem ismerjük, sem pontos géntérképi lokalizációjukat. Így a keresztezések nem csak idő- és forrásigényes feladatot jelentenek, hanem számos alkalommal a lényeg is elveszhet a keresztezés során. Így feltétlenül szükséges, hogy törzsfüggetlen és megbízható ES sejtvonal alapítási technikák kerüljenek kidolgozásra.

Laboratóriumunkban kidolgoztunk egy olyan új tápfolyadékot, melyben a hagyományos ES tápoldatot ún. kondicionált, az ES sejtek kultivációja során nyert tápoldattal kiegészítve alkalmaztuk. A módszert eredményesen használtuk miosztatin-mutáns beltenyésztett egértörzsből (*Cmpt*; Varga et al. 1997) származó embrionális ős-sejtvonal alapítására és ivarsejt kimérák létrehozására. A munka során nem csak egy új összetételű tápoldatot, hanem egy módosított izolálási eljárást is kidolgoztunk. Ez az új és könnyen ismételhető eljárás a kondicionált tápoldat alkalmazása révén bármilyen egértörzs esetében sikeresen alkalmazható. E módszer hatékony eszközt ad poligénes fenotípusok mutáns törzsben való követésére, mivel nem kell a törzset előtte más, ES-sejtvonal alapításra nézve permisszív törzzsel (pl: 129SV vagy C57BL/6) keresztezni.

A módszer valódi teszteléséhez permisszív és non-permisszív egértörzseket egyaránt felhasználtunk. Sikeresen hoztunk létre CBA és BalbC, valamint NMRI ES sejtvonalakat, amelyek a non-permisszív egértörzsek közé tartoznak. A sejtvonalak alapítását követően azok pluripotenciáját részletesen bizonyítottuk, ezzel igazoltuk alkalmazhatóságukat a sejtbiológiai és embriológiai kísérletek számára. Több in vitro eljárás kombinált alkalmazásával jellemeztük ezeket a sejtvonalakat, lehetővé téve további, más célú kutatásban történő felhasználásukat.

Mivel a CBA sejtvonal szerepe több területen is jelentős laboratóriumunk számára így Egfp transzformáns változatát is előállítottuk. Sikeresen használtuk fel a transzformáns sejtvonalat kimérakísérletekben és *in vitro* differenciáltatásban egyaránt.

Kísérleteink során a törzsfüggő ES sejtvonal alapíthatóságának genetikai okait igyekeztünk feltárni azáltal, hogy ún. permisszív és non-permisszív egértörzsekből új módszerünkkel sikeresen alapított sejtvonalak korai differenciálódását hasonlítottuk össze. Feltételezéseink szerint a különböző genetikai eredetű sejtvonalak in vitro differenciáltatása során, a korai elköteleződés alatt ható gének aktivitásának vizsgálata rávilágíthat a törzsek közötti különbségekre és így a törzsfüggőség okára is. Azért a korai géneket választottuk vizsgálódásunk tárgyaként, mert irodalmi adatok alapján úgy tűnik, hogy a pluripotencia jelenségével összefüggő gének expressziós változása lehet felelős az egyes sejtvonalak, így várhatóan az egyes egértörzsek ivari kiméra-képző képességéért.

Ezért több újonnan alapított embrionális ős-sejtvonalat és az igen jól jellemzett kontroll R1 ES sejtvonalat *in vitro* differenciáltattunk és követtük számos, az embrió korai differenciálódásért és sejtleszármazás alakulásáért felelős gén expresszióját. Megvizsgáltuk az Oct-4 korai, pluripotenciáért felelős transzkripciós faktort és mindazon géneket, amelyek szignálútvonalában szerepet játszanak. Más fontos géneket —mint a telomeráz vagy Lif receptor— is bevontunk a kísérletekbe, melyeknek szerepük lehet az őssejt megújulásában, illetve a pluripotencia fennmaradásában.

Az Oct-4 expressziós szintjének csökkenését figyeltük meg a differenciálódó EB csomókban, ami irodalmi adatokkal egyezést mutat (Pesce és Schöler, 2001). Mindazonáltal, az Oct-4 abszolút mennyiségét illetően különbségeket detektáltunk a sejtvonalak között. Az F2 és a CBA sejtvonalak esetében az expressziós szint magasabb volt. Megítélésünk szerint ez lehet felelős azért, hogy ezekből a vonalakból kisebb hatékonysággal lehet csak embrionális őssejtvonalat alapítani és kimérát létrehozni. Az Oct-4 expressziója ugyanis három cis-szabályozó régiótól függ. Az első a minimál promóter (MP) régió, a második a proximális enhancer (PE) régió, míg a harmadik a disztális enhancer régió (DE; 17. ábra). A PE felelős a gén retinsav-függő repressziójáért (Okazawa et al. 1991; Minucci et al. 1996), míg a DE régió felel a megfelelő Oct-4 expresszióért az implantáció szakasza alatt (Yeom et al. 1991). A minimál promóter számos átfedő kötőhelyet tartalmaz: így megtalálható egy GC box, amely az Sp 1 transzkripciós család tagjait köti, és három Hormone Response Element (HRE), amelyek pl. retinsavat is képesek megkötni (Okazawa et al. 1991; Pikarsky et al. 1994; Schoorlemmer et al. 1994; Sylvester és Schöler 1994). Jól ismert, hogy az Oct-4 mRNS-szintje befolyásolja az Oct-4 aktivációs útját. Ha magas, az ES sejtek endoderma és mezoderma irányba differenciálódnak, míg ha az mRNS szint

alacsony, az a trofektoderma irányba történő differenciálódásnak kedvez (Niwa et al. 2000; Niwa 2001). Csak a "normális" mRNS szint képes megőrizni az ES sejtek pluripotens állapotát (Niwa et al. 2000; Pan et al. 2002).

A "normális" Oct-4 mRNS szint nem kvantitatív vizsgálat eredménye, így abszolút értelemben sajnos nem adható meg. Az irodalomban közölt eredmények alapján tehát csak feltételezhetjük, hogy a pluripotens, ivari kimérát is képző ES sejtvonalak pluripotenciájához szükséges génexpressziós szint tekinthető normálisnak. A hipotézis bizonyításához azonban több ilyes ES sejtvonal egyidejű, lehetőleg kvantitatív RT-PCR technikával végzrett összehasonlító vizsgálata lenne szükségres.Ezek alapján az egyes sejtvonalak között detektálható Oct-4 expressziós szint különbség magyarázatot adhat a sejtvonalak különböző pluripotenciájára és *in vivo* kiméra-képző képességére.

Az Oct-4 különböző módon képes a génexpresszió aktiválására, amelyet három modellel magyarázhatunk. Az első szerint az E1A fehérje az Oct-4-hez egy cink-ujj motívumon keresztül képes kötődni (Schöler et al. 1991) és egy transzkripciós komplexet létrehozni, ami további faktorokat is képes megkötni (Pesce et al. 1998; Pesce és Schöler 2001).

A második modell szerint az Oct-4 egy oktamer-kötő motívumon keresztül közvetlenül kapcsolódik a DNS-hez. Erre a legjobb példa az Fgf4 aktivációja pluripotens sejtekben. Az Fgf4 mRNS-e az embrióban maternális RNS formájában van jelen, ami az első osztódások során csökken, de mennyisége később, a blasztociszta stádiumban jelentősen megnő. Expressziója ilyenkor az ICM-re korlátozódik (Fraichard et al. 1995, Rappolee et al. 1994). Az Fgf4 3' UTR részén található enhancer régió tartalmazza az oktamer-kötő motívumot, valamint a Sox2 kötőhelyet (Curatola és Basilico, 1990; Yuan et al. 1995). Az Oct-4 és a Sox-2 DNS-hez való kötődése az Fgf4 transzaktivációjához vezet. Ugyanezt az aktivációs modellt találjuk az Utf1 (Nischimoto et al. 1999), valamint a Rex1 (Ben-Shusan et al. 1998) transzkripciós koaktivátorok esetében is.

A Sox2 expressziós mintázata megegyezett az embrionális differenciálódás során detektált, Avilion és csoportja által 2003-ban leírttal. A sejtvonalak között nem volt észlelhető jelentős különbség a differenciálódás kezdeti szakaszában, körülbelül a 4. napig, azonban azt követően az R1 sejtvonalban jelentős csökkenést mutatott. A többi vizsgált sejtvonalban a transzkriptum mennyiségének csökkenése csak a 9. és 10. napon volt jól detektálható.

Az Fgf4 esetében, melynek expresszióját Sox2 - Oct4 komplexek aktiválják (Pesce és Schöler 2001), az mRNS-szint lassú csökkenést mutatott, ami egybevág a korábbi irodalmi adatokkal (Niswander és Martin, 1992; Rappolee et al. 1994). A sejtvonalak között kis különbségek voltak felfedezhetők: a differenciáció késői szakaszában az mRNS hiányzott az R1 és $mstn^{-/-}/Egfp^{+/+2}$ EB csomókból, de az F2, CBA és $mstn^{-/-}/Egfp^{+/+1}$ vonalakban kimutatható volt. Ez a variancia a sejtvonalak közötti törzskülönbségek jele lehet, amely rámutat a CBA törzsből történő ES sejtvonal alapítás korlátozottságára (Niwa et al. 2000; Nichols et al. 1998).

Nem találtunk különbséget a hat sejtvonal között az Utf1 és Rex-1 expressziós mintázatában. Az IL-6 citokin családba tartozó LIF receptor

expresszióját differenciálódó ES sejtekben szintén megvizsgáltuk. A LIF szignálútvonala, mely az ES sejtek pluripotencia fenntartásának egyik fő fehérjéje, a LIF receptor komplexen keresztül vezet. Így a receptor jelenléte jelzi, hogy az ES sejt receptív-e vagy sem, bár a gp190-ként is ismert LIF receptor alegység egyéb IL-6 citokin receptoroknak is része. Ez azt jelenti, hogy a receptor jelenléte megjósolható, de nem bizonyítható a LIF receptor aktivitása (Metcalf, 2003). A receptor hiánya azt jelezheti, hogy a LIF fehérje más IL-6 receptorokon keresztül hathat, de arra eddig nincs bizonyíték, hogy a LIF más receptorokon keresztül fejtené ki hatását (Mountford et al. 1994). Megfigyeléseink azt mutatják, hogy minden ES sejtvonalunk LIF- és fibroblaszt-függő: embrionális fibroblaszt-eredetű tápláló sejtréteg nélkül a sejtvonalaink nem voltak fenntarthatóak. Így a LIF receptor mRNS szükséges a normális proliferáció és pluripotencia fenntartásához. A LIF receptor transzkriptum mennyisége igen hasonló mintázatot mutatott a sejtvonalakon, szintje alig változott a differenciáltatás 10 napja alatt: csupán az R1 és F2 sejtvonalakon mutatott jelentősebb csökkenést a 7-10. napokon a kezdeti szinthez (d0) képest, ami a pluripotencia megszűnésére utalhat.

A telomeráz reverz transzkriptáznak egér ES sejtekben való expressziója vitatott. Míg humán ES sejtvonalakban nagyfokú telomeráz aktivitást figyeltek meg (Thomson et al. 1998), egér esetében a napvilágot látott adatok elég eltérőek: míg egyesek nem találtak, mások erős expresszióról számoltak be. Így a telomeráz reverz transzkriptáz aktivitás szerepe és szükségessége még vizsgálat tárgya. Mi az F2 kivételével (ahol nem tudtunk telomeráz reverz transzkriptáz mRNS-t kimutatni), az összes sejtvonalban kismértékű telomeráz aktivitást észleltünk. Az aktivitás a differenciálódó és proliferáló EB csomó sejtekben is megfigyelhető volt. Az EB csomókban a differenciáció és a proliferáció párhuzamos folyamat, így a differenciáció ellenére a telomeráz mRNS kimutatható egy darabig az EB csomókban.

A négy, telomerázt expresszáló sejtvonal telomeráz aktivitásában nem találtunk különbséget. Azonban a telomeráz negatív F2 sejtvonalnál az mRNS hiánya lehet felelős az F2 sejtvonal nem-kiméraképző természetéért. Mivel nincs egyértelmű bizonyíték a telomeráznak az egér ES sejt pluripotenciájában betöltött közvetlen szerepére, további vizsgálatok szükségesek e hipotézis bizonyítására. További kutatást, illetve hosszabb differenciáltatási periódust igényel továbbá annak vizsgálata is, hogy a sejtek pluripotenciájának teljes eltűnésével a differenciálódás során mikorra szűnik meg a telomeráz expresszió.

Eredményeink szerint a különböző ES sejtvonalakban megfigyelt eltérő expressziós mintázat felelős lehet az egértörzsek közötti megfigyelt különbségekért. A kérdés egyértelmű megválaszolásához azonban egyéb törzsekből alapított sejtvonalakra és embrióik összehasonlító vizsgálatára van szükség. Az irodalomban eleddig közzétett génexpressziós vizsgálatok eredményei mindig csak egy bizonyos egértörzsre vonatkoztak, így nincs adat az expresszió törzsfüggőségére vonatkozóan.

Eredményeinkből azonban az is kiderül, hogy jelenlegi ismereteink szerint nincs mód a pluripotencia vizsgálatakor a vizsgálati paraméterek számának csökkentésére. Sőt, az *in vivo* kiméra analízis sem hagyható el. Önmagában egyetlen vizsgált faktor sem mutatott egyértelmű és szoros korrelációt a vizsgált sejtvonal majdani kiméra, illetve ivari kiméra-képző képességével. Ez azt jelenti, hogy jelenlegi tudásunk alapján több sejtfelszíni marker jelenlétének együttes vizsgálata, enzimaktivitási vizsgálatok és génexpressziós vizsgálatok egyaránt szükségesek az ES sejtvonalak *in vitro* jellemzéséhez, az *in vivo* kiméra kísérletek pedig továbbra sem hagyhatók el. A pluripotencia meghatározása további, széleskörű vizsgálatokat igényel.

differenciálódás nyomonkövetésére két Az izomszövet módszert alkalmaztunk. Az ES sejtvonalak in vitro differenciáltatását, mely régóta ismert és egyre szélesebb körben alkalmazott technika a szöveti differenciálódás során zailó folyamatok megismerésére (O'Shea 1999; Wobus és Boheler 1999). A másik, az izomszövetből izolált ún. szöveti eredetű őssejtek vagy más néven szatellita sejtek izomszövet irányú in vitro differenciáltatása, amely egyre elterjedtebb vizsgálati eljárás az izomdifferenciálódás tanulmányozására (Cornelison és Wold 1997; Zammit et al. 2002; Qu-Petersen et al. 2002). Tudomásunk szerint azonban ez az első olyan tanulmány, amely e két módszert együtt alkalmazza, az általuk kapott eredményeket összehasonlítva, az eredményeket ötvözve jut következtetésekre. Az általunk kialakított kísérleti rendszer tehát ebben a tekintetben is egyedülálló és úttörő jellegű a különböző őssejtek szöveti differenciáltatása terén. Az eljárások ötvözésével a korai, embriogenezis során zajló folyamatok ez által a fejlődés későbbi szakaszában zajló regeneráció, mint neogenezis folyamatával is összefüggésbe hozhatók.

Az újonnan alapított sejtvonalak differenciációs kapacitását is teszteltük: nem találtunk szignifikáns különbséget az $mstn^{-/-}/Egfp^{+/+}$ és $mstn^{+/+}/C$ törzsből származó sejtvonalak között. Mindamellett enyhe eltérés volt tapasztalható a differenciálódás idejét tekintve. Az izomdifferenciálódás első jeleként megjelenő kontraháló EB csomók később jelentek meg a mutáns sejtvonalban, mint a kontrollban. Azonban a kontrakciós idő is tovább tartott, jobban elhúzódott. Ezek a különbséget azt mutatják, hogy a miosztatin befolyással lehet az izom differenciálódás időbeli lefutására. Az *mstn* mutáns egerekben a miosztatin befolyásoló hatása nem érvényesülhet, így valószínűleg a hosszabb ideig zajló proliferáció miatt csak késve indul meg a differenciáció az *in vitro* kultúrákban is. Ezek a megfigyelések egybevágnak azokkal a publikált adatokkal, amelyek a miosztatin sejt proliferációt gátló hatásáról számolnak be (Thomas et al. 2000; Langley et al. 2002).

Ahhoz, hogy a miosztatin hatását tanulmányozhassuk, a differenciálódás során zajló génexpressziót szükséges vizsgálnunk. A gének széles skáláját vontuk be a vizsgálatokba: mind az izomszövet differenciálódás regulációjában, mind a struktúrgének szabályozásában, mind pedig a sejtciklusban szerepet játszó, az izom differenciálódás során ható géneket megvizsgáltuk. Összesen 17 génre terjesztettük ki vizsgálatainkat. A gének egy részét az irodalomban végzett kutatás alapján, míg másokat részletes szekvencia analízissel választottuk ki. A szekvenciaanalízis során lehetséges transzkripciós faktor kötőhelyeket kerestünk azzal a céllal, hogy olyan új faktorokat vonjunk be a kutatásba, amelyekre eddig még nem került sor. Másrészt pedig az eddig már feltárt összefüggések bizonyítékául is szolgálhat a részletes szekvencia analízis.

Két lehetséges reguláló faktort, a Smad3-at (az MRF-ek egy upstream szabályozó faktorát), valamint az ivarspecifikus Sox5-öt vizsgáltuk abból a szempontból, hogy gyakorolnak-e valamilyen hatást a miosztatinra vagy kimutatható-e valamilyen ok-okozati összefüggés köztük és a miosztatin között. A miosztatin mutáns egér ivari dimorfizmusát a *Cmpt* egérben először Varga és csoportja írta le 1997-ben, amit McMahon és munkatársai is megerősítettek más, *mstn* mutáns egérmodellen (2003). Feltehető, hogy egy, az ivarra ható vagy azt meghatározó faktor a miosztatinra is hatással lehet, és a hipertrófia fenotípusos expresszióját is befolyásolhatja.

Az embrionális őssejtek vázizommá történő *in vitro* differenciálódását semikvantitatív RT-PCR-rel vizsgáltuk. A differenciálódást izom-őssejtek (szatellitasejtek) differenciálódásával is összehasonlítottuk. Mind az embrionális őssejtek, mind a szatellitasejtek esetében különbséget találtunk az *mstn* mutáns és kontrol vonalak MRF génexpressziós mintázataiban. A kontroll sejtek expressziós profilja összevethető volt az izomsejtek embrionális differenciációja során megfigyelt és leírt embrionális expressziós mintázattal. Az MRF-ek expressziójának időbeli megjelenése megegyezett az *in vivo* embriogenezis során detektált expressziós mintázattal (Palmer és Rudnicki 2002). Az R1 és a *mstn*^{+/+}/*C* kontroll vonalak közötti expressziós különbség nem volt jelentős, de kvantitatív RT-PCR nélkül ez nem volt igazolható.

A Rohwedel és mtsai által megfigyelt és leírt (1998) expressziós mintázatok a MyoD expresszió időzítésében különböztek a mi eredményeinktől. Kísérleteinkben a MyoD expressziója mind a kontroll, mind a mutáns sejtvonalban korábban, az EB csomók zselatinra helyezésekor (D10) megkezdődött, bár nagyon gyenge intenzitással. A mutáns sejtvonalakban megfigyelt korai és elnyújtott MyoD-expresszió azt jelzi, hogy a MyoD expressziójára a miosztatin hatással van. Mutáns sejtekben ennek a hatásnak nincs jele. Ez megegyezik Oldham és mtsai adataival (2001), akik miosztatin hatására a MyoD expressziójának csökkenését figyelték meg kontroll állatokban. A szarvasmarha miosztatin promóter aktivitás vizsgálatának alapján Spiller és csoportja (2002) arra a következtetésre jutott, hogy a miosztatin a MyoD célgénje, amely szabályozza expresszióját. Azonban a mi megfigveléseink alapján ez nem jelenthető ki egyértelműen. A számos MyoDkötőhely, amit az egér miosztatin gén nem kódoló régiójában azonosítottunk, megerősíti ezt a feltételezést, de az mRNS szintiének megváltozását nem tudtuk kísérletesen kimutatni.

A Miogenin és az MRF4 esetében egy expresszió-csökkentő hatás szintén megfigyelhető volt: a miosztatin hiánya mindkét transzkriptum szintjének emelkedését vonta maga után a mutáns sejtekben. A miosztatin upstream szekvenciáin leírt nagyszámú miogeninin-kötőhely azt valószínűsítheti, hogy a miogenin a miosztatin szabályozására is hatással lehet.

Az eddig ismertetet eredmények alapján úgy gondoljuk, hogy az MRF faktorok és a miosztatin egymásra hatása, a reguláció kölcsönös. A MyoD, miogenin és Smad3 transzkripciós faktor kötőhelyek nagy száma az 5' és 3' nem transzlálódó régióban valószínűsíti, hogy e faktorok képesek kötődni, így aktiválni a miosztatin génexpresszióját. Ennek bizonyítására azonban DNS-fehérje kölcsönhatás vizsgálat szükséges, hiszen a kötőhelyek megléte csak valószínűsíti a hatást, azonban nem elégséges bizonyíték a valódi aktiválásra.

A mutáns sejtvonalban az MRF faktor gének megnövekedett transzkripciós aktivitása azt sugallja, hogy a miosztatin képes csökkenteni e gének aktivitását a kontroll sejtvonalakban. Ha az első feltételezés igaz, vagyis az MRF faktor kötőhelyek nem véletlenül vannak jelen a miosztatin gén szabályozó régiójában, hanem általuk aktiváló hatást fejtenek ki a génre az MRF faktorok, akkor a kísérleteinkben megfigyelt, ezzel szinte ellentétes hatás csak egy módon magyarázható. Akkor, ha a két mechanizmus együtt, egyszerre zajlik, vagyis ha a miosztatin szint maga is képes regulálni a MyoD termelődést, nem csak a MyoD a miosztatin aktivitást. Így egy feedback mechanizmus regulálja aktivitásukat. Vizsgálataink eredményeiből nem dönthető el egyértelműen, hogy a MyoD vagy a miosztatin tölti-e be a feedback szerepet. Ezt csak MyoD vagy Miogenin knockout egértörzsekben végzett vizsgálatokkal lehetne egyértelműen eldönteni. Az általunk feltételezett hatásmechanizmust a 38. ábra szemlélteti.



38. ábra. A miosztatin feltételezett hatásmechanizmusa a sejtosztódás során A miosztatin a sejtosztódás p21 fehérjén keresztül fejti ki a myoblast prolifrációt gátló hatását. A miosztatin szintet azonban a MyoD közvetlenül a miosztatin génhez kötődve képes befolyásolni. Ugyanakkor a miosztatin az ActR II recepztoron keresztül képes a Smad kaszkádot aktiválni, amely a Smad3 transzkripciós faktoron keresztül a MyoD termelődésére is hathat. Így egy ún. feedback mechanizmus képes a miosztatin szintet szabályozni, ezzel regulálni az egészséges izomban történő myoblast proliferciót. További növekedési faktorok, mint a Pax3 és Pax7 a MyoD szintjének szabályozásán keresztül fejthetik ki hatásukat a miosztatinra, így az myoblast proliferációra nézve. Két, a sejtciklus szabályozásában szerepet játszó gén expresszióját is megvizsgáltuk. Amíg a Cdk2 expressziós szintje növekedést mutatott, addig a p21 csökkent expresszióját detektáltuk a mutáns sejtvonalban. Ez a megfigyelés összhangban áll Thomas és mtsai (2000), valamint Joulia és mtsai (2003) közölt eredményeivel. A kapott eredmények azt bizonyítják, hogy a miosztatinnak jelentős szabályozó hatása van a sejtosztódást illetően: amikor a mutáns miosztatin sejtosztódást gátló hatása nem képes érvényesülni, így a p21 csak csökkent szinten expresszál (hiszen nem aktiválja a miosztatin), így nem képes a Cdk2 inhibícióra sem. A Cdk2 szint így a normálishoz képest magasabb marad a mutáns sejtekben, amely az Rb fehérje foszforilációján keresztül a proliferációt serkenti.

Annak ellenére, hogy számos Smad3 kötőhelyet azonosítottunk a Gdf8 lókusz 5' régiójában, nem tudtunk szignifikáns változást kimutatni sem az ES-, sem pedig a szatellitasejtek mutáns és kontroll sejtjei között a Smad3 expreszióban. Mindazonáltal a Smad3 expresszió kissé eltért az R1 és $mstn^{+/+}/C$ sejtvonalak között. Ennek okát azonban nem tudtuk feltárni. Itt kell megjegyeznünk, hogy az általunk használt detektálási rendszer nem alkalmas arra, hogy különbséget tegyen a nem a miosztatin mutációból eredő esetleges eltérésekre, amelyek a mutáns és nem mutáns sejtvonalak között lehetnek. Ahhoz, hogy az $mstn^{+/+}/C$ és R1 sejtvonalak közötti különbségek okát feltárhassuk, további kvantitatív RT-PCR reakciókra lenne szükség (Real time RT-PCR).

Annak ellenére, hogy mi a Smad3 kölcsönhatásra nem találtunk bizonyítékot az expressziós mintázatot illetően, mások eredményei bizonyítani látszanak a feltételezett kapcsolatot (Langley et al. 2002). Ezek szerint primer szarvasmarha myoblast kultúrákban és C_2C_{12} sejtvonalakban Langley és kollégái a Smad3 megemelkedett szintjét detektálták, amely közvetlenül hat a MyoD szintre: miosztatin adagolás hatására lecsökkent a sejtekben. Ez azt jelenti, hogy az MRF-ek esetén leírt mechanizmus, amelyet a 38. ábra szemléltet, a Smad3 fehérjén keresztül valósulhat meg, hiszen ez az a fehérje, amely a miosztatin receptor ActRIIB alegység citoplazmás doménjéhez kötődik, és aktiválódik.

A paired homeobox fehérjecsalád tagjai, a Pax3 és Pax7 szükségesek a szatellita sejtek kialakulásához (Seale et al. 2000) valamint az izomszövet differenciálódáshoz (Borycki és Emerson, 1997; Kay et al. 1998). Az *mstn* mutáns sejtekben mindkét faktor expressziós szintje növekedést mutatott, amely alátámasztani látszik a miosztatin izomszövet differenciálódás során betöltött negatív reguláló szerepét. Az *mstn* mutáns ES sejtekben (és állatokban, amelyekből a szatellita és myoblast kultúrákat izoláltuk) a miosztatin nem képes a proliferáció gátlására, és így a myoblast osztódás leállítására. Valószínűleg ugyanez igaz a szatellita sejtek osztódására is. Így a legtöbb osztódásban szerepet játszó gén aktív marad, amelyet mi a kontroll sejtvonalhoz képest az expresszió növekedéseként is értelmezhetünk, holott valójában a kontroll sejtvonalakban bekövetkező csökkenésről van szó! Ugyanígy az IGF-1 esetén is expressziós szintnövekedést detektáltunk a mutáns sejtekben. Ezek a megfigyelések mind a miosztatin sejt-proliferációt reguláló hatását támasztják alá, amely hatást a myoblastok sejtciklus szabályozásán keresztül fejt ki. Így a miosztatin nem más, mint egy izomszövet

specifikus sejtosztódás szabályozó fehérje (Thomas et al. 2000; Oldham et al. 2001; Langley et al. 2002, Joulia et al. 2003). A kérdés már csak az, hogy a sejtosztódást szabályozó hatás miért csak az izomsejtekben nyilvánul meg.

Feltételezések szerint korábban nem csak az izomszövetben ható szabályozó szerepről volt szó, hanem más szövetekre is kiterjedt a hatása. Az irodalmi áttekintésben részletezett expressziós aktivitás az emlősöktől különböző rendszertani kategóriákban igen eltérő. A gerincesek között a halaknál találjuk a legváltozatosabb expressziós mintázatot és a két izoformát. Ahogy haladunk felfelé az evolúciós létrán, az egyre magasabb rendű szervezetek felé a miosztatin szerepe, vagyis expressziós mintázata egyre szűkül, mintegy specializálódik. Az emlősöknél már csak a zsírszövet, de főként a vázizom marad meg expressziós helyül. Feltételezéseink szerint a miosztatin gén szerepe tehát általánosabb volt kialakulásakor, amely feladat és szerep az evolúció során szűkült, így specializálódott. Mindez azt jelenti, hogy a miosztatin sejtcikluson keresztül kifejtett szabályozó funkciója egy ősibb, általánosabb szabályozó funkcióra vezethető vissza, amely a gén regulátor régiójában bekövetkezett változásoknak köszönhetően az evolúció során a magasabbrendű osztályokba egyre inkább az izomszövetre korlátozódott. A regulátor régióban ugyanis olyan, az izomszövet specifitásért felelős faktorok (MvoD, Mef2, miogenin, MCK, stb.) kötőhelyei alakultak ki, amelyek a szöveti specifitást biztosítják. Másik lehetséges magyarázat a halak osztályában tapasztalt igen széles spektrumú expresszióra vonatkozóan a halaknál bekövetkezett genomduplikáció, amely számos génből több kópiát eredményezett. Ennek következtében az azonos gének is különböző szövetekre kiterjedő sokszor igen eltérő aktivitást is mutathatnak. Ezt látszik alátámasztani az agy/izom, illetve ovariális formák megléte a pataki szajblingban (Roberts és Goetz 2003).

vizsgálva a génexpresszió nyomon követésére Tovább iránvuló kísérleteinket, elmondhatjuk, hogy a leglátványosabb különbséget a Sox5 fehérjénél detektáltuk. A tény, hogy ivar determinációban szerepet betöltő faktorok kötőhelyét azonosítottuk a miosztatin szekvencián, már önmagában érdekes eredmény. Ez képes megmagyarázni, hogy miért detektáltak többen is ivarfüggő fenotípus erősséget a miosztatin mutációja esetén (Varga et al. 1997; McMahon et al. 2003; Reisz-Porszasz et al. 2003). A Sox5 expresszió szignifikáns növekedést mutatott a mutáns sejtekben a korai differenciálódás szakaszában Ez az expresszió növekedés magyarázatot adhat az ivari determinizmusra a fenotípus esetében. A Sox5 gén rövid transzkriptuma a herében expresszál, és az ivari determináció meghatározásában tölt be szerepet. Mindemellett létezik egy ún. hosszú, vagy L-Sox5 változata, amely a porcfejlődésben játszik nagyon fontos szerepet a család másik két tagjával kooperációban (Sox 6 és Sox9; Lefebvre 2002). A Sox5 szerepének egyértelmű tisztázásához azonban egyelőre nem áll rendelkezésünkre elég információ, mert a Sox5 gén null-mutáns változatát hordozó egerek azelőtt elpusztulnak az embriogenezis során, hogy a herefejlődésben és ivari determinációban betöltött pontos szerepét megvizsgálhatnák. Így a miosztatin mutáns tenyészetekben detektált Sox5 expressziószint növekedésről csupán a Sox5

here- és spermatida-specifikus expressziója alapján feltételezhető, hogy szerepet játszik a fenotípus ivari determináltságának kialakításában. Azonban az ivar által befolyásolt fenotípus megjelenés okának feltárása további vizsgálatokat igényel.

Az izomszövet szöveti eredetű őssejtjei a szatellita sejtek az izomrost plazma membránja és a bazális lamina között helyezkednek el, a rost felszínén. E sejtek vesznek rész a rost regenerálásában, például egy sérülés esetén. Ezek a sejtek normálisan "csendes" sejtek, azaz minimális génexpressziót mutatnak, ezért kimutatásuk igen nehéz. Csak aktivált állapotban mutathatók ki jól. Ekkor osztódásnak indulnak, majd igen gyorsan megjelenik bennük az izomszövet differenciálódásra jellemző gének expressziója. Éppen ezért ideális modellül szolgálnak az izomszövet differenciálódás tanulmányozásához (Zammit és rendszerünkben Beauchamp 2001). Kísérleti e szöveti őssejtek differenciálódásának vizsgálatával kívántuk igazolni, hogy az általunk használt ES sejtvonal differenciáltatás során kapott eredmények megfelelnek a normális szöveti differenciálódás során kapott expressziónak.

Az expressziós mintázat, amelyet a szatellita sejtek differenciálódása során detektáltunk konzisztens számos korábban megjelent tanulmányban közölt eredménnyel (Hawke és Garry, 2001). A frissen izolált szatellita sejteknél egy igen csekély expressziós aktivitást tudtunk detektálni, a sejtek jelentős része "csendes" volt. Számos, különböző eredmény jelent már meg a szatellita sejtek "nyugalmi állapotának" expressziós mintázatáról, ezek azonban az izolálás módszere szerint eltérő eredményeket adtak. Ugyan ez a helyzet az aktiváció során bekövetkező génexpressziós mintázatnál is (Cornelison és Wold 1997). Kísérleteinkben az izolálási módszerből adódóan egy vegyes sejtpopulációt izoláltunk, amely izom prekurzor sejteket, szatellita sejteket valamint hematopoetikusan aktivált izomszövet eredetű sejteket is tartalmazott (Yablonka-Reuveni és Nameroff 1987). A percoll gradiens centrifugálás, valamint a preplating technika (Qu-Petersen et al. 2002) kombinált alkalmazása lehetővé tette mintegy 98%-os tisztaságú szatellita populáció kinyerését. Ez idő alatt azonban a szatellita sejtek aktiválódása (vélhetően a környezeti változások és az izolációs sokknak köszönhetően) megtörténik, hiszen a preplating 12-16 órát vesz igénybe, mialatt a sejtek in vitro kultúrában vannak. Ez azt jelenti, hogy a nyugalmi állapotra vonatkozó expressziós mintázat (D0) nem csak a szatellita sejtekre igaz és nem biztos, hogy jól jellemzi a preplating utáni populáció expresszióját. Ennek vizsgálatára FACS-eljárás lenne szükséges, a korai elkülönítés és génexpresszió vizsgálatára. A szelekciót követően azonban már valóban csak a szatellita sejtek expressziójára nézve kaphatnánk információkat.

Az MRF faktorok esetén kapott expressziós mintázat (korai MyoD és Myf5 aktiváció, késői MRF4 és miogenin aktivációval együtt), megegyezik azt embriogenezis során leírt szatellita sejtaktiváció génexpressziós mintázatával (Cornelison és Wold 1997; Beauchamp et al. 2000).

Más, a vizsgálatba bevont gének esetén, mint például a p21, Cdk2, Pax3, Pax7, és dezmin, az ES sejtvonalak differenciáltatásakor megfigyelt expressziós

változásokat detektáltunk. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az izomszövet őssejtek differenciáltatása során detektált expressziós mintázat, a miosztatin által kiváltott génexpresszió módosító hatást igazolta.

Eredményeinket hipertrófiás szarvasmarha szatellita és primer myoblast tenyészetek *in vitro* differenciáltatásával hasonlítottuk össze. Tettük mindezt azért, hogy a genetikai modellen, az egéren nyert információk értékét lemérhessük. Habár az irodalmi adatokból több esetben is kitűnt, hogy a modellállatokon gyűjtött információk jól adaptálhatók a modellezett élőlényre, azonban számos esetben különbségek is adódnak a vizsgált fajok rendszertani, fiziológiai eltéréseinek köszönhetően.

Az izomszövet differenciálódás esetén nem utalt arra semmilyen korábbi adat, hogy a szarvasmarha izomzat kialakulásának genetikai programjában eltérne az egérétől, így joggal várhattuk, hogy az egér vizsgálatok eredményei értékes következtetésekkel szolgáljanak számunka.

Ennek bizonyítására kísérletet terveztünk, ahol a szöveti típusú őssejtek és primer izomszövet tenyészetek vizsgálatát tűztük ki célul. Vizsgálatainkat a *fehér-kék belga* szarvasmarha fajtára terjesztettük ki. Azért ezt a fajtát választottuk, mert itt bizonyosak lehettünk abban, hogy a hipertrófia valóban a miosztatin génben bekövetkező mutáció következménye, másrész a fajta fajtatiszta tenyészete megtalálható Magyarországon. A fajta hazai tenyésztő egyesületének segítségével, az Ostffyasszonyfai Petőfi Mgtsz állományából választottunk ivarérett bikákat a vizsgálatokhoz. Kísérleteinkben tűbiopszia módszerét alkalmazva, állatorvos végezte a farizomból a mintavételt. A mintákból párhuzamosan nyertünk szatellita és myoblast tenyészeteket. Ehhez a szövet feltárásánál először egy enyhe enzimes kezelést alkalmazva az első szűrésnél különválasztottuk az igen kis méretű szatellita sejteket, majd pedig a szűrőn fennmaradt szöveti törmeléket tovább kezelve myoblast preparátumot készítettünk. Így egy lépésben, igen hatékonyan lehetett sejteket nyerni a biopsziákból.

A szatellita és myoblast tenyészeteket párhuzamosan differenciáltattuk és az egér kísérletek mintájára az *in vitro* differenciáltatás során mRNS mintát gyűjtöttünk, majd megvizsgáltuk számos gén működését. Az eredmények szoros korrelációt mutattak a miosztatin mutáns egértörzsből alapított ES sejtvonalak, szöveti őssejtek és primer myoblast kultúrák izomszövet differenciálódása során tapasztalt vizsgálati eredményeinkkel. Az adatok összehasonlítása alapján elmondható, hogy az általunk vizsgált faktorok esetében nincs különbség a két faj között a miosztatin által regulált izomszövet differenciálódási kaszkádban. Így a miosztatin mutáns egértörzsön végzett vizsgálataink eredményei jól modellezik a gazdasági haszonnal bíró *fehér-kék belga* szarvasmarhán tapasztalt változásokat.

Morfológiai vizsgálatainkkal a compact egértörzsben bekövetkező fenotípust kívántuk szöveti szinten is jellemezni. Tömegmérési kísérleteinkben a fenotípusra oly jellemző megnövekedett test- és izomtömeget kívántuk kvantifikálni. Eredményeink szerint a miosztatin mutáció által okozott fenotípus testtömegre gyakorolt hatása először szignifikánsan a választáskori testtömegben mérhető. Ezt követően a különbség egyre nő a vizsgált periódusban (16 hetes kor), ami ivar szerinti megoszlást mutat. A detektált különbség megfelel a korában a cmpt egértörzsre (Varga et al. 1997), illetve más miosztatin mutáns törzsre vonatkozó publikációk eredményenek (McMahon et al. 2003.)

Ismert, hogy az emlősök izomrostjai több formai és funkcionális tulajdonság tekintetében különbözők, ami alapján három alapvető csoportba sorolhatók be (Carpenter és Karpati 2001, 41-50. p.; Dubowitz 1985, 41-81. p.). Kísérleteinkben a három alapvető rosttípus, a Pearce által ismertetett (1972) hisztokémiai NADH-tetrazólium reduktáz (NADH-TR) reakció alapján került azonosításra (Carpenter és Karpati 2001, 41-50. p.; Dubowitz 1985, 41-81. p.). Mivel a főbb izmok esetében kvantitatív eredmény a rosttípus összetételét illetően sem normál, sem a mutáns egérben nem áll rendelkezésre, és mert mind a normális, mind a miosztatin izmok szövettani képében a rostok átmérői jelentős varianciát mutattak, úgy döntöttünk, hogy a rostátmérőnek a miosztatin-hiány okozta változását morfometria segítségével fogjuk bizonyítani.

Az is a miosztatin-hiány következményének tekinthető, hogy, bár eltérő mértékben, de az izmok keresztmetszetének átmérője mutáns egérben nagyobb. Úgyszintén, az egyes rosttípusok arányának vizsgálatakor mindegyik vizsgált izomban az I-es típusú rostok mennyiségének jelentős növekedése volt megfigyelhető. Ez is alátámasztja a differenciálódó ES sejtekben megfigyelt megemelkedett MyHC I expressziót.

A miosztatinnak az egyes MyHC típusokra kifejtett eltérő szabályozásával kapcsolatban vannak közvetett bizonyítékok. Artaza és mtsai (2002) az MyHC II típusú izomrostokban miosztatint lokalizáltak. Anti-MyHC antitestek használatával fehér-kék belga szarvasmarha magzatban nagyobb arányban azonosítottak olyan másodlagos rostokat, melyek felnőttkorban több gyorstípusú izomrostot hoznak majd létre.

A MyHC gének és reguláló régiók óriási mérete és összetett szerkezete miatt azonban (Weiss et al. 1999) egy hosszabb és bonyolultabb szekvencia analízis szükséges a miosztatin MyHC típusok expressziójára gyakorolt közvetlen hatás bizonyításához. Ma ugyanis még nem tisztázott, hogy a II-es típusú rostokban megnyilvánuló, rostspecifikus miosztatin expresszió szekvenciális kapcsolatban van-e a miozin nehézlánc génekkel, vagy valamely közvetítő molekula segítségével történik a kommunikáció.

A hisztopatológiai analízisek eredményei számos ponton megegyeznek a hipertrófia, illetve hiperplázia jelensége során leírt eltérésekkel. A korábban már hipertrófia során leírt megnövekedett rostátmérő és hasadt rostok, valamint centrális sejtmagok jelenléte ebbe a sorba tartozik (részletes eligazítást Carpenter és Karpati: Pathology of Skeletal Muscle című munkája ad). A fénymikroszkópos hisztológiai analízis emellett a miosztatin null-mutáns egereken korábban McPherron és munkatársai (1997) leírt csökkent kötőszövet mennyiséget igazoltak, a *cmpt* egértörzsön is. Egyéb, a rostok finomszerkezetét érintő patológiás elváltozás nem volt detektálható. A PAS festés megnövekedett glikogén mennyiségre utal,

azonban ez rosttípussal összefüggő változás is lehet, amelyet a későbbiekben értékelünk.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatok a miofibrillum struktúra épségét igazolták. Korábban az irodalomban még le nem írt, miosztatin mutációval kapcsolatos jelenségként jelentős mitokondrium felszaporodást detektáltunk. A mitokondriumok felszaporodása a sejtmembrán alatti területen volt igen jelentős. Ez a jelenség az ún. mitokondriopátiában fordul elő, amikor patológiás mitokondrium felszaporodás figyelhető meg (Bosche et al. 1989). Ez azonban gyakran mitokondrium szerkezeti elváltozásokkal jár együtt (a mitokondrium kriszták degradáltak; Angelini et al. 1993). Esetünkben nem mutattunk ki mitokondrium kriszta degradációt, a mitokondriumok szerkezete normális volt. További elváltozásként tubuláris aggregátumok kialakulását (TA) figyeltük meg a mutáns állatok izmában. A jelenséget korábban humán és egér miopátiákban írták le (Roullet et al. 1985), azonban Agbulut és mtsai a beltenyésztett egértörzsek idős hím tagjainál is megfigyelték azt (2000). Közleményük szerint tehát kor-, és ivarfüggő a jelenség. Esetünkben ivarérett, 16 hetes korú hímeket választottunk és használtunk fel a szövettani kísérletekhez. A kísérletekben több izmot is megvizsgáltunk. A jelenséggel két állat m. gastrocnemius izmában találkoztunk az ELMI vizsgálatok során. Ez azt jelentheti, hogy a tubuláris aggregátumok kialakulása fiatal állatokban is megfigyelhető volt, a miosztatin mutációval összefüggésben. Habár az ELMI vizsgálatokba bevont egyedek száma alacsony, mégis úgy tűnik, hogy a jelenség összefüggésben van a miosztatin mutációval és az annak hatására kialakuló túlizmolt fenotípussal. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy a TA aggregátumokat az egér kísérletekben egyértelműen a IIB típusú rostokban lokalizálták (Agbulut et al. 2000). A miosztatin mutáns állatok IIB típusú izomrostjainak megnövekedett száma magyarázhatja az aggregátumok előfordulását. Azonban mindeddig nem ismert a tubuláris aggregátumok kialakulásának oka és patológiás kórképe sem, hiszen egészséges egyedekben is előfordulnak (Yoshitoshi et al. 1991). A miosztatin mutációval összefüggő előfordulása véleményünk szerint a hipertrófiás és hiperpláziás izomban bekövetkező fiziológiai változásoknak tudható be, tehát közvetett hatás eredménye. Hipotézisünk szerint a megnövekedett arányú II B típusú rost magas szarkoplazmás retikulum mennyiségével, valamint magas Ca²⁺ és ATPase aktivitásával függhet össze. Erre utal Chevessier és munkatársai munkája, amely a szarkoplazmás retikuláris hálózat fehérjéinek a tubuláris aggregátumokban való lokalizációját és szerepét tárta fel a közelmúltban (2004).

Következtetések és javaslatok
8. Összefoglalás

Új tudományos eredményeim az alábbi pontokban foglalhatók össze:

- 1. Miosztatin mutáns egértörzsből ES sejtvonalakat hoztam létre melyek pluripotenciáját *in vitro* és *in vivo* kísérletekben bizonyítottam.
- 2. Kidolgoztam egy új, kondicionált embrionális ős-sejtvonal alapító tápoldatot és módosítottam az alapítási metodikát. Ezzel az eljárással nonpermisszív egértörzsek embrióiból ES sejtvonalakat alapítottam, amelyek pluripotenciáját *in vitro* és *in vivo* igazoltam.
- 3. A miosztatin mutáns egér ES sejtvonalak izomszövet irányú differenciáltatása során a miosztatin génexpressziót csökkentő hatását mutattam ki az MFR faktorok, a Cdk2, Pax3, Pax7, Igf1, dezmin, és Sox5 esetében, míg az expressziót növelő hatást detektáltam a p21 és Smad3 géneknél.
- 4. A génexpressziós adatokat egér és szarvasmarha izomszövet őssejt- és primer mioblaszt kultúrák párhuzamos differenciáltatásával is igazoltam.
- 5. Részletes hisztopatológiai analízist végeztem miosztatin mutáns és kontroll egyedeket összehasonlítva.

Az izomszövet fénymikroszkópos és elektronmikroszkópos vizsgálata során mitokondriopátiát és korai tubuláris aggregátum képződést írtam le.

Analizáltam a hipertrófiás izomban kialakuló rostátmérő növekedést, ahol a fehér típusú rostok számának és területének növekedését detektáltam, melyet *in vitro* génexpressziós vizsgálataim is alátámasztottak.

The new scientific results of the experiments are the following:

- 1. Es cell lines have been derived from myostatin mutant mouse strain. Their pluripotency has been verified *in vitro* and *in vivo*.
- 2. A new medium has been developed and the method has been modified for derivation of ES cell lines. This enabled the derivation of ES cell lines from non-permissive mouse strains. The pluripotency of these cell lines has been proven *in vitro* and *in vivo*.
- 3. It was found that in myostatin mutant mouse-derived ES cells differentiating in muscle, the myostatin decreases the expression of genes of MFR factors, Cdk2, Pax3, Pax7, Igf1, dezmin, and Sox5 and increases the expression of p21 and Smad3.
- 4. The data of gene expression have been verified by parallel differentiation of mouse and bovine muscle stem cells and primary myoblast cultures.
- 5. Detailed histopathological analysis has been made in the comparison of myostatin mutant and control animals. Investigations by light microscopy and TEM revealed mitochondriopathy and forming of early tubular aggregates. The increased diameters of muscle fibres in hypertrophic muscles have been analysed and it was found that the number and the cross section area of the white type fibres increased. This was reinforced by *in vitro* gene expression analysis.

9. Mellékletek

M1. Irodalomjegyzék

- Agbulut O., Destombes J., Thiesson D., Butler-Browne G. (2000): Age-related appearance of tubular aggregates in the skeletal muscle of almost all male inbred mice. *Histochem Cell Biol*, 114 (6) 477-481. p.
- Ambrosetti D. C., 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*, 17 6321-6329. p.
- Andrews P. W. (2002): From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Phil Trans Roy Soc B*, 357 405–417. p.
- Angelini C., Melacini P., Valente M. L., Reichmann H., Carrozzo R., Fanin M., Vergani L., Boffa G. M., Martinuzzi A., Fasoli G. (1993): Hypertrophic cardiomyopathy with mitochondrial myopathy. A new phenotype of complex II defect. *Jpn Heart J*, 34 (1) 63-77. p.
- Arnold H. H., Winter B. (1998): Muscle differentiation: more complexity to the network of myogenic regulators. *Curr Opin Genet Dev*, 8 539-544. p.
- Artaza J. N., Bhasin S., Mallidis C., Taylor W., Ma K., Gonzalez-Cadavid N. F. (2002): Endogenous expression and localization of myostatin and its relation to myosin heavy chain distribution in C2C12 skeletal muscle cells. *J Cell Physiol*, 190 (2) 170-179. p.
- Arthur P. F. (1992): Double muscling in cattle: A review. Aust J Agr Res, 46 1493-1515. p.
- Asakura A., Rudnicki M. A. (2002): Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation. *Exp Hematol*, 30 1339-1345. p.
- Asakura A., Seale P., Girgis-Gabardo A., Rudnicki M. A. (2002): Miogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol*, 159 123-134. p.
- Auerbach W., Dunmore J. H., Fairchild-Huntress V., Fang Q., Auerbach A. B., Huszar D., Joyner A. L. (2000): Establishment and chimera analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-derived mouse embryonic stem cell lines. *Biotechniques*, 29 (5) 1024-1032. p.
- Avilion A. A., Nicolis S. K., Pevny L. H., Perez L., Vivian N., Lovell-Badge R. (2003): Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Gene Dev*, 17 (1) 126-140. p.
- Bain G., Kitchens D., Yao M., Huettner J. E., Gottlieb D. I. (1995): Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol*, 168 (2) 342-357. p.
- Baker R. K., Lyons G. E. (1996): Embryonic stem cells and in vitro muscle development. *Curr Top Dev Biol*, 33 263-279. p.
- Beauchamp J. R., Heslop L., Yu D. S., Tajbakhsh S., Kelly R. G., Wernig A., Buckingham M. E., Partridge T. A., Zammit P. S. (2000): Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol*, 151 (6) 1221-1234. p.
- Bjornson C. R. R., Rietze R. L., Reynolds B. A., Magli M. C., Vescovi A. L. (1999): Turning brain into blood: hematopoetic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*, 283 534-537. p.
- Boehm M. L., Kendall T. L., Thompson V. F., Goll D. E. (1998): Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. *J Anim Sci*, 76 2415-2434. p.

- Boettiger D., Enomoto-Iwamoto M., Yoon H. Y., Hofer U., Menko A. S., Chiquet-Ehrismann R. (1995): Regulation of integrin alpha 5 beta 1 affinity during myogenic differentiation. *Dev Biol*, 169 (1) 261-272. p.
- Bogdanovich S., Krag T. O., Barton E. R., Morris L. D., Whittemore L. A., Ahima R. S., Khurana T. S. (2002): Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature*, 420 (6914) 418-421. p.
- Borycki A. G., Emerson C. P. (1997): Muscle determination: another key player in myogenesis? *Curr Biol*, 7 (10) R620-623. p.
- Borycki A. G., Li J., Jin F., Emerson C. P., Epstein J. A. (1999): Pax3 functions in cell survival and in pax7 regulation. *Development*, 126 (8) 1665-1674. p.
- Bosche J., Hammerstein W., Neuen-Jacob E., Schober R. (1989): Variation in retinal changes and muscle pathology in mitochondriopathies. *Graef Arch Clin Exp*, 227 (6) 578-583. p.
- Botquin V., Hess H., Fuhrmann G., Anastassiadis C., Gross M. K., Vriend G., Schöler H. R. (1998): New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. *Gene Dev*, 12 2073-2090. p.
- Bölcskey K., Sárdi J., Bozó S. (1995a): A fehér-kék belga keresztezés magyarországi első eredményei. Előadás. Tiszántúli Mezőgazdasági Tudományos Napok, Hódmezővásárhely, 1995
- Bölcskey K., Sárdi J., Bozó S. (1995b): Minőségi vágómarha előállítás fehér-kék belga fajtával. Poszter. AgriUniv. '95, Mezőgazdasági Kiállítás és Vásár, Gödöllő, 1995
- Bölcskey K., Sárdi J., Bozó S. (1996): Haszonállat előállító keresztezés a fehér-kék belga fajta "culard" típusával. 1. Közlemény: Hizlalás. *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 45 (2-3) 163-183. p.
- Bradley A., Evans M., Kaufman M. H., Robertson E. (1984): Formation of germ line chimeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309 87-89. p.
- Brook F. A., Gardner R. L. (1997): The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl. Acad Sci USA*, 94 5709-5712. p.
- Buckingham M. (2001): Skeletal muscle formation in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev*, 11 (4) 440-448. p.
- Bunger L., Laidlaw A., Bulfield G., Eisen E. J., Medrano J. F., Bradford G. E., Pirchner F., Renne U., Schlote W., Hill W. G. (2001): Inbred lines of mice derived from long-term growth selected lines: unique resources for mapping growth genes. *Mamm Genome*, 12 (9) 678-686. p.
- Carlson C. J., Booth F. W., Gordon S. E. (1999): Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am J Physiol*, 277 (2 Pt 2) R601-606. p.
- Carpenter S., Karpati G. (2001): Pathology of the skeletal muscle. Oxford, UK: Oxford University Press. 662 p.
- Chang J. K., Jeong D. L., Hong Y. H., Park T. S., Moon Y. K., Ohno T., Han J. Y. (1997): Production of germ line chimeric chickens by transfer of cultured primordial germ cells. *Cell Biol Int*, 21 495-499. p.
- Charlier C., Coppieters W., Farnir F., Grobet L., Leroy P. L., Michaux C., Mni M., Schwers A., Vanmanshoven P., Hanset R., Georges M. (1995): The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine Chromosome 2. *Mamm Genome*, 6 788-792. p.

- Chen J., Sanberg P. R., Li Y., Wang L., Lu M., Willing A. E., Sanchez-Ramos J., Chopp M. (2001): Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke*, 32 (11) 2682-2688. p.
- Chevessier F., Marty I., Paturneau-Jouas M., Hantai D., Verdiere-Sahuque M. (2004): Tubular aggregates are from whole sarcoplasmic reticulum origin: alterations in calcium binding protein expression in mouse skeletal muscle during aging. *Neuromuscular Disord*, 14 (3) 208-216. p.
- Cibelli J. B., Stice S. L., Golneke P. G., Kane J. J., Jerry J., Blackwell E. S. C., Ponce de Leon F. A., Robl J. M. (1998): Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat Biotechnol*, 16 642-646. p.
- Collodi P., Kamei Y., Sharps A., Weber D., Barnes D. (1992): Fish embryo cell cultures for derivation of stem cells and transgenic chimeras. *Mol Mar Biol Biotech*, 1 257-265. p.
- Conley B. J., Young J. C., Trounson A. O., Mollard R. (2004): Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells. *Int J Biochem Cell B*, 36 (4) 555-567. p.
- Cornelison D. D. W., Wold B. J. (1997): Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol*, 191 270-283. p.
- Cossu G., Tajbakhsh S., Buckingham M. (1996): How is myogenesis initiated in the embryo? *Trends Genet*, 12 (6) 218-223. p.
- Culley G. (1807): Observations on Livestock. 4th ed. London, UK: G. Woodfall.
- Curatola A. M., Basilico C. (1990): Expression of the K-fgf proto-onco-gene is controlled by 3' regulatory elements which are specific for embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol*, 10 2475-2484. p.
- Dani C., Smith A. G., Dessolin S., Leroy P., Staccini L., Villageois P., Darimont C., Ailhaud G. (1997): Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci*, (Pt 11) 1279-1285. p.
- Delhaise F., Bralion V., Schuurbiers N., Dessy F. (1996): Establishment of an embryonic stem cell line from 8-cell stage mouse embryos. *Eur J Morphol*, 34 237-243. p.
- Doetschman T. C., Eistetter H. R., Katz M., Schmidt W., Kemler R. (1985): The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: Formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morph*, 87 27-45. p.
- Doetschman T. C., Williams P., Maeda N. (1988): Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. *Dev Biol*, 127 224-227. p.
- Dohy J. (1979): Állattenyésztési genetika. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó. 196 p.
- Dohy J. (1989): Az állattenyésztés genetikai alapjai. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó. 242 p.
- Donovan P. J., Gearhart J. (2001): The end of the beginning for pluripotent stem cells *Nature*, 414 92-97. p.
- Drab M., Haller H., Bychkov R., Erdmann B., Lindschau C., Haase H., Morano I., Luft F. C., Wobus A. M. (1997): From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: a retionic acid and db-cAMP *in vitro* differentiation model. *FASEB J*, 11 905-915. p.
- Dubowitz V. (1985): Muscle biopsy: a practical approach. London, UK: Balliere Tindall Press. 214 p.

- Edmondson D. G., Lyons G. E., Martin J. F., Olson N. E. (1994): Mef2 gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. *Development*, 120 1251-1263. p.
- Edmondson D. G., Olson E. N. (1989): A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev.* **3** (5) 628-640. p.
- Edwards R. G. (2004): Stem cells today: A. Origin and potential of embryo stem cells. *Reprod Biomed Online*, 8 (3) 275-306. p.
- Eglitis M. A., Mezey E. (1997): Hematopoetic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl. Acad Sci USA*, 94 4080-4085. p.
- Eistetter H. R. (1989): Pluripotent embryonal stem cell lines can be established from disaggregated mouse morulae. *Dev Growth Differ*, 31 275-282. p.
- Emerson C. P. (1993): Embryonic signals for skeletal myogenesis: arriving at the beginning. *Curr* Opin Cell Biol, 5 1057-1064. p.
- Evans M. J., Kaufman M. H. (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292 154-156. p.
- Ferrari G., De Angelis G. C., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavilio F. (1998): Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, 279 1528-1530. p.
- First N. L., Sims M. M., Park S. P., Kent-First M. J. (1994): Systems for production of calves from cultured bovine embryonic cells. *Reprod Fert Develop*, 6 553-562. p.
- Fraichard A., Chassande O., Bilbaut G., Dehay C., Savatier P., Samarut J. (1995): In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J Cell Sci*, 108 (Pt 10) 3181-3188. p.
- Fraidenraich D., Lang R., Basilico C. (1998): Distinct regulatory elements govern Fgf-4 gene expression in the mouse blastocyst, myotomes, and developing limb. *Dev Biol*, 204 197-209. p.
- Freshney I. R. (2000): Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. 4th Edition. Hoboken, NJ, USA: Wiley-Liss. 600 p.
- Gardner R. L., Brook F. A. (1997): Reflections on the biology of embryonic stem (ES) cells. *Int J Dev Biol*, 41 235-243. p.
- Garry D. J., Meeson A., Elterman J., Zhao Y., Yang P., Bassel-Duby R., Williams R. S. (2000): Myogenic stem cell function is impaired in mice lacking the forkhead/winged helix protein MNF. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97 (10) 5416-5421. p.
- Georges M., Grobet L., Poncelet D., Royo L. J., Pirottin D., Brouwers B. (1998): Positional candidate cloning of the bovine mh locus identifies an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Armidale, NSW, Australia, January 11-16*, 195-204. p.
- Gilbert S.C. (2000): Developmental Biology. 6th Edition. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates, Inc. 709 p.
- Gonzalez-Cadavid N. F., Taylor W. E., Yarasheski K., Sinha-Hikim I., Ma K., Ezzat S., Shen R., Lalani R., Asa S., Mamita M., Nair G., Arver S., Bhasin S. (1998): Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl. Acad Sci USA*, 95 14938-14943. p.

- Goodell M. A., Brose K., Paradis G., Conner A. S., Mulligan R. C. (1996): Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*, 183 1797-1806. p.
- Graves K. H., Moreadith R. W. (1993): Derivation and characterisation of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos. *Mol Reprod Dev*, 36 424-433. p.
- Grobet L., Martin L. J. R., Poncelet D., Pirottin D., Brouwers B., Riquet J., Schoeberlein A., Dunner S., Ménissier F., Massabanda J., Fries R., Hanset R., Georges M. (1997): A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. *Nat Genet*, 17 71-74. p.
- Grobet L., Pirottin D., Farnir F., Poncelet D., Royo L. J., Brouwers B., Christians E., Desmecht D., Coignoul F., Kahn R., Georges M. (2003): Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene. *Genesis*, 35 (4) 227-238. p.
- Grobet L., Poncelet D., Royo L. J., Brouwers B., Pirottin D., Michaux C., Menissier F., Zanotti M., Dunner S., Georges M. (1998): Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm Genome*, 9 (3) 210-213. p.
- Guenin L. M. (2001): Essays on science and society. Morals and primordials. *Science*, 292 (5522) 1659-1660. p.
- Gussoni E., Soneoka Y., Strickland C. D., Buzney E. A., Khan M. K., Flint A. F., Kunkel L. M., Mulligan R. C. (1999): Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*, 401 390-394. p.
- Hahnel A. C., Eddy E. M. (1986): Cell surface markers of mouse primordial germ cells defined by two monoclonal antibodies. *Gamete Res*, 15 25-34. p.
- Hahnel A. C., Eddy E. M. (1987): The distribution of two cell surface determinants of mouse embryonal carcinoma and early embryonic cells. *J Reprod Immunol*, 10 89-110. p.
- Hamrick M. W., McPherron A. C., Lovejoy C. O., Hudson J. (2000): Femoral morphology and cross-sectional geometry of adult myostatin-deficient mice. Bone, 27 (3) 343-349. p.
- Hannon K., Smith C. K., Bales K. R., Santerre R. F. (1992): Temporal and quantitative analysis of myogenic regulatory and growth factor gene expression in the developing mouse embryo. *Dev Biol.*, 151 (1) 137-144. p.
- Hanset R. (1997): At the heart of the Belgian White-Blue genetics. Proceedings of the 5th International Association of Belgian White-Blue Cattle Breeders Annual Meeting, Montebello, Quebec, Canada, October, 1997. 125-134 p.
- Hawke T. J., Garry D. J. (2001): Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*, 91 534-551. p.
- Hayflick L. (1965): The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 37 614-636. p.
- Hirsch E., Lohikangas L., Gullberg D., Johansson S., Fassler R. (1998): Mouse myoblasts can fuse and form a normal sarcomere in the absence of beta1 integrin expression. *J Cell Sci*, 111 (Pt 16) 2397-2409. p.
- Hole N. (1999): Embryonic stem cell-derived haematopoiesis. Cells Tissues Organs, 165 181-189. p.
- Hollenberg S. M., Cheng P. F., Weintraub H. (1993): Use of a conditional MyoD transcription factor in studies of MyoD trans-activation and muscle determination. *Proc Natl. Acad Sci* USA, 90 (17) 8028-8032. p.

- Hong Y., Winkler C., Schartl M. (1996): Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medakafish (Oryzias latipes). Mech Develop, 60 33-44. p.
- Hong Y., Winkler C., Schartl M. (1998): Production of medakafish chimeras from a stable embryonic stem cell line. *Proc Natl. Acad Sci USA*, 95 3679-3684. p.
- Hosler B. A., Rogers M. B., Kozak C. A., Gudas L. J. (2003): An octamer motif contributes to the expression of the retinoic acid-regulated zinc finger gene Rex-1 (Zfp-42) in F9 teratocarcinoma cells. *Mol Cell Biol*, 13 (5) 2919-2928. p.
- Howell J. C., Yoder M. C., Srour E. F. (2002): Hematopoietic potential of murine skeletal musclederived CD45(-)Sca-1(+)c-kit(-) cells. *Exp Hematol*, 30 915-924. p.
- Iannaccone P. M., Taborn G. U., Garton R. L., Caplice M. D., Brenin R. D. (1994): Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. *Dev Biol*, 163 288-292. p.
- Jackson K. A., Mi T., Goodell M. A. (1999): Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl. Acad Sci USA*, 96 14482-14486. p.
- Jeanplong F., Sharma M., Paterson K. A., Morris C. A., Kambadur R. (2000): Polymorphism in dinucleotide repeat (BTAFJ1) upstream to the bovine myostatin locus. *Anim Genet*, 31 (5) 340-341. p.
- Jiang Y., Vaessen B., Lenvik T., Blackstad M., Reyes M., Verfaillie C. M. (2002): Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol*, 30 896-904. p.
- Joulia D., Bernardi H., Garandel V., Rabenoelina F., Vernus B., Cabello G. (2003): Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp Cell Res*, 286 (2) 263-275. p.
- Kaiser (1888): Über die sogenannten doppellendigen Rinder. Landw Jbr, 17 387-403. p.
- Kambadur R., Sharma M., Smith T. P. L., Bass J. J. (1997): Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese Cattle. *Genome Res*, 7 (9) 910-916. p.
- Kay P. H., Harmon D., Fletcher S., Robertson T., Ziman M., Papadimitriou J. M. (1998): Pax7 includes two polymorphic homeoboxes which contain rearrangements associated with differences in the ability to regenerate damaged skeletal muscle in adult mice. *Int J Biochem Cell B*, 30 (2) 261-269. p.
- Kierszenbaum A. L. (2002): Histology and cell biology: an introduction to pathology. St. Louis, MI, USA: Mosby, Inc. 619 p.
- Kim H. S., Liang L., Dean R. G., Hausman D. B., Hartzell D. L., Baile C. A. (2001): Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3t3-11 cultures. *Biochem Biophys Res Comm*, 281 4 902-906. p.
- Kingsley D. M. (1994): The TGF-β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organism. *Gene Dev*, 8 133-146. p.
- Kirchhof N., Carnwath J. W., Lemme E., Anastassiadis K., Schöler H. R., Niemann H. (2000): Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol Reprod*, 63 1698-1705. p.
- Kirk S., Oldham J., Kambadur R., Sharma M., Dobbie P., Bass J. (2000): Myostatin regulation during skeletal muscle regeneration. J Cell Physiol, 184 (3) 356-363. p.
- Kiszely Gy., Barka T. (1958): Gyakorlati mikrotechnika és hisztokémia. Budapest: Medicina. 192 p.

- Klug M. G., Soonpaa M. H., Koh G. Y., Field L. J. (1996): Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells from stable intracardiac grafts. *J Clin Invest*, 98 (1) 216-224. p.
- Kocamis H., Killefer J. (2002): Myostatin expression and possible functions in animal muscle growth. *Domest Anim Endocrin*, 23 (4) 447-454. p.
- Kocamis H., McFarland D. C., Killefer J. (2001): Temporal expression of growth factor genes during myogenesis of satellite cells derived from the biceps femoris and pectoralis major muscles of the chicken. J Cell Physiol, 186 (1) 146-152. p.
- Kopen G. C., Prockop D. J., Phinney D. G. (1999): Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl. Acad Sci USA*, 96 10711-10716. p.
- Kress C., Vandormael-Pournin S., Baldacci P., Cohen-Tannoudji M., Babinet C. (1998): Nonpermissiveness for mouse embryonic stem (ES) cell derivation circumvented by a single backcross to 129/Sv strain: establishment of ES cell lines bearing the Omd conditional lethal mutation. *Mamm Genome*, 9 (12) 998-1001. p.
- Krutsay M. (1999): Patológiai technika. Budapest: Medicina. 518 p.
- LaBarge M. A., Blau H. M. (2002): Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell*, 111 589-601. p.
- Langley B., Thomas M., Bishop A., Sharma M., Gilmour S., Kambadur R. (2002): Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. J Biol Chem, 277 (51) 49831-49840. p.
- Lee S. H., Lumelsky N., Studer L., Auerbach J. M., McKay R. D. (2000): Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 18 675-679. p.
- Lee S. J., McPherron A. C. (1999): Myostatin and the control of skeletal muscle mass. *Curr Opin Genet Dev*, 9 (5) 604-607. p.
- Lee S. J., McPherron A. C. (2001): Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl. Acad Sci USA*, 98 (16) 9306-9311. p.
- Lefebvre V. (2002): Toward understanding the functions of the two highly related Sox5 and Sox6 genes. *J Bone Miner Metab*, 20 (3) 121-130. p.
- Liu J. P., Baker J., Perkins A. S., Robertson E. J., Efstratiadis A. (1993): Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*, 75 (1) 59-72. p.
- Lu S. H., Cannon T. W., Chermanski C., Pruchnic R., Somogyi G., Sacks M., de Groat W. C., Huard J., Chancell M. B. (2003): Muscle-derived stem cells seeded into acellular scaffolds develop calcium-dependent contractile activity that is modulated by nicotinic receptors. Urology, 61 1285-1291. p.
- Marcell T. J., Harman S. M., Urban R. J., Metz D. D., Rodgers B. D., Blackman M. R. (2001): Comparison of GH, IGF-I and testosterone with mRNA of receptors and myostatin in skeletal muscle in older men. *Am J Physiol Endoc-M*, 281 E1159-E1164. p.
- Martin G. R. (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl. Acad Sci USA*, 78 7634-7638. p.

- Martin G. R., Evans M. J. (1975): Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: Formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl. Acad Sci USA*, 72 1441-1445. p.
- Matsui Y., Zsebo K., Hogan B. L. M. (1992): Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*, 70 841-847. p.
- McDonald J. W., Liu X. Z., Qu Y., Liu S., Mickey S. K., Turetsky D., Gottlieb D. I., Choit D. W. (1999): Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med*, 5 (12) 1410-1412. p.
- McKay R. (2000): Stem cells hype and hope. Nature, 406 (6794) 361-364. p.
- McKinney-Freeman S. L., Kathyjo J. A., Fernando D. C., Ferrari G., Fulvio M., Goodell M. A. (2002): Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl. Acad Sci USA*, 99 1341–1346. p.
- McMahon C. D., Popovic L., Jeanplong F., Oldham J. M., Kirk S. P., Osepchook C. C., Wong K. W., Sharma M., Kambadur R., Bass J. J. (2003): Sexual dimorphism is associated with decreased expression of processed myostatin in males. *Am J Physiol Endoc-M*, 284 (2) E377-381. p.
- McPherron A. C., Lawler A. M., Lee S. J. (1997): Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-β superfamily member. *Nature*, 387 83-90. p.
- McPherron A. C., Lee S. J. (1996): The transforming growth factor β superfamily. 357-393. p. In: LeRoith D., Bondy C. (Eds.): *Growth Factors and Cytokines in Health and Disease*. Greenwich, UK: JAI Press. 416 p.
- McPherron A. C., Lee S. J. (1997): Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl. Acad Sci USA*, 94 (23) 12457-12461. p.
- McWhir J., Schnieke A. E., Ansell R., Wallace H., Colman A., Scott A. R., Kind A. J. (1996): Selective ablation of differentiated cells permits isolation of embryonic stem cell lines from murine embryos with a non-permissive genetic background. *Nat Genet*, 14 (2) 223-226. p.
- Mendler L., Zador E., VerHeyen M., Dux L., Wuytack F. (2000): Myostatin levels in regenerating rat muscles and in myogenic cell cultures. *J Muscle Res Cell M*, 21 (6) 551-563. p.
- Ménissier F. [1982]: Present state of knowledge about the genetic determination of muscular hypertrophy or the double muscled trait in cattle. 387-428. p. In: King J. W. B., Ménissier F. (Eds.): *Muscle Hypertrophy of Genetic Origin and its Use to Improve Beef Production*. [The Hague, The Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers]. (Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science, Vol. 16.). 658 p.
- Metcalf D. (2003): The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor. Stem Cells, 21 (1) 5-14. p.
- Minucci S., Botquin V., Yeom Y. I., Dey A., Sylvester I., Zand D. J., Ohbo K., Ozato K., Schöler H. R. (1996): Retinoic acid-mediated down-regulation of Oct3/4 coincides with the loss of promoter occupancy in vivo. *EMBO J*, 15 888-899. p.
- Moens A., Flechon B., Degrouard J., Vignon X., Ding J., Flechon J. E., Beteridge K. J., Renard J. P. (1997): Ultrastructural and immunocytochemical analysis of diploid germ cells isolated from fetal rabbit gonads. *Zygote*, 5 47-60. p.
- Molkentin J. D., Olson E. N. (1996a): Combinatorial control of muscle development by basic helixloop-helix and MADS-box transcription factors. *Proc Natl. Acad Sci USA*, 93 9366-9373. p.
- Molkentin J. D., Olson E. N. (1996b): Defining the regulatory networks for muscle development. *Curr Opin Genet Dev*, 6 445-453. p.

- Mountford P. S., Brandon M. R., Adams T. E. (1994): Expression and characterization of biologically active ovine FSH from mammalian cell lines. *J Mol Endocrinol*, 12 (1) 71-83. p.
- Mountford P. S., Nichols J., Zevnik B., O'Brien C., Smith A. (1998): Maintenance of pluripotential embryonic stem cells by stem cell selection. *Reprod Fert Develop*, 10 (7-8) 527-533. p.
- Mummery C. L., Feyen A., Freund E., Shen S. (1990): Characteristics of embryonic stem cell differentiation: a comparison with two embryonal carcinoma cell lines. *Cell Diff Dev*, 30 195-206. p.
- Myer A., Olson E. N., Klein W. H. (2001): MyoD cannot compensate for the absence of myogenin during skeletal muscle differentiation in murine embryonic stem cells. *Dev Biol*, 229 (2) 340-350. p.
- Nagy A., Gertsenstein M., Vinterstein K., Behringer R. (2003): Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. 3rd Edition. Cold Spring Harbour, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 800 p.
- Nagy A., Gocza E., Diaz E. M., Prideaux V. R., Ivanyi E., Markkula M., Rossant J. (1990): Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development*, 110 815-821. p.
- Nagy A., Rossant J., Nagy R., Abramow-Newerly W., Rode J. C. (1993): Derivation of completely culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl. Acad Sci USA*, 90 8424-8428. p.
- Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K., Niwa H., Klewe-Nebenius D., Chambers I., Schöler H., Smith A. (1998): Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95 379-391. p.
- Nishimoto M., Fukushima A., Okuda A., Muramatsu M. (1999): The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol Cell Biol*, 19 5453-5465. p.
- Niswander L., Martin G. L. (1992): Fgf-4 expression during gastrulation, myogenesis, limb and tooth development in the mouse. *Development*, 114 755-768. p.
- Niwa H. (2001): Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct*, 26 (3) 137-148. p.
- Niwa H., Miyazaki J., Smith A. G. (2000): Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*, 24 372-376. p.
- Notarianni E., Gall C., Laurie S., Moor R. M., Evans M. J. (1991): Derivation of pluripotent embryonic cell lines from the pig and sheep. *J Reprod Fert Suppl*, 43 255-260. p.
- Okabe S., Forsberg-Nilsson K., Spiro A. C., Segal M., McKay R. D. (1996): Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Develop*, 59 89-102. p.
- Okamoto K., Okazawa H., Okuda A., Sakai M., Muramatsu M., Hamada H. (1990): A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell*, 60 461-472. p.
- Okazawa H., Okamoto K., Ishino F., Ishino-Kaneko T., Takeda S., Toyoda Y., Muramatsu M., Hamada H. (1991): The oct3 gene, a gene for an embryonic transcription factor, is controlled by a retinoic acid repressible enhancer. *EMBO J*, 10 2997-3005. p.
- Oldham J. M., Martyn J. A., Sharma M., Jeanplong F., Kambadur R., Bass J. J. (2001): Molecular expression of myostatin and MyoD is greater in double-muscled than normal-muscled cattle fetuses. *Am J Physiol-Reg I*, 280 (5) R1488-1493. p.

Olson E. N., Klein W. H. (1998): Muscle minus MyoD. Dev Biol, 202 153-156. p.

- Olson E. N. Perry. M., Schulz R. A. (1995): Regulation of muscle differentiation by MEF2 family of MADS box transcription factors. *Dev Biol*, 172 2-14. p.
- O'Shea, K. S. (1999): Embryonic stem cell models of development. Anat Rec Part A, 257 32-41. p.
- Ovitt C. E., Schöler H. R. (1998): The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo. Mol Hum Reprod, 4 1021-1031. p.
- Pain B., Clark M. E., Shen M., Nakazawa H., Sakura M., Samarut J., Etches R. J. (1996): Longterm in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development*, 122 2339-2348. p.
- Palmer C. M., Rudnicki M. A. [2002]: The myogenic regulatory factors. 1-32. p. In: Sassoon D. A. (Ed.): Stem Cells and Cell signalling in skeletal muscles. [Amsterdam, The Netherlands: Elsevier]. (Advances in Developmental Biology and Biochemistry /Series ed.: Wassarman P. M. / Vol. 11) 152 p.
- Palmieri S. L., Peter W., Hess H., Schöler H. R. (1994): Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol*, 166 259-267. p.
- Pan G. J., Chang Z. Y., Scholer H. R., Pei D. (2002): Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res*, 12 (5-6) 321-329. p.
- Pearce A. G. E. (1972): Histochemistry: Theoretical and Applied. Boston, USA: Little, Brown Co., 324 p.
- Pease S., Braghetta P., Gearing D., Grail D., Williams R. L. (1990): Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). *Dev Biol*, 141 (2) 344-352. p.
- Pedersen R. A. (1994): Studies of in vitro differentiation with embryonic stem cells. *Reprod Fert Develop*, 6 543-552. p.
- Pesce M., Gross M. K., Schöler H. R. (1998): In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ. *Bioessays*, 9 722-732. p.
- Pesce M., Schöler H. R. (2000): Oct-4: control of totipotency and germline determination. *Mol Reprod Dev*, 55 452-457. p.
- Pesce M., Schöler H. R. (2001): Oct-4: Gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells*, 19 271-278. p.
- Pette D., Staron R. S. (2000): Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. Review. *Microsc Res Techniq*, 50 (6) 500-509. p.
- Piedrahita J. A., Moore K., Oetama B., Lee C. K., Scales N., Ramsoondar J., Bazer F. W., Ott T. (1998): Generation of transgenic porcine chimeras using primordial germ cell-derived colonies. *Biol Reprod*, 58 1321-1329. p.
- Pikarsky E., Sharir H., Ben-Shushan E., Bergman Y. (1994): Retinoic acid represses Oct-3/4 gene expression through several retinoic acid-responsive elements located in the promoterenhancer region. *Mol Cell Biol*, 14 1026-1038. p.
- Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., Marshak D. R. (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284 143-147. p.
- Pollock R., Treisman R. (1991): Human SRF-related proteins: DNA-binding properties and potential regulatory targets. *Gene Dev*, 5 2327-2341. p.

- Prelle K., Vassiliev I. M., Vassilieva S. G., Wolf E., Wobus A. M. (1999): Establishment of pluripotent cell lines from vertebrate species-present status and future prospects. *Cells Tissues Organs*, 165 220-236. p.
- Quinn L. S., Steinmetz B., Maas A., Ong L., Kaleko M. (1994): Type-1 insulin-like growth factor receptor overexpression produces dual effects on myoblast proliferation and differentiation. J Cell Physiol, 159 (3) 387-398. p.
- Qu-Petersen Z., Deasy B., Jankowski R., Ikezawa M., Cummins J., Pruchnic R., Mytinger J., Cao B., Gates C., Wernig A., Huard J. (2002): Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol*, 157 (5) 851-864. p.
- Rappolee D. A., Basilico C., Patel Y., Werb Z. (1994): Expression and function of FGF-4 in periimplantation development in mouse embryos. *Development*, 120 (8) 2259-2269. p.
- Rathjen J., Rathjen P. D. (2003): Lineage specific differentiation of mouse ES cells: formation and differentiation of early primitive ectoderm-like (EPL) cells. *Method Enzymol*, 365 3-25. p.
- Rawls A., Morris J. H., Rudnicki M., Braun T., Arnold H. H., Klein W. H., Olson E. N. (1995): Myogenin's functions do not overlap with those of MyoD or Myf5 during mouse embryogenesis. *Dev Biol*, 172 (1) 37-50. p.
- Reisz-Porszasz S., Bhasin S., Artaza J. N., Shen R., Sinha-Hikim I., Hogue A., Fielder T. J., Gonzalez-Cadavid N. F. (2003): Lower Skeletal Muscle Mass in Male Transgenic Mice with Muscle-Specific Overexpression of Myostatin. Am J Physiol-Endoc M, 285 (4) E876-888. p.
- Roberts S. B., Goetz F. W. (2001): Differential skeletal muscle expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms. *FEBS Lett*, 491 (3) 521-530. p.
- Roberts S. B., Goetz F. W. (2003): Myostatin protein and RNA transcript levels in adult and developing brook trout. *Mol Cell Endocrinol*, 210 (1-2) 9-20. p.
- Robertson E. J. (1987): Embryo-derived stem cell lines. 102-104. p. In: Robertson E. J. (Ed.): *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: Practical Approach*. Oxford, UK: IRL Press, 254 p.
- Rodgers B. D., Weber G. M., Sullivan C. V., Levine M. A. (2001): Isolation and Characterization of Myostatin Complementary Deoxyribonucleic Acid Clones from Two Commercially Important Fish: Oreochromis mossambicus and Morone chrysops. *Endocrinology*, 142 (4) 1412-1418. p.
- Rohwedel J., Guan K., Wobus A. M. (1999): Induction of cellular differentiation by retionic acid in vitro. *Cells Tissues Organs*, 165 190-202. p.
- Rohwedel J., Guan K., Zuschratter W., Jin S., Ahnert-Hilger G., Furst D., Fassler R., Wobus A. M. (1998): Loss of beta1 integrin function results in a retardation of myogenic, but an acceleration of neuronal, differentiation of embryonic stem cells in vitro. *Dev Biol*, 201 (2) 167-184. p.
- Rohwedel J., Maltsev V., Bober E., Arnold H. H., Hescheler J., Wobus A. M. (1994): Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Dev Biol*, 164 (1) 87-101. p.
- Rohwedel J., Sehlmeyer U., Shan J., Meister A., Wobus A. M. (1996): Primordial germ cell-derived mouse embryonic germ (EG) cells in vitro resemble undifferentiated stem cells with respect to differentiation capacity and cell cycle distribution. *Cell Biol Int*, 20 579-587. p.

- Romero-Ramos M., Vourc'h P., Young H. E., Lucas P. A., Wu Y., Chivatakarn O., Zaman R., Dunkelman N., el-Kalay M. A., Chesselet, M. F. (2002): Neuronal differentiation of stem cells isolated from adult muscle. *J Neurosci Res*, 69 894–907. p.
- Rosner M. H., Viganao M. A., Ozato K., Timmons P. M., Poirier F., Rigby P. W., Staudt L. M. (1990): A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature*, 345 686-692. p.
- Rossant J., Bernelot-Moens C., Nagy A. (1993): Genome manipulation in embryonic stem cells. *Phil Trans Roy Soc B*, 339 (1288) 207-215. p.
- Roullet E., Fardeau M., Collin H., Marteau R. (1985): [Myopathy with tubular aggregates. Clinical, biological and histological study of 2 cases]. *Rev Neurol* (Paris), 141 (10) 655-662. p. [French]
- Ruvkin G., Finney M. (1991): Regulation of transcription and cell identity by POU domain proteins. *Cell*, 64 475-478. p.
- Sakuma K., Watanabe K., Sano M., Uramoto I., Totsuka T. (2000): Differential adaptation of growth and differentiation factor 8/myostatin, fibroblast growth factor 6 and leukemia inhibitory factor in overloaded, regenerating and denervated rat muscles. *Biochim Biophys* Acta, 1497 (1) 77-88. p.
- Schoonjans L., Albricht G. M., Li J. L., Collen D., Moreadith R. W. (1996): Pluripotential rabbit embryonic stem (ES) cells are capable of forming overt coat colour chimeras following injection into blastocysts. *Mol Reprod Dev*, 45 439-443. p.
- Schoonjans L., Kreemers V., Danloy S., Moreadith R. W., Laroche Y., Collen D. (2003): Improved generation of germline-competent embryonic stem cell lines from inbred mouse strains. *Stem Cells*, 21 90-97. p.
- Schoorlemmer J., van Puijenbroek A., van Den Eijnden M., Jonk L., Pals C., Kruijer W. (1994): Characterization of a negative retionic acid response element in the murine Oct4 promoter. *Mol Cell Biol*, 4 1122-1136. p.
- Schöler H. R. (1991): Octamania: the POU factors in murine development. *Trends Genet*, 7 323-329. p.
- Schöler H. R., Ciesiolka T., Gruss P. (1991): A nexus between Oct-4 and E1A: implications for gene regulation in embryonic stem cells. *Cell*, 66 291-304. p.
- Schöler H. R., Dressler G. R., Balling R., Rohdewohld H., Gruss P. (1990a): Oct-4: a germlinespecific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J*, 9 2185-2195. p.
- Schöler H. R., Hatzopoulos A. K., Balling R., Suzuki N., Gruss P. (1989): A family of octamerspecific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germ line-specific expression of an Oct factor. *EMBO J*, 8 2543-2550. p.
- Schöler H. R., Ruppert S., Suzuki N., Chowdhury K., Gruss P. (1990b): New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature*, 344 435-439. p.
- Schuelke M., Wagner K. R., Stolz L. E., Hubner C., Riebel T., Komen W., Braun T., Tobin J. F., Lee S. J. (2004): Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. N Engl J Med, 350 (26) 2682-2688. p.
- Seale P., Sabourin L. A., Girgis-Gabardo A., Mansouri A., Gruss P., Rudnicki M. A. (2000): Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, 102 777-786. p.
- Shamblott M. J., Axelman J., Wang S., Bugg E. M., Littlefield J. W., Donovan P. J., Blumenthal P. D., Huggings G. R., Gearthart J. D. (1998): Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl. Acad Sci USA*, 95 13726-13731. p.

- Shannon L., McKinney-Freeman Jackson K. A., Camargo F. D., Ferrari G., Mavilio F., Goodell M. A. (2002): Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl. Acad Sci USA*, 99 (3) 1341-1346. p.
- Shaoquan J., Losinski R. L., Cornelius S. G., Frank G. R., Willis G. M., Gerrard D. E., Depreux F. F. S., Spurlock M. E. (1998): Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. *Am J Physiol*, 275 (4 Pt 2) R1265-R1273. p.
- Sharma M., Kambadur R., Matthews K. G., Somers W. G., Devlin G. P., Conaglen J. V., Fowke P. J., Bass J. J. (1999): Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J Cell Physiol*, 180 (1) 1-9. p.
- Smith A. (2001): Embryo-derived stem cells: of mice and men. Annu Rev Cell Dev Bi, 17 435-462. p.
- Smith A. G., Heath J. K., Donaldson D. D., Wong G. G., Moreau J., Stahl M., Rogere D. (1988): Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, 336 688-690. p.
- Smith T. P. L., Lopez-Corrales N. L., Kappes S. M., Sonstegard T. S. (1997): Myostatin maps to the interval containing the bovine mh locus. *Mamm Genome*, 8 742-744. p.
- Solter D., Knowles B. B. (1978): Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl. Acad Sci USA*, 75 5565-5569. p.
- Sonstegard T. S., Rohrer G. A., Smith T. P. L. (1998): Myostatin maps to porcine chromosome 15 by linkage and physical analyses. *Anim Genet*, 29 19-22. p.
- Spiller M. P., Kambadur R., Jeanplong F., Thomas M., Martyn J. K., Bass J. J., Sharma M. (2002): The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD. *Mol Cell Biol*, 22 (20) 7066-7082. p.
- Staron R. S., Pette D. (1993): The continuum of pure and hybrid myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. *Histochemistry*, 100 (2) 149-153. p.
- Stekelenburg-Hamers A. E. P., Achterberg T. A. E., Rebel H. G., Flechon J. E., Campbell K. H. S., Weima S. M., Mummery C. L. (1995): Isolation and characterisation of permanent cell lines from inner cell mass cells of bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev*, 40 444-454. p.
- Stratil A., Kopecny M. (1999): Genomic organization, sequence and polymorphism of the porcine myostatin (GDF8; MSTN) gene. *Anim Genet*, 30 (6) 468-470. p.
- Sukoyan M. A., Vatolin S. Y., Golubitsa A. N., Zhelezova A. J., Semenova L. A., Serov O. L. (1993): Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their pluripotencies. *Mol Reprod Dev*, 33 148-158. p.
- Sun L., Bradford C. S., Ghosh G., Collodi P. (1995): ES-like cell cultures derived from early zebrafish embryos. *Mol Mar Biol Biotech*, 4 193-199. p.
- Sylvester I., Schöler H. R. (1994): Regulation of the Oct-4 gene by nuclear receptors. *Nucleic Acids Res*, 22 901-911. p.
- Szabó F. (Szerk. 1998): Húsmarhatenyésztés. Budapest: Mezőgazda Kiadó. 246 p.
- Szabo G., Dallmann G., Muller G., Patthy L., Soller M., Varga L. (1998): A deletion in the myostatin gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice. *Mamm Genome*, 9 (8) 671-672. p.

- Takahashi S., Kitamoto M., Takaishi H., Aikata H., Kawakami Y., Nakanishi T., Shimamoto F., Tahara E., Tahara H., Ide T., Kajiyama G. (2000): Expression of telomerase component genes in hepatocellular carcinomas. *Eur J Cancer*, 36 (4) 496-502. p.
- Taylor W. E., Bhasin S., Artaza J., Byhower F., Azam M., Willard D. H., Kull F. C., Gonzalez-Cadavid N. (2001): Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C(2)C(12) muscle cells. *Am J Physiol-Endoc M*, 280 (2) E221-E228. p.
- Thomas M., Langley B., Berry C., Sharma M., Kirk S., Bass J., Kambadur R. (2000): Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem*, 275 (51) 40235-40243. p.
- Thomson J. A., Kalishman J., Golos T. G., Durning M., Harris C. P., Hearn J. P. (1996): Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocyst. *Biol Reprod*, 55 254-259. p.
- Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., Jones J. M. (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blastocyst. *Science*, 282 1145-1147. p.
- Thomson J. A., Kalishman J., Golos T. G., Durning M., Harris C. P., Becker R. A., Hearn J. P. (1995): Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl. Acad Sci USA*, 92 7844-7848. p.
- Tian L., Catt J. W., O'Neill C., King N. J. (1997): Expression of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules on murine embryonic stem cells. *Biol Reprod*, 57 561-568. p.
- Torrente Y., Tremblay J. P., Pisati F., Belicchi M., Rossi B., Sironi M., Fortunato F., El Fahime M., D'Angelo M. G., Caron N. J., Constantin G., Paulin D., Scarlato G., Bresolin N. (2001): Intraarterial injection of muscle-derived CD34(+)Sca-1(+) stem cells restores dystrophin in mdx mice. *J Cell Biol*, 152 335-348. p.
- Vadáné K. M. (1996a): Az állatvágás és a hűtés fiziológiája, a hús fizikai tulajdonságai, húsminőség és előrejelzésének lehetőségei. 7. Húsipari Továbbképző Napok, 1996. Dec.4-5. OHKI Kft kiadványa, 103-124. p.
- Vadáné K. M. (1996b): Porhanyósság és az azt befolyásoló tényezők. 7. Húsipari Továbbképző Napok, 1996. Dec.4-5. OHKI Kft kiadványa, 125-134. p.
- Varga L., Müller G., Szabó Gy., Pinke O., Korom E., Kovács B., Patthy L., Soller M. (2003): Mapping modifiers affecting muscularity of the myostatin mutant (Mstn^{Cmpt-dl1Abc}) compact mouse. *Genetics*, 165 257-267. p.
- Varga L., Szabó Gy., Darvasi A., Müller G., Sass M., Soller M. (1997): Inheritance and mapping of compact (Cmpt), a new mutation causing hypermuscularity in mice. *Genetics*, 147:755-764. p.
- Wagner K. R., McPherron A. C., Winik N., Lee S. J. (2002): Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. *Ann Neurol*, 52 (6) 832-836. p.
- Wehling M., Cai B., Tidball J. G. (2000): Modulation of myostatin expression during modified muscle use. FASEB J, 14 (1) 103-110. p.
- Weiss A., McDonough D., Wertman B., Acakpo-Satchivi L., Montgomery K., Kucherlapati R., Leinwand L., Krauter K. (1999): Organization of human and mouse skeletal myosin heavy chain gene clusters is highly conserved. *Proc Natl. Acad Sci USA*, 96 (6) 2958-2963. p.
- Weissman I. L. (2000): Stem cells units of development, units of regeneration, and units in evolution. Cell, 169 157-168. p.

- Welle S., Bhatt K., Shah B., Thornton, C. A. (2002): Insulin-like growth factor-1 and myostatin mRNA expression in muscle: comparison between 62-77 and 21-31 year old men. *Exp Gerontol*, 37 833-839. p.
- Wells D. N., Misica P. M., Day T. A. M., Tervit H. R. (1997): Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: A comparison between in vivo- and in vitro-matured cytoplasts. *Biol Reprod*, 57 385-393. p.
- Westhusin M. (1997): From mighty mice to mighty cows. Nat Genet, 17 (1) 4-5. p.
- Wheeler M. B. (1994): Development and validation of swine embryonic stem cells: A review. *Reprod Fert Develop*, 6 563-568. p.
- Whittemore L. A., Song K., Li X., Aghajanian J., Davies M., Girgenrath S., Hill J. J., Jalenak M., Kelley P., Knight A., Maylor R., O'Hara D., Pearson A., Quazi A., Ryerson S., Tan X. Y., Tomkinson K. N., Veldman G. M., Widom A., Wright J. F., Wudyka S., Zhao L., Wolfman N. M. (2003): Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem Biophys Res Comm*, 300 (4) 965-971. p.
- Wiles M. V. Keller G. (1991): Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development*, 111 259-267. p.
- Williams R. L., Hilton D. J., Pease S., Willson T. A., Stewart C. L., Gearing D., Wagner E. F., Metcalf D., Nicola N. A., Gough N. M. (1988): Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 336 684-687. p.
- Willing A. E., Lixian J., Milliken M., Poulos S., Zigova T., Song S., Hart C., Sanchez-Ramos J., Sanberg P. R. (2003): Intravenous versus intrastriatal cord blood administration in a rodent model of stroke. *J Neurosci Res*, 73 (3) 296-307. p.
- Wobus A. M., Boheler K. R. (Eds.) (1999): Embryonic stem cells as a developmental model in vitro. *Cells Tissues Organs* (special issue), 165 (3-4) 125-256. p.
- Wobus A. M., Holzhausen H., Jakel P., Schöneich J. (1984): Characterisation of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res*, 152 212-219. p.
- Wobus A. M., Kaomei G., Chan J., Wellner M. C., Rohwedel J., Guanju J., Fleischmann B., Katus H. A., Hescheler J., Franz W. M. (1997): Retionic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol, 29 1525-1529. p.
- Wobus A. M., Rohwedel J., Maltsev V., Hescheler J. (1994): In vitro differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes or skeletal muscle cells is specifically modulated by retinoic acid. *Roux Arch Dev Biol*, 204 36-45. p.
- Wobus A. M., Wallukat G., Hescheler J. (1991): Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca2+ channel blockers. *Differentiation*, 48 (3) 173-182. p.
- Xu C., Wu G., Zohar Y., Du S. J. (2003): Analysis of miosztatin gene structure, expression and function in zebrafish. *J Exp Biol*, 206 (Pt 22) 4067-4679. p.
- Yablonka-Reuveni Z., Nameroff M. (1987): Skeletal muscle cell populations. Separation and partial characterization of fibroblast-like cells from embryonic tissue using density centrifugation. *Histochemistry*, 87 27-38. p.
- Yamanouchi K., Soeta C., Naito K., Tojo H. (2000): Expression of myostatin gene in regenerating skeletal muscle of the rat and its localization. *Biochem Biophys Res Comm*, 270 (2) 510-516. p.

- Yeom Y. I., Fuhrmann G., Ovitt C. E., Brehm A., Ohbo K., Gross M., Hübner K., Schöler H. R. (1996): Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development*, 122 881-894. p.
- Yeom Y. I., Ha H. S., Balling R., Scholer H. R., Artzt K. (1991): Structure, expression and chromosomal location of the Oct-4 gene. *Mech Develop*, 35 171-179. p.
- Yoshitoshi M., Ishihara T., Yoshimura Y., Tsugane T., Shinohara Y. (1991): [The effect of sex hormones on tubular aggregates in normal mouse skeletal muscles]. *Rinsho Shinkeigaku*, 31 (9) 974-980. p. Japanese
- Young H. E., Steele T. A., Bray R. A., Hudson J., Floyd J. A., Hawkins K., Thomas K., Austin T., Edwards C., Cuzzourt J., Duenzl M., Lucas P. A., Black A. C. Jr. (2001): Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec*, 264 51-62. p.
- Yuan H., Corbi N., Basilico C., Dailey L. (1995): Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Gene Dev*, 9 2635-2645. p.
- Zammit P. S., Beauchamp J. R. (2001): The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? *Differentiation*, 68 193-204. p.
- Zammit P. S., Heslop L., Hudon V., Rosenblatt J. D., Tajbakhsh S., Buckingham M. E., Beauchamp J. R., Partridge T. A. (2002): Kinetics of myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate skeletal muscle fibers. *Exp Cell Res*, 281 (1) 39-49. p.

M2. Internetes oldalak

Gén szekvencia adatbázis: www.ncbi.nih.gov/BLAST

TRANSFAC[®] Transzkripciós faktor kötőhely analizáló program: <u>www.transfac.gbf.de/cgi-bin/matSearch/matsearch.pl</u>

GENOME[®] Transzkripciós faktor kötőhely analizáló program: <u>www.genome.ad.jp/GenomeNet</u>

MOTIF[®] Transzkripciós faktor kötőhely analizáló program: <u>http://motif.genome.ad.jp/</u>

Jackson Laboratory: <u>http://jaxmice.jax.org</u>

Olasz Piemonti Szarvasmarha Tenyésztők Egyesülete: www.anaborapi.it/

Európai Únió őssejt tenyésztéssel kapcsolatos etikai állásfoglalása: <u>http://europa.eu.int/comm/research/conferences/2003/bioethics/pdf/sec2003</u> <u>-441report_en.pdf</u>

Nemzetközi Őssejt Tenyésztő Társaság (International Society for Stem Cell Research): http://www.isscr.org/public/ethics.htm

Az USA Nemzeti Egészségügyi Intézetének (NIH) hivatalos állásfoglalása az őssejt tenyésztésről: http://stemcells.nih.gov/info/ethics.asp

M3. Oldatok összetétele

MilliQ víz: Az embriológiai és szövettenyésztő laboratóriumban használt minden oldat MilliQ vízből készül (*Milli-Q Synthesis A10 System*; Millipore, Billerica, Mass.USA)

DMEM tápoldat:

DMEM tápoldat premix (Sigma:D7777)	1 üveg
penicillin (Sigma: P3032)	0,06 g/liter
streptomycin (Sigma: S9137)	0,1 g/liter
NaHCO ₃ (Sigma: S5761)	3,75 g/liter
Na-piruvát (Sigma: P4562)	0,11 g/liter
Milli Q vizben oldva, a gyártó utasításai szerint	1000 ml

DMEM low-glucose tápoldat:

DMEM tápoldat premix (Sigma:D5472)	1 üveg
penicillin (Sigma: P3032)	0,06 g/liter
streptomycin (Sigma: S9137)	0,1 g/liter
NaHCO ₃ (Sigma: S5761)	3,75 g/liter
Na-piruvát (Sigma: P4562)	0,11 g/liter
Milli Q vizben oldva, a gyártó utasításai szerint	1000 ml

DMM (ES sejt differenciáltató tápoldat, izomszövet differenciáltatáshoz):

β-mercaptoethanol (Sigma: M7522)	0,1 mM
MEM nem esszenciális aminosav oldat (100x; Sigma: M7145)	
FCS (Gibco)	10 v/v%
HS (Gibco)	5 v/v%
DMEM tápoldatban oldva	

DM (általános ES differenciáltató tápoldat):

β-merkaptoethanol (Sigma:M7522)	0,1 mM
MEM nem esszenciális aminosav oldat (100x; Sigma:M7145)	
FCS (Gibco)	10 v/v%
DMEM tápoldatban oldva	

EDTA oldat:

EDTA (Sigma: E6511)	0,2 g/liter
PBS oldatban	1000 ml

β -merkaptoethanol (Sigma: M7522)	0,1 mM
MEM nem esszenciális aminosav oldat (100x; Sigma: M/145)
mLIF (Sigma: L5158) $\Gamma(G)$	1000 U/ml
FCS (GIDCO)	15 V/V%o
DMEM lapolaalban olava	
F10 tápoldat:	
F10 tápoldat premix (Sigma: N6635)	1 üveg
penicillin (Sigma: P3032)	0,06 g/liter
streptomycin (Sigma: S9137)	0,10 g/liter
NaHCO ₃ (Sigma: S5761)	3,75 g/liter
Na-piruvát (Sigma: P4562)	0,11 g/liter
Glutamax supplement 100x; CatN.:35050-038, Gibco)	
Fungisone (100x; CatN.:15290-018, Gibco)	1000 1
Milli Q vizben oldva, a gyarto utasitasai szerint	1000 ml
F10-MGM (F10 myoblast tápoldat):	
bFGF (Sigma: F0291)	
FCS (Gibco)	20 v/v%
F10 tápoldatban oldva	1000 ml
Fagyasztó tápoldat:	
DMSO (Sigma: D2650)	10 v/v%
FCS (Gibco)	20 v/v%
DMEM tápoldatban oldva	

FCS: magzati borjú savó (Foetal Calf Serum) készítéséből adódóan igen változó minőségű. Így laboratóriumunkban egyszerre nagyobb mennyiségű, azonos tételből származó borjúsavó kerül beszerzésre. Ezzel igyekszünk kiküszöbölni az egyes savók különböző összetételéből adódó különbségeket. A dolgozatban leírt kísérletekhez minden esetben azonos FCS került felhasználásra a következő tételből: Gyártó: Gibco katalógusszám: 10106-169, Lot.No. (tételszám): 40F2208F

FM (Fibroblaszt tenyésztő tápoldat):

EM (ES tenyésztő tápoldat):

10 v/v%

FCS (Gibco) DMEM tápoldatban oldva

MFM (Izomsejt fúziós tápoldat):

HS (Gibco)		
DMEM-low glucose	törzsoldatban	oldva

PBS oldat:

KCl (Sigma: P5405)	0,200 g/liter
KH ₂ PO ₄ (Sigma: P6555)	0,200 g/liter
NaCl (Sigma: S5886)	8,000 g/liter
Na ₂ HPO ₄ (Sigma: S5136)	1,115 g/liter

Tripszin törzsoldat:

KCl (Sigma: P5405) NaCl (Sigma: S5886) Na₂HPO₄ (Sigma: S5136) D-glükóz (Sigma: G7021) Trisma base (Sigma: T6066) fenolvörös (Sigma: P3532) penicillin (Sigma: P3032) streptomycin (Sigma: S9137) tripszin (Sigma: T9935) milli Q vízben oldva

20 ml/liter

0,40 g/liter 8,00 g/liter 0,10 g/liter 1,00 g/liter 3,00 g/liter 0,01 g/liter 0,06 g/liter 0,10 g/liter 2,50 g/liter 1000 ml

Tripszin-EDTA oldat:

Tripszin törzsoldat és EDTA oldat 1:4 arányú keveréke

M4. Táblázatok

Génbank referencia szám*	Tudományos név	Fajnév magyarul	Azonosított szekvencia típusa	
<u>AY606017</u>	Alopex lagopus	Sarki róka	myostatin (MSTN) mRNA, complete cds	
<u>AY540994</u>	Ameiurus catus	Fehér harcsa	myostatin mRNA, complete cds	
<u>AF440861</u>	Anas platyrhynchos	Tőkés réce	myostatin (MSTN) mRNA, complete cds	
<u>AY448009</u>	Anser anser	Nyári lúd	myostatin (MSTN) mRNA, complete cds	
<u>AH011054</u>	Bos grunniens	Jak	myostatin gene, partial cds	
<u>AF320998</u>	Bos taurus	Szarvasmarha	myostatin (GDF8) gene, complete cds	
<u>AH013313</u>	Bubalus bubalis	Bivaly	myostatin (GDF8) gene, complete cds	
<u>AY254098</u>	Bubalus bubalis	Bivaly	myostatin (GDF8) gene, exon 3 and complete cds	
<u>AF151692</u>	Cairina moschata	Pézsmakacsa	myostatin (MSTN) mRNA, partial cds	
<u>AY367768</u>	Canis familiaris	Kutya	myostatin (MSTN) mRNA, complete cds	
<u>AY436347</u>	Capra hircus	Házikecske	myostatin (GDF8) mRNA, complete cds	
<u>AF440863</u>	Columba livia	Szirti galamb	myostatin (MSTN) mRNA, complete cds	
<u>AF317665</u>	Coryphaena hippurus	Aranymakréla	myostatin mRNA, partial cds	
<u>AF440864</u>	Coturnix chinensis	Kínai törpefürj	myostatin (MSTN) mRNA, complete cds	
<u>AY323521</u>	Danio rerio	Zebradánió	myostatin gene, complete cds	
<u>AF097584</u>	Equus caballus	Ló	myostatin (MSTN) gene, partial cds	
<u>AF317666</u>	Euthynnus alletteratus	Kis tonhal	myostatin mRNA, partial cds	
<u>AF500271</u>	Gadus morhua	Atlanti tőkehal	myostatin GDF8 mRNA, partial cds	
<u>AF019621</u>	Gallus gallus	Bankivatyúk	myostatin (MSTN) mRNA, complete cds	
<u>AF104922</u>	Homo sapiens	Ember	myostatin (GDF8) mRNA, complete cds	
<u>AF396747</u>	Ictalurus punctatus	Foltos csatornaharcsa	myostatin gene, complete cds	
<u>AY169410</u>	Lepus capensis swinhoei	Fokföldi nyúl	myostatin GDF-8 (GDF-8) mRNA, complete cds	
<u>AY055750</u>	Macaca fascicularis	Jávai makákó	myostatin mRNA, complete cds	
<u>AF019625</u>	Meleagris gallopavo	Pulyka	myostatin (MSTN) mRNA, complete cds	
<u>AF290911</u>	Morone americana	Amerikai fehér sügér	myostatin mRNA, complete cds	
<u>AF197194</u>	Morone chrysops	Fehér sügér	myostatin (MSTN) mRNA, complete cds	

14. táblázat. Ismert miosztatin szekvenciájú fajok



Mellékletek

<u>AF290910</u> N	Iorone saxatilis
-------------------	------------------

Csíkos sügér

myostatin mRNA, complete cds

Fajok Származás In vitro vizsgálatok		In vivo vizsgálatok	Referenciák	
Japán rizsponty (Orvzias latipes)	blasztociszta	AP+, EB formálódás	Transzgénikus kiméra	Hong et al. (1996) Collodi et al. (1992)
Zebradánió (Danio rerio)	blasztociszta	AP+, in vitro differenciálódás	Transzgénikus kiméra	Sun et al. (1995)
Tyúk	X stádiumú blasztoderm	AP+, SSEA-1, SSEA- 3 expresszió	Ivari kimérák	Pain et al. (1996)
(Gallus gallus)	5 napos ivarléc	Morfológia	Ivari kimérák	Chang et al. (1997)
Nyúl (Oryctolagus	5 napos embriók	EB formálódás	Szőrszín kimérák	Schoonjans et al. (1996) Graves és Moreadith, 1993
cuninculus)	18-22 napos ivarlécek	SSEA-1 expresszió, AP+	Szőrszín kimérák	Moens et al. (1997)
Patkány (Rattus norvegicus)	Patkány AP+, SSEA-1 (Rattus norvegicus) blasztociszta AP+, SSEA-1		Szőrszín kimérák	Iannaccone et al. (1994)
Szíriai aranyhörcsög (Mesocricetus auratus)	3 napos blasztociszta	EB formálódás	Nem vizsgálták	Doetschman et al. (1988)
Nyérc (Mustela vison)	7 napos blasztociszta	EB formálódás, teratoma formálódás	Nem vizsgálták	Sukoyan et al. (1993)
Sertés	blasztociszta	EB formálódás	Szőrszín kimérák	Wheeler (1994) Notarianni et al. 1991
(Sus scrofa)	25-27 napos ivarlécek (PGC)	AP+, EB formálódás	Transzgénikus kimérák	Piedrahita et al. (1998)
	blasztociszta	Morfológia	Transzgénikus kiméra	Cibelli et al. (1998) First és mtsai 1994
Szarvasmarha (Bos primigenius)	45 napos ivarlécek	Morfológia, pszeudopodia	Klónozott bikaborjú	Strelchenko et al. (1998) (<i>cit: Prelle et al. 1999</i>)
	blasztociszta ICM	Morfológia	Nem vizsgálták	Steckelenburg- Hamers et al. 1995
Juh (Ovis avies)8 napos blasztocisztaMorfológia		Klónozott bárányok	Wells et al. (1997) Notarianni et al. 1991	
Rhesus majom6 naposAP +, SSEA-3, SSE(Macaca mulatta)blasztociszta4 expresszió in vitro		AP +, SSEA-3, SSEA- 4 expresszió, in vitro	Nem vizsgálták	Thomson et al. (1995)
Selyemmajom (Callithrix jacchus)	8 napos blasztociszta	differenciálódás, EB és teratoma formálódás	Nem vizsgálták	Thomson et al. (1996)

15. táblázat.	ES és	EG se	itvonalak	előállítása	különböző	állatfajokból

Megnevezés	Szekvencia (5'→3')	bp Referencia		Amplifikált fragment mérete (bp)
MyoD_F	GCAGGCTCTGCTGCGCGACC	20	Decode et al. 1008	270
MyoD_R	TGCAGTCGATCTCTCAAAGCACC	23	Rawis et al. 1998	570
Myf5_F	TGTATCCCCTCACCAGAGGAT	21	Honnon et al. 1002	270
Myf5_R	GGCTGTAATAGTTCTCCACCTGTT	24	Hannon et al. 1992	579
Myogenin_F	TGGAGCTGTATGAGACATCCC	21	Edmondson és Olson	194
Myogenin_R	TGGACAATGCTCAGGGGTCCC	21	1989	104
MRF4_F	GAGAGGAACACGTTCTGGCTCC	22	Hannon at al. 1002	452
MRF4_R	TGCTGGAGGCTGAGGCATCC	20	Hamion et al. 1992	433
Myostatin_F	TGGGCTTGATTGTGATGAAC	20	Verge et al. 1997	200
Myostatin_R	ATTCTCCAGAGCAGTAATTGGC	22	varga et al. 1997	200
Cdk2_F	AAATTCATGGATGCCTCTGC	20	saiót tarvazás	202
Cdk2_R	ACAGGGACTCCAAAGGCTCT	20	sajat tervezes	203
p21_F	CGGTGGAACTTTGACTTCGT	20	saiát tarvazás	211
p21_R	GAGTGCAAGACAGCGACAAG	20	sajat tervezes	
Smad3_F	CACAGCCACCATGAATTACG	20	saját tarvazás	242
Smad3_R	TCTGGAATATTGCTCTGGGG	20	sajat tervezes	242
Pax3_F	AAACCCAAGCAGGTGACAAC	20	solót tomozós	170
Pax3_R	CTAGATCCGCCTCCTCCTCT	20	sajat tervezes	
Pax7_F	GCGAGAAGAAAGCCAAACAC	20	saját tarvazás	160
Pax7_R	TCTAGCTCCTCCAGCTGCTC	20	sajat tervezes	100
Igf-1_F	CCCCACTGAAGCCTACAAAA	20	agiót tomagóa	109
Igf-1_R	GGGAGGCTCCTCCTACATTC	20	sajat tervezes	198
Desmin_F	GTGGAGCGTGACAACCTGAT	20	solót tomozós	221
Desmin_R	GATGGTCTCATACTGAGCCCG	21	sajat tervezes	321
MNF-α_F	TACTTCATCAAAGTCCCTCGGTC	23		206
MNF-a_R	GTACTCTGGAACAGAGGCTAACTT	24	Corrected 2000	500
MNF-β_F	TACTTCATCAAAGCTCCTGCCTC	23	Garry et al. 2000	200
MNF-β_R	GTGCGCGCGCGCATGTGGGC	20		300
MyHC I_F	GGCCCAGAAACAAGTGAAGA	20	soliát tom vozás	202
MyHC I_R	GTCTTGCTCTGCCAGTTTCC	20	sajat tervezes	
MyHC IIb_F	TAGGGTGAGGGAGCTTGAAA	20	soliát tom soción	202
MyHC IIb_R	CCTCCTCAGCCTGTCTCTTG	20	sajat tervezes	203

16. táblázat. Az egér kísérletekben felhasznált RT-PCR primerek

Sox5_F	CTACCTCACCTCAGAAGGCG	20) saját tervezés)	172
Sox5_R	CTGGGAGTGTCTTCTGGCTC	20	sajat tervezes	172
Rb7_F	GGAGCTCATCTATGAGAAGGC	21	Hollopharg at al. 1002	202
Rb7_R	AAGACGAAGGAGCTGCAGAAC	21	Honenberg et al. 1995	202

17. táblázat. Szarvasmarha kísérletekben felhasznált RT-PCR primerek

Megnevezés	Szekvencia (5'→3')		Referencia	Amplifikált fragment mérete (bp)	
B-MyoD_F	GACGGCTCTCTCTGCAACTT	20	saiót tarvazás	270	
B-MyoD_R	TAGTCGTCTTGCGTTTGCAC	20	sajat tervezes	270	
B-Myf5_F	ACCAACCCTAACCAGAGGCT	20	sajót tervezés	270	
B-Myf5_R	GGGCTGTTACATTCAGGCAT	20	sajat tervezes	219	
B-Myogenin_F	TGGGCGTGTAAGGTGTGTAA	20	saját tervezés	184	
B-Myogenin_R	TGGGCGTGTAAGGTGTGTAA	20	sajat tervezes	104	
B-CD45_F	ACCTGGACACCACCTCAAAG	20	saját tervezés	243	
B-CD45_R	AAACCATTGACCTTGCTTGG	20	sajat tervezes	273	
B-Myostatin_F	TGAGGCCTGTCAAGACTCCT	20	saját tervezés	200	
B-Myostatin_R	GCCTGGGTTCATGTCAAGTT	20	sajat tervezes	200	
B-Cdk2_F	CGACTTTCAGATCCCGTTGT	20	saját tervezés	203	
B-Cdk2_R	AGATTCTTTCGGTACCCGCT	20	sujut tervezes		
B-p21_F	GGCAGTGATGCCCAACTTAT	20	saját tervezés	211	
B-p21_R	TCCTCTGCCTGTTCTGGAGT	20	sajat tervezes		
B-Smad3_F	GACGCCAGTTCTACCTCCTG	20	saját tervezés	242	
B-Smad3_R	TCTGGAATATTGCTCTGGGG	20	sujut tervezes		
B-Igf-1_F	CATCCTCCTCGCATCTCTTC	20	saját tervezés	108	
B-Igf-1_R	CCTCCTCAGATCACAGCTCC	20	sajat tervezes	178	
B-Desmin_F	GGGACATCCGTGCTCAGTAT	20	saját tervezés	321	
B-Desmin_R	GTGGCGGTACTCCATCATCT	20	sujut tervezes		
B-MyHC I_F	TAGGGTGAGGGAGCTTGAAA	20	saját tervezés	203	
B-MyHC I_R	CCTCCTCAGCCTGTCTCTTG	20	5ajar 101 v0205	203	
B-MyHC IIb_F	GGCCCAGAAACAAGTGAAGA	20	saját tervezés	202	
B-MyHC IIb_R	GTCTTGCTCTGCCAGTTTCC	20	5ujat to1 v0205	202	
B-Actin_F	GGAGCTCATCTATGAGAAGGC	20	saját tervezés	202	
B-Actin_R	AAGACGAAGGAGCTGCAGAAC	20	sujat tel vezes	202	

Primer neve	Szekvencia	bp	Referencia	Amplifikált fragment mérete (bp)	
mZfx_F	AACATCCTGAACACCTTGCC	20	saját tervezés	104	
mZfx_R	TAGCTTGTGGCTCTCCAGGT	20	saját tervezés	104	
mZfy_f	CCATCAGCACTCAAAAAGCA	20	saját tervezés	200	
mZfy_R	GCCTTTGTGTGAACGGAAAT	20	saját tervezés	299	
mHprt_F	CTGCCTCTGCCTCCTAAATG	20	saját tervezés	195	
mHprt_R	CTGCCTCTGCCTCCTAAATG	20	saját tervezés	105	

18. táblázat. Ivarmeghatározáshoz használt egér primerek adatai

19. táblázat. Miosztatin szekvencián azonosított transzkripciós faktor kötőhelyek adatai

Faktor neve	Matrix pozíció	DNS szál	Matrix egyezés	Szekvencia egyezés	Matrix szekvencia (mindig a (+) szál DNS szekvenciája)
Sox-5	172	(+)	1.000	0.993	acaACAATgc
Smad3	321	(-)	1.000	0.926	tagCAGACa
myogenin	514	(-)	1.000	0.607	caatagttgtggGCCAAttagccatcctg
myogenin	619	(+)	1.000	0.611	agaagctggattTTGGCtctcctaaacca
myogenin	978	(-)	1.000	0.617	aaaagttgccagGCCAAtggtaagaaaaa
Smad3	1417	(+)	1.000	0.926	tGTCTGtcc
Sox-5	1552	(+)	1.000	0.996	caaACAATgc
Sox-5	1720	(+)	1.000	0.996	ttaACAATtt
Sox-5	2020	(-)	1.000	0.996	atATTGTtgt
Sox-5	2210	(+)	1.000	0.998	tcaACAATag
Smad3	2220	(+)	1.000	0.987	tGTCTGggt
Smad3	2850	(+)	1.000	0.972	tGTCTGcca
Sox-5	3887	(-)	1.000	0.992	ggATTGTttc
Sox-5	4536	(+)	1.000	0.993	gtaACAATtg
Sox-5	4698	(-)	1.000	0.991	gaATTGTtcc
myogenin	5628	(+)	1.000	0.605	ggaaattgagcaTTGGCatcattcactaa
Smad3	6754	(-)	1.000	0.874	ggcCAGACa
MyoD	7032	(+)	1.000	0.924	cctCAGGTgatc
Smad3	7340	(-)	1.000	0.946	aaaCAGACa
myogenin	7721	(+)	1.000	0.653	acacttttgttgTTGGCaattgtaccacc
Sox-5	8625	(-)	1.000	0.992	ccATTGTtcc
MyoD	8717	(+)	1.000	0.901	acaCAGGTgtac

myogenin	9173	(+)	1.000	0.768	tttggttaatttTTGGCtcggagcctatg
Smad3	11381	(+)	1.000	0.998	tGTCTGctt
Smad3	11393	(+)	1.000	0.992	tGTCTGgtt
MEF-2	11578	(+)	1.000	0.902	tggtgacctaaAAATAaatatt
MEF-2	11578	(+)	1.000	0.901	tggtgacctaaAAATAaatatt
myogenin	11771	(-)	1.000	0.621	gtggctcctaaaGCCAAgggtgaaagttt
MyoD	11874	(+)	1.000	0.914	tgcCAGGTgtct
Smad3	12759	(-)	1.000	0.978	tgaCAGACa
myogenin	12797	(-)	1.000	0.622	tgtggagcaggaGCCAAtcatagatcctg
myogenin	12926	(+)	1.000	0.665	ctaatatttcacTTGGCattactcaaaag
Sox-5	13356	(+)	1.000	0.992	gaaACAATca
MEF-2	13448	(-)	1.000	0.900	cagatcTATTTtcaggctttta
MEF-2	13448	(-)	1.000	0.914	cagatcTATTTtcaggctttta
Sox-5	14473	(-)	1.000	0.995	caATTGTtag
Sox-5	14631	(-)	1.000	0.998	atATTGTttg
MyoD	14905	(+)	1.000	0.904	aaaCAGGTgaaa
myogenin	15345	(+)	1.000	0.636	aggcactggtatTTGGCagagtattgatg
Sox-5	17106	(+)	1.000	0.996	tcaACAATga
Sox-5	17468	(-)	1.000	0.991	taATTGTtct
myogenin	18021	(+)	1.000	0.723	tagatgcaatggTTGGCattcaaccacca
Sox-5	18284	(-)	1.000	0.993	ggATTGTtat
myogenin	18618	(-)	1.000	0.611	tcttaaaaggcaGCCAAacagtattcatt
Sox-5	18750	(+)	1.000	0.993	gaaACAATta
Sox-5	18781	(-)	1.000	0.997	atATTGTttt
myogenin	19557	(+)	1.000	0.604	aatgcatttcaaTTGGCagtggtatatac
Smad3	20527	(-)	1.000	0.978	tgaCAGACa
Sox-5	20880	(+)	1.000	0.993	aaaACAATta
myogenin	21136	(+)	1.000	0.658	gctaaatatctcTTGGCtctgttcctagg
Sox-5	21342	(-)	1.000	0.996	gcATTGTtag
MyoD	21526	(+)	1.000	0.928	ggtCAGGTgtgg
myogenin	21785	(+)	1.000	0.704	tgcagttctgtgTTGGCagccagtgaaat
Sox-5	21810	(-)	1.000	0.991	aaATTGTtcc
Sox-5	23369	(-)	1.000	0.994	tcATTGTttt
myogenin	23912	(+)	1.000	0.635	attgtgctttgcTTGGCccttgggctgtt

				Izo	m			
	m. pec	toralis	m. biceps	femoris	m. gastro	cnemius	m. mas	sseter
Rosttípus	Kontroll ¹¹	Mstn ^{-/- 12}	Kontroll ¹⁰	Mstn ^{-/- 11}	Kontroll ¹⁰	Mstn ^{-/- 11}	Kontroll ¹⁰	Mstn ^{-/-11}
	Az e	gves rosttín	usok (A1. A2.	A ₂) átlagos	rostkeresztn	netszeti terü	ilete (um² ±S	5E)
Vörös ¹³	842,4 a	1221,7 b	694,2 a	2106,0 c	928,9 b	1499,7 b	856,2 a	711,2 a
v 01 05	±61.3	±89.3	± 52.9	±148.6	±128.3	±72.5	±147.9	±163.1
Intermedier ¹⁴	2801,7 a	3462,2 b	2076,2 c	3941,3 d	3116,2 b	3497,4 b	1977,3 c	2897,5 b
intermetier	±137.9	± 180.4	± 78.8	±158.2	±207.9	±172.0	±118.7	±181.6
Fahár ¹⁵	5980,1 a	7155,2 b	4378,7 c	6283,4 a	4153,6 c	6239,1 a	4292,2 c	6077,2 a
r chei	±339.8	±287.1	±264.2	±244.7	±260.2	±231.5	±264.1	±507.2
	Az egyes r	osttípusok á	itlagos rostke	eresztmetsz	eti területéne	k megoszlás	sa a kontroll	%-ában
Vörös ¹²	100,00	145,03	100,00	303,36	100,00	161,45	100,00	83,06
Intermedier ¹³	100,00	123,57	100,00	189,84	100,00	112,23	100,00	146,54
Fehér ¹⁴	100,00	119,65	100,00	143,50	100,00	150,21	100,00	141,59

20. táblázat. Rosttátmérő változás NADH-TR festés eredményeinek értékelése során

Az **a**, **b**, **c** és **d** csoportok egymástól szignifikáns eltérést mutatnak (soronkén), azonban az azonos betűvel jelölt értékek között nincs szignifikáns eltérés (soronként).

¹¹ mstn^{+/+}/C egértörzs
¹² mstn^{-/-}/Egfp^{-/-} egértörzs
¹³ MyHC I típusú rostok
¹⁴ intermedier rostok
¹⁵ főként MyHC IIB típusú rostok

M5. Ábrák jegyzéke

- 2. ábra. Miosztatin mutáns és kontroll egér (A) 18 hetes korú *Cmpt* egér hím, (B) 18 hetes kontroll, BalbC egértörzsből származó hím (saját felvétel).

5. ábra. A miozin molekula felépítése (Kierszenbaum, 2002 nyomán)......18

8. ábra. A miogenezis folyamatának szakaszai a determinációt követően (Gilbert, 2000 nyomán). 23
 9. ábra. A miosztatin fehérje feltételezett hatásmechanizmusa Thomas és munkatársai (2000) szerint

- 10. ábra. Miosztatin fehérjét megkötő ActR receptor aktivációs mechanizmusa A ligandum kötését

ábra. Preimplantációs korú egér embriók (A) 4,5 napos, hólyagcsíra állapotú egér embrió ICM sejtjei, (B) a peteburokból (*zona pellucida*) kibújt embrió trofoblaszt sejtjei (saját felvételek).
 35

15. 16.	ábra. Az ES sejt differenciáltatás függőcseppes módszerének sematikus ábrája (Gócza, 1999) 40 ábra. Az ES sejtek transzplantációs terápiában való felhasználásának lehetősége41
17.	ábra: Az oct-4 gén expressziójának alakulása a korai embriófejlődés során (Pesce et al. 1998) A vörös szín az Oct-4 pozitív sejteket jelöli az embrióban
18.	ábra. Az oct4 gén szerkezete (Övitt és Schöler 1998)
19.	ábra. Az Oct4 transzaktiváció ismert modelljei (Pesce és Schöler 2001 közleménye alapján) (A)
20	E1A aktivációs modell, (B) Fgf4-típusúaktivációs modell, (C) osteopontin modell
20.	abra. Szatellita sejt az izomrost bazalis membranja alatt A felvetelen a kek sejt M-cadherin specifikus ellenenyeggal jelölt szatellita sejt míg a zöld fluoreszenes partikulumok az
	izomrost seitmagiai (Terry Partridge felvétele) 49
21.	ábra. Izombiopszia vétel szarvasmarha farizmából (A) fehér-kék belga bika felhajtása
	mintavételhez, (B) mintavételi karám a kezelőfolyosón, (C) borotvával megtisztított,
	fertőtlenített felület a faron, (D) mintavétel, (E) mintavevő pisztoly, (E) biopszia tű és
~~	tűhüvely
22.	abra. Kosttipus teruleti megoszlasanak szamítasa
23.	kontroll genomiális DNS, 2: mstn ^{+/+} kontroll genomiális DNS, Tipizált minták 3: mstn ^{+/-} , 4: mstn ^{+/+} , 5: mstn ^{+/-} , 6: mstn ^{-/-} , 7: mstn ^{+/-} , 8: mstn ^{-/-} , 9: mstn ^{-/-} , 10 mstn ^{+/+} , 11: mstn ^{+/+}
24.	ábra. Pluripotencia-vizsgálat mstn ^{-/-} Egfp ^{+/+} 2 ES sejtvonalban (A) Egfp expressziót mutató ES
	kolóniák fluoreszcens mikroszkóp alatt (méretvonal: 500 µm); (B) AP pozitív ES kolónia
	(méretvonal: 25 µm); (C) SSEA-1 immunfestés pozitív ES kolónia (méretvonal: 25 µm); (D)
	kromoszóma szerelvény Giemsa-festéssel (méretvonal: 5 μm); (E) ES-diploid embrió kiméra
	blasztociszta stadiumban, beultetes elott, anol az ES eredetu sejtek az Egip expresszio alapjan
25	ábra Korai differenciálódásért felelős gének expressziójának vizsgálata RT-PCR analízissel in
20.	vitro ES differenciáltatás során (reprezentatív RT-PCR felvétel)
26.	ábra. ES sejtek függőcseppes differenciáltatása (A) függőcsepp kultúra, (B) szuszpenziós
	kultúrában tartott EB csomók a differenciáltatás 6. napján (saját felvételek)
27.	ábra. Miosztatin mutáns sejtvonalak izomszövet differenciálódási képességének vizsgálata in
	nanián (B) vázizom seitek aránya a differenciálódó tenyészetben 77
28.	ábra. Génexpresszió intenzitása ES seitvonalak in vitro izomszövet differenciáltatása során. Az
	ábrán kontrollként az $mstn^{+/+}/C7$ sejtvonal, míg mstn ^{-/-} sejtvonalként az $mstn^{-/-}/Egfp^{+/+}2$
	sejtvonal szerepel. A *-al jelzett esetekben a kontroll sejtvonal génexpressziós aktivitása eltért
20	az R1 sejtvonalétól (részletes magyarázatot 6.4 alfejezet tartalmazza)
29.	abra. Genexpresszio valtozas osszenasonlitasa mstn mutans es kontroll ES sejtvonalak izomszövet irányú in vitro differenciáltatása során. Az ábrán kontrollkánt az $mstn^{+/+}/C^{-2}$
	seitvonal míg mstn ^{-/-} seitvonalként az <i>mstn^{-/-}/Egfn^{+/+}</i> 2 seitvonal szerepel (reprezentatív RT-
	PCR felvétel)
30.	ábra. Génexpresszió intenzitása egér szatellita és myoblast sejttenyészetek in vitro izomszövet
	differenciáltatása során. Az ábrán kontrollként az $mstn^{+/+}/C$ egértörzs, míg mstn ^{-/-} al az $mstn^{-/-}/Egfp^{+/+}$ egértörzs került jelölésre
31.	ábra. Különböző izmok egyedi tömegének összehasonlítása mstn ^{-/-} és kontroll állatok között86
32.	abra. Usszehasonlito izomvizsgalatok mstn ^{-/-} /C es mstn ^{-/-} /Egfp ^{-/-} egertorzsek között. Az abra A és B kénének hal oldalán mstn ^{-/-} /Egfp ^{+/+} jobb oldalán mstn ^{+/+} /C törzsből származó 16 hatas
	es B Repener dai oluaran instit $/Lgp$, jobb oluaran <i>mstri</i> /C torzsoor szarmazo ro netes hím látható
33.	ábra. Izomrost típusok megoszlásának összehasonlítása kontroll és mstn ^{-/-} egerek a különböző
	izmaiban. (A) rosstípusok megoszlása a teljes keresztmetszeti rostszám %-ában; (B)
<u>.</u> .	rosstípusok megoszlása a teljes keresztmetszet területének %-ában
34.	abra. NADH-TR festés (A) m. gastrocnemius keresztmetszet $mstn^{+/+}/C$, és (B) $mstn^{-/-}/Egfp^{-/-}$
	egyettek izmaban; (U) <i>biceps jemoris; mstn</i> /U es (D) <i>mstn</i> /Egyp egyettek izmaban. A felvételen a sötét színnel festődő (sötétkék) rostok Les tínusúak a világosabb árpyalatú
	Torrection a solet szinner restore (soletkek) rostok res upusuak, a vnagosabb annyalatu

- 35. ábra. Fénymikroszkópos hisztológiai analízis miosztatin mutáns és kontroll egerek m. gastrocnemius izmán. (A-G) hematoxilin-eozin festések: (A) kontroll és (B) mutáns keresztmetszet 120x, míg (C) és (D) 440x nagyítva; (E) kontroll és (F) mutáns izom hosszmetszet (120x); (G) mutáns izom hosszmetszet 440x nagyítva. A kontroll és mutáns izmok összehasonlítása révén látható a megnövekedett rostátmérő és lecsökkent kötőszövet a mutáns állatok izmában, amelyet az (I) kontroll és (J) mutáns félvékony, toluidinkék festett metszetek is szemléltetnek (440x). (H) Van Gieson trikróm festés mstn^{-/-} izomban: a nyilak az ún. ragged rostokat jelölik (440x). (K) Kontroll és (L) mutáns izom PAS festés (220x) a megnövekedett mioglobin tartalmat és rostátmérőt szemlélteti. (M) kontroll és (N) mutáns izom hosszmetszet Azan (220x), illetve (O) kontroll és (P) mutáns keresztmetszet ezüst impregnáció festése (600x), amely a lecsökkent kötőszöveti állományt szemlélteti a mutánsokban. (R) mutáns izom keresztmetszet Azan festése: ragged rostok és centralizált sejtmag (440x), (S) mutáns izom vas-hematoxilin festés a normális harántcsíkolatot szemlélteti (440x).

M6. Táblázatok jegyzéke

1. táblázat. A myotom determinációban részt vevő szabályozó fehérjék és szerepük	21
2. táblázat. A miosztatin gén szerkezete néhány fajban	25
3. táblázat. A miosztatin expressziós mintázata különböző állatfajokban	31
4. táblázat. Pluripotens humán sejtvonalak	38
5. táblázat. Az egyes szöveti őssejtek származása és terápiás célú felhasználásuk lehetőségei	49
6. táblázat. A kísérletekben felhasznált egértörzsek adatai	55
7. táblázat. ES sejtvonal alapítás eredmények R1 kondícionált médium alkalmazásával, ms kontroll egértörzsekből	tn⁻/⁻ és 70
8. táblázat. ES sejtvonal alapítási eredmények Robertson módszerének alkalmazásával	71
9. táblázat. ES sejtvonal alapítási eredmények CEM tápoldat és módosított ES sejtvonal al alkalmazásával	apítás 71
10. táblázat. Az ES sejtvonalak kariotípusa és euploídia százaléka	72
11. táblázat. Az ES-diploid embrió kiméra aggregációs kísérletek eredményei	73
12. táblázat. Átlagos kontrakciós idő napokban kifejezett alakulása miosztatin mutáns és ko	ontroll
sejtvonalak in vitro differenciáltatása során	78
13. táblázat. Testtömeg összehasonlítás miosztatin mutáns és kontroll egerek között, külö életkorokban	nböző 85
14 táblázat Ismert miosztatin szekvenciájú fajok	131
15. táblázat. ES és EG sejtvonalak előállítása különböző állatfajokból	133
16. táblázat. Az egér kísérletekben felhasznált RT-PCR primerek	134
17. táblázat. Szarvasmarha kísérletekben felhasznált RT-PCR primerek	135
18. táblázat. Ivarmeghatározáshoz használt egér primerek adatai	136
19. táblázat. Miosztatin szekvencián azonosított transzkripciós faktor kötőhelyek adatai	136
20. táblázat. Rosttátmérő változás NADH-TR festés eredményeinek értékelése során	138

M7. Állatvédelmi rendszabályok

Az állatkísérletekben a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Állatbiológiai Intézetének állatházában tenyésztett különböző laboratóriumi egértörzseket hazsnáltuk fel. A kísérletek során a Kutatóintézet Állatvédelmi Bizottsága által jóváhagyott és engedélyezett kísérleti terv szerint jártunk el. Az Intézet állatháza és az ott tartott kísérleti állatok 767/001/2003 iktatószámon nyilvántartásba kerültek az illetékes állategészségügyi állomáson (Az engedély érvényes: 2008. 04. 30.). A kísérleti munka során állatkísérleti jegyzőkönyvet vezettünk az elvégzett beavatkozásokról.

A munka során az alábbi törvények rendelkezéseinek eleget téve végeztük a kísérletes munkát:

- 1998. évi XXVIII. Törvény az Állatok védelméről és kíméletéről, valamint annak 2002. évi LXVIII. számú módosítása.
- 243/1998. (XII. 31.) módosított Korm. rendelet az állatkísérletek végzéséről.
- 36/1999 (IV.2.) FVM-KÖM-GM rendelet, a kísérleti állatok tenyésztésének, tartásának, szállításának, stb. szabályairól.

M8. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó tudományos publikációk

Idegen nyelvű folyóirat, impakt faktor: >1

 Kobolák, J., Réz, G. and Gócza, E. (2004): Differences in gene expression in myostatin mutant ES cell lines during muscle differentiation *Cell Tissue Res.* (revised) IF:2.991

Idegen nyelvű folyóirat, impakt faktor: <0,3

2. Kobolák, J., Gócza, E. (2002): The role of the myostatin protein in meat quality - a review. Arch. Tierz., 45(2):159-170. IF.: 0,251

Impakt faktorral nem rendelkező, hazai, magyar nyelvű folyóiratok

- 3. **Kobolák, J**., Baranyai, B., Dohy, J. (2000): Szintetikus húsmarhafajták alkalmazása a hústermelés növelése érdekében Állattenyésztés és Takarmányozás, 49(6):588-592
- 4. **Kobolák J**. (2001): Szövetpótlás őssejtekkel Természettudományi Közlöny, 132(7):313-315
- 5. **Kobolák J**. (2001): Hogyan lesz az izomszövetből vérsejt? Természettudományi Közlöny, 132(8):349-351
- 6. **Kobolák J**. (2002): A gyógyulás valutái: a köldökvér-őssejtek? Természettudományi Közlöny, 133(6):276-277
- Kobolák J. (2002): A miosztatin fehérje húsminőséget befolyásoló hatása. A Hús, 12(3):171-173
- 8. **Kobolák J**. (2003): Őssejtkutatás: Ha megfelelő jelet kapnak. Élet és Tudomány, LVIII(15):460-463;
- 9. Kobolák J. (2003): Őssejtkutatás: Átváltozások Élet és Tudomány, LVIII(16):486-489
- 10. **Kobolák J**. (2004): Izomszövet őssejtek és alkalmazási lehetőségeik a transzplantációs terápiában. Magyar Tudomány, XLX(3):369-376

Impakt faktorral nem rendelkező, hazai, idegen nyelvű folyóiratok

11. **Kobolák, J**., Bölcskey, K. (2002): The role of myostatin in beef cattle production. Hungarian Agricultural Research, 11(1):16-19
Konferencia esetén: teljes szövegű közlemény, impakt faktorral rendelkező tudományos folyóiratban vagy annak különszámában, lektorált formában megjelentetve

12. Wiener, Z., Tóth, S., Gócza, E., **Kobolák, J**., Falus, A. (2003): Mouse embryonic stem cells express histidine decarboxylase and histamine H1 receptors. *Inflammation Research* (52):53-54, IF.: 1,602

Egy oldalas abstract, alkalmi (nem periodika jellegű) kongresszusi kiadványban, idegen nyelven (Előadás):

13. Gócza, E., Kobolák, J., Nagy, V., Tóth, S., Wiener, Z. (2002): Characterisation of stem cell markers in pluripotent inbred and outbred mouse ES stem cell lines. Lecture at the 'Human Cell Culture 2002' ETCS Meeting, Oxford, UK, 22-24 September 2002. Book of abstracts, p. 18

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

- 14. Gócza, E., Kobolák, J., Horváth, B., Tóth, S. (1999): Leukemia inhibitory factor receptor as a marker of differentiation of murine embryonic stem cells. Poster at the 10th IMP Spring Conference on Cell Biology of Cell Division, Vienna, Austria, 27-29 May 1999. Book of abstracts, p. 61.
- Kobolák, J., Nagy, V., Laczkó, L., Gócza, E. (2001): Derivation of ES cell lines: new method for mouse strain independent ES cell line establishment. Poster at the 43rd ETCS Congress, Granada, Spain, 28th September-4th October 2001. Book of abstracts, P1-05.
- Kobolák, J., Gócza, E. (2002): Myostatin mutant stem cell differentiation: application for the therapy of dystrophy. Poster at the EMBO workshop on the molecular Genetics of Myogenesis and Muscle Diseases, Cambridge, UK, 29th September-3rd October 2002. Proceedings, p. 43.
- Kobolak, J., Gócza, E. (2003): Differing transcription factor expression in myostatin mutant mice during muscle differentiation. Poster at the 'Embryonic stem cells' mini-symposium, Gödöllő, Hungary, 12th November 2003. Proceedings, p. 21.
- Kobolák, J., B. Görhöny, I. Király, K. Kiss, K. Bölcskey and E. Gócza, (2004): Differences in gene expression in myostatin-mutant Belgian White-Blue satellite cell cultures during differentiation. Poster at the 55th Annual Meeting of the European Association of Animal Production, Bled, Slovenia, 5-9 September, 2004

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

- Gócza, E., Kobolák, J. (2001): Embrionális őssejtvonalak: múlt, jelen és jövő. Előadás, IX. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Debrecen, 2001. Január 21-24. Absztraktkönyv, 103. p.
- Kobolák J., Nagy V., Laczkó L., Gócza E. (2002): Embrionális eredetű őssejtvonalak alapításának és differenciáltatásának vizsgálata. Előadás, Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának 7. Munkaértekezlete, Keszthely, 2002. Absztraktkönyv, CE-2.
- 21. Kobolák J., Nagy V., Tóth, S., Wiener, Z., Gócza E. (2002): Egér embrionális eredetű ős-sejtvonalak in vitro differenciáltatása: első lépések. Előadás, X. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, 2002. Absztraktkönyv, p. 47
- Kobolák J., Gócza E. (2003): Embrionális őssejtek alkalmazása in vitro differenciáltatási rendszerben. Előadás V. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok, 2003. Április 13-15. Absztraktkönyv, 74-75. p.

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

- 23. Kobolák J., Gócza E., Horváth B., Tóth S. (2000): Leukémia inhibitor faktor (LIF) receptor vizsgálata az ES sejtek differenciálódása során. Poszter, VIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Pécs, 2000. Január 17-19. Absztraktkönyv, P13
- Kobolák, J., Nagy, V., Laczkó, L., Gócza, E. (2001): Embrionális eredetű őssejtvonal alapítási módszerek összehasonlító vizsgálata. Poszter, IX. Sejtés Fejlődésbiológiai Napok, Debrecen, 2001. Január 21-24. Absztraktkönyv, 111. p.
- 25. Kobolák J., Görhöny B., Király I., Kiss K., Bölcskey K., és Gócza E. (2004): Génexpressziós különbségek miosztatin mutáns fehér-kék belga szarvasmarhafajta izomszövet prekurzor tenyészeteinek in vitro differenciáltatása során. <u>Poszter, XII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok</u>, Pécs 2004. Április 16-18. absztraktkönyv, 35. p.

10. Köszönetnyilvánítás

Őszinte tisztelettel köszönöm Szüleimnek és Férjemnek, valamint családom tagjainak a támogatást, ösztönzést, a sok szeretetet és türelmet, amellyel e munka elkészültét segítették.

Ez úton szeretnék köszönetet mondani továbbá tanáraimnak és segítőimnek:

Dr. Gócza Elennek témavezetőmnek, aki tanított, irányította munkámat és segítségemre volt a laboratóriumban.

Dr. Bősze Zsuzsanna Állatbiológiai Intézet igazgatónak, aki lehetővé tette, hogy az Intézetben dolgozhassak, támogatta és felügyelte munkámat.

Köszönöm továbbá Bodó Szilárd, Bolyós Tivadarné Rózsika, Gróf Mihályné Marika, Kungl Györgyi, Licskó Adrienn, Nagy Veronika, Polgár Zsuzsanna, Szabó László és Valer Bogdan Carstea kollégáim segítségét a mindennapi munkám során.

Külön köszönet illeti:

Dr. Müller Gézát (EGIS) és Dr. Varga Lászlót (MBK), akik a Cmpt mutáns egértörzset a kutatások számára rendelkezésünkre bocsátották;

Dr. Nagy Andrást (Mount Sinai Hospital, Toronto, Canada), aki az R1 ES sejtvonalat, valamint a Tg(GFPU)5Nagy/J transzgénikus egértörzset rendelkezésünkre bocsátotta;

Dr. Barta Endrét (MBK) aki a TRANSFAC 7.2 számítógépes program működtetésében segédkezett;

Szabó Gyulát és Sóvári Krisztinát (MBK) akik a Cmpt keresztezések genotipizálását végezték;

Dr. Dinnyés András, Dr. Görhöny Botond, és Dr. Balogh Emese kollégákat (MBK), akik a telepi szarvasmarha mintavétel kivitelezésében és lebonyolításában nyújtottak segítséget;

Dr. Magyar Éva, Dr. Arató Gabriella, Dr. Kósa Rita és Truszka Ferencné Mónika, az OGYK Pathológiai Intézetének munkatársait, akik az egér izom hisztopathológiai analízisében és az ELMI felvételek elkészítésében, valamint az analízisben segédkeztek; Dr. Réz Gábor, Pálfia Zsolt és Pálfia Sára az ELTE Állatszervezettani tanszékének munkatársait, akik a NADH-TR festés és morfometria elvégzésében segítettek;

Dr. Szmolenszky Ágnest, aki a dolgozat szakmai és helyesírási hibáinak javításában nyújtott nélkülözhetetlen segítséget.

A munka elvégzését az OTKA-T037587 számú pályázata, valamint a BIO-00020/2001 és OMFB-01896/2002 pályázatai biztosították.