SZENT ISTVÁN EGYETEM

Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont

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

Doktori értekezés tézisei

Készítette:
Kobolák Julianna

2004
GÖDÖLLŐ

A doktori iskola:

Megnevezése: **Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola**
Tudományága: **Mezőgazdaságtudomány**

Vezetője: **Dr. Horváth László**
egyetemi tanár, PhD, DSc.,
SZIE, Mezőgazdaságtudományi Kar
Halgazdálkodási Tanszék

Témavezető: **Dr. Gócza Elen**
tudományos munkatárs, PhD
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont
Állatbiológiai Intézet

…… ……
Az iskolavezető jóváhagyása A témavezető jóváhagyása

1. A munka előzményei és a kitűzött célok

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 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 volt 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.

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 differenciálódásának 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.

A dolgozatban tárgyalt kísérleti munka főbb célkitűzései:

1. A miosztatin gén mutációját hordozó, pluripotens embrionális ős-sejtvonalak 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 ős-sejtvonallal.
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.
7. 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.

2. Anyag és módszer

Vizsgálatainkhoz a miosztatin mutáns (*mstn*$^{-/-}$), ún. *compact* egértörzs homozigóta *Egfp* transzgénikus törzzsel való keresztezéséből származó egereket használtuk fel. A keresztezés révén kapott F_1 heterozigóta *mstn*$^{+/-}$/*Egfp*$^{+/-}$ egyedeket testvérpárosítottuk, majd a kihasadó homozigóták révén új törzseket alapítottunk *mstn*$^{+/+}$/*Egfp*$^{-/-}$ és *mstn*$^{-/-}$/*Egfp*$^{+/+}$), amelyeket beltenyésztési programban tenyésztettünk tovább.

Az egértörzsektől szuperovuláltatás révén hólyagcsíra állapotú embriókat gyűjtöttünk, amelyeket ES sejtvonal alapításra használtunk fel.

A sejtvonal alapításhoz kidolgoztunk egy új, kondícionált tenyésztő tápoldat alkalmazásán alapuló sejtvonal alapítási módszert (részletesen lásd: Eredmények), amellyel több miosztatin mutáns és kontroll sejtvonalat alapítottunk. Az újonnan alapított sejtvonalak pluripotenciáját *in vitro* (kariotípus analízis, alkalikus foszfatáz enzim aktivitás, SSEA-1 sejtfelszíni antigén expresszió, Oct-4 génexpresszió) és *in vivo* (kiméra analízis) részletesen vizsgáltuk.

Az izomszövet differenciálódás vizsgálatához az ES sejtvonalakat in vitro differenciáltattuk az ún. *függőcseppes aggregációs* módszert alkalmazva. A függőcseppekben aggregáltatott ES sejtekből kialakult embrió csomókat (EB) in vitro differenciáltattuk szuszpenziós, majd letapadó kultúrában, 30 napig. Ez idő alatt rendszeresen mintákat gyűjtöttünk, amelyekből mRNS-t preparáltunk. Az mRNS mintákat RT-PCR eljárás alkalmazásával vizsgáltuk, 17 kiválasztott gén expressziójára. A vizsgálatba bevont géneket az irodalomban közölt korábbi eredmények és a miosztatin gén kódoló régióján végzett transzkripciós faktor kötőhely analízisünk alapján választottuk ki.

Az embrionális őssejtek in vitro differenciáltatásával párhuzamosan izomszövet eredetű őssejtek izolálását és in vitro differenciáltatását is elvégeztük, primer izomszövet tenyészetek vizsgálatával együtt. A vizsgálatokat egéren és szarvasmarhán egyaránt elvégeztük. A differenciáltatás során az ES sejteknél leírt génexpressziós vizsgálatokat végeztük el, az ott leírtakkal azonos módon.

A compact egértörzsön részletes morfológiai és hisztológiai analízist végeztünk. Tömegmérési kísérletekben hasonlítottuk össze a miosztatin mutáns és kontroll egyedek születéskori alomtömegét és átlagos egyedi tömegét, a választáskori alomtömeget és az átlagos egyedi tömeget, valamint a felnőttkori testtömeget. A tömegmérési kísérletekkel párhuzamosan izomtömeg mérési kísérleteket végeztünk, ahol több izom tömegét hasonlítottuk össze.

A hisztológiai analízis során fénymikroszkópos (hematoxilin-eozin, metilzöld-pironin, vashematoxilin, azan-festés, Van Gieson-festés, ezüst impregnáció) és elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztünk.

Emellett az egyes izmok rosttípusának meghatározásához tetrazólium reduktáz (NADH-TR) festést és morfometriai analízist használtunk.

Az egyes kísérletekből nyert adatokat statsztikai analízissel értékeltük (Fischer-teszt, khi^2-próba).

3. Eredmények

3.1 Embrionális ős-sejtvonalak alapítása mstn-/- mutáns egértörzsből

A sejtvonal alapítási kísérletekhez kidolgoztunk egy kondícionált tápoldaton alapuló eljárást. A jól jellemzett, R1 ES sejtvonallal kondícionáltuk az ES tenyésztő tápoldatot. A hagyományosan ES tenyésztésére használt 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 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 $NaHCO_3$ 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 mitomicin 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 mitomicin 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, mitomicin C-vel kezelt, első passzázsú MEF sejtrétegre helyeztük CEM tápoldatban.
- A megfelelő kolóniaszám elérését követően 6 cm-es Petri-csészére vittük 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 5 miosztatin mutáns (*mstn*$^{-/-}$*/Egfp*$^{+/+}$) és két 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 *in vitro* és *in vivo* kísérletekben egyaránt. A sejtvonalak analízisekor a miosztatin mutáció genotipizálását újra elvégeztük a sejteken. Eredményeink szerint a vizsgált sejtvonalak pluripotensnek bizonyultak.

3.2 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. A kondícionált tápoldat és módosított ES alapítási eljárást az ún. „klasszikus” módszerrel hasonlítottuk össze.

A klasszikus módszerrel egyetlen ES sejtvonalat sem sikerült létrehoznunk a vizsgált öt egértörzs (129SV, F2, CBA, BalbC, NMRI) embrióiból, míg a kondícionált médium alkalmazásával sikeresen hoztunk létre non-permisszív egértörzs embrióiból is ES-sejtvonalakat. A 129SV egértörzsnél 6%, az F2 törzsnél 2%, a CBA törzsnél 6%, a BalbC törzsnél 6%, míg az NMRI törzsnél 17% volt a hatékonyság a kiindulási embriószámra vonatkoztatva.

A sejtvonalak pluripotenciájának vizsgálatakor először a sejtvonalak euploídia-fokát határoztuk meg kromoszómaszám meghatározással, Giemsa festést alkalmazva. A sejtvonalak ivarát PCR segítségével határoztuk meg. 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 aktivitást. Minden vizsgált sejtvonal pozitívnak bizonyult mindhárom markerre nézve.

Az in vitro vizsgálatok után a sejtvonalakat in vivo kiméra kísérletekben vizsgáltuk. Így a sejtvonalakat ES—diploid embrió aggregációs kiméra kísérletben teszteltük a kiméra-képző képességet, majd pedig az ivari kimérizmust tekintve. Eredményeink szerint csak az F2 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$^{+/+}$2 sejtvonal, míg azt R1 kimeraképző képességét jóval meghaladó értéket detektáltunk az mstn$^{-/-}$/Egfp$^{+/+}$1 és CBA sejtvonalaknál. Az mstn$^{-/-}$/Egfp$^{+/+}$1 sejtvonalnál a kimeraképzés azonban erősen gazdaembrió-függőnek bizonyult: az F2 partner csökkent kimérizmust eredményezett a CD1 gazdaembrió partnerhez viszonyítva.

3.3 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.

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.

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.

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.

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.

3.4 ES sejtvonalak vázizom irányú differenciáltatása

Az újonnan alapított miosztatin mutáns ES sejtvonalak pluripotenciájának bizonyítását követően a sejtvonalak izomszövet irányú differenciálódási képességét

vizsgáltuk meg. Mindhárom miosztatin mutáns, a kontroll és az R1 ES sejtvonalat is differenciáltattuk. Az EB csomókat zselatinozott 10 cm-es Petri-csészére 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.

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. 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, ami a kontroll sejtvonalaknál nem volt kimutatható.

A génexpressziós mintázat analízisekor 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.

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. Nagyon enyhe 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-ben.

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 detektáltuk, azonban jóval erősebb szinten, mint a kontroll sejtvonalakban. Az MRF expresszió jóval hosszabb ideig volt megfigyelhető, mint a kontroll sejtvonalakban.

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 (10. naptól a 16. napig) tudtuk kimutatni a mutáns sejtekben. Ezzel szemben a kontrollban csak egyetlen időpontban (10. nap) mértünk hasonlóan magas aktivitást.

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.

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. 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.

Az Igf1 transzkripciós aktivitása erőteljesebb volt a mutáns sejtvonalakban a differenciálódás második szakaszában (19. nap) a kontrollhoz képest. A két MNF izoforma vizsgálatakor nem tudtunk különbséget kimutatni az egyes sejtvonalak között.

A Sox5 transzkripciós faktor vizsgálatakor jelentős különbséget detektáltunk a sejtvonalak között. A Sox5 transzkriptumának mennyisége három vizsgált időpontban is magasabbnak mutatkozott az mstn mutáns sejtvonalban (10. naptól a 16. napig). A kontroll sejtvonalak között is különbséget detektáltunk, a Sox5 expresszió gyengébb volt az R1 kontrollban, mint az *mstn*$^{+/+}$*/C7* sejtvonalban.

A dezminnél a késői differenciálódási periódusban (22. naptól a 29. napig mutattunk ki nagyobb expresszió növekedést a mutáns sejtekben, míg a korai szakaszban (10. naptól a 19. napig) ez elenyésző volt.

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, vagy más néven 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.

3.4.1 Izomszövet őssejtek (szatellita sejtek) és primer izomszövet tenyészetek differenciáltatása

Vázizom eredetű szöveti őssejteket izoláltunk tehát a miosztatin mutáns és kontroll egyedekből. Az izolált szatellita sejteket *in vitro* differenciáltattuk. Ezt követően az ES sejtvonal differenciáltatás során leírt szemi-kvantitatív RT-PCR eljárást alkalmazva a korábban már ismertetett és az ES sejtek differenciálódása során analizált 17 gén expresszióját vizsgáltuk meg. Az expressziós mintázat összehasonlításakor a MyoD, Myf5, Cdk2 és Sox5 géneknél expresszió növekedést detektáltunk a miosztatin mutáns, differenciálódó mioblasztokban (D3), míg a p21 és Smad3 szint lecsökkent. A mioblaszt 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, soksejtmagvű rostokkal találkozunk a tenyészetben, a tenyészetek

közötti expressziós különbségek lecsökkentek: a kontrollhoz képest csak a miogenin, az MRF4, a dezmin és a MyHC I mutatott magasabb expressziót az *mstn* mutáns szatellita tenyészetekben.

A primer izomszövet tenyészeteket in vitro differenciáltattuk, majd az ES és szatellita tenyészetek esetén kapott mintázattal összehasonlítottuk. A kapott expressziós mintázat szinte teljesen megegyezett a szatellita sejtek differenciáltatása során kapott eredményekkel.

3.5 Morfológiai vizsgálatok

A miosztatin mutációt hordozó egértörzs vizsgálatakor testtömeg és izomtömeg méréseket végeztünk. A születéskori alomtömeget és korrigált alomtömeget tekintve, valamint az alomtömegekből számított átlagos testtömeget tekintve nem találtunk szignifikáns eltérést a miosztatin mutáns 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. A 16 hetes testtömeg mérésnél ivar szerinti szignifikáns eltérést tapasztaltunk, miszerint az *mstn*$^{-/-}$ hímek átlagosan 51,57 (±2,18) gramm tömege nagyobb volt a kontroll hímek átlagos 43,41 (±3,41) gramm tömegétől. A nőstényeknél ehhez hasonlóan, a kontroll egyedek átlagosan 29,24 (±4,11) gramm tömegét szignifikánsan meghaladta a vizsgált miosztatin mutáns nőstény egyedek átlagos testtömege (38,18±2,31 g). Ha azonban ivar szerint nem teszünk különbséget, akkor 16 hetes korban nincs szignifikáns eltérés a kontroll (34,9±5,8 g) és mutáns (46,12±5,6 g) egyedek között.

Nemcsak a testtömeg tekintetében, hanem az egyes izmok tömegét illetően is végeztünk vizsgálatokat. Az irodalmi adatokból ugyanis kiderült, hogy egészséges egyedeknél a miosztatin-szint az egyes izmokban eltérő. Ezért feltételezhető volt, hogy a hipertrófia mértéke miosztatin hiányában nem egyforma az egyes izmokban. Minden vizsgált izomnál tömegnövekedést detektáltunk a kontrollhoz képest. A legjelentősebb eltérést a kontroll és mutáns egyedek izmai között azonban 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.

3.6 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 rostspecifikus enzimhisztokémiai reakció segítségével (NADH-TR festés) azonosítottuk az egyes rosttípusokat az izom keresztmetszetében.

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. masseter*, csökkent a *m. gastrocnemius* és m. *pectoralis,* míg növekedett 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.

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

A rosttípusok megoszlása a rostterület tekintetében ismételten jelentős eltéréseket mutatott. Minden izomban a IIB típusú rostok területaránya mutatta a legnagyobb értéket. 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.

3.7 Szövettani analízis

A fénymikroszkópos hisztotechnikai eljárások során az *mstn* mutáns állatok izomzatának szerkezeti, struktúrális felépítését kívántuk megvizsgálni és összehasonlítani kontroll egyedek izommintáival. A vizsgálatokhoz formalinnal rögzített, paraffinba ágyazott metszeteket használtunk. A fent részletezett hisztológiai festések elvégzését követően az alábbi következtetések voltak levonhatók:

- A hematoxilin-eozin festést követően egyértelmű rostátmérő növekedés volt detektálható az *mstn* mutáns állatokban. A rostátmérő növekedése 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 azonosíthatók az $mstn^{-/-}$ egerek izmaiban.
- A hosszmetszet normális harántcsíkolatot mutatott. Ezt a vashematoxilin festés eredménye is megerősítette.
- 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.

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 a kontrollhoz viszonyítva egyetlen vizsgált izomban sem mutatott kóros eltérést.
- A miosztatin mutáns izmokban a mitokondrium számának igen jelentős, főként a szubszarkolemma területre kiterjedő növekedését tapasztaltuk. 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 mutáns egyedek izmaiból készült metszetekben gyakrabban figyeltünk meg sejtmagokat és szatellita sejteket. Azonban a megnövekedett sejtmag és szatellita sejtszám igazolására további kísérlet szükséges.
- A mutánsok izmaiból készült keresztmetszeti képek analízisekor ún. tubuláris aggregátumok (TA) voltak megfigyelhetőek.

3.8 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* egyedeinek 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 mioblaszt sejttenyészetet az izombiopsziák szöveti izolátumából. A *fehér-kék belga* 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, amely a IIA típus rovására következett be. A differenciálódás során mért génexpressziós különbségek a miosztatin izomszövet differenciálódásban betöltött szerepét támasztják alá.

3.9 Új tudományos eredményeim

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 non-permisszív 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.

4. 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 *in vitro* rendszerben, vagyis szövettenyészetekben is jól nyomon követhető legyen, 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.

Habár számos embrionális őssejt alapítási módszer került kidolgozásra az elmúlt 10 évben, ennek ellenére, mind a mai napig nem létezik hatékony, könnyen kivitelezhető, és törzsfüggetlen ős-sejtvonal alapítási technika. Ezért ES sejtvonal alapítási metodika fejlesztésébe fogtunk, azzal a céllal, hogy kidolgozzunk egy olyan ES sejtvonal alapítási eljárást, amely lehetővé teszi non-permisszív egértörzsek, vagy nem beltenyésztett egértörzsek esetén is az ES sejtvonalak sikeres létrehozását.

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 (*Compact*) származó embrionális ős-sejtvonal alapítására. 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. A módszer hatékony eszközt ad poligénes fenotípusok mutáns törzsben való követésére is.

A módszer teszteléséhez a miosztatin mutáns egértörzsön kívül 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.

Így újonnan alapított embrionális ős-sejtvonalinkat és az igen jól jellemzett kontroll, 129SV eredetű R1 ES sejtvonalat in vitro differenciáltattuk és követtük számos, az embrió korai differenciálódásért és a sejtleszármazás alakulásáért felelős gén expresszióját. Feltételezéseink szerint a különböző genetikai eredetű sejtvonalak in vitro differenciáltatása során, a korai elköteleződés során ható gének aktivitásának vizsgálata rávilágíthat a törzsek közötti különbségekre és így a törzsfüggőség okára is.

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. 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 kimérát létrehozni.

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. Csak a „normális" mRNS szint képes megőrizni az ES sejtek pluripotens állapotát. 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 Fgf4 esetében, melynek expresszióját Sox2 - Oct4 komplexek aktiválják az mRNS-szint lassú csökkenést mutatott. 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.

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.

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.

A telomeráz reverz transzkriptáznak egér ES sejtekben való 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. A négy telomerázt expresszáló sejtvonal telomeráz aktivitásában nem találtunk különbséget. A telomeráz 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.

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. 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.

Az izomszövet differenciálódás nyomonkövetésére két módszert alkalmaztunk. Az ES sejtvonalak in vitro differenciáltatását, mely régóta ismert és egyre szélesebb körben alkalmazott technika a szöveti differenciálódás során zajló folyamatok megismerésére. A másik, az izomszövetből izolált ún. szöveti eredetű őssejtek vagy más néven szatellita sejtek izomszövet irányú *in vitro* differenciáltatása szintén széles körben alkalmazott eljárás az izomdifferenciálódás tanulmányozására. 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 újonnan alapított sejtvonalak differenciációs kapacitását is teszteltük: nem találtunk szignifikáns különbséget az $mstn^{-/-}/Egfp^{+/+}$ és $mstn^{+/+}/C$ törzsből származó sejtvonalak között. Mindamellett mérsékelt eltérés volt tapasztalható a differenciálódás idejét tekintve. Az izomdifferenciálódás első jeleként megjelenő kontraháló EB csomók később jelentek meg, a kontrakciós periódus pedig tovább tartott a mutáns sejtvonalban, mint a kontrollban. Ezek a különbséget azt mutatják, hogy a miosztatin befolyással lehet az izom differenciálódás időbeli lefutására.

Ahhoz, hogy a miosztatin hatását tanulmányozhassuk, a differenciálódás során zajló génexpressziót vizsgáltuk. 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.

Az embrionális őssejtek vázizommá történő in vitro differenciálódása során zajló génexpressziós történéseket szemikvantitatív 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 kontroll vonalak MRF génexpressziós mintázataiban. A kontroll sejtek expressziós profilja összevethető volt az izomsejtek embrionális differenciációja során megfigyelt és leírt embrionális expressziós mintázattal.

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. 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 miogenin-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.

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. A kapott eredmények azt bizonyítják, hogy a miosztatinnak jelentős szabályozó hatása van a sejtosztódást illetően: amikor a mutáns miosztatin fehérje sejtosztódást gátló hatása nem képes érvényesülni, így a p21 csak csökkent szinten expresszál, 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.

A paired homeobox transzkripciós faktorok, a Pax3 és Pax7 szükségesek a szatellita sejtek kialakulásához, valamint az izomszövet differenciálódáshoz. Az *mstn* mutáns sejtekben mindkét faktor expressziós szintje növekedést mutatott, amely alátámasztani látszik a miosztatin izomszövet differenciálódás során betöltött negatív reguláló szerepét.

Tovább vizsgálva a génexpresszió nyomon követésére irányuló kísérleteinket, elmondhatjuk, hogy a leglátványosabb különbséget a Sox5 transzkripciós faktornál 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. 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 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 expressziós mintázat, amelyet a szatellita sejtek differenciálódása során detektáltunk konzisztens az ES sejtvonal differenciáltatás során kapott expressziós mintázattal. Eltérés alig volt tapasztalható a vizsgált gének expresszió intenzitásában és időbeli lefutásában. A szatellitasejt differenciáltatási vizsgálatok jól igazolták az ES sejtek vázizom specifikus differenciálódását.

Kísérleteinkben a három alapvető rosttípus hisztokémiai NADH-tetrazólium reduktáz (NADH-TR) reakció alapján került azonosításra. 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 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. A fénymikroszkópos hisztológiai analízis emellett a miosztatin null-mutáns egereken korábban már 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. Ez azonban gyakran mitokondrium szerkezeti elváltozásokkal jár együtt, azonban 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. 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.

Eredményeinket hipertrófiás szarvasmarha szatellita és primer mioblaszt 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 mioblaszt 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 mioblaszt preparátumot készítettünk. Így egy lépésben, igen hatékonyan lehetett sejteket nyerni a biopsziákból.

A szatellita és mioblaszt 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 mioblaszt 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.

5. A szerzőnek az értekezés témaköréhez kapcsolódó publikációi

Idegen nyelvű folyóirat, impakt faktor: >1

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
7. **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.
15. **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.
16. **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.
17. **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.
18. **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):

19. 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.
20. **Kobolák J**., Nagy V., Laczkó L., Gócza E. (2002): Embrionális eredetű ős-sejtvonalak 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
22. **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
24. **Kobolák, J**., Nagy, V., Laczkó, L., Gócza, E. (2001): Embrionális eredetű őssejtvonal alapítási módszerek összehasonlító vizsgálata. Poszter, IX. Sejt- és 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. Poszter, *XII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok*, Pécs 2004. Április 16-18. absztraktkönyv, 35. p.