



**Állatteny észt és-tudom ányí Doktori Iskola**

**EMLŐS TESTI SEJTEK ÚJRAPROGRAMOZÁSA ŐSSEJTEKKÉ,  
A PLURIPOTENCIA TANULMÁNYOZÁSA**

Doktori (PhD) értekez és

**Varga Eszter**

Gödöllő  
2015

**A doktori iskola**

**Megnevezése:**

**Állattenyésztés- és tudományi Doktori Iskola**

**Tudományága:**

**Állattenyésztés- és tudomány**

**Vezetője:**

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

Tanszékvezető, egyetemi tanár

Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és

Környezettudományi Kar, Állattudományi Alapok

Intézet, Takarmányozástani Tanszék

**Témavezető:**

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

Laboratóriumvezető, egyetemi tanár

Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és

Környezettudományi Kar, Állattudományi Alapok

Intézet, Molekuláris Állatbiotechnológiai Laboratórium

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>TARTALOMJEGYZÉK</b> .....	<b>3</b>
<b>RÖVID ÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	<b>5</b>
<b>1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	<b>9</b>
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	<b>11</b>
2.1. <i>A pluripotens őssejtek</i> .....	11
2.1.1. A pluripotens sejtek felfedezése és a négy méréföldköve.....	14
2.1.2. A naiv és „aktivált” (primed) pluripotencia.....	14
2.1.3. A pluripotencia molekuláris alapjai.....	17
2.1.4. A pluripotencia igazolása <i>in vitro</i> .....	23
2.1.5. A pluripotencia igazolása <i>in vivo</i> .....	26
2.2. <i>A genetikai újraprogramozás</i> .....	28
2.2.1. Újraprogramozás testi sejt magát ültetéssel.....	28
2.2.2. Sejtfejtési óval való újraprogramozás.....	29
2.2.3. Sejt kivonattal való újraprogramozás.....	29
2.2.4. Transzdifferenciáció.....	30
2.2.5. Transzkripciós faktorok túlexpresszálása a sejtekben.....	30
2.3. <i>Az indukált pluripotens őssejtek</i> .....	34
2.3.1. Az iPSC előállítás mérőföldkövei.....	34
2.3.2. Az iPSC alapfáshoz alkalmazott sejt donor genetikai háttere és a kiinduló sejt típusa.....	35
2.4. <i>Transzgen-mentes iPSC vonalak generálása</i> .....	40
2.4.1. Nem integráló DNS alapú vektorral való újraprogramozó technikák.....	40
2.4.2. DNS-mentes újraprogramozó technikák.....	42
2.4.3. Integráló kivágó konstrukcióval való újraprogramozó technikák.....	45
2.4.4. Kémiai újraprogramozás.....	48
2.5. <i>Az iPSC vonalak jelentősége az állattenyésztésben</i> .....	49
2.6. <i>Az iPSC vonalak gyógyászati alkalmazása</i> .....	50
<b>3. ANYAG ÉS MÓDSZER</b> .....	<b>53</b>
3.1. <i>Az iPSC-k generálásához kapcsolódó standard eljárások</i> .....	53
3.1.1. Sejttenyésztés.....	53
3.1.2. Lentivírus előállítás.....	55
3.1.3. AP-festés.....	55
3.1.4. ICC-festés.....	55
3.1.5. RT-PCR.....	56
3.1.6. Genomi DNS izolálása.....	57
3.1.7. Áramlási citometria.....	57
3.1.8. Southern blot analízis.....	57
3.1.9. Az iPSC-k spontán differenciációja <i>in vitro</i> .....	58
3.1.10. A miPSC-k irányított <i>in vitro</i> neurális differenciációja.....	58
3.1.11. Kimutatás a létrehozása miPSC-kből.....	59
3.2. <i>Különböző genetikai hátterű egér miPSC vonalak létrehozása lentivírus transzdukcióval</i> .....	60
3.2.1. Alkalmazott egér törzsek.....	60
3.2.2. Egér OSKM lentivírus plazmid.....	60
3.2.3. Egér sejtek lentivirussal történő transzdukciója.....	61
3.3. <i>Transzgen-mentes miPSC vonalak létrehozása lentivírus transzdukcióval</i> .....	62
3.3.1. A Cre-plazmid expressziója és a transzgen kivágásának igazolása.....	62
3.4. <i>Az miPSC vonalak létrehozása egy újraprogramozó rendszerek alkalmazásával</i> .....	64
3.4.1. Az miPSC generálásának bevitellel.....	64
3.5. <i>Transzgen-mentesíthető humán iPSC vonalak létrehozása lentivírus transzdukcióval</i> .....	65
3.5.1. Az újraprogramozandó kiinduló sejt típus izolációja.....	65
3.5.2. Humán OKSM lentivírus plazmid.....	65
3.5.3. Humán PBMC-k lentivírus transzdukciója.....	66
3.5.4. A transzgen kivágása és annak igazolása az L-hiPSC vonalakban.....	67
3.6. <i>Transzgen-mentesíthető hiPSC vonalak létrehozása Sleeping Beauty-transzpozonnal</i> .....	69
3.6.1. Az újraprogramozandó kiinduló sejt típus izolációja.....	69
3.6.2. SB-transzpozon és transzpozon plazmidok és transzfekciójuk.....	69
3.6.3. A transzgen kivágása Sleeping Beauty-humán iPSC vonalakkal.....	70
<b>4. EREDMÉNYEK</b> .....	<b>75</b>

4.1. Különböző genetikai háttérű egér iPSC vonalak létrehozása lentivírus transzdukcióval.....	75
4.1.1. A kísérletek előzménye.....	75
4.1.2. MEF újraprogramozása lentiv fússal.....	75
4.1.3. Az L-miPSC vonalak pluripotencia karakterizációja.....	76
4.2. Transzgén-mentes L-miPSC vonalak létrehozása.....	78
4.2.1. A transzgén-mentes L-miPSC-k szelekciója a Cre-transzfekcióját követően.....	78
4.2.2. Az L-miPSC vonalak pluripotencia karakterizációja kivágás előtt és után.....	80
4.2.3. Az L-miPSC vonalak <i>in vitro</i> differenciációja kivágás előtt és után.....	81
4.2.4. Kiméra kőpész és csővonal transzmisszió.....	85
4.3 Az miPSC vonalak létrehozása fehérje bevitellel.....	86
4.3.1. A P-miPSC vonal pluripotencia karakterizációja.....	86
4.3.2. A P-miPSC vonal <i>in vitro</i> spontán/kardiális differenciációja.....	87
4.3.3. A P-miPSC vonal kiméra kőpész és kőpészesség.....	89
4.4 Transzgén-mentesíthető hiPSC vonalak létrehozása lentivírus transzdukcióval.....	90
4.4.1. Humán vérből származó PBMC-k újraprogramozása lentiv fússal.....	90
4.4.2. Az L-hiPSC vonalak pluripotencia karakterizációja.....	91
4.4.3. Az L-hiPSC vonalak spontán differenciációja.....	93
4.4.4. Az L-hiPSC vonalak transzgén-mentesítése.....	94
4.5 Transzgén-mentesíthető hiPSC vonalak létrehozása SB-transzpozonnal.....	97
4.5.1. HFF újraprogramozása SB-transzpozonnal.....	97
4.5.2. Az SB-hiPSC vonalak pluripotencia karakterizációja.....	97
4.5.3. Az SB-hiPSC vonalak spontán differenciációja.....	98
4.5.4. Az SB-hiPSC vonalak transzgén-mentesítése.....	98
<b>5. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE ÉS JAVASLATOK.....</b>	<b>105</b>
5.1. Különböző genetikai háttérű miPSC vonalak létrehozása lentivírus transzdukcióval.....	105
5.2. Transzgén-mentes miPSC vonalak létrehozása lentiv fússal transzdukcióval.....	106
5.3 Az miPSC vonalak létrehozása fehérje bevitellel.....	108
5.4 A hiPSC vonalak létrehozása lentiv fússal transzdukcióval.....	110
5.5 A hiPSC vonalak létrehozása SB-transzpozonnal.....	111
5.6 Transzgén-mentes hiPSC vonalak létrehozása SB-transzpozonnal vs. lentiv fússal.....	111
<b>6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....</b>	<b>115</b>
<b>7. ÖSSZEFOGLALÁS.....</b>	<b>117</b>
<b>8. SUMMARY.....</b>	<b>119</b>
<b>9. MELLÉKLETEK.....</b>	<b>123</b>
9.1. Irodalomjegyzék.....	123
9.2. Felhasznált oldatok/tenyésztő médiumok.....	156
9.3. Melléklet táblázatai és ábrái.....	160
9.4. Publikációs lista.....	162
9.4.1. Az értekezés témakörében megjelent lektorált magyar és idegen nyelvű publikációk felsorolása.....	162
9.4.2. Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó lektorált magyar és idegen nyelvű publikációk felsorolása.....	165
9.4.3. Egyéb tudományos tevékenységek.....	166
<b>10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>167</b>

## RÖVID ÍTÉSEK JEGYZÉKE

AP	Alkaline Phosphatase (alkalikus foszfatáz)
<i>βgeo</i>	β-galaktozidáz és a neomicin génfüziója
BMP	Bone Morphogenetic Protein (csont morfogén fehérje)
BSA	Bovine Serum Albumin (szarvasmarha szérumalbumin)
CPP	Cell-Penetrating Peptid (sejten-áthatolópeptid)
CRISPR/Cas	CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ Cas: CRISPR-Associated protein
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimetil szulfoxid
EB	Embryoid Body (embrionális testecske)
EBNA1	EB nukleáris antigén 1
ECC	Embryonic Carcinoma Cell (embrionális karcinómasejt)
EDTA	Etilén Diamin Tetraecetsav
EF1α	Elongation Factor 1-alpha
EGC	Embryonic Germ Cell (embrionális csősejt)
EGFP	Enhanced Green Fluorescens Protein (zöld fluoreszcens fehérje)
EpiSC	Epiblast Stem Cell (epiblaszt őssejt)
EPO	Erythropoietin
ESC	Embryonic Stem Cell (embrionális őssejt)
EV	Episzómális Vektor
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (áramlási citometria)
FBS	Fetal Bovine Serum (újszülött szarvasmarha szérum)
FGF	Fibroblast Growth Factor (fibroblaszt növekedési faktor)
GDF	Growth Differentiation Factor (növekedési differenciációs faktor)
GSK-3	Glikogén Szintáz Kináz-3
HD	Hanging Drop (függő csepp)
hESC	Human Embryonic Stem Cell (humán embrionális őssejt)
HFF	Human Foetal Fibroblast (humán magzati fibroblaszt)
hiPSC	Human Induced Pluripotent Stem Cells (humán indukált pluripotens őssejt)
ICC	Immuncitokémia

ICM	Inner Cell Mass (belső sejtcsoport)
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1 (inzulin-szerű növekedési faktor-1)
IGF-2	Insulin-like Growth Factor-2 (inzulin-szerű növekedési faktor-2)
IL-3	Interleukin 3
iPSC	Induced Pluripotent Stem Cell (indukált pluripotens őssejt)
IRES	Internal Ribosome Entry Site
JAK	Janus Kináz
KLF4	Kruppel-Like Factor 4 (kruppel-szerű faktor 4)
LIF	Leukémia Inhibitor Faktor
L-hiPSC	Lentivirus-mediated Human iPSC (lentivírus-mediált humán iPSC)
L-miPSC	Lentivirus-mediated Mouse iPSC (lentivírus-mediált egér iPSC)
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast (egér embrionális fibroblaszt)
MEK/ERK	Mitogén-aktivált protein kináz/Extracelluláris jelátvitel-regulált Kináz
mESC	Mouse Embryonic Stem Cell (egér embrionális őssejt)
MYOD	Myogenikus Differenciációs
miPSC	Mouse Induced Pluripotent Stem Cells (egér indukált pluripotens őssejt)
MitC	Mitomycin C
MOI	Multiplicity of Infection
OCT-4	Octamer-Binding Factor 4
oriP	origin of viral replication (vírus replikációs origó)
PB	PiggyBac
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (perifériás vér mononukleáris sejt)
PBS	Phosphate Buffered Saline (foszfát puffer)
PFA	paraformaldehid
PGC	Primordial Germ Cell (ősivarsejtek)
POU5F1	POU domain, class 5, transcription factor 1
P-miPSC	Protein-mediated Mouse iPSC (fehérje-mediált egér iPSC)
RT	Room Temperature (szobahőmérséklet)
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (reverz transzkripció-polimeráz láncreakció)
SB	Sleeping Beauty
SCF	Stem Cell Factor
SCNT	Somatic Cell Nuclear Transfer (testi sejt sejtmagátültetés)

---

SDC2	Syndecan 2
SB-hiPSC	Sleeping Beauty-mediated Human iPSC (SB-mediált humán iPSC)
SB-miPSC	Sleeping Beauty-mediated Mouse iPSC (SB-mediált egér iPSC)
SeV	Sendai-vírus
SFFV	Spleen Focus-Forming Virus U3
SMAD	Sma: Second mitochondria-derived activator és Mad: Mothers Against Decapentaplegic
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2
SSEA-1	Stage-Specific Embryonic Antigen-1
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (szignáltranszdukciós és transzkripcióaktivátor 3 gá)
TALEN	Transcription Activator-Like Effector
TE	Tris-EDTA
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
TIR	Terminal Inverted Repeat
TSC	Trophoblast Stem Cells (trofoblaszt őssejt)
TTF	Tail Tip Fibroblast (farok csúcs fibroblaszt)
XEN	Extra-embryonic Endoderm (extraembrionális endoderma sejt)
ZFN	Zinc Finger Nuclease (cink-ujj nukleáz)





## 1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A pluripotens őssejteket alkalmazó kutatások egyre több területen jutnak fontos szerephez és az őssejtek széles körű gyakorlati alkalmazása belátható közelségbe került. Ezen sejtek különlegessége abban rejlik, hogy megfelelő körülmények között megtartják pluripotens állapotukat, folyamatosan növekednek, osztódnak, vagyis önmegújulásra képesek. Emellett képesek arra is, hogy mind a három csőfalemez irányába differenciálódjanak, spontán illetve irányított módon. E tulajdonságok miatt a pluripotens őssejtek igen hasznosak biológiai alap-, illetve orvosi- kutatásokban, például gyógyszertervezésben, vagy betegségek modellezésben. Mindemellett a humán őssejtek lehetőséget nyújthatnak számos betegség, például a Parkinson-kór, gerincvelői sérülések vagy a diabetes terápiás gyógyításában is.

Többféle pluripotens őssejt típus ismert, amelyek közül az őssejt kutatásokban az embrionális őssejtek (ESC: Embryonic Stem Cell) használata az általánosan elterjedt. Laboratóriumi körülmények között ESC-k hódgyagszálló állapotú embriók embriócsomójából nyerhetőek. Számos faj esetében az ESC-k alapítása komoly biológiai korlátokba ütközik, mind ez idáig csak néhány faj ismert (egér, patkány és főemlősök), beleszállóva az embert is, ahol a pluripotens embrionális őssejt vonalak izolálása sikerrel járt. Ezen felül a humán embrionális őssejt vonalak létrehozásához szükséges humán embriók kinyerése további nehézségekbe ütközik, mind biológiai mind pedig etikai okokból. Ezért, egy az embriók feláldozását elkerülő pluripotens sejt vonal előállítási eljárás komoly előnyt nyújthat az őssejt kutatás és terápia területén. Az indukált pluripotens őssejtek (iPSC: Induced Pluripotent Stem Cell) alkalmazása egy alternatív megoldást jelenthet e problémák leküzdésére, mivel azok felnőtt testi sejtek genetikai újraprogramozásával hozhatóak létre, a pluripotenciáért felelős gének bizonyos kombinációjának a sejtekbe való túlexpresszállatásával. Továbbá páciens-specifikus iPSC-k klinikai használatával, elméletileg a transzplantáció utáni kilökődés is elkerülhető volna, amely a jelenleg alkalmazott idegen donortól származó őssejt terápia egyik sarkalatos problémája. Mindemellett, genetikai eredetű betegséget hordozó testi sejteket újraprogramozva, betegség-specifikus iPSC vonalak állíthatók elő, amelyek az adott betegség modellezésére illetve gyógyszerfejlesztésre és tesztelésre használhatóak. Ezzel az eljárással tehát új utat nyit a személyre szabott terápiák kidolgozásához, hiszen az iPSC-k az adott páciens teljes genetikai információját hordozzák, így egyedi lehetőséget biztosítanak a terápiás megoldások kiválasztásában is.

Kutatócsoportunkban számos emlős fajból (egér, nyúl, humán) származó ESC-alapú kutatás folyik. Azonban az ESC-k fent említett limitáló tényezői miatt az iPSC-k létrehozása

és alkalmazása sok tekintetben előnyösebb volna. Mindemellett, az irodalomban sikerrel számoltak be iPSC vonalak izolálására olyan fajokban is, ahol az ESC vonalak hódgyagszerű embriókból történő izolálása kudarcot vallott. Ezért munkám elsődleges célja az volt, hogy egy megbízható újraprogramozási rendszert állítsak be egér sejteken, mely rendszer (vagy az annak használata során gyűjtött tapasztalatok) a későbbiek során adaptálható más emlős fajokra is, például nyúl- vagy humán- sejttípusokra.

További célom volt, hogy a létrehozott iPSC vonalakat teljes körűen jellemezzem azok pluripotenciájára, *in vitro* és *in vivo* differenciációs képességére. Végül, de nem utolsósorban pedig a karakterizációban jól szereplő vonalakat felszaporítom és hosszútávra tároljam kutatócsoportunk részére.

Számos iPSC újraprogramozó rendszer létezik, amelyek hatékonyságukban és az újraprogramozó faktorok bejuttatásának módjában jelentősen eltérnek egymástól. A megfelelő rendszer kiválasztása és beállítása a téma széleskörű tanulmányozását és az irodalomban megjelölt egyes rendszerek megismerését, összehasonlító elemzését követelte meg. Így a fent kijelölt célok elérésének érdekében a munkám első lépéseként két robosztus integrálandó- (lentivírus, transzpozon) és egy nem integrálandó- rendszert (fehérje bevitel) tanulmányoztam egér sejteken. Célom az volt, hogy a három újraprogramozó rendszerből a tapasztalataim alapján leghatékonyabbnak bizonyuló rendszert/rendszereket adaptáljam humán sejtek újraprogramozásához.

Ezek mellett munkám része volt az is, hogy olyan értékes iPSC vonalakat is alapítsak kutatócsoportunk számára, amelyek mentesek vagy mentesíthetőek az integrálandó transzgéntől. E munka során a két alkalmazott integrálandó/kivágható rendszerrel (lentivírus, transzpozon) alapított iPSC vonalaktól a transzgén kivágását kíséreltem meg. Így, a pluripotenciáért felelős transzgén eltávolíthatóságának és hatásának széleskörű vizsgálatára nyílt lehetőségem, amely kísérletek számos újszerű eredménnyel bővítették a témával kapcsolatos eddigi ismereteket.

A munka távlati célja pedig az volt, hogy az újraprogramozásról szerzett értékes tapasztalatokat, technikai ismereteket tovább alkalmazva transzgén-mentes, betegség-specifikus iPSC vonalak alapítását segítsen elő laboratóriumunkban, betegségek modellezése céljából. A munka során előállított és karakterizált egér/humán iPSC vonalak e kutatások kontroll vonalaiként is szolgálnak.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A pluripotens őssejtek

Az ún. pluripotens őssejtek még nem specializálódott sejtek, amelyek folyamatos osztódásra és önmegújulásra képesek. Aszimmetrikus osztódásuk során, önmagukkal megegyező-, valamint már egy bizonyos irányba elköteleződött- utódsejteket, ún. prekursor sejteket is képesek létrehozni, vagyis differenciálódni. Az őssejtek *in vitro* tenyésztési körülmények között differenciálatlan állapotukban korlátlan ideig fenntarthatóak. A tenyésztési körülmények megváltoztatásával pedig spontán, illetve irányított differenciációjuk érhető el a három csíralemez (ekto-, endo-, és mezoderma) bármely irányába.

Azonban a pluripotens őssejtek mellett léteznek további őssejtek is, amelyek csoportosíthatóak például a differenciációs potenciájuk alapján. A legmagasabb differenciációs potenciával rendelkező őssejtek az ún. **totipotens** sejtek, amelyek a szervezet összes embrionális és extraembrionális, sejt- illetve szövettípusává képesek specializálódni. Totipotens őssejt a termékenyített petesejt, illetve a zigótában az első négy osztódás során keletkezett sejt, más néven blasztomer. A fejlődő embrió esetében a blasztomerek totipotenciája általában 2-, 4-, esetleg 8-sejtes stádiumig tart, ez azonban állatfajonként eltérő. A totipotencia legfőbb kísérletes bizonyítékai az embriófelezés és blasztomer átültetési kísérletek, amelyek segítségével identikus ikreket állítottak elő számos állatfajon (Williams et al. 1984; Nagashima et al. 1989; Willadsen 1980; Tsunoda és McLaren 1983; Allen és Pashen 1984). E sejteknél valamivel alacsonyabb differenciációs potenciával rendelkező sejtek a **pluripotens** őssejtek. A pluripotens őssejtek az extraembrionális sejt típusok kialakítására már nem képesek (például magzatburok), azonban mindhárom csíralemez sejtjeit létrehozhatják, valamint ivarsejtek képzésére is alkalmasak. E csoportba tartoznak az embrionális-, primordiális- és teratomákból izolált, valamint az indukált pluripotens őssejtek is. A pluripotens sejteknél alacsonyabb differenciációs potenciával rendelkező sejteket **multipotens** őssejteknek nevezzük. A multipotens őssejtek már valamilyen szövettípus irányába elköteleződtek, ivarsejtek létrehozására nem képesek, azonban még számos szövettípus kialakulhat belőlük. Erre példa a mezenhimális- vagy a vérképző- őssejtek populációja. Léteznek a multipotens sejteknél alacsonyabb potenciájú őssejtek is, amelyek már csak négy vagy egy bizonyos sejt típusra képesek létrehozni (**unipotens**), azonban a differenciálódott sejtektől eltérően még osztódásra és önmegújulásra képesek. Ilyenek a **progenitor** (elődsejtek) vagy más néven **prekursor** sejtek.

Az őssejtek származásuk alapján is csoportosíthatók, ahol megkülönböztetünk **embrionális-, magzati-,** illetve **szöveti-** eredetű (vagy más néven „felnőtt”) őssejteket. Az embrionális őssejt típusok az embrionális fejlődés és a születés közeli (post-natal) szakaszokban figyelhetőek meg. A magzati őssejtek a magzati szervekből, vagy az extraembrionális szövetekből származnak, míg a szöveti őssejtek a már felnőtt szervezet egyes szerveiben vannak jelen.

### Az embrionális őssejt típusok:

- Embrionális őssejt (ESC: Embryonic Stem Cell): olyan pluripotens őssejt, amely a pre-implantációs állapotú hólyagcsíra embrió belső sejtsomójából (ICM: Inner Cell Mass) származik (Evans és Kaufman 1981; Martin 1981).
- Epiblaszt őssejt (EpiSC: Epiblast Stem Cell): olyan pluripotens őssejt, amely a már implantálódott embrió epiblaszt rétegéből származik (egérben: E5,5 - E6,5 napos embrió) (Brons et al. 2007). Habár pluripotens őssejtként kategorizálhatóak, meg kell jegyezni, hogy az ESC-ktől mind génexpressziós mintázatukban, mint pedig metilációs és X kromoszóma inaktívációs állapotukban eltérnek. Emellett az ivari kimérea képző potenciáljuk is jóval kisebb az ESC-khez képest.
- Embrionális csírasejt (EGC: Embryonic Germ Cell): olyan pluripotens őssejt, amely az ősvarsejtekből (PGC: Primordial Germ Cell) származik. Differenciációs képességük az ESC-khez hasonló, azonban génexpressziós mintázatuk nem teljesen megegyező azokkal (Matsui et al. 1992).
- Embrionális karcinómasejt (ECC: Embryonic Carcinoma Cell): olyan pluripotens sejt, amely az ivarmirigyekben keletkező teratokarcinómákból származik. E teratokarcinómák, olyan tumorerő, amelyekben számos már specializálódott szövettípus található, valamint egy még nem differenciálódott pluripotens sejtpopuláció, amelyből maguk az ECC vonalak alapíthatók. Az ECC-k szintén fontos eszközei a pluripotencia tanulmányozásának csak úgy, mint az ESC-k és EpiSC-k, azonban a kutatásokban való használatuk elterjedését korlátozza az ECC vonalakban gyakran megfigyelhető kromoszóma rendellenességek megléte (Hogan 1976; Martin 1980; Robertson 1987).
- Trofoblaszt őssejt (TSC: Trophoblast Stem Cells): olyan multipotens őssejt, amely a hólyagcsíra állapotú embrió trofektodermális rétegéből származik. A trofektoderma eredetű sejtek az emlős embrió méhben való túléléséhez elengedhetetlenek. Specializálódásuk még az embrió méhbe való implantálódása előtt történik meg, és szerepük a méhlepény kialakítására korlátozódik, a magzat embrionális szöveiteinek

l érehozására nem képesek (Tanaka et al. 1998).

- Extraembrionális endoderma sejt (XEN: Extra-embryonic Endoderm): olyan multipotens őssejt, amely a hólyagcsíra állapotú embrió primitív endoderma rétegéből származik. A XEN sejtek az extraembrionális endoderma réteg prekursorjai, és az embrionális fejlődésben van fontos támogató szerepük (Kunath et al. 2005; Shimosato et al. 2007). A kutatásokban a korai emlős embrionális fejlődés tanulmányozására használják.

### **A magzati őssejtek:**

A magzati őssejtek olyan sejtek, amelyek magzati szervekből (például: máj, csontvelő, vér) vagy az extraembrionális szövetekből (magzatvéz, membrány) származnak (Abdulrazzak et al. 2010). E sejttípusok egy közös fenotípust képviselnek az embrionális és a felnőtt őssejtek között és számos tulajdonságukban eltérnek azoktól. A magzati őssejtek nem mondhatók sem teljesen pluripotensnek, sem multipotensnek. A szöveti őssejtekhez képest egy primitívebb állapotot képviselnek, mivel magasabb növekedési kintekával, kisebb sejt mérettel és a tumorosodásra való hajlam hiányával rendelkeznek. Emellett differenciációs potenciájuk és *in vivo* szövet regenerációs képességük is magasabb a felnőtt őssejtekhez képest. Potenciájuk az embrionális őssejteknél alacsonyabb, azonban például a születés utáni extraembrionális szövetek olyan sejtforrást jelentenek, amelyekhez embriók használatának eljuthatunk (Marcus és Woodbury 2008; Spinelli et al. 2013). Ezen előnyös tulajdonságaik miatt a regeneratív medicina területén használatuk újéretes, pre-klinikai tanulmányokban már számos betegség gyógyításában sikeresen alkalmazták (például: csont diszplázia, rekeszszív, légzési rendellenesség stb.). Továbbá közös státuszuk miatt a genetikai újraprogramozás területén jelenthetnek hasznos kiinduló sejtforrást (Abdulrazzak et al. 2010).

### **A szöveti őssejtek:**

A szöveti őssejtek a felnőtt szövetekben található multipotens vagy unipotens őssejtek. Alapvető funkciójuk az adott szövet fenntartása és helyreállítása, amelyben elhelyezkednek, tehát szöveti sérülés esetén az adott szerv regenerációs tartókait képezik. Szöveti őssejtek találhatóak például a bőrben, a csontvelőben, az agyban, a vérben, a májban és a vázizomzatban. Ide tartoznak például a vértképző (hemopoetikus) őssejtek, amelyekből különböző vérsajt típusok differenciálódnak. Valamint ilyenek a mezenhimális őssejtek, amelyek mezodermais sejttípusokká például, izom-, csont-, porc-, vagy zsírsajtsejteké képesek differenciálódni. A szöveti őssejtek jelentősége a regeneratív medicina területén igen jelentős, hiszen eredeti szerepüknek megfelelően a sérült szövetek regenerációjában, illetve

génterápiás alkalmazásokban lehet. Az egyik legjobb példa talán a vérképző rendszert érintő megbetegedések bizonyos típusaiban a csontvelő átültetés alkalmazása, de ide tartozik az mezenhimális sejtek csont- és porcérülések során való alkalmazása (Schroeder et al. 2015).

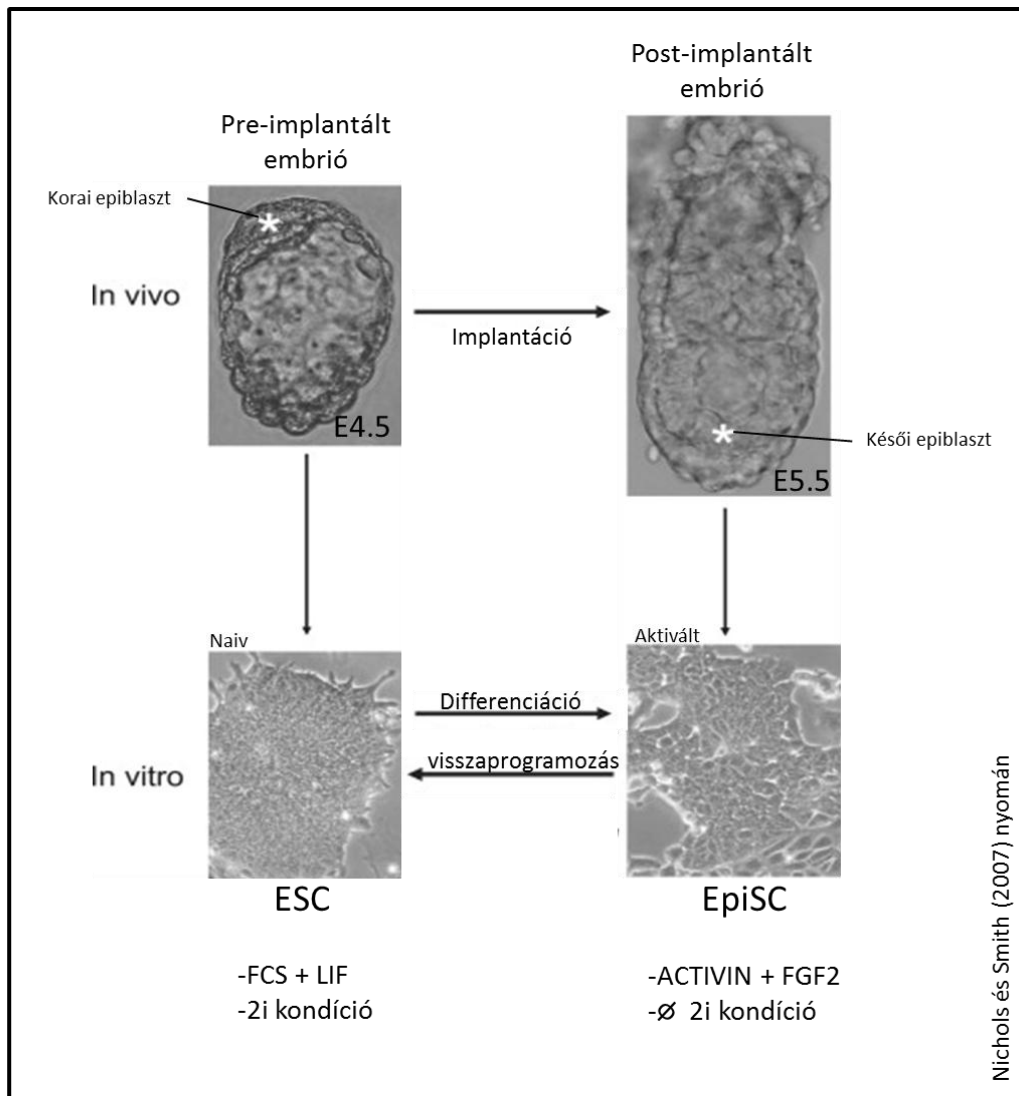
### 2.1.1. A pluripotens sejtek felfedezésének mérföldkövei

Az első pluripotens őssejtvonalak, amelyeket létrehoztak és *in vitro* körülmények között fenn tudtak tartani az ECC-k voltak (Hogan 1976; Martin 1980). Az ECC vonalak *in vitro* tenyésztése során gyűjtött tapasztalatok és ismeretek révén, nagy áttörést hozott, amikor ugyanabban az évben két kutatócsoport is elsőként számolt be egy ESC-k izolálásáról és azok sikeres *in vitro* tenyésztéséről (Evans és Kaufman 1981; Martin 1981). Közel 20 évre volt szükség ezután az újabb áttöresre: 1998-ban humán embrióból sikerült humán ESC vonalakat létrehozni és *in vitro* tenyésztetni (Thomson et al. 1998). Az ESC vonalak létrehozása és *in vitro* tenyésztési körülményeinek kidolgozása új utat nyitott a kutatók számára a korai embrionális fejlődés tanulmányozására, és számos új ismerettel egészítette ki az embriológia területét. Többek között ezek az ismeretek, vezettek további őssejt típusok (EpiSC, XEN, TSC)-, valamint Takahashi és Yamanaka 2006-ban publikált felfedezéséhez, ahol az embrionális őssejt alapítási technológiát kombinálták a testi sejtek pluripotens állapotúvá való direkt újraprogramozásával. Ezt az ESC-hez hasonló őssejt típust indukálható pluripotens őssejteknek nevezték el, és a technológia folyamatos fejlődésével megnyitották az utat a személyre szabott orvoslás és számos újszerű felfedezés irányába.

### 2.1.2. A naiv és „aktivált” (primed) pluripotencia

Az pre-implantát hódgyacsfa állapotú egy embrió (E4.5) belső sejtcsoport epiblaszt rétegéből alakul ki az egész embrió, így a korai epiblaszt réteg funkciójában a fejlődés alapállapotának tekinthető („ground state epiblast”). Az ebben a stádiumban izolált egy epiblaszt sejtekből hozhatóak létre az ESC-k (Evans és Kaufman 1981; Martin 1981), amelyek pluripotenciájuk *in vitro* körülmények között, egy fibroblaszt tápláló sejtrétegen, Leukémia Inhibitor Faktor (LIF) és újszülött szarvasmarha szérum (FBS: Fetal Bovine Serum) hozzáadásával fenntartható (1. ábra). A LIF a LIF/JAK/STAT3 (részletesen lásd a 2.1.3-as pontban) jelátviteli rendszeren keresztül, az egy ESC-k differenciációját gátolja, elősegítve így a pluripotens állapot fenntartását (Smith 2001). Az ESC-k fibroblaszt-mentes és FBS-mentes tenyésztési körülmények között is fenntarthatóak *in vitro* LIF jelenlétében az ún. 2i kondíció alkalmazásával. A 2i kondíció a differenciációért felelős MEK/ERK (részletesen lásd: 2.1.3. bekezdésben) jelátviteli út vonal és a Glikogén Szintáz Kináz-3 (GSK-3) kismolekulákkal való blokkolásán alapul (Ying et al. 2008). A már éppen beágyazódott

(post-implantációs) egér embrió (E5.5) késői epiblaszt rétegét izolálva szintén pluripotens sejtpopuláció nyerhető, amelyek az ún. epiblaszt őssejtek, azonban ezek a sejtek nem LIF, hanem fibroblaszt növekedési faktorról (FGF: Fibroblast Growth Factor) és ACTIVIN hozzáadásával tarthatók fenn (Brons et al. 2007) (**1. ábra**). Az ESC-k és EpiSC-k tehát egyaránt pluripotensek, azonban eltérő jelátviteli útvonalak aktiválásával/blokkolásával tarthatók fenn. Így egyes feltevések szerint kétféle pluripotens állapot különböztethető meg, amelyeket az ún. naiv- és az aktivált- („primed”) pluripotencia névvel illetnek. Ezen elmélet szerint az egér ESC-k naiv pluripotenciával rendelkeznek, és a pre-implantált epiblasztot reprezentálják. Még az EpiSC-k egy előrehaladottabb, ún. aktivált pluripotens állapotot képviselnek, és a késői post-implantációs epiblasztot reprezentálják. E feltevést támasztja alá az a tény is, hogy még az ESC-k magas-, addig az EpiSC-k igen alacsony kimérea képző képességgel bírnak, vagyis egységnyi sejtszámra vonatkoztatva mind a kiméreak száma, mind pedig a szöveti kimérezmus %-a jelentősen alacsonyabb az EpiSC-knél az ESC-khez viszonyítva. Emellett néhány, a pluripotencia fenntartásában szerepet játszó transzkripciós faktor expressziójában is eltérések mutathatók ki a két sejt típus között, például a kruppel-szerű faktor 4 (KLF4: Kruppel-Like Factor 4) csak az ESC-kben detektálható. Továbbá a naiv egér ESC-k FGF és ACTIVIN jelenlétében EpiSC-vé differenciálhatóak (Nichols és Smith 2009). Az EpiSC-ben a KLF4 túlexpresszióját követően olyan újraprogramozott vonalakat figyelt meg egy munkacsoport, amelyek a naiv ESC-kre jellemző expressziós mintázatot mutattak, és csírvonal kompetens kiméreakat formáltak (Guo et al. 2009) (**1. ábra**).



**1. ábra**  
A naiv és „aktivált” (primed) pluripotencia

A humán ESC-k szintén a korai epiblaszt sejtekből származnak csakúgy, mint az egér ESC-k (Thomson et al. 1998), azonban azok számos tulajdonságukban inkább az egér EpiSC-kre emlékeztetnek, mint például morfológiájukban vagy az alkalmazott tenyésztési körülményekben. Továbbá az EpiSC-k és humán ESC-k érzékenyek az olyan passzálási eljárásokra, amelyek egysejtes állapotot eredményeznek, ellentétben az egér ESC-kkel (Hanna et al. 2010). E jelenség arra engedett következtetni, hogy az ez idáig alapított humán ESC-k már egy előrehaladottabb stádiumban lehetnek, inkább az aktivált pluripotens állapotot képviselik. Nemrég egyes munkacsoportoknak sikerült komplex tenyésztési paramétereket kidolgozniuk, amelyben olyan humán ESC-ket tudtak alapítani és fenntartani, amelyek molekuláris- és funkcionális-tulajdonságaikban közelebb álltak a naiv egér ESC-khez, mint az egér EpiSC-khez (Gafni et al. 2013; Chan et al. 2013). Azonban ezek a rendszerek még mindig FGF, TGF- $\beta$  és/vagy szérum-függőek. Takashima et al. (2014) humán pluripotens sejtek naiv állapotba való konverzióját kísérte meg NANOG és KLF2 faktorok



túlexpresszával. Az így létrehozott sejtek nagyon hasonlóak voltak az egér naiv ESC-khez és képesek voltak az ICM-be beépülni.

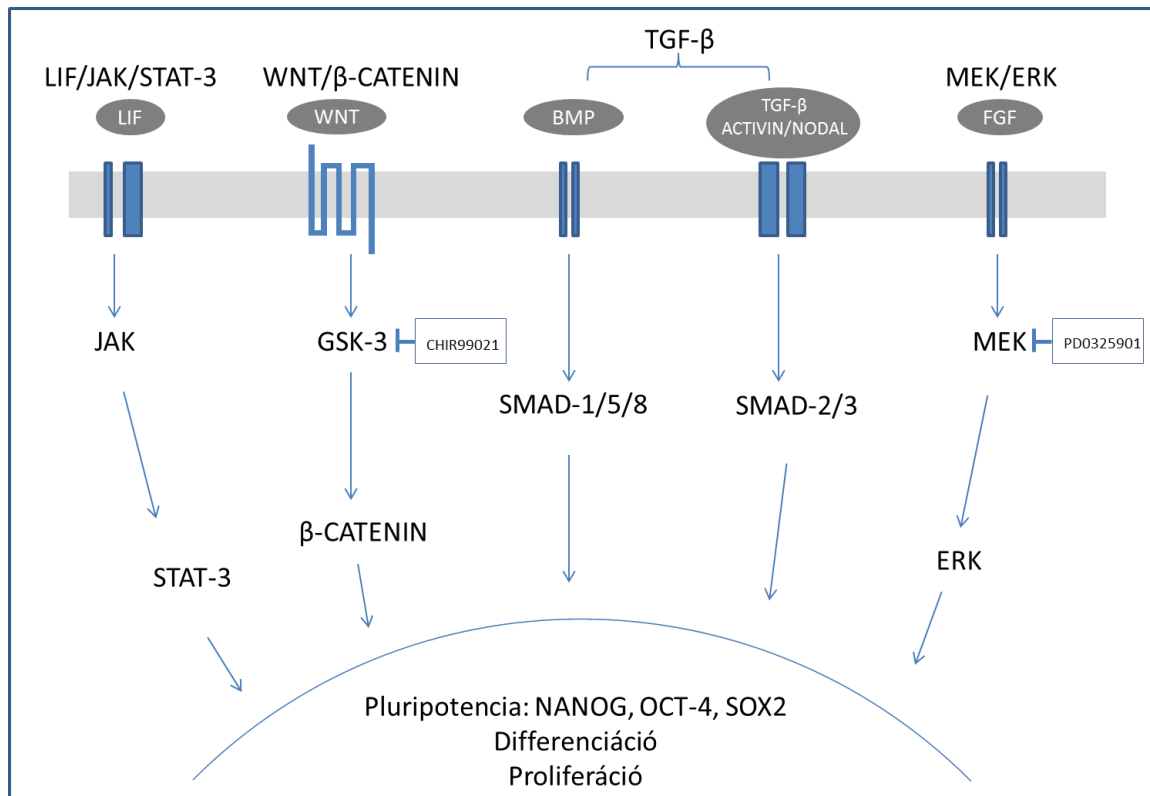
A naiv és aktivált pluripotens állapot felismerése kulcsfontosságú ismeretekkel bővítette a korai embrionális fejlődéssel foglalkozó tudományt, valamint a ma is használt egér és humán sejtenyésztési kondíciók kidolgozásában is alapvető szerepe volt. Emellett a sejtek genetikai újraprogramozásával kapcsolatban is számos újszerű ismerettel szolgált.

### **2.1.3. A pluripotencia molekuláris alapjai**

A pluripotens állapot kialakítását és fenntartását sejtes szinten az ún. pluripotencia faktorok felelősek, amelyek a transzkripciós faktorok családjába tartoznak és a gének átírását (transzkripció) szabályozzák. E transzkripciós faktorok különböző jelátviteli útvonalakon keresztül aktiválódnak/blokkolódnak, amelyek egér és humán ESC-k esetén számos esetben eltérnek egymástól, illetve egyes esetekben ellentétes szereppel bírnak. A pluripotencia fenntartásában szerepet játszó jelátviteli útvonalak az alábbiakban kerülnek bemutatásra, kiemelve e tekintetben a két faj közötti eltéréseket.

#### **LIF/JAK/STAT3 jelátviteli útvonal:**

A LIF/JAK/STAT3 jelátviteli útvonalban a LIF kötődésén keresztül aktiválódik a Janus Kináz (JAK), ami a szignáltranszdukciós és transzkripcióaktivátor 3 gén (STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription-3) foszforilációját eredményezi. A foszforilált STAT3 a sejtmagban a célgénekhez kötődve szabályozza azok expresszióját (Niwa et al. 1998) (**2. ábra**).



**2. ábra**  
**A pluripotencia fenntartásában szerepet játszó jelátviteli útvonalak**

Az egér ESC-k tenyésztéséhez a LIF egy alapvető fontosságú faktor, amely az Interleukin-6 citokinek közé tartozik. A LIF-et az egér embrionális fibroblasztok (MEF: Mouse Embryonic Fibroblast) is termelik, amelyet az ESC-k tápláló sejtrétegeként szoktak használni és a pluripotencia fenntartásában van szerepe a differenciáció gátlásán keresztül. Az egér ESC-k esetében a STAT3 leggyakoribb célje az „Octamer-binding factor 4” (*Oct-4*), „SRY (sex determining region Y)-box 2” (*Sox2*) és *Nanog*, melyeknek az őssejtek önmegújulásában és pluripotenciájuk fenntartásában van kulcsfontosságú szerepük. A STAT3 gátlása egér ESC-kben az endodermális és mezodermális gének aktivációját eredményezi, alámasztva ezzel aktivitásának szerepét a differenciáció megelőzésében (Bourillot et al. 2009).

Humán ESC-kben a LIF szintén indukálja a STAT3 foszforilációját és sejtmagi transzlokációját, azonban e jelátviteli útvonal aktiválódása önmagában nem elegendő a pluripotens állapot fenntartásához (Dahéron et al. 2004). Habár, ahogy azt a 2.1.2.-es bekezdés taglalta, a 2i kondíció (amely a LIF-et magába foglalja) további faktorokkal kiegészítve naiv pluripotens állapot érhető el humán sejtek esetében is. Tehát a humán ESC-k pluripotenciájában valamilyen módon mégis további szerepe lehet e jelátviteli útvonalnak, vélhetően azonban az egér ESC-ktől eltérő módon.

**TGF- $\beta$  jelátviteli útvonalak:**

A „Transforming Growth Factor- $\beta$ ” (TGF- $\beta$ ) család több mint 40 fehérje/faktort foglal magába, amelyekből a pluripotencia szempontjából a TGF- $\beta$ /ACTIVIN/NODAL és a csont morfogén fehérjéknek (BMP: Bone Morphogenetic Protein), valamint a növekedési differenciációs faktoroknak (GDF: Growth Differentiation Factor) van fontos szerepük. A TGF- $\beta$  faktorok a „SMAD” fehérjék (Sma: Second mitochondria-derived activator és Mad: Mothers Against Decapentaplegic) aktivációjában játszanak szerepet. A SMAD-2 és 3 a TGF- $\beta$ /ACTIVIN/NODAL fehérjék jelátviteli útvonalán keresztül aktiválódnak, míg a SMAD-1, 5 és 8 a BMP útvonalon keresztül (Wrana et al. 1992). A TGF- $\beta$  családhoz kapcsolódó jelátviteli útvonalaknak komplex szerepük van a pluripotencia szabályozásában, amelyek a SMAD fehérjék sejtmagi transzlokációján keresztül a cél gének expressziójának szabályozásában jutnak érvényre (2. ábra).

Egér ESC-k esetében a BMP a SMAD fehérjéken keresztül aktiválja a differenciációt gátló géneket LIF jelenlétében, blokkolva így módon a neurális differenciációt (Ying et al. 2003). A TGF- $\beta$ /ACTIVIN/NODAL jelátviteli útvonal nem alapvető fontosságú az egér ESC-k pluripotenciájában, inkább a normális sejtosztódásban van szerepe (Ogawa et al. 2007).

Az egér ESC-kkel szemben, a humán ESC-kben a BMP jelátviteli útvonal szerepe a trofoblaszt irányú differenciáció elősegítésében van (Xu et al. 2002), továbbá a TGF- $\beta$ /ACTIVIN/NODAL útvonalnak is eltérő szerep tulajdonítható. A SMAD-2, 3 fehérjéken keresztül a jelátviteli útvonal a humán ESC-k önmegújulásában játszik fontos szerepet. Ezt támasztják alá azok a kísérletek, ahol az ACTIVIN és NODAL stimulációján keresztül az *OCT-4* és *NANOG* expressziós szintje emelkedett, míg a jelátviteli útvonal gátlásával a gének expressziója jelentősen csökkent (Xiao et al. 2006; Vallier et al. 2005).

A GDF3 szintén a TGF- $\beta$  család tagja, szerepe azonban az egér- és humán ESC-kben eltérő. Egér ESC-kben a GDF3 csökkenése a pluripotencia fenntartását eredményezi, míg humán ESC-kben a GDF3 túlexpresszáztatásával lehet elérni hasonló hatást. A GDF3 tehát BMP antagonistaként alkalmazható, alacsony koncentrációban az egér ESC-k pluripotenciájának fenntartásában van szerepe, míg magas koncentrációban alkalmazva a humán ESC-k pluripotens állapotát támogatja (Levine et al. 2009).

**MEK/ERK jelátviteli útvonal:**

A fibroblaszt növekedési faktorok jelátvitelére a Mitogén-aktivált protein kináz/Extracelluláris signál-regulált Kináz (MEK/ERK) útvonalon keresztül történik. A MEK/ERK útvonal az ERK/MAPK néven is ismert (**2. ábra**).

Az egér ESC-k pluripotenciájának fenntartását segíti a MEK/ERK útvonal gátlása (Burdon et al. 1999; Stavridis et al. 2007). Azonban ez a gátlás önmagában az önmegújulást nem képes elősegíteni, ehhez további jelátvitel aktivációja/gátlása szükséges. Ilyen jelátviteli útvonalak kombinációján alapul a már említett 2i kondíció, amely kismolekulákkal gátolja az MEK/ERK (PD0325901) útvonalat, valamint aktiválja a WNT/ $\beta$ -CATENIN útvonalat a GSK-3 inhibitorral (CHIR99021), LIF jelenlétében pedig a LIF/JAK/STAT3 útvonalat aktiválja (Ying et al. 2008) (**2. ábra**).

A Humán ESC-k *in vitro* tenyésztéséhez az egér ESC-kkel szemben FGF hozzáadása szükséges, ahhoz hogy pluripotens állapotukat fenntartsák. Az FGF megvonásával, vagy az FGF jelátviteli útvonal gátlásával a sejtek differenciációja figyelhető meg (Kim et al. 2005; Dvorak et al. 2005). Az FGF receptor kötődése számos jelátviteli útvonalat aktivál, azonban a humán ESC-k fenntartásában az MEK/ERK jelátvitelnek van szerepe (Kang et al. 2005). Egyesek bemutatták, hogy az FGF-2 az inzulin-szerű növekedési faktor-2 (IGF-2: Insulin-like Growth Factor-2) szekrécióját indukálja a tápláló fibroblaszt réteg sejtjeiben, ami elősegíti a humán sejtek differenciálatlan állapotának fenntartását (Bendall et al. 2007; Greber et al. 2007). Mások pedig azt bizonyították, hogy még az endogén FGF-2 jelátvitel (tápláló fibroblaszt réteg által termelt) a humán ESC-k differenciálatlan állapotát tartotta fenn, addig a tenyésztőmédiához adagolt FGF-2 indirekt módon a sejt halál és apoptotikus gének gátlásával járult hozzá a pluripotens állapotához (Eiselleova et al. 2009).

**WNT/ $\beta$ -CATENIN jelátviteli útvonal:**

Ebben a jelátviteli útvonalban a WNT fehérje a receptor komplexhez csatlakozva, transzmembrán receptorokon keresztül a  $\beta$ -CATENIN fehérje stabilitását szabályozza. WNT jelenlétében a  $\beta$ -CATENIN a sejtmagban transzlokálódik és a célgénekről átíródó fehérjék expresszióját (például: OCT-4, REX1, NANOG) szabályozza. A WNT fehérje hiányában pedig a  $\beta$ -CATENIN a GSK-3 foszforilációja által degradálódik (**2. ábra**). A WNT/ $\beta$ -CATENIN útvonalnak az őssejt jelleg fenntartásában való szerepe még nem teljesen tisztázott, az egyes tudományos közlemények igen eltérő fontosságot tulajdonoznak számára. Az egér ESC-k esetén a WNT/ $\beta$ -CATENIN útvonal aktiválható volt a GSK-3 gátlásával, amely a sejtek differenciálatlan állapotát tartotta fenn rövidtávon. Amikor pedig a 2i

kondícióban ennek az útvonalnak az aktivációját kombinálták a LIF/JAK/STAT3 aktivációjával és a MEK/ERK gátlásával a sejtek hosszútávú önmegújulásáért (Ogawa et al. 2006; Umehara et al. 2007; Ten Berge et al. 2011).

Humán ESC-k esetén pedig azt mutatták be, hogy a WNT/ $\beta$ -CATENIN útvonal aktivációja szintén a sejtek differenciációját gátolta, azonban a  $\beta$ -CATENIN általi transzkripciós faktorok aktivációja minimális volt a differenciálatlan sejtekben (Sato et al. 2004). Tehát, a WNT/ $\beta$ -CATENIN útvonal önmagában feltételezhetően nem elegendő a pluripotencia fenntartásához, azonban az irodalmi adatok igen eltérőek, így valódi szerepük tisztázásához a szerzők az útvonal további tanulmányozását javasolják (Wray és Hartmann 2012).

Az ESC-kben a fent tárgyalt jelítviteli útvonalak a pluripotenciában szerepet játszó cdc gének expresszióját szabályozzák. Genetikai- és transzkripciós profil-tanulmányok során számos pluripotenciáért felelős transzkripciós faktort sikerült már azonosítani, mint például az OCT-4, SOX2, NANOG, FOXD3, ID, stb. Ezek közül háromnak van kiemelt szerepe, amelyek az OCT-4, SOX2 és a NANOG. Az alábbiakban e három kulcsfontosságú faktor kerül bemutatásra, amelyek az ért jelentősek, mert a pluripotens transzkripciós hálózat alapját képezik.

#### **OCT-4:**

Az OCT-4 (POU5F1: POU domain, class 5, transcription factor 1) a POU transzkripciós családba tartozik és először egérben írták le (Okamoto et al. 1990; Rosner et al. 1990; Schöler et al. 1990). A jelenléte elengedhetetlen az embriogenezis során, valamint ESC-kben a pluripotencia kialakításában és fenntartásában. A pre-implantációs embrionális fejlődés során a kompaktizáció előtt minden sejtben expresszál, majd a hólyagcsíra állapotú embrióban expressziója már csak az ICM sejtjeire korlátozódik. Az embrió implantációját követően már csak a primitív endodermában detektálható, amely az embriogenezis során a primordiális őssejtekre korlátozódik, majd az ivarsejtek differenciációja során teljesen elcsendesül (Nichols et al. 1998; Shi és Jin 2010). Az OCT-4 nagyszámú faktor expresszióját szabályozza, mint például az FGF4, UTF1, OPN, REX1, FBXO15, SOX2 és CDX2 (Nishimoto et al. 1999; Zeng et al. 2004). A megfelelő OCT-4 szint az ESC-k pluripotenciáját tartja fenn, annak csökkenése trofektodermális-, míg túlexpressziója primitív endodermális és mezodermális-irányú differenciációt okoz (Yeom et al. 1996; Niwa et al. 2000; Niwa 2001).

**SOX2:**

A SOX2 fehérje, a SOX transzkripciós család tagja és emlős embriókban az embriogenezis korai szakasz során kezd el expresszálni, majd az ICM-ben éri el a legmagasabb szintet (Avilion et al. 2003; Masui et al. 2007). Csak úgy, mint az OCT-4, a SOX2 is az embriogenezisben valamint az ESC-k pluripotenciájának kialakításában, és stabilizálásában játszik szerepet. ESC-kben a SOX2 megfelelő szintű expressziója a pluripotens állapothoz elengedhetetlen. Ennek túlexpressziója akár ESC-kben nem endodermális irányú differenciációt eredményezett, például neurális differenciációt (Zhao et al. 2004; Kopp et al. 2008). A SOX2 az OCT-4 fehérjével egy komplexet alkotva szabályozza a célgének expresszióját (Tomioaka et al. 2002).

**NANOG:**

A NANOG szintén egy transzkripciós faktor, ami jellemzően az ESC-kben expresszáldik. Az embriogenezis során az ICM csak e fehérje jelenlétében tartja fenn pluripotens állapotát. Expressziója a nem differenciálódott egér- és humán- ESC-kben egyaránt detektálható, valamint a NANOG-deficiens ESC-k differenciációra hajlamosak (Mitsui et al. 2003; Chambers et al. 2003). Csak úgy, mint az OCT-4 és SOX2 esetében, a NANOG-nak is központi szerepe van a pluripotencia fenntartásában, azonban az általa történő szabályozó mechanizmusok egyelőre nem teljesen ismertek. Egyes feltevések szerint a differenciációhoz szükséges bizonyos fehérjéket (GATA4 és GATA6) expresszáló gének által is keresztül képes a pluripotens állapot fenntartására. Mások szerint pedig aktiválja az önmegújuláshoz szükséges fehérjék expresszióját (REX1, ID fehérjék: Inhibitor of differentiation proteins) (Ying et al. 2003; Mitsui et al. 2003; Chambers et al. 2003). Genomikus tanulmányok pedig azt mutatták be, hogy az OCT-4, SOX2 és NANOG fehérjék gyakran kötődnek azonos szabályozó régiókhoz, egér- és humán- ESC-kben is. Ezek a megfigyelések azt igazolták, hogy e három fehérje fizikai, ún. feed-forward kölcsönhatásban van egymással és számos esetben együttesen fejtik ki a célgénre gyakorolt szabályozó hatásukat, illetve szabályozzák önmaguk és egymás expresszióját is (Sharov et al. 2008; Boyer et al. 2005; Mathur et al. 2008).

### 2.1.4. A pluripotencia igazolása *in vitro*

Az újonnan létrehozott ESC/iPSC vonalak pluripotenciájának igazolására számos módszer alkalmazása terjedt el, mindazonáltal jelenleg nincs olyan egységesített protokoll, amely rögzítené, hogy mely eljárásokat kell alkalmazni ahhoz, hogy egy vonal pluripotens állapotát egyértelműen igazoljuk. A legtöbb módszer a pluripotencia definíciójából kiindulva a sejtvonalak korlátlan fenntarthatóságát illetve *in vivo* és *in vitro* differenciációs képességét hivatott igazolni, amelyek az alábbiakban kerülnek bemutatásra:

#### 2.1.4.1. Morfológiai kritériumok

A tipikus egér ESC morfológia: világos, lekerekedett szélű kolóniák, amelyek képesek korlátlan számú osztódásra, miközben megtartják pluripotens állapotukat. Az egér ESC-k esetén a passzálástól az első osztódásig eltelt idő körülbelül 10-14 óra (Pauklin et al. 2011), így passzálásuk általában 2-3 naponta szükséges. Az egér ESC-kre jellemző morfológiai tulajdonságok az egér iPSC-kre egyaránt jellemzőek.

A tipikus humán ESC morfológia: világos, kerekedett szélű kolóniák, az egér ESC-khez képest a kolóniák kilapultak és nagyobb terjedelműek, szintén képesek korlátlan számú osztódásra, miközben megtartják pluripotens állapotukat. A sejtekben a sejtmag aránya a citoplazmához viszonyítva nagy. A humán ESC-k esetén a passzálástól az első osztódásig eltelt idő körülbelül 31-56 óra (Ware et al. 2006). A humán ESC-k passzálása 5-7 naponta szükséges, amelyet befolyásolnak a tényezési körülmények és a sejtvonala genetikai háttere is. A humán ESC-kre jellemző morfológiai tulajdonságok a humán iPSC-kre egyaránt jellemzőek.

#### 2.1.4.2. Génexpressziós vizsgálat

A pluripotenciáért felelős gének expresszióját reverz transzkripciós-polimeráz láncreakcióval (RT-PCR: Reverz Transcription-Polimerase Chain Reaction) lehet vizsgálni. A vizsgálni kívánt sejt pelletből totál RNS izolálható, majd abból cDNS-részt lehet reverz transzkripciósítani. A cDNS így már a genomiális DNS-hez hasonlóan PCR reakcióban vizsgálható és így módon az egyes pluripotenciáért felelős gének aktivitása ellenőrizhető. Általánosságban az *Oct-4*, *Sox2*, *Klf4* és *Nanog* gének expresszióját vizsgálják, azonban elterjedt továbbá, a pluripotencia kialakításában szerepet játszó gének (például *Utf1*, *Gdf3*, *Fbxo15*, stb.) aktivitásának vizsgálata is. Sőt, ún. macro-array panelek segítségével egyszerre akár 92 gén aktivitásának vizsgálata is elterjedőben van a pluripotens állapot bizonyításában.

#### 2.1.4.3. Fehérjék és sejtfelszíni markerek kimutatása

Az ESC-k pluripotens állapotának fenntartásában számos fehérje illetve sejtfelszíni marker játszik szerepet (lásd: 2.1.3. bekezdés). Ezeknek a markereknek a hiányát/jelenlétét az alkalikus foszfatáz- (AP: Alkaline Phosphatase) és immuncitokémiai- (ICC) festésekkel lehet igazolni. Az AP olyan enzim, amely lúgos környezetben hidrolizálja a foszfát tartalmú molekulákat. Az AP enzimnek több típusa is ismert, amelyek közül egyes formák egy bizonyos szervre specifikusak (placenta, bél), míg más formák nem szövet-specifikusak. A nem szövet-specifikus AP expresszája a májban, a csontszövetben, a tüdőben és egy izoformja magas szinten expresszája pluripotens sejtípusokban (ECC, EGC, ESC). Ezt a jelenséget kihasználva, ESC vonalak alapítása esetén az AP-pozitív kolónia formálódás a pluripotens állapot indikátoraként alkalmazható. Azonban, ez a festés nem túl érzékeny, kvalitatív módon nehezen értékelhető (Singh et al. 2012). A karakterizációs szerves részét képezik tehát az ICC-festések, melyek antitesteken alapuló technikával egy adott pluripotenciában szerepet játszó marker jelenlétét, illetve hiányát mutatják ki. A közvetlen kimutatás mellett a marker szubcelluláris lokalizációja is pontosan meghatározható, amely annak funkcionális árára is utal. Szűes körben elterjedt legalább egy pluripotenciáért felelős transzkripciós faktor- (például: NANOG, OCT-4, SOX2, lásd: 2.1.3. bekezdés), valamint legalább egy membrán marker kimutatása, amelyekből egér és humán fajokban a leggyakrabban alkalmazottakat a **1. táblázat** ismerteti.



## 1. táblázat

A gyakorlatban elterjedt pluripotenciát igazoló sejtfelszíni markerek listája egér és humán modellben

Sejtfelszíni marker	Molekula típusa	Funkció	Referencia
<b>Egér</b>			
SSEA-1	Szénhidrát adhéziós molekula, mely glikoprotein, glikolipidek és proteoglikánok felszínéhez kapcsolódik	Pre-implantált egér embriók egér ESC és ECC sejtek felszínén detektálható. A sejtfelszíni interakciókat szabályozza az embriogenezis során.	Solter és Knowles 1987
<b>Humán</b>			
SSEA-3 és SSEA-4	Szénhidrát adhéziós molekula, mely glikoprotein, glikolipidek és proteoglikánok felszínéhez kapcsolódik	Humán petesejtek, zigóták és korai stádiumú embriók, humán ECC, ESC és EGC sejtek felszínén detektálható. A sejtfelszíni interakciókat szabályozza az embriogenezis során.	Shevinsky et al. 1982 Kannagi et al. 1983
TRA-1-60 és TRA-1-81	Keratán-szulfát proteoglikán, mely neuraminidáz-érzékeny/vagy neuraminidáz-tűrő epitópot ismer fel	Humán ESC, ECC és EGC-k felületén detektálható. A sejtfelszíni interakciókat szabályozza.	Badcock et al. 1999
E-CADHERIN	Transzmembrán glikoprotein	Humán petesejtek és korai stádiumú embriók felületén detektálhatóak. A kalcium-függő sejt-sejt interakciókban és azon keresztül a sejtek integritásának fenntartásában van szerepe.	Li et al. 2012

2.1.4.4. Spontán differenciáció *in vitro*

Az *in vitro* differenciációval a pluripotens őssejtek azon tulajdonsága vizsgálható, hogy képesek-e mindhárom csíralemez irányába differenciálódni (Eiges et al. 2002). E tulajdonság mellett szintén a pluripotens állapot alapkövetelménye. Az *in vitro* spontán differenciáció iniciációs lépése a sejtek felülettől való elválasztása - miután az őssejtek ún. adhézív, vagyis letapadó sejtenyészeteket alkotnak, amelyek megfelelő körülmények között aggregátumokká formálódnak, kialakítva ilyen módon az ún. embrionális testecskéket (EB: Embryoid Body). Az EB formálódás képessége, azok mérete és mennyisége egy adott sejtvonal fontos markere. Az EB formálásnak számos módja ismeretes, például az ún. függőcseppe módszer (HD: Hanging Drop) vagy egyéb gravitáción alapuló technika (Spin EB-módszer, Ng et al. 2008). Ezek fő előnye, hogy azonos méretű EB-k létrehozása teszik lehetővé, ezzel a differenciáció irányítható. A szuszpenziós aggregátum formálással nagy mennyiségű EB hozható létre, azonban azok mérete nagy variációt mutathat a kultúrán belül, így azok differenciációjának iránya igen különböző. Az EB-k megfelelő felületre való kiültetésével, azok további spontán differenciációja érhető el ahol, ha a létrejött sejttömeg tartalmazza a három csíraréteg sejtűseit, akkor az a kiinduló ESC pluripotenciáját igazolja.

Ennek ellenőrzése általában ICC-festésekkel történik a három csírvára specifikus fehérje markerek alkalmazásával. A leggyakrabban használt ektodermális, endodermális és mezodermális markereket a **2. táblázat** mutatja be.

## 2. táblázat

A gyakorlatban elterjedt ektodermális, endodermális és mezodermális markerek listája

Csírvaréteg	Marker	Specifitás	Referencia
Ektoderma	NESTIN	Korai neurális őssejt/progenitor marker a központi idegrendszerben	Lendahl et al. 1990 Dahlstrand et al. 1992
	βIII-TUBULIN	AZ érett neuronokban expresszál	Katsetos et al. 2003
Endoderma	AFP	Az embrionális májban expresszál	Karmali és Novo 1990
	GATA4	A szívben és a hasnyálmirigyben expresszál	Arceci et al. 1993 White et al. 1995
Mezoderma	VIMENTIN	A mezenhimális sejtekben expresszál és egy tumor marker	Capetanaki et al. 1990 Sarria et al. 1992
	BRACHYURY	A posterior mezoderma formálódáshoz szükséges az embrionális fejlődés során	Kispert és Herrmann 1994 Edwards et al. 1996

### 2.1.5. A pluripotencia igazolása *in vivo*

Az *in vivo* spontán differenciáció ellenőrzésére egér esetében két teszt létezik, az egyik az ún. teratoma teszt (Gertow et al. 2007; Wesselschmidt 2011), míg a másik a csírvával kompetens kimérák formációjának képessége (Polejaeva és Mitalipov 2013; Carstea et al. 2009). Humán sejtek esetében csak a teratoma teszt alkalmazható, mely során a pluripotens egér/humán sejteket immun-deficiens (SCID) egerek bőre alá injektálják. A sejtek spontán differenciálni kezdenek és tumorokat formálnak, melyeket teratomáknak neveznek. Ha az injektált sejt valóban pluripotens, akkor a három csírvára bármely sejt pusztán képes létrehozni a teratomában, mely immunhisztokémiai-festésekkel ellenőrizhető a három csírvára specifikus fehérje markerekkel.

A csírvával kompetens kimérák formációjának képessége a pluripotencia meglétének legszigorúbb kritériuma. A fent említett *in vitro/vivo* differenciációs tesztekkel szemben e teszttel ellenőrizhető az is, hogy a pluripotens sejtek részt vesznek-e a csírvasejtek kialakulásában is. A kimérákat az aggregációs eljárással (4- vagy 8-sejtes egémbrió + ESC aggregációjával) vagy a sejtek hódgyacsrá állapotú gazda embriókba való injektálásával, majd azok anyaállatba való ültetésével lehet létrehozni. A született állatok szőrszíne utalhat a

kimériszmus mértékére (például C57BL/6, fekete szőrszínű egérből származó sejtvonala, ICR fehér szőrszínű gazda embrióba injektálva, a születő kimérák fekete-fehérek lesznek), vagyis arra, hogy az embriósejtjeinek kialakításában képes-e részt venni a tesztelni kívánt sejtvonala. Annak ellenőrzésére, hogy a született kimérák ivarsejt kimérák-e, azok megfelelő szőrszínű egyeddel való párosítása szükséges, ahol szintén a született utódok szőrszíne utal majd a beültetett sejtvonala csírvonala transzmissziójára (a fenti példa esetében a fekete-fehér kimérákat, fehér szőrszínű állatokkal szükséges párosítani, amelyből ha a születendő utódok között van fekete szőrszínű, akkor a tesztelni kívánt sejtvonala csírvonala kompetens). A folyamat felgyorsítására több módszert is kifejlesztettek, ahol például tetraploid komplementáció vagy Piezo-Mikromanipulátor alkalmazása révén már az első generációban nagyon magas kimérisz sejtarányt, akár 100 %-ban kimérisz utódokat sikerült elérni (Nagy et al. 2003; Huang et al. 2008). Számos esetben az *in vitro* differenciációban vagy *in vivo* teratoma tesztekben jól szerepelt egérvonalak nem képesek ivarsejtek létrehozására, éppen ezért a pluripotencia meglétének igazolására e tesztek mellett a csírvonala kompetens kimérisz formálódás ellenőrzése elengedhetetlen fontosságú.

## 2.2. A genetikai újraprogramozás

Genetikai újraprogramozásnak nevezzük azt, amikor egy érett testi sejt differenciált állapota megváltozik az embrionális állapotú még differenciálatlan sejtekre jellemző tulajdonságúvá. Korábban genetikai újraprogramozásra három stratégia alkalmazása nyújtott lehetőséget: testi sejt sejtmagátültetéssel (SCNT: Somatic Cell Nuclear Transfer), sejtfúzióval vagy sejtkivonattal való újraprogramozás révén. Mindemellett több közlemény számolt be differenciált sejtípusok „átprogramozásáról” más sejtípusokká, amely az ún. transzdifferenciáció jelensége. E négy stratégia fejlődése szolgált alapul 2006-ban az első iPSC vonal létrehozásához (Takahashi és Yamanaka), ahol a szerzők testi sejtek pluripotens állapotúvá való újraprogramozását érték el bizonyos transzkripciós faktorok túlexpressziójával.

### 2.2.1. Újraprogramozás testi sejt sejtmagátültetéssel

Az SCNT vagy közismertebb nevén a klónozás magába foglalja egy testi sejt sejtmagjának egy már előzőleg sejtmagjától megfosztott (enukleált) petesejtbe (vagyis inkább annak citoplazmájába, hiszen az enukleálást követően már csak a petesejt citoplazmatikus anyaga képezi a befogadó petesejtet) való injektálását majd annak aktivációját. Reprodukív klónozásnak nevezik azt a folyamatot, mely során az SCNT-vel létrehozott embrió recipiens állatba ültetik, és abból utód születik, amely a klón állat. Az SCNT során előállított blasztociszta embrióból *in vitro* ESC is izolálható, amelyet ha a testi sejt donorba visszatranszplantálnak, akkor elméletileg nem kell az immunreakció általi sejtkilökődéssel számolni. Ezt a folyamatot, amikor a sejtmagátültetés célja a donorral azonos őssejt előállítására terápiai klónozásnak hívják. Az első sikeres klónozási kísérleteket békafajokban hajtották végre (Briggs és King 1952; Gurdon et al. 1958; Gurdon 1962), amelyek bizonyították, hogy a sejtek specializációja során a sejtmagban bekövetkező változások nem visszafordíthatatlanok. Ezt követően az első testi sejtből klónozott emlős Dolly, a bárány volt (Wilmut et al. 1997), amelyet az első klón egér (Wakayama et al. 1998) majd további emlős fajok követtek (Kubota et al. 2000; Behboodi et al. 2004). Azonban számos klónozott állat, amelyet sejtmagátültetéssel hoztak létre több abnormalitást (fenotípus, gén expressziós) mutatott, ami arra enged következtetni, hogy a sejtmag átprogramozás nem volt tökéletes, amely esetlegesen az epigenetikai átprogramozás hibájára utalhat (Wakayama és Yanagimachi 1999; Humpherys et al. 2002; Ogonuki et al. 2002; Tamashiro et al. 2002; Gurdon et al. 2003).

A genetikai újraprogramozás területén a sikeres SCNT kísérletek, azt bizonyították, hogy a petesejt olyan faktorokkal rendelkezik, amely már specializálódott sejteket képes pluripotens állapotba újraprogramozni, azonban a sejtek újraprogramozhatóságát nagyban befolyásolja azok eredeti (sejtmag donor szövetre jellemző) epigenetikai mintázata.

### 2.2.2. Sejtfüzióval való újraprogramozás

A sejtfüzióval való újraprogramozás magába foglalja testi sejtek pluripotens sejtekkel való hibridizációját, amely egy tetraploid hibridet eredményez. E módszerrel a differenciált állapot formálhatóságát tanulmányozható. Miller és Ruddle 1976-ban, egy pluripotens teratocarcinóma sejt és egy thymus sejt fúziójával olyan pluripotens hibrid sejtpopulációt hozott létre, amely hordozta az eredeti embrionális karcinóma sejtekre jellemző tulajdonságokat. A pluripotens sejtek differenciált sejt típusokon való dominanciáját testi sejt és embrionális csíra sejtek (Tada et al. 2003; Tada et al. 1997) és ESC-k (Tada et al. 2001; Tada et al. 2003) között is bemutatták, amit később humán sejtek esetén is megfigyeltek (Cowan et al. 2005; Yu et al. 2006).

Ezek a kísérletek azt igazolták, hogy a pluripotens sejtek, olyan faktorokkal rendelkeznek, amelyek képesek már differenciált sejt típusok újraprogramozására. Azonban a módszer szélesebb körben való alkalmazását a tetraploid sejtek re-diploidizálásának hiánya okozta.

### 2.2.3. Sejtkivonattal való újraprogramozás

A petesejtből (kétéltű) vagy pluripotens sejtéből (ESC, ECC) származó sejtkivonat differenciált sejtekhez való hozzáadásával, szintén azok újraprogramozása valósítható meg. Ahhoz, hogy a differenciált sejtek felvegyék a sejtkivonatot azonban azok permeabilizációja szükséges, amelyet általában kémiai úton lehet megvalósítani (pl. streptolysin-O kezelés). Az első néhány kísérletet béka petesejtből nyert sejtkivonattal végezték, ahol azt humán testi sejthez adták majd annak gén expressziós változását vizsgálták (Hansis et al. 2004), és habár az OCT-4 aktivitásának növekedését figyelték meg, a sejt újraprogramozás csak részleges volt. Hakelien et al. (2002) HEK293T sejteket programozották lymphoid-specifikus sejtekkel emléős eredetű T sejtéből származó kivonattal. E próbálkozásokot követte az első olyan kísérlet, ahol petesejt helyett pluripotens sejtkivonatot használtak emléős sejtek újraprogramozásához, azonban itt a létrehozott sejtpopuláció csak részleges újraprogramozódást mutatott (Taranger et al. 2005).

Tehát elmondható, hogy habár a sejtkivonattal való genetikai újraprogramozás nem volt túl eredményes, mégis bizonyította a differenciált sejtek áformálhatóságát, akár egy

kevésbé specializálódott stádiumba is. Ezen eredmények a petesejtek és pluripotens sejtípusok által hordozott faktorok újraprogramozásban betöltött alapvető fontosságát erősítették tovább.

#### 2.2.4. Transzdifferenciáció

Egy korai tanulmányban bemutatták, hogy egér fibroblaszt sejtek 5-azacytidine (DNS metilációt gátló hatású anyag) kezeléssel áprogramozhatóak myocita-, kondrocita- és adipocita típusú sejtekké (Taylor és Jones 1979). Az 5-azacytidine-el végzett további sejt-konverziós kísérletek során sikerült egy domináns transzkripciós faktort meghatározni (MYOD: Myogenikus Differenciáció), amely az izom-specifikus gének aktivációján keresztül képes a fibroblasztot myoblasztokká áprogramozni (Lassar et al. 1986; Davis et al. 1987). Ezt a felfedezést követték további domináns transzkripciós faktorok azonosítása, amelyek direkt módon képesek egyes sejt típusokat más sejt típusokká transzformálni.

Ezek a kísérletek demonstrálták, hogy sejtek áprogramozhatóak más sejt típusokká bizonyos transzkripciós faktorok hatására, és vezettek a Takahashi és Yamanaka (2006) által is alkalmazott módszerhez, ahol az adott transzkripciós faktorokat túlexpresszáztatták a sejtekben.

#### 2.2.5. Transzkripciós faktorok túlexpresszáztatása a sejtekben

A transzkripciós faktorok túlexpresszáztatását egyesek a sejtek pluripotens állapotúvá való újraprogramozáshoz alkalmazzák, amely során a pluripotenciában szerepet játszó transzkripciós faktorokat használnak. Mások a már egy bizonyos irányba elköteleződött sejtek direkt konverziójához alkalmazzák ugyanezt a módszert, ahol a kívánt sejt típusnak megfelelő csírvonal-specifikus transzkripciós faktorokat expresszáztatják a sejtekben.

##### 2.2.5.1. Transzkripciós faktorok túlexpresszáztatásával történő újraprogramozás

Takahashi és Yamanaka 2006-ban transzkripciós faktorok túlexpresszáztatásával testi sejteket programozott újra pluripotens állapotúvá és az így létrehozott sejteket indukált pluripotens őssejteknek nevezte el. A genetikai újraprogramozás történelmében ezen óriási tudományos átöréshozó eredményükhöz többek között a testi sejt klónozással- a sejtfejtési úttal-, sejt kivonattal- és a transzdifferenciációval való újraprogramozás során elért eddigi ismeretek vezettek, amelyek azt mutatták, hogy a differenciálódott sejtek újraprogramozhatóak pluripotens állapotúvá megfelelő transzkripciós faktorok hatására. Továbbá egy petesejt, illetve az ESC-k olyan faktorokat tartalmaznak, amelyek testi sejteket képesek pluripotens állapotúvá áprogramozni.

Takahashi és Yamanaka 2006-os kísérletükben számos korábban már leírt transzkripciós faktort teszteltek és azt vizsgálták, hogy azok géneinek testi sejtekben való túlexpresszálása képes-e a pluripotencia indukciójára. A tesztelt faktorok között szerepelt az OCT-4 (Nichols et al. 1998; Niwa et al. 2000), SOX2 (Avilion et al. 2003) és NANOG-ot (Chambers et al. 2003; Mitsui et al. 2003), (lásd: 2.1.3. bekezdés), valamint számos olyan gén, amelyek gyakran aktívódnak tumorokban, mint például a *Stat3* (Matsuda et al. 1999; Niwa et al. 1998), az *E-Ras* (Takahashi et al. 2003), a *c-Myc* (Cartwright et al. 2005), a *Klf4*: (Li et al. 2005), és a  $\beta$ -catenin (Kielman et al. 2002; Sato et al. 2004). Ez utóbbi géneknek az ESC-kre jellemző fenotípus fenntartásában és azok *in vitro* tenyésztésben való gyors osztódásában van szerepük. Továbbá számos egyéb gént is azonosítottak és teszteltek, amelyek az ESC-kben expresszálódnak (Maruyama et al. 2005; Mitsui et al. 2003), úgymint a: *Ecat1* (GenBank: AB211060), *Dppa5a* (MGI:101800), *Fbxo15* (MGI:1354755), *Dnmt31* (GenBank: NM\_019448), *Ecat8* (GenBank: AB211061), *Gdf3* (MGI:95686), *Sox15* (MGI:98363), *Dppa4* (MGI:2157525), *Dppa2* (MGI:2157523), *Fth117* (GenBank: NM\_031261), *Sall4* (MGI:2139360), *Rex1* (MGI:99187), *Utf1* (MGI:1276125), *Tcl1* (MGI:1097166), *Dppa3* (MGI:1920958), *Grb2* (MGI:95805).

Összesen tehát a fenti 24 kiválasztott gént tesztelték a kísérletükben, amelyhez egy olyan rendszert fejlesztettek ki, ahol a pluripotens állapot aktivációját a G418 rezisztencia jelezte. Ehhez olyan transzgenikus egeret hoztak létre, ahol az *Fbxo15* génbe egy  $\beta$ geo (a  $\beta$ -galaktozidáz és a neomicin génfüziója) vektort illesztettek. Az *Fbxo15* gén az egér ESC-kben és egér embriókban expresszálódik, azonban jelenléte nélkülözhető a pluripotencia fenntartásában. Az ebből az egérből izolált ESC-k (amelyek a  $\beta$ geo génekstruktúrára homozigóták) G418-ra rezisztensek, jelezve így az *Fbxo15* lokusz aktivitását. Még ugyanebből az állatból származó szintén  $\beta$ geo homozigóta testi sejtek G418 érzékenyek. E rendszer alkalmazásával az *Fbxo15* egerekből MEF-et izoláltak és a sejtekbe retrovírus transzdukcióval a 24 gént egyesével jutatták be, majd G418-al szelektálták azokat, ellenőrizve ilyen módon, hogy az adott gén aktív-e az *Fbxo15* gén expresszióját vagy nem. Azt találták, hogy az egyes gének egyike sem eredményezett G418-rezisztens kolóniát, vagyis azok önmagukban a pluripotencia indukciójára nem alkalmasak. Azonban amikor mind a 24 gént együttesen transzdukálták a MEF sejtekbe, akkor G418 rezisztens kolóniákat kaptak, amelyek az ESC-khez hasonló fenotípust mutattak, amelyet RT-PCR-el igazoltak (lásd: 2.1.4.2. bekezdés). Ezek az eredmények azt sugallták, hogy bizonyos kombinációja e 24 faktornak alkalmas MEF sejtekben ESC-kre jellemző marker gének expressziójának indukciójára. Ezt követően számos faktorkombinációt teszteltek, amely kísérletsorozat végén az OCT-4, SOX2, KLF4, C-MYC (továbbiakban: OSKM) kombinációt találták a leghatékonyabbnak a

keletkezett kolóniák számát és minőségét tekintve. A létrejött iPSC kolóniák pluripotenciáját igazolták *in vitro* (lásd: 2.1.4. bekezdés), valamint *in vivo* (lásd: 2.1.5. bekezdés) és azt találták, ahogy azok nagyon hasonlóak voltak normál ESC-khez, valamint kimérik létrehozására is képesek voltak. Az OSKM faktorok kombinációjával farok csúcs fibroblasztot (TTF: Tail Tip Fibroblast) is sikerült újraprogramozniuk, bizonyítva így módon, hogy a négy faktor felnőtt testi sejtek újraprogramozására is alkalmas. A szerzők az eredmények megbeszélésben kiemelték, hogy igaz hogy a SOX2, az OCT-4, és a NANOG a pluripotens transzkripciós hálózat alapját képezik, azonban a NANOG meglepő módon nem alapvető fontosságú az iPSC-k létrehozásában. A C-MYC egy a MYC családba tartozó fehérje, amelynek szerepe az iPSC-k alapításában azzal magyarázták, hogy valószínűleg teljes hiszton acetiláció okozhat, amely elősegítheti az OCT-4 és SOX2 target helyekhez való kötődését (Fernandez et al. 2003). Emellett a C-MYC kulcsfontosságú szerepe egyesek korábban már bemutatták az ESC-k önmegújulásában és a pluripotens állapot fenntartásában (Cartwright et al. 2005). A KLF4 a KLF családba tartozik és szerepe a P53 fehérje szupressziójában lehet (amely jelenléte a NANOG szupressziójában fontos az ESC-k differenciálódása során), vagyis a KLF4 jelenléte a P53 fehérje csökkenésén keresztül a NANOG expresszió fenntartásában játszik szerepet (Rowland et al. 2005; Ying Shi és Walden Ai 2013).

Takahashi és Yamanaka (2006) által közölt OSKM faktor kombináció az iPSC alapítás során jelenleg is széles körben elterjedt, amelyet Yamanaka faktoroknak is szoktak nevezni. Az OSKM faktor kombinációval ez idáig számos emlős sejtípust sikerült eredményesen újraprogramozni, integratív és nem-integratív génterhelési eljárásokkal egyaránt. A négy transzkripciós faktor egyike a C-MYC, amely egy onkogén, vagyis számos tumor esetén expressziójának megváltozása szerepet játszik a tumorigenezisben, így e tulajdonsága az esetleges humán klinikai alkalmazásban kizáró tényező lehet. A C-MYC káros hatása miatt annak kihagyása vagy helyettesítése, illetve az újraprogramozó hatékonyság növelése érdekében néhányan a négy Yamanaka faktor helyett egyéb kombinációk kifejlesztésével foglalkoznak. Például egy munkacsoport a KLF4 és C-MYC helyett NANOG és LIN28-at (OSNL) alkalmazott (Yu et al. 2007). A LIN28 fehérje egyes újraprogramozó kombinációkban elterjedt, azonban az nem transzkripciós faktor, hanem egy RNS-kötő fehérje (Moss et al. 1997) és eddigi ismeretek alapján szerepe nem az őssejtek önmegújulásában, hanem inkább annak a szabályozásában van, hogy a sejtek differenciációba kezdenek-e (Lee et al. 2010). Használatát inkább az iPSC generálás eredményességének növelése érdekében elterjedt. Öt faktort tartalmazó kombinációt is tesztelt néhány kutatócsoport (Buecker et al. 2010; Maherali et al. 2008), ahol az OSKM mellé LIN28 vagy



NANOG-ot adtak, amely rendszerrel nehezen újraprogramozható sejttípusoknál próbáltak hatékonyságot növelni (Lee et al. 2010). Ehhez hasonlóan, hat faktor (OSKMNL) használatával is sikerrel alapítottak humán iPSC vonalakat több kutatócsoportban (Kamata et al. 2010; Liao et al. 2008), mindazonáltal a módszerek nem változtatták meg jelentősen a kezdetben publikált 4 faktor alkalmazásának körét.

#### 2.2.5.2. A transzkripciós faktorok túlexpresszáttal történő átprogramozás (transzdifferenciáció)

A pluripotenciáért felelős transzkripciós faktorok túlexpresszáttal tehát a pluripotencia indukciója érhető el. Az ily módon újraprogramozott sejtek pedig a három csíraréteg bármely sejttípusává képesek differenciálódni. Azonban a visszaprogramozás mellett egy másik stratégia is folyamatosan fejlődik, amely során a már egy irányba elköteleződött sejttípusok direkt konverziója valósul meg, a kívánt sejttípus kialakulásának megfelelő transzkripciós faktorok túlexpresszáttal. Ezt a módszert nevezik a már korábban tárgyalt transzdifferenciációnak vagy direkt átprogramozásnak (Chin 2014). E technológia korai kísérletei szintén fontos ismeretekkel szolgáltak az első iPSC vonal létrehozásához, valamint a ma is folyó transzdifferenciációs kísérletekhez is. A transzdifferenciáció során a sejttípus megváltoztatása nincs korlátozva az eredeti csírarégre és az iPSC technológiával szemben nincs szükség a sejtek pluripotens állapotúvá történő újraprogramozására. Számos sejttípust sikerült már ezzel a módszerrel létrehozni, mint például fibroblasztból kardiomyocita-szerű sejteket (Ieda et al. 2010), vagy neurális típusú sejteket (Caiazzo et al. 2011; Son et al. 2011), stb. Ezek az eljárások azonban jelenleg igen alacsony hatékonysággal működnek és még számos fejlesztésre szorulnak. Például a kívánt sejttípus eléréséhez szükséges megfelelő transzkripciós faktorok megválasztása egy kulcsfontosságú és még kidolgozásra váró lépése ezeknek a módszereknek. Egyelőre egy kívánt sejttípus létrehozásához még mindig a sejtek újraprogramozása majd azok megfelelő irányba való differenciálása a legelterjedtebb (Chin 2014).

## 2.3. Az indukált pluripotens őssejtek

### 2.3.1. Az iPSC előállítás mérföldkövei

A következőkben időrendi sorrendben tekintjük át az OSKM újraprogramozó faktorok közlése és az iPSC technológia térhódításának mérföldköveit jelentő tudományos eredményeket, amelyek kutatásaink számára fontos támpontot jelentenek.

#### 2006-2007

Takahashi és Yamanaka 2006-ban elsőként egér iPSC vonalakat hozott létre. Az OCT-4, SOX2, KLF4 és C-MYC faktorkombinációt retrovírus transzdukcióval jutatták egér fibroblaszt sejtekbe, amely azok újraprogramozódását eredményezte. A létrejött iPSC vonalak pluripotenciáját jellemezték és azt találták, hogy azok nagyon hasonlóak egér ESC-khez. Egy évvel később, az említett négy transzkripciós faktorral humán fibroblasztból is képesek voltak iPSC-ket létrehozni az egyén bemutatott módszerrel (Takahashi et al. 2007).

Az újraprogramozó rendszerek fejlődésével párhuzamosan a különböző betegségekre specifikus-iPSC vonalak is elkezdtek megjelenni. Az első ilyen iPSC vonalat 2007-ben közölték, amely a sarlósejtes anémiára volt specifikus (Hanna et al. 2007). Egészen napjainkig a betegség specifikus-iPSC vonalak folyamatosan jelennek meg, betegségmodellelés, gyógyszeresztelés és génterápiás célokra (Kim 2014).

#### 2007-2008

Az ismert Yamanaka faktor kombináció helyett egyesek (Yu et al. 2007) olyan faktor kombinációval hozták létre humán iPSC sejteket, amelyből a C-MYC-et kihagyták, hogy annak káros hatásait elkerüljék: NANOG, LIN28, OCT-4 és SOX2. Wernig et al. (2008b) egér iPSC-ket hoztak létre csupán 3 faktor (OCT-4, KLF4, SOX2) bejuttatásával, amelyet egér- és humán-sejtek esetében Nakagawa et al. (2008) is demonstrált ugyanebben az évben.

#### 2009

Az eddigiekben vírus-vektorral külön-külön bejuttatott négy faktort sikerült egyetlen ún. polisztronos vektor által stabilan expresszálni a sejtekben, csökkentve így az inszerciós mutagenézis veszélyét, valamint a különböző integrációkból adódó eltérő expressziós aktivitás okozta heterogenitást (Carey et al. 2009). Immár az egyes faktorok eloszlása és aktivitása nem az egyes faktorok egyedi beépülési helyétől és számától függött, hanem a polisztronos vektor beépülésének számától. Ettől a ponttól kezdődően az alacsony

vagy lehetőleg egyedi kópiaszámú klónok szelekciójára is lehetőség nyílt, amely a transzgén mentesítés hatékonyságának növelése szempontjából jelentős.

### 2008-2010

A retrovírus-alapú génbeviteli eljárás limitáló tényezőinek kiküszöbölésére számos alternatív újraprogramozórendszer került kidolgozásra ezekben az években.

Egyes kutatások az aktív transzgén jelenlétének káros hatását elkerülendő, integrálandó/kivágható rendszereket dolgoztak ki. Például a Cre/LoxP-rendszerrel eltávolítható lentivírus alapú technikák jelentek meg (Chang et al. 2009; Soldner et al. 2009; Sommer et al. 2010; Somers et al. 2010). A vírus bevitelt elkerülendő transzpozonokkal való újraprogramozás a lentivírushoz hasonló hatékonysággal működött, ahol a transzpozáz enzim hozzáadásával a transzgén kivágása egér iPSC-kből sikeres volt (Woltjen et al. 2009).

Míg más kutatások azt helyezték előtérbe, hogy az iPSC vonalak integrációktól mentes módon és/vagy vírus bevitel használata nélkül képződjenek. Ide tartoztak az adenovírus-, fehérje-, mRNS-, „Minicircle” vektor-, episzómális vektor- és Sendai-vírus- alapú újraprogramozási rendszerek (Stadtfeld et al. 2008; Kim et al. 2009; Zhou et al. 2009; Warren et al. 2010; Jia et al. 2010; Yu et al. 2009; Ban et al. 2011; Fusaki et al. 2009).

### 2010-2012

A leghatékonyabban újraprogramozható sejt típus a fibroblaszt, azonban e sejtek a humán donoroktól invazív beavatkozással nyerhetőek. A beavatkozást elkerülendő kevésbé invazív- vagy non-invazív- módon nyerhető sejtípusokból való újraprogramozási rendszerek kerültek kidolgozásra ezekben az években (Loh et al. 2010; Staerk et al. 2010; Zhou et al. 2011).

#### 2.3.2. Az iPSC alapításához alkalmazott sejt donor genetikai háttere és a kiinduló sejt típusa

2.3.2.1. Az alkalmazott egértörzs genetikai hátterének hatása az újraprogramozó hatékonyságra

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a genetikai háttér jelentős mértékben befolyásolhatja az ESC alapítás eredményességét, aminek akkor van jelentősége, ha a vonalalapítás célja a humán betegségek modellezése. Vannak egyes egértörzsek, amelyekből az egér ESC alapítás hatékonyabb, mint másokból. Például Kawase et al. (1994) beltenyésztett és mutáns egértörzseket hasonlított össze, ahol az ESC alapítás a C57BL/6 törzsből volt a leghatékonyabb. Egy másik kutatócsoport C57BL/6 és BALB/C törzseket

hasonlított össze, ahol a BALB/C-ESC vonalak alapításához eltérő *in vitro* tenyésztési paraméterekre volt szükség a LIF mennyiség emelése mellett (Baharvand és Matthaei 2004). Hasonló megfigyelésre jutott egy másik munkacsoport is, ahol három *in vitro* tenyésztési körülményt hasonlítottak össze két beltenyésztett vonal alapítása során, ahol szintén a genetikai hátterek eltérő hatását figyelték meg, mivel a két törzs egymástól eltérő módon reagált a különböző kondíciókra (Iijima et al. 2010). Suzuki et al. (1999) a genetikai háttér befolyását úgy vizsgálta, hogy beltenyésztett és nem-beltenyésztett egértörzseket 12 különböző kombinációban párosított és a létrejövő blasztocisztákból az ESC vonalalapítás hatékonyságát mérte. A legtöbb ESC vonalat a 129/Sv x 129/Sv törzs párosításából sikerült létrehozni. Az ICR x ICR vonalak párosítása nem eredményezett ESC vonalakat, azonban keresztezésekben (ICR x Yok:ddY) a hibrid embriókból sikerült egy ESC vonalat alapítani, bizonyítva így a beltenyésztett és nem-beltenyésztett törzsek közötti különbségek jelentős befolyását.

E kísérletek alapján feltételezhető, hogy az iPSC alapítás eredményessége függhet a kiinduló sejtípus genetikai hátterétől is. Egér esetén a leggyakrabban alkalmazott kiinduló sejtípus a MEF vagy TTF, azonban a publikációk nagy többségében azok genetikai háttere nincs jelezve, vagy számos esetben hibrid vonalak sejtjeit alkalmazták. Ez idáig csekély számú iPSC tanulmány során alkalmaztak tisztán beltenyésztett egértörzseket (Hanna et al. 2009; Takata et al. 2011; Liu et al. 2011). Szintén igen kevés kutatás irányul arra, ahol a genetikai hátterek hatását tanulmányozzák az egér iPSC vonalalapítási képességre nézve. Schnabel et al. (2012) hat különböző beltenyésztett egértörzsből (NON/LtJ, C57BL/6J, DBA/2J, BALB/cJ, 129S1/SvImJ, CAST/EiJ) alapított egér iPSC vonalakat lentivírus transzdukcióval, és az alapítás hatékonyságát vizsgálta. Habár mindegyik törzsből sikerült egér iPSC vonalakat alapítaniuk, az újraprogramozó hatékonyságban, az egér iPSC-k (miPSC) növekedésében és a szükséges *in vitro* tenyésztési paraméterekben jelentős különbségeket észleltek. Muenthaisong et al. (2012) Sleeping Beauty-transzpozon általi géntranszferrel használt MEF-ből való egér iPSC alapításhoz, három különböző egértörzsből (beltenyésztett: C57BL/6, nem-beltenyésztett: ICR, F1 hibrid: C57BL/6 x DBA/2J) és a genetikai háttér befolyását tanulmányozta az egér iPSC-k *in vitro* és *in vivo* tulajdonságaira nézve. A három törzs újraprogramozhatóságában nem talált különbségeket, azonban csak az ICR és F1-hibrid iPSC vonalak adtak kimérákat, amelyekből az F1 hibrid kimérái csírvonal kompetenciát mutattak. Meglepő módon az ICR-iPSC vonalak esetében magasabb differenciációs potenciált figyeltek meg az ICR-ESC vonalakkal képest.

A fenti megfigyelések azt sugallhatják, hogy még az egér ESC vonalalapítás eredményességét jelentős mértékben, addig az miPSC vonalalapítás sikerességéig kevésbé

befolyásolja a genetikai hátér, azonban a kapott sejtvonalak differenciációs képessége, így pluripotenciája ugyanúgy, mint az ESC-k esetében eltérő lehet. Ennek alátámasztására azonban további kísérletekre volna szükség.

### 2.3.2.2. A humán sejt donor korának hatása az újraprogramozó hatékonyságra

A donor korának hatását az iPSC alapításra nézve számos munkacsoport tanulmányozta. Egyes munkacsoportok bemutatták, hogy akár egy 100 éves ember sejtjei is újraprogramozhatók és mindhárom csíraréteg irányába differenciálhatók (Lapasset et al. 2011; Yagi et al. 2012). Az újraprogramozással a sejtek is „fiatalosabb megjelenést” mutattak: a telomérák hosszában és a génextpressziós profiljukban az ESC-khez hasonlóan bizonyultak (Lapasset et al. 2011). Boulting és munkatársai sem tapasztalták a kor jelentős befolyását az iPSC vonalak differenciációs képességére, amikor hét eltérő korú donor iPSC vonalait vizsgálták, habár a pluripotencia faktorok expressziós szintjében eltéréseket mutattak ki (Boulting et al. 2011). Az LMNA (más néven: LAMIN A) egy olyan fehérje, amely a nukleáris struktúra építésében játszik szerepet, a testi sejtek öregedésével szintje növekszik, azonban differenciálatlan sejt típusokban a szintje alacsony. Az LMNA gátlásával az iPSC indukció felgyorsult humán fibroblasztok használatakor, túlexpresszálatakor pedig az újraprogramozódás lassult (Zuo et al. 2012).

A fenti néhány példa az eddigi, e témát feldolgozó kutatások töredéké mutatja be, azonban így is jól szemlélteti, hogy az eredmények igencsak ellentmondóak, bármilyen konklúzió a témával kapcsolatban egyelőre nehezen vonható le (Rohani et al. 2014).

### 2.3.2.3. Az iPSC alapításhoz alkalmazott kiinduló sejt típusa

Humán iPSC alapításnál figyelembe kell venni, hogy annak eredményessége donorfüggő lehet, vagyis mivel a sejt donorok eltérő genetikai háttérűek, korúak és egészségi állapotúak az újraprogramozási hatékonyság is igen eltérő lehet. Mindezek mellett mégis a legfontosabb tényező, amely egyelőre kidolgozásra szorul, az a megfelelő kiinduló sejt típus megválasztása. Humán mintavétel esetén az eljárásnak olyannak kell lennie, amellyel nagy mennyiségű sejt gyűjthető, non-invazív módon. Számos humán iPSC vonalat alapítottak már fibroblasztból (Takahashi et al. 2007; Yu et al. 2007), keratinocitákból (Aasen et al. 2008), amelyhez bőrbioopszia vétele szükséges. Plasztikai beavatkozások esetén zsírszövetből nyerhető sejtekből (Sun et al. 2009) is sikeres volt az újraprogramozás. Néhány munkacsoport fogszövet-eredetű sejt típusokból (Yan et al. 2010; Tamaoki et al. 2010; Wada et al. 2011) vagy mások a szájüregben található biopsziával nyert fibroblaszt sejtekből (Miyoshi et al.

2010) hozták létre humán iPSC vonalakat. Azonban e sejttípusok invazív beavatkozás során nyerhetőek.

Vannak sejttípusok, amelyek teljesen non-invazív módon hozzáférhetőek, úgymint az extra embrionális szövetek származékos sejtjei, például a köldökzsinórvér vagy a magzatvíz sejtjei, amelyekből szintén iPSC vonalakat alapításáról számoltak be (Giorgetti et al. 2009; Li et al. 2009). Azonban e szövetek/sejtek csak a születés körüli időszakban érhetőek el és azok elterjedése nem minden országban bevett eljárás.

Kevésbé invazív eljárások közé sorolható a vérvétel, ahol egyszerre nagy mennyiségű perifériás vérvétel és annak mononukleáris sejtjei (PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell) alkalmasak lehetnek újraprogramozásra. Néhány kutatócsoportnak sikerült PBMC-k összességéből lenti-/retrovírussal (Loh et al. 2010; Staerk et al. 2010; Kunisato et al. 2011) humán iPSC vonalakat alapítani, azonban a hatékonyság alacsony volt, illetve magas titerű vírus használatára vagy többszöri transzdukcióra volt szükség. Ennek oka, hogy a PBMC heterogén sejtpopulációt és nehezen újraprogramozható sejttípusokat tartalmaz. Mások az esetleges klinikai alkalmazások felé irányulva nem-integratív rendszerekkel a PBMC-ből izolált T-limfocitákat tudták újraprogramozni (Seki et al. 2010), eleinte igen alacsony hatékonysággal. Azonban napjainkra ezek a módszerek sokat fejlődtek és számos cég fejleszt hatékony Sendai-vírus- és episzómális-vektor általi újraprogramozó protokollokat a PBMC-khez.

Klinikai alkalmazásra igen ígéretesek lehetnek a vizeletben nagy számban található felhám-szerű sejtek újraprogramozása, mivel azok teljesen non-invazív módon hozzáférhetőek. Zhou et al. (2011) e sejttípusokból, retrovírus transzdukcióval iPSC vonalakat alapított. Később episzómális nem integráló vektorokkal is sikeres volt a vizeletből kinyert sejtek újraprogramozása (Xue et al. 2013).

Az iPSC előállításához alkalmas non-invazív sejttípusként a haj folliculusok hajszemölcs (dermal papillae) is említendő. A hajszemölcs sejtjei olyan szöveti oszletek a bőrben, amelyek a haj képződéséért és regenerációjáért felelősek. Össejtes tulajdonságaik miatt ígéretesek lehetnek, mivel esetlegesen kevesebb transzkripciós faktorról is újraprogramozhatóak. Egy esetben OCT-4 és KLF4-el (Tsai et al. 2010), később pedig csak az OCT-4 bevitelével ugyanaz a munkacsoport (Tsai et al. 2011) egy iPSC vonalakat tudott alapítani. Egy igen friss tanulmányban pedig humán hajszemölcs sejtet programozott egy munkacsoport vissza az OSKM lentivírus transzdukciójával (Muchkaeva et al. 2014). Az újraprogramozás korai szakaszában valproinsavat és aszkorbinsavat is adtak a sejt kultúrához, valamint alacsony oxigén tartalmú tenyésztő paramétereket alkalmaztak (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>). A hajszemölcs sejtjei jelentősek lehetnek humán klinikai alkalmazás esetén, azonban

jelenleg csak csekély ismeret áll a rendelkezésünkre e sejttípus újraprogramozásával kapcsolatban.

Általánosságban tehát elmondható, hogy jelenleg a vér, illetve a vizelet sejtjeinek újraprogramozása mutatkozik a legígéretesebbnek jövőbeli klinikai alkalmazások céljából, illetve esetleg a haj egyes sejtjei. Azonban egyelőre a bőrbioptziából nyert fibroblasztok újraprogramozása az, ami széles körben elterjedt, mivel az újraprogramozó hatékonysága e sejtekben a legmagasabb. Számos cég specializálódott kifejezetten arra, hogy non-invazív sejttípusokból, a nem integrálódó rendszerek újraprogramozó hatékonyságát növelje. Az általuk kibocsájtott kitek egyre megbízhatóbban működnek, így a jövőben valószínűsíthető, hogy a bőrbioptziát, a vizelet/vérvélet, illetve és a lenti-/retrovírus géntelvitel alkalmazását a nem-integratív rendszerek válthatják fel.

A kiinduló sejttípus megválasztását a visszaprogramozhatóság mellett egyéb tényező is befolyásolhatja, például hogy a létrehozott sejtvonalból milyen irányú differenciációs szükséges az adott kísérletben. Egyesek bemutatták, hogy az iPS sejtek epigenetikai újraprogramozódása nem teljes az ES sejtekhez hasonlóan (Kim et al. 2011). Vagyis számos esetben az eredeti szövet metilációs mintázatából is fennmarad, amely által az iPS sejt „előnyben részesíti” a donor sejtre jellemző differenciációs útvonalat (pl: egy ektodermális eredetű donorsejt hatékonyabban differenciálódhat ektodermális irányban). Az irodalomban erre a jelenségre azonban egymásnak ellentmondó adatok állnak rendelkezésre, mely szerint egyesek nem észlelték, míg mások egyértelműen alátámasztották az epigenetikai memória iPS sejtek pluripotenciájára gyakorolt hatását (Rohani et al. 2014). A kérdés megválaszolásához azonban még további kísérletek és ismeretanyag gyűjtése szükséges.

## 2.4. Transzgen-mentes iPSC vonalak generálása

Takahashi és Yamanaka (2006) első iPSC vonala óta, számos sejtpótló programoztak vissza világszerte, különböző transzkripciósfaktor beviteli eljárásokkal. A korai tanulmányokban retrovírus-, későbbiekben lentivírus-átviteli eljárásokat alkalmaztak az iPSC alapfáshoz. Azonban ezekkel a módszerekkel a transzgen random szándékú és pozícióban például a genomba, ami által egyes gének funkciójukat veszíthetik vagy elcsendesülhetnek, vagyis inszerció mutagenézis alakulhat ki. E problémák kiküszöbölésére olyan újraprogramozó eljárások jelentek meg, amelyek elkerülik a transzgen genomba való integrációját. Például ilyenek az episzómális- (Yu et al. 2009), Minicircle- (Jia et al. 2010), adenovírus-vektorral (Stadtfeld et al. 2008), Sendai-vírus-transzdukcióval (Ban et al. 2011; Fusaki et al. 2009), mRNS-transzfekcióval (Yakubov et al. 2010; Warren et al. 2010) vagy fehérjével (Kim et al. 2009; Zhou et al. 2009) való beviteli eljárások. Ezek a rendszerek az esetleges humán klinikai alkalmazásban igen ígéretesek, azonban hatékonyságuk jóval az integratív rendszerek alatt marad, még ismételt transzfekció/transzdukció alkalmazó protokoll mellett is.

Az integratív rendszerek használata hatékonyabb és robosztusabb rendszer, ezért még mindig igen elterjedt. Azonban a genomi integrációk nem csak az esetleges terápia alkalmazás esetén jelenthetnek problémát, hanem a transzgen jelenléte az iPSC-ket molekuláris illetve funkcionális tulajdonságaikban is negatívan befolyásolhatja például azok differenciációjában (Soldner et al. 2009). A retrovírussal bejuttatott vektor expressziója képes elcsendesülni, vagy ha a lentivírus vektorban egy indukálható promóter van, akkor annak expressziója blokkolható (Wernig et al. 2008a; Sommer et al. 2009), azonban amíg a transzgen a genomban jelen van, annak re-aktiválódása potenciális veszélyt jelenthet (Hochedlinger et al. 2005; Markoulaki et al. 2009). Ezen okok miatt, még abban az esetben is, ha az iPSC-ket csak *in vitro* kutatásra, nem pedig terápia céljára alapítják, a transzgen eltávolítása és ilyen módon transzgen-mentes vonalak létrehozása fokozottan ajánlott.

### 2.4.1. Nem integráló DNS alapú vektorral való újraprogramozó technikák

Ebbe a kategóriába azok az újraprogramozó technikák tartoznak, amelyek a pluripotenciáért felelős faktorokat DNS formájában juttatják a sejtekbe, azonban azok rövid expressziója után kihígulnak a rendszerből, így a sejtek genomjába idegen DNS szakaszok nem integrálódnak. Ennek köszönhetően gyógyászati alkalmazásban igen ígéretesek lehetnek a jövőben. Azonban az e kategóriába tartozó eddig bemutatott rendszerek alacsony hatékonysággal működnek nehezen újraprogramozható sejtpótló sejteken. Emellett technikai



nehézséget okozhat az is, hogy a transzgen integrációtól való mentesség igazolni kell, mert ritka esetekben random integráció is előfordulhat.

Ide tartoznak az **episzómális-, Minicircle- és adenovírus-vektort** alkalmazó újraprogramozási eljárások. A három rendszer közül a leghatékonyabb az episzómális vektor (EV), jelenleg a laboratóriumokban a legelterjedtebb.

#### 2.4.1.1. Episzómális vektor

Az egyik DNS-alapú integrációt elkerülő újraprogramozás episzómális vektorokkal végezhető. Az általánosságban elterjedt EV-ké Epstein-Barr vírusból származó elemet tartalmaz (oriP, EBNA1), amelyet egyetlen plazmidba építettek be. A vírus replikációs origója (oriP: origin of viral replication) a plazmid replikációját teszi lehetővé az emlős sejtekben. Az EB nukleáris antigén 1 (EBNA1) az oriP-hez csatlakozva kötődik a kromoszómális DNS-hez, ami lehetővé teszi, hogy a gazdasejt osztódása során az episzómák is osztódjanak. Az EV stabil episzómaként tenyészthető antibiotikum szelekció alatt, ami fokozatosan eltűnik a sejtekből, ha az antibiotikum adagolása megszűnik. Az EV plazmid egyetlen transzfekciója is elegendő lehet a sejtek újraprogramozásához, azonban a vektor kihígulása a rendszerből akár 2-3 hónapos tenyésztést is követően következhet (Yates et al. 1984; Yates et al. 1985). Az első EV plazmidok igen alacsony hatékonysággal működtek humán fibroblasztok újraprogramozása során (Yu et al. 2009). Ezekben a kísérletekben két transzkripciós faktor kombinációját használták, amelyek expresszióját három különböző oriP/EBNA1 vektor biztosította. Az EV vektorok továbbfejlesztésével integrációmentes iPSC vonalakat tudtak alapítani vérsejtekből (Chou et al. 2011; Okita et al. 2013; Su et al. 2013) és a vizeletben található felhám sejtekből is (Xue et al. 2013). Az EV vektor-mentes iPSC generálás ígéretes, mivel a kivitelezése egyszerű transzfekció követel és nincs szükség vírusok alkalmazására.

#### 2.4.1.2. Minicircle-vektor

Az újraprogramozáshoz használt episzómák méretének csökkentéseként éppen az ún. Minicircle-vektorok általi iPSC generálást került kifejlesztésre. A Minicircle-vektorok képesek a nem integrálódott és a nem replikáló episzómákra is expresszálni. Korábban voltak próbálkozások konvencionális DNS-vektorral való újraprogramozásra, azonban azok csak igen alacsony hatékonysággal működtek (Okita et al. 2008). A Minicircle-vektorok előnye a konvencionális DNS-vektorokkal szemben, hogy nem tartalmaznak bakteriális szekvenciákat, kevésbé hajlamosak az elcsendesülésre és sokkal magasabb szintű expresszióra képesek (Chen et al. 2003; Chen et al. 2005). Jia et al. (2010) alapítottak először

sikeresen humán iPSC vonalakat egy négy faktort tartalmazó polycisztronos Minicircle-vektor többszöri transzfekciójával. Ugyanez a kutatócsoport később egy standardizált protokollt publikált szűz övet-eredetű sejtek Minicircle-vektor általi újraprogramozáshoz (Narsinh et al. 2011). Újabban pedig egy kodon-optimalizált Minicircle-vektorral humán fibroblasztból hoztak létre iPSC vonalakat (Diecke et al. 2014b), azonban vérből vagy egyéb nehezen újraprogramozható sejt típusokból ezzel a rendszerrel iPSC alapfázis ez idáig nem kövöltek.

#### 2.4.1.3. Adenovírus-vektor

Az egyik első integráció-mentes egér iPSC vonal generálása adenovírus vektorral történt (Stadtfeld et al. 2008), amelynek a hatékonysága alacsony volt. A replikációhiányos vektor a legtöbb sejt típusba nem képes integrálódni. Ezek a vektorok képesek számos sejt típus transzdukciójára, ahol epizóma formájában maradnak fent és a hozzáadott promotortól függően expresszálódnak (Graham et al. 1992; He et al. 1998). Később humán embrionális fibroblaszt újraprogramozásával is próbálkozott egy munkacsoport: a transzkripciós faktorokat egyenként adenovírus-vektorokkal jutatták a sejtekbe. A többszöri transzdukció és 250 „MOI” (Multiplicity of Infection) ellenére is, az egér sejteknél elért hatékonyságnál alacsonyabb eredményt értek el (Zhou és Freed 2009). Az adenovírus alacsony újraprogramozó hatékonysága mellett, annak random rekombinációja is ismeretes, elsősorban a kódoló szakaszokba integrálódva (Stephen et al. 2008).

#### 2.4.2. DNS-mentes újraprogramozó technikák

A DNS-mentes újraprogramozó rendszerek a pluripotenciáért felelős faktorokat RNS vagy fehérje formájában juttatják a sejtekbe, így azok átróására sincs már szükség. Továbbá, itt még a ritkán előforduló random integráció jelenségével sem kell számolni ellentétben a DNS alapú rendszerekkel. Ezen okokból humán terápiás alkalmazásban e rendszerekkel való iPSC előállítás tűnhet a legígéretesebbnek. Az újraprogramozó hatékonyságuk eltérő tendenciát mutat, azonban általában elmondható, hogy az integrálódó rendszerek hatékonysága alatt maradnak.

Ide tartozik a **Sendai-vírus** (SeV) által RNS formájában bejuttatott transzkripciós faktorokkal való újraprogramozás, valamint az **mRNS-alapú** és **fehérje bevitelt** alkalmazó eljárások. Jelenleg a Sendai-vírus használata a legelterjedtebb ebben a kategóriában, mivel a másik két rendszer eredményességének növeléséhez számos esetben többszöri transzfekció szükséges, illetve alkalmazásuk speciális technológiát követel, amelyek az ESC/iPSC tenyésztő laboratóriumok nagy részében nem elérhetőek.

#### 2.4.2.1. Sendai-vírus transzdukció

A SeV egy negatív-szálú RNS vírus, amely nem képes a genom integrációjára. Számos sejt típus fertőzésére alkalmas, azonban azt követően már nem képes fertőző ágensekké válni a sejtekben. Az adenovírussal ellentétben a SeV nem igényli a gazdasejt által termelt fehérjéket, a transzkripcióhoz nem kerül a sejtmagba, tehát a random integráció veszélye sem áll fenn (Az adenovírus szintén nem integrálódik a genomba, azonban a sejtmagban lokalizálódik, ahhoz hogy virális fehérjéket képezzen. Vagyis itt még mindig felléphet random integráció, ahol a virális DNS beépülhet a genomba). SeV-el már számos sejt típusból még nehezen újraprogramozható sejt típusokból is sikerült az iPSC alapítás (Fibroblasztból: Fusaki et al. 2009; CD34+ sejtekből: Nishishita et al. 2012, Názális epitélium sejtekből: Ono et al. 2012; T-sejtekből: Seki et al. 2010).

Habár jól működő rendszernek tűnik, egyelőre vannak limitáló tényezői. Például a Sendai-vírussal bevezetett szekvencia mérete limitált, így a pluripotencia faktorok bejuttatásához több vírus-vektor együttes hozzáadása szükséges. Az újraprogramozás hatékonysága így kevésbé megbízható az egy sejtbe jutott faktorok véletlenszerű eloszlása miatt. Továbbá a SeV folyamatosan replikálódik a citoplazmában, ezért az újraprogramozás után az iPSC vonalából való kiürítése hosszadalmas. Az egyes sejtvonalak között nagy a variancia, általában 5-10 passzálás szükséges ahhoz, hogy a vírus kiürüljön a sejtekből, amelyet SeV-re specifikus PCR-el vagy ICC-festéssel lehet ellenőrizni (Macarthur et al. 2012). A SeV gyorsabb kiürülésére, egy kutatócsoport hőmérséklet-érzékeny vírust fejlesztett ki, ahol a sejtek 3-5 napon át tartó 38 °C-os inkubációjára van szükség (Ban et al. 2011). Azonban a természeti körülmények, mint például a hőmérséklet drasztikus változása a sejteket ért stressz következtében esetlegesen mutációk vagy nagyobb kromoszómális változások kialakulásához vezethet. Nishimura et al. (2011) egy továbbfejlesztett SeV-et hoztak létre, az úgynevezett SeVdp-t, amivel egér sejteket tudtak újraprogramozni. Az SeVdp replikáció-deficiens, vagyis folyamatos expresszióra képes, és a négy transzkripciós faktort az eddigiekkel szemben egy vektorban képes bevinni. Az újraprogramozást követően pedig a SeV siRNS kezeléssel eltávolítható.

Mivel a SeV hatékonysága nem sokkal marad el a beépülő rendszerekhez képest, még nehezen újraprogramozható sejt típusok esetében sem és emberre nem veszélyes (nem fertőző), így humán génterápiában jól hasznosítható lehet a jövőben (Nakanishi és Otsu 2012).

#### 2.4.2.2. mRNS-alapú újraprogramozás

Az integráció-mentes rendszerek közé sorolható az mRNS-alapú újraprogramozás, mellyel a vírusok használata elkerülhető. Yakubov et al. (2010) programoztak vissza először sikeresen humán fibroblaszt sejteket négy *in vitro* előállított mRNS (5' cap) öt egymást követő ismételt transzfekcióval. A felhasznált mRNS egy „Internal Ribosome Entry Site” (IRES) szekvenciát tartalmazott az 5'UTR- és egy polyA-t a 3'UTR- régióban. Ennek magasabb hatékonyságot ért el egy másik kutatócsoport szintetikus mRNS-ek ismételt transzfekciója mellett (Warren et al. 2010; Warren et al. 2012). Azonban a limitáló tényező e rendszer használata esetén a többszöri ismételt transzfekció szükségessége, amit az érzékeny sejtípusok nem képesek tolerálni. Emellett a szintetikus mRNS vektor előállítása igen költséges.

#### 2.4.2.3. Fehérje-érel-mediált újraprogramozás

A fehérje általi újraprogramozási rendszer elkerüli a bármiféle genetikai eredetű anyag sejtekbe való bevitelét, mivel az újraprogramozó faktorok fehérje formájában jutnak a sejtekbe. Korábbi tanulmányokban bemutatták, hogy különböző fehérjék bejuttathatóak a sejtekbe (*in vitro* és *in vivo*), ha azokat sejten-áthatoló peptidekkel (CPP: Cell-Penetrating Peptid) vagy fehérje transzdukciós doménnel fuzionálják (Inoue et al. 2006; Michiue et al. 2005; Wadia és Dowdy 2002). Ezzel a módszerrel Zhou et al. (2009) állított elő olyan rekombináns pluripotencia faktorokat, amelyek képesek áthatolni a plazma membránon. Ezeket a faktorokat, egymást követő négy ciklusban adták MEF-hez és ily módon először tudtak létrehozni egér iPSC vonalakat. Az újraprogramozáshoz a fehérjék hozzáadása mellett, kismolekulák adagolása is szükséges volt. Azonban ugyanezzel a módszerrel humán iPSC-k alapítása ez idáig nem volt sikeres. További hátrány, hogy nagy mennyiségű tisztított rekombináns fehérje előállítására volt szükség, amely a legtöbb sejttenyésztő laboratóriumban nem tartozik a rutin eljárások közé. Ugyanebben az évben egy másik csoport is hasonló iPSC újraprogramozó eljárást közölt (Kim et al. 2009). Stabil HEK293 sejtvonalakban expresszáztatták a négy humán faktort (OSKM) és fuzionálták 9R-el és MYC tag-el. Az erről gyűjtött sejt kivonatot 6 órán át ismételt ciklusban adták humán magzati fibroblaszthoz (HFF: Human Foetal Fibroblast) és így kért stabil humán iPSC vonalat állítottak elő, kismolekulák hozzáadása nélkül is.

A fehérje általi újraprogramozás alkalmazása akkor válhat szükségessé, ha olyan iPSC vonalak alapítása a cél, amely teljesen mentes mindenféle exogén RNS/DNS-től. Azonban az eddig elért hatékonyság igen alacsony, még az általában könnyen újraprogramozható

sejttípusokkal is. Ez a módszer egyelőre további fejlesztésre szorul, és jelenleg a használat nem elterjedt.

### 2.4.3. Integrálódó/kivágható konstrukcióval való újraprogramozó technikák

Ebbe a kategóriába olyan DNS alapú géneviteli eljárások tartoznak, amelyek a bevitt konstrukciót integrálják a sejtek genomjába, azonban azok az újraprogramozódást követően az alapfolt vonalából specifikus módon eltávolíthatók. A fenti két kategóriával ellentétben (2.4.1. és 2.4.2. bekezdés) e rendszerek hatékonysága a legmagasabb mivel a bevitt DNS stabilan integrálódik a genomba, és az folyamatosan képes expresszálni a sejtekben, így a bevitel ismétlésére sincs szükség. Ezek a rendszerek robosztusak, nehezen újraprogramozható sejttípusok esetében is kiválóan működnek. A négy gén bevitelére egy polisztronos vektorral történik, így a random integrációk mennyisége csökkenthető. Azonban az egy transzdukción során integrálódott transzgének száma és helye random, növelve így e rendszerek kiszámíthatatlanságát és az inszerciós mutagenézis veszélyét.

A transzgén(-ek) eltávolításához az alapfolt vonalak szelekciója szükséges, az azokban integrálódott transzgének száma alapján, és csak az alacsony kópiaszámú klónok (max. 3-4 kópia) transzgén-mentes fésze ajánlott. A kópiaszám meghatározásra leggyakrabban Southern blot analízist, ritkábban kvantitatív PCR vagy egydb PCR alapú eljárásokat alkalmaznak (Kolacsek et al. 2011; Uren et al. 2009). Ezek az eljárások költség- és időigényesek, azonban használatuk elengedhetetlen integratív géneviteli eljárások alkalmazása esetén.

Mivel az újraprogramozás során genom-manipuláció történik, így e technológiák humán terápiás célokra nagy valószínűséggel nem lesznek alkalmasak. Azonban biológia alapú kutatókhoz illetve gyógyszereszekhez e rendszerek használata jelenleg a legelterjedtebb, mivel újraprogramozó hatékonyságuk a legmagasabb. Néhány munkacsoport megfigyelte a transzgén molekuláris-, és differenciációs képességre kifejtett káros hatását is (Sommer et al. 2010; Chakraborty et al. 2013), így annak eltávolítása még *in vitro* alkalmazás esetén is javasolt, növelve így a rendszer használatának eszköz- és időigényét.

E kategóriába két rendszer tartozik: az egyik a **kivágható lentivírus alapú**, a másik pedig a **transzpozon-transzpozáz** rendszer általi génevitelt alkalmazza.

#### 2.4.3.1. Kivágható lentivírus alapú újraprogramozó rendszerek

Az újraprogramozáshoz használt lentivírus vektort úgy tervezték, hogy a transzgén az integrációt követően a genomból kivágható legyen. Ez úgy valósítható meg, hogy a pluripotencia faktorokat tartalmazó vektor 3'LTR régiójába egy *LoxP* szekvencia található. A

v fűs reverz transzkripciója során a LoxP szekvencia az 5'LTR régióba másolódik, körülvéve így a transzgén két LoxP hellyel. A transzgén kivágását a Cre-rekombinázt sejtekbe való transzfekciójával lehet elérni. A kivágást követően az egyik LoxP hely továbbra is a genomban marad, azonban az aktív promotert nem tartalmaz tehát a vonalak transzgénmentesnek nevezhetőek.

Ezt az újraprogramozó stratégiát először Chang et al. (2009) alkalmazta transzgénmentes egér iPSC vonalakat alapfáshoz. Az OSK policisztronos lentívűs-vektor transzdukciójával egér TTF-et programoztak vissza, majd a Cre-rekombinázt adenovíussal vagy elektroporációval jutatták a sejtekbe a transzgén kivágásának céljából. Ugyanebben az évben Soldner et al. (2009) humán transzgénmentesített iPSC vonalakat alapított egy hasonló módszerrel humán fibroblasztból ahol az OSK faktorokat egyenként jutatták be a sejtekbe. A létrehozott transzgénmentes iPSC vonalakat normál ESC és transzgén-tartalmazó iPSC vonalakkal hasonlították össze *in vitro* tesztekben, ahol a transzgén káros hatását tapasztalták. A következő években további egér és humán iPSC vonalakat hozott létre néhány kutatócsoport, ahol a sejtvonalat a Cre/LoxP-rendszert alkalmazva transzgénmentesítették (egérben: Sommer et al. 2010; Chakraborty et al. 2013; humánban: Somers et al. 2010). Ezekben a munkákban az alkalmazott újraprogramozó/kivágható rendszer stratégiája hasonló volt, azonban a felhasznált lentívűs vektorok némileg eltértek egymástól. A transzgén negatív hatását a sejtek molekuláris tulajdonságaira és/vagy a differenciációs képességre a transzgén kivágása előtt szintén detektálták (Sommer et al. 2010; Chakraborty et al. 2013). A Cre/LoxP-rendszer mellett az Flp/FRT-rekombinázt használata is elterjedt emlős sejtekben, és habár a hatékonysága alacsonyabb, azonban a sejtekre kifejtett toxicitása kisebb (Nakano et al. 2001; Schmidt-Supprian és Rajewsky 2007). Az Flp/FRT-rendszert alkalmazva Voelkel et al. (2010) transzgénmentesített egér iPSC vonalakat alapított sikeresen egy egér OSKM policisztronos lentívűs vektor használatával. Az alapított egér iPSC vonalakba a Flp-rekombinázt Gag-pol poliprotein általi transzdukcióval jutatták be. Transzgénmentesített humán iPSC-k létrehozását a Flp/FRT-rekombinázt rendszerrel ez idáig nem kövölték.

Igaz a kivágható/lentívűs vektorokkal létrehozott transzgénmentes iPSC-kben az aktív transzgén már nincsen jelen, azonban a sejtek genom-manipulációk által és a vektor által hátrahagyott rövid szekvencia részletet, ún. „footprint-et” még mindig tartalmazzák. Vagyis használatuk inkább a gyógyszertervezésben, betegségek modellezésében elterjedt, jövőbeli klinikai alkalmazásuk nem valószínű.

#### 2.4.3.2. Transzpozonnal történő plazmid alapú újraprogramozó rendszerek

Kaji et al. (2009) policisztronos lineáris plazmiddal, amely tartalmazta az OSKM szekvenciákat, egér embrionális sejteket programoztak vissza. A Cre/LoxP-rendszert felhasználva a pluripotencia vektor kivágható volt az iPSC-k genomjából. Azonban a transzgen kivágása után a legtöbb vonal differenciálódásnak indult, amelynek az oka feltételezhetően a sejtek részleges újraprogramozása volt, mivel az aktív transzgen eltávolítása után a pluripotens állapot fenntartására képtelenek voltak. Lineáris plazmid alapú újraprogramozásra humán sejtekben ez idáig nem volt példa, valószínűleg az egér sejteken is tapasztalt alacsony újraprogramozó hatékonyság miatt. A transzfekciós hatékonyság növelése céljából Kaji és munkacsoportja ugyanebben a közleményben PiggyBac (PB) transzpozon-alapú génbeviteli eljárást is tesztelt, amivel eredményesebb genom-integráció érték el, mint a linearizált plazmiddal, és így humán PB-iPSC vonalakat tudtak alapítani.

Az iPSC alapítás során a vírus felhasználás elkerülésére egy alternatív út lehet a transzpozon általi génbevitel. A transzpozonok olyan mobilis genetikai elemek, amelyek a transzpozáz enzim katalizációjával képesek kivágni/inszertálni a genom mentén. A transzpozon vektorok a bevinni kívánt DNS szekvencia 5' és 3' végén egy-egy „Terminal Inverted Repeat” (TIR) szekvenciát tartalmaznak, amihez a transzpozáz enzim kapcsolódni tud (VandenDriessche et al. 2009). Ezt a mechanizmust kihasználva genetikailag módosított transzpozonok, amelyek tartalmazzák a pluripotencia faktorokat, alkalmasak a sejtek újraprogramozására a transzpozáz expressziója mellett. Továbbá a sejtek genomjába stabilan beépült transzgenek eltávolíthatóak a transzpozáz enzim újraexpresszálásával. A kivágható lentivírussal bemutatott rendszerhez képest a transzpozon-transzpozáz általi transzgen-mentesített iPSC vonalak csak 1-2 bázispárt (SB: Sleeping Beauty) hagynak maguk után a genomban vagy akár „footprint”-mentesek a PB típusú vektoroknál a kivágást követően. Elsőként PiggyBac-alapú újraprogramozással két munkacsoport egér iPSC vonalak létrehozásáról számolt be, majd a transzpozáz újraexpresszálásával sikeresen transzgen-mentesítette azokat (Woltjen et al. 2009; Yusa et al. 2009). Woltjen et al. (2009) és Kaji et al. (2009) HFF-ből is iPSC-eket tudtak létrehozni PB-policisztronos újraprogramozó vektorral, azonban az egerben bemutatott transzgen-mentesítési eljárásra a humán iPSC-k esetén nem került sor. Az emlős sejtek transzgenéziséhez használt másik transzpozon a Sleeping Beauty, amely igen magas hatékonysággal bír. Az SB a halgenomból származó Tc1/mariner-eredetű fragmentumok rekonstrukciójából jött létre. (Ivics et al. 1997). Mács et al. 2009-ben az SB hiperaktív verzióját (SB100X) közölte, ami 100x-os transzpozíciós hatékonysággal bír emlős sejtekben az eredeti SB-hez képest. Az SB100x egy új és újszerű eljárás transzgenikus állatmodellek létrehozásában, különböző humán sejtek genetikai módosításában illetve

génterápiás eljárásokban (Izsvák et al. 2010; Ivics és Izsvák 2011; Hackett et al. 2010). Ezek mellett pedig az SB-vektorok használata egyszerű és költséghatékony. Az első SB-iPSC vonalat Muenthaisong et al. (2012) közölte egér embrionális fibroblaszt újraprogramozásával. Mind a PB- és SB-transzpozon-transzpozáz rendszerek iPSC-k alapításában hasznosak, mivel hatékonyságuk nem sokkal tér el a vírus-alapú génbeviteli eljárásoktól, azonban azokkal ellentétben vírus-mentes, egyszerű DNS-bevitelen alapulnak. Transzgén-mentesített iPSC vonalak létrehozásában szintén egyedülálló eljárást nyújthatnak a transzpozáz újraexpresszálása révén. Ismert, hogy a transzpozáz enzim hasonló hatékonysággal képes kivágni és újra-integrálni a transzgént, ami a transzpozon genom mentén való ugrálás fogja eredményezni („jumping effect”) (Wang et al. 2008; Li et al. 2013). A kontrollálatlan, ismételt transzpozíciók pedig nem kívánt „footprint”-eket és/vagy genetikai átrendeződéseket okozhatnak a sejtekben. A transzpozonok ezen ismert természete miatt, a kivágható/integratív iPSC alapításban egyelőre a lentivírus az elterjedt, a transzpozont alkalmazó eljárások továbbfejlesztésre szorulnak.

#### 2.4.4. Kémiai újraprogramozás

A kémiai úton történő újraprogramozással elméletben semmiféle genetikai módosításnak nem teszik ki a sejteket, éppen ezért a csak kis molekulákkal történő iPSC alapításra számos próbálkozás volt az elmúlt években a klinikai alkalmazás felé irányulva. Az adott kis molekulák speciális jelítési útvonalakra hatnak, amelyeknek a sejtek újraprogramozásában van szerepük. Két munkacsoportnak sikerült először iPSC vonalakat előállítaniuk csak egyetlen transzkripció faktor stabil integrációjával számos kismolekula használata mellett (Li et al. 2011, Zhu et al. 2010). Zhu et al. (2010) humán keratinocitákat programozott sikeresen vissza csak az *OCT-4* lentivírus transzdukciójával speciális kismolekulák kombinációjának adagolása mellett (A-38-01, PS48, Nárium butirát, Parnate, CHIR99021, PD0325901). Li et al. (2011) egér embrionális és felnőtt fibroblasztot tudott iPSC-vé újraprogramozni, hasonlóan csak az *Oct-4* lentivírus transzdukciója és négy kismolekulából álló keverék hozzáadása mellett (valproinsav, tranilcypromine, CHIR99021, 616452). Más csoport pedig nem integratív rendszerek és kismolekulák kombinációjával készített meg humán iPSC-eket létrehozni. Valamehr et al. (2014) az *OCT-4*, *SOX2* és *SV40LT*-t tartalmazó episzómális vektorral és kismolekulák kombinációjával (SMC4, Thiazovivin, PD0325901, CHIR99021, SB431542) transzgén-mentes humán iPSC vonalakat hozott létre. Nemrég Hou et al. (2013) sikeresen alapított egér iPSC vonalakat kizárólag kémiai úton, hét kismolekula felhasználásával (CHIR99021, 616452, Forskolin, DZNep, valproinsav, tranilcypromin, TTNPB), amely sejteknek a CiPS nevet adták. A kémiai újraprogramozással



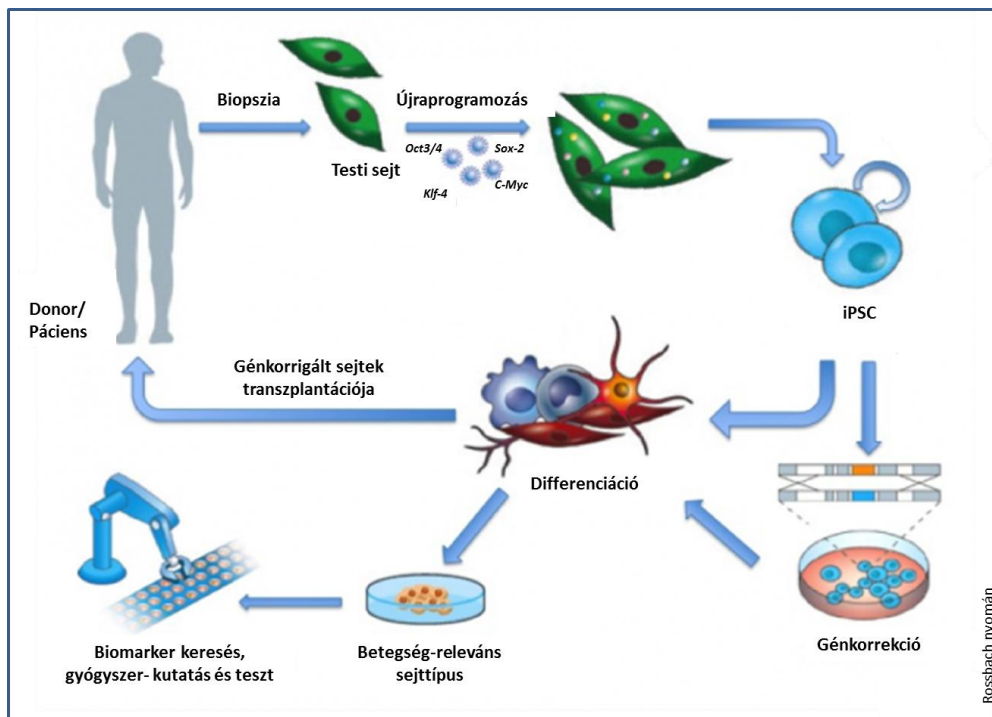
ugyan direkt genetikai módosítás nem történik, azonban számos molekulának nem ismert hatásai lehetnek. A hété alkalmazott kismolekulából négy már klinikai alkalmazásban elterjedt, azonban a másik három, illetve a molekulák együttes hatásának bővebb ismerete elengedhetetlen a rendszer esetleges távlati használatához.

## 2.5. Az iPSC vonalak jelentősége az állattenyésztésben

Habár az iPSC kutatások, azok gyógyászati jelentősége miatt főként humán modellen vagy laborállatokon zajlanak, az iPSC-k állatorvoslásban valamint az állattenyésztésben betöltött szerepe is említendő. Állatmodellekből létrehozott iPSC vonalak az őssejt alapú génterápiás eljárások tesztelésére lehetnek alkalmasak, amelyek értékes információval szolgálnak a humán gyógyászat számára, emellett terápiás alternatívát nyújthatnak az állatorvoslás számára is (Cebrian-Serrano et al. 2013). Az állattenyésztésben az iPSC technológia a transzgenikus haszonállatok előállításában járhat számos előnnyel a pluripotens őssejtek célzott módon történő genetikai módosításán keresztül. A módosított őssejteket embrionális környezetbe visszajuttatva ivarsejt kimérák hozhatóak létre (lásd: 2.1.5. bekezdés), amely állatok szaporításával a kívánt genetikai módosítás átadható az utódnemzedékbe. Azonban a haszonállat eredetű embrionális őssejt alapítás nem minden esetben sikeres, vagy a létrehozott sejtvonalak nem alkalmasak genetikai manipulációra és/vagy nem képesek kimérák formálására (Lu et al. 2012a). E problémák az iPSC-k alkalmazásán keresztül esetlegesen áthidalhatóak lesznek, mivel néhány olyan faj esetén sikerült már csíravonal-kompetens iPSC vonalakat létrehozni, ahol az embrionális eredetű őssejtekkel ugyanez kudarcot vallott (Koh és Piedrahita 2014). Sertésben számos iPSC vonal alapításáról számoltak már be betegségek modellezése céljából (Cebrian-Serrano et al. 2013), valamint West et al. (2010) és Fujishiro et al. (2013) iPSC sejtek által történő transzgenikus sertések előállítását közölte. Szarvasmarha iPSC vonalak sikeres alapításáról több kutatócsoport is beszámolt, ahol általában az OSKM faktorok mellett további faktorok bevitele volt szükséges stabil vonalak alapításához (Han et al. 2011). Az alapított vonalak jól szerepeltek *in vitro* és *in vivo* pluripotencia tesztekben, azonban kiméraféle formálási képességük további vizsgálatra szorul (Koh és Piedrahita 2014). iPSC-k előállításáról birkában is beszámoltak ahol a vonalak élve születő kimérákat formáltak, habár alacsony mértékű kimériszmust mutattak (Sartori et al. 2012; Liu et al. 2012). A madárfajokból történő iPSC alapításnak a transzgenikus állatok előállítása mellett fejlődésbiológiai tanulmányokban lehet jelentősége. Japán fűrjből származó primer sejtet programoztak újra egyesek a humán pluripotencia faktorok alkalmazásával, ahol az iPSC vonalak képesek voltak kimérák formálására (Lu et al. 2012b).

## 2.6. Az iPSC vonalak gyógyászati alkalmazása

A fenti fejezetek azt mutatták be, hogy az elsőként alapított pluripotens sejtek létrehozásáért (Hogan 1976), illetve az első genetikai újraprogramozási kísérletektől (Briggs és King 1952; Gurdon et al. 1958; Miller és Ruddle 1976), hogy jutott el a tudomány az indukálható pluripotens vonalak létrehozásáig (Takahashi és Yamanaka 2006). Továbbá hogy hogyan fejlődött az iPSC alapfais technológia napjainkig a klinikai alkalmazás felé irányulva, kitérve arra is, hogy mely technikai lépések szorulnak további fejlesztésre. Ahhoz hogy az iPSC-k sejt- illetve gén-terápiás gyógymódkban ténylegesen alkalmazhatóak legyenek, az iPSC alapfais kidolgozása mellett a kutatókra még nagyon sok nyitott kérdés megválaszolása vár. Azonban az iPSC-k a gyógyászat számára már napjainkban is igen nagy hasznót jelentenek (Kim 2014), elsősorban a betegségek modellezésében, új gyógyszerek felfedezésében, gyógyszertervezetekben és egyéb terápiás lehetőségek feltárásában, mivel bizonyos betegséget hordozó páciensek sejtjeinek újraprogramozásával ún. betegség-specifikus iPSC vonalakhoz juthatunk. A betegség-specifikus iPSC vonalak számos igen fontos alternatív alkalmazási lehetőséget kínálnak, amelyeket folyamatában a **3. ábra** mutat be.



**3. ábra**  
Betegség-specifikus iPSC-k alkalmazása

A betegségek modellezésére hagyományosan az állatmodellek vagy a sejtes rendszerek terjedtek el. Ezekkel szemben a betegség-specifikus iPSC vonalak előnye például az állatmodellekhez képest, hogy a humán betegségek humán sejteken tanulmányozhatóak. A betegségmokkélként eddig alkalmazott sejtes rendszerekhez képest pedig jelentőségét az iPSC-k pluripotens állapota adja, mivel azok differenciációjával a betegség által érintett bármilyen sejt típus létrehozható (3. ábra). Ennek olyan humán betegségeknek is van jelentősége ahol az érintett sejt-/szövet típus nem áll rendelkezésre (például központi idegrendszer sejtjei). Továbbá egyes betegségek esetén annak patofiziológiája, a tünetek kialakulása, előrehaladása is tanulmányozható a betegséget hordozó élő sejteken. A betegségek modellezése mellett az iPSC-kből differenciáltott betegség által érintett sejt típusokon új betegség markerek, diagnosztikai lehetőségek dolgozhatóak ki, valamint gyógyszerek tesztelhetőek. A gyógyszertervezetekhez szükséges nagymennyiségű akár pluripotens/multipotens/differenciált sejt típusok pedig korlátlan mennyiségben előállíthatóak (3. ábra). Továbbá a betegség-specifikus iPSC-k funkcionalitása is tesztelhető állatkísérletekben. Mindezeket az előnyös tulajdonságokat szembe véve az iPSC rendszer a betegségmokkél területén mindenképpen egy egyedülálló lehetőséget kínál (Marchetto és Gage 2012).

Ahhoz, hogy az iPSC-k klinikailag biztonságosak legyenek, számos kutatócsoport dolgozik az iPSC újraprogramozási stratégia fejlesztésén (lásd: 2.4. bekezdés), illetve a létrehozott vonalak validálási módszerein. Ezekkel a kutatókkal párhuzamosan egyesek az iPSC mint gátherápiás lehetőség felíranyulva végeznek kísérleteket, a lehetséges eljárások megismerése és kidolgozása céljából (Diecke et al. 2014a). Ezzel a módszerrel egy genetikai alapú betegséggel rendelkező páciens testi sejtjeit újraprogramozva, a mutáció *in vitro* körülmények között kerülne korrekcióra, és már a korrigált pluripotens- vagy differenciált sejt típusai kerülhetnének visszaültetésre (3. ábra). Elméletben, ha a páciens saját sejtje kerülne transzplantációra, akkor a hoszt vs. graft, graft vs. hoszt betegségekkel nem kellene számolni, illetve a betegekre nézve igen kockázatos immunizálási eljárás is elkerülhető volna. Génkorrekció céljából a homológ rekombinációs módszer, amely hagyományosan elterjedt, azonban emellett az elmúlt években a génkorrekció hatékony és precíz elvégzéséhez különböző irányított gémnipulációs eljárások is kidolgozásra kerültek. Például a cink-ujj nukleáz (ZFN: Zinc Finger Nuclease) alkalmazásával (Händel és Cathomen 2011) Hemofilia B-t okozó mutációt tudták korrigálni *in vivo* (Li et al. 2011), míg mások ugyanezzel a rendszerrel például HIV betegség esetén állítottak elő mutáció-korrigált sejt vonalakat (Holt et al. 2010; Perez et al. 2008). Újabban a ZFN-nél kevésbé toxikus (Sun és Zhao 2013), irányított gémódosító eljárások kerülnek előtérbe, amelyek az ún. TALEN (Transcription Activator-Like Effector) (Hockemeyer et al. 2011) és CRISPR/Cas (CRISPR: Clustered

Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas: CRISPR-Associated protein) rendszerek (Gaj et al. 2013) alkalmazására épülnek.

Azonban az iPSC *in vitro* modellnek tekinthető, a betegségek *in vivo* fenotípusának tanulmányozására nem alkalmas. Erre a célra továbbra is állatmodellek használata elengedhetetlen fontosságú, így az iPSC általi betegség modellezés valószínűleg nem azok helyett, hanem inkább azzal együtt lesz hasznos az orvos biológiai kutatások számára (Marchetto és Gage 2012; Kim 2014).

### 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

#### 3.1. Az iPSC-k generálásához kapcsolódó standard eljárások

A kísérletekhez használt vegyszereket a Sigma-Aldrich (St Louis, USA), illetve minden sejtenyésztő reagenst a Life Technologies (Carlsbad, USA) cégektől szereztünk be (az ettől való eltérést külön említjük).

A kísérletekhez használt állatok kezelésére vonatkozó eljárásokat az illetékes Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság (MÁB) és a Pest Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság, mint illetékes hatóság hagyta jóvá.

A felhasznált oldatok és tenyésztő médiumok készítését a Mellékletek 9.2-es pontjában részleteztem (szövegben dőlt betűvel és szögletes zárójelbe foglalt számozással jelölve).

##### 3.1.1. Sejttenyésztés

A sejteket ún. sejtenyésztő inkubátorban, 37 °C-on, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> szint mellett tenyésztettük.

###### 3.1.1.1. Egér sejtenyésztés

A primer MEF-et egér embrióból izoláltuk a standard protokoll alapján (Robertson 1987) majd *Fibroblaszt-máliumban* [1] tenyésztettük azokat. A primer MEF sejteket használtuk fel az egér iPSC-k generálásához. Szintén MEF-et (korai passzázsú: P3) használtunk a tápláló sejtréteg-függő tenyésztéshez, amihez a MEF-et előzőleg Mitomycin C-vel (MitC) kezeltük.

Az egér ESC (mESC) és miPSC-ket *mESC-máliumban* [2], MitC-vel kezelt tápláló sejtrétegen vagy 0,1%-os zselatinon tenyésztettük. A standard eljárásnak megfelelően, az osztódó sejteket 2-3 naponta passzáztuk, amikor azok elérték a 70-80%-os konfluenciát. A passzázás napján a sejtekről eltávolítottuk a médiumot, majd foszfátpufferes (PBS: Phosphate Buffered Saline) mosást követően 0,05%-os tripszin-Etilén Diamin Tetraecetsavval (EDTA) 37 °C-on 3 percig inkubáltuk azokat. Amikor a sejtek a felszíntől kezdtek elválni a tripszin hatására *mESC-máliummal* [2] neutralizáltuk. A sejteket tartalmazó médiumot egy 15 ml-es centrifugacsőbe gyűjtöttük és sejtuszpenziót készítettünk. Ezt követően a szuszpenziót centrifugáltuk (1000 rpm, 3 perc, szobahőmérséklet (RT: Room Temperature); Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf, Németország) és a felülúszót eltávolítottuk. A sejt pelletből

*mESC-médiával* [2] sejtszuszpenziót készítettünk majd a szükséges méretű tenyésztőedényekbe újra szétosztottuk azt (Nagy et al. 1993).

Az iPSC alapfási kísérletekben kontrollként minden esetben az azonos genetikai háttérű egé ESC vonalakat alkalmaztuk, amely vonalakat laboratóriumunkban alapították. A vonalak pluripotencia jellemzését a mellékletek **M1. ábrája** mutatja be.

### 3.1.1.2. Humán sejtenyésztés

A humán iPSC-eket kétféle körülmény között tenyésztettük: tápláló sejtréteg-függő vagy tápláló sejtréteg-mentesen. Az osztódó sejteket 5-7 naponta passzítottuk. **A tápláló sejtréteg-függő** tenyésztés során a passzálást kétféle módon végeztük, enzimatikus vagy mechanikus módon. Az enzimatikus módszer esetén a passzálást akkor végeztük, amikor a tenyészet elérte a 70-80%-os konfluenciát. A passzálás napján a sejtekről eltávolítottuk a médiomot, majd PBS-es mosást követően TrypleE select-el 37 °C-on 3 percig inkubáltuk azokat. Amikor a sejtek a felszíntől elkezdtek elválni szuszpenziót készítettünk és azt egy 15 ml-es centrifugacsőbe gyűjtöttük, amely olyan mennyiségben tartalmazott PBS-t, hogy az a TrypleE select-et 1/10 arányba hígítsa ki. Ezt követően a szuszpenziót centrifugáltuk (1000 rpm, 3 perc, RT; Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf, Németország) és a felülszót eltávolítottuk. A sejtpelletből *hESC-médiával* [3] sejtszuszpenziót készítettünk majd a szükséges méretű tenyésztőedényekbe újra szétosztottuk azt. Mechanikus módszer esetén az iPSC vonalakat az ún. „cut and paste” eljárással passzítottuk. Az esetlegesen differenciálódott kolóniarészeket mikroszkóp (OLYMPUS SZX9 Stereo Microscope, OLYMPUS, USA) alatt steril injekciós tűvel (18G) kivágtuk, majd a tű hegyével a felszíntől elválasztottuk. Ezt követően a médiomot eltávolítottuk a sejtekről és friss médiomot adtunk hozzájuk. Mikroszkóp alatt steril injekciós tűvel (18G) az egyes kolóniákat 12-16 részre vágtuk fel. A kolónia darabkákat a manuális pipettára (50-200 µl) illesztett pipetta hegygel választottuk el a felszíntől. A kolóniadarabkákat tartalmazó médiomot összegyűjtöttük majd megfelelő méretű tenyésztőedényekbe újra szétosztottuk azokat.

**Tápláló sejtréteg-mentesen** a humán iPSC-eket Matrigel-en (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) mTeSR-ben (Stem Cell Technologies, Vancouver, Kanada) a gyártó előírásának megfelelően tenyésztettük.

### 3.1.2. Lentivírus előállítás

A lentivírus előállításához  $3-4 \times 10^6$  HEK293T sejtet, 40 µg expressziós plazmival, 16 µg “envelope” VSV-G plazmival (Addgene, Cambridge, USA; plazmid szám: 12259), 8 µg “packaging” gag-pol plazmival (Addgene, Cambridge, USA; plazmid szám: 12251; Dull et al. 1998) és 8 µg “packaging” Rev plazmival (Addgene, Cambridge, USA; plazmid szám: 12253; Dull et al. 1998) ko-transzfektáltunk kalcium-foszfátos transzfektációs eljárással (Kingston et al. 2001). Két és három nappal a transzfektációt követően a vírust tartalmazó felülúszót összegyűjtöttük, 0,22 µm-es membránszűrővel szűrtük és használatig  $-80^\circ\text{C}$ -on tároltuk.

### 3.1.3. AP-festés

A sejteket minimum 48 óra keresztül 0,1% zselatinnal fedett üveg fedőlemezen tenyésztettük szokványos tenyésztőmédiumban. Ezt követően a sejteket PBS-el mostuk, majd 4% paraformaldehiddel (PFA) fixáltuk (20 perc, RT). A festéshez a fixált sejteket *Mosó-pufferrel* [4] mostuk, ezt követően *Alkalikus foszfát-oldattal* [5] 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk azokat, majd kétszer ismét mostuk *Mosó-pufferrel* [4]. A festést inverz mikroszkóp (OLYMPUS IX71 Inverted Microscope, OLYMPUS, USA) segítségével vizsgáltuk.

### 3.1.4. ICC-festés

Sejtfelszíni markerek vizsgálatakor a sejteket élő (*in vivo*) állapotban festettük, ahol az ICC-festésnél máskor alkalmazott fixálási és permeabilizációs lépést (lásd alább) kihagytuk és az elsődleges ellenanyagokat a sejtenyésző médiumba tettük 1/50 hígítási arányban majd 30 percig inkubáltuk  $37^\circ\text{C}$ -on. Ezt követően a sejteket 2 alkalommal PBS-el mostuk, majd szintén a tenyésztő médiumban hígítottuk a másodlagos ellenanyagokat 1/100 arányban és újabb 30 percig inkubáltuk  $37^\circ\text{C}$ -on a sejteket. A másodlagos ellenanyagot eltávolítottuk, 2x mostuk a sejteket PBS-el majd tenyésztő médiumban, fluoreszcens mikroszkóp (OLYMPUS IX71 Inverted Microscope, OLYMPUS, USA) alatt detektáltuk és fényképeztük a kapott fluoreszcens festődést.

Az *in vitro* ICC-festéshez a sejteket 4% PFA-val fixáltuk (20 perc, RT). Ezek után a sejteket 0,1% Triton X-100-t tartalmazó PBS-el permeabilizáltuk (5 perc, RT). A membrán markerek esetében a sejtek nem kerültek permeabilizálásra. Ezt követően a sejteket 1 óra keresztül 5%-os szarvasmarha szérumalbumint (BSA: Bovine Serum Albumin) tartalmazó PBS-el blokkoltuk, majd az elsődleges ellenanyagokkal inkubáltuk azokat ( $4^\circ\text{C}$ , egy éjszaka)

á). Másnap, háromszoros PBS mosást követően az elsődleges antitestek a megfelelő másodlagos antitestek hozzáadásával váltak láthatóvá az azokkal való kétfázisú inkubáció (RT) elteltével. Végezetül a magfestéshez a sejteket DAPI-val (4',6-diamidino-2-phenylindole; 0,2 µg/ml végkoncentráció) inkubáltuk (20 perc, RT). A használt elsődleges és másodlagos ellenanyagok listáját az **M1. táblázat** tartalmazza. A sejteket a 3D képkalkáló modullal (ApoTome, AxioImager rendszer, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Németország) elemeztük, és a gyártó AxioVision 4.8.1. programjával analizáltuk (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany).

### 3.1.5. RT-PCR

A PCR reakcióban használt primerek nukleotid szekvenciájának megfelelő megválasztásával elkülöníthetők egymástól az exogén- (újraprogramozás során kívülről bevitt), illetve az endogén- faktorok (a sejt eredeti génállományában meglévő és az újraprogramozás során a sejtben aktiválódó saját pluripotencia gének) expressziója.

A tenyésztett sejtekből az össz-RNS-t RNS izoláló kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével a gyártó előírásának megfelelően izoláltuk. 1 µg RNS-t Superscript Vilo kit segítségével írtuk át cDNS-é, a gyártó protokolljának megfelelően. Az RT-PCR reakcióhoz a GoTaq Hot Start Green Master Mix-et (Promega, Madison, USA) használtuk és a gyártó protokolljának megfelelő reakció paramétereket követtük. Az RT-PCR-ekhez alkalmazott primerek listáját a **3. táblázat** tartalmazza. A PCR termék méretét gél elektroforézissel detektáltuk, amelyhez etídium bromid tartalmú 1%-os agaróz gélt használtunk.

### 3. táblázat

Az pluripotenciát igazoló RT-PCR-ekhez alkalmazott primerek listája

Egér RT-PCR primerek	Forward	Reverz
Endogén (Woltjen et.al. 2009)		
<i>Oct-4</i>	CCAACGAGAAGAGTATGAGGC	CAAAATGATGAGTGACAGACAGG
<i>Sox2</i>	TCTGTGGTCAAGTCCGAGGC	TTCTCCAGTTCGCAGTCCAG
<i>Klf4</i>	GGCGAGAAACCTTACCACTGT	TACTGAACTCTCTCCTGGCA
<i>c-Myc</i>	TCAAGCAGACGAGCACAAGC	TACAGTCCCAAAGCCCCAGC
<i>Nanog</i>	CCTCCAGCAGATGCAAGAA	GCTTGCACTTCATCCTTTGG
<i>Rex1</i>	GGAAGAAATGCTGAAGGTGGAGAC	AGTCCCCATCCCCTTCAATAGC
<i>Dax1</i>	TGCTGCGGTCCAGGCCATCAAGAG	GGGCACTGTTCAAGTTCAGCGGATC
<i>Foxd3</i>	AGGTCTGACCCCAACAAG	AGCGCGATGTAAGAGTAGGG
<i>Fbxo15</i>	TGCCAATTGTGGGAGTACA	CAGATGAGCCTCTAACAACTACTTC
<i>Eras</i>	GCCCCTCATCAGACTGCTAC	GCAGCTCAAGGAAGAGGTGT
<i>Gapdh</i>	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA



### 3.1.6. Genomiális DNS izolálása

A begyűjtött sejt pelletet 3 ml *L* *his*-pufferben [6] szuszpendáltuk fel. A mintákhoz 10% (v/v) SDS-t és 0,5 ml *Proteináz K*-oldatot [7] adtunk és 37 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk. A következő napon 3 ml 5M-os NaCl és 3 ml steril MilliQ víz hozzáadását követően a mintákat centrifugáltuk (3000 rpm, 15 perc, RT; Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf, Németország). Ezek után a felülúszóhoz kétfogat abszolút etanolt adtunk. A DNS szárok összegyűjtését követően a mintát steril MilliQ vízben vagy 1x Tris-EDTA (TE) pufferben szuszpendáltuk fel.

Nagyszánú minta izolációja esetén egy genomiális DNS izoláló Kit-et (Qiagen, Hilden, Németország) használtunk a gyártó előírásainak megfelelően, a mintákat pedig -20 °C-on tároltuk.

### 3.1.7. Áramlási citometria

A 70-80%-os konfluenciájú sejteket a standard passzási eljárásnak (3.1.1.1. bekezdés) megfelelően disszociáltuk. Az így kapott sejtsuszpenziót PBS-es mosást követően 4%-os PFA-val fixáltuk (20 perc, RT), majd centrifugáltuk (3000 rpm, 3 perc, RT; Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf, Németország). A felülúszó eltávolítása után a sejteket PBS-el mostuk, majd ismét centrifugáltuk az előbbi paraméterekkel. A felülúszó ismételt eltávolítása után a sejteket PBS-ben szuszpendáltuk fel majd mértük áramlási citometriával (FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting). A mérésekhez a FC-500 Flow citométert (Beckman Coulter, California, USA), az eredmények analíziséhez pedig a CXP analysis programot alkalmaztuk.

### 3.1.8. Southern blot analízis

A Southern blot analízishez a genomiális DNS-t a klasszikus fenol-kloroform alapú módszerrel izoláltuk (Davis et al. 2009). A genomiális DNS-t (10-15 µg) a megfelelő enzimmal emésztettük (egy éjszakán át), majd gőlelektroforézist követően Hybond-N+ Nylon membránra (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) vittük fel. A próba hibridizációhoz és detektálásához a DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II-t (Roche, Bazel, Svájc) alkalmaztuk, a gyártó által javasolt protokollnak megfelelően. A kapott eredményt az ImageQuant 350 imager-el vizualizáltuk az ahhoz kapcsolódó szoftverrel (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

### 3.1.9. Az iPSC-k spontán differenciációjának *in vitro*

#### 3.1.9.1. A miPSC-k *in vitro* spontán/kardiális differenciációjának

Az egér ESC/iPSC-k spontán differenciációjának iniciációs lépése a sejtek szuszpenzióban történő tenyésztése, mely során EB-k képződnek. Az iPSC-kből az EB-ket a HD módszerrel állítottuk elő. Ehhez az ESC-ket a standard passzási eljárásnak megfelelően disszociáltuk (3.1.1.1. bekezdés). A létrejött sejtuszuszpenziót 800 sejt/20 µl sejtszámra állítottuk be, *Egér differenciációs-médiumban [8]*, majd bakteriális Petri-csészék tetejére pipettáztunk 20 µl-es cseppekben. A tenyésztő edény aljába PBS-t töltöttünk, a függőcseppek kiszáradásának megelőzése érdekében. A Petri-csészék lefordításával a cseppekben a sejtek aggregátumokká állnak össze a gravitáció segítségével (0. Nap, a kihelyezés napja). A differenciáció második napján (2. Nap) az EB-ket 24-lyukú tenyésztőedényekbe tettük ki (1 EB/well), amely 0,1% zselatinnal bevont üveg fedőlemezt tartalmazott. A *differenciációs-médiomot [8]* minden második nap lecseréltük, és a spontán kontrakciót mutató sejtsomók számát folyamatosan feljegyeztük. A sejtsomókat a differenciáció 14. és 21. napján 4% PFA-val fixáltuk ICC-festésekhez.

#### 3.1.9.2. A humán iPSC-k *in vitro* spontán differenciációjának

A humán sejtek spontán differenciációjának iniciációs lépése szintén a sejtek szuszpenzióban történő tenyésztése. Ehhez a sejteket azok szokásos passzálsát követően alacsony tapadási (low cell binding, Nunc, Waltham, USA) Petri-csészékben tenyésztettük 5 napig mTeSR médiumban. Minden második nap a sejteken médiomot cseréltünk. Ötödik nap (5. Nap) az EB-t zselatinozott fedőlemezzre, *Humán differenciációs-médiumba [9]* tettük ki (1-3 EB/cm<sup>2</sup>). A 14. napon (14. Nap) a sejteket 4% PFA-val fixáltuk (20 perc, RT) a későbbi ICC-festésekhez a 3 csírvonalra jellemző ellenanyagokkal (**M1. táblázat**).

### 3.1.10. A miPSC-k irányított *in vitro* neurális differenciációjának

A neurális differenciációt Klincumhom et al. (2012) által közölt protokoll alapján végeztük. Az EB-ket a sejtuszuszpenziós módszerrel állítottuk elő. Az EB-ket 0,25% tripszin-EDTA-val disszociáltuk és  $45 \times 10^5$  sejtet 15 ml *Egér differenciációs-médiumban [8]* tettünk ki egy 10 cm-es bakteriális Petri-csészébe ( $0,75 \times 10^5$  sejt/cm<sup>2</sup>). A Petri-csészéket 2-hydroxyethyl methacrylate-al (2-HEMA, végkoncentráció 10 mg/ml) vontuk be, amely megelőzte a sejtek felülethez való letapadást. A sejteket 8 napig tenyésztettük szuszpenzióban és a médiomot kétnaponta cseréltük. A negyedik naptól retinsavat adtunk a médiumhoz 5 µM végkoncentrációban. A differenciáció 8. napján az EB-ket 0,25% tripszin-EDTA-val

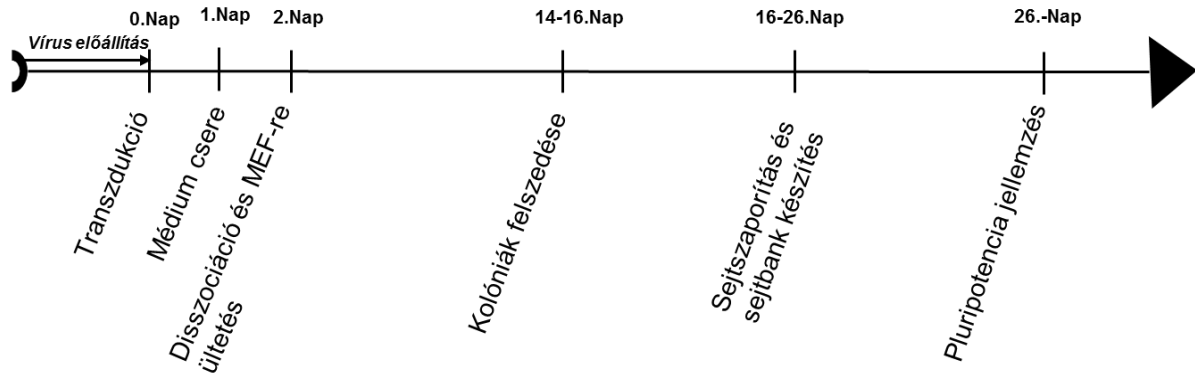
disszociáltuk és a sejtszuspenzióból  $2 \times 10^5$  sejt/cm<sup>2</sup> tettünk ki fedőlemezt tartalmazó 24-lyukú tenyésztőedényekbe (ICC-festéshez), vagy 6-lyukú tenyésztőedényekbe (FACS-hoz) *Egér neurális-máriumA-ban* [10]. A tenyésztőedényeket előzőleg 0,01% poly-L-ornithin-el (37 °C, egy éjszakán át) és 1 µg/cm<sup>2</sup> laminin-el vontuk be. A differenciáció 10. napjától a máriumot *Egér neurális-máriumB-re* [11] cseréltük és a sejteket a differenciáció végéig ebben tenyésztettük. A sejteket a differenciáció 10-, 12- és 14.-ik napján 4% PFA-val fixáltuk. A sejteken βIII-TUBLIN és NESTIN ICC-festést végeztünk (M1. táblázat). A NESTIN-el jelölt sejtek neurális irányú elköteleződését a fluoreszcens mikroszkópia mellett FACS-al ellenőriztük. Az eredmények három független kísérletet foglalnak magukba.

### 3.1.11. Kiméra állat létrehozása miPSC-kből

A sejtek előkészítése az injektáláshoz a standard tenyésztési eljárástól nem tért el (3.1.1.1 bekezdés). A passzással disszociált sejteket 1 ml *Fibroblaszt-máliumban* [1] szuszpendáltuk fel és az injektálásig jégen tartottuk. A kiméra állatok létrehozása hályagcsra állapotú embriók (E3.5) mikroinjektálásával (PrimeTech, Ibaraki, Japán) történt, amely során 10-15 sejt/embrió került injektálásra (Kawase et al. 2001). A befogadó embrió a C57BL/6xDBA/2J hibrid és C57BL/6 genetikai háterű miPSC vonalak esetében ICR, az ICR-miPSC vonalak esetében pedig C57BL/6xDBA/2J volt. Az éve születtő kimérák szünet feljegyeztük. A csávonal transzmissziójára a kimérák párosításból születtő utódok szörszíne utalt.

### 3.2. Különböző genetikai háttérű egér miPSC vonalak létrehozása lentivírus transzdukcióval

A lentivírus-mediált egér iPSC (L-miPSC: Lentivirus-mediated mouse iPSC) vonalak alapfája a **4. ábrán** illusztrált kísérleti elrendezés alapján történt.



**4. ábra**  
Az L-miPSC vonalak alapításának kísérleti elrendezése

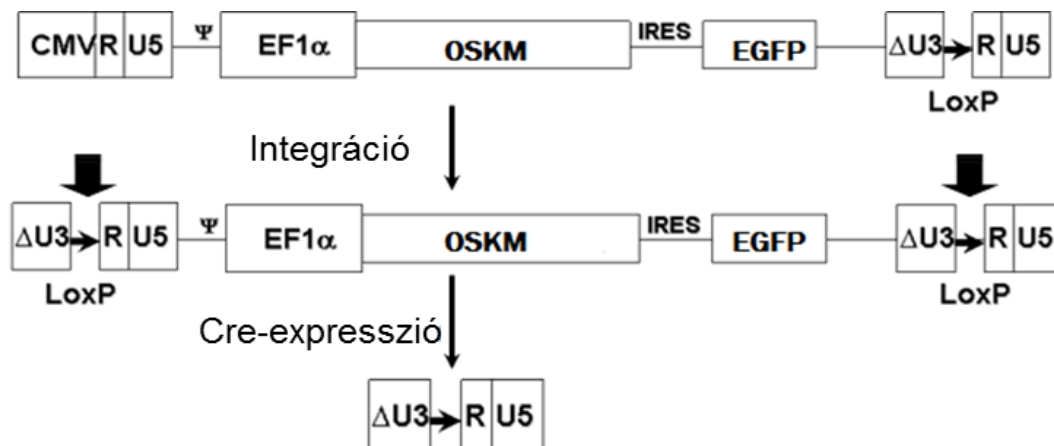
#### 3.2.1. Alkalmazott egértörzsek

A kísérletek során három különböző genetikai háttérű egértörzset alkalmaztunk, amelyek a következők voltak: C57BL/6 (beltenyészett), C57BL/6xDBA/2J (hibrid) és ICR (nem-beltenyészett), továbbiakban BL6, F1 és ICR-ként jelölve.

#### 3.2.2. Egér OSKM lentivírus plazmid

A MEF újraprogramozáshoz lentivírus plazmidot hoztunk létre, amely az újraprogramozást követően kivágható volt, lehetőséget nyújtva így módon transzgen-mentes L-miPSC vonalak alapfásához. Az IRES szekvenciát az ún. FUGW (flap-Ub promoter-GFP-WRE; Addgene, Cambridge, USA; plazmid szám: 14883; Lois et al. 2002) plazmidba illesztettük be a javított zöld fluoreszcens fehérje (EGFP: Enhanced Green Fluorescens Protein) szekvencia elé. Az UbC promotert az „Elongation Factor 1-alpha” (EF1 $\alpha$ ) promoterre cseréltük ki, amelyet a pEF-GFP (Addgene, Cambridge, USA; plazmid szám: 11154; Matsuda et al. 2004) plazmidból klónoztuk ki. Ahhoz, hogy a létrehozott vektor a genomtól kivágható legyen, egy LoxP szekvenciát ligáltunk a 3' LTR BspE1 hasfési helybe. Végül pedig a FUGW-OSKM (Addgene, Cambridge, USA; plazmid szám: 20328; Carey et al. 2009) plazmidból, amely az egér *Oct-4*, *Sox2*, *Klf4* és *c-Myc* cDNS szekvenciákat tartalmazta, 2A peptid szekvenciák által elválasztva, ezt az mOSKM kazettát vágtuk ki és ligáltuk az EcoRI hasfési helybe az EF1 $\alpha$  promóter után. Így módon létrehoztunk egy lentivírus alapú,

kivágható, polycisztronos újraprogramozó plazmidot, amelyet pF-EF1 $\alpha$ /OSKM/IRES/EGFP-W-nek neveztünk el (5. ábra).



5. ábra

**Egér újraprogramozó lentivírus plazmid.** A polycisztronos újraprogramozó vektor sematikus ábrázolása (pF-EF1 $\alpha$ /OSKM/IRES/EGFP-W), amely tartalmazza az egér pluripotencia cDNS szekvenciákat (mOSKM) és az EGFP riportert. A konstrukt egy LoxP (vastag fekete nyilak) helyet is magába foglal, amely lehetővé teszi az integrálódott vektor eltávolítását a Cre-plazmid transziens transzfekciója által. Jelölések: CMV, cytomegalovírus promóter;  $\Psi$ , packaging signal; EF1 $\alpha$ , Elongation factor 1-alpha; OSKM, OCT-4, SOX2, KLF4, C-MYC; IRES, Internal Ribosome Entry Site,  $\Delta$ U3, deleted U3 régió.

### 3.2.3. Egér sejtek lentívírustal történő transzdukciója

A vírus transzdukcióhoz  $3 \times 10^4$  MEF-et ültettünk ki ( $0,75 \times 10^4$  sejt/cm<sup>2</sup>) egy 24-lyukú tenyésztőedény 2 lyukába együttesen (2w/24wp) *Fibroblaszt-médiumban* [1] a transzdukció reggelén. A transzdukció után, a vírusot tartalmazó felüliszót 1 ml *mESC-médiumbal* [2] hígítottuk ki és 8  $\mu$ g/ml víruskoncentrációban polibrént adtunk hozzá. Az MOI 2 és 5 között volt. A MOI számítása a következő volt: vírus mennyiség (ml) x vírus titer (TU/ml) / sejtszám. A transzdukciót követő 24 órával a médiomot lecseréltük és a sejteket további 24 óráig tenyésztettük. Ezt követően a MEF-et tripszin-EDTA-val disszociáltuk és a két lyukból származó sejtmennyiséget egyetlen MitC-vel kezelt MEF réteggel fedett 10 cm-es tenyésztőedénybe tettük *mESC-médiumban* [2]. A médiomot naponta cseréltük a sejteken. A megjelent EGFP pozitív ESC-szerű kolóniákat fluoreszcens mikroszkóp alatt (OLYMPUS CKX41 Stereo Microscope, OLYMPUS, USA) egyesével felszedtük. A további analízishez és az EGFP expressziós szint FACS mérésekhez a klónokat felszaporítottuk.

### 3.3. Transzgén-mentes miPSC vonalak létrehozása lentivírus transzdukcióval

#### 3.3.1. A Cre-plazmid expressziója és a transzgén kivágásának igazolása

Az iPSC-eket a szokásos passzással disszociáltattuk és  $2 \times 10^6$  sejtet  $400 \mu\text{l}$  *Mosó-pufferben* [4] felfuszpendeltünk és 0,4 cm-es elektróda távolságú elektroporációs küvettkébe töltöttünk. A 40  $\mu\text{g}$  cirkuláris Cre-expresszó plazmidot (pTriEx-HTNC; Addgene plazmid szám: 13763; Peitz et al. 2002)  $400 \mu\text{l}$  *Mosó-pufferben* [4] elő-inkubáltunk (10 perc, 37 °C), majd az előkészített sejtszuszpenzióhoz adtuk. Az elektroporációt Gene Pulser® II Elektroporációs rendszerrel végeztük a következő beállításokkal: 240V, 500mF és  $R=\infty$ . Az elektroporációt követően a küvettkéket 20 percig jégen inkubáltuk, majd a sejtszuszpenziót  $400 \mu\text{l}$ -enként 6 cm-es ( $0,1 \times 10^6$  sejt/ $\text{cm}^2$ ) MitC-MEF-el fedett tenyésztőedényekbe tettük ki *mESC-médium* [2] hozzáadásával. Két nappal a transzfekciót követően a sejteket a szokásos passzási eljárással disszociáltattuk (3.1.1.1. bekezdés) és 200 sejtet 0,1% zselatinnal fedett 10 cm-es tenyésztő edénybe tettünk. Az EGFP negatív kolóniákat fluoreszcens mikroszkóp alatt (OLYMPUS CKX41 Stereo Microscope, OLYMPUS, USA) egyesével felszedtük és felszaporítottuk 0,1% zselatinon FACS analízishez és MEF rétegen a további kísérletekhez.

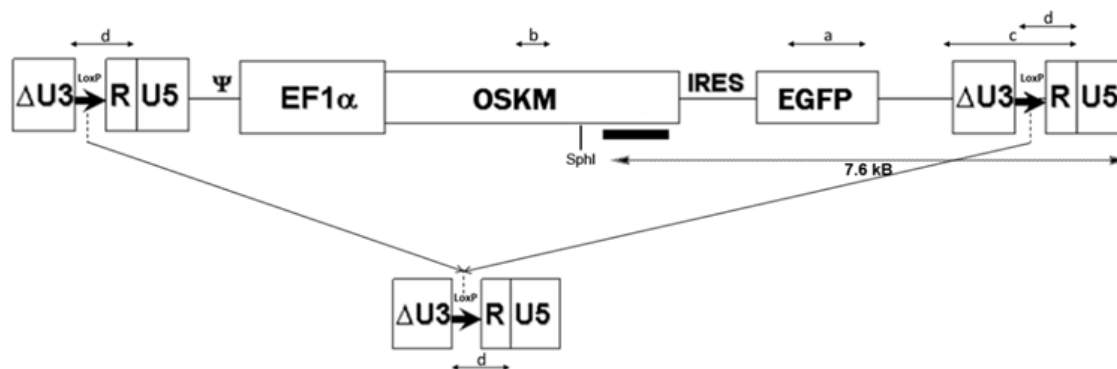
A transzgén jelenléte/hiányát PCR reakcióval erősítettük meg, ahol a primerek az újraprogramozó vektorra voltak specifikusak. A PCR reakciókat egy ún. "3 primer-alapú módszerrel" ("three primer-based method") is elvégeztük (Voelkel et al. 2010), ahol a **4. táblázatban** megjelölt c és d primer kombinációkat egy reakcióban használtuk (ahol a reverz primerek azonosak). A PCR reakciókhoz a  *$\beta$ -actin* géntervezett primer szekvenciákat használtuk belső kontrollként. A primer szekvenciákat és a várható PCR termékek méretét a **4. táblázatban** soroltuk fel. A PCR reakciókhoz a GoTaq® Green Master Mix-et (Promega, Madison, USA) használtuk, és a gyártó protokolljának megfelelő reakció paramétereket követtük. A PCR termékméretét gél-elektroforézissel detektáltuk, amelyhez etídium bromid tartalmú 1%-os agaróz gélt használtunk.

Emellett a transzgén jelenléte/hiányát Southern blot analízissel is igazoltuk, amihez a genomias DNS-t a SphI enzimmel emésztettük és a *c-Myc* szekvenciára illeszkedő (1305 bp) próbát használtuk. Kontrollként egy ESC vonalat használtunk, ahol csak az endogén *c-Myc* detektálható voltunk (2,6 kB). A **6. ábra** az újraprogramozó vektort ábrázolja kivágás előtti és utáni állapotban, amin a PCR reakciókban felhasznált primereket, valamint a Southern blot analízishez alkalmazott próbát elhelyezkedését is feltüntettük.

**4. táblázat**

Az L-miPSC vonalakban a transzgén jelenlétét/hiányát igazoló PCR primerek listája

L-miPSC, PCR primerek	Forward	Reverz
<i>β-actin</i> (85 bp)	TTCACCTGCCCTGAGTGTTC	TGAAGGTCTCAAACATGATCTGTAGA
a (475 bp)	AAGTTCATCTGCACCACCG	TGCTCAGGTAGTGGTTGTCG
b (400 bp)	GGCGAGAAACCTTACCACTGT	GATAGAAATTCTTCTCCTCGTCGC
c (686 bp)	CGAGTCGGATCTCCCTTTGGGC	GCTCTCTGGCTAACTAGGGAACC
d (137 bp)	CACATGGCCCGAGAGCTGCAT	GCTCTCTGGCTAACTAGGGAACC



**6. ábra**

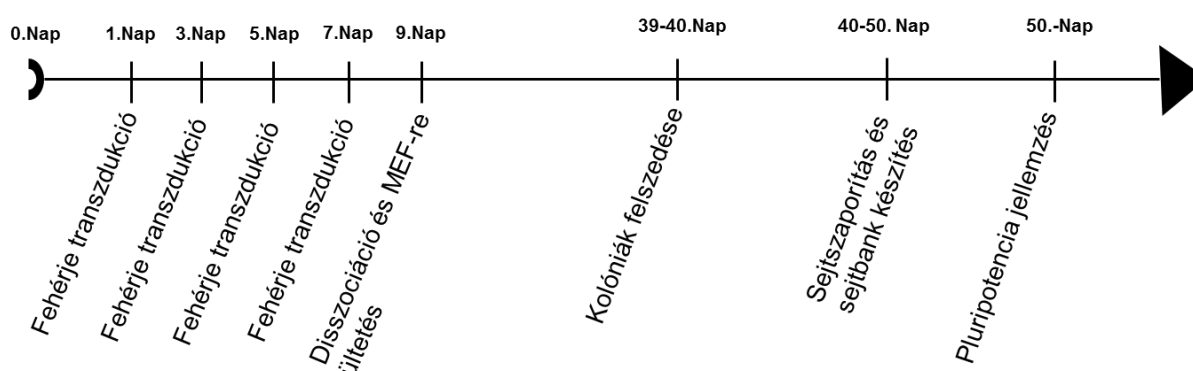
**Az egér OSKM vektor sematikus ábrázolása kivágás előtt és után.** A PCR primer kombinációk (kétféjű nyilak a, b, c, d jelöléssel) és a Southern blot-hoz alkalmazott próba (vastag fekete vonal) vektoron való elhelyezkedése.

### 3.4. Az miPSC vonalak létrehozása egy újraprogramozó rendszerek alkalmazásával

#### 3.4.1. Az miPSC generálás fehérje bevitellel

Az újraprogramozáshoz  $5 \times 10^4$  ICR-MEF-et ( $0,5 \times 10^4$  sejt/cm<sup>2</sup>) ültettünk ki egy 6-lyukú tenyésztőedény 1 lyukába (0. Nap, a kihelyezés napja). A sejteket kiültetésüktől számított 48 órás időközönként, négy ciklusban, a négy pluripotencia faktorból származó (OCT-4, KLF4, SOX2, C-MYC) tisztított fehérjével transzdukáltuk (8 µg/ml/fehérje), egy korábban közölt protokollt követve (Kim et al. 2009; Zhou et al. 2009).

A fehérje-mediált egér iPSC (P-miPSC: Protein-mediated Mouse iPSC) vonalak létrehozása a **7. ábrán** illusztrált kísérleti elrendezés alapján történt.



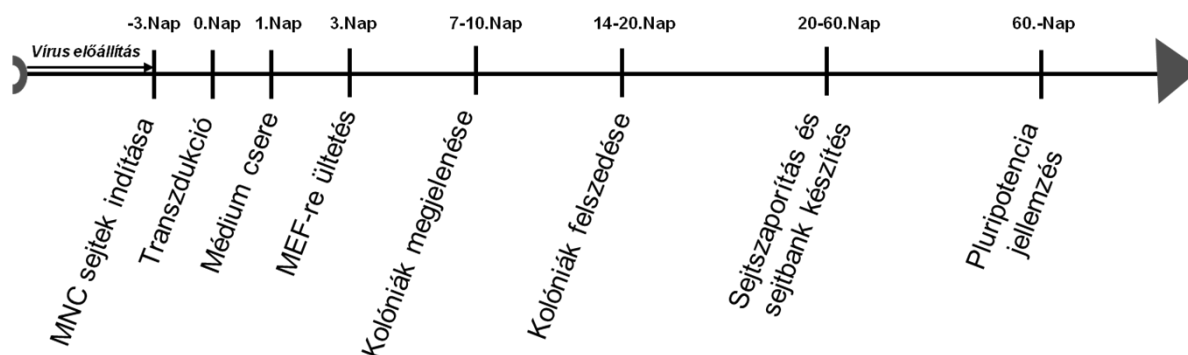
**7. ábra**  
A P-miPSC vonalak alapításának kísérleti elrendezése

A 9. napon a sejteket a szokásos passzási eljárással disszociáltattuk (3.1.1.1. bekezdés) és MitC-vel kezelt MEF réteggel fedett 10 cm-es tenyésztőedényekbe tettük ki azokat. A transzdukciót követő 40. nap körül mESC-szerű kolóniák kezdtek megjelenni, amelyeket felszedtünk és felszaporítottunk a további karakterizációs kísérletekhez.



### 3.5. Transzgen-mentesíthető humán iPSC vonalak létrehozása lentivírus transzdukcióval

A lentivírus-mediált humán iPSC (L-hiPSC: Lentivirus-mediated Human iPSC) vonalak alapfája a **8. ábra**n illusztrált kísérleti elrendezés alapján történt.



**8. ábra**  
Az L-hiPSC vonalak alapításának kísérleti elrendezése

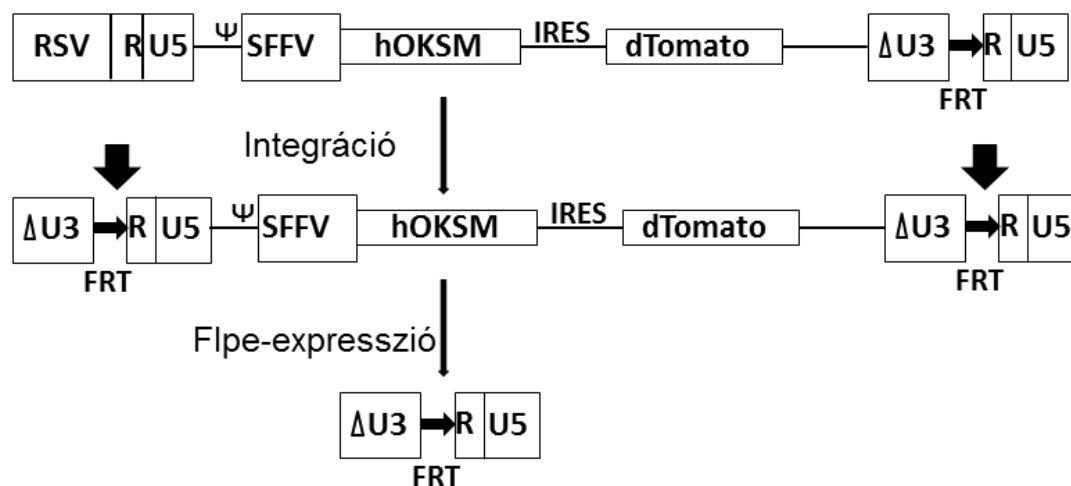
#### 3.5.1. Az újraprogramozandó kiinduló sejt típus izolációja

Az újraprogramozáshoz öt egészséges donortól (B#1-5; B=blood) származó PBMC-eket használtunk. A vérvétel körülményei az arra vonatkozó „lege artis” előírások betartásával történt, az ETT TUKEB által adott kutatási engedély alapján. A vért 8 ml-es BD Vacutainer (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) csövekbe gyűjtöttük le. A vérvételtől számított 2 órán belül a vérből a PBMC-eket izoláltuk a csövek 30 percig tartó centrifugálásával (1800 rcf, 30 perc, RT; Avanti® J-E 369003, Beckman Coulter, USA). A PBMC-eket tartalmazó réteget sterilén egy PBS-t tartalmazó 15 ml centrifugacsőbe gyűjtöttük, majd újra centrifugáltuk (300 rcf, 15 perc, RT; Allegra® X-30R, Beckman Coulter, USA). A felülúszót eltávolítottuk, a sejteket felfuszpendeltük, és megszámoltuk. Az így nyert sejteket azonnal felhasználtuk vagy későbbi felhasználásig lefagyasztottuk 90% FBS és 10% Dimetil Szulfoxidot (DMSO) tartalmazó médiumban és folyékony nitrogénben tároltuk.

#### 3.5.2. Humán OKSM lentivírus plazmid

A PBMC-k újraprogramozásához egy lentivírus alapú plazmidot alkalmaztunk, amely az újraprogramozást követően kivágható a genomól az Flp/FRT-rendszer alkalmazásával, lehetőséget nyújtva transzgen-mentes L-hiPSC vonalak generálására. Az újraprogramozáshoz Prof. C. Baum és Dr. A. Schambach által előállított pRRL.PPT.SF.hOKSMco.idTomato.preFRT vektort használtuk (Voelkel et al. 2010; Warlich et al. 2011), amelyet a **9. ábra** ábrázol. A vektor tartalmazta a hOKSM kazettát (kodon-

optimalizált transzkripciós faktorok), ahol a humán pluripotencia gének cDNS szekvenciáit 2A peptid szekvenciák választották el. A hOKSM kazetta után egy IRES és egy dTomato szekvenciát is tartalmazott a plazmid. A hOKSM kazetta előtt az SFFV (Spleen Focus-Forming Virus U3) promóter volt, amely egy a retrovírusoknál alkalmazott promóter, így az idő előrehaladtával a létrejött humán iPSC (hiPSC) vonalakban elcsendesedése várható. Ahhoz, hogy a létrehozott vektor a genomtól kivágható legyen, egy FRT szekvencia volt a 3' LTR régióba illesztve.



9. ábra

**Humán újraprogramozó lentivírus plazmid.** A policisztronos újraprogramozó vektor sematikus ábrázolása (pRRL.PPT.SF.hOKSMco.idTomato.preFRT), amely tartalmazza a humán kodonoptimalizált pluripotencia cDNS szekvenciákat (hOKSM) és a dTomato riportert. A konstrukció egy FRT helyet (vastag fekete nyílak) is magába foglal, amely lehetővé teszi az integrálódott vektor eltávolítását a Flp-plazmid transziens transzfekeciója által. Jelölések: RSV, Rous sarcoma vírus; Ψ, packaging signal; SFFV, Spleen Focus-Forming Virus U3; OKSM, OCT-4, KLF4, SOX2, C-MYC; IRES, Internal Ribosome Entry Site, ΔU3, deleted U3 régió.

### 3.5.3. Humán PBMC-k lentivírus transzdukciója

A transzdukció előtt három nappal  $1 \times 10^6$  PBMC-t (friss vagy fagyasztott/felolvasztott)  $1 \text{ w}/12 \text{ wp}$ -be ( $0,25 \times 10^6$  sejt/ $\text{cm}^2$ ) tettünk ki *Humán PBMC-m álliumban* [12]. Három nap elteltével (0. Nap, a transzdukció napja) a sejteket 15 ml-es centrifugacsőbe gyűjtöttük, majd centrifugáltuk (300 rcf, 10 perc, RT; Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf, Németország). A felülúszót eltávolítottuk, majd a sejteket felfuszpendeltük a vírusot tartalmazó felülúszóval (max. 1 ml), amihez polibrént adtunk  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  végkoncentrációban. A vírusot tartalmazó sejtuszpenziót egy 12-lyukú tenyésztőedény 1 lyukába tettük ki és a tenyésztőedényt centrifugáltuk (2250 rpm, 90 perc, RT; Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf, Németország), majd az inkubátorba helyeztük. Négy óra elteltével a transzdukált sejtekhez 1 ml *Humán PBMC-m álliumot* [12] adtunk, amely a megadott mennyiségekhez képest dupla annyi növekedési faktort tartalmazott (SCF: Stem Cell Factor, IL-3: Interleukin 3, EPO: Erythropoietin, IGF-1: Insulin-like Growth Factor-1, Dexamethasone). Másnap (1. Nap) a

sejteket 15 ml-es centrifugacsőbe gyűjtöttük, majd centrifugáltuk (300 rcf, 10 perc, RT; Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf, Németország). A felüliszót eltávolítottuk, és a sejteket 2 ml *Humán PBMC-médiumban* [12] szuszpendáltuk fel és a sejtszuszpenziót 1w/12wp-re tettük ki. Két nap elteltével (3. Nap) a sejteket ismét összegyűjtöttük 15 ml-es centrifugacsőbe és centrifugáltuk (300 rcf, 10 perc, RT; Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf, Németország). A felüliszót eltávolítottuk, majd a sejteket szuszpendáltuk 5 ml növekedési faktorokat tartalmazó *Humán IMDM MEF-médiumban* [13] és a sejtszuszpenziót 6 cm-es Petri-csészébe, tettük ki, amely  $7 \times 10^5$  MitC MEF-et tartalmazott. A továbbiakban pedig minden másnap friss *Humán IMDM MEF-médiomot* [13] adtunk a sejtekhez, amely a növekedési faktorokat már nem tartalmazta. A transzdukciótól számolt 13. napon a tenyésztő médiomot *hESC-médiúra* [3] váltottuk és a sejteket a továbbiakban ebben tenyésztettük, a médium kénaponkénti cseréjével. A megjelent ESC-szerű kolóniákat egyesével felszedtük és szaporítottuk.

#### 3.5.4. A transzgen kivágása és annak igazolása az L-hiPSC vonalakban

A transzgen eltávolításához az L-hiPSC kultúrákat tápláló sejtrégen tenyésztettük és enzimatikusan passzáltuk (3.1.1.2 bekezdés). Az L-hiPSC vonalakat a pLV.hCMV-IE.FLPe.IRES.PurR.hHBVPRE (Gonçalves et al. 2010) plazmiddal transzfektáltuk FuGENE-6 (Roche, Bazel, Svájc) transzfekciós reagens felhasználásával. Passzáskor  $5 \times 10^5$  sejtet szuszpendáltunk fel *hESC-médiumban* [3] és tettünk ki 6 cm-es Petri-csészébe ( $0,25 \times 10^5$  sejt/cm<sup>2</sup>), amely  $6 \times 10^6$  MitC MEF-et tartalmazott. A transzfekciót akkor végeztük, amikor a sejtek elérték az 50-60%-os konfluenciát (1-2 nap). A transzfekció előtt 2 órával a tenyésztő médiomot friss médiúra cseréltük. Egy 1,5 ml-es eppendorf-csőben 94 µl DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) médiumhoz 6 µl FuGENE-6-ot adtunk és 5 percig inkubáltuk (RT), majd hozzáadtuk az 1 µg Flp-rekombinázt expresszáló plazmidot és 40 percig inkubáltuk (RT). A 100 µl FuGENE-6/DNS keveréket cseppenként adtunk hozzá a 6 cm-es Petri-csészében tenyésztett sejtekhez, miközben a Petri-csészék körkörösén mozgattuk. Egy napos inkubációt követően a sejtekre 1 µg/ml puomicint tartalmazó tenyésztő-médiomot adtunk, amelyet 48 órás szelekciót követően puomicinmentes médiúra cseréltünk.

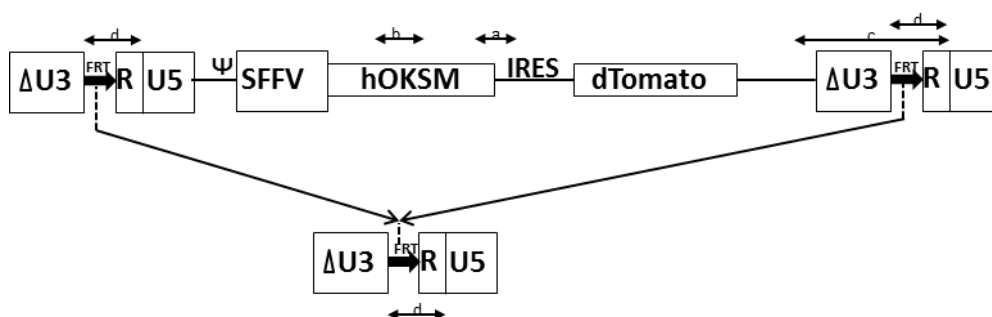
A megjelent kolóniákban a transzgen jelenléte/hiányát PCR reakciókkal erősítettük meg, ahol a primer párok az újraprogramozó vektorra voltak specifikusak, illetve az ún. "3 primer-alapú módszert" is alkalmaztunk (Voelkel et al. 2010). Az ellenőrzéshez nagyszámú kolóniát vizsgáltunk, ahol az egyes kolóniákat megszámoztunk (Petri-csészé aljába karcolva), majd egy kis darabot kivágtunk azokból. A kolónia darabokat egyenként 96-lyukú PCR plate-

be tettük, amelyben az egyes lyukak 30 µl RNase A-val (200 µg/ml) és Proteinase K-val (670 µg/ml) kiegészített klorid-alapú lúis puffert [14] tartalmaztak. A lúishez a 96-lyukú PCR plate-t 60 °C-on 3 órán keresztül inkubáltuk, majd 90 °C-on 2 percig. A PCR reakciókhoz 2 µl sejtlyúzátumot használtunk. A vektor kivágását először a "3 primer-alapú módszerrel" ellenőriztük, és az alapján csak a transzgén-mentesnek bizonyult kolóniákat szedtük fel mechanikusan és tenyésztettük tovább. A tovább tenyésztett vonalakon a transzgén hiányát az újraprogramozó vektorra specifikus primer párokkal erősítettük meg. A primer szekvenciákat az 5. táblázatban soroltuk fel. A PCR reakciókhoz a GoTaq® Green Master Mix-et (Promega, Madison, USA) használtuk, és a gyártó protokolljának megfelelő reakció paramétereket követtük. A PCR termékméretét gélelektroforézissel detektáltuk, amelyhez etidium bromid tartalmú 1%-os agaróz gélt használtunk. A 10. ábra az újraprogramozó vektort ábrázolja kivágás előtti és utáni állapotában, amin a PCR reakciókban felhasznált primerek elhelyezkedését tüntettük fel.

**5. táblázat**

Az L-hiPSC vonalakban a transzgén jelenlétét/hiányát igazoló PCR primerek listája

L-hiPSC, PCR primerek	Reverz	
a (292 bp)	GTTGCGGAAACGACGAGAACAGTT	GACCTTGCAATTCCTTTGGCGAG
b (443 bp)	TCGTGAGAGTGTGGTTCTGC	CTCCCGCCATCTGTTGTTAG
c (290 bp)	CGAGTCGGATCTCCCTTTGGGC	GGTCCCTAGTTAGCCAGAGAGC
d (171 bp)	TGGAAGGGCTACGTAGCTAGC	GGTCCCTAGTTAGCCAGAGAGC

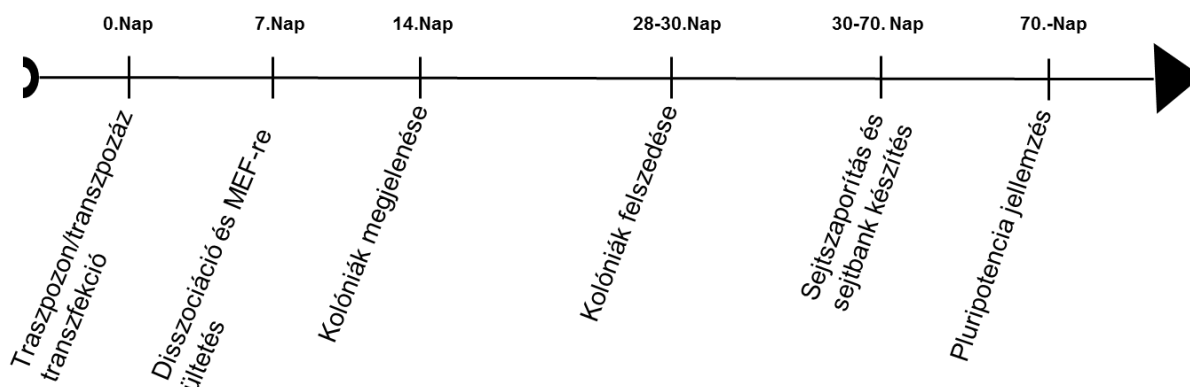


**10. ábra**

**A humán OKSM vektor sematikus ábrázolása kivágás előtt és után.** A PCR primer kombinációk (kétféjű nyilak a, b, c, d jelöléssel) vektoron való elhelyezkedése.

### 3.6. Transzgen-mentesíthető hiPSC vonalak létrehozása Sleeping Beauty-transzpozonnal

Az Sleeping Beauty-medi által humán iPSC (SB-hiPSC: Sleeping Beauty-human iPSC) vonalak létrehozása a **11. ábrán** illusztrált kísérleti elrendezés alapján történt.



**11. ábra**  
Az SB-hiPSC vonalak alapításának kísérleti elrendezése

#### 3.6.1. Az újraprogramozandó kiinduló sejt típus izolációja

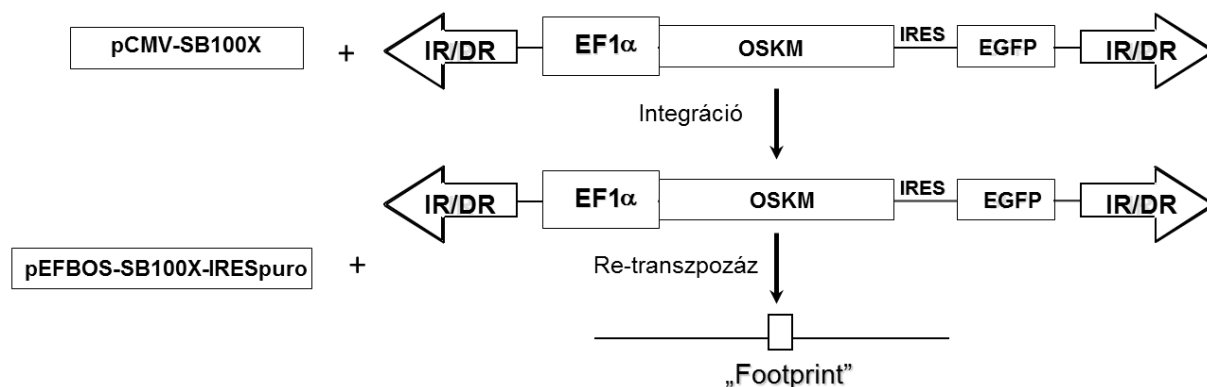
A kísérletek első lépése Hollandiában, az LUMC-n egy Európai Unió projektéhez kapcsolódó tudományos együttműködés keretében történt. A holland kutatócsoport etikai engedélye keretében egy kutatási célokra felajánlott 14 hetes abortált magzattal a standard eljárással HFF-et izoláltunk. A sejteket *Fibroblaszt-máiumban* [1] tenyésztettük, majd a második passzázsban újraprogramoztuk.

#### 3.6.2. SB-transzpozon és transzpozáz plazmidok és transzfekciójuk

Az HFF-ek újraprogramozásához egy SB-transzpozon alapú plazmidot alkalmaztunk: pT2BH-OSKM- IRES/eGFP, amelyet kutatócsoportunk (Muenthaisong et al. 2012) közölt, valamint a **12. ábra** ábrázol. A transzpozon plazmid tartalmazta az mOSKM kazettát, ahol az egér pluripotencia gének cDNS szekvenciáit 2A peptid szekvenciák választottak el. Az mOSKM kazetta után az IRES és az EGFP szekvenciát tartalmazta a plazmid. Az mOSKM kazetta előtt az EF1 $\alpha$  promóter volt beillesztve.

A  $2,5 \times 10^5$  HFF-et  $2 \mu\text{g}$  pT2BH-OSKM- IRES/eGFP transzpozonnal és  $200 \text{ ng}$  pCMV-SB100X transzpozáz (Máás et al. 2009) plazmidokkal nukleoporáltuk. A nukleoporációt  $100 \mu\text{l}$  végtérfogatban a Nucleofector kit-el (Lonza, Bazel, Svájc) végeztük, a gyártó által előírt protokollal (program: U23) (0. Nap). A transzfektált sejteket  $1\text{w}/6\text{wp}$  tenyésztőedényekbe tettük ki *Fibroblaszt-máiumban* [1]. Egy nappal a transzfekciót követően (1. Nap) a máiumot *hESC-máiumra* [3] cseréltük. A továbbiakban a máiumot kénaponta cseréltük a sejteken. A transzfekció után szűrt 7. napon a sejteket PBS-el mostuk, majd TrypleE-vel

gyűjtöttük össze, centrifugáltuk (1000 rpm, 3 perc, RT; Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf, Németország), *hESC-médiumban* [3] szuszpendáltuk fel és  $3,5 \times 10^4$  sejt/cm<sup>2</sup> MEF-et tartalmazó tenyésztőedényre tettük ki. A megjelent ESC-szerű kolóniákat mechanikusan felszedtük és tenyésztettük a 3.1.1.2-es bekezdésben részletezett tenyésztési módszerek alkalmazásával.



12. ábra

**SB-transzpozon-transzpozáz újraprogramozó plazmidok.** Az SB-policisztronos újraprogramozó transzpozáz vektor sematikus ábrázolása (pT2BH-OSKM- IRES/eGFP), amely tartalmazza az egér pluripotencia cDNS szekvenciákat (mOSKM) és az EGFP riportert. A transzpozon és transzpozáz (pCMV-SB100X) együttes transzfekciójával az újraprogramozó vektor integrálódik a genomba. A hiperaktív transzpozáz (pEFBOS-SB100X-iresPuro) újra transzfektálása lehetővé teszi az újraprogramozó vektor eltávolítását a sejtek genomjából. Jelölések: IR/DR, Inverted repeats; CMV, cytomegalovírus promóter; EF1α, Elongation factor 1-alpha; OSKM, OCT-4, SOX2, KLF4, C-MYC; IRES, Internal Ribosome Entry Site.

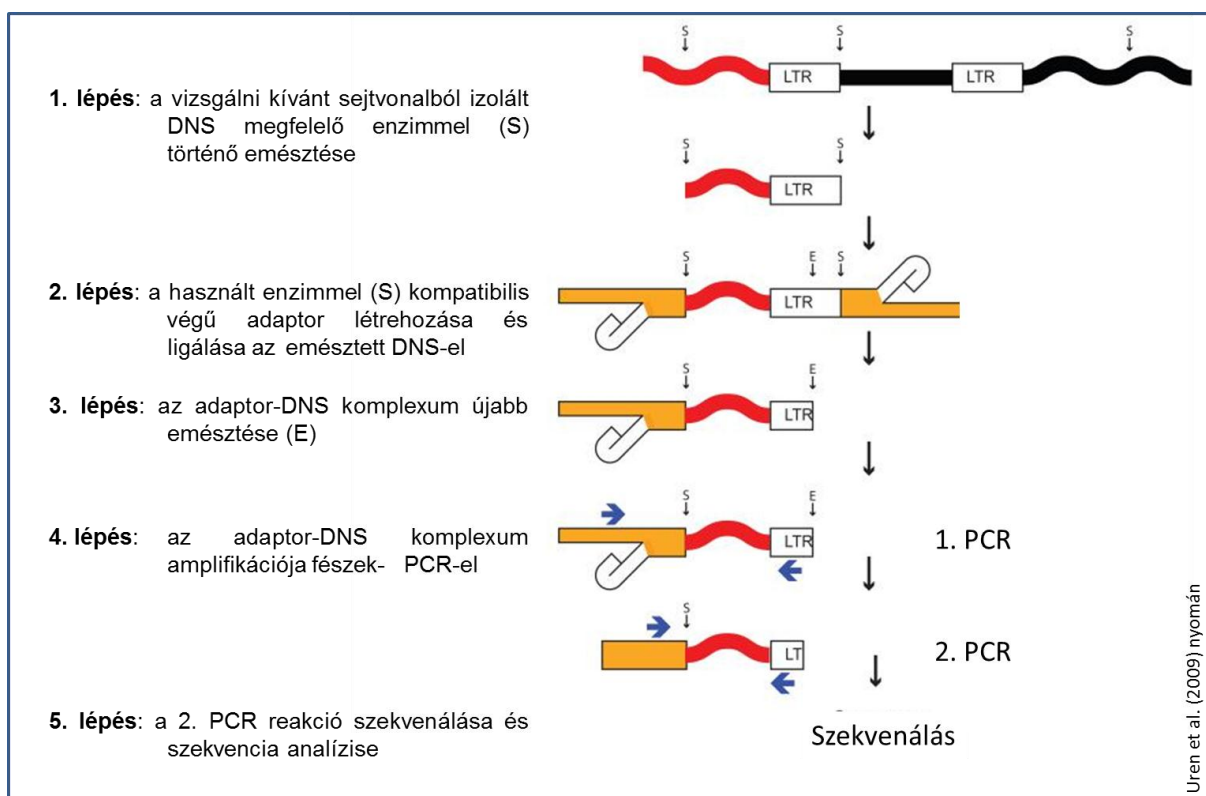
### 3.6.3. A transzgenkivágása Sleeping Beauty-humán iPSC vonalakból

Az iPSC vonalakba beépült SB-transzgenek számát Southern blot analízissel határoztuk meg (3.1.8. bekezdés). A Southern blot-hoz a genomi DNS-t a PstI vagy SacI enzimekkel emésztettük és az *EGFP* (Life Technologies, Carlsbad, USA, 712 bp) vagy *c-Myc* (1305 bp) kódoló szekvenciára specifikus próbát használtuk (14. ábra). Az endogén *C-MYC*-et egy ~1,5 kB méretű sáv detektálásával vártuk. A transzpozon-transzpozáz rendszer lehetőséget nyújt a genomba beépült transzpozon vektor esetleges kimozdítására a transzpozáz újra transzfektálásával. A rendszer e tulajdonságát kihasználva az SB-hiPSC vonalak transzgen-mentesítését egy hiperaktív transzpozáz, a pEFBOS-SB100X-iresPuro újra transzfektálásával kísértük meg. A plazmid a puromicin szekvenciát is tartalmazta, amely antibiotikum szelekcióra adott lehetőséget. A transzfekciót a FuGENE-6 transzfekciós reagenssel (Roche, Bazel, Svájc) végeztük el. A transzfekció előtt 2 órával a tenyésztő médiomot friss médióra cseréltük. Egy 1,5 ml-es eppendorf-csőben 94 µl DMEM/F12 médiomhoz 6 µl FuGENE-6-ot adtunk és 5 percig inkubáltuk (RT), majd 1 µg pEFBOS-SB100X-iresPuro transzpozáz plazmidot adtunk hozzá és 40 percig inkubáltuk (RT). A 100 µl FuGENE-6/DNS keveréket cseppenként adagoltuk a 6 cm-es Petri-csőben tenyésztett

sejtekhez, miközben a Petri-csészék köröken mozgattuk. Egy napos inkubációt követően a sejtekre 1 µg/ml puromicint tartalmazó tenyésztő-médiumot adtunk, amelyet 48 órásszelekciót követően puromicin-mentes médiumra cseréltünk.

### 3.6.3.1. Splinkerette PCR

Az ún. Splinkerette PCR-el az integrációk genomban való elhelyezkedését határoztuk meg. A Splinkerette PCR több speciális lépést magába foglaló összetett módszer, amelynek folyamatát a **13. ábra** illusztrálja.



**13. ábra**

**A Splinkerette PCR sematikus ábrázolása.** A Splinkerette PCR első lépése a genomiális DNS megfelelő enzimmel való emésztése. Ezt követi az adaptor létrehozása, amely két oligonucleotid szekvenciából áll (hosszú kar és rövid kar). A két adaptor szekvencia úgy van megtervezve, hogy azok kapcsolódása egy olyan struktúrát hoz létre, amelynek egyik vége egy kétszálú DNS-t eredményez, amely kompatibilis a DNS emésztéséhez használt enzimmel. A másik vége pedig egy egyszálú DNS-t eredményez (hosszú kar), mivel a másik szál (rövid kar) egy hajtű-szerű struktúrát képez. Az így létrejött adaptor és az emésztett DNS ligálása a Splinkerette PCR második lépése. A harmadik lépés a létrejött adaptor-DNS komplexum újabb emésztése olyan enzimmel, amely az egyik oldali adaptort eltávolítja, abból a célból, hogy az ezt követő PCR-ek minél specifikusabbak legyenek. A módszer negyedik lépése az ún. „fészek (nested)-PCR”, amely két PCR reakciót foglal magába, ahol a második PCR reakciót az első PCR során nyert amplikon-on végezzük, amely szintén a reakció specitását erősíti. A módszer utolsó lépése a második PCR-ből kapott termék szekvenálása és a kapott szekvenciák genom adatbázishoz való hasonlítása, amely egyezés esetén az adott inszert genomi lokációját adja meg.

A genomi áis DNS izolálásához a QIAamp DNA Mini Kit-et (Qiagen, Hilden, Németország) alkalmaztuk. A Splinkerette PCR-t egy korábban közölt protokoll alapján végeztük (Uren et al. 2009). A genomi áis DNS-t CviQI vagy DpnII enzimekkel emésztettük, majd ligáltuk a megfelelő splinkerette adaptorokkal. A transzpozont tartalmazó DNS fragmentumokat, amelyeket az adaptorokkal ligáltunk az ún. „fészek (nested)-PCR” módszerrel amplifikáltuk. A Splinkerette PCR-hez alkalmazott primer szekvenciákat a **6. táblázat** tartalmazza. A PCR reakciókhoz a Platinum Taq high fidelity DNA polimerázot használtuk.

**6. táblázat**

A Splinkerette PCR-hez alkalmazott primerek listája

Splinkerette PCR primerek	
Long-adaptor-CviQI	5'-CGAAGAGTAACCGTTGCTAGGAGAGACCGTGGCTGAATGAGACTGGTGTGCGACTAGTGG-3'
Short-adaptor-CviQI	5'-TACCACTAGTGTGCGACACCACTCTCTAATTTTTTTTTTCAAAAAA-3'
Long-adaptor-DpnII	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCTCCGCTTAAGGGAC-3'
Short-adaptor-DpnII	5'-phosphate-GATCGTCCCTTAAGCGGAG-3'-amino
Spl-CviQI-P1	5'-CGAAGAGTAACCGTTGCTAGGAGAGACC-3'
Spl-DpnII-P1	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
Spl-CviQI-P2	5'-GTGGCTGAATGAGACTGGTGTGCGAC-3'
Spl-DpnII-P2	5'-AGGGCTCCGCTTAAGGGAC-3'
SB5-P1	5'-CATGACATCATTTTCTGGAATT-3'
SB5-P2	5'-CTTGTGTCATGCACAAAGTAGATGTCC-3'

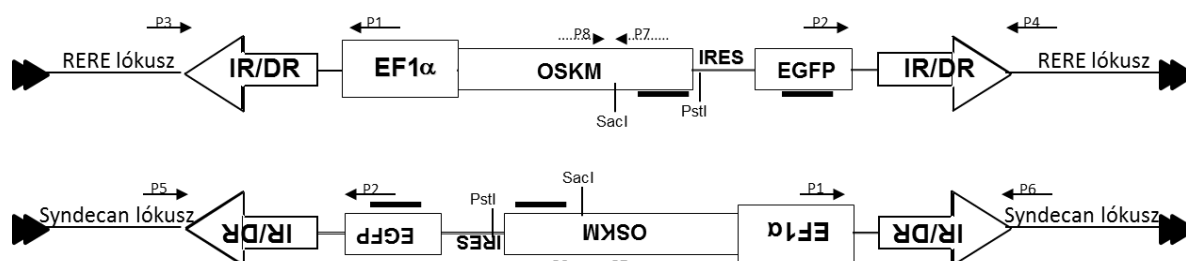
Az első PCR reakcióban az Spl-CviQI-P1 és SB5-P1 vagy Spl-DpnII-P1 és SB5-P1 primer párokat használtuk. A második PCR reakcióban (nested PCR) pedig az Spl-CviQI-P2 és SB5-P2 vagy Spl-DpnII-P2 és SB5-P2 primereket alkalmaztuk. A TA-klónozott PCR termékeket két oldalról az M13 forward és reverz primerekkel megszekvenáltuk. A szekvenálási eredményeket az NCBI Homo Sapiens build 37.3 genom adatbázis BLAST kereséssel analizáltuk. Az SB-inszerciók genomban való elhelyezkedését genomi áis PCR-ekkel erősítettük meg, amelyekhez transzpozon- és genom- specifikus primereket használtunk (**7. táblázat**). A PCR reakciókhoz a GoTaq® Green Master Mix-et (Promega, Madison, USA) használtuk, valamint a gyártó által előírt reakció paramétereit alkalmaztuk. A PCR termék méretét gélelektroforézissel detektáltuk etílium bromid tartalmú 1%-os agaróz gélben. A **14. ábra** a transzpozon-újraprogramozó vektort ábrázolja genomba való integrálódását követően, amin a PCR reakciókban felhasznált primereket, valamint a Southern blot analízishez alkalmazott próbára elhelyezkedését is feltüntettük.



**7. táblázat**

Az SB-hiPSC vonalakban használt lókus- és transzgen-specifikus PCR primerek listája

SB-hiPSC, PCR primerek	
Lókus-specifikus	
p1 (Ef1a_rev)	5'-GGAGAATTACATCAAGTGCCAAG-3'
p2 (GFP4)	5'-GTGCAGCTCGCCGACCACTACCAG-3'
p3 (RERE_fwd)	5'-GAAAAGGAACATGCTTCTCTGGATGC-3'
p4 (RERE_rev)	5'-GATCCAGATCATATGTGACAAGAC-3'
p5 (SDC2_fwd)	5'-CAGCATGTCTCAGATTGACCTTAC-3'
p6 (SDC2_rev2)	5'-GACTAAACGGTTTTGTAGTAATAATC-3'
Transzpozon-specifikus	
p7 (cMYC_2a_rev)	5'-ATAGGGCTGTACGGAGTCGTAGT-3'
p8 (KLF4_2a_fwd)	5'-CCTTACACATGAAGAGGCACTTT-3'



**14. ábra**

Az SB-OSKM vektor sematikus ábrázolása genomba való integrációját követően. A lókus-specifikus (fekete nyilak p1, p2, p3, p4, p5, p6 jelöléssel) és transzpozon-specifikus (fekete szaggatott nyilak p7, p8 jelöléssel) PCR primer kombinációk és a Southern blot-hoz alkalmazott próbák (vastag fekete vonal) vektoron való elhelyezkedése. Az EGFP szekvenciára illeszkedő próba használata esetén a PstI és SacI enzimeket használtuk. A c-Myc szekvenciára illeszkedő próba használata esetén a SacI enzimmel emésztettük a genomiális DNS-t.

**3.6.3.2. Az SB-transzgen jelenlétének/hiányának igazolása**

A puromicin szelekciót követően megjelent kolóniákban a transzgen jelenlétét/hiányát PCR reakciókkal erősítettük meg, ahol a Splinkerette PCR által megismert genom-, illetve transzpozon-specifikus primereket használtunk (7. táblázat).

Nagyszámú kolóniát ellenőriztünk, ahol az egyes kolóniákat megszórtuk (Petri-csésze aljába karcolva), majd egy kis darabot kivágtunk azokból. A kolónia darabokat egyenként 96-lyukú PCR plate-be tettük, amelyben az egyes lyukak 30 µl RNase A-val (200 µg/ml) és Proteinase K-val (670 µg/ml) kiegészített klorid-alapú lúis puffert [14] tartalmaztak. A lúishez a 96 lyukú PCR plate-t 60 °C-on 3 órán keresztül inkubáltuk, majd

90 °C-on 2 percig. A PCR reakciókba 2 µl sejtlizátumot használtunk. A PCR reakciók alapján transzgen-mentesnek látszó kolóniákat mechanikusan felszedtük és tenyésztettük. A PCR reakciókhoz a GoTaq® Green Master Mix-et (Promega, Madison, USA) használtuk, valamint a gyártó által előírt reakció paramétereiket alkalmaztuk. A PCR termékek méretét gél-elektroforézissel ellenőriztük etílium bromid tartalmú 1 %-os agaróz gélben.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. Különböző genetikai háttérű egér iPSC vonalak létrehozása lentivírus transzdukcióval

#### 4.1.1. A kísérletek előzménye

Laboratóriumunkban az Sleeping Beauty-mediált egér iPSC (SB-miPSC: Sleeping Beauty-mediated mouse iPSC) és az L-miPSC vonalalapítási kísérletek eleinte párhuzamosan folytak, amelyet Dr. Suchitra Polgári munkatársammal végeztem. A SB-transzpozonnal való iPSC generálási kísérleteket Dr. Suchitra Polgári végezte, amely munkába segítettem. A SB-miPSC tényleges kísérletsorozat eredményeit 2012-ben közzétették (Muenthaisong et al. 2012), illetve Muenthaisong (2012) doktori értekezésében részletezte azokat.

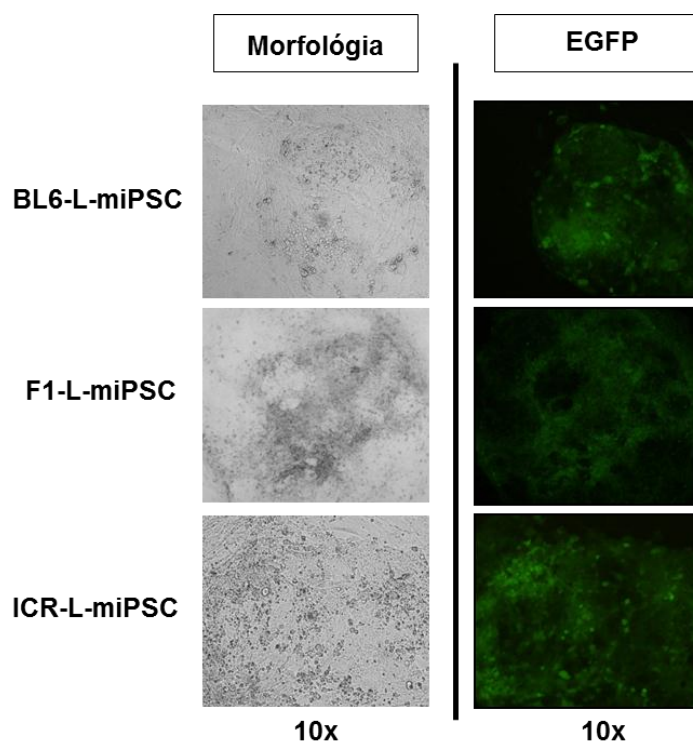
Az eredményeket röviden ismertetve: a munkában az általam is vizsgált három különböző genetikai háttérű egértörzsből SB-transzpozonnal sikeresen stabil SB-miPSC vonalakat hoztunk létre. Az újonnan létrehozott vonalak morfológiájukban hasonlóak voltak az azonos egértörzsekből alapított mESC vonalakhoz, illetve expresszálták a vizsgált pluripotencia markereket. A három genetikai háttér esetén nem figyeltünk meg lényeges különbséget a sejtek újraprogramozhatóságában, a kolóniák megjelenésének időpontjában, sem pedig a pluripotencia marker expressziós mintázatában.

A vonalakat *in vitro* és *in vivo* differenciációs kísérletekben is teszteltük. Az *in vitro* spontán/kardiális differenciációs kísérletekben az SB-ICR-miPSC vonalak szerepeltek a legjobban, azonban a vonalak között kialakult különbséget nem feltétlenül a genetikai háttérükben való eltérés adta. A bevitt transzgen integrációjának helye és annak expressziós szintje negatívan befolyásolhatja a differenciáció hatékonyságát. A három genetikai háttér egy-egy *in vitro* jól differenciálódó SB-miPSC vonalát a legszigorúbb pluripotencia tesztben is vizsgáltuk, ahol az *in vivo* differenciációs képességet ellenőriztük kiméra kísérletekkel. E tesztben az ICR és F1 (C57BL/6xDBA/2J) vonalak adtak kiméreket, azonban a kísérletekben csak az F1 (C57BL/6xDBA/2J) vonalból született kimérek voltak csávonal kompetensek.

#### 4.1.2. MEF újraprogramozása lentivírussal

A MEF újraprogramozáshoz az általunk újonnan létrehozott policisztronos vektort használtuk, amely tartalmazza az mOSKM kazettát és az EGFP riporter gént az EF1 $\alpha$  promóter irányítása alatt (5. ábra).

Mind a három általunk vizsgált egértörzből (BL6, F1, ICR) 14-16 nappal a transzdukció követően, nagyszámú ESC-szerű kolónia jelent meg, igazolva így a létrehozott újraprogramozó vektor hatékony működését. A három genetikai háttér újraprogramozásának hatékonyságában nem találtunk különbséget csak úgy, mint az SB-miPSC-k újraprogramozásánál. A felszedés előtti kolóniák morfológiáját a **15. ábra** reprezentálja.



**15. ábra**

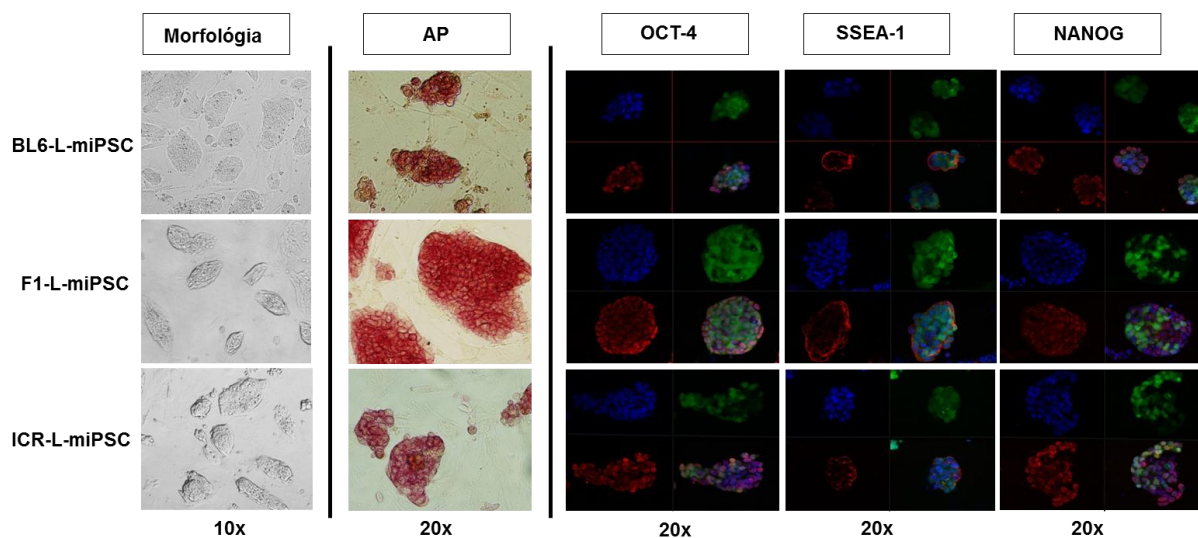
**Az L-miPSC kolóniák felszedés előtti morfológiája.** A bal oldali panel fénymikroszkóppal készített képeket mutat. A jobb oldali panel a fluoreszcens mikroszkóp által készített képeket mutatja, ahol az EGFP fehérje jelenléte az újraprogramozó vektor ektopikus expresszióját jelzi.

#### 4.1.3. Az L-miPSC vonalak pluripotencia karakterizációja

A keletkezett kolóniákat egyedileg szedtük fel további tenyésztés céljából, és minden genetikai háttérből morfológia alapján 6 klónt választottunk ki további jellemzésre, illetve stabil vonalak alapfáca céljából. A vizsgált vonalak minimum 20 passzálon keresztül képesek voltak fenntartani mESC-szerű morfológiájukat mind zselatinon mind pedig MitC-kezelt MEF-en. Az L-miPSC vonalak morfológiájában és növekedésének mértékében nem tapasztalunk különbséget a kontroll mESC vonalakhoz képest. Genetikai háttérként egy-egy reprezentatív L-miPSC vonal morfológiáját a **16. ábra** szemlélteti.

A kiválasztott vonalak mindegyike pluripotensnek bizonyult, mind expresszálták a vizsgált exogén és a már újra-aktiválódott endogén pluripotencia markereket, amelyet ICC-,

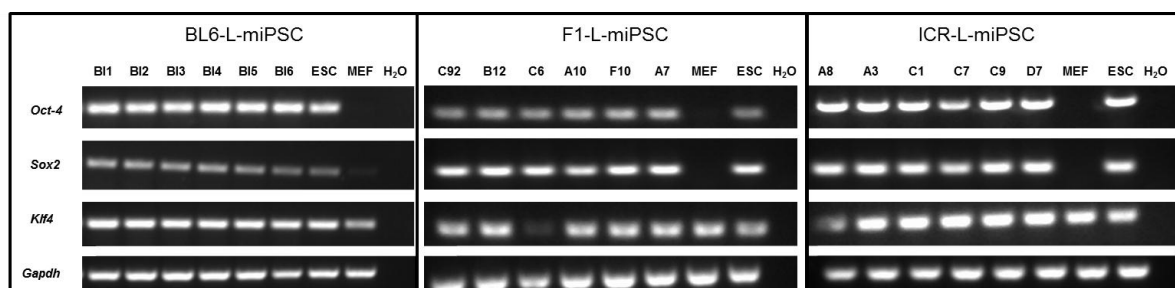
és AP-festések valamint RT-PCR vizsgálatok igazoltak. Az egyes genetikai hátterekből egy-egy reprezentatív L-miPSC vonal AP-, és ICC-festését OCT-4, SSEA-1, és NANOG markerekre a **16. ábra** szemlélteti.



**16. ábra**

**A három különböző genetikai háttérű L-miPSC vonal morfológiája, AP- és ICC-festései.** A fénymikroszkópos felvételek az iPSC vonalak morfológiáját és AP-festését mutatja. A fluoreszcens mikroszkóppal készített képek a sejtvonalak ICC-festéseit mutatja a pluripotencia markerekre (kék: DAPI, piros: OCT-4, SSEA-1 és NANOG, zöld: ektopikus EGFP).

A létrehozott vonalakkól végzett RT-PCR reakciókat a **17. ábra** szemlélteti, amely az újra aktiválódott endogén markerek expresszióját mutatja be. Az L-miPSC vonalak pluripotencia marker-expressziós mintázatában az RT-PCR alapján eltérő szintű nem volt észlelhető a kontroll mESC vonalához képest, illetve a különböző genetikai háttér befolyása sem volt tapasztalható.



**17. ábra**

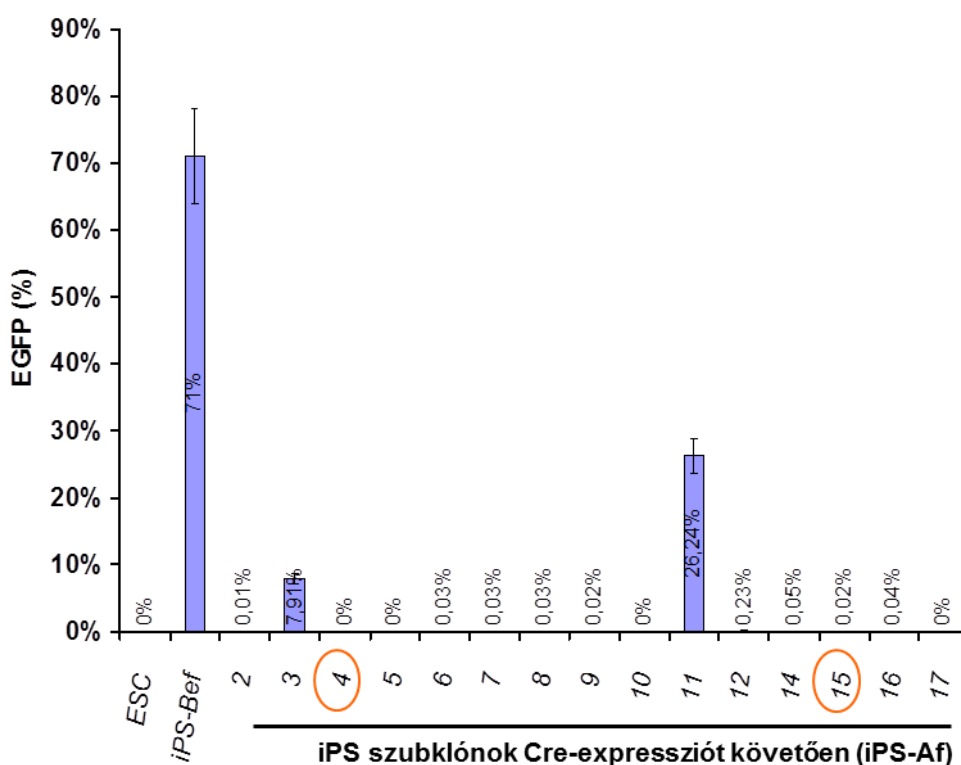
**A három eltérő genetikai háttérből származó L-miPSC vonalak pluripotencia génexpressziós mintázata.** A pluripotencia gének újraaktiválódását igazoló RT-PCR reakciók, amelyekben az alkalmazott primerek az endogén pluripotencia markerekre voltak specifikusak.

## 4.2. Transzgén-mentes L-miPSC vonalak létrehozása

A 4.1.1-es bekezdésben leírt kísérleti előzményekből az SB-miPSC vonalak *in vivo* differenciációs eredményei alapján az alábbi kísérletbe csak az F1 egértörzsekből származó hat L-miPSC vonalat vontuk be. FACS-al mért eredmények alapján a vonalak EGFP expressziós szintje 71,0% és 97,9% között változott. Az alacsonyabb EGFP expresszió arra utalhat, hogy az adott vonal kevesebb számú integrálódott transzgént tartalmaz. Ebből a feltevésből kiindulva a legalacsonyabb EGFP-t mutató vonalat választottuk ki transzgén-mentes fés c ő j ő d, amely az A7 nevű klón volt, továbbiakban iPS-Bef (azaz Before excision = Kivágás előtti).

### 4.2.1. A transzgén-mentes L-miPSC-k szelekciója a Cre-transzfekecióját követően

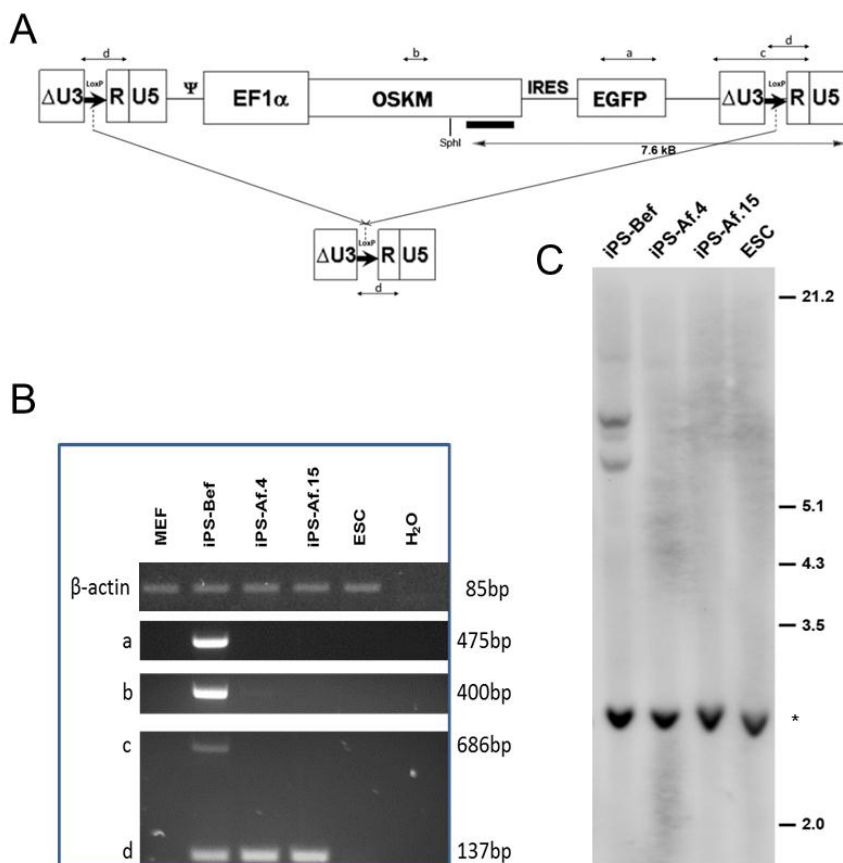
Az iPS-Bef vonal Cre-plazmival történő transzfekeciója, nagyszámú EGFP negatív kolóniát eredményezett. A transzgén kivágódásának igazolásához, 15 feltételezhetően transzgén-mentes (fluoreszcens mikroszkóp alatt EGFP-negatívnak látszó) kolóniát egyesével felszedtünk, felszaporítottunk majd az EGFP expresszióját FACS-al is ellenőriztük. A 15 ellenőrzött vonalból tizenhárom volt EGFP-re nézve negatív (18. ábra).



18. ábra

**L-miPSC vonalak transzgén-mentességének igazolása FACS analízissel.** Az EGFP szint mérése FACS-al a transzgént tartalmazó (iPS-Bef) és a Cre-kivágott szubklónokban (iPS-Af). A további kísérletekhez két transzgén-mentes iPSC vonalat választottunk ki (piros körök).

Morfológiai kritériumok alapján két EGFP-negatív szubklónt választottuk ki további jellemzésre: iPS-Af.4 és iPS-Af.15 (iPS-Af, azaz After excision = Kivágás utáni). A két szubklónból a transzgén eltávolítását Southern blot analízissel (19C. ábra) és PCR reakciókkal (ahol a primerek a lentivírus vektorra voltak specifikusak, 19B. ábra) bizonyítottuk. A 19A. ábra a feljebb ismertetett (3.2.2. és 3.3.1. bekezdés) újraprogramozó vektort ábrázolja kivágás előtti és utáni állapotában, amin a felhasznált PCR primereket, valamint a Southern blot analízishez alkalmazott próbát elhelyezkedésük is feltüntetjük.



19. ábra

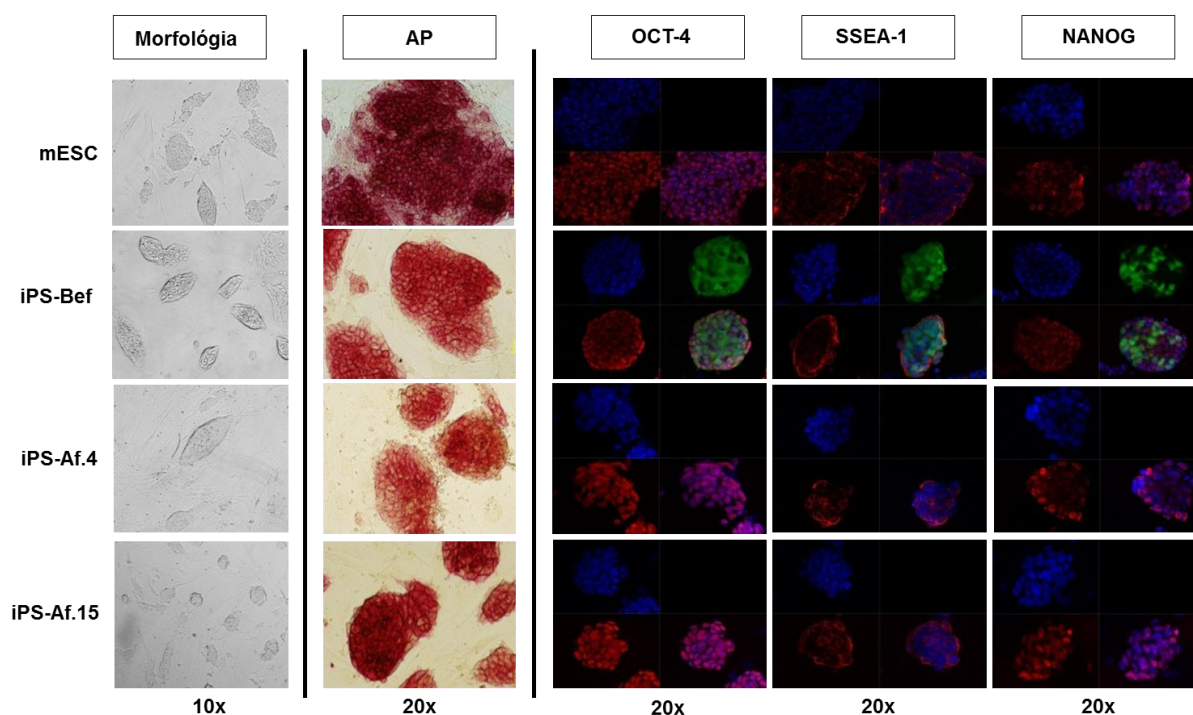
**L-miPSC vonalak transzgén-mentességének igazolása PCR-el és Southern blot analízissel. A)** Az egér OSKM vektor sematikus ábrázolása kivágás előtt és után a PCR primer kombinációk (kétféjű nyilak a, b, c, d jelöléssel) és a Southern blot-hoz alkalmazott próba (vastag fekete vonal) vektoron való elhelyezkedésének feltüntetésével. **B)** A transzgén-mentesített klónok (iPS-Af.4 and iPS-Af.15) és a transzgén-tartalmazó klón (iPS-Bef) PCR analízise az ábra A-részében feltüntetett primer kombinációkkal. A  $\beta$ -actin szekvencia amplifikációja a genomiális DNS jelenlétét erősítette meg, a MEF és az egér ESC genomiális DNS pedig negatív kontrollként szolgált. A 'c' és 'd' primer kombinációkat egyetlen PCR reakcióban használtuk ahol a reverz primer ugyanaz volt ("3 primer-alapú módszer"). A 'c' primer kombináció egy 686 bp amplikont eredményez, amely a vektor kivágását követően nem látható. Míg a 'd' primer kombináció egy 137 bp amplikont eredményez a transzgén-mentes és transzgén-tartalmazó klónokban egyaránt. **C)** A transzgén-mentes és transzgén-tartalmazó klónok Southern blot analízise, amelyhez kontrollként egér ESC-t használtunk. A genomiális DNS-t SphI-el emésztettük és a c-Myc kódoló szekvenciáját használtuk próbaként. A 2.6 kb sáv (jelölés:\*) az endogén c-Myc jelenlétét detektálja az összes vonalban. További sávok az iPS-Bef vonal esetén láthatóak, amely a próba c-Myc transzgénhez való hibridizációját mutatja. A transzgén-mentes klónok esetén az iPS-Bef-el ellentétben további sávok nem detektálhatóak, igazolva így a transzgén kivágását.



#### 4.2.2. Az L-miPSC vonalak pluripotencia karakterizációja kivágás előtt és után

Az újraprogramozó transzgén konstrukció kivágása előtti és utáni L-miPSC vonalak morfológiájukban nagyon hasonlóak voltak az azonos genetikai háttérű mESC vonalhoz (20. ábra). A tipikus mESC-re jellemző morfológiát mutattak, képesek voltak az önmegújulásra és *in vitro* fenntarthatóak voltak minimum 20 passzáson keresztül.

Megvizsgáltuk, hogy a transzgén-mentes L-miPSC vonalak képesek-e megőrizni pluripotenciájukat a többszöri genom manipuláció ellenére is. Az iPS-Bef, és iPS-Af.4, iPS-Af.15 transzgén-mentes főtt vonalak AP pozitívak voltak, emellett az ICC-festéseik megerősítették a vizsgált pluripotencia fehérjék jelenlétét is (OCT-4, NANOG, SSEA-1) (20. ábra).



20. ábra

A kivágás előtti és utáni L-miPSC vonalak morfológiája, AP- és ICC-festései. A fénymikroszkópos felvételek az iPSC vonalak morfológiáját és AP-festését mutatják. A fluoreszcens mikroszkóppal készített képek a sejtvonalak ICC-festéseit mutatják a pluripotencia markerekre (kék: DAPI, piros: OCT-4, SSEA-1 és NANOG, zöld: ektopikus EGFP).

A vonalakban kimutattuk a fontosabb pluripotencia gének expresszióját is, amelyet RT-PCR-el végeztünk (21. ábra). Az RT-PCR reakciókhoz olyan primereket alkalmaztunk, amelyek az endog génekre voltak specifikusak. A pluripotencia markerek expresszióját tekintve az L-miPSC- és mESC- vonalak között nem észleltünk különbséget, a Cre-kivágott vonalak is stabilan expresszálják az újra aktiválódott endog pluripotencia géneket.



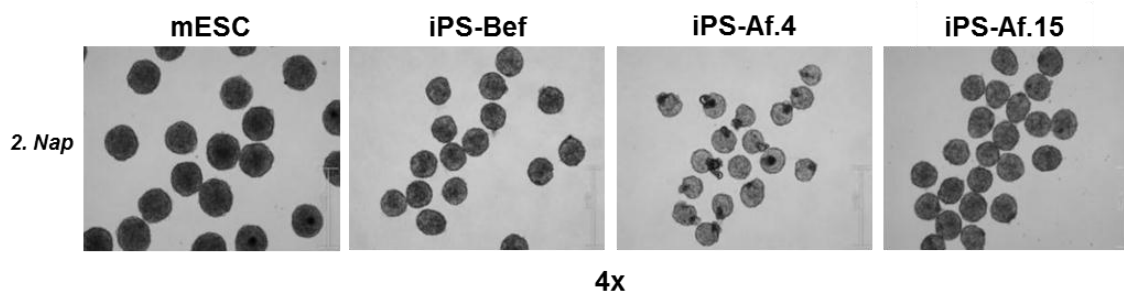


21. ábra

A kivágás előtti és utáni L-miPSC vonalak pluripotencia géneexpressziós mintázata. A pluripotencia gének újraaktiválódását igazoló RT-PCR reakciók, amelyekben az alkalmazott primerek az endogén pluripotencia markerekre voltak specifikusak.

#### 4.2.3. Az L-miPSC vonalak *in vitro* differenciációjának kivágás előtt és után

Az *in vitro* differenciációs kísérleteket szintén a pluripotens állapot ellenőrzésére végeztük el mind az iPS-Bef mind pedig az iPS-Af vonalakon. Akárcsak az mESC vonalak, a vizsgált L-miPSC vonalak (iPS-Af.4, iPS-Af.15 és iPS-Bef) is képesek voltak kompakt EB formára LIF-mentes tenyésztő médiumban (22. ábra).



22. ábra

Az L-miPSC vonalak *in vitro* differenciációja kivágás előtt és után. Fénymikroszkóppal készített felvételek a HD módszerrel aggregált EB-k morfológiájáról a differenciáció második napján.

#### 4.2.3.1. Az L-m iPSC vonalak *in vitro* spontán/kardiális differenciációja

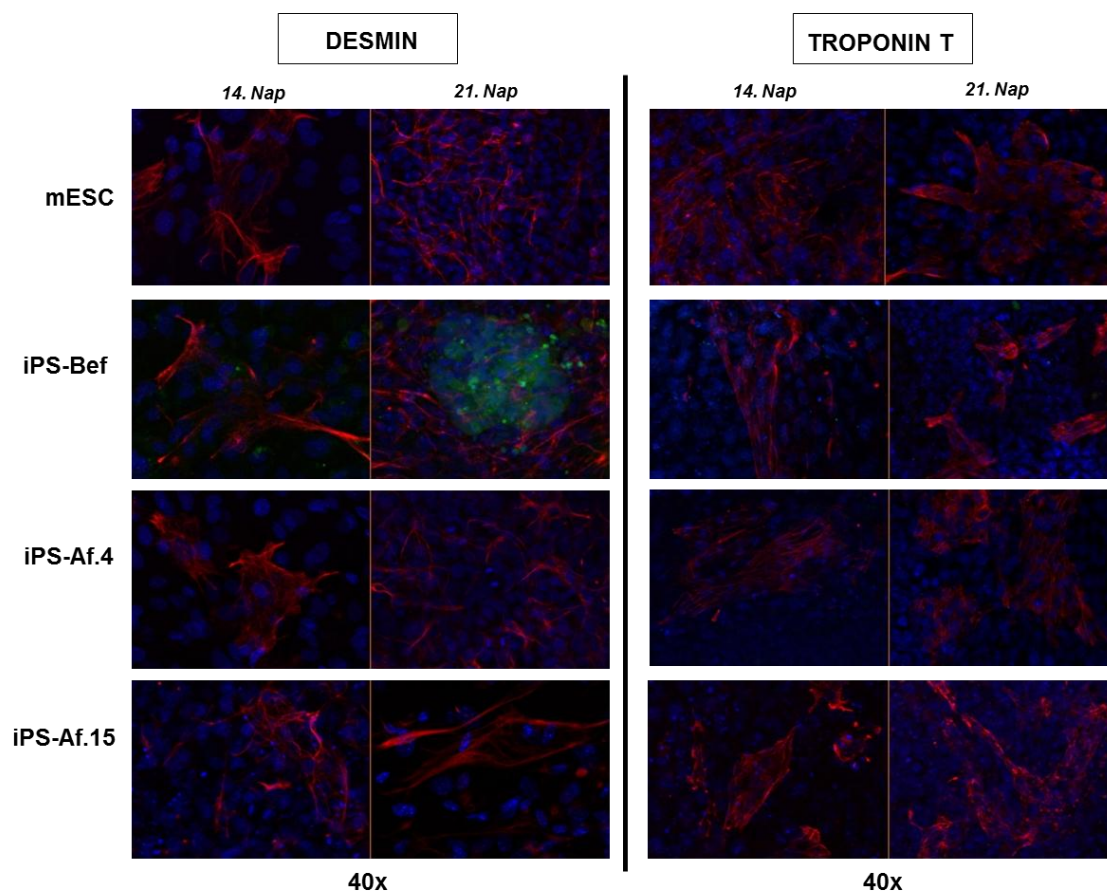
A HD módszerrel formált EB-ket egyesével, zselatinnal fedett felszínre tettük ki. Az mESC EB-k a differenciáció 7-8. napjára spontán kontrakciót mutató sejtcsomókat képeztek. Az iPS-Af.4 és iPS-Af.15 vonalak ehhez képest 2-3 napos késést mutattak, míg az iPS-Bef vonalból létrejött EB-k nem tapadtak le, illetve a kevés számban letapadt EB-k, csak a differenciáció 16-17. napján kezdtek el pulzálni. Igaz, hogy a transzgen eltávolításának eredményeként a kontrakáló sejtcsomók száma növekedett, de ez még mindig kevesebb volt a kontroll mESC vonalaknál megfigyeltékhez képest (**8. táblázat**).

#### 8. táblázat

A kontrakáló sejtcsomók száma a differenciáció 21. napjáig

	F1-ESC	iPS-Bef	iPS-Af.4	iPS-Af.15
Pulzáló sejtcsomók száma	20/22 (91 %)	9/23 (39,13 %)	16/24 (66,67 %)	13/24 (54,17%)

ICC-festésekkel igazoltuk, hogy az iPS-Af.4, iPS-Af.15 és iPS-Bef vonalak *in vitro* spontán differenciáció során kardiális szöveteket formáltak, melyek DESMIN-re (miogén marker) és a kardiális TROPONIN T-re (kardiális marker) pozitívak voltak (**23. ábra**).

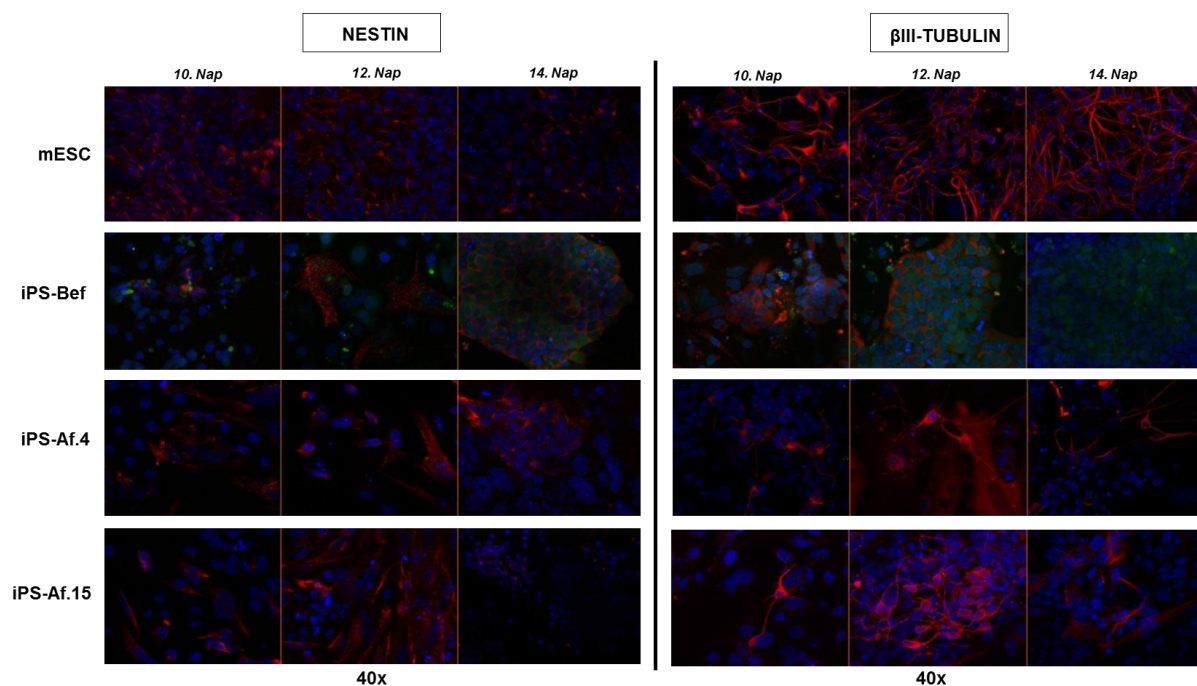


23. ábra

A kivágás előtti és utáni L-miPSC vonalak *in vitro* spontán/kardiális differenciációja. A fluoreszcens mikroszkóppal készített képek a differenciált sejtek ICC-festéseit mutatják kardiális markerekre a differenciáció 14. és 21. napján (kék: DAPI, piros: DESMIN, TROPONIN T, zöld: ektopikus EGFP).

#### 4.2.3.2. Az L-miPSC vonalak *in vitro* neurális differenciációja

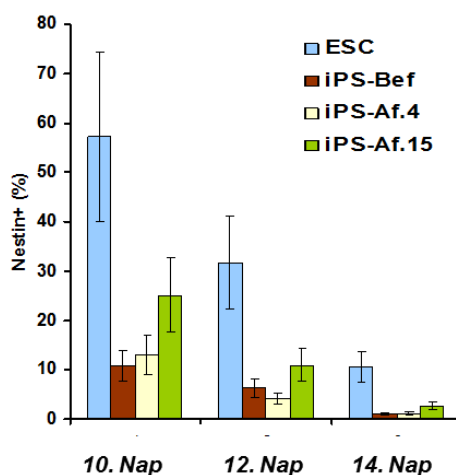
Az összes vizsgált vonal szuszpenzióban képes volt EB-k formálására, és az eredmények azt mutatták, hogy a két transzgén-mentes vonal képes volt neurális irányba differenciálódni. Azonban az iPS-Bef vonalban  $\beta$ III-TUBULIN festődés már nem volt kimutatható a differenciáció 14. napján. A transzgén eltávolítását követően a vonalak képesek voltak ektodermális irányba differenciálódni, és a  $\beta$ III-TUBULIN fehérje detektálható volt a differenciálódott sejtekben. ICC-festéssel a két kivágott szubklón neurális differenciációban nem észleltünk jelentős különbséget, sem a  $\beta$ III-TUBULIN sem pedig a NESTIN festődés esetében (24. ábra).



24. ábra

**A kivágás előtti és utáni L-miPSC vonalak *in vitro* neurális differenciációja.** A fluoreszcens mikroszkóppal készített képek a differenciált sejtek ICC-festéseit mutatják neurális markerekre a differenciáció 10. 12. és 14. napján (kék: DAPI, piros: NESTIN, βIII-TUBULIN, zöld: ektopikus EGFP).

A NESTIN mennyiségének FACS-al való meghatározása azt mutatta, hogy az iPS-Af.15 neurális irányú differenciációja hatékonyabb volt, mint az iPS-Af.4 vonalé (25. ábra). Ahogy az várható volt, minden vonal esetében a NESTIN expresszió a differenciáció 10. napján volt a legmagasabb és fokozatosan csökkent a 14. napig. A 10. napon az iPS-Bef vonal csak  $10,7 \pm 0,3\%$ , míg az iPS-Af.15 transzgen-mentes vonal  $25,1 \pm 0,8\%$  NESTIN expressziót mutatott. Habár ez az érték még mindig jelentősen alacsonyabb volt, mint az mESC vonal esetében kapott értékek ( $57,1 \pm 1,7\%$ ). Az iPS-Af.4 vonal pedig csak  $13,0 \pm 0,4\%$  NESTIN pozitív sejtet tartalmazott. Az mikroszkópos felvételek és a FACS eredmények közötti különbségek oka, hogy míg a mikroszkópos felvétel a sejtpopuláció egy kiválasztott részéről ad információt és nem kvantitatív, addig a FACS az egész populáció NESTIN expressziós szintjét reprezentálja.

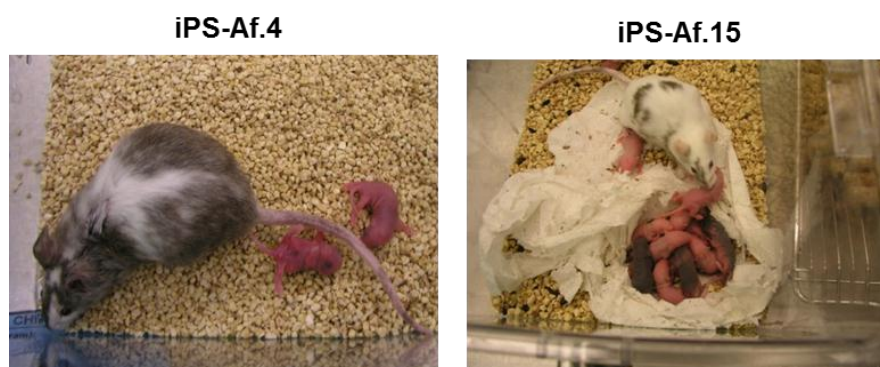


25. ábra

A kivágás előtti és utáni L-miPSC vonalak *in vitro* neurális differenciációja FACS analízissel mérve. A NESTIN expressziós szinteket FACS analízissel mértük a neurális differenciáció 10. 12. és 14. napján.

#### 4.2.4. Kiméra képzés és csírvonal transzmisszió

A fenti kísérleteink eredményei azt mutatták, hogy a transzgén jelenléte az iPSC-kben negatív hatással van a differenciációs képességre. Ezért az *in vivo* differenciációs képességet, azaz a kiméra állat képződést és csírvonal transzmissziós potenciált csak a transzgén-mentes vonalak esetében vizsgáltuk. Az iPS-Af.4 és az iPS-Af.15 vonal is képes volt kimérákat formálni, melyeknek erőssége a közepesről az igen erősig terjedt, amelyet az állatok szőrszíne indikált. Az élve született kiméák aránya az iPS-Af.4 esetében 39,1% (9/23), míg az iPS-Af.15 esetében 36,4% (8/22) volt. A kimérákat ICR egerekkel pároztattuk, amely során mindkét transzgén-mentes iPSC vonal csírvonal kompatibilitást mutatott, amire a született utódok között található fekete szőrszínű egerek utaltak (26. ábra).



26. ábra

A transzgén-mentes L-miPSC vonalak kiméra képzése és csírvonal transzmissziója. Mindkét transzgén-mentes vonal (iPS-Af.4 és iPS-Af.15) képes volt közepesről erős kimérák formálására, amelyek csírvonal kompetenciát mutattak (fekete szőrszínű utódok).

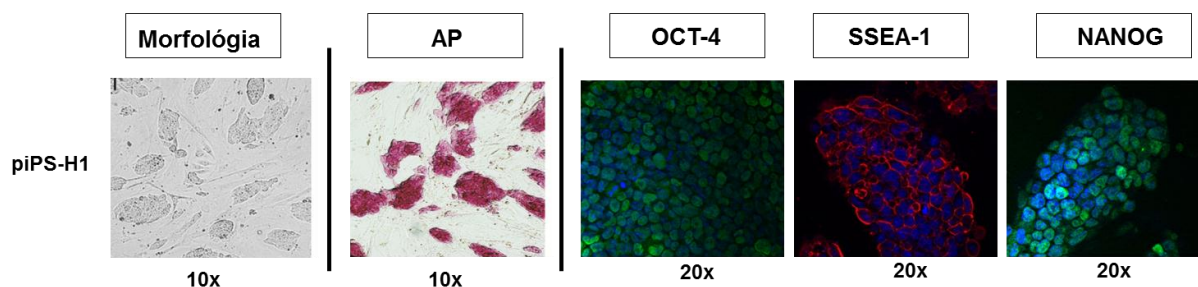
### 4.3 Az miPSC vonalak létrehozása fehérje bevitellel

#### 4.3.1. A P-miPSC vonal pluripotencia karakterizációja

Egy stabil P-miPSC vonalat sikerült alap fanunk, amelyet piPS-H1-nek nevezünk el. A piPS-H1 vonal a normál mESC-khez hasonló morfológiát és növekedési potenciált mutatott, amelyet a **27. ábra** szemléltet.

A létrehozott piPS-H1 vonal stabilitása megfelelő volt (több mint 20 passzáson keresztül megtartotta differenciálatlan állapotát) és alkalmas volt a pluripotencia karakterizációs tesztek elvégzésére.

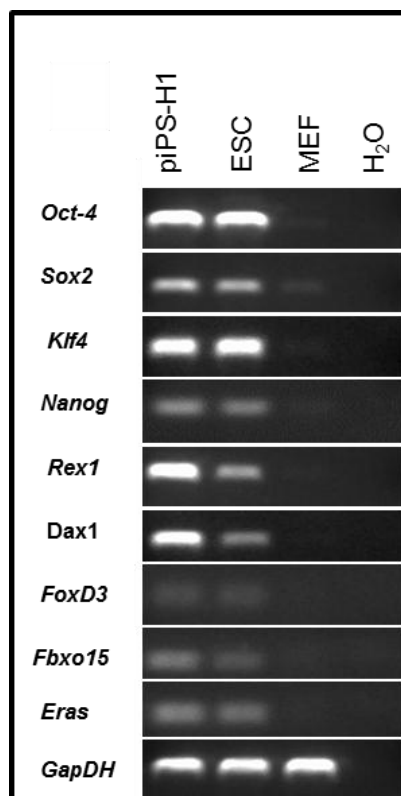
A pluripotencia további ellenőrzésére a piPS-H1 vonalon AP- és ICC-festéseket végeztünk, amelyekkel igazoltuk a sejtek AP-pozitivitását és az OCT-4, NANOG, és SSEA-1 pluripotencia markerek jelenlétét (**27. ábra**).



**27. ábra**

**A piPS-H1 vonal morfológiája, AP- és ICC-festései.** A fénymikroszkópos felvételek az iPSC vonal morfológiáját és AP-festését mutatja. A fluoreszcens mikroszkóppal készített képek a sejtvonal ICC-festéseit mutatják a pluripotencia markerekre (kék: DAPI, piros: SSEA-1, zöld: OCT-4, NANOG).

Az RT-PCR reakciókkal igazoltuk a fontosabb endogén pluripotencia gének újraaktiválódását, melyek expressziója a kontroll mESC vonalhoz hasonlóan a piPS-H1 vonalban is detektálhatóak voltak (**28. ábra**).

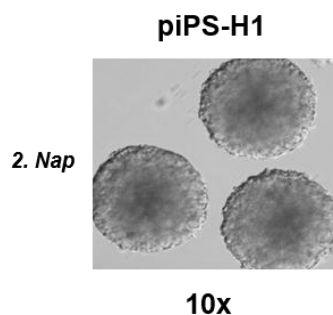


28. ábra

**A P-miPSC vonal pluripotencia génexpressziós mintázata.** A pluripotencia gének újraaktiválódását igazoló RT-PCR reakciók, amelyekben az alkalmazott primerek az endogén pluripotencia markerekre voltak specifikusak.

#### 4.3.2. A P-miPSC vonal *in vitro* spontán/kardiális differenciációja

Az *in vitro* differenciációs kísérleteket szintén a pluripotens állapot ellenőrzések éppen végeztük el az piPS-H1 vonalon. Az mESC vonalakhoz hasonlóan a vizsgált piPS-H1 sejtvonal a HD módszer alkalmazásával képes volt kompakt EB-ket formálni LIF-mentes tenyésztő médiumban (29. ábra).



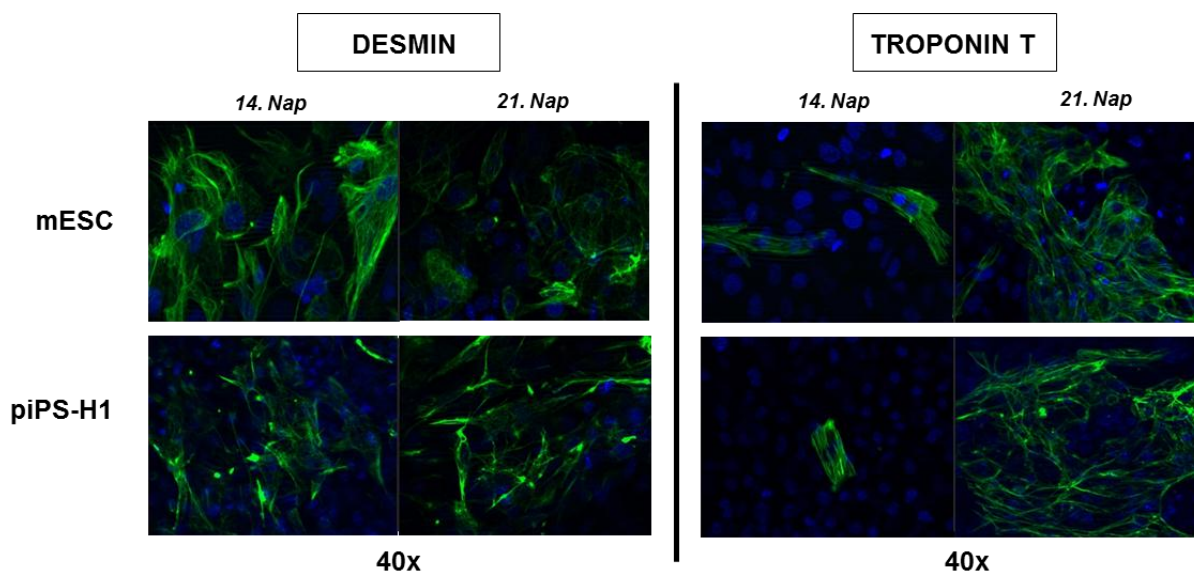
29. ábra

**Az P-miPSC vonal *in vitro* differenciációja.** Fénymikroszkóppal készített felvételek a HD módszerrel aggregált EB-k morfológiájáról a differenciáció második napján.



#### 4.3.2.1. A piPS-H1 vonal *in vitro* spontán/kardiális differenciációja

A differenciáció 6. napján a felületre egyesével kitett EB-k kontrahálni kezdtek (22/24), és a 7. napra mind a 24 darab kitett EB kontrakciót mutatott, csak úgy, mint a kontroll mESC vonal. A sejteket tovább tenyésztettük és a 14. valamint 21. napon ICC-festéssel ellenőriztük a kardiális TROPONIN T és DESMIN marker jelenlétét. Mind a piPS-H1 mind pedig a kontroll mESC vonal erős pozitívítást mutatott a vizsgált markerekre (**30. ábra**).



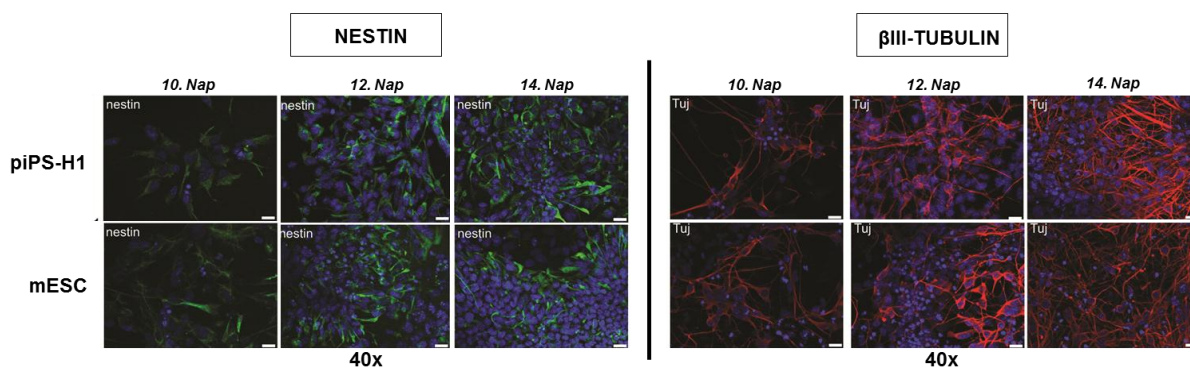
**30. ábra**

**A P-miPSC vonal *in vitro* spontán/kardiális differenciációja.** A fluoreszcens mikroszkóppal készített képek a differenciált sejtek ICC-festéseit mutatják kardiális markerekre a differenciáció 14. és 21. napján (kék: DAPI, zöld: DESMIN, TROPONIN T).

#### 4.3.2.2. A piPS-H1 vonal *in vitro* neurális differenciációja

A piPS-H1 vonal szuszpenzióban képes volt EB-k formálására, és neurális irányú differenciációra *in vitro*, csak úgy, mint a kontroll mESC. A sejtek pozitív festődést mutattak a vizsgált NESTIN és  $\beta$ III-TUBULIN neurális markerekre (**31. ábra**). A FACS-al mért NESTIN expresszió a piPS-H1 vonal esetében, ahogy az várható volt a differenciáció 10. napján volt a legmagasabb (49,5%) és fokozatosan csökkent a 14. napig (4,24%).





31. ábra

**A P-miPSC vonal *in vitro* neurális differenciációja.** A fluoreszcens mikroszkóppal készített képek a differenciált sejtek ICC-festéseit mutatják neurális markerekre a differenciáció 10. 12. és 14. napján (kék: DAPI, piros:  $\beta$ III-TUBULIN, zöld: NESTIN).

#### 4.3.3. A P-miPSC vonal kimérai képzési képessége

Az piPS-H1 vonal *in vivo* differenciációs képességét is vizsgáltuk kimérai tesztekben, ahol a p8-9 iPSC sejteket F1 hibrid hódgyagcsra állapotú embriókba mikroinjektáltuk. Az egerek, amelyek ezekből az embriókból születtek különböző mértékű kimérizmust mutattak (32. ábra), amelyet szőrszínük indikált. Az élve született kimérai aránya 34% (11/32) volt. Azonban a kimérai további tesztek során nem mutattak csírvonal kompetenciát.

#### piPS-H1



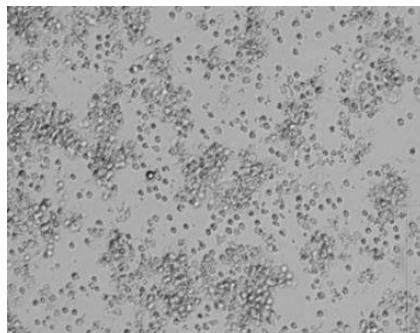
32. ábra

**A P-miPSC vonal kimérai képzése.** A vizsgált piPS-H1 sejtvonal képes volt kimérai formálásra, amelyek különböző mértékű kimérizmust mutattak.

## 4.4 Transzgen-mentesíthető hiPSC vonalak létrehozása lentivírus transzdukcióval

### 4.4.1. Humán vérből származó PBMC-k újraprogramozása lentivirussal

A humán PBMC-k újraprogramozásához a C. Baum és munkatársaitól kapott policensztronos vektort használtuk (9. ábra). Az öt donortól vett vérből (B#1-5; B=blood) izolált PBMC-k szuszpenzióban tartott sejtmorfológiáját a transzdukció napján egy reprezentatív ábra mutatja be (33. ábra).

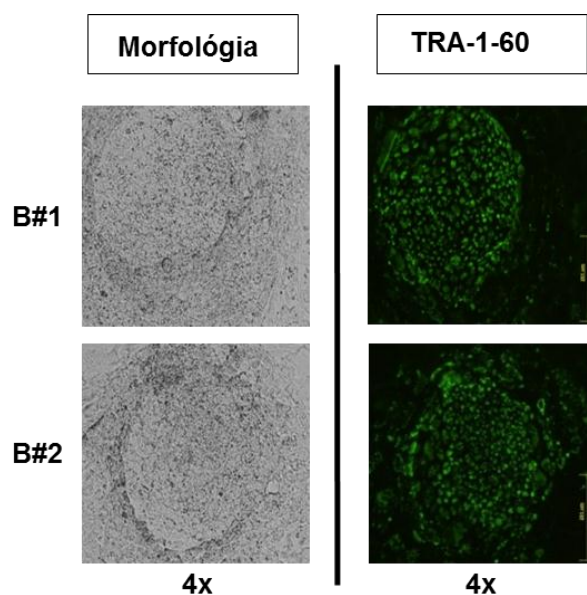


4x

33. ábra

Az izolált PBMC-k szuszpenzióban tartott sejtmorfológiája a transzdukció napján

15-18 nappal a transzdukciót követően a megjelent humán ESC (hESC)-szerű kolóniákat egyenként felszedtük. A felszedést megelőzően a sejteket *in vivo* festettük a TRA-1-60 markerre. A kolóniák morfológiáját és azok élő ICC-festését a 34. ábra reprezentálja.



34. ábra

Az L-hiPSC kolóniák felszedés előtti morfológiája és élő ICC-festése. A bal oldali panel a fénymikroszkóppal készített képeket mutatja. A jobb oldali panel a fluoreszcens mikroszkóp által készített képeket mutatja, amelyen a TRA-1-60 *in vivo* ICC-festése látható (zöld: TRA-1-60).

Az izolált kolóniákat felszaporítottuk és azokból, amelyek képesek voltak megtartani ESC-szerű morfológiájukat stabil vonalakat hoztunk létre. Az öt donorból létrejött ESC-szerű kolóniák-, a felszedett kolóniák- és az azokból létrejött stabil vonalak-számát a **9. táblázat** mutatja.

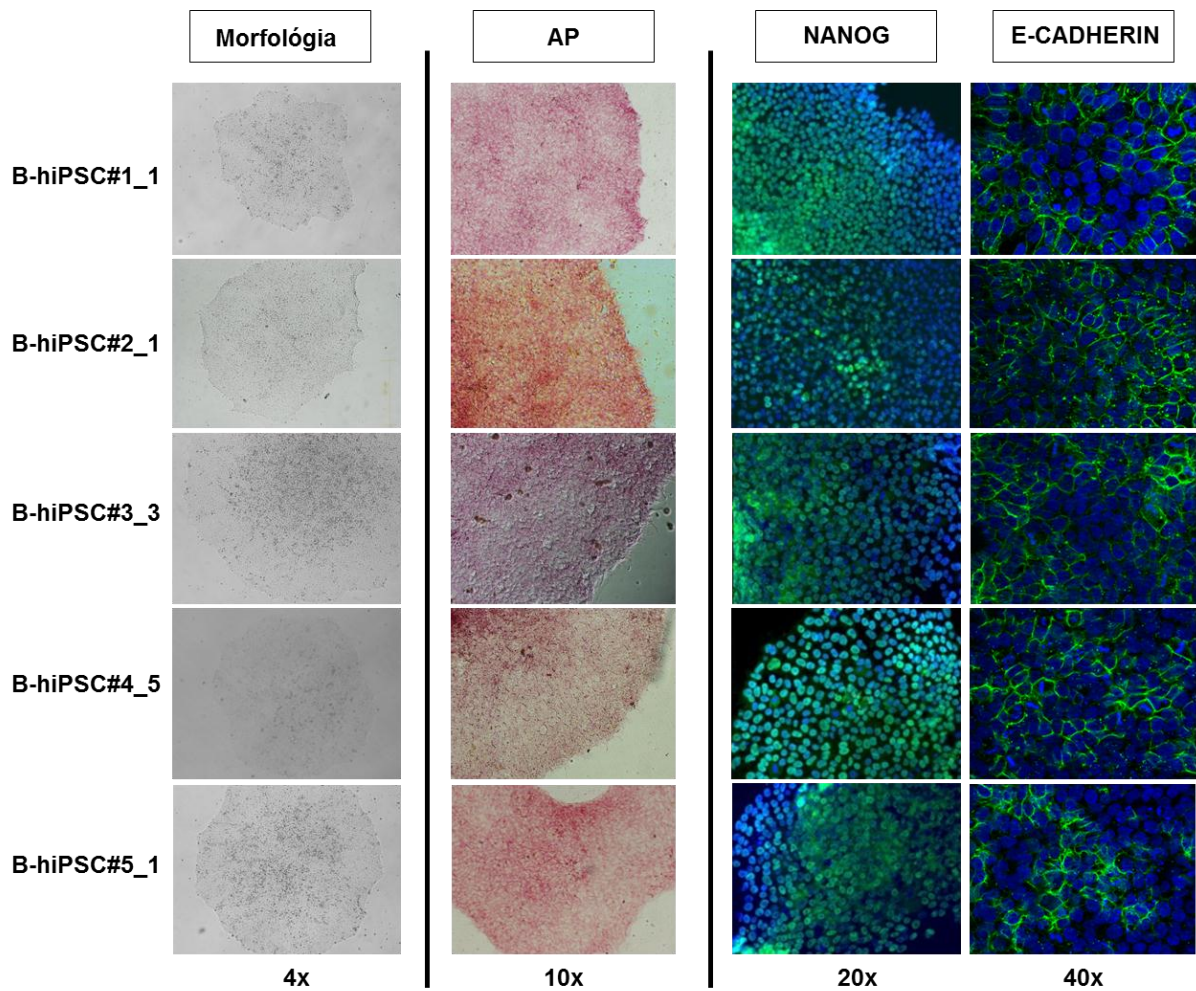
#### 9. táblázat

A PBMC-ből létrejött ESC-szerű kolóniák-, a felszedett kolóniák- és az azokból létrejött stabil vonalak-száma

Vérdonor	Megjelent kolóniák száma	Felszedett kolóniák száma	Alapított stabil vonalakszáma
B#1	~70	8	6
B#2	~80	7	6
B#3	~40	7	7
B#4	~30	6	5
B#5	1	1	1

#### 4.4.2. Az L-hiPSC vonalak pluripotencia karakterizációja

A stabil vonalak pluripotenciáját NANOG és E-CADHERIN ICC-, valamint AP-festéssel ellenőriztük, ahol az összes L-hiPSC vonal pozitív festődést mutatott. Az öt donor egy-egy reprezentatív vonalát az **35. ábra** szemlélteti, amelyen a morfológia, AP- és ICC-festések láthatóak. A stabil L-hiPSC vonalak képesek voltak fenntartani hESC-szerű morfológiájukat mind tálaló sejtréteg-mentes, mind pedig tálaló sejtréteg-függő tényezők körülmények között, amiben felszaporítottuk és hosszú távú tárolás céljából lefagyasztottuk azokat a lehető legkorábbi passzázban (p3-p5).



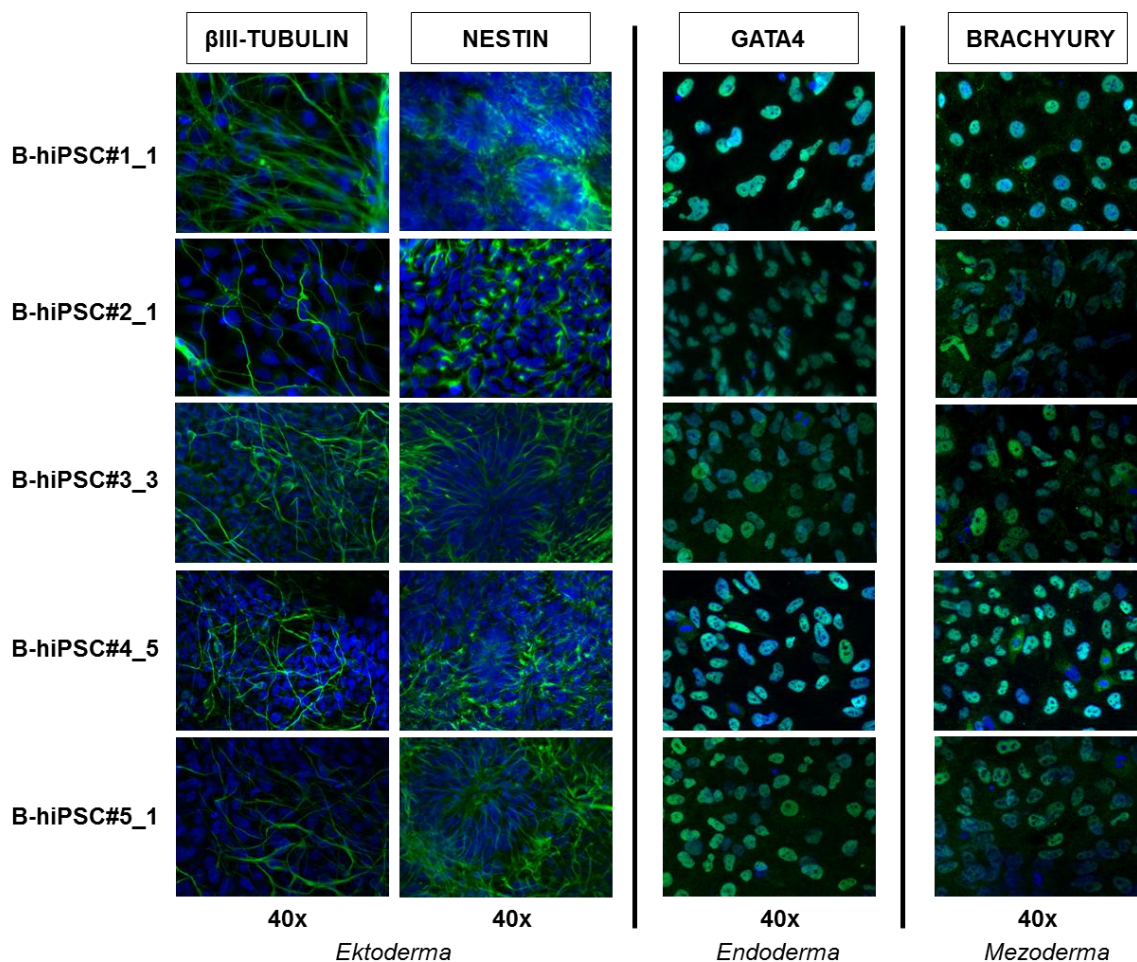
35. ábra

**Az L-hiPSC vonalak morfológiája, AP- és ICC-festései.** A fénymikroszkópos felvételek az iPSC vonalak morfológiáját és AP-festését mutatja. A fluoreszcens mikroszkóppal készített képek a sejtvonalak ICC-festéseit mutatják a pluripotencia markerekre (kék: DAPI, zöld: NANOG, E-CADHERIN).



#### 4.4.3. Az L-hiPSC vonalak spontán differenciációja

Az 5 donorból alapított L-hiPSC vonalokból morfológiai kritériumok alapján egyet-egyét kiválasztottunk (B-hiPSC#1\_1, B-hiPSC#2\_1, B-hiPSC#3\_3, B-hiPSC#4\_5, B-hiPSC#5\_1) és teszteltük *in vitro* spontán differenciációs képességüket. Mind az öt vonal képes volt EB-ket formálni szuszpenzióban. A differenciáció 5. napjától az EB-ket zselatinizált fedőlemezen tenyésztettük tovább és a 14. napon a sejteket fixáltuk. A fixált sejteket a három csírarétegre jellemző markerekkel festettük:  $\beta$ III-TUBULIN, NESTIN, GATA4, BRACHYURY. Mind az öt vonal a vizsgált markerekre pozitív festődést mutatott, igazolva így a vonalak *in vitro* spontán differenciációs képességét a három csíraréteg irányába. A spontán differenciáció 14. napi ICC-festését a három csíraréteg markereire a **36. ábra** szemlélteti.



36. ábra

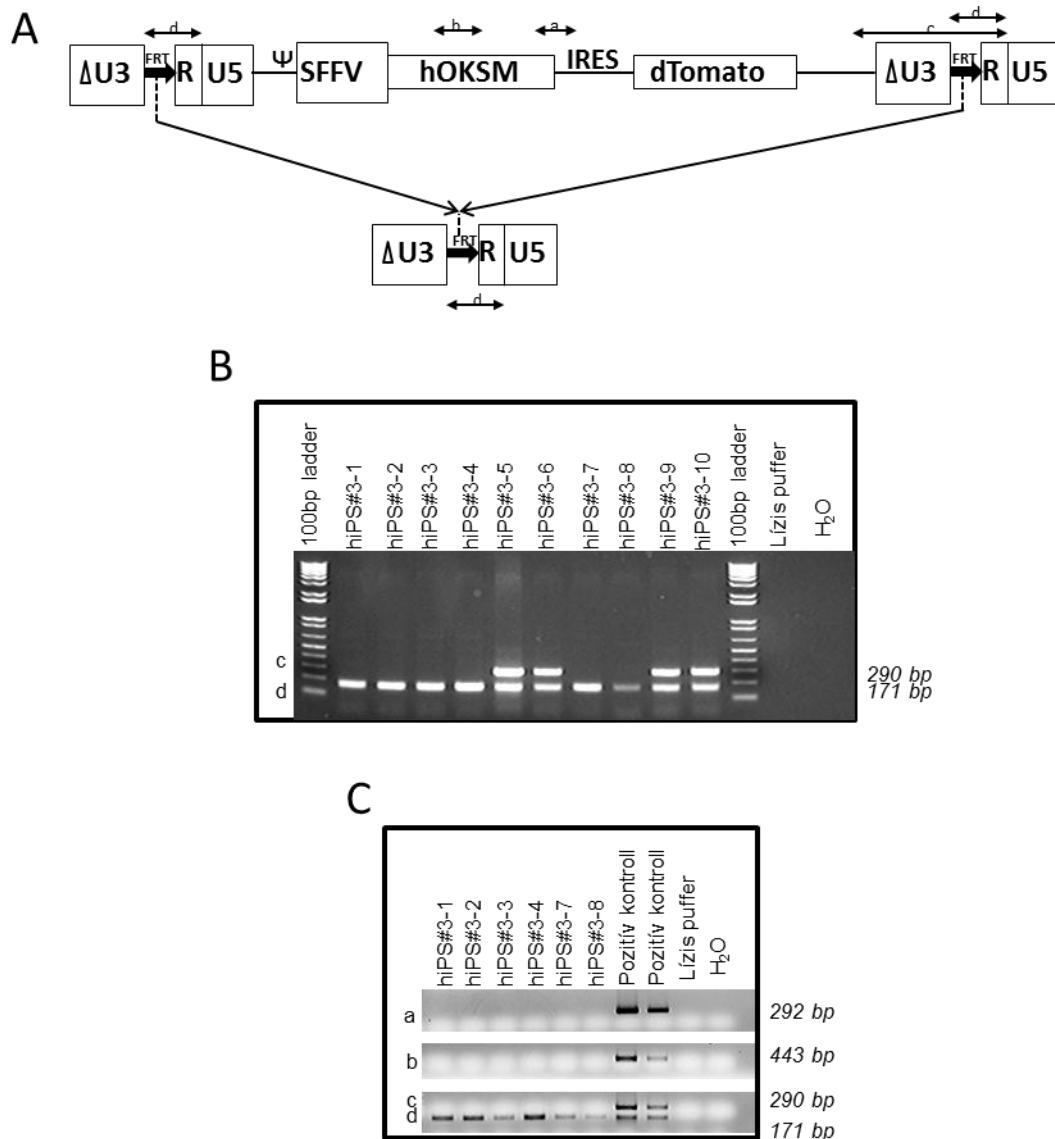
**A B-hiPSC vonalak *in vitro* spontán differenciációja.** A fluoreszcens mikroszkóppal készített képek a differenciált sejtek ICC-festéseit mutatják a három csírarétegre-specifikus markerekre, a differenciáció 14. napján (kék: DAPI, zöld:  $\beta$ III-TUBULIN, NESTIN, GATA4, BRACHYURY).

#### 4.4.4. Az L-hiPSC vonalak transzgén-mentesítése

A 4.2-es bekezdésben ismertetett transzgén-mentes L-miPSC létrehozásánál szerzett tapasztalatokat használtuk fel transzgén-mentes L-hiPSC vonalak előállításához. A humán újraprogramozó hOKSM vektor hasonló módon az mOSKM vektorhoz, eltávolítható volt a genomból, az Flp/FRT-rendszer segítségével. Az Flp-vektor puromicint is tartalmazott az egénél alkalmazott Cre-rekombinázt expresszáló plazmiddal ellentétben. Emellett egy továbbfejlesztett klón szelekciós rendszert is alkalmaztunk, lehetővé téve a nagyszámú klón integrációra való ellenőrzését.

A transzgén-mentesítést Dr. Cheryl Dambrot kolléganőmmel (Hollandia, Leiden University Medical Center) végeztem az általa előállított L-hiPSC vonalakon. Ezek a hiPSC vonalak humán fibroblasztból kerültek újraprogramozásra, ugyanazzal a módszerrel, amelyet a 3.5-ös bekezdésben előzőleg ismertettem. Az alábbi munka Cheryl Dambrot (2013) doktori értekezésének anyaga, emellett az eredményeket 2014-ben közös publikációban közöltük (Dambrot et al. 2014). Ebben a munkában a transzgén eltávolítását, és annak ellenőrzését hajtottam végre, amelyet az alábbiakban ismertetek. A sejtvonalak további karakterizációját az LUMC munkacsoportja végezte, ezért azok az eredmények ebben a dolgozatban nem kerülnek részletezésre.

Hét L-hiPSC vonalból (hiPS#1, hiPS#2, hiPS#3, hiPS#4, hiPS#9, hiPS#12, hiPS#13) készítettük meg a transzgén eltávolítását, a Flp-rekombinázt alkalmazásával. A hét vonal esetében a puromicin szelekciót túlélő kolóniákat ellenőriztük (max. 60 kolónia/vonal) és csak azokat tenyésztettük tovább, amelyekben sikerült igazolni a kivágást (max. 6 kolónia/vonal). A kivágást először a "3 primer-alapú módszerrel" ellenőriztük. A klónok transzgén-mentességét az újraprogramozó vektorra specifikus PCR reakciókkal is megerősítettük. A **37A. ábra** a feljebb ismertetett (3.5.2. és 3.5.4. bekezdés) újraprogramozó vektort ábrázolja kivágás előtt és után, amin a felhasznált PCR primerek elhelyezkedését is feltüntettük. A **37B. ábra** a kivágást ellenőrző „3 primer-alapú módszerrel” végzett PCR reakciók eredményeit mutatja, amelyet a hiPS#3 vonalból származó random módon kiválasztott klónokon végeztünk el. Látható, hogy a 10 klónból 6 tűnt transzgén-mentesnek (hiPS#3-1, hiPS#3-2, hiPS#3-3, hiPS#3-4, hiPS#3-7, hiPS#3-8). Ezt a hat klónt továbbtenyésztettük és transzgén-mentes stáuszukat további PCR reakciókkal erősítettük meg, amelyet a **37C. ábra** mutat.



37. ábra

**Az L-hiPSC vonalak transzgén-mentességének igazolása PCR-el.** **A)** A humán OKSM vektor sematikus ábrázolása kivágás előtt és után a PCR primer kombinációk (kétféjű nyilak a, b, c, d jelöléssel) vektoron való elhelyezkedésének feltüntetésével. **B)** A hiPS#3 klónok Flp-rekombináz expresszióját követő random felszedett klónok transzgén-mentességének igazolása PCR analízissel. A 'c' és 'd' primer kombinációkat egyetlen PCR reakcióban használtuk ahol a reverz primer ugyanaz volt ("3 primer-alapú módszer"). A 'c' primer kombináció egy 290 bp amplikont eredményez, amely a vektor kivágását követően nem látható. Míg a 'd' primer kombináció egy 171-bp amplikont eredményez a transzgén-mentes és transzgént-tartalmazó klónokban egyaránt. Ezek alapján a tíz vizsgált klónból hat látszott transzgén-mentesnek. **C)** A hat klón (hiPS#3-1, hiPS#3-2, hiPS#3-3, hiPS#3-4, hiPS#3-7, hiPS#3-8) transzgén-mentes státuszát további PCR reakciókkal is megerősítettük az 'a' és 'b' primer kombinációkkal.

A további hat vonal esetében is a hiPS#3 vonalon bemutatott séma alapján jártunk el. A hét vonalból hatban (hiPS#1, hiPS#2, hiPS#4, hiPS#9, hiPS#12, hiPS#13) sikerült transzgén-mentes vonalakat létrehozni. A kivágás hatékonysága 20-98% között változott (transzgén-mentes klónok száma/vizsgált klónok száma), amelyet a **10. táblázat** mutat be.

**10. táblázat**

A transzgén kivágásának hatékonysága az L-hiPSC vonalakban

L-hiPSC neve	Hatékonyság (%)
hiPS#1	98
hiPS#2	24
hiPS#3	60
hiPS#4	20
hiPS#9	0
hiPS#12	43
hiPS#13	40

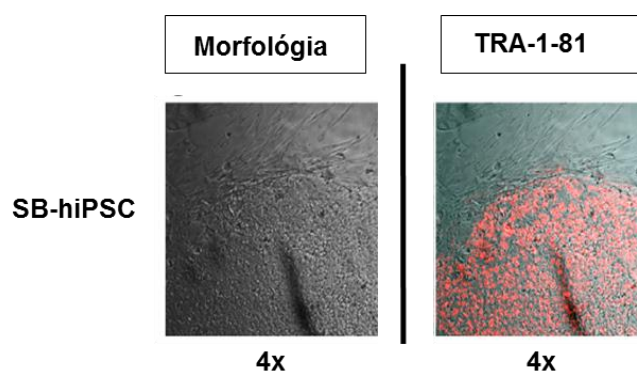


## 4.5 Transzgén-mentesíthető hiPSC vonalak létrehozása SB-transzpozonnal

### 4.5.1. HFF újraprogramozása SB-transzpozonnal

A humán magzati származó fibroblasztot a második passzázsban a transzpozon-transzpozáz vektor párossal transzfektáltuk. A HFF újraprogramozásához az általunk közölt (Muenthaisong et al. 2012) Sleeping Beauty-transzpozon alapú vektort használtuk (pT2BH-OSKM-IRES/eGFP, **12. ábra**).

14 nappal a transzfekciót követően sejtsomók jelentek meg, amelyek EGFP-t expresszártak. Körülbelül négy hét elteltével a megjelent 4 hESC-szerű kolóniát egyenként izoláltuk és tenyésztettük tovább *in vitro*. Az izolációt megelőző kolónia morfológiákat és azok élő ICC-festését a TRA-1-81 pluripotencia markerre a **38. ábra** reprezentálja.

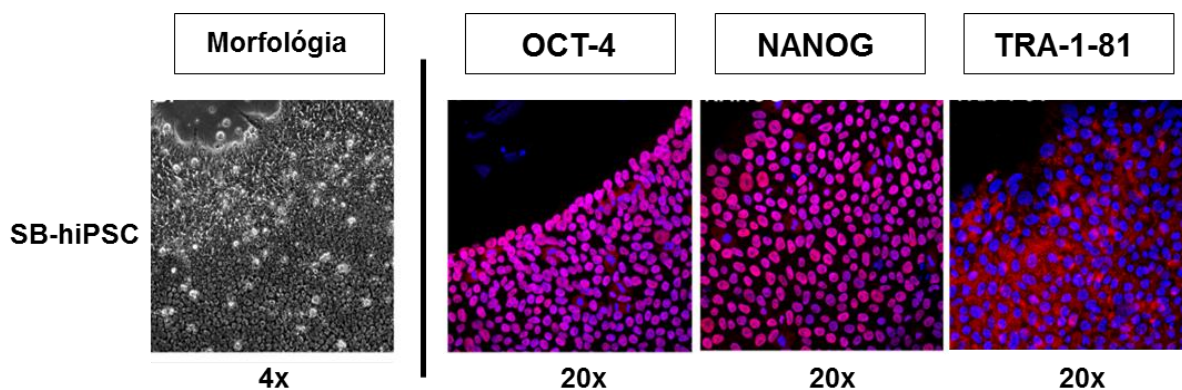


**38. ábra**

**Az SB-hiPSC kolóniák felszedés előtti morfológiája és élő ICC-festése.** A bal oldali panel a fénymikroszkóppal készített képet mutatja. A jobb oldali panel a fluoreszcens mikroszkóppal készített képet mutatja, amelyen a TRA-1-81 *in vivo* ICC-festése látható (piros: TRA-1-81).

### 4.5.2. Az SB-hiPSC vonalak pluripotencia karakterizációja

A stabil vonalak pluripotenciáját NANOG, OCT-4, és TRA-1-81 markerekre való ICC-festésekkel ellenőriztük. Mind a négy SB-hiPSC (SB1, SB2, SB4, SB5) a vizsgált markerekre pozitív festődést mutatott. Egy reprezentatív vonal morfológiáját és ICC-festéseit a **39. ábra** szemlélteti. A stabil SB-hiPSC vonalak képesek voltak fenntartani hESC-szerű morfológiájukat tápláló sejtnégy-mentes és tápláló sejtnégy-függő tenyésztési körülmények között egyaránt, amiben felszaporítottuk és hosszú távú árolás céljából lefagyasztottuk azokat a lehetséges legkorábbi passzázsban (p5).

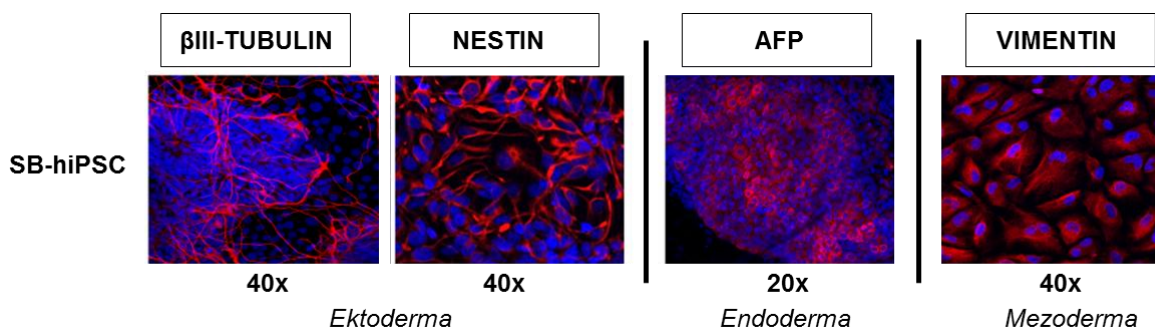


39. ábra

**Az SB-hiPSC vonalak morfológiája, és ICC-festései.** A fénymikroszkópos felvételek az iPSC vonalak morfológiáját mutatják. A fluoreszcens mikroszkóppal készített képek a sejtvonalak ICC-festéseit mutatják a pluripotencia markerekre (kék: DAPI, piros: OCT-4, NANOG, TRA-1-81).

#### 4.5.3. Az SB-hiPSC vonalak spontán differenciációja

Az SB-hiPSC vonalakat *in vitro* differenciációs képességükre is teszteltük. Ennek érdekében a sejteket szuszpenziós körülmények között tenyésztettük, ahol azok képesek voltak EB-ket képezni. Az EB-ket disszociáltuk, majd a differenciáció 14. napján vizsgáltuk, ahol mind a négy vonal expresszálta a 3 csírarétegre jellemző markereket ( $\beta$ III-TUBULIN, NESTIN, AFP, VIMENTIN). Az SB-iPSC vonalak differenciációs markerekre specifikus ICC-festéseit egy reprezentatív vonal (SB2) szemlélteti a **40. ábrán**.

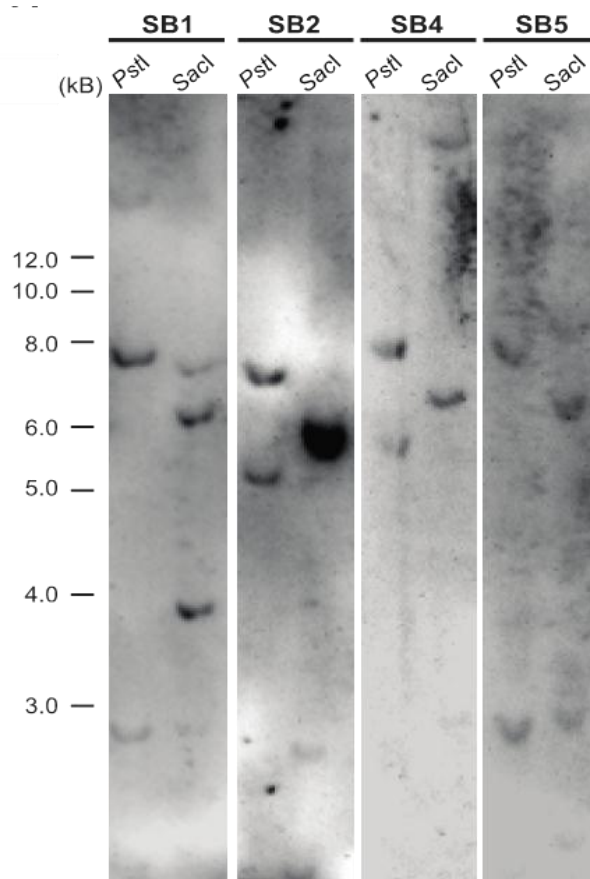


40. ábra

**Az SB-hiPSC vonalak *in vitro* spontán differenciációja.** A fluoreszcens mikroszkóppal készített képek a differenciált sejtek ICC-festéseit mutatják a három csírarétegre specifikus markerekkel a differenciáció 14. napján (kék: DAPI, piros:  $\beta$ III-TUBULIN, NESTIN, AFP, VIMENTIN).

#### 4.5.4. Az SB-hiPSC vonalak transzgenmentesítése

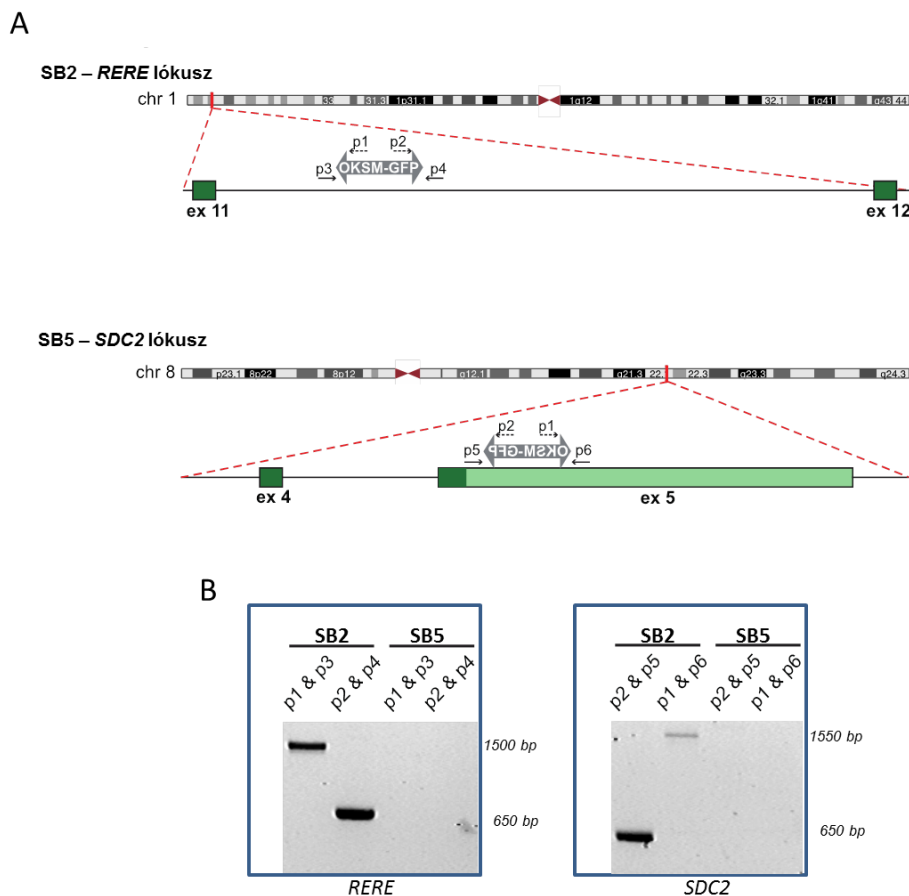
Southern blot analízis segítségével meghatároztuk az egyes vonalak genomjába integrálódott transzpozon vektorok számát. A Southern blot analízis alapján minden vonal 2-3 integrációt mutatott, amelyet a **41. ábra** szemléltet. Mivel a négy vonalban az integrációk száma nagyjából azonos volt, így morfológia és növekedési potenciál alapján az SB2 és SB5 vonalakat választottuk ki azok transzgenmentesítése céljából.



41. ábra

**A transzpozon integrációk száma Southern Blot analízissel az SB-hiPSC klónokban.** Az SB1, SB2, SB4 és SB5 klónokból származó genomális DNS-t *SacI*-el és *PstI* enzimekkel emésztettük és az *EGFP* szekvenciát használtuk próbaként. A négy vonal 2-3 integrációt mutatott.

A transzpozonok kivágódó/újraintegrálódó („jumping effect”) tulajdonsága korábbi publikációkból ismert volt számunkra (Wang et al. 2008; Li et al. 2013), így az integrációk helyét Splinkerette PCR segítségével próbáltuk meghatározni, hogy azok követhetőek legyenek esetleges újraintegrálódásuk esetén. A Splinkerette PCR segítségével a két vizsgált vonalban lévő integrációs helyekből csak egy-egy integrációs helyet sikerült azonosítani. Az SB2 vonal esetében ezt az integrációs helyet az 1.-es kromoszómán azonosítottuk, ahol a transzgen a *RERE* intron szakaszába épült be. Az SB5 esetében a transzgen inverz formában a 8.-as kromoszómán található *Syndecan 2* gén (*SDC2*) 3' UTR régiójába integrálódott. Az inszerciók lokációjának sematikus ábráját és az ez alapján tervezett lokusz specifikus primereket a 42A. ábra mutatja be. A Splinkerette PCR-el megtalált SB-inszerciók lokációját az SB2 és SB5 vonalakban lokusz specifikus PCR-ekkel erősítettük meg, amelyet a 42B. ábra szemléltet. SB2 esetében a transzgen integrációt sikerült megerősítenünk az *RERE* lokuszban, ami az SB5 vonalnál nem volt detektálható. Még az SB5 vonal esetében a transzpozon integrációt az *SDC2* lokuszban sikerült megerősítenünk, ami pedig az SB2-nél nem volt látható.

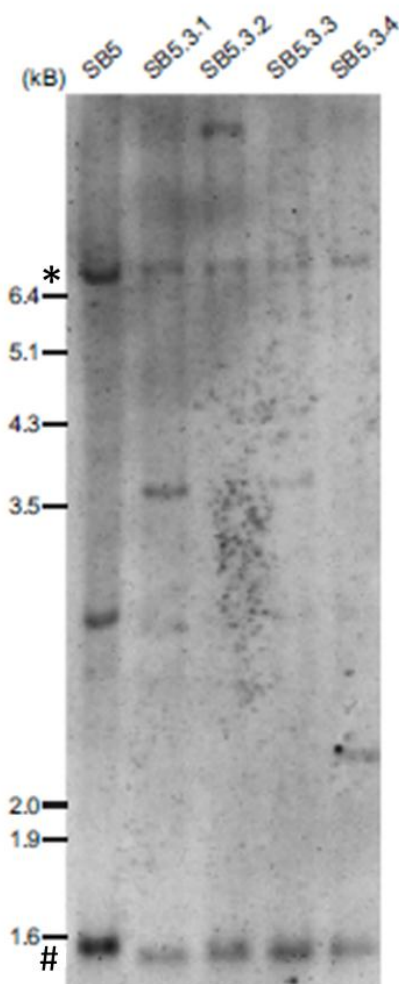


42. ábra

**Az SB2 és SB5 vonalakban a transzpozon integrációk helyének sematikus ábrázolása és lókuszt-specifikus PCR reakciói. A)** A két vonalban egy-egy SB-integrációt Splinkerette PCR-el sikerült meghatározunk, melyeknek genomialis elhelyezkedését sematikus ábrázoltunk. Feltüntettük a PCR reakciókhoz alkalmazott lókuszt-specifikus PCR primer kombinációkat is (fekete nyilak p1-p6 jelöléssel). Az SB5 vonal esetén az *SDC2* lókusztban a transzpozon (kétfejtű nyilak) inverz formában integrálódott. Az exonok kódoló szekvenciáit sötétzölddel, míg az aminosavvá át nem íródó (untranslated) exon régiókat világoszölddel jelöltünk. **B)** A lókuszt specifikus PCR-ekkel a Splinkerette PCR-el meghatározott inszerciók genomialis elhelyezkedését erősítettük meg. Az transzpozon integrációt SB2-ben az *RERE* lókusztban erősítettük meg, ami az SB5 vonalnál nem volt detektálható. Míg az SB5 vonal esetében a transzpozon integrációt az *SDC2* lókusztban sikerült megerősítenünk, ami pedig az SB2-nél nem volt látható a PCR-ek alapján.

Az SB5 és SB2-es vonalak egy-egy inszerciós helyének ismeretében megkíséreltük azok transzgen-mentesítését. Az SB2-t és SB5-t a pEFBOS-SB100X-IRESpuro transzpozázzal transzfektáltuk, majd egy nappal a transzfekciót követően 48 órán át tartó puromicin szelekciót végeztünk a sejteken. A túlélő kolóniákban a kivágódást PCR reakcióval ellenőriztük, ahol a primer párok vagy lókuszt specifikusak, vagy transzgen specifikusak voltak. Mindkét vonal esetében 60-60 kolóniát ellenőriztünk, azonban nem találtunk olyat, amelyből a transzgent sikerült eltávolítani. Annak tesztelésére, hogy a többszöri transzfekció növeli-e a kivágás valószínűségét, néhány egyszeresen transzfektált SB5 klónt újra-transzfektáltunk a pEFBOS-SB100-IRESpuro vektorral, szelekciót végeztünk és nagyszámú

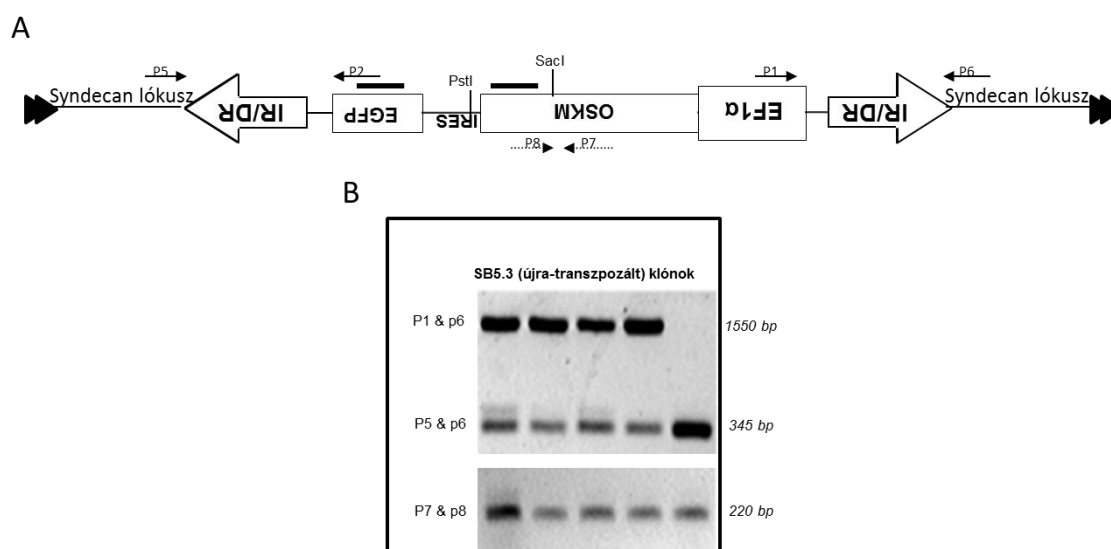
túlélő kolóniát ellenőriztünk, azonban továbbra sem találtunk transzgen-mentes vonalakat. Az SB5.3 kétszeresen transzfektált klónt ismét transzfektáltuk az eddigiekkel azonos módon. Négy szelektált háromszorosan (SB5.3.1, SB5.3.2, SB5.3.3, SB5.3.4) transzfektált klónon Southern blot analízist végeztünk és azt találtuk, hogy ezek a klónok esetében az *SDC2* lokuszban azonosított transzgen még mindig jelen volt, azonban a transzpozon a második genomik lokuszból kivágódott és egy másik genomik régióba újraintegrálódott (43. ábra).



43. ábra

**Southern blot analízis az SB5 klónban háromszoros transzfektálást követően.** Az SB5 klón (két inszerciót tartalmaz) és annak a pEFBOS-SB100X-IRESpuro transzpozózával többszörösen újra-transzfektált klónjai (SB5.3.1, SB5.3.2, SB5.3.3, SB5.3.4), ahol a genomik DNS-t *SacI*-el emésztettük és a *c-Myc* kódoló szekvenciáját használtuk próbaként. A ~1.5 kB sáv (jelölés:#) az endogén *C-MYC* jelenlétét detektálja az összes vonalban. A \*-al jelölt sávok az *SDC2* lokuszba integrálódott transzpozonnak felelnek meg, amelyet egyik klón esetében sem sikerült mobilizálni. A harmadik sáv a második genomik régióba integrálódott transzpozont mutatja, amely az egyes újra-transzfektált klónok esetében méretében eltér egymástól, valamint az eredeti SB5 klónban detektált sáv méretével sem egyezik meg. Ez a jelenség indikálja, hogy a második genomik lokuszban látott transzpozon kivágódott az eredeti integrációs helyéből és újra-integrálódott egy másik genomik régióba a transzpozáz többszöri újra-transzfektálásának következtében.

További háromszorosan újra-transzfektált SB5 klónt teszteltünk lókuszt- és transzpozon-specifikus PCR-ekkel (**44B. ábra**). Egy klón esetén látható, hogy az *SDC2* lókuszból a transzgen már nincs jelen (p1-p6), azonban a transzpozon specifikus primer párokkal igazoltuk (p7-p8), hogy az továbbra is a genomban van, feltételezhetően egy másik pozícióban. A **44A. ábra** a már ismertetett (3.6.2. és 3.6.3. bekezdés) újraprogramozó vektort ábrázolja a *SDC2* lókuszból integrálódva, amin az alkalmazott PCR primerek és a Southern blot-hoz használt próbák elhelyezkedését is feltüntettük.

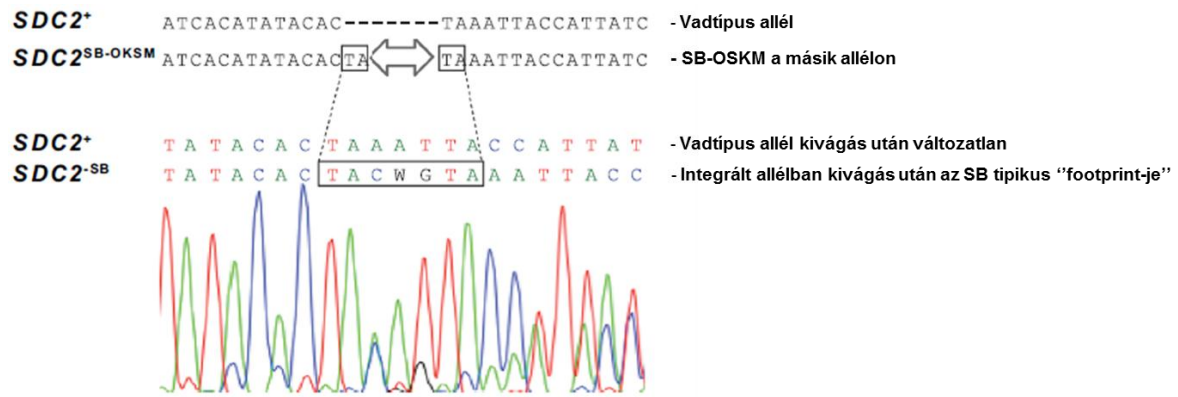


**44. ábra**

**PCR kombinációk a transzpozon kivágásának ellenőrzésére. A)** Az SB-OSKM vektor sematikus ábrázolása az *SDC2* lókuszból való integrációját követően az SB5 klónban. A lókuszt-specifikus (fekete nyilak p1, p2, p5, p6 jelöléssel) és transzpozon-specifikus (szaggatott nyilak p7, p8 jelöléssel) PCR primer kombinációk és a Southern blot-hoz alkalmazott próbák (vastag fekete vonal) vektoron való elhelyezkedése. **B)** További újra-transzpozált klónok lókuszt- és transzpozon-specifikus PCR reakciói, ahol látható, hogy egy klón esetében az *SDC2* lókuszból a transzgen kimozdult (p1-p6, 1550 bp). Ugyanabban a PCR reakcióban detektáltuk a vad típusú *SDC2* allélt és a transzpozon-kivágott lókuszt (p5-p6, 345 bp), amellyel a genomiális DNS jelenlétét erősítettük meg. Azonban a transzpozon specifikus primer párokkal (p7-p8, 220 bp) kimutattuk, hogy a transzpozon a genomban továbbra is jelen van, feltételezhetően egy másik pozícióban.

Azt a háromszorosan újra-transzpozált klónt, ahol a PCR alapján a transzpozon az *SDC2* lókuszból kimozdult, az *SDC2* lókuszból az inszerció környékén megszekvenáltuk. A szekvenálási eredmények megerősítették az SB-transzpozon kivágását az *SDC2* lókuszból. A szekvenálással az SB-transzpozon által hátrahagyott specifikus szekvenciát („footprint”: TACAGTA, Luo et al. 1998) is sikerült kimutatnunk (**45. ábra**). Az SB2 vonal esetében a transzgen kivágása/kimozdulása az ismert *RERE* lókuszból sikertelen volt.





45. ábra

**Az SDC integrációs helyének szekvenálási eredményei a transzpozon kivágása után.** A felső két szekvencia a vad típusú *SDC2* lókuszt eredeti genomiai szekvenciáját mutatja (*SDC2*<sup>+</sup>) és a lókuszt, amely a transzpozont tartalmazza (kétoldalú nyíl) a megkettőződött TA szekvenciákkal az inszerció helyén (*SDC2*<sup>SB-OSKM</sup>). A két alsó szekvencia a lókuszt ábrázolja a transzpozon kivágása után. Az *SDC2*<sup>+</sup> allél nem változik, míg az SB-kivágott allél (*SDC2*<sup>SB</sup>) már nem tartalmazza a transzpozon szekvenciát, csak a hátrahagyott „footprint” szekvenciát: TACWGTA. Az elektroforegram a transzpozon kivágását erősíti meg és a fennmaradó „footprint” szekvencia jelenlétét: TACAGTA.





## 5. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE ÉS JAVASLATOK

### 5.1. Különböző genetikai háttérű miPSC vonalak létrehozása lentivírus transzdukcióval

Egér iPSC vonalak alapításához egy általunk tervezett polycisztronos mOSKM vektort használtunk. E rendszer használatával három különböző genetikai háttérű MEF-ből nagyszámú, stabil iPSC vonalat hoztunk létre. A vonalak mindegyike a velük azonos genetikai háttérű mESC morfológiáját mutatta, valamint expresszálták a fontosabb pluripotencia markereket, amelyeket AP-, ICC- festésekkel és RT-PCR-el is igazoltunk.

Korábbi publikációk azt mutatták, hogy az mESC alapításában a 129/SV vagy a C57BL/6 beltenyésztett törzsekből a legeredményesebb, míg egy nem beltenyésztett/nem-beltenyésztett törzsekből a sejtvonal alapítás jelentősen komplikáltabb (Suzuki et al. 1999; Kawase et al. 1994). Azonban a genetikai háttér miPSC alapításra való hatása, eddig igen csekély számú tanulmány jelent meg (Schnabel et al. 2012; Muenthaisong et al. 2012). Kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy az általunk létrehozott vektort alkalmazva a genetikai háttér, ezen belül is a beltenyésztés/nem-beltenyésztés hatása tapasztalható-e az újraprogramozási hatékonyságára nézve. Megfigyeléseink alapján a három általunk vizsgált egértörzsből (C57BL/6, C57BL/6xDBA/2J, ICR) származó egér testi sejtek újraprogramozhatóságában és a megjelent iPSC kolóniák mennyiségében nem találtunk különbséget. Ugyanezt tapasztaltuk az SB-transzpozonnal való iPSC generálás során is (Muenthaisong et al. 2012). E kísérletsorozatok alapján megállapítható, hogy integrálódó iPSC újraprogramozó rendszerek használata esetén a rendszerek robusztussága lehetőséget nyújt arra, hogy még az ESC alapításban nehézkesen alkalmazható egértörzsekből is pluripotens vonalakat hozzunk létre. Ennek akkor van nagy jelentősége, ha az egér pluripotens sejtek alkalmazásának célja egyes humán genetikai betegségek tanulmányozása/modellzése. Olyan egér ESC-kben, amelyeket humán betegségek modellezésére alapítottak, megfigyelték, hogy amikor a tanulmányozni kívánt betegségben szerepet játszó mutációt az egér sejtek genomjába helyezték, azok különböző fenotípust mutatattak az egyes egértörzsekben. Ezeket a különbségeket a beltenyésztett törzsek közötti alléli variációk megjelenésével magyarázták. Ezért humán betegségek esetén az optimális egér modell genetikai háttérének megválasztása kulcsfontosságú lehet (Erickson 1996; Sullivan et al. 2007).

Muenthaisong et al. (2012) az integrálódó rendszerrel alapított SB-miPSC vonalakat *in vitro* és *in vivo* differenciációs kísérletekben is tesztelte. Az *in vitro* differenciációs kísérletekben az SB-ICR-miPSC vonalak szerepeltek a legjobban, míg a kiméra tesztekben az F1-iPSC vonalak mutattak csúsvonal kompetenciát. Azonban mivel az SB-transzpozon random integrálódik a genomba és a gén expresszió elcsendesülésének a szintje is eltérő, ezért a transzgén jelenléte is befolyással lehet a differenciációs képességre, ez esetben nem feltétlenül a genetikai háttér, amely a vonalak közötti eltéréseket okozhatja. A genetikai hátterek *in vitro/in vivo* differenciációra gyakorolt hatását esetlegesen nem integrálódó újraprogramozó rendszerek alkalmazásával lehetne a leghatékonyabban vizsgálni.

## 5.2. Transzgén-mentes miPSC vonalak létrehozása lentivírus transzdukcióval

Korábbi publikációból ismert az iPSC vonalakba integrálódott transzgén negatív hatása. Mivel a különböző genetikai hátterek hatását az újraprogramozhatóság hatékonyságára nem tapasztaltuk, és mivel az SB-miPSC vonalak közül az F1 vonal volt csúsvonal kompetens, ezért az alapított F1-L-miPSC vonalak egyikét választottuk ki a transzgén-mentes fészes kísérletekhez. Az általunk létrehozott újraprogramozó mOSKM vektort úgy terveztük meg, hogy a Cre/LoxP-rendszerrel lehetővé tette a bevitt transzgén genomból való eltávolítását. A kivágás után néhány száz bázispár „footprint” marad a genomban, amely nem tartalmaz aktív régiókat. A kivágással az ektopikus pluripotencia gének túlexpressziója megszüntethető, így azok működése nem befolyásolja negatívan a sejtek későbbi differenciációját. Lentivirussal generált hibrid genetikai háttérű egér iPSC vonalból sikerült a transzgént kivágnunk, és ily módon értékes, aktív transzgéntől mentes miPSC vonalakat hoztunk létre. Ezek az L-miPSC vonalak morfológiájukban és a vizsgált pluripotencia marker expressziós mintázatukban nem tértek el a transzgént-tartalmazó eredeti, illetve az azonos genetikai háttérből származó mESC vonalaktól.

A kivágás előtti (iPS-Bef) és kivágás utáni (iPS-Af) iPSC vonalak differenciációs képességének összehasonlításával lehetőségünk nyílt a transzgén meglétének/hiányának hatását tanulmányozni. Annak ellenére, hogy a vizsgált mintaszám alacsony volt, mégis kimutatható volt a transzgén drasztikus hatása az iPSC-k *in vitro* differenciációs képességére. Az *in vitro* spontán/kardiális és neurális differenciációs esetekben is azt találtuk, hogy a kivágás előtti differenciációs hatékonyság igen alacsony volt, míg a kivágott iPS-Af.4 és iPS-Af.15 szubklónok differenciációs hatékonysága megnövekedett a transzgén eltávolításával. Ez a jelenség magyarázható egyrészt azzal, hogy a lentivírus vektorok esetén az integrációk gyakorta transzkripciós egységekbe történnek (Schröder et al. 2002). Mivel a transzgének

lokációja az iPS-Bef vonalban általunk nem ismert, ezért csak feltételezni lehet, hogy az integráció valamilyen differenciációban kulcsfontosságú gátlóba történt, csökkentve, vagy megszüntetve az inszerció által érintett gén működését. Egy másik magyarázat lehet az is, hogy az újraprogramozó vektor egy stabilan expresszázó promotert tartalmaz, amely a transzgen által kódolt exogén pluripotencia gének folyamatos expresszióját eredményezi. A pluripotencia gének folyamatos expressziója mellett pedig valószínűsíthető, hogy a sejtek nem képesek differenciálódni. A  $\beta$ III-TUBULIN festéseinken az ektopikus EGFP expressziója igen erős a transzgen-t tartalmazó vonalban, ami az aktívan expresszázó transzgen jelenlétét jelzi. Eredményeinket egy humán sejteken végzett korábbi tanulmány is alátámasztja (Soldner et al. 2009). E munkában Soldner és munkatársai bemutatták, hogy a transzgen-mentes iPSC vonal molekuláris karakterisztikájában sokkal közelebb állt az ESC-hez, mint a transzgen-t még tartalmazó eredeti vonalhoz. Ez a munkacsoport az újraprogramozó faktorokat (OSK) egyesével jutatta a sejtekbe, aminek nagy hányára lehet a magasabb számú random integráció, amely nagyobb eséllyel vezethet káros mutációk kialakulásához. Emellett egy policisztronos vektorhoz képest itt a pluripotencia faktorok random számban és arányban jutnak az egyes sejtekbe, így a transzgen száma tekintve egy heterogén sejtpopuláció alakul ki. A transzgen kardiális differenciációra való hatását egy másik tudományos munkacsoport is vizsgálta, akik egér iPSC vonalakat hoztak létre policisztronos/kivágható vektorral (Chakraborty et al. 2013). Egy újszerű szűrési rendszert állítottak be a kivághott klónok szelekciójára ahol Herpesz Szimplex Virus-thymidin kináz/ganciclovirt használtak az általánosan elterjedt antibiotikum szelekció helyett. Ismert, hogy az antibiotikumok kromoszóma aberrációkat okozhatnak a sejt kultúrákban, ezért ez az újszerű rendszer előnyös lehet, habár a ganciclovir eddigi állatesztekben tumorigenitást mutatott. Nincs elérhető kísérletes adat a szer hatásáról sejtes szinten, de az eddig végzett állatkísérletekből következtetve lehetnek nem kívánt mellékhatásai. Ezek tudatában az általunk használt szelekciós rendszer jelentős előnye, hogy fluoreszcencián alapul, amely elkerüli a kémiai anyagok hozzáadásával esetleges genetikai módosítások létrejöttének lehetőségét a sejtekben.

Azt is megfigyeltük, hogy a két kivághott szubklón (iPS-Af.4 és iPS-Af.15) különböző *in vitro* differenciációs képességet mutatott. Az iPS-Af.4 neurális differenciációban hozott eredményei igen alacsonyak voltak, még kardiális irányú sejt típusokká való differenciációja igen eredményes volt (relatíve magas számú pulzázó sejtsomó). Ezzel ellentétben az iPS-Af.15 növekedett mennyiségű neurális típusú sejtet hozott létre az *in vitro* neurális differenciációban, és alacsony hatékonyságot mutatott *in vitro* kardiális differenciációban

(relatív alacsony számú pulzáló sejtcsomó) az iPS-Af.4-hez képest. Hasonló szubklón-szubklón közötti különbséget figyeltek meg egy nem régi tanulmányban is, ahol az egyes szubklónok a neurális differenciációban viselkedtek egymástól eltérően (Martinez et al. 2012). Következésképpen tehát levonható, hogy a megfelelő iPSC klón kiválasztása elengedhetetlen a jó eredményt adó differenciációhoz.

Habár nagyszámú tanulmány bizonyítja az egész iPSC vonalak *in vivo* differenciációs potenciálját teratoma formálódási kísérletekkel vagy kiméra előállítással, azonban ismert, hogy e módszerek még nem bizonyítják, hogy az iPSC vonal csírvonal kompetens volna. A kiméra előállítási kísérleteinkkel az irodalomban elsőként mutattunk be, lentivirussal generált csírvonal kompetens iPSC vonalak létrehozását, a transzgen sejtekből való eltávolítását követően. Az iPS-Af.4 és iPS-Af.15 transzgen-mentes vonalak csírvonal-kompetens kimérák születését eredményezték, amely kimérákban az őssejtes megjelenés középestől igen erősen változott. Habár a ké kivágot szubklón *in vitro* differenciációban eltérő módon viselkedett az *in vivo* differenciációjukban hasonlóak voltak. Ennek az egyik magyarázata az lehet, hogy az újonnan alapított klónok, habár szubklónozva voltak, még lehet, hogy sejtpopulációjuk kevert, ahol az egyes sejteknek nagyobb kapacitása van kardiális vagy neurális sejtekké differenciálódni, mint a másoknak. Feltételezhető, hogy a legjobb ESC vonal is heterogén sejtpopulációból áll. Kiméra formálódás során lehetséges, hogy csak a „ténylegesen pluripotens” sejtek szub-populációja játszik szerepet az embrió létrejöttében és az összes többi sejt eliminálódik. Ezzel ellentétben az *in vitro* differenciációban az egész sejtpopuláció szerepet játszhat, ahol néhány sejt nagyobb hatékonysággal formál neurális sejt típusokat, még egy másik sejt inkább kardiális irányú vagy egyéb irányú sejt típusok kialakításában bír előnyösebb képességgel. Ezek az eredmények tovább erősítik a pluripotencia karakterizációk során sokszor kihagyott *in vivo* differenciációs kísérletek fontosságát, ahol a csírvonal-kompetens kimérák formálódása a differenciációs kapacitás és a pluripotencia valódi mérése, ezért meglehetősen kiemelkedő fontosságú.

### 5.3 Az miPSC vonalak létrehozása fehérje bevitellel

Két integrálódó rendszer széleskörű tanulmányozása után, egy a genomba nem integrálódó rendszert szerettünk volna beállítani laboratóriumunkban, amely további előnye, hogy mentes mindenféle vírus-beviteli technikától. Mint ahogy azt Dr. Suchitra Polgári munkájában láhattuk, az SB-transzpozonnal a transzgen bevitel és így a sejtek újraprogramozása magas hatékonysággal működik, azonban a transzgen kivágása többszöri próbálkozás után sem volt sikeres (Muenthaisong 2012). A lentivirussal való újraprogramozás

szintén egy igen robusztus rendszernek bizonyult. Ezekből a sejtekből a transzgén eltávolítása sikeres volt, aktív transzgén szakasz nem maradt a genomban, amely negatívan befolyásolhatja a differenciációs potenciált. Azonban a transzgén kivágása után „footprint” marad hátra a genomban, vagyis nem teljesen transzgén-mentes az adott vonal. Ezen okok miatt fontosnak tartottuk egy genommanipulációmentes újraprogramozó rendszer tanulmányozását is, ahol a transzgén eltávolításával sem kell szánolni. Korábban két munkacsoportnak sikerült fehérje általi sejt újraprogramozást elérniük. Zhou et al. (2009) *E.coli*-ban expresszátotott újracsomagolt fehérjét használt egymást követő négy ciklusban, amellyel MEF-et tudott iPSC-vé újraprogramozni. Ugyanebben az évben egy másik csoport humán iPSC-ket hozott létre (Kim et al. 2009) HFF-ből, amelyhez sejtkivonatot használt, és 6 héten keresztül ismételt ciklusokban adott a sejtekhez. Ehhez képest mi 4 alkalommal kezeltük a sejteket 48 órás időközönként, illetve olyan *E.coli*-ban expresszátotott fehérjéket használtunk, amelyekhez sejt penetráció (Trans Activator Transcription), illetve sejtmagi lokalizáció (Nuclear Localization Signal) elősegítő szekvenciákat fuzionáltunk.

Ezzel az újszerű módszerrel sikerült egy transzgén-mentes egér iPSC vonalat létrehozni. A piPS-H1 vonal morfológiájában és növekedési potenciáljában nagyon hasonló volt a kontroll mESC vonalhoz. Expresszáta a fontosabb pluripotencia markereket, amelyet RT-PCR-el és ICC-festésekkel igazoltunk. A piPS-H1 vonal spontán/kardiális differenciációban nem tért el a kontroll mESC vonal eredményeitől, amelyet a pulzáló sejtsomók szánával mértünk. A piPS-H1 vonal *in vivo* differenciációs kísérletekben is jól szerepelt, amelyet kiméra tesztekkel ellenőriztünk. Azonban a kimérák nem voltak csírvonal kompatibilisek, így a sejtek újraprogramozódásának mértéke nem teljesen egyértelmű.

A fehérjével való újraprogramozás a lentivírus és SB-transzpozon általi újraprogramozásokhoz képest a többszöri transzdukció ismétlése miatt igen csak munkaigényes. Emellett pedig a rendszer hatékonysága is igen alacsony volt, még itt csak egy vonalat tudtunk létrehozni, addig a másik két integráló rendszer sokkal robusztusabb volt. Három genetikai háttérből származó fibroblaszt sejtek hasonló módon nagy mennyiségű iPSC vonalat eredményeztek. A három rendszer beállítása alatt gyűjtött értékes tapasztalatok, kulcsfontosságúak voltak a további humán iPSC vonalak alapításához alkalmazott megfelelő újraprogramozási rendszer kiválasztásában.

## 5.4 A hiPSC vonalak létrehozása lentív fűs transzdukcióval

Az mOSKM lentív fűs-alapú újraprogramozó vektorhoz hasonló policisztronos vektort alkalmaztunk humán iPSC vonalak előállításához. A vektor korábbi (ahol az OKSM faktorok nem voltak kodon-optimalizálva) verzióival transzgen-mentes egér iPSC vonalakat sikerült előállítaniuk a vektor készítőinek (Voelkel et al. 2010). Még a vektor egy további verzióival, amely humán kodon-optimalizált pluripotencia faktorokat tartalmazott egér és humán fibroblasztból sikerült nagyszámú iPSC vonalat előállítani egy másik munkacsoportnak (Warlich et al. 2011).

Az iPSC előállítására leggyakrabban elterjedt a fibroblaszt használata, mivel e sejttípus újraprogramozhatósága a leghatékonyabb. Az invazív mintavételt elkerülendő számos olyan próbálkozás folyik, ahol az újraprogramozáshoz használt sejtekhez kevésbé vagy non-invazív eljárásokkal lehet hozzáfutni (például vizeletből: Zhou et al. 2011 vagy vérből: Loh et al. 2010; Staerk et al. 2010). Azonban e sejttípusok újraprogramozása általánosan nehézkes, az újraprogramozási hatékonyság jelentősen alacsonyabb. A vér sejtselemből való iPSC generálás nagy előnye, hogy a vizelethez képest a mintavétel körülményei sterilek, a donoroktól egyszerre nagy mennyiségű vér vehető le, és az PBMC-k szeparációját követően azok hosszútávon tárolhatóak. Az ezt követő újraprogramozási procedúrát Sommer et al. (2012) által közölt protokoll alapján végeztük, melyet kisebb módosításokkal egészítettünk ki. Az említett munkacsoport a STEMCCA (Sommer et al. 2009; Sommer et al. 2010) policisztronos lentív fűs vektort használta a sejtek újraprogramozáshoz, amely az egér OKSM cDNS szekvenciákat tartalmazta. A transzdukciót követő 10-15. napon ESC-szerű kolóniák megjelenését figyelték meg, és a 30.-40. nap a kolóniákat felszedték és egyenként tenyésztették. Ezen eljáráshoz képest mi a C. Baum-tól kaptott (Voelkel et al. 2010; Warlich et al. 2011) policisztronos lentív fűs vektorral programoztuk vissza a sejteket. A kolóniák néhány nappal korábban kezdtek megjelenni (7. Nap) és a transzdukciót követő 21.-26. napon szedtük fel azokat. A folyamat felgyorsulását feltételezhetően az okozta, hogy az általunk használt lentív fűs vektor humán OKSM cDNS szekvenciákat tartalmazott, amelyek kodon-optimalizáltak (a kodon-optimalizáció következményeként a pluripotencia faktorok sokkal hatékonyabban fejeződnek ki). E módszerrel sikerült L-hiPSC vonalakat előállítanunk öt vérdonor mintából. A megjelent ESC-szerű kolóniák mennyisége az öt donor esetében nagy eltérést mutatott. Az alapított iPSC vonalak mindegyike normál humán ESC morfológiával rendelkezett. Expresszáltak a vizsgált fontosabb pluripotencia markereket és képesek voltak *in vitro* differenciálódni mindhárom csírázóirányba.

## 5.5 A hiPSC vonalak létrehozása SB-transzpozonnal

Korábbi tanulmányokból tudjuk, hogy PB-transzpozonnal már sikerült egér és humán testi sejteket újraprogramozni iPSC-ké hasonló hatékonysággal, mint a vírus alapú géneviteli eljárásokkal (Kaji et al. 2009; Woltjen et al. 2009; Yusa et al. 2009).

SB-transzpozon-alapú rendszerrel nekünk is sikerült humán iPSC vonalakat előállítani. Az SB-hiPSC vonalak morfológiájukban hasonlóak voltak normál hESC vonalakhoz és expresszálta a tipikus pluripotencia markereket. Emellett képesek voltak *in vitro* differenciálódni a három csíráterület irányába is, amelyet ICC-teszték igazoltak.

Míg az általunk végzett újraprogramozások során az SB-transzpozonnal négy darab iPSC vonal jelent csak meg HFF-et alkalmazva, addig a lentivírusos rendszerrel ez a szám igen változó volt. Azonban, két újraprogramozó rendszer hatékonyságát pontosan összehasonlítani nem lehet, mivel az függhet például az újraprogramozandó sejt típusától, annak osztódásától, genetikai hátterétől, a vektorban alkalmazott faktorok típusától, illetve az újraprogramozás során használt kismolekuláktól is.

Az SB-transzpozon-alapú iPSC újraprogramozó rendszer előnyei közé sorolható, hogy nem vírus alapú, így alkalmazása során nincs szükség speciális biztonsági eljárásokra. Emellett a transzpozon vektor egy DNS molekula, amely előállítása egyszerűbb és olcsóbb, mint a jelenlegi vírus előállítási protokollok, illetve lehetővé teszi a xeno-free iPSC vonalak előállítását. Az integrálódó rendszerek negatív tulajdonságai közé sorolható, hogy azok random módon integrálódnak a genomba, azonban egy korábbi tanulmány azt mutatta, hogy a lentivirussal, retrovirussal és PB-transzpozonnal szemben az SB-transzpozon nem szokott transzkripciós egységekbe beépülni (Mátés et al. 2009; Schröder et al. 2002; Wilson et al. 2007; Wu et al. 2003). Végül pedig humán genom nem tartalmaz SB-szerű elemeket nem úgy, mint a PB, csökkentve így annak a lehetőségét, hogy endogén transzpozon elemek mobilizálódjának (VandenDriessche et al. 2009).

## 5.6 Transzgen-mentes hiPSC vonalak létrehozása SB-transzpozonnal vs.

### lentivirussal

Az egér iPSC-kben szerzett tapasztalataink alapján ismert volt számunkra, hogy a transzgen-mentes vagy mentesíthető humán iPSC rendszerek alkalmazása szintén elengedhetetlen fontosságú.

A transzpozon alapú rendszerek természetüknél fogva lehetőséget nyújthatnak az újraprogramozó vektor eltávolítására és genetikailag módosíthatlan hiPSC vonalak létrehozására. Amíg ezt az elképzelést PB-transzpozonnal egér sejtekben sikerült

megvalósítani (Woltjen et al. 2009; Yusa et al. 2009) és transzgen-mentes miPSC vonalakat létrehozni, addig hasonló transzgen-mentes humán iPSC vonalak generálása e rendszerekkel eddig még nem sikerült. Ennek kipróbálására az SB-hiPSC vonalakat puromicint kódoló SB100X transzpozáz vektorral transzfektáltuk, azonban a transzpozon eltávolítása ezzel a módszerrel eredménytelen volt. Az integrálódott transzpozont az SB5 vonalban sikerült ugyan az eredeti lokuszból kimosztanunk, azonban az újraintegrálódott a genom más részébe. Megállapítottuk, hogy az SB-transzpozonnal való újraprogramozás előnyösebb lehet egyéb vírus-alapú génbeviteli eljárásokkal szemben. Azonban tapasztalataink azt mutatták, hogy a transzpozonok újraintegrálódó természetéből adódóan e rendszer alkalmatlan transzgen-mentes iPSC vonalak előállítására.

A lentivírus-mediált génbeviteli eljárással előállított hiPSC-kből is megkíséreltük az újraprogramozó vektor eltávolítását a Flp/FRT-rekombinázt rendszer használatával. A Flp-rekombinázt expresszáló plazmid tartalmazta a puromicin szelekciós szekvenciát is. E plazmid transzfekciója, majd a sejtek puromicin szelekcióját követően gyors PCR reakció segítségével nagyszámú kolóniát tudunk vizsgálni a transzgen meglétére/hiányára. Három hiPSC vonalban sikerült transzgen-mentes szubklónokat előállítanunk. Annak ellenére, hogy mindegyik esetben ugyanazt a rendszert használtuk, egy vonalban a kivágás sikertelen volt, a másik hat esetben a kivágás hatékonysága igen nagy variációt mutatott. Ez azzal magyarázható, hogy a lentivírus transzdukcióval a transzgen random szándékban és pozícióban integrálódik a genomba. Feltételezhetően az egyes lokuszokból a kivághatóság mértéke eltérő. A vektor egykorábbi, nem kodon-optimalizált verzióját egy hiPSC vonalak létrehozásával és a transzgen eltávolításával teszteltük (Voelkel et al. 2010). Egy a vektort három kópiaszándékban tartalmazó miPSC vonalban próbáltuk meg a transzgent eltávolítani a Flp-rekombinázt fehérje transzdukciójával. A 12 tesztelt szubklón egyikéből sem sikerült mindhárom transzgent eltávolítani. Azt a szubklónt, amely már csak egyetlen transzgent tartalmazott Flp-rekombinázzal újra transzdukáltuk és a 8 vizsgált szubklón közül háromban sikerült eltávolítaniuk a fennmaradó egy transzgent is. Ezzel ellentétben mi egy Flp-rekombinázt expresszáló vektorral transzfektáltuk az L-hiPSC-eket, ahol már az egyszeri transzfekció is számos transzgen-mentes vonalat eredményezett. Transzgen-mentesített humán iPSC vonalakat elsőként hoztunk létre a Flp/FRT-rekombinázt rendszerrel, amelynek a Cre/LoxP-rendszerrel szembeni előnye, hogy a sejtekre kevésbé toxikus (Schmidt-Supprian és Rajewsky 2007).



A kivágás után néhány száz bázispár „footprint” marad a genomban, csakúgy, mint az egér mOSKM vektor esetében. Azonban ez a szekvencia szintén nem tartalmaz aktív régiót. Mivel a transzgen jelenléte negatívan befolyásolhatja a differenciációt, ezért annak eltávolítása elengedhetetlen. Azonban a genommanipulációk miatt ez a rendszer inkább laboratóriumi felhasználásra alkalmas; humán terápiás célokra a jövőben valószínűleg nem vírus-alapú, integrációmentes újraprogramozási rendszerek használatára lesz szükség.



## 6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Hazánkban először egy jól működő lentivírus újraprogramozó rendszert hoztam létre és optimalizáltam, amely alkalmas egér embrionális fibroblaszt újraprogramozására, a kiinduló sejt genetikai hátterének különösebb befolyása nélkül. A létrehozott lentivírus-mediált egér iPSC vonalak mindegyike jól szerepelt *in vitro* pluripotencia tesztekben.
2. A generált lentivírus-mediált egér iPSC vonalak egyikéből sikerült eltávolítanom a transzgént, amellyel növeltem a vonalak *in vitro* differenciációs hatékonyságát az eredeti transzgént tartalmazó szülői vonalhoz képest. Bizonyítottam, hogy a transzgénmentes iPSC vonalak csírvonal-kompatibilis kimérők formálására is képesek voltak, amire publikált adatok korábban nem jelentek meg.
3. Egy újszerű fehérje-mediált újraprogramozó rendszerrel sikerült egy transzgénmentes pluripotens egér iPSC vonalat létrehozni, amely *in vitro* és *in vivo* pluripotencia tesztekben egyaránt jól szerepelt.
4. SB-transzpozonnal előállított humán iPSC vonalokból a transzgén eltávolítása sikertelen volt, a transzpozon újra-integráló természeté miatt. Azonban a lentivírus transzdukcióval alapított vonalokból az Flp/FRT-rendszert alkalmazva sikerült transzgénmentes humán iPSC vonalakat alapítanom.



## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az iPSC-k felnőtt testi sejtek újraprogramozásával nyerhetőek, a széles körben elterjedt Yamanaka faktor-kombinációjú sejtekbe való bejuttatásával. Az ilyen módon létrehozott sejtek nagyon hasonlóak az embrionális őssejtekhez, azonban embriók feláldozása nélkül juthatunk hozzájuk. Előnyös tulajdonságaik közé sorolható, hogy páciens-specifikusak, valamint ha betegséget hordozó donor sejtjei kerülnek újraprogramozásra, akkor betegség-specifikusak is. E tulajdonságok ismeretében mind a biológiai alap kutatásokban, mind pedig az orvostudomány számára igen hasznos eszközt jelentenek, például gyógyszerkutatásban és tesztelésben, betegségek modellezésben, valamint a klinika számára az őssejt terápia és a génterápia fejlesztésében.

Számos iPSC előállítási rendszer létezik, amelyek közül a transzgenet integráló rendszerek a leghatékonyabbak, ezért a legelterjedtebbek is. Azonban, a genomi integrációk nem csak az esetleges terápiás alkalmazás esetén jelenthetnek problémát, hanem a transzgen jelenléte az iPSC-eket molekuláris illetve funkcionális tulajdonságaikban is negatívan befolyásolhatja, ezért a transzgen-mentes visszaprogramozó rendszerek kidolgozása és fejlesztése elengedhetetlen követelmény.

Célunk az volt, hogy különböző újraprogramozási rendszereket állítsunk be és fejlesszünk laboratóriumunkban egér modellen, majd az abból szerzett tapasztalatok alapján, humán mintákon is. További célunk az volt, hogy olyan jól működő újraprogramozó rendszert dolgozzunk ki, amely transzgen-mentes vonalakat eredményez, valamint a munka során a transzgen káros hatásának tanulmányozására is alkalmunk nyílik. A létrehozott és karakterizált értékes transzgen-mentes vonalak, pedig későbbi kutatásaink kontroll vonalaiként szolgálnak majd.

Első lépésként egy általunk létrehozott lentivírus vektorral, megbízható és robusztus egér iPSC generálási rendszert sikerült laboratóriumunkban beállítani. A rendszer alkalmas volt arra, hogy beltenyésztett, nem-beltenyésztett és hibrid genetikai háttérű MEF-ből nagyszámú stabil L-miPSC vonalat hozzon létre. Az előállított L-miPSC vonalak mind morfológiájukban, mind pedig pluripotencia marker expressziós mintázatukban hasonlóak voltak az azonos genetikai háttérű egerekből alapított kontroll mESC vonalakhoz. A három vizsgált genetikai háttérből származó sejtek újraprogramozhatósága és annak hatékonysága között nem találtunk lényeges különbséget. Ezt a megfigyelést korábban már az SB-miPSC-k létrehozása esetén is lefűtük.

A generált L-miPSC vonalak egyikéből a Cre/LoxP-rendszer alkalmazásával sikerült kivágnunk a bevitt transzgént, így létrehozva transzgén-mentes L-miPSC vonalakat. Ezek az L-miPSC vonalak morfológiájukban és a pluripotenciáért felelős marker expressziós mintázatukban nem tértek el a transzgén-tartalmazó őseiktől illetve az mESC vonalaktól sem. A transzgén-mentes L-miPSC vonalakon a transzgén eltávolításának az *in vitro* differenciációs képességre gyakorolt hatását is tanulmányoztuk. Azt találtuk, hogy a kivágott L-miPSC szubklónok mind neurális-, mind pedig spontán/kardiális- *in vitro* differenciációja sokkal hatékonyabb volt, mint a kivágás előtti L-miPSC vonalé. Ezzel sikerült bemutatnunk és igazolnunk a transzgén jelenlétének káros hatását, illetve az integrációktól mentes iPSC generálási rendszerek alkalmazásának elengedhetetlen fontosságát. A létrehozott transzgén-mentes L-miPSC vonalak *in vivo* differenciációra is képesek voltak. Kivágható lentivírus vektorral újraprogramozott egér iPSC sejtekkel sikerült elsőként csírvonal-kompatibilis kimerőket létrehozni, amire publikált adatok ez idáig nem voltak.

Egy nem integrálódó rendszert is teszteltünk, ahol az mOSKM faktorokat rekombináns tisztított fehérje formájában jutattunk a sejtekbe és így módon újraprogramoztuk azokat. Ezzel a módszerrel egy transzgén-mentes P-miPSC vonalat sikerült létrehozni, amely pluripotenciáját *in vitro* és *in vivo* tesztekben is igazoltuk. Azonban, a korábban alkalmazott lentivírus és transzpozon általi újraprogramozásokhoz képest ez a rendszer igen munkaigényes és alacsony hatékonyságú volt.

Az egér iPSC-k generálása alatt gyűjtött tapasztalatok alapján a két robosztusnak bizonyult rendszert választottuk ki azok humán sejtekre való adaptálásához. SB-transzpozonnal és lentivírus transzdukcióval sikerült pluripotens hiPSC vonalakat alapfánunk humán testi sejtekből. Az első esetében magzati fibroblasztot, az utóbbival pedig vérmononukleáris sejteket programoztunk vissza laboratóriumunkban.

A két rendszerrel generált hiPSC vonalak transzgénmentes fésű is megkíséreltük. Az egér kísérletekhez hasonlóan (Muenthaisong 2012), az SB-transzpozon genomból való eltávolítása sikertelen volt. A humán SB-iPSC-kkel végzett kísérletek során egy esetben a transzpozont sikerült kimozdítani integrációs helyéből a transzpozáz többszöri transzfekcióját követően, azonban az újraintegrálódott egy másik genomi lokuszban. Ezzel szemben a lentivírus-mediált vonalaktól az Flp/FRT-rendszert alkalmazva sikerült transzgén-mentes L-hiPSC-eket alapfánunk csak úgy. Az eredmények azt mutatják, hogy a vektorok különböző jellegéből adódóan a rekombináns rendszereken alapuló kivágható lentivírus vektorok eltávolítása nagyobb hatékonysággal, ismételhető módon, fajtól függetlenül működik, ezért e rendszer használata javasolt transzgén-mentes iPSC-k generálásához.

## 8. SUMMARY

Reprogramming of somatic cells to Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC) is a promising tool to generate patient-specific donor cells for drug discovery, disease modelling and regenerative medicine. The reprogrammed cells are very similar to embryonic stem cell, but can be obtained without sacrificing embryos. The introduction of four factors, OCT-4, SOX2, KLF4 and C-MYC into mouse embryonic fibroblasts (MEF), by retroviral transduction was sufficient to reprogram skin cells to pluripotency. Since then, multiple somatic cells have been reprogrammed using a variety of delivery methods of the transcription factors. Non-integrating methods to deliver the reprogramming genes are considered to be the best but they may be inefficient. The integrative reprogramming systems are currently among the most efficient methods and still the most commonly applied for basic research. Although in such systems there is a potential risk of insertional mutagenesis, caused by the random integrations what may affect the molecular/functional abilities of the iPSCs if it occurs into an important locus. For possible clinical purposes the optimization of transgene-free iPSC generation systems is highly desirable. For basic research application reprogramming systems which are integrative but excisable are more reasonable however such strategies are not well studied in the past and require improvement in their excision efficiency.

Our goal was to test and to optimize different iPSC reprogramming systems, on mice then followed on human samples, as well as to study the pluripotency on the newly generated iPSCs. Our aim was also the development of a robust reprogramming system in both species, where the integrated transgene can be excised, which would allow us to study the impact of the transgene presence. The practical goal of the work was also to provide fully characterized valuable transgene-free iPSCs as control lines for patient-specific iPSC generation projects performed by our laboratory.

An excisable polycistronic lentiviral-vector was designed and used for reprogramming somatic cells. The system was highly efficient in the reprogramming of MEF from inbred, outbred and hybrid mouse strains as well. The obtained miPSC lines showed pluripotency similar to mESC originated from the same genetic background, tested in their morphology and pluripotency marker expression pattern. The success of mESC maintenance depends on the mouse strain origin; however we did not observe any impact of the different genetic background in case of reprogramming efficiency. From a newly generated L-miPSC line the integrated transgene was successfully excised using the Cre/LoxP-system, which provided

valuable transgene-free L-miPSC lines. The morphology of the L-miPSCs before and after excision was very similar to that of mESC, and the L-miPSCs expressed all examined pluripotency markers. The effect of the transgenes on the *in vitro* spontaneous and neuronal differentiation ability was assessed by comparing the parental L-miPSC with two of its transgene-free subclones. The subclones obtained after Cre-recombination were capable of differentiation *in vitro*, in contrast to the parental, non-excised lines. The results represented in this work further proved the negative effect of the transgene, pointing out the importance of the generation of transgene free cell lines. The *in vivo* differentiation ability of the transgene-free lines was also demonstrated by chimera formation, the most stringent test for stem cell pluripotency. Here we showed for the first time that the L-miPSC lines generated using excisable lentiviral delivery system are germ-line compatible and represents a promising technology to generate transgene-free iPSC for disease modelling and pharmacological testing. A novel SB-transposon/transposase integrative system was also examined earlier by us, which resulted large number of mouse iPSCs, with no observed impact of the different genetic background also (Muenthaisong et al. 2012).

A non-integrative reprogramming strategy was tested, where we delivered the mOSKM factors by transducing the MEF with purified protein cocktail, resulting only one P-miPSC line. The obtained P-miPSC line showed pluripotency, examined in *in vitro* and *in vivo* pluripotency assays. The observed reprogramming efficiency using protein delivery was very low, as well as labour intensive in contrast to other integrative systems.

Based on the experience gained during the mouse cell reprogramming, we have chosen the two most robust systems, the SB-transposon- and the lentiviral delivery system to adapt for human somatic cell reprogramming. Both methods were efficient in the generation of hiPSCs from primary somatic cells, and showed pluripotency tested in *in vitro* assays. The primary cell source reprogrammed with the SB-transposon was foetal fibroblast, while the PBMCs were reprogrammed by lentiviral transduction. The hiPSCs were obtained from both systems were examined in their capability of removing the transgene from their genome. The excision of transgenes from the SB-hiPSC lines was not successful, similar what was observed earlier by our research group using mouse SB-miPSCs. From one of the human SB-hiPSC line one transposon integration was removed from its location after repeated re-transfection of the transposase, although it was re-integrated elsewhere in the genome. In contrast, the excision was successful from the lentivirus-mediated hiPSCs using the Flp/FRT-system resulting transgene-free L-hiPSCs, the same as for the mouse cell lines.



The results represent that due to the different nature of the vectors, the removal of the recombinase system-based excisable lentivirus vectors work with higher efficiency, in reproducible, and in species independent manner. Our findings pave the way for further studies exploiting reprogramming with excisable lentiviral-mediated systems.



## 9. MELLÉKLETEK

### 9.1. Irodalomjegyzék

Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilić J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boué S, Izpisua Belmonte JC. (2008) Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 2008;26:1276–1284

Abdulrazzak H, Moschidou D, Jones G, Guillot PV. (2010) Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. *J R Soc Interface*. 2010 Dec 6;7 Suppl 6:S689-706.

Allen WR, Pashen RL. (1984) Production of monozygotic (identical) horse twins by embryo micromanipulation. *J Reprod Fertil*. 1984 Jul;71(2):607-13.

Arceci RJ, King AA, Simon MC, Orkin SH, Wilson DB. (1993) Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol*. 1993 Apr;13(4):2235-46.

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

Badcock G, Pigott C, Goepel J, Andrews PW. (1999) The human embryonal carcinoma marker antigen TRA-1-60 is a sialylated keratan sulfate proteoglycan. *Cancer Res*. 1999 Sep 15;59(18):4715-9.

Baharvand H, Matthaei KI. (2004) Culture condition difference for establishment of new embryonic stem cell lines from the C57BL/6 and BALB/c mouse strains. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2004 Mar-Apr;40(3-4):76-81.

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

Behboodi E, Memili E, Melican DT, Destrempe MM, Overton SA, Williams JL, Flanagan PA, Butler RE, Liem H, Chen LH, Meade HM, Gavin WG, Echelard Y. (2004) Viable transgenic goats derived from skin cells. *Transgenic Res*. 2004 Jun;13(3):215-24.

Bendall SC, Stewart MH, Menendez P, George D, Vijayaragavan K, Werbowetski-Ogilvie T, Ramos-Mejia V, Rouleau A, Yang J, Bossé M, Lajoie G, Bhatia M. (2007) IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature*. 2007 Aug 30;448(7157):1015-21.

Boulting GL, Kiskinis E, Croft GF, Amoroso MW, Oakley DH, Wainger BJ, Williams DJ, Kahler DJ, Yamaki M, Davidow L, Rodolfa CT, Dimos JT, Mikkilineni S, MacDermott AB, Woolf CJ, Henderson CE, Wichterle H, Eggan K. (2011) A functionally characterized test set of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2011 Mar;29(3):279-86.

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

Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. 2005 Sep 23;122(6):947-56.

Briggs R, King TJ. (1952) Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 1952; 38(5): 455–463.

Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, Howlett SK, Clarkson A, Ahrlund-Richter L, Pedersen RA, Vallier L. (2007) Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*. 2007 Jul 12;448(7150):191-5. Epub 2007 Jun 27.

Buecker C, Chen HH, Polo JM, Daheron L, Bu L, Barakat TS, Okwieka P, Porter A, Gribnau J, Hochedlinger K, Geijsen N. (2010) A murine ESC-like state facilitates transgenesis and homologous recombination in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010 Jun 4;6(6):535-46.

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

Caiazzo M, Dell'Anno MT, Dvoretzkova E, Lazarevic D, Taverna S, Leo D, Sotnikova TD, Menegon A, Roncaglia P, Colciago G, Russo G, Carninci P, Pezzoli G, Gainetdinov RR, Guscini S, Dityatev A, Broccoli V. (2011) Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature*. 2011 Jul 3;476(7359):224-7.

Capetanaki Y, Kuisk I, Rothblum K, Starnes S. (1990) Mouse vimentin: structural relationship to fos, jun, CREB and tpr. *Oncogene*. 1990 May;5(5):645-55.

Carey BW, Markoulaki S, Hanna J, Saha K, Gao Q, Mitalipova M, Jaenisch R. (2009) Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jan 6;106(1):157-62.

Carstea AC, Purity MK, Dinnyes A. (2009) Germline competence of mouse ES and iPS cell lines: Chimera technologies and genetic background, *World J Stem Cells*. 2009 Dec 31;1(1):22-9.

Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S. (2005) LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*. 2005 Mar;132(5):885-96.

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

Chakraborty S, Christoforou N, Fattahi A, Herzog RW, Leong KW. (2013) A robust strategy for negative selection of Cre-loxP recombination-based excision of transgenes in induced pluripotent stem cells. *PLoS One.* 2013 May 22;8(5):e64342.

Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell.* 2003 May 30;113(5):643-55.

Chan YS, Göke J, Ng JH, Lu X, Gonzales KA, Tan CP, Tng WQ, Hong ZZ, Lim YS, Ng HH. (2013) Induction of a human pluripotent state with distinct regulatory circuitry that resembles preimplantation epiblast. *Cell Stem Cell.* 2013 Dec 5;13(6):663-75.

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

Chen ZY, He CY, Ehrhardt A, Kay MA. (2003) Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo. *Mol Ther* 2003; 8(3): 495-500.

Chen ZY, He CY, Kay MA. (2005) Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression in vivo. *Hum Gene Ther* 2005; 16(1): 126-31.

Chin MT. (2014) Reprogramming cell fate: a changing story. *Front Cell Dev Biol.* 2014 Aug 27;2:46.

Chou BK, Mali P, Huang X, Ye Z, Dowey SN, Resar LM, Zou C, Zhang YA, Tong J, Cheng L. (2011) Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. *Cell Res.* 2011 Mar;21(3):518-29.

Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. (2005) Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*. 2005 Aug 26;309(5739):1369-73.

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

Dahlstrand J, Zimmerman LB, McKay RD, Lendahl U. (1992) Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *J Cell Sci*. 1992 Oct;103 ( Pt 2):589-97.

Dambrot C. (2014) From teeth, skin or blood to heart: Induced pluripotent stem cells as an in vitro model for cardiac disease. Doktori értekezés. Leiden University Medical Center, Hollandia

Dambrot C, Buermans HP, Varga E, Kosmidis G, Langenberg K, Casini S, Elliott DA, Dinnyes A, Atsma DE, Mummery CL, Braam SR, Davis RP. (2014) Strategies for rapidly mapping proviral integration sites and assessing cardiogenic potential of nascent human induced pluripotent stem cell clones. *Exp Cell Res*. 2014 Oct 1;327(2):297-306.

Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. (1987) Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*. 1987 Dec 24;51(6):987-1000.

Davis RP, Grandela C, Sourris K, Hatzistavrou T, Dottori M, Elefanty AG, Stanley EG, Costa M. (2009) Generation of human embryonic stem cell reporter knock-in lines by homologous recombination. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2009 Nov;Chapter 5:Unit 5B.1 1.1-34.

Diecke S, Jung SM, Lee J, Ju JH. (2014a) Recent technological updates and clinical applications of induced pluripotent stem cells. *Korean J Intern Med*. 2014 Sep;29(5):547-57.

Diecke S, Lisowski L, Kooreman NG, Wu JC. (2014b) Second generation codon optimized minicircle (CoMiC) for nonviral reprogramming of human adult fibroblasts. *Methods Mol Biol*. 2014;1181:1-13.

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

Dvorak P, Dvorakova D, Koskova S, Vodinska M, Najvirtova M, Krekac D, Hampl A. (2005) Expression and potential role of fibroblast growth factor 2 and its receptors in human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2005 Sep;23(8):1200-11.

Edwards YH, Putt W, Lekoape KM, Stott D, Fox M, Hopkinson DA, Sowden J. (1996) The human homolog T of the mouse T(Brachyury) gene; gene structure, cDNA sequence, and assignment to chromosome 6q27. *Genome Res.* 1996 Mar;6(3):226-33.

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

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

Erickson RP. (1996) Mouse models of human genetic disease: which mouse is more like a man? *Bioessays.* 1996 Dec;18(12):993-8.

Evans MJ, Kaufman MH. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981 Jul 9;292(5819):154-6.

Fernandez PC, Frank SR, Wang L, Schroeder M, Liu S, Greene J, Cocito A, Amati B. (2003) Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev.* 2003 May 1;17(9):1115-29.

Fujishiro SH, Nakano K, Mizukami Y, Azami T, Arai Y, Matsunari H, Ishino R, Nishimura T, Watanabe M, Abe T, Furukawa Y, Umeyama K, Yamanaka S, Ema M, Nagashima H, Hanazono Y. (2013) Generation of naive-like porcine-induced pluripotent stem cells capable of contributing to embryonic and fetal development. *Stem Cells Dev.* 2013 Feb 1;22(3):473-82.



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

Gafni O, Weinberger L, Mansour AA, Manor YS, Chomsky E, Ben-Yosef D, Kalma Y, Viukov S, Maza I, Zviran A, Rais Y, Shipony Z, Mukamel Z, Krupalnik V, Zerbib M, Geula S, Caspi I, Schneir D, Shwartz T, Gilad S, Amann-Zalcenstein D, Benjamin S, Amit I, Tanay A, Massarwa R, Novershtern N, Hanna JH. (2013) Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature.* 2013 Dec 12;504(7479):282-6.

Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 2013 Jul;31(7):397-405.

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

Giorgetti A, Montserrat N, Aasen T, Gonzalez F, Rodríguez-Pizà I, Vassena R, Raya A, Boué S, Barrero MJ, Corbella BA, Torrabadella M, Veiga A, Izpisua Belmonte JC. (2009) Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell.* 2009 Oct 2;5(4):353-7

Gonçalves MAFV, Janssen JM, Holkers M, de Vries AAF. (2010) Rapid and sensitive lentivirus vector-based conditional gene expression assay to monitor and quantify cell fusion activity. *PLoS One* 2010;5:e10954

Graham FL, Prevec L. (1992) Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines. *Biotechnology* 1992; 20: 363-90.

Greber B, Lehrach H, Adjaye J. (2007) Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor beta signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal. *Stem Cells.* 2007 Feb;25(2):455-64.

Guo G, Yang J, Nichols J, Hall JS, Eyres I, Mansfield W, Smith A. (2009) Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development*. 2009 Apr;136(7):1063-9.

Gurdon JB, Elsdale TR, Fischberg M. (1958) Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature*. 1958 Jul 5;182(4627):64-5.

Gurdon JB. (1962) Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev Biol*. 1962 Apr;4:256-73.

Gurdon JB, Byrne JA, Simonsson S. (2003) Nuclear reprogramming and stem cell creation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 30;100 Suppl 1:11819-22.

Hackett PB, Largaespada DA, Cooper LJ. (2010) A transposon and transposase system for human application. *Mol Ther*. 2010 Apr;18(4):674-83.

Hakelien AM, Landsverk HB, Robl JM, Skålhegg BS, Collas P. (2002) Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts. *Nat Biotechnol*. 2002 May;20(5):460-6.

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

Händel EM, Cathomen T. (2011) Zinc-finger nuclease based genome surgery: it's all about specificity. *Curr Gene Ther*. 2011 Feb;11(1):28-37.

Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. (2007) Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*. 2007 Dec 21;318(5858):1920-3.

Hanna J, Markoulaki S, Mitalipova M, Cheng AW, Cassady JP, Staerk J, Carey BW, Lengner CJ, Foreman R, Love J, Gao Q, Kim J, Jaenisch R. (2009) Metastable pluripotent states in NOD-mouse-derived ESC. *Cell Stem Cell*. 2009 Jun 5;4(6):513-24.

Hanna J, Cheng AW, Saha K, Kim J, Lengner CJ, Soldner F, Cassady JP, Muffat J, Carey BW, Jaenisch R. (2010) Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 May 18;107(20):9222-7.

Hansis C, Barreto G, Maltry N, Niehrs C. (2004) Nuclear reprogramming of human somatic cells by xenopus egg extract requires BRG1. *Curr Biol*. 2004 Aug 24;14(16):1475-80.

He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(5): 2509-14.

Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, Jaenisch R. (2005) Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell*. 2005 May 6;121(3):465-77

Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, Lai CS, Gao Q, Cassady JP, Cost GJ, Zhang L, Santiago Y, Miller JC, Zeitler B, Cherone JM, Meng X, Hinkley SJ, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jaenisch R. (2011) Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol*. 2011 Jul 7;29(8):731-4.

Hogan BL. (1976) Changes in the behaviour of teratocarcinoma cells cultivated in vitro. *Nature*. 1976 Sep 9;263(5573):136-7.

Holt N, Wang J, Kim K, Friedman G, Wang X, Taupin V, Crooks GM, Kohn DB, Gregory PD, Holmes MC, Cannon PM. (2010) Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo. *Nat Biotechnol*. 2010 Aug;28(8):839-47.

Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, Zhao T, Ye J, Yang W, Liu K, Ge J, Xu J, Zhang Q, Zhao Y, Deng H. (2013) Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*. 2013 Aug 9;341(6146):651-4.

Huang J, Deng K, Wu H, Liu Z, Chen Z, Cao S, Zhou L, Ye X, Keefe DL, Liu L. (2008) Efficient production of mice from embryonic stem cells injected into four- or eight-cell embryos by piezo micromanipulation. *Stem Cells*. 2008 Jul;26(7):1883-90.

Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Friedman A, Hochedlinger K, Yanagimachi R, Lander ES, Golub TR, Jaenisch R. (2002) Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci*. 2002 Oct 1;99(20):12889-94.

Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, Srivastava D. (2010) Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*. 2010 Aug 6;142(3):375-86.

Iijima S, Tanimoto Y, Mizuno S, Daitoku Y, Kunita S, Sugiyama F, Yagami K. (2010) Effect of different culture conditions on establishment of embryonic stem cells from BALB/cAJ and NZB/BINJ mice. *Cell Reprogram* 2010 Dec;12(6):679-88.

Inoue M, Tomizawa K, Matsushita M, Lu YF, Yokoyama T, Yanai H, Takashima A, Kumon H, Matsui H. (2006) p53 protein transduction therapy: successful targeting and inhibition of the growth of the bladder cancer cells. *Eur Urol*. 2006 Jan;49(1):161-8.

Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvák Z. (1997) Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell*. 1997 Nov 14;91(4):501-10.

Ivics Z, Izsvák Z. (2011) Nonviral gene delivery with the sleeping beauty transposon system. *Hum Gene Ther*. 2011 Sep;22(9):1043-51.

Izsvák Z, Fröhlich J, Grabundzija I, Shirley JR, Powell HM, Chapman KM, Ivics Z, Hamra FK. (2010) Generating knockout rats by transposon mutagenesis in spermatogonial stem cells. *Nat Methods*. 2010 Jun;7(6):443-5.

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

Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. (2009) Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*. 2009 Apr 9;458(7239):771-5.

Kamata M, Liu S, Liang M, Nagaoka Y, Chen IS. (2010) Generation of human induced pluripotent stem cells bearing an anti-HIV transgene by a lentiviral vector carrying an internal murine leukemia virus promoter. *Hum Gene Ther* 2010; 21(11): 1555-67.

Kang HB, Kim JS, Kwon HJ, Nam KH, Youn HS, Sok DE, Lee Y. (2005) Basic fibroblast growth factor activates ERK and induces c-fos in human embryonic stem cell line MizhES1. *Stem Cells Dev*. 2005 Aug;14(4):395-401.

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

Karmali A, Novo C. (1990) Human alfa-fetoprotein: isolation and production of monoclonal antibodies. *Biochimie*. 1990 May;72(5):369-74.

Katsetos CD, Legido A, Perentes E, Mörk SJ. (2003) Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. *J Child Neurol*. 2003 Dec;18(12):851-66; discussion 867.

Kawase E, Suemori H, Takahashi N, Okazaki K, Hashimoto K, Nakatsuji N. (1994) Strain difference in establishment of mouse embryonic stem (ES) cell lines. *Int J Dev Biol*. 1994 Jun;38(2):385-90.

Kawase Y, Iwata T, Watanabe M, Kamada N, Ueda O, Suzuki H. (2001) Application of the piezo-micromanipulator for injection of embryonic stem cells into mouse blastocysts. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2001 Mar;40(2):31-4.

Kielman MF, Rindap ääM, Gaspar C, van Poppel N, Breukel C, van Leeuwen S, Taketo MM, Roberts S, Smits R, Fodde R. (2002) Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of beta-catenin signaling. *Nat Genet.* 2002 Dec;32(4):594-605.

Kim C. (2014) iPSC technology- Powerful hand for disease modeling and therapeutic screen. *BMB Rep.* 2014 Aug 8. pii: 2823.

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

Kim K, Zhao R, Doi A, Ng K, Unternaehrer J, Cahan P, Huo H, Loh YH, Aryee MJ, Lensch MW, Li H, Collins JJ, Feinberg AP, Daley GQ. (2011) Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2011 Nov 27;29(12):1117-9.

Kim SJ, Cheon SH, Yoo SJ, Kwon J, Park JH, Kim CG, Rhee K, You S, Lee JY, Roh SI, Yoon HS. (2005) Contribution of the PI3K/Akt/PKB signal pathway to maintenance of self-renewal in human embryonic stem cells. *FEBS Lett.* 2005 Jan 17;579(2):534-40.

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

Kispert A, Herrmann BG. (1994) Immunohistochemical analysis of the Brachyury protein in wild-type and mutant mouse embryos. *Dev Biol.* 1994 Jan;161(1):179-93.

Klincumhom N, Purity MK, Berzsenyi S, Ujhelly O, Muenthaisong S, Rungarunlert S, Tharasanit T, Techakumphu M, Dinnyes A. (2012) Generation of neuronal progenitor cells and neurons from mouse sleeping beauty transposon-generated induced pluripotent stem cells. *Cell Reprogram.* 2012 Oct;14(5):390-7.

Koh S, Piedrahita JA. (2014) From "ES-like" cells to induced pluripotent stem cells: a historical perspective in domestic animals. *Theriogenology.* 2014 Jan 1;81(1):103-11.

Kolacsek O, Kr ́szik V, Schamberger A, Erdei Z, Ap ́ti A, V ́rady G, M ́t ́s L, Izsv ́k Z, Ivics Z, Sarkadi B, Orb ́n TI. (2011) Reliable transgene-independent method for determining Sleeping Beauty transposon copy numbers. *Mob DNA*. 2011 Mar 3;2(1):5.

Kopp JL, Ormsbee BD, Desler M, Rizzino A. (2008) Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2008 Apr;26(4):903-11.

Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Mizoshita K, Tabara N, Barber M, Yang X. (2000) Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Feb 1;97(3):990-5.

Kunath T, Arnaud D, Uy GD, Okamoto I, Chureau C, Yamanaka Y, Heard E, Gardner RL, Avner P, Rossant J. (2005) Imprinted X-inactivation in extra-embryonic endoderm cell lines from mouse blastocysts. *Development*. 2005 Apr;132(7):1649-61.

Kunisato A, Wakatsuki M, Shinba H, Ota T, Ishida I, Nagao K Direct generation of induced pluripotent stem cells from human nonmobilized blood. *Stem Cells Dev*. 2011 Jan;20(1):159-68.

Lapasset L, Milhabet O, Prieur A, Besnard E, Babled A, A ĩ-Hamou N, Leschik J, Pellestor F, Ramirez JM, De Vos J, Lehmann S, Lemaitre JM. (2011) Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev*. 2011 Nov 1;25(21):2248-53.

Lassar AB, Paterson BM, Weintraub H. (1986) Transfection of a DNA locus that mediates the conversion of 10T1/2 fibroblasts to myoblasts. *Cell*. 1986 Dec 5;47(5):649-56.

Lee TH, Song SH, Kim KL, Yi JY, Shin GH, Kim JY, Kim J, Han YM, Lee SH, Lee SH, Shim SH, Suh W. (2010) Functional recapitulation of smooth muscle cells via induced pluripotent stem cells from human aortic smooth muscle cells. *Circ Res*. 2010 Jan 8;106(1):120-8.

Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990 Feb 23;60(4):585-95.

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

Li C, Zhou J, Shi G, Ma Y, Yang Y, Gu J, Yu H, Jin S, Wei Z, Chen F, Jin Y. (2009) Pluripotency can be rapidly and efficiently induced in human amniotic fluid-derived cells. *Hum Mol Genet.* 2009 Nov 15;18(22):4340-9.

Li H, Haurigot V, Doyon Y, Li T, Wong SY, Bhagwat AS, Malani N, Anguela XM, Sharma R, Ivanciu L, Murphy SL, Finn JD, Khazi FR, Zhou S, Paschon DE, Rebar EJ, Bushman FD, Gregory PD, Holmes MC, High KA. (2011) In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature.* 2011 Jun 26;475(7355):217-21.

Li L, Bennett SA, Wang L. (2012) Role of E-cadherin and other cell adhesion molecules in survival and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Adh Migr.* 2012 Jan-Feb;6(1):59-70.

Li MA, Pettitt SJ, Eckert S, Ning Z, Rice S, Cadiñanos J, Yusa K, Conte N, Bradley A. (2013) The piggyBac transposon displays local and distant reintegration preferences and can cause mutations at noncanonical integration sites. *Mol Cell Biol.* 2013 Apr;33(7):1317-30.

Li Y, McClintick J, Zhong L, Edenberg HJ, Yoder MC, Chan RJ. (2005) Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood.* 2005 Jan 15;105(2):635-7.

Li Y, Zhang Q, Yin X, Yang W, Du Y, Hou P, Ge J, Liu C, Zhang W, Zhang X, Wu Y, Li H, Liu K, Wu C, Song Z, Zhao Y, Shi Y, Deng H. (2011) Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules. *Cell Res.* 2011 Jan;21(1):196-204.

Liao J, Wu Z, Wang Y, Cheng L, Cui C, Gao Y, Chen T, Rao L, Chen S, Jia N, Dai H, Xin S, Kang J, Pei G, Xiao L. (2008) Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell Res.* 2008 May;18(5):600-3.



Liu J, Ashton MP, Sumer H, O'Bryan MK, Brodnicki TC, Verma PJ. (2011) Generation of stable pluripotent stem cells from NOD mouse tail-tip fibroblasts. *Diabetes*. 2011 May;60(5):1393-8.

Liu J, Balehosur D, Murray B, Kelly JM, Sumer H, Verma PJ. (2012) Generation and characterization of reprogrammed sheep induced pluripotent stem cells. *Theriogenology*. 2012 Jan 15;77(2):338-46.e1.

Loh YH, Hartung O, Li H, Guo C, Sahalie JM, Manos PD, Urbach A, Heffner GC, Grskovic M, Vigneault F, Lensch MW, Park IH, Agarwal S, Church GM, Collins JJ, Irion S, Daley GQ. (2010) Reprogramming of T cells from human peripheral blood. *Cell Stem Cell*. 2010 Jul 2;7(1):15-9.

Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. (2002) Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science*. 2002 Feb 1;295(5556):868-72.

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

Lu Y, West FD, Jordan BJ, Mumaw JL, Jordan ET, Gallegos-Cardenas A, Beckstead RB, Stice SL. (2012b) Avian-induced pluripotent stem cells derived using human reprogramming factors. *Stem Cells Dev*. 2012 Feb 10;21(3):394-403

Luo G, Ivics Z, Izsvák Z, Bradley A. (1998) Chromosomal transposition of a Tc1/mariner-like element in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Sep 1;95(18):10769-73.

Macarthur CC, Fontes A, Ravinder N, Kuninger D, Kaur J, Bailey M, Taliana A, Vemuri MC, Lieu PT. (2012) Generation of human-induced pluripotent stem cells by a nonintegrating RNA Sendai virus vector in feeder-free or xeno-free conditions. *Stem Cells Int*. 2012;2012:564612.

Maherali N, Ahfeldt T, Rigamonti A, Utikal J, Cowan C, Hochedlinger K. (2008) A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 3(3):340-5.

Marchetto MC, Gage FH. (2012) Modeling brain disease in a dish: really? *Cell Stem Cell*. 2012 Jun 14;10(6):642-5.

Marcus AJ, Woodbury D. (2008) Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. *J Cell Mol Med*. 2008 Jun;12(3):730-42.

Markoulaki S, Hanna J, Beard C, Carey BW, Cheng AW, Lengner CJ, Dausman JA, Fu D, Gao Q, Wu S, Cassady JP, Jaenisch R. (2009) Transgenic mice with defined combinations of drug-inducible reprogramming factors. *Nat Biotechnol*. 2009 Feb;27(2):169-71.

Martin GR. (1980) Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science*. 1980 Aug 15;209(4458):768-76.

Martin GR. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Dec;78(12):7634-8.

Martinez Y, B éna F, Gimelli S, Tirefort D, Dubois-Dauphin M, Krause KH, Preynat-Seauve O. (2012) Cellular diversity within embryonic stem cells: pluripotent clonal sublines show distinct differentiation potential. *J Cell Mol Med*. 2012 Mar;16(3):456-67.

Maruyama M, Ichisaka T, Nakagawa M, Yamanaka S. (2005) Differential roles for Sox15 and Sox2 in transcriptional control in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem*. 2005 Jul 1;280(26):24371-9. Epub 2005 Apr 29.

Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA, Ko MS, Niwa H. (2007) Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Jun;9(6):625-35.

Máé L, Chuah MK, Belay E, Jerchow B, Manoj N, Acosta-Sanchez A, Grzela DP, Schmitt A, Becker K, Matrai J, Ma L, Samara-Kuko E, Gysemans C, Pryputniewicz D, Miskey C, Fletcher B, VandenDriessche T, Ivics Z, Izsvák Z. (2009) Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat Genet.* 2009 Jun;41(6):753-61.

Mathur D, Danford TW, Boyer LA, Young RA, Gifford DK, Jaenisch R. (2008) Analysis of the mouse embryonic stem cell regulatory networks obtained by ChIP-chip and ChIP-PET. *Genome Biol.* 2008;9(8):R126.

Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, Yokota T. (1999) STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J.* 1999 Aug 2;18(15):4261-9.

Matsuda T, Cepko CL. (2004) Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jan 6;101(1):16-22.

Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. (1992) Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell.* 1992 Sep 4;70(5):841-7.

Michiue H, Tomizawa K, Wei FY, Matsushita M, Lu YF, Ichikawa T, Tamiya T, Date I, Matsui H. (2005) The NH2 terminus of influenza virus hemagglutinin-2 subunit peptides enhances the antitumor potency of polyarginine-mediated p53 protein transduction. *J Biol Chem.* 2005 Mar 4;280(9):8285-9.

Miller RA, Ruddle FH. (1976) Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. *Cell.* 1976 Sep;9(1):45-55.

Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. (2003) The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell.* 2003 May 30;113(5):631-42.

Miyoshi K, Tsuji D, Kudoh K, Satomura K, Muto T, Itoh K, Noma T. (2010) Generation of human induced pluripotent stem cells from oral mucosa. *J Biosci Bioeng.* 2010 Sep;110(3):345-50.

Moss EG, Lee RC, Ambros V. (1997) The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. *Cell.* 1997 Mar 7;88(5):637-46.

Muchkaeva IA, Dashinimaev EB, Artyuhov AS, Myagkova EP, Vorotelyak EA, Yegorov YY, Vishnyakova KS, Kravchenko IE, Chumakov PM, Terskikh VV, Vasiliev AV. (2014) Generation of iPS Cells from Human Hair Follicle Dermal Papilla Cells. *Acta Naturae.* 2014 Jan;6(1):45-53.

Muenthaisong S. (2012) Generation of mouse induced pluripotent stem (IPS) cells by sleeping beauty (SB) transposon. Doktori értekezés. Szent István Egyetem, Magyarország.

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

Nagashima HI, Kato Y, Ogawa S. (1989) Microsurgical bisection of porcine morulae and blastocysts to produce monozygotic twin pregnancy. *Gamete Res.* 1989 May;23(1):1-9.

Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. (1993) Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Sep 15;90(18):8424-8.

Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. (2003) Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory: New York.* 2003. pp. 453-506

Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol.* 2008 Jan;26(1):101-6.

Nakanishi M, Otsu M. (2012) Development of Sendai virus vectors and their potential applications in gene therapy and regenerative medicine. *Curr Gene Ther.* 2012 Oct;12(5):410-6.

Nakano M, Ishimura M, Chiba J, Kanegae Y, Saito I. (2001) DNA substrates influence the recombination efficiency mediated by FLP recombinase expressed in mammalian cells. *Microbiol Immunol.* 2001;45(9):657-65.

Narsinh KH, Jia F, Robbins RC, Kay MA, Longaker MT, Wu JC. (2011) Generation of adult human induced pluripotent stem cells using nonviral minicircle DNA vectors. *Nat Protoc.* 2011 Jan;6(1):78-88.

Ng ES, Davis RP, Hatzistavrou T, Stanley EG, Elefanty AG. (2008) Directed differentiation of human embryonic stem cells as spin embryoid bodies and a description of the hematopoietic blast colony forming assay. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2008 Jan;Chapter 1:Unit 1D.3.

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.* 1998 Oct 30;95(3):379-91.

Nichols J, Smith A. (2009) Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell.* 2009 Jun 5;4(6):487-92.

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.* 1999 Aug;19(8):5453-65.

Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, Furuta B, Umemura Y, Nakajima Y, Ikehara Y, Kobayashi T, Segawa H, Takayasu S, Sato H, Motomura K, Uchida E, Kanayasu-Toyoda T, Asashima M, Nakauchi H, Yamaguchi T, Nakanishi M. (2011) Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J Biol Chem*. 2011 Feb 11;286(6):4760-71.

Nishishita N, Shikamura M, Takenaka C, Takada N, Fusaki N, Kawamata S. (2012) Generation of virus-free induced pluripotent stem cell clones on a synthetic matrix via a single cell subcloning in the naïve state. *PLoS One*. 2012;7(6):e38389.

Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. (1998) Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*. 1998 Jul 1;12(13):2048-60.

Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*. 2000 Apr;24(4):372-6.

Niwa H. (2001) Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct*. 2001 Jun;26(3):137-48.

Ogawa K, Nishinakamura R, Iwamatsu Y, Shimosato D, Niwa H. (2006) Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Apr 28;343(1):159-66.

Ogawa K, Saito A, Matsui H, Suzuki H, Ohtsuka S, Shimosato D, Morishita Y, Watabe T, Niwa H, Miyazono K. (2007) Activin-Nodal signaling is involved in propagation of mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci*. 2007 Jan 1;120(Pt 1):55-65.

Ogonuki N, Inoue K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Tanemura K, Suzuki O, Nakayama H, Doi K, Ohtomo Y, Satoh M, Nishida A, Ogura A. (2002) Early death of mice cloned from somatic cells. *Nat Genet*. 2002 Mar;30(3):253-4.

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*. 1990 Feb 9;60(3):461-72.

Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. (2008) Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*. 2008 Nov 7;322(5903):949-53.

Okita K, Yamakawa T, Matsumura Y, Sato Y, Amano N, Watanabe A, Goshima N, Yamanaka S. (2013) An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells*. 2013 Mar;31(3):458-66.

Ono M, Hamada Y, Horiuchi Y, Matsuo-Takasaki M, Imoto Y, Satomi K, Arinami T, Hasegawa M, Fujioka T, Nakamura Y, Noguchi E. (2012) Generation of induced pluripotent stem cells from human nasal epithelial cells using a Sendai virus vector. *PLoS One*. 2012;7(8):e42855.

Pauklin S, Pedersen RA, Vallier L. Mouse pluripotent stem cells at a glance. *J Cell Sci*. 2011 Nov 15;124(Pt 22):3727-32.

Peitz M, Pfannkuche K, Rajewsky K, Edenhofer F. (2002) Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 2;99(7):4489-94.

Perez EE, Wang J, Miller JC, Jouvenot Y, Kim KA, Liu O, Wang N, Lee G, Bartsevich VV, Lee YL, Guschin DY, Rupniewski I, Waite AJ, Carpenito C, Carroll RG, Orange JS, Urnov FD, Rebar EJ, Ando D, Gregory PD, Riley JL, Holmes MC, June CH. (2008) Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*. 2008 Jul;26(7):808-16.

Polejaeva I, Mitalipov S. (2013) Stem cell potency and the ability to contribute to chimeric organisms. *Reproduction*. 2013 Mar 7;145(3):R81-8.

Robertson EJ. (1987) Embryo-derived stem cell lines. In: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach. *IRL press: Oxford*. 1987. pp. 71-112.

Rohani L, Johnson AA, Arnold A, Stolzing A. (2014) The aging signature: a hallmark of induced pluripotent stem cells? *Aging Cell*. 2014 Feb;13(1):2-7.

Rosner MH, Vigano MA, Ozato K, Timmons PM, Poirier F, Rigby PW, Staudt LM. (1990) A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature*. 1990 Jun 21;345(6277):686-92.

Rowland BD, Bernards R, Peeper DS. (2005) The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol*. 2005 Nov;7(11):1074-82.

Sarria AJ, Panini SR, Evans RM. (1992) A functional role for vimentin intermediate filaments in the metabolism of lipoprotein-derived cholesterol in human SW-13 cells. *J Biol Chem*. 1992 Sep 25;267(27):19455-63.

Sartori C, DiDomenico AI, Thomson AJ, Milne E, Lillico SG, Burdon TG, Whitelaw CB. (2012) Ovine-induced pluripotent stem cells can contribute to chimeric lambs. *Cell Reprogram*. 2012 Feb;14(1):8-19.

Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. (2004) Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med*. 2004 Jan;10(1):55-63.

Schmidt-Supprian M, Rajewsky K. (2007) Vagaries of conditional gene targeting. *Nat Immunol*. 2007 Jul;8(7):665-8.

Schnabel LV, Abratte CM, Schimenti JC, Southard TL, Fortier LA. (2012) Genetic background affects induced pluripotent stem cell generation. *Stem Cell Res Ther*. 2012; 3(4): 30.



Schröder HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P. (1990) New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature*. 1990 Mar 29;344(6265):435-9.

Schröder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F. (2002) HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*. 2002 Aug 23;110(4):521-9.

Schroeder J, Kueper J, Leon K, Liebergall M. (2015) Stem cells for spine surgery. *World J Stem Cells*. 2015 Jan 26;7(1):186-94.

Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, Nakata H, Tohyama S, Hashimoto H, Kodaira M, Okada Y, Seimiya H, Fusaki N, Hasegawa M, Fukuda K. (2010) Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell*. 2010 Jul 2;7(1):11-4.

Sharov AA, Masui S, Sharova LV, Piao Y, Aiba K, Matoba R, Xin L, Niwa H, Ko MS. (2008) Identification of Pou5f1, Sox2, and Nanog downstream target genes with statistical confidence by applying a novel algorithm to time course microarray and genome-wide chromatin immunoprecipitation data. *BMC Genomics*. 2008 Jun 3;9:269.

Shevinsky LH, Knowles BB, Damjanov I, Solter D. (1982) Monoclonal antibody to murine embryos defines a stage-specific embryonic antigen expressed on mouse embryos and human teratocarcinoma cells. *Cell*. 1982 Oct;30(3):697-705.

Shi G, Jin Y. (2010) Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. *Stem Cell Res Ther*. 2010 Dec 14;1(5):39.

Shimosato D, Shiki M, Niwa H. (2007) Extra-embryonic endoderm cells derived from ES cells induced by GATA factors acquire the character of XEN cells. *BMC Dev Biol*. 2007 Jul 3;7:80.

Singh U, Quintanilla RH, Grecian S, Gee KR, Rao MS, Lakshmipathy U. (2012) Novel live alkaline phosphatase substrate for identification of pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev*. 2012 Sep;8(3):1021-9.

Smith A. (2001). Embryonic Stem Cells. In Stem Cell Biology, Marshak DR, Gardner RL, Gottlieb D. (Ed.) *Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York*, 2001 pp. 205–230.

Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O, Jaenisch R. (2009) Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*. 2009 Mar 6;136(5):964-77.

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

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

Sommer AG, Rozelle SS, Sullivan S, Mills JA, Park SM, Smith BW, Iyer AM, French DL, Kotton DN, Gadue P, Murphy GJ, Mostoslavsky G. (2012) Generation of human induced pluripotent stem cells from peripheral blood using the STEMCCA lentiviral vector. *J Vis Exp*. 2012 Oct 31;(68). pii: 4327. doi: 10.3791/4327.

Sommer CA, Stadtfeld M, Murphy GJ, Hochedlinger K, Kotton DN, Mostoslavsky G. (2009) Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells*. 2009 Mar;27(3):543-9.

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

Son EY, Ichida JK, Wainger BJ, Toma JS, Rafuse VF, Woolf CJ, Eggan K. (2011) Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell Stem Cell*. 2011 Sep 2;9(3):205-18.

Spinelli V, Guillot PV, De Coppi P. (2013) Induced pluripotent stem (iPS) cells from human fetal stem cells (hFSCs). *Organogenesis*. 2013 Apr-Jun;9(2):101-10.

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

Staerk J, Dawlaty MM, Gao Q, Maetzel D, Hanna J, Sommer CA, Mostoslavsky G, Jaenisch R. (2010) Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010 Jul 2;7(1):20-4.

Stavridis MP, Lunn JS, Collins BJ, Storey KG. (2007) A discrete period of FGF-induced Erk1/2 signalling is required for vertebrate neural specification. *Development*. 2007 Aug;134(16):2889-94.

Stephen SL, Sivanandam VG, Kochanek S. (2008) Homologous and heterologous recombination between adenovirus vector DNA and chromosomal DNA. *J Gene Med*. 2008 Nov;10(11):1176-89.

Su RJ, Baylink DJ, Neises A, Kiroyan JB, Meng X, Payne KJ, Tschudy-Seney B, Duan Y, Appleby N, Kearns-Jonker M, Gridley DS, Wang J, Lau KH, Zhang XB. (2013) Efficient generation of integration-free ips cells from human adult peripheral blood using BCL-XL together with Yamanaka factors. *PLoS One*. 2013 May 21;8(5):e64496.

Sullivan KA, Hayes JM, Wiggin TD, Backus C, Su Oh S, Lentz SI, Brosius F 3rd, Feldman EL. (2007) Mouse models of diabetic neuropathy. *Neurobiol Dis*. 2007 Dec;28(3):276-85. Epub 2007 Jul 31.

Sun N, Panetta NJ, Gupta DM, Wilson KD, Lee A, Jia F, Hu S, Cherry AM, Robbins RC, Longaker MT, Wu JC. (2009) Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 15;106 (37):15720-5.

Sun N, Zhao H. (2013) Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing. *Biotechnol Bioeng*. 2013 Jul;110(7):1811-21.

Suzuki O, Matsuda J, Takano K, Yamamoto Y, Asano T, Naiki M, Kusanagi M. (1999) Effect of genetic background on establishment of mouse embryonic stem cells. *Exp Anim.* 1999 Jul;48(3):213-6.

Tada M, Tada T, Lefebvre L, Barton SC, Surani MA. (1997) Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *EMBO J.* 1997 Nov 3;16(21):6510-20.

Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. (2001) Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol.* 2001 Oct 2;11(19):1553-8.

Tada M, Morizane A, Kimura H, Kawasaki H, Ainscough JF, Sasai Y, Nakatsuji N, Tada T. (2003) Pluripotency of reprogrammed somatic genomes in embryonic stem hybrid cells. *Dev Dyn.* 2003 Aug;227(4):504-10.

Takahashi K, Mitsui K, Yamanaka S. (2003) Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature.* 2003 May 29;423(6939):541-5.

Takahashi K, Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006 Aug 25;126(4):663-76.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007 Nov 30;131(5):861-72.

Takashima Y, Guo G, Loos R, Nichols J, Ficuz G, Krueger F, Oxley D, Santos F, Clarke J, Mansfield W, Reik W, Bertone P, Smith A. (2014) Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. *Cell.* 2014 Sep 11;158(6):1254-69.

Takata Y, Kishine H, Sone T, Andoh T, Nozaki M, Poderycki M, Chesnut JD, Imamoto F. (2011) Generation of iPS cells using a BacMam multigene expression system. *Cell Struct Funct.* 2011;36(2):209-22.

Tamaoki N, Takahashi K, Tanaka T, Ichisaka T, Aoki H, Takeda-Kawaguchi T, Iida K, Kunisada T, Shibata T, Yamanaka S, Tezuka K. (2010) Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking. *J Dent Res*. 2010 Aug;89(8):773-8.

Tamashiro KL, Wakayama T, Akutsu H, Yamazaki Y, Lachey JL, Wortman MD, Seeley RJ, D'Alessio DA, Woods SC, Yanagimachi R, Sakai RR. (2002) Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. *Nat Med*. 2002 Mar;8(3):262-7.

Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis AK, Nagy A, Rossant J. (1998) Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science*. 1998 Dec 11;282(5396):2072-5.

Taranger CK, Noer A, Sørensen AL, Håkelién AM, Boquest AC, Collas P. (2005) Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol Biol Cell*. 2005 Dec;16(12):5719-35.

Taylor SM, Jones PA. (1979) Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell*. 1979 Aug;17(4):771-9.

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

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.

Tomioka M, Nishimoto M, Miyagi S, Katayanagi T, Fukui N, Niwa H, Muramatsu M, Okuda A. (2002) Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. *Nucleic Acids Res*. 2002 Jul 15;30(14):3202-13.

Tsai SY, Clavel C, Kim S, Ang YS, Grisanti L, Lee DF, Kelley K, Rendl M. (2010) Oct4 and klf4 reprogram dermal papilla cells into induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2010 Feb;28(2):221-8.

Tsai SY, Bouwman BA, Ang YS, Kim SJ, Lee DF, Lemischka IR, Rendl M. (2011) Single transcription factor reprogramming of hair follicle dermal papilla cells to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2011 Jun;29(6):964-71.

Tsunoda Y, McLaren A. (1983) Effect of various procedures on the viability of mouse embryos containing half the normal number of blastomeres. *J Reprod Fertil*. 1983 Sep;69(1):315-22

Umehara H, Kimura T, Ohtsuka S, Nakamura T, Kitajima K, Ikawa M, Okabe M, Niwa H, Nakano T. (2007) Efficient derivation of embryonic stem cells by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *Stem Cells*. 2007 Nov;25(11):2705-11.

Uren AG, Mikkers H, Kool J, van der Weyden L, Lund AH, Wilson CH, Rance R, Jonkers J, van Lohuizen M, Berns A, Adams DJ. (2009) A high-throughput splinkerette-PCR method for the isolation and sequencing of retroviral insertion sites. *Nat Protoc*. 2009;4(5):789-98.

Valamehr B, Robinson M, Abujarour R, Reznar B, Vranceanu F, Le T, Medcalf A, Lee TT, Fitch M, Robbins D, Flynn P. (2014) Platform for Induction and Maintenance of Transgene-free hiPSCs Resembling Ground State Pluripotent Stem. *Stem Cell Reports*. 2014 Mar 6;2(3):366-81.

Vallier L, Alexander M, Pedersen RA. (2005) Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci*. 2005 Oct 1;118(Pt 19):4495-509.

VandenDriessche T, Ivics Z, Izsvák Z, Chuah MK. (2009) Emerging potential of transposons for gene therapy and generation of induced pluripotent stem cells. *Blood*. 2009 Aug 20;114(8):1461-8.

Voelkel C, Galla M, Maetzig T, Warlich E, Kuehle J, Zychlinski D, Bode J, Cantz T, Schambach A, Baum C. (2010) Protein transduction from retroviral Gag precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 27;107(17):7805-10.

Wada N, Wang B, Lin NH, Laslett AL, Gronthos S, Bartold PMJ. (2011) Induced pluripotent stem cell lines derived from human gingival fibroblasts and periodontal ligament fibroblasts. *Periodontal Res.* 2011 Aug;46(4):438-47.

Wadia JS, Dowdy SF. (2002) Protein transduction technology. *Curr Opin Biotechnol.* 2002 Feb;13(1):52-6.

Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. (1998) Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature.* 1998 Jul 23;394(6691):369-74.

Wakayama T, Yanagimachi R. (1999) Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Nat Genet.* 1999 Jun;22(2):127-8.

Wang W, Lin C, Lu D, Ning Z, Cox T, Melvin D, Wang X, Bradley A, Liu P. (2008) Chromosomal transposition of PiggyBac in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jul 8;105(27):9290-5.

Ware CB, Nelson AM, Blau CA. (2006) A comparison of NIH-approved human ESC lines. *Stem Cells.* 2006 Dec;24(12):2677-84.

Warlich E, Kuehle J, Cantz T, Brugman MH, Maetzig T, Galla M, Filipczyk AA, Halle S, Klump H, Schöder HR, Baum C, Schroeder T, Schambach A. (2011) Lentiviral vector design and imaging approaches to visualize the early stages of cellular reprogramming. *Mol Ther.* 2011 Apr;19(4):782-9.

Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, Rossi DJ. (2010) Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. *Cell Stem Cell.* 2010 Nov 5;7(5):618-30.

Warren L, Ni Y, Wang J, Guo X. (2012) Feeder-free derivation of human induced pluripotent stem cells with messenger RNA. *Sci Rep.* 2012;2:657.

Wernig M, Lengner CJ, Hanna J, Lodato MA, Steine E, Foreman R, Staerk J, Markoulaki S, Jaenisch R. (2008a) A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nat Biotechnol.* 2008 Aug;26(8):916-24.

Wernig M, Meissner A, Cassady JP, Jaenisch R. (2008b) C-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell.* 2008 Jan 10;2(1):10-2.

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

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

White RA, Dowler LL, Pasztor LM, Gatson LL, Adkison LR, Angeloni SV, Wilson DB. (1995) Assignment of the transcription factor GATA4 gene to human chromosome 8 and mouse chromosome 14: Gata4 is a candidate gene for Ds (disorganization). *Genomics.* 1995 May 1;27(1):20-6.

Willadsen SM. (1980) The viability of early cleavage stages containing half the normal number of blastomeres in the sheep. *J Reprod Fertil.* 1980 Jul;59(2):357-62.

Williams TJ, Elsdon RP, Seidel GE Jr. (1984) Pregnancy rates with bisected bovine embryos. *Theriogenology.* 1984 Nov;22(5):521-31

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature.* 1997 Feb 27;385(6619):810-3.

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



- Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämmäläinen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A. (2009) PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2009 Apr 9;458(7239):766-70.
- Wrana JL, Attisano L, Cárcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF, Massagué J. (1992) TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell*. 1992 Dec 11;71(6):1003-14.
- Wray J, Hartmann C. (2012) WNTing embryonic stem cells. *Trends Cell Biol*. 2012 Mar;22(3):159-68.
- Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM. (2003) Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science*. 2003 Jun 13;300(5626):1749-51.
- Xiao L, Yuan X, Sharkis SJ. (2006) Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2006 Jun;24(6):1476-86.
- Xu RH, Chen X, Li DS, Li R, Addicks GC, Glennon C, Zwaka TP, Thomson JA. (2002) BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol*. 2002 Dec;20(12):1261-4.
- Xue Y, Cai X, Wang L, Liao B, Zhang H, Shan Y, Chen Q, Zhou T, Li X, Hou J, Chen S, Luo R, Qin D, Pei D, Pan G. (2013) Generating a non-integrating human induced pluripotent stem cell bank from urine-derived cells. *PLoS One*. 2013 Aug 5;8(8):e70573.
- Yagi T, Kosakai A, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Nihei Y, Nabetani A, Ishikawa F, Arai Y, Hirose N, Okano H, Suzuki N. (2012) Establishment of induced pluripotent stem cells from centenarians for neurodegenerative disease research. *PLoS One*. 2012;7(7):e41572.
- Yakubov E, Rechavi G, Rozenblatt S, Givol D. (2010) Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Mar 26;394(1):189-93.

Yan X, Qin H, Qu C, Tuan RS, Shi S, Huang GT. (2010) iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. *Stem Cells Dev.* 2010 Apr;19(4):469-80.

Yates J, Warren N, Reisman D, Sugden B. (1984) A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81(12): 3806-10.

Yates JL, Warren N, Sugden B. (1985) Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* 1985; 313(6005): 812-5.

Yeom YI, Fuhrmann G, Ovitt CE, Brehm A, Ohbo K, Gross M, Hübner K, Schöder HR. (1996) Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development.* 1996 Mar;122(3):881-94.

Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. (2003) BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell.* 2003 Oct 31;115(3):281-92.

Ying QL, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A. (2008) The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature.* 2008 May 22;453(7194):519-23.

Ying Shi, Walden Ai (2013) Function of KLF4 in Stem Cell Biology, Pluripotent Stem Cells, Dr. Deepa Bhartiya (Ed.), ISBN: 978-953-51-1192-4.

Yu J, Vodyanik MA, He P, Slukvin II, Thomson JA. (2006) Human embryonic stem cells reprogram myeloid precursors following cell-cell fusion. *Stem Cells.* 2006 Jan;24(1):168-76.

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 2007 Dec 21;318(5858):1917-20.

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

Yusa K, Rad R, Takeda J, Bradley A. (2009) Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods*. 2009 May;6(5):363-9.

Zeng X, Miura T, Luo Y, Bhattacharya B, Condie B, Chen J, Ginis I, Lyons I, Mejido J, Puri RK, Rao MS, Freed WJ. (2004) Properties of pluripotent human embryonic stem cells BG01 and BG02. *Stem Cells*. 2004;22(3):292-312.

Zhao S, Nichols J, Smith AG, Li M. (2004) SoxB transcription factors specify neuroectodermal lineage choice in ES cells. *Mol Cell Neurosci*. 2004 Nov;27(3):332-42.

Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Schöder HR, Duan L, Ding S. (2009) Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins. *Cell Stem Cell*. 2009 May 8;4(5):381-4.

Zhou T, Benda C, Duzinger S, Huang Y, Li X, Li Y, Guo X, Cao G, Chen S, Hao L, Chan YC, Ng KM, Ho JC, Wieser M, Wu J, Redl H, Tse HF, Grillari J, Grillari-Voglauer R, Pei D, Esteban MA. (2011) Generation of induced pluripotent stem cells from urine. *J Am Soc Nephrol*. 2011 Jul;22(7):1221-8.

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

Zhu S, Li W, Zhou H, Wei W, Ambasudhan R, Lin T, Kim J, Zhang K, Ding S. (2010) Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell*. 2010 Dec 3;7(6):651-5.

Zuo B, Yang J, Wang F, Wang L, Yin Y, Dan J, Liu N, Liu L. (2012) Influences of lamin A levels on induction of pluripotent stem cells. *Biol Open*. 2012 Nov 15;1(11):1118-27.

## 9.2. Felhasznált oldatok/tenyésztő médiumok

### 1. Fibroblaszt-m édiium

DMEM-GlutaMaxI

FBS.....	10% (v/v)
Pen/Strep (10.000 U/ml).....	1% (v/v)

### 2. mESC-m édiium

DMEM-GlutaMaxI

FBS (Stem Cell Qualified, West Sacramento, USA).....	15% (v/v)
Non-essential amino acids (100x).....	1% (v/v)
Pen/Strep (10.000 U/ml).....	1% (v/v)
$\beta$ -mercaptoetanol.....	100 $\mu$ M
LIF (ESGRO, Chemicon/Millipore, Billerica, MA, USA).....	1000 U/ml

### 3. hESC-m édiium

DMEM/F12

Knockout Serum Replacement.....	20 % (v/v)
Non-essential amino acids (100x).....	1% (v/v)
$\beta$ -mercaptoetanol.....	100 $\mu$ M
Pen/Strep (10.000 U/ml).....	1 % (v/v)
bFGF.....	10 ng/ml

### 4. Mos ó-puffer

PBS

CaCl <sub>2</sub> .....	0,1 mM
MgCl <sub>2</sub> .....	1 mM

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

Trizma® base.....	29,7 mM
Maleic acid .....	6 mM
MgCl <sub>2</sub> .....	0,08 % (v/v)
Naphtol-As MX Foszfatáz.....	10,8 mM
Fast Red TR Salt .....	23 µM

6. Lízis-puffer (PH:8,2)

Tris/HCl .....	10 mM
NaCl.....	400 mM
Na <sub>2</sub> EDTA.....	2 mM

7. Proteináz K-oldat

Proteináz K .....	2 mg/ml
SDS.....	1% (v/v)
Na <sub>2</sub> EDTA.....	2 mM

8. Egér differenciációs-médium

DMEM-GlutaMaxI	
FBS (Stem Cell Qualified, West Sacramento, USA).....	15% (v/v)
Non-essential amino acids (100x).....	1% (v/v)
Pen/Strep (10.000 U/ml) .....	1% (v/v)
β-mercaptoetanol.....	100 µM

9. Humán differenciációs-médium

DMEM-GlutaMaxI	
FBS.....	20% (v/v)
Non-essential amino acids (100x).....	1% (v/v)
β-mercaptoetanol.....	100 µM

10. Egér neurális-médiumA

DMEM/F12

Glükóz.....	3 mg/ml
Pen/Strep (10.000 U/ml).....	1% (v/v)
AlbuMax-I.....	3 mg/ml
N2 Supplement (100x).....	1 % (v/v)
bFGF.....	10 ng/ml

11. Egér neurális-médiumB

DMEM/F12.....	50 % (v/v)
Neurobazális médium.....	50 % (v/v)
L-Glutamin.....	1 mM
Pen/Strep (10.000 U/ml).....	1% (v/v)
AlbuMax-I.....	3 mg/ml
N2 Supplement (100x).....	0,5 % (v/v)
B-27® Serum-Free Supplement (50X).....	1 % (v/v)

12. Humán PBMC-médium

QBSF®-60 Serum Free Medium (Quality Biological, Gaithersburg, USA)

Pen/Strep (10.000 U/ml).....	1 % (v/v)
Aszkorbinsav.....	50 µg/ml
Növekedési faktorok:	
SCF (R&D systems, Minneapolis, USA).....	50 ng/ml
IL-3 (R&D systems, Minneapolis, USA).....	10 ng/ml
EPO (R&D systems, Minneapolis, USA).....	2 U/ml
IGF-1 (R&D systems, Minneapolis, USA).....	40 ng/ml

13. Humán IMDM MEF-m édiüm

Iscove's Modified Dulbecco's M édiüm

FBS .....	10% (v/v)
Non-essential amino acids (100x) .....	1% (v/v)
$\beta$ -mercaptoetanol .....	100 $\mu$ M
Pen/Strep (10.000 U/ml) .....	1% (v/v)
Aszkorbinsav .....	50 $\mu$ g/ml
N öveked ési faktorok:	
SCF (R&D systems, Minneapolis, USA) .....	50 ng/ml
IL-3 (R&D systems, Minneapolis, USA) .....	10 ng/ml
EPO (R&D systems, Minneapolis, USA) .....	2 U/ml
IGF-1 (R&D systems, Minneapolis, USA) .....	40 ng/ml
Dexamethasone .....	1 $\mu$ M
bFGF .....	10 ng/ml

14. Klorid-alap ú l ézis puffer

MilliQ v éz

Tris/HCl .....	10mM
EDTA .....	1mM
KCl .....	50mM
MgCl <sub>2</sub> .....	2mM

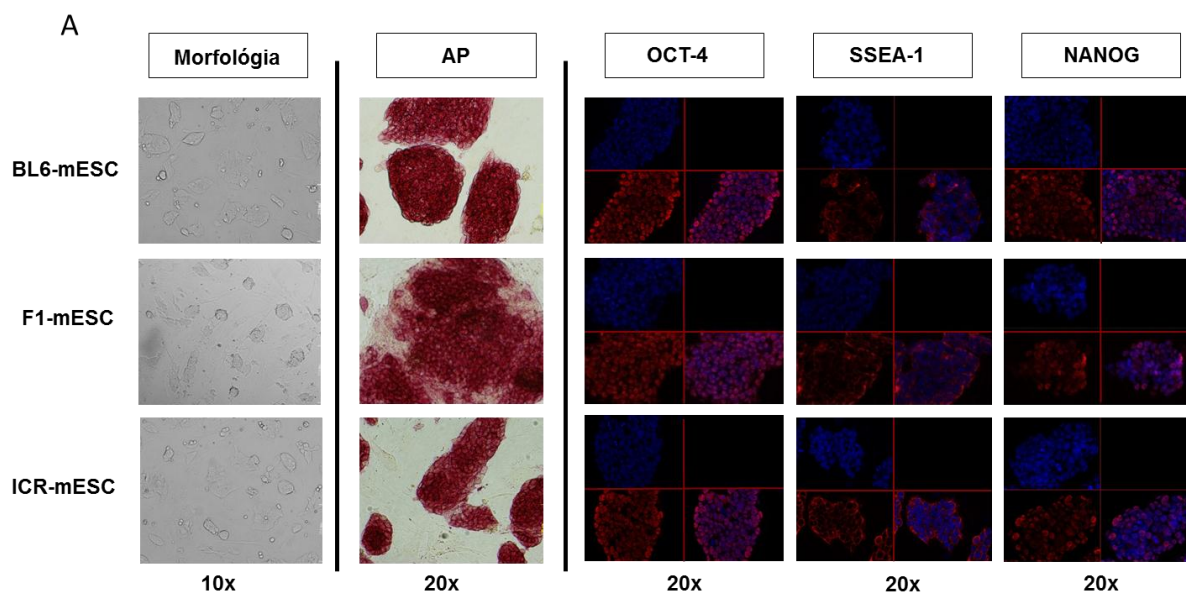
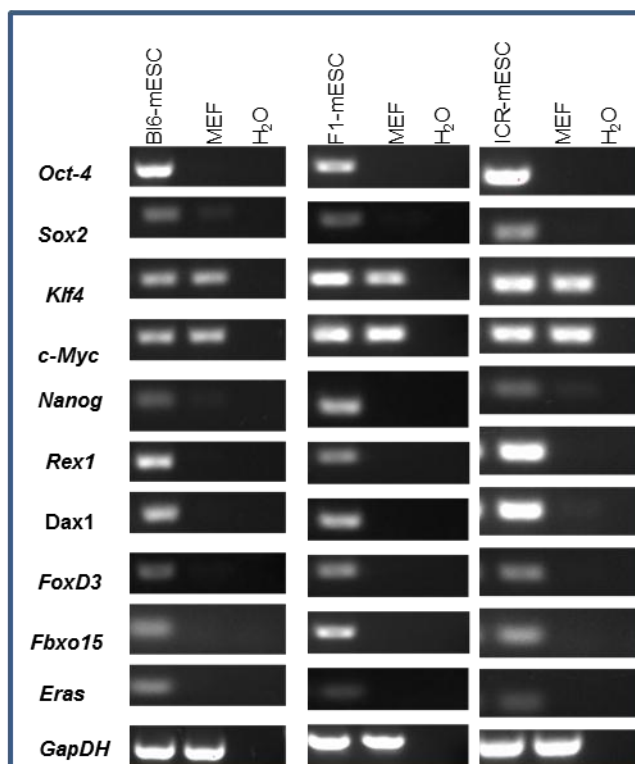
### 9.3. Melléklet táblázatai és ábrái

#### M1. táblázat

A kísérletekben felhasznált elsődleges és másodlagos antitestek

	Gyártó	Hígítás
<b>Elsődleges Antitestek</b>		
<b>Egér Pluripotencia markerek</b>		
mouse anti-OCT4	Santa-Cruz	1:100
mouse anti-SSEA1	Santa-Cruz	1:100
goat anti-Nanog	R&D Systems	1:50
<b>Humán Pluripotencia markerek</b>		
goat anti-hNanog	R&D Systems	1:20, 50
mouse anti Tra 1-60	Santa Cruz	1:50
mouse anti Tra 1-81	Millipore	1:100, 200
goat- $\alpha$ -human Oct3/4	Santa Cruz	1:100
mouse anti-E-Cadherin	Invitrogen	1:1000
<b>Egér spontán/kardiális differenciációs markerek</b>		
monoclonal cardiac troponin T	Hybridoma B.	1:100
rabbit anti-Desmin	Cell Signaling	1:100
<b>Humán spontán differenciációs markerek</b>		
mouse anti-hNestin	Millipore	1:200, 1000
rabbit anti- $\beta$ III-Tubulin	Covance	1:2000
mouse anti-GATA4	Santa Cruz	1:50
mouse-a-human Vimentin	Sigma-Aldrich	1:50
rabbit-a-human AFP	Quartett	1:40
rabbit anti-BrachyuryT	Santa Cruz	1:50
<b>Egér neurális markerek</b>		
mouse anti-Nestin	Hybridoma B.	1:50, 100
neuronal class III $\beta$ -tubulin	Covance	1:2000
<b>Másodlagos antitestek</b>		
AlexaFluor 594 donkey anti-goat IgG	Life Tech.	1:2000
AlexaFluor 594 donkey anti-rabbit IgG	Life Tech.	1:2000
AlexaFluor 594 donkey anti-mouse	Life Tech.	1:2000
AlexaFluor 488 donkey anti-mouse IgG	Life Tech.	1:2000
AlexaFluor 488 goat anti-rabbit IgG	Life Tech.	1:2000
AlexaFluor 488 donkey anti goat IgG	Life Tech.	1:2000
AlexaFluor 647 donkey anti mouse IgG	Life Tech	1:2000



**B****M1. ábra**

**A három különböző genetikai háttérű mESC vonal pluripotencia jellemzése.** **A)** A fénymikroszkópos felvételek az ESC vonalak morfológiáját és AP-festését mutatja. A fluoreszcens mikroszkóppal készített képek a sejtvonalak ICC-festéseit mutatják a pluripotencia markerekre (kék: DAPI, piros: OCT-4, SSEA-1 és NANOG, zöld: ektopikus EGFP, amely expresszióját az ESC sejtekben nem vártuk). **B)** A pluripotencia gének expresszióját igazoló RT-PCR reakciók.

## 9.4. Publikációs lista

### 9.4.1. Az értekezés témakörében megjelent lektorált magyar és idegen nyelvű

#### publikációk felsorolása

##### 9.4.1.1. Impakt faktoralal rendelkező, idegen nyelvű folyóirat

- Dambrot, C., Buermans, H.P.J., **Varga, E.**, Kosmidis, G., Langenberg, K., Casini, S., Elliott, D.A., Dinnyes, A., Atsma, D., Mummery, C., Braam, S., Davis, R.P. Strategies to rapidly map proviral integration sites and assess cardiogenic potential of nascent human induced pluripotent stem cell clones. *Exp Cell Res.* 2014 Oct 1;327(2):297-306. IF: 3,557
- Varga, E.**, Nemes C., Davis, R.D., Ujhelly, O., Klincumhom, N., Polgar, Z., Muenthaisong, S., Pirity, M.K., Dinnyes, A. Generation of transgene-free mouse induced pluripotent stem cells using an excisable lentiviral system. *Experimental Cell Research*, 2014 Apr 1;322(2):335-44. IF: 3,557
- Nemes, C., **Varga, E.**, Polgar, Z., Klincumhom, N., Pirity, M., Dinnyes, A. Generation of mouse induced pluripotent stem cells by protein transduction. *Tissue Eng Part C Methods.* 2014 May;20(5):383-92. IF: 4,065
- Davis, R., Nemes, C., **Varga, E.**, Freund, C., Kosmidis, G., Gkatzis, K., de Jong, D., Szuhai, K., Dinnyes A., Mummery, C. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Foetal Fibroblasts Using the Sleeping Beauty transposon Gene Delivery System. *Differentiation*, 2013 Jul-Sep;86(1-2):30-7. IF: 2,855
- Muenthaisong, S., Ujhelly, O., Polgar, Z., **Varga, E.**, Ivics, Z., Pirity, M., Dinnyes, A. Generation of mouse induced pluripotent stem cells from different genetic backgrounds using Sleeping Beauty transposon mediated gene transfer. *Experimental Cell Research*, 2012 Nov 15;318(19):2482-9. IF: 3,557

##### 9.4.1.2. Poszter/Absztrakt/Előadás/Konferencia publikáció alkalmi kongresszusi kiadványban, idegen nyelven

- Kobolák J, Chandrasekaran A, Ochalek A, Bellák T, Szegedi V, **Varga E**, Avci H, Zhou S, Szczesna K, Smidth B, Dinnyés A. Patient specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) and their neuronal differentiation in Alzheimer's disease "Hungarian Molecular Life Sciences 2015" Conference Eger, Hungary 27-29 March 2015. Presentation
- Bellák T, Chandrasekaran A, Ochalek A, Szegedi V, **Varga E**, Nemes C, Zhou S, Avci H, Kobolák J, Dinnyes A. 3D engineered neural tissue from human induced pluripotent stem cells. "Hungarian Molecular Life Sciences 2015" Conference Eger, Hungary 27-29 March 2015 Abstract and Poster
- Chandrasekaran A, Neelchen Roesingh L, Ochalek A, Nemes C, **Varga E**, Bock I, Szczesna K, Avci H, Kobolák J, Dinnyes A. Comparison of 2D and 3D neuronal differentiation of patient specific induced pluripotent stem cells XV. Biannual Conference of the Hungarian Neuroscience Society, Budapest, Hungary 22-23 Jan. 2015. Abstract and Poster
- Tancos, Zs., Ochalek A., Bock I., **Varga E.**, Nemes Cs., Dinnyes A. Generation of rabbit induced pluripotent stem cells (rbiPSCs) by human reprogramming factors. Salaam Opening Conference. Munich, Germany. 15. Dec. 2014. Abstract (p38) and Poster

- Chandrasekaran A., Neelchen Roesingh L., Ochalek A., Nemes C., **Varga E.**, Bock I., Avci H., Kobolak J., Dinnyes A. Neuronal differentiation of patient specific induced pluripotent stem cells. EMBO Conference Stem cells in Cancer and Regenerative Medicine, Heidelberg, Germany 9–12 Oct. 2014. Abstract and Poster
- Tancos Zs, Ochalek A, Nemes Cs, **Varga E.**, Bock I, Dinnyes A. Establishment and characterization of rabbit iPS cells RGB-Net (Collaborative European Network on Rabbit Genome Biology) Third RGB-Net meeting, Zagreb, Croatia 6-8 May 2014. Presentation
- Dinnyes, A., Nemes, C., Li, T., Phanthong, P., **Varga, E.**, Tancos, Z., Polgar, Z., Berzsenyi, S., Raveh-Amit, H., Feher, A. Induced Pluripotent stem cells for toxicity testing and regenerative medicine of aging-related diseases. 8th European Congress of Biogerontology (ECB) joint with the 2nd international RESOLVE meeting Healthy Ageing and Regenerative Medicine. Beer-Sheva - Dead Sea, Israel, 11. Mar. 2013. Abstract (p. 21.) and Presentation
- Dambrot, C., Braam, S., Davis, R., **Varga, E.**, Ward-van Oostwaard, D., Schalijs, M.J., Atsma, D., Mummery, C. Human induced pluripotent stem cells as in vitro model for hypertrophic cardiomyopathy. 3rd Rembrandt Symposium. Conference Centre Leeuwenhorst, Noordwijkerhout, The Netherlands, Nov. 29. 2012. Abstract and Poster
- Dambrot, C., Braam, S., Davis, R., Langenberg, K., **Varga, E.**, Freund, C., Van de Pas, S., Van Zijl, L., Atsma, D., Mummery, C. Ultra-rapid Methods To Determine Transgene Placement & Cardiac Potential Of Newly Derived Human Induced Pluripotent Stem Cells. Stem Cells, Development and Regulation, International Society of Differentiation Conference. Amsterdam, the Netherlands, 5-8. Nov. 2012. Abstract and Poster
- Dambrot, C., Braam, S., Davis, R., Langenberg, K., **Varga, E.**, Freund, C., van de Pas, S., van Zijl, L., Atsma, D., Mummery, C. Ultra-rapid methods to determine transgene placement and cardiac potential of newly derived human induced pluripotent stem cells. in ISSCR 10th Annual Meeting. Yokohama, Japan, 13-16. Jun. 2012. Abstract (p. 67.) and Poster
- Dinnyes, A., Nemes, C., Muenthaisong, S., Klincumhom, N., Rungarunlert, S., **Varga, E.**, Tancos, Z., Lauko, A., Tosoki, R., Jakus, M., Polgar, Z., Berzsenyi, S., Raveh-Amit, H., Kovacs, K.A., Feher, A. Pluripotent stem cell-derived differentiated cells for toxicity testing and regenerative medicine. Resolve International Meeting "Tissue Remodeling in Ageing and Disease - Emerging Insights into a Complex Pathology". Vienna, Austria, 28. Mar. 2012. Abstract (p. 29.) and Presentation
- Dinnyes, A., Ujhelly, O., Nemes, C., Muenthaisong, S., Rungarunlert, S., Klincumhom, N., **Varga, E.**, Lauko, A., Tosoki, R., Jakus, M., Polgar, Z., Feher, A., Purity, M., Kovacs, K.A. Pluripotent stem cell-derived cardiac and neural cells for toxicity testing and regenerative medicine. Abstracts of the IV Congress of Polish Biotechnology and "IV EUROBIOTECH 2011" Central European Congress of Life Sciences, Krakow, Poland, 12-15. Oct. 2011. Abstract (p. 79.) and Presentation
- Varga, E.**, Nemes, C., Klincumhom, N., Polgar, Z., Muenthaisong, S., Ujhelly, O., Purity, M., Dinnyes, A. Generation of mouse induced pluripotent stem cells from different genetic backgrounds by excisable lentiviral system. ISSCR International Society for Stem Cell Research 9th Annual Meeting. Toronto, Canada, 15-18. Jun. 2011. Abstracts (p.180) and Poster (#1214)
- Nemes, C., **Varga, E.**, Polgar, Z., Klincumhom, N., Purity, M., Dinnyes, A. Generation of mouse induced pluripotent stem cells by protein transduction. ISSCR International Society for Stem Cell Research 9th Annual Meeting. Toronto, Canada, 15-18. Jun. 2011. Abstracts (p.181.) and Poster

- Varga, E.**, Nemes, C., Klincumhom, N., Polgar, Z., Muenthaisong, S., Ujhelly, O., Pirity, M., Dinnyes, A. Generation of transgene-free mouse induced pluripotent stem cells by an excisable lentiviral system. DSSCR 4th Dutch Stem Cell Meeting. Leiden, The Netherlands, 15. Apr. 2011. Abstract and Presentation
- Muenthaisong, S., Ujhelly, O., **Varga, E.**, Polgar, Z., Carstea, A.C., Ivics, Z., Pirity, M., Dinnyes, A. Induction of pluripotent stem (ips) cells by Sleeping Beauty Transposon mediated gene transfer. in 3rd conference on "A Focus On Stem Cells". Debrecen, Hungary, 10-11. Mar. 2011. Abstract (p.14.)
- Muenthaisong, S., Ujhelly, O., **Varga, E.**, Carstea, A.C., Ivics, Z., Pirity, M., Dinnyes, A. Generation of mouse induced pluripotent stem cells from various genetic background by sleeping beauty transposon mediated gene transfer. IETS 37th Annual Conference. Orlando, USA: Reproduction, 8-12. Jan. Fertility and Development, 2011, 23(1): p. 243-244. Abstract and Poster
- Dinnyes, A., Ujhelly, O., Nemes, C., Muenthaisong, S., Rungarunlert, S., Klincumhom, N., **Varga, E.**, Polgar, Z., Pirity, M. Pluripotent stem cells for drug testing and regenerative medicine. in Proceedings of the Advances in Medical Biotechnology Conference. Pécs, Hungary, 29. Nov. – 1. Dec. 2010. Abstract (p. 21.)
- Muenthaisong, S., Ujhelly, O., **Varga, E.**, Ivics, Z., Pirity, M., Dinnyes, A. Generation and Characterization of mouse induced pluripotent stem (iPS) cells line by Sleeping Beauty transposon. in 7th. Annual Conference of ARBs. Kuala Lumpur, Malaysia, 8-12. Nov. 2010. Abstract (p. 69) and Poster
- Muenthaisong, S., Ujhelly, O., **Varga, E.**, Ivics, Z., Pirity, M., Dinnyes, A. Generation of induced pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Sleeping Beauty Transposon. 9th Transgenic Technology Meeting (TT2010). Berlin, Germany, 22-24. Mar. Transgenic Research, 2010. 19(2): p. 344. Abstract and Poster

9.4.1.3. Poszter/Absztrakt/Előadás/Konferencia publikáció alkalmi magyar kongresszusi kiadványban

- Tancos, Z., Ochalek A., Nemes C., **Varga E.**, Bock I., Dinnyes A. Generation of rabbit induced pluripotent stem cells (iPSCs) by human reprogramming factors. in Fialat Biotechnológusok Országos Konferenciája (FIBOK 2014). Szeged, Hungary. 7. March 2014. Abstract and Poster (p.86)
- Varga, E.** Transzgén-mentes Indukálható Pluripotens Össejt vonalak alapítása Egér modellben. Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola fórum. Szent István Egyetem, Gödöllő, Magyarország, 19. Jún. 2013. Absztrakt
- Dinnyes, A., **Varga, E.**, Berzsenyi, S. Betegspecifikus össejtek, majd idegsejtek előállítás a bőr és vér minták genetikai újraprogramozásával. Magyar Tudományos Parkinson Társaság konferenciája. Budapest, Magyarország, 31. Máj. - 1. Jún. 2013. Absztrakt (p. 1-3.) és Előadás
- Dinnyes, A., Berzsenyi, S., Nemes, C., **Varga, E.**, Kobolak, J. Emberi indukált pluripotens össejtek az idegrendszeri és más örökletes betegségek kutatásának szolgálatában. Transzlációs klinikai idegtudományok: az omikától a proteomikáig. Velence, Magyarország, 6-7. Dec. 2013. Absztrakt
- Varga, N., **Varga, E.**, Almássy, Z., Dinnyes, A. Össejt terápia, össejt nélkül. 18. Magyar Mucopolysaccharidózis és társult betegségek Konferencia. Gödöllő, Magyarország, 14-16. Szept. 2012. Absztrakt és Előadás

Pirity, M., Ujhelly, O., Nemes, C., Muenthaisong, S., Rungarunlert, S., Klincumhom, N., **Varga, E.**, Polgar, Z., Carstea, A.C., Bodo, S., Dinnyes, A. Testi sejtek genetikai újraprogramozásának lehetőségei – Tools for Genetic Reprogramming of Somatic Cells. MBK Napok. Gödöllő, Magyarország, 30. Nov. - 1. Dec. 2009. Absztrakt (p. 16.)

#### **9.4.2. Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó lektorált magyar és idegen nyelvű publikációk felsorolása**

9.4.2.1. Impakt faktoral rendelkező, hazai, magyar nyelvű folyóirat

**Varga, E.**, Polgar, Z., Bodo, S., Dinnyes, A. Lézer asszisztált in vitro fertilizáció fagyasztott spermával nyúl modellben. Magyar Allatorvosok Lapja, 2009. 131(9): p. 562-565. IF: 0,146

9.4.2.2. Impakt faktoral nem rendelkező, hazai, magyar nyelvű folyóirat

Varga, N., **Varga, E.**, Almassy, Z. A Hunter-szindróma korai felismerésének lehetőségei és diagnosztikai lépései. Gyermekorvos Továbbképzés. 2012.11. évfolyam 5. Szám

9.4.2.3. Poszter/Absztrakt/Előadás/Konferencia publikáció alkalmi kongresszusi kiadványban, idegen nyelven

Zhou S., Szczesna K., Avci H., Kobolák J., **Varga E.**, Schmid B., Ochalek A., Rasmussen M., Freude K., Cirera S., Dinnyes A., Hyttel P. Role of bFGF and EGF in neural rosette formation, ISSCR 2015, Stockholm, Sweden, 24-27. June 2015. Abstract

Polgar, Z., Boonkusol, D., **Varga, E.**, Dinnyes, A. In vitro development of vitrified in vivo and in vitro fertilized pronuclear-stage rabbit embryos. Reproduction in Domestic Animals, ESDAR, 2010. 45(3). Abstract (p. 69.) and Poster

Polgar, Z., Boonkusol, D., **Varga, E.**, Dinnyes, A. Efficient vitrification of pronuclear-stage rabbit embryos. in Proceeding of the 3rd General Meeting of GEMINI. Soustons, France, 1-3. Oct. 2010. Abstract (p. 60.)

**Varga, E.**, Polgar, Z., Bodo, S., Dinnyes, A. Increase of fertilization with frozen semen in laser-assisted rabbit in vitro fertilization. Magyar Allatorvosok Lapja, 2009. 131(9): p. 562-565. Abstract and Presentation

**Varga, E.**, Polgar, Z., Bodo, S., Dinnyes, A. Laser-assisted zona-drilling increased in vitro fertilization with frozen semen in rabbit. Reproduction in Domestic Animals, ICAR 2008, Budapest, Hungary, 13-17. Jul. 2008. Abstract (43: p. 138-139) and Poster (#337)

### 9.4.3. Egy évi tudományos tevékenységek

#### 9.4.3.1. Előadás

**Varga E.** iPSCs as neurodegenerative disorder models. 1st Autism spectrum disorder workshop, Godollo, Hungary, 06. Nov. 2014

**Varga E.** MPS-II disease specific iPSC generation for disease modelling and drug screening. 20th Hungarian Mucopolysaccharidosis diseases conference, Godollo, Hungary, 04. Okt. 2014

**Varga E.,** Nemes, C., Varga, N., Berzsenyi, S., Dinnyes, A. Betegség-specifikus humán iPSC vonalak létrehozása. Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Godollo, MBK Napok 21-22. Nov. 2013

**Varga E.** Hogyan csináljunk őssejtet: Indukálható pluripotens őssejtek (iPS). (How to generate stem cells: Induced pluripotent stem cells (iPS)). Scientific forum for Medical doctors, Budapest, Hungary Madarász Street Children's Hospital 2011.

#### 9.4.3.2. Előadás és gyakorlat tartása

**Varga, E.** How iPS cells are generated/iPS cell generation from blood and fibroblast – technical advices. EpiHealthNet, Annual Scientific Trainings, 28-29. Nov. 2013

#### 9.4.3.3. Képzésen való részvétel

From nano- to macro biomaterials (design, processing, characterization, modeling) and applications to stem cells regenerative orthopedic and dental medicine. April 8-11, 2013: COST Action MP1005, (NAMABIO), Ancona, Olaszország

TALEN mediated gene targeting in iPSCs, including TALEN designing and generation. May-July, 2013 (6 hét), Campus Hungary Ösztöndíj, Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht, Hollandia

## 10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozatom elkészítéséhez szükséges kísérleteket a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban Dr. Dinnyés András munkacsoportjában végeztem.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Prof. Dinnyés Andrásnak, aki pályafutásomat diplomadolgozókorom óta segítette, és a munkámhoz folyamatos és nélkülözhetetlen szakmai támogatást nyújtott.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Nemes Csillának, aki munkámat közvetlenül segítette és folyamatos technikai valamint szakmai segítségével járult hozzá a tudományos előmenetelemhez, valamint a publikációm és dolgozatom összeállításában és javításában is nagy segítségemre volt.

Továbbá köszönettel tartozom Dr. Kobolák Juliannának a doktori értekezésem összeállításában és átnézésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségét.

Nagy köszönettel tartozom Prof. Christine Mummery-nek és Dr. Richard Davis-nek akikkel kollaborációnk eredményeként több közös publikációnk is született, és akiktől nagyon sok szakmai támogatást kaptam munkám során.

Hálával tartozom Dr. Polgár Zsuzsannának és Kovács Lászlónak, akik a kiméra teszteket végezték el számomra. Szeretnék köszönetet mondani Kovács Eszter kolléganőmnek, aki a dolgozatom átnézésében volt segítségemre. Továbbá szeretném megköszönni a kutató csoportom többi tagjának a munkám során nyújtott áldozatos segítségüket.

Külön köszönettel tartozom szüleimnek, családomnak, és barátaimnak, akik végig mellettem álltak és támogattak.

Munkám anyagi fedezetét a Kutató Kari Kiválósági Támogatás– Research Centre of Excellence- 8526-5/2014/TUDPOL, EU FP7 (InduStem, PIAP-GA-2008-230675; RabPStem, PERG07-GA-2010-268422; ANISTEM, PIAPP-GA-2011-286264; STEMMAD, PIAPP-GA-2012-324451; EPIHEALTH, HEALTH-2012-F2-278418; Resolve, FP7-Health-F4-2008-202047; InduHeart, PEOPLE-IRG-2008-234390; STEMCAM, PIAP-GA-2009-251186); Bonus Resolve, OMF-01660/2009; Research Centre of Excellence, 17586-4/2013/TUDPOL; PartnErS, PIAP-GA-2008-218205; PluriSys, HEALTH-2007-B-223485; Bonus PluriSys, OMF-00236/2010; és NKTH/KPI (NKTH-OTKA FP7 "Mobility" HUMAN-MB08C-80205) pályázatok biztosították.