Szent István Egyetem

Kiméra-technikák kidolgozása klónozás, ivar átfordítás és genetikai manipulációk céljára

Doktori értekezés tézisei

Carstea Valer Bogdan

GÖDÖLLŐ
2007

Szent István Egyetem, Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

A doktori iskola megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Mezőgazdaság-tudomány

vezetője: **Dr. Horváth László, D.Sc.**
egyetemi tanár
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Környezet- és tájgazdálkodási Intézet
Halgazdálkodási tanszék

témavezetők: **Dr. Gócza Elen, Ph.D.**
tudományos munkatárs
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont
Gödöllő
Genetikai Módosítás Program Csoport

Dr. Kovács András, D.Sc.
tudományos tanácsadó
Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
Herceghalom

....
Az iskolavezető jóváhagyása A témavezetők jóváhagyása

TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK

Miután 1981-ben létrehozták az első egér embrionális őssejt vonalakat (ES sejtek) ismét megnőtt a kimérák alkalmazásának jelentősége. A 90-es években sikerült kidolgozni azokat a molekuláris genetikai módszereket is, amelyek lehetővé tették az ES sejtek célzott genetikai módosítását. Ezzel lehetővé vált az egér génjeinek tervezett módosítása, génkiütött (knock out), vagy éppen az adott gén módosított változatát tartalmazó ES sejtvonalakat hoztak létre. Az ES sejtek segítségével az egér genetikai módosítása irányítottan, indukált és helyspecifikus módon történhetett, amit egyszerű DNS mikroinjektálásos módszerrel nem lehetett megvalósítani. A módosított géneket hordozó ES sejteket gazda embrióba injektálva, vagy azzal aggregáltatva, kiméra embriókat hoztak létre. Ezeket recipiens nőstényben beültetve olyan kiméra utódok születtek, amelyek ivarsejtjei között megtalálhatók voltak az ES sejtekből differenciálódott transzgénikus ivarsejtek is, így a genetikai módosítás átöröklődhetett az utódokba is. Ez a technika lehetővé tette, hogy mára több ezer genetikailag módosított egeret hozzanak létre, köztük számos betegség modell állatot is.

CÉLKITŰZÉSEK

Feladatom hatékony egér és nyúl kiméra előállító módszerek kidolgozása volt. A kiméra nyúl és egér embriók fejődésének vizsgálata lehetőséget teremt az ivari determináció, illetve a sejtek elköteleződése során zajló molekuláris folyamatok jobb megismerésében.

Elsőként az ES sejtek a kiméra alkotó képességét befolyásoló faktorokat vizsgáltam. A kimérákat 8-sejtes gazda-embriók és ES sejtek aggregálásával állítottam elő. Arra voltam kíváncsi, hogy milyen faktorok befolyásolhatják a kiméra újszülöttek, illetve az ivarsejt kimérák arányának eltérő alakulását különböző ES sejtvonalak alkalmazása esetén.

Munkám következő részében EGFP-t expresszálló nyolc-sejtes embrióból származó sejtet (blasztomert) diploid, illetve tetraploid gazda-embrióval aggregáltatva hoztam létre a kimérákat. Elsőként EGFP-t expresszáló embrióból származó egyetlen blasztomer sorsát követtem nyomon *in vitro,* a 3,5 és 4,5 napos kiméra embriókban. Az EGFP-t expresszáló blasztomerből származó sejtek beépülési mintázatát vizsgáltam. Azt szertettem volna megtudni, hogy a blasztomerből származó sejtek, diplod, illetve tetraploid gazda-embriót alkalmazva, ugyanolyan eséllyel képesek-e beépülni a létrejött kiméra embriók ICM-jébe.

Ezt követően azt vizsgáltam, hogy egyetlen XY genotípusú blasztomer képes-e átfordítani egy XX genotípusú diploid gazda-embrió ivarát. Tetraploid gazda-embriót alkalmazva hasonló kiméra konstrukció összeállítva, arra voltam kiváncsi, hogy elegendő-e egyetlen blasztomer egy teljes állat létrehozásához, illetve hogy ez a tetraploid komplementációs rendszer alkalmas-e identikus iker egerek létrehozásra abban az esetben, ha azonos embrióból származó egy-egy blasztomert aggregáltatok egy-egy tetraploid gazda embrióval.

ES kiméra nyulak létrehozásához egy ivarsejt kiméra utódok létrehozására is alkalmas kiméra előállító módszert kellett kifejleszteni. Ehhez kapcsolódva olyan kromoszóma vizsgálati rendszert dolgoztam ki, mely alkalmas annak megállapítására, hogy az adott kiméra sejtjei milyen gonoszómákat hordoznak.

FISH módszerrel a csoportunkban újonnan szekvenált néhány nyúl gén kromoszomális lokalizációjának megállapítása volt a feladatom.

ANYAG ÉS MÓDSZER

EGÉR EMBRIÓK ELŐÁLLÍTÁSA

A CD1 egereket a Charles River Laboratórium magyarországi képviseletétől szereztük be. Az EGFP-t expresszálló transzgénikus B5/EGFP egér törzset Nagy András (Toronto) biztosította számunkra.

Az embriókat szuperovuláltatott vemhes nőstény petevezetőjét átmosva nyertük ki, majd egy üveg kapilláris és kézi pipettor segítségével gyűjtöttük össze a kimosó folyadékból. Ezt követően néhány M2 médium csepben átmostuk az embriókat, majd ásványi olajjal lefedett KSOM cseppbe helyeztük azokat. Ezt követően 37°C-on, 5% CO_2 mellett továbbtenyésztettük az embriókat a megfelelő fejlődési állapot eléréséig.

TETRAPLOID EMBRIÓK ELŐÁLLÍTÁSA

Két-sejtes CD1 embriók blasztomerjeinek fúziójához CF-150B típusú elektro-fúziós készülékét (BLS Kft., Budapest) alkalmaztunk, ami 39 hpg (órával a megtermékenyülést követően, *hours post gestation*) korú egér embriók blasztomerjeinek fuzionáltatására optimalizáltak. A két-sejtes embriókat 0,3 M-os, 0,3% BSA-val kiegészített mannitol oldatba, két platina elektród közé (GSS-250) helyeztük, s egy elektromos impulzust adtunk az embrióknak (0,7 V AC mezőben, 2 ismétléssel, 30 V feszültségű, 40 μs nagyságú impulzus). Az embrió két blasztomerje ennek hatására fuzionált és egy-sejtes tetraploid embrió jött létre. A tetraploid embriókat tovább tenyésztettük KSOM médiumban 4 sejtes állapotig (24 órán át), 37°C-on, 5% CO_2 mellett.

DIPLOID BLASZTOMEREK IZOLÁLÁSA

A nyolc-sejtes embriókat körülvevő zona pellucidát savas Tyrode-oldattal távolítottuk el (58 hpg). A zóna mentes embriókat Ca/Mg mentes, 1 % BSA-val kiegészített PBS oldatba tettük 10 percre és óvatos pipettázással elválasztottuk az egyes blasztomereket egymástól. Minden embrióból egy blasztomert a szex meghatározásra szolgáló PCR reakcióban megvizsgáltunk, és a maradék 7 sejtet tartalmazó embriókat, vagy 7 különálló blasztomert a PCR vizsgálat idejére KSOM médiumba helyeztük (37°C-on, 5% CO_2).

BLASZTOMEREK SZEXÁLÁSA EGYSEJT PCR SEGÍTSÉGÉVEL

Zfx és Zfy specifikus primer párokat terveztünk, amelyek eltérő méretű PCR termékeket sokszorosítottak. A PCR reakció idejét 3 órára minimalizáltuk, így ez alatt a rövid idő alatt az embriók életképessége nem károsodott.

AGGREGÁCIÓS KIMÉRÁK ELŐÁLLÍTÁSA SZEXÁLT DIPLOID BLASZTOMEREK ÉS DIPLOID VAGY TETRAPLOID GAZDA-EMBRIÓK FELHASZNÁLÁSÁVAL

Az aggregáltatáshoz KSOM médium cseppeket fedtünk be ásványi olajjal. A csepp közepén tűheggyel kis mélyedést készítettünk, majd ebbe egyetlen EGFP-t expresszáló blasztomert és egy megfelelő genotípusú gazda-embriót helyeztünk egymás mellé (63 hpg). A kiméra embriókat 24 órán át tovább tenyésztettük KSOM médiumban, 37°C-on, 5% CO_2 mellett.

KIMÉRA BLASZTOCISZTÁK BEÜLTETÉSE

24 órás tenyésztést követően (87 hpg) a blasztocisztákat a 2,5 napos terhes (dpc) álvemhes nőstények méhébe ültettük. Az újszülött egereket a vemhesség 19. napján, császármetszéssel hoztuk világra.

MICROSATELLIT ANALÍZIS

A 28 microszatellitet (Research Genetics) választottunk az analízisre, melyek közül 17-et (D1Mit262, D2Mit113, D3Mit352, D4Mit166, D5Mit1, D5Mit155, D6Mit105, D6Mit200, D7Mit22, D8Mit85, D9Mit163, D10Mit16, D11Mit2, D12Mit63, D13Mit26, D15Mit13, D16Mit136) polimorfnak találtunk. A 17 polimorf mikroszatellit marker 15 egér kromoszómán volt található.

EGÉR ES SEJTVONALAK

Az ES sejtek differenciálatlan állapotban való fenntartásához mitomicin C kezelt embrionális egér fibroblaszt tápláló sejtréteget használtunk. A sejteket DMEM médiumban tenyésztettük, 15 % FCS kiegészítés mellett. A médium L-glutamin, beta-merkaptoetanol ($5x10^{-5}$ M), nem esszenciális aminosav (100x), penicillin, streptomicin és rekombináns egér Leukémia Inhibitor Faktor fehérje (1000 U/ml) kiegészítést kapott. 6cm-es Petri-csészébe 3 ml ES tenyésztő médiumban felszuszpendált ($1x10^6$ sejt) ES sejtszuszpenziót helyeztünk ki. A tenyészeten az EM médiumot minden nap cseréltük. Amikor a sejtek teljesen benőtték a Petri-csésze felületét ($2x10^7$) a sejteket új fibroblaszt rétegre oltottuk át (passzáltuk). Általában minden második napon szükséges az ES tenyészetek átpasszálása.

Az R1 sejtvonalat (129/Sv x 129/Sv-CP) F1 3,5 napos blasztocisztákból kiindulva alapították. Az R1 és R1/E sejtvonalakat Dr. Nagy András (Toronto) biztosította a kísérleteink elvégzéséhez. Az R1/ES sejtvonal az R1 sejtvonal egyik szubklónja.

AGGREGÁCIÓS ES KIMÉRÁK ELŐÁLLÍTÁSA

Kiméra kísérleteink során aggregációs kimérákat készítettünk.

Az ES kimérákat 8-sejtes gazda-embrió és 10-15 ES sejtet tartalmazó ES csomó aggregáltatásával hoztuk létre. Olyan ES tenyészeteket használtunk, amelyeket, a kiméra készítést megelőző napon zselatin rétegre passzáltunk. Az embriókról savas Tyrode oldattal leemésztettük a zona pellucidát, majd egy zona nélküli embriót és egy-egy ES csomót ásványi-olajjal lefedett KSOM médiumba helyeztük, szorosan egymás mellé. Másnapra az embriók az ES sejtekkel aggregálódtak és blasztociszta állapotú kiméra embrióvá fejlődtek, melyeket álvemhes nőstény méhébe ültettünk. Kísérleteink

során az embrionális fejlődés 19. napján császármetszéssel kaptuk meg a magzatokat, melyeket dajka anya nevelt fel.

EGÉR ES SEJTEK KARIOGRAMJÁNAK ELKÉSZÍTÉSE

Kariogram készítéshez a sejteket először zselatinra passzáltuk át. A következő napon colcemid kezelést alkalmaztunk 2,5 órán keresztül, 37°C -on, 5 % CO_2 mellett. Az idő elteltével az oldatot Pasteur-pipetta és víz-légszivattyú segítségével távolítottuk el. Ezután az elhalt sejteket PBS oldattal lemostuk. A sejtek fellazítására tripszin-EDTA oldatot használtunk (1ml oldat/6 cm átmérőjű Petri-csésze; 10 perc; 4°C). Az emésztést FM médiummal állítottuk le, és az oldatot lecentrifugáltuk (1000-1200 rpm; 7 min; 4° C). A felülúszó eltávolítása után a sejteket 4 ml, 37°C-os, 0,56 % KCl-ban szuszpendáltuk fel (hipotonizáltuk). A sejtszuszpenziót ismét centrifugacsőbe helyeztük és lecentrifugáltuk (1200 rpm; 5 min; RT °C). Ezt követően a centrifugálással összegyűjtött sejteket metanol:ecetsav 3:1 arányú keverékével fixáltuk. A fixálást háromszor megismételtük, majd a sejtszuszpenziót krómkénsavval kezelt tárgylemezre cseppentettük.

Kariogram készítéshez a sejteket az utolsó alkalommal zselatinra passzáltuk át, a kromoszómafestésnél már említett módon. A fixálást háromszor megismételtük, majd a sejtszuszpenziót krómkénsavval kezelt tárgylemezre cseppentettük és szobahőmérsékleten hagytuk megszáradni minimum 24 órán át. A következő nap 50 ml Diaton-CT-ben oldott 0,12 mg tripszinnel 10-12 másodpercig kezeltük, majd 2 percre festőoldatba helyeztük. Az idő leteltével a tárgylemezt 2x desztillált vízben mostuk, majd légszárítottuk. A FISH-re szánt lemezeket nem festettük és -20C°-on tartottuk.

FISH TECHNIKA EGÉRBEN

Néhány (1-2 csepp) fixált sejtmag-szuszpenziót tárgylemezre cseppentettünk, majd levegőn száradni hagytunk. Másnap 10 (5-30) percig mostuk 2xSSC/0,5% NP40, 0,5 % Tween 20 oldatban. Ezután a proteáz (SIGMA) kezelés 100 ml deszt. víz + 1 ml 1N HCL-ben történt, ezt vízfürdőn 37˚C-ra melegítettük, ehhez közvetlenül a felhasználás előtt 50 µl 10 %-os pepszint tettünk, jól elkevertük és 5-30 percre beletettük a lemezeket. A proteáz kezelést követően a lemezeket szobahőmérsékleten 5 percig 1xPBS-ben mostuk. A preparátumokat ezt követően 2-2 percig 70-90-100 %-os etanolban dehidratáltuk, majd száradni hagytuk. Száradás után 5µl próbát (X és Y próba (QBIOGENE, CP6121, Red Total Mouse Chromosome Y, Red (Cy3); CP6120, Green Total Mouse Chromosome X, Green (FITC) label) 22x22 mm-es fedőlemezre cseppentettünk és a tárgylemezen a vizsgálandó területet ezzel buborékmentesen lefedtük. (A próbát felhasználásig -20˚C-on tartottuk.) A tárgylemezt ezután denaturáltuk. Ez történhet melegítő lapon, 72˚C-on 2 percig, illetve in situ PCR-rel 72˚C-on, 2,5 perc elteltével azonnal kivéve és 3 percre 20˚C-ra helyezve. A hibridizáció 37˚C-on párakamrában, termosztátban 16-24 óráig történt. A második napon 2xSSC-ben, 37˚C-os vízfürdőben eltávolítottuk a fedőlemezt és ezután a tárgylemezt 10 percig 50 %-os formamid/2xSSC-ben, 37˚C-on, vízfürdőben (50ml 2xSSC, 50ml formamid) mostuk, majd 1 percre 1xPBS oldatba helyeztük. A mag festése úgy történt, hogy a

22x22 mm-es fedőlemezre 10-15 µl VECTA SHIELD-DAPI (1:1)(VECTOR LAB.) oldatot cseppentettünk, majd a hibridizált területet buborékmentesen lefedtük. A fluoreszcens mikroszkópos vizsgálat 100x immerziós objektívvel történt.

NYÚL KROMOSZÓMÁK ANALÍZISE

KROMOSZÓMA ANALÍZIS PERIFÉRIÁS VÉR LIMFOCITÁKBÓL

A kromoszóma vizsgálatokat limfocita tenyészetekből származó preparátumokon végeztem. A komplett mitózisokat (2n=44) analizálva meghatároztam a legkisebb akrocentrikus kromoszómák számát. Kilenc kis akrocentrikus kromoszóma (egy-egy pár 18, 19, 20, 20, 21 és Y) esetében a sejt XY-, nyolc ilyen kromoszóma esetében pedig XX-genotípusú.

FISH TECHNIKA NYÚLBAN

A FISH technikát négy különböző nyúl BAC klón felhasználásával végeztük, melyek közül kettő a LIF receptor gént tartalmazta (102H02 és 206F02), a másik kettő (304A7 és 779H10) pedig a POU5F1(Oct4) génre lett kiválasztva. Ez a két PO5F1-et hordozó klón, mivel a humán kromoszómák esetében a HSA6p21.3 régióban (a fő-hisztokompabilitási géneket hordozó régióban) helyezkedik el, azt gondoltuk, hogy a 12. nyúl kromoszómán fog elhelyezkedni, míg a humán LIF receptor, a 5p13.1 régióban található, ami az összehasonlító nyúl-humán kromoszóma összehasonlítás alapján a nyúl 11-es kromoszómáján ad várhatón jelet.

EREDMÉNYEK

EGÉR ES SEJTEK KIMÉRA LÉTREHOZÓ KÉPESSÉGÉNEK VIZSGÁLATA

Feladatom hatékony egér és nyúl kiméra előállító módszerek kidolgozása volt és az, hogy az így létrehozott kiméra embriók fejlődését vizsgálva újabb információkat szerezzek az ivari determináció, illetve a sejtek elköteleződése során zajló folyamatokról.

Munkám első részében az egér embrionális őssejtek (ES sejtek) kiméra alkotó képességét befolyásoló tényezőket vizsgáltam. Azt figyeltük meg, hogy az eltérő eredetű ES sejtvonalakból származó sejtek eltérő mértékben képesek részt venni a kiméra egerek szöveteinek kialakításában és ivarsejtek létrehozásában.

Én az R1 és R1/E sejtvonalakat hasonlítottam össze. Az ES sejtek passzázs számának növekedésével egyre kevesebb kiméra állatot lehet kapni. Amikor R1/E sejteket alkalmaztam a kimérák létrehozására, a megszületett utódok 21,2%-a lett kiméra, míg az R1 sejtek esetébe csak 6,8%. Csak az R1/E ES sejtek tudtak ivarsejteket is létrehozni.

Megállapítottam, hogy az R1 sejtek esetében már kezdetben is magas volt az aneuploid sejtek aránya. X és Y kromoszóma FISH analízist végezve azt találtam, hogy mind az aneuploid R1 ES sejtek, mind az R1/E ES sejtek is tartalmaznak Y kromoszómát, így nem az Y kromoszóma elvesztése okozta az ivarsejt képzésben megfigyelt hiányosságokat. A kariotípus analízis azt mutatta, hogy a 41 és 42 kromoszómát tartalmazó aneuploid R1 ES sejtek autószomális triszómiát tartalmaztak. A triszómiát tartalmazó sejtek aránya a passzázs szám növekedésével nőtt. Az aneuploid sejtek ugyan korlátozott mértékben, de részt tudtak venni kimérák szöveteinek kialakításában, de már nem voltak képesek életképes ivarsejteket képezni.

EGÉR KIMÉRÁK ALKALMAZÁSA AZ IVARI ELKÖTELEZŐDÉS FOLYAMATÁNAK VIZSGÁLATÁRA

A munkám második részében olyan kimérákat állítottam elő, amelyekben egyetlen, EGFP-t expresszálló nyolcsejtes embrióból származó blasztoméra sejtet aggregáltattam nyolc sejtes diploid, vagy tetraploid gazda-embrióval. Az EGFP-t expresszálló blasztomérából származó sejtek sorsát a 3,5-4,5 napos embriókban nyomon követve, megállapítottam, hogy mind a diploid, mind a tetraploid gazda embrió ICM-jébe be tudnak épülni ezek a sejtek, de mivel a tetraploid sejtek elleni szelekció még a hólyagcsíra kialakulását megelőzően megkezdődik, a tetraploid gazda-embrióban a diploid blasztomérából származó sejtek nagyobb arányban tudtak beépülni az ICM-be, mint diploid gazda-embriók esetében.

Később, szexált embrióból származó EGFP-t expresszálló blasztomérákat aggregáltattam diploid gazda-embriókkal. Arra voltam kíváncsi, vajon egyetlen XY genotípusú embrióból származó blasztoméra képes-e részt venni az állat különböző

szöveteinek felépítésében, illetve képes-e átfordítani egy XY genotípusú blasztoméra az XX genotípusú gazda-embrióval aggregáltatva létrehozott kiméra állat ivarát.

A 84 beültett embrióból 39 beágyazódott, de elpusztult az embrionális fejlődés során. A megszületett 22 embrió közül 12 lett kiméra, és mutatott EGFP expressziót. Ezek közül 11 hím volt, és csak egy nőstényt kaptunk. Ez a nőstény XX/XY kiméra volt, mivel mind az XX és mind az XY genotípust ki tudtuk mutatni a szöveteiből. Bár ez a nőstény fertilis volt, de a 31 utódja közül egyikben sem örökítette az EGFP transzgént. Részletes szöveti analízissel a különböző szövetei 10% körüli EGFP expressziót mutattak. A 11 hím újszülött mind fertilis hímmé fejlődött, melyek utódaikba is örökítették az EGFP-t. Ezek alapján elmondható, hogy egyetlen XY genotípusú blasztomer is képes az XX genotípusú embrió ivarát megváltoztatni.

Kísérletünk további részében egy-egy olyan blasztomert aggregáltattam tetraploid gazda- embriókkal, amely ugyanabból az EGFP-t expresszáló, szekált embrióból származtak. A 12 beültetett 2n/4n aggregátumból, ahol egyetlen EGFP-t expresszáló 8-sejtes embrióból kivett blasztomert kombináltunk egy 4-sejtes tetraploid embrióval 2n (1 sejt) / 4n (4-sejt), kettő (16,7 %) élő újszülöttett, egy hímet (M) és egy nőstényt (F) kaptunk. A 36 beültetett 2n, XY (1-sejt)/4n (4-sejt) aggregátumból, ahol egyetlen XY, EGFP expresszáló blasztomer lett kombinálva 4-sejtes tetraploid embrióval, öt (13,9 %) élő újszülöttet: két pár ikret (A1, A2 és B1, B2) és egy egyedüli hímet (D1) kaptunk. A négy beültetett 2n, XX (1-sejt)/4n (4-sejt) kiméra embrióból hármasiker nőstényeket (C1, C2, C3) kaptunk. Öt hím és a hármasikrek is megérték a felnőtt kort, és a B1 hímet és hármas iker nőstényeket CD1 egyedekkel pároztatva egészséges utódokat kaptunk.

Ezzel a módszerrel sikerült ikerpárokat és hármas iker egereket is előállítanom. Ezzel a tetraploid komplemntációs módszerrel lehetségessé vált előre meghatározott nemmel rendelkező, identikus ikrek előállítása. Az ikrek klonális eredetét a mikroszatellit analízis is igazolta.

Az analízis négy csoportot tudott megkülönböztetni (G1-G2-G3-G4): A1 és A2 hím; B1 és B2 hím; D1 hím; C1, C2, C3 nőstények. A csoportokon belül minden tag uniform volt a microsatellita markerekre, de a csoportok eltértek egymástól. Tehát a mikroszatelit analízis is igazolta, hogy tetraploid komplementációs rendszerrel sikerült identikus, előre meghatározott nemmel rendelkező ikrek előállítása.

NYÚL KIMÉRÁK VIZSGÁLATA

ES kiméra nyulak létrehozásához egy ivarsejt kiméra utódok létrehozására is alkalmas kiméra előállítási módszert kellett kifejleszteni. Ehhez kapcsolódva olyan kromoszóma vizsgálati rendszert dolgoztam ki, mely alkalmas annak megállapítására, hogy az adott kiméra sejtjei milyen gonoszómákat hordoznak. FISH módszerrel a csoportunkban újonnan szekvenált néhány nyúl gén kromoszómális lokalizációját is sikerült meghatározni. A kromoszóma vizsgálatokat limfocita tenyészetekből származó preparátumokon végeztem. A komplett mitózisokat (2n=44) analizálva meghatároztam a legkisebb akrocentrikus kromoszómák számát. Kilenc kis akrocentrikus kromoszóma (egy-egy pár 18, 19, 20, 20, 21 és Y) esetében a sejt XY-, nyolc ilyen kromoszóma

esetében pedig XX-genotípusú. A vizsgált kiméra nyulak mindegyike, még a fiatalon hipogonádiás XX/XY bak is fertilis volt.

A FISH analízis négy különböző BAC klón felhasználásával történt. Az eredmények igazolták, hogy a nyúl LIF receptor gén a 11-es nyúl kromoszómán, az OCU11p11.1 régióban található.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Igazolni tudtam kariotipizálást és FISH analízist alkalmazva, hogy az R1 és R1/E ES sejtvonal sejtjeiben, a 41 és 42 kromoszómát tartalmazó sejtek autoszómális triszómiát tartalmaznak, s a passzázs szám növekedésével a triszómiát tartalmazó sejtek száma megnő.
2. Azt találtam, hogy a tetraploid sejtek képesek ugyan beépülni a tetraploid-diploid kiméra embriók ICM-jébe, de a tetraploid sejtek ellen még a hólyagcsíra üregének képződése előtt szelekció indul.
3. Igazoltam, hogy egyetlen XY genotípusú blasztomer is elegendő az XX genotípusú gazda-embrióval aggregáltatva a kifejlődő állat ivarának átfordítására.
4. Sikerült EGFP riporter gént hordozó, kettes és hármas ikreket létrehoznom előre meghatározott nemmel, egy hatékony tetraploid komplementációs rendszert alkalmazva.
5. Meghatároztam a nyúl LIF receptor gén kromoszómális lokalizációját FISH technikát alkalmazva. A nyúl LIFR gént a nyúl 11-es kromoszómájának OCU11p11.1 régiója tartalmazza.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

ES KIMÉRÁK

Munkám során az R1, illetve az R1/E egér ES sejtek kiméra alkotó képességét vizsgáltam. Kiváncsi voltam arra, hogy a passzázs szám növekedése hogyan befolyásolja az ES sejtek kiméra alkotó képességét. A pluripotens ES sejtekre jellemző markerek expresszióját immunhisztológiai elemzéssel, illetve RT-PCR vizsgálatokkal tanulmányozva nem található számottevő különbség a két sejtvonal között, azonban az euploid (40 kromoszómát tartalmazó) sejtek arányában számottevő különbséget találtam.

Különböző passzázs számú sejtvonalak esetében is meghatároztam az euploid és aneuploid sejtek arányát. Megfigyeltem, hogy az aneuploid sejtek aránya a passzázs szám növekedésével fokozódik. Azt feltételeztük, hogy az ES sejtek felfokozott ütemű sejtosztódásai során az Y kromoszóma nem tud egyenletesen elrendeződni az utód sejtek közt. Feltételezésünk igazolására kombinált X- és Y- FISH vizsgálatot végeztem. Az általam vizsgált ES sejtek mindegyike tartalmazott Y kromoszómát, így nem az okozta a két sejtvonal közt az ivarsejt kiméra képzésben található különbséget, hogy az Y kromoszóma kizáródása miatt létrejövő X0 (Y-t nem tartalmazó) ES sejtek nem képesek ivarsejtek képzésére.

A munka utolsó szakaszában kariogramot készítettem az R1 és R1/E ES sejtvonalak különböző passzázs számú tenyészeteiből, annak eldöntésére, hogy a többlet kromoszómát tartalmazó sejtekben megfigyelhető-e triszómia. A vizsgált ES sejtvonalaknál a 41 és 42 kromoszómát tartalmazó sejtekben autoszómális triszómia volt kimutatható. A triszómiát hordozó sejtek száma a passzálások számával párhuzamosan nőtt. Az aneuploid ES sejtek ugyan képesek a kiméra állatok szöveteibe beépülni, azonban nem képesek életképes ivarsejteket létrehozni.

Mivel a passzálások során folyamatosan nő a triszómiát hordozó sejtek aránya, ezért ha ivarsejt kiméra állatokat szeretnénk kapni, fontos, hogy az ES sejteket még optimális tenyésztési feltételek mellett is minél rövidebb ideig tartsuk fenn a kísérleteink során. Transzgénikus ES sejtvonalak létrehozását követően pedig fontosnak tartom, hogy elvégezzük a transzgenezis után kapott homológ rekombináns ES vonalak kariotipizálását még a kiméra vizsgálatok megkezdése előtt, s csak azokat a vonalakat alkalmazzuk közülük a kimérák előállítása során, melyek nagyrészt euploid sejteteket tartalmaznak.

AZ IVARÁTFORDÍTÁS JELENSÉGE

EGFP-t expresszáló sejtek alkalmazásával lehetővé vált a fejlődő embrióban a bejuttatott sejtek vándorlásának követése. Ha az EGFP-t szövetspecifikus promoter segítségével expresszáltatjuk, az adott EGFP-t expresszálló sejtpopuláció megfigyelése a sejtek szöveti elkötekeződésének feltérképezésében is hasznos információt nyújt.

XY genotípusú EGFP-t expresszálló balsztomereket XX genotípusú diploid gazda-embrióval aggregáltatva az XX/XY kimérák embrionális fejlődés során képet nyerhetünk arról, hogy az XY blasztomerből származó utód sejtek milyen esetben képesek a fejlődő magzat ivarát átalakítani, milyen arányban, illetve milyen sejttípusokban kell jelen lennie az XY genotípusú sejteknek, hogy az ivarátfordítás megtörténhessen.

A molekuláris genetikai módszerek fejlődésével egyre több iker vizsgálatból származó eredmény látott napvilágot. Többek közt a szívbetegségek, koleszterol szintet befolyásoló faktorok örökölhetőségének vizsgálatát is ikerpárokon végezték.

Számos állatkísérletben is végeznek hasonló populáció genetikai felméréseken alapuló vizsgálatokat, azonban ezekhez, hogy statisztikailag is értékelhető mennyiségű adatot nyerjenek, nagyon nagy számú állatot kell tesztelni. Iker vizsgálatok esetében azonban ilyen felmérésekben az alkalmazott állatok mennyisége csökkenthető, mivel ebben az esetben homogén genetikai állományú egyedek összehasonlításáról van szó. Az általam alkalmazott tetraploid komplementációs rendszerrel olyan kettes- és hármas ikrek hozhatók létre, amelyek genetikailag identikusak, így kevesebb állat is elegendő a környezeti hatások feltérképezésére.

Az iker vizsgálatok nem helyettesíthetők a sejtmagátültetéssel létrehozott klónozott állatok vizsgálatával, mivel a klónozott állatok mitokondriális heterogenitást mutatnak. Az általunk kifejlesztett tetraploid komplementációs rendszerrel létrehozott identikus ikrek mitokondriális szinten is identikusak.

A klónozott embriók trofektodermájának differenciálódása során rendellenességek lépnek fel. A tetraploid komplementációs technika azonban a klónozott embriók életképességének növelésében is segíthet. Ha klónozott embriót tetraploid gazda-embrióval aggregáltatnak, akkor az ebből a fejlődő magzat méhlepényébe beépült, a tetraploid sejtek segítenek a normális méhlepényt kialakításában, így a magzat nem pusztul el a méhlepény rendellenes fejlődésének következményeként.

NYÚL KIMÉRÁK

Az általunk kidolgozott nyúl kiméra előállító módszer esetében a mikromanipuláció során csak minimális mértékben sérül a zona pellucida és azt körbevevő mucin réteg. A beültetett kiméra embriók nagy százalékban megszülettek, életképes utódokat kaptunk, mivel az általunk használt recipiens nőstények ivari ciklusát hormonális kezeléssel késleltettük, így az azok petevezetőjébe visszaültetett kiméra embrióknak jobb beágyazódási esélyt teremtettünk. A megszületett kiméra magzatokban az injektált sejtek transzgénikus embrióból származtak, így a megszületett utódokban, real time PCR-el pontosan meghatározható volt a transzgénikus embrióból származó sejtek aránya az egyes szövetekben. A megszületett kiméra nyulak mindegyike, még a fiatalon hipogonádiás XX/XY bak is fertilis volt, és nem mutatott semmilyen fejlődési rendellenességet. Néhány szerző leírta, hogy az XX/XY kiméra egerek hímek lesznek. A mi nyúl kiméra adataink is alátámasztják ezeket a megfigyeléseket, mivel az XX/XY

kiméra állat is hím fenotípust mutatott, bár az XY sejtek aránya a vérében csak 20% volt.

A LIFR gén az 5p13.1 humán kromoszómán található, ami a nyúl-egér összehasonlító géntérképezés alapján a nyúl 11-es kromoszómájával analóg. Mivel az általam alkalmazott FISH analízis is a 11-es kromoszómának az OCU11p11.1 régiójába térképezte az LIFR gént, így elmondható, hogy a nyúl LIFR gén lokuszának behatárolása sikerrel járt.

A másik két BAC klón (304A7 és 779H10) - melyeket a nyúl POU5F1(Oct4) gén primerekkel a nyúl BAC klóntárból választottak ki - nem a humán HSA6p21.3 régióval homológ régióban (a fő-hisztokompabilitási géneket hordozó régióban) helyezkedett el. Mi az OCU12q11.1 régióban vártuk a lokalizációját, de a OCU1q21.1 régióban kaptam jelet, így az általunk kiválasztott BAC klónok csupán az Oct4 pszeudogén formáját tartalmazták. A nyúl BAC könyvtár fizikai térképezését további nyúl Oct4 primerek felhasználásával kell folytatni.

PUBLIKÁCIÓK

IMPAKT FAKTOROS KÖZLEMÉNYEK NEMZETKÖZI FOLYÓIRATOKBAN ELSŐ SZERZŐKÉNT

1. **CARSTEA, V.B**., LEMOS, A.P.C., ILIE, D., VARGA, L., BODÓ, SZ., KOVÁCS, A., BŐSZE, ZS., GÓCZA, E. (2007): Production of identical mouse twins and a triplet with predicted gender. Cloning and Stem Cells, 9/2 pp. 247-56. **IF: 3.062**

IMPAKT FAKTOROS KÖZLEMÉNYEK NEMZETKÖZI FOLYÓIRATOKBAN

1. BODÓ, SZ., GÓCZA, E., RÉVAY, T., HIRIPI, L., **CARSTEA, B**., KOVÁCS, A., BODROGI, L., BŐSZE, ZS. (2004): Production of transgenic chimeric rabbits and transmission of the transgene through the germline. Molecular Reproduction and Development 68, pp. 435-440. **IF: 2.331**

KÖZLEMÉNYEK MAGYAR NYELVŰ FOLYÓIRATOKBAN

1. BODROGI L., BODÓ SZ., GÓCZA E., **CARSTEA B**., HIRIPI L. ,RÉVAY T., KOVÁCS A., BŐSZE ZS. (2004): Ivarsejt kiméra nyulak létrehozása mikroinjektálásos módszerrel. Állattenyésztés és Takarmányozás. 53/2. pp. 174-177.
2. **CARSTEA V.B**., LEMOS A.P.C., ILIE, D., BODÓ SZ., KOVÁCS A., BŐSZE ZS., GÓCZA E. (2006): Az ivar átfordítás lehetőségének vizsgálata egér kimérák alkalmazásával. Állattenyésztés és Takarmányozás 55./5. pp. 501-504.

KONFERENCIÁK

ABSZTRAKTOK NEMZETKÖZI IMPAKTOS FOLYÓIRATOKBAN

1. GÓCZA, E., HIRIPI, L., BODÓ, SZ., RÉVAY, T., **CARSTEA, V.B**., KOVÁCS, A., BODROGI, L., LEMOS, A.P.C., BŐSZE, ZS. (2005): Characterization of rabbit ES like cells and creation of rabbit germline chimeras from preimplantation embryos. Transgenic Research, 14, p. 523. **IF: 2.543**
2. **CARSTEA, V. B**., LEMOS, A.P.C., ILIE, D., BODÓ, SZ., KOVÁCS, A., GÓCZA, E. (2005): Mouse triplets developed from single blastomeres of an 8-cell stage embryo supported with tetraploid embryos. IETS, Reproduction, Fertility and Development 2006; 18(1,2)**IF: 1.515**

ANGOL NYELVŰ ELŐADÁSOK

1. **CARSTEA,V.B**., BODÓ, SZ., GÓCZA, E., BŐSZE, ZS., HIRIPI, L., KOVÁCS, A. (2003): Chromosomal sex of lymphocytes of chimeric rabbits. Annual Scientific Session, Banat's University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Timisoara.

2. **CARSTEA, V.B.,** KOBOLÁK, J., LICSKÓ, A., KOVÁCS, A., GÓCZA, E. (2003): Comparison of the effect of host embryo genotype on the efficiency of chimera production from inbred and outbreed mouse strains derived ES cell lines. Buletinul USAMV-CN, 58/2003, ISSN 1454-2382. pp. 275-278., Cluj-Napoca.
3. **CARSTEA, V.B.**, BODÓ, SZ., HIRIPI, L., BODROGI, L., LEMOS, APC, BŐSZE, ZS., GÓCZA, E. (2004): Producing chimeras: A rapid and efficient tool for obtaining transgenic organisms. Buletinul USAMV-CN 60/2004. pp. 286-291. , Cluj-Napoca.
4. **CARSTEA, C.V.,** KOBOLÁK, J., LICSKÓ, A., GÓCZA, E., KOVÁCS, A. (2004): The effect of different level of FCS and LIF in ES cell culture medium on efficiency of mouse chimera production. Annual Scientific Session, Banat's University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Timisoara.
5. **CARSTEA, V. B.,** ILIE, D., GHIŞĂ, G., LEMOS, A. P. C., BODÓ, SZ., KOVÁCS, A., GÓCZA, E. (2005): Masculinisation phenomenon in chimeric organisms. Lucrări ştiinţifice Zootehnie şi Biotehnologii, vol. XXXVIII (2005), ISSN 1221-5287, Timişoara, pp. 757-762.
6. **CARSTEA, V.B**., LEMOS, A.P.C., ILIE, D., VARGA, L., BODÓ, SZ., KOVÁCS, A., BŐSZE, ZS., GÓCZA, E. (2006): Female-to-Male Sex Reversal Produced by the Addition of a Single Male Blastomere. 13. Szaporodásbiológiai Találkozó, Budapest.
7. **CARSTEA, V.B.,** DOBÓ, K., LICHNER, ZS., STANCA, C., ILIE, D., GOCZA, E. (2007): Examination of the germ cell chimera forming potential of mouse embryonic stem cell. Lucrări ştiinţifice Zootehnie şi Biotehnologii, 40/1, pp. 36-41., Timisoara.

POSZTEREK NEMZETKÖZI KONFERENCIÁKON

1. GÓCZA, E., KOBOLÁK, J., LICSKÓ, A., **CARSTEA, V.B.** (2003): Comparison of the effect of host embryo genotype on efficiency of chimera production from different ES cells. 5th EMBL Mouse Molecular Genetics Meeting, Heidelberg, p. 103.
2. GÓCZA, E., BODÓ, SZ., KOBOLÁK, J., HIRIPI, L.,, RÉVAY, L. T., **CARSTEA, B.,** BODROGI, L., KOVÁCS A. AND BŐSZE ZS. (2003): Comparison of methods of derivation of embryonic stem cell lines from rabbit embryos. Embryonic stem cells. Mini-symposium. Gödöllő, p. 11.
3. BODROGI, L., BODÓ, SZ., GÓCZA, E., **CARSTEA, B**., HIRIPI, L., RÉVAY, T, KOVÁCS A., BŐSZE ZS. (2003): Production of germline chimera rabbits by microinjection. Embryonic stem cells. Mini-symposium. Gödöllő, p. 15-17.
4. **CARSTEA V.B.,** A. KOVÁCS, J. KOBOLÁK, A. LICSKÓ, E. GÓCZA (2003): Chimera production from mouse ES cell lines. Embryonic stem cells. Mini-symposium. Gödöllő, p. 18.
5. GÓCZA, E., BODÓ, SZ., RÉVAY, T., HIRIPI, L., **CARSTEA, B**., KOVÁCS, A., BODROGI, L., BŐSZE, ZS. (2004): Degree of chimerism in different tissues of chimeric rabbits. Congress From Oocytes to Stem Cells: Progress in Basic and Applications, 2004, Prague, Czech Republic, Book of Abstract p. 16.
6. BODÓ, SZ., GÓCZA, E., RÉVAY, T., HIRIPI, L., **CARSTEA, B.,** BENDER, B., KOVÁCS, A., BODROGI, L., BŐSZE, ZS. (2004): Creating germ line chimeric rabbits by

blastomer injection. 55th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Bled, Slovenia, p. 48.

7. BARANYI, M., GÓCZA, E., LEMOS, A.P.C., HIRIPI, L., **CARSTEA, V.B.,** WHITELAW, B., BŐSZE, ZS. (2004): Production of kappa-casein knock out mouse chimera. 55th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Bled, Slovenia, p. 2.
8. TÓTH, S., GÓCZA, E., **CARSTEA, V. B**., LUX, Á., UZONYI, B., FALUS, A. (2005): Comparison of the differentiation capacity of histamine deficient (HDC KO) and wild type embryonic stem (ES) cells. 4th Annual Meeting of the European Tissue Engineering Society, Munich, O96, p. XXVI.
9. TÓTH, S., GÓCZA, E., **CARSTEA, V.B.,** UZONYI, B., FALUS, A. (2005): Comparison of the Differentiation Capacity of Histamine Deficient (HDC KO) and Wild Type Embryonic Stem (ES) Cells. 34th Meeting of European Histamine Research Society, Bled, Slovenia, p. 17.
10. TÓTH, S., GÓCZA, E., **CARSTEA, V.B.,** LUX, Á., WIENER, Z., FALUS, A. (2005): Budapest, Hungary - Influence of histamine on stem cell differentiation. International Symposium on Stem Cell Biology and Gene Therapy, Budapest.
11. TÓTH, S.P., GÓCZA, E., **CARSTEA, V.B.,** FALUS, A. (2006): Strain specific differences in Oct4 expression of HDC KO and wild type ES cells. 35th Annual Meeting of EHRS, 2006, Delphi, Greece, p.56.
12. STANCA, C., **CARSTEA, V.B**., ILIE, D., GÓCZA, E., VINTILA, I. (2007): Models for mouse chimera production: aggregation of ES cells with cleavage stage embryos. Lucrări ştiinţifice Zootehnie şi Biotehnologii, 40/1, pp. 195-200., Timisoara.
13. GÓCZA, E., LEMOS, A.P.C., **CARSTEA, V.B**,. HAYES, H., ROGEL-GAILLARD, C., HIRIPI, L., BŐSZE, ZS. (2007): Applied embryological research by biotechnological methods in rabbit. 2nd International Meeting on Mammalian Embryogenomics., Paris, France, p. 118.

ELŐADÁSOK MAGYAR NYELVEN

1. **CARSTEA, V. B**., LEMOS, A.P.C., PATAKI, R., KOVÁCS, A., BŐSZE, ZS., GÓCZA, E. (2005): Szex determináció vizsgálata egér kimérákban. Genetikai mini-konferencia, Szeged.

POSZTEREK MAGYAR KONFERENCIÁKON

1. **CARSTEA V.B**., LICSKÓ A., KOBOLÁK J., GÓCZA E., KOVÁCS A.: (2003): EGFP, ECFP expresszáló sejtek differenciációs képességének vizsgálata kiméra embriókban. Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya, Tihany, p.52.
2. BODÓ SZ., GÓCZA E., **CARSTEA V.B.,** HIRIPI L., BODROGI L., KOVÁCS A., BŐSZE ZS. (2003): Kiméra nyulak létrehozása injektálásos módszerrel. 15. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, Kaposvár, pp. 151-55.

3. **CARSTEA V.B,** BODÓ SZ., GÓCZA E., HIRIPI L., BODROGI L., KOVÁCS A., BŐSZE ZS. (2003): Chromosomal sex of lymphocytes of chimeric rabbits. 15. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, Kaposvár, pp. 157-159.
4. BODROGI L., BODÓ SZ., GÓCZA E., **CARSTEA V.B.,** HIRIPI L., RÉVAY T., KOVÁCS A., BŐSZE ZS. (2003): Ivarsejt kiméra nyulak létrehozása mikroinjektálásos módszerrel. 10. Szaporodásbiológiai Találkozó. Kiskunmajsa, pp. 16-18.
5. **CARSTEA, V.B**., CATUNDA LEMOS, A.P., PATAKI, R., KOVÁCS, A., BŐSZE, ZS., GÓCZA, E. (2005): Embrionális eredetű őssejtek ivarsejt kiméra alkotó képességét befolyásoló tényezők vizsgálata. VI. Magyar Genetikai Kongresszus, XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Eger, P011, p. 124.
6. GÓCZA, E., **CARSTEA, V.B.,** UZONYI, B., TÓTH, S., WOBUS, A., FALUS, A. (2005): Hisztidin dekarboxiláz (HDC-/-) deficiens ES sejtek in vitro szívizom irányba történő differenciálódásának vizsgálata. VI. Magyar Genetikai Kongresszus, XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Eger, E39, pp. 61-62.
7. GÓCZA, E., **CARSTEA, V.B.,** BŐSZE, ZS. (2005): Egér kimérák szerepe az embrionális fejlődés során lejátszódó folyamatok feltérképezésében. Biomodellek 2005, Charles River Laboratories, Magyarország Kft. Tanácskozása, Budapest, p.
8. **CARSTEA, V.B.**, LEMOS, A.P.C., BODÓ, SZ., KOVÁCS, A., GÓCZA, E. (2005): Szex determináció vizsgálata egér kimérákban. 12. Szaporodásbiológiai Találkozó, Hajdúszoboszló.
9. GÓCZA, E., LEMOS, A.P.C., HIRIPI, L., BODROGI, L., **CARSTEA, V.B**., BŐSZE ZS. (2006): Alkalmazott embriológiai kutatás biotechnológiai módszerekkel házinyúlban. 18. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, Kaposvár pp. 91-96.
10. DOBÓ, K., **CARSTEA, V.B.,** STANCA, C., LICHNER, ZS. (2007): Egér embrionális őssejtek ivarsejt kiméra alkotó képességének vizsgálata.VII. Magyar Genetikai Kongresszus / XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, P034, p.110, Balatonfüred, 2007.04.15-17.
11. LEMOS, A.P.C., **CARSTEA, V.B.,** GÓCZA, E., ROGEL-GAILLARD, C., HAYES, H., HIRIPI, L., BŐSZE, ZS. (2007): Characterization and chromosomal assignment of the rabbit Leukemia Inhibitory Factor receptor (LIFR) gene. VII. Magyar Genetikai Kongresszus / XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, P014, p. 93., Balatonfüred, 2007.04.15-17.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni köszönetemet Dr. Kobolák Juliannának, Dr. Révay Tamásnak és Ana Paula Catunda Lemosnak a sex PCR primerek megtervezésében és a PCR reakció optimalizálásában. Szeretném megköszönni Dr. Katona Róbertnek, hogy segítséget nyújtott az ES sejtek kariotipizálásban. Köszönöm Kozma Andrásnak, hogy segített az általam alkalmazott egér kromoszóma FISH technikák tökéletesítésében és Dr. Helen Hayesnak, hogy lehetővé tette számomra, hogy elsajátítsam a R sávozott nyúl kromoszómák FISH vizsgálatát.

Köszönettel tartozom Takács Gábornak a művészi kiméra fotókért, Gróf Mihályné, Marikának és Sóvári Krisztinának a technikusi segítségért.

Köszönöm Dr. Bősze Zsuzsannának és Dr. Bodó Szilárdnak, hogy PhD dolgozatomat kritikus szemmel átnézték, és segítettek az abban található hibák kijavításában.

Utoljára, de nem utolsó sorban köszönöm témavezetőimnek, Dr. Gócza Elennek és Dr. Kovács Andrásnak azt a segítséget, amivel folyamatosan végig kísérték munkámat, s lehetővé tették számomra, hogy azt sikeresen be is fejezhessem.

Ezt a kutatást az *OTKA T037582, NKFP-1/A-060-2004, GVOP/3.1.1./2004-05-0290, BIO-125* és a *RO-3/2002*, *RO-23/05, D-26/02(HUN02/045)* TéT pályázatok támogatták, illetve a franciaországi tanulmányutamat az *ESF-COST B20 STSM* együttműködés segítette.