

DEBRECENI EGYETEM
AGRÁRTUDOMÁNYI CENTRUM
MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR
ÁLLATTENYÉSZTÉSTUDOMÁNYI INTÉZET

ÁLLATTENYÉSZTÉSI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola vezető: **Dr. Kovács András** az MTA doktora

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Témavezetők:

Dr. Jávor András, C.Sc.
egyetemi tanár

Dr. Macháty Zoltán, Ph.D.
egyetemi docens

**PARTHENOGENETIKUS SERTÉS EMBRIÓK ELŐÁLLÍTÁSÁNAK
VIZSGÁLATA**

Készítette:
Nánássy László
doktorjelölt

Debrecen
2007

BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

Az első testi sejtéből előállított állat születése óta eltelt mintegy 10 év intenzív kutatásai ellenére is a sejtmagátültetési klónozás hatékonysága meglehetősen alacsonynak tekinthető, ami a fő gátló tényezője a módszer széles körű alkalmazásának. Jelenleg a sejtmagátültetéssel előállított embriók csak mintegy 1-4%-ából lesz élő utód. A hatékonyság növelése céljából a technológia összes lépésének javítása szükséges. A sejtmagátültetéssel módosított petesejtek fejlődési programjának beindítása valamint a tenyésztéskori optimális körülmények biztosítása kulcsfontosságú életképes embriók létrehozásának szempontjából.

Gerincesek petesejtjeiben a meiózis során két egymást követő sejtosztódás zajlik le, melyet az M-fázis elősegítő faktor (MPF) irányít. Az MPF-et az érett *Rana pipiens* petesejtek citoplazmájában egy „aktivitás”-ként azonosítottak, amely képes maturáció indukálására nyugvó petesejtbe való injektálás után. A későbbi kutatások szerint az MPF két alkotóegység heterodimere: a katalitikus alegységet a ciklin-függő kináz 1 (cdk1), míg a szabályozó alegységet a ciklin B alkotja. A cdk1 homológ az élesztő cdc2 gén termékével, a ciklin B a sejtciklus irányításában részt vevő proteinek családjának egyik tagja. Éretlen petesejtben a cdc2 a ciklin B-hez kötődik, ekkor azonban még az MPF inaktív, a cdc2 treonin 14-es, a tirozin 15-ös és a treonin 161-es végeinek foszforilált állapota miatt. Békák esetében a CAK és Myt1, élesztők esetében a Wee1 kinázok a felelősek a cdc2 gátló foszforilálásáért. Az MPF a germinális vezikulum lebomlásakor aktiválódik, amikor a kettős hatású cdc25 foszfatáz defoszforilálja a cdc2-t a treonin 14 és tirozin 15 pozíciókban. Az aktív MPF vezeti a sejtet a metafázis I-be. Az MI-ből való kilépés (hasonlóan a MII-höz) egy multi-subunit E3 ligáz, az anafázis elősegítő komplex (APC) hatására következik be, ami a ciklin B ubiquitinezését végzi, megjelölve azt a 26S proteaszóma általi lebontásra. A ciklin B lebomlása az MPF részleges inaktíválódásához vezet, ez a meiózis I-ből való kilépést és az első sarki test kizáródását eredményezi. Az ezt követő növekvő ciklin B szintézis aktív MPF-et eredményez, melynek nyomán a sejt belép a meiózis II-be. A fenntartott magas MPF aktivitás a kromatint kondenzált állapotban tartja a és stabilizálja a meiotikus orsót.

Egy másik szignál transzdukciós kaszkád, a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) kaszkád is döntő fontosságú a meiózis szabályozásában. A MAPK egy szerin/treonin protein kináz, mely szubsztrátjaival együtt az MPF stabilizációját és az

MPF által irányított folyamatok elősegítését végzi. Röviddel a maturáció kezdetét követően megindul a maternális *c-mos* mRNS transzlációja. A *c-mos* egy proto-onkogén, melynek terméke a MOS fehérje, egy 39-kD nagyságú szerin/treonin kináz. A MOS MAPK kináz kinázként funkcionál (MEKK), aktiválja a MAPK kinázt (MEK1), mely a MAPK aktiválódását okozza annak foszforilációja által. Az aktív MAPK foszforilálja és ezáltal aktiválja a p90^{Rsk} szerin/treonin kinázt, amely gátolja a Myt1 inhibitor kinázt, elősegítve a cdc25-mediált MPF aktivációt. A MOS/MEK1/MAPK/p90^{Rsk} kaszkád a maturáció alatt segíti az MPF aktiválódását és hozzájárul annak stabilizálásához a G₂/M átmenet idején. Továbbá a kaszkád szerepet játszik a magorsó kialakulás ellenőrzőpontjának aktiválásában, mely gátolja az APC működését, ezzel lassítva a ciklin B degradációját és megakadályozva a metafázis/anafázis átmenetet érett petesejtekben.

Természetes körülmények között a termékenyítő spermium váltja ki a meiózis újraindulását valamint az interfázisba való belépést, oszcillációt indukálva a petesejt intracellulárisan szabad kalcium koncentrációjában. A termékenyüléskori kalcium szignál elsődleges feladata a cdk1 és a ciklin B gátlása, majd az MPF aktivitásának csökkenése vezet a MOS defoszforilációjához és azt követő lebomlásához. Az intracellulárisan szabad kalcium koncentrációjának növelése mesterségesen is létrehozható, ami ugyancsak képes a meiózis újraindulását előidézni. A termékenyüléssel ellentétben azonban a parthenogenetikus aktiválás csak egyszeri kalcium felszabadulást okoz a petesejtben. Egér petesejtekben egyszeri kalciumszint emelkedés nem bizonyul hatékonynak, ilyen esetekben az MPF és MAPK újra-aktiválódását figyelték meg. A sejtciklus szabályozásában fontos protein kinázok csökkent szintje a hatékony petesejt aktiválási protokollok jó jelzője. Ezen okokból kifolyólag olyan parthenogenetikus aktiválási módszer használata szükséges, mely a termékenyülést kísérő összes jelenséget képes előidézni, hatékony embriófejlődést eredményezve.

A hatékony in vitro embrió-előállítás szempontjából ugyancsak fontos az embriók számára a megfelelő környezet biztosítása. Sertés zigóták blasztocishta stádiumig való tenyésztésére jelenleg a legszélesebb körben az NCSU-23 médium használatos. A legújabb kutatások szerint a PZM-3 médium az NCSU-23-nál hatékonyabb, azonban a szakirodalom nem egységes ezen a területen. Ugyancsak fontos szempont az embrió-tenyésztés szempontjából a kultiváció alatti gázkeverék összetétele. A legáltalánosabban használt embriótenyésztő gázkeverék körülbelül

20% O₂-t tartalmaz az inkubátorban. Azonban az oxigén koncentráció rhesus majmok, hörcsögök és nyulak reprodukciós traktusában 1,5 és 8,7% körül mozog. Egyes szerzők szerint a csökkentett O₂ koncentráció használata előnyösebb sertés embriók tenyésztésére, de a témával kapcsolatos eredmények egymásnak gyakran ellentmondóak.

CÉLKITŰZÉSEK

A dolgozat elkészítésekor célul tűztük ki különböző parthenogenetikus aktiválási módszerek és különböző embrió-tenyésztési rendszerek *in vitro* érlelt sertés petesejtekre kifejtett hatásának vizsgálatát. Ugyancsak meg kívántuk vizsgálni a sejtciklus szabályozásában kulcsszerepet játszó két fehérje, az MPF és MAPK aktivitásának változását sertés petesejtekben különböző aktiválási módszerek alkalmazását követően.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A petesejtek gyűjtése és in vitro maturációja

A kísérletekhez a helyi vágóhídról származó prepubertás sertés (nagy fehér) petefészkekből származó petesejteket használtunk. A petefészkek laboratóriumba szállítása 1 órán belül megtörtént. A 3-6 mm átmérőjű tüszőkből a tüszőfolyadékot egy 10 ml-es eldobható fecskendővel valamint egy hozzá erősített 20 G méretű injekciós tűvel aspiráltuk és egy 50 ml-es centrifugacsőbe (Falcon) gyűjtöttük. Ülepedés után a felülúszó folyadékot eltávolítottuk, majd a maradékból a kumulusz-petesejt komplexek (KPK) feltárássra kerültek sztereo mikroszkóp (Nikon) alatt. Ezt követően kiválogatásra kerültek azok a komplexek, amelyek esetében a petesejteket számos kumulusz sejtréteg borította. A KPK-eket ezek után 4 vájatú NUNC (Nunc, Roskilde, Dánia) tenyésztőedényben, 500 µl maturációs oldatban, 400 µl olajjal fedve (TCM-199 médium kiegészítve a következő anyagokkal: 26 mM nátrium bikarbonát, 3,05 mM glükóz, 0,91 mM nátrium piruvát, 0,57 mM cisztein, 10 ng/ml epidermális növekedési faktor [EGF], 0,5 IU/ml luteinizáló hormon, 0,5 IU/ml follikulus stimuláló hormon, 0,1% polivinil alkohol, 75 µg/ml penicillin G és 50 µg/ml sztreptomycin) érleltük. A petesejtek maturáltatása 42-44 óráig tartott, 39°C-on, 5% CO₂ szint mellett.

A petesejtek aktivációja

Maturáció után a petesejtek felszínéről a kumuluszsejteket eltávolítottuk, amit 0,1% hialuronidázt tartalmazó TL-Hepes médiumban való 8 perces vortexeléssel értünk el. Kumulusz sejtek nélküli, egyenletesen sötét ooplazmával és látható sarkitesttel rendelkező petesejtek kerültek kiválogatásra. A petesejteket ezek után elektroporációs médiumban (Mannitol 300 mM, CaCl_2 0,1 mM, MgSO_4 0,1 mM, Hepes 0,5 mM, BSA 0,01 mg/ml) kétszer átmostuk. A petesejteket egy elektroporációs kamra két, egymástól 0,5 mm-re lévő elektródja közé helyeztük majd egy Electro Cell Manipulator (BTX Instrument Division, Harvard Apparatus, Inc., Holliston, MA, USA) segítségével elektroporáltuk. Az elektroporációhoz két, egyenként 60 μsec -ig tartó, 1,2 kV/cm-es feszültségű egyenáramú impulzust alkalmaztunk. Az elektromos impulzus alkalmazása után 3 perccel a petesejteket tenyésztőmédiumban átmostuk, majd a különböző kezeléseknek megfelelően véletlenszerűen csoportosítottuk őket. A jelen kísérletsorozat során három aktiválási módszert (kezelést) alkalmaztunk. Az első csoportba azok a petesejtek kerültek, amelyeket a fent leírt elektroporációs eljárás során aktiváltunk. Ezek a petesejtek további aktivációs kezelést nem kaptak, ezeket 7,5 $\mu\text{g/ml}$ cytochalasin B-vel kiegészített tenyésztőmédiumba helyeztük 4 órára. A második csoportban az elektroporált petesejteket 100 μM butyrolactone I-t tartalmazó tenyésztőmédiumba kultiváltuk 4 órán keresztül, a tenyésztő oldat ebben az esetben is tartalmazott 7,5 $\mu\text{g/ml}$ cytochalasin B-t. A harmadik kezelés esetében az elektroporáción átesett petesejteket 10 $\mu\text{g/ml}$ cycloheximide-dal kiegészített oldatban inkubáltuk 5 órán keresztül; az első négy óra során az inkubációs médium 7,5 $\mu\text{g/ml}$ cytochalasin B-t is tartalmazott.

A pronukleusz-képződés meghatározása

A pronukleusz-képződést kísérlettől függően 6 és 10 órával az aktiválás után vizsgáltuk. Az aktivált petesejtek egy részét tárgylemezre helyeztük, fedőlemezzel óvatosan lefedtük, és a mintákat etilalkohol-ecetsav 3:1 arányú elegyében 4 napig fixáltuk. Ezt követően a fixált petesejteket 1%-os ecetsavas orceinnel megfestettük, majd a kromatin konfigurációt Nikon Eclipse 55i fáziskontraszt mikroszkóp alatt 400-szoros nagyítással vizsgáltuk.

Az apoptotikus sejtek meghatározása

A 7 napos tenyésztési periódus végén a blasztocisztákat 3,7%-os paraformaldehidben fixáltuk 4°C-on 12-14 órán keresztül, kétszer átmostuk a fixált embriókat PBS-ben, majd a plazma membránt 0,1% Triton-X-et és 0,1% nátrium citrátot tartalmazó PBS oldatban 2 percig permeabilizáltuk. Az apoptotikus sejtek arányának meghatározására In Situ Cell Death Detection Kit-et (Kat. #11648795910; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) használtunk. Ezt követően TUNEL reakció médiumba helyeztük a blasztocisztákat és 1 órán keresztül inkubáltuk őket 39°C-on. Egy óra elteltével az embriók sejtmagjait Hoechst 33342 festéket tartalmazó PBS médiumban festettük 10 percig. Az értékelés Nikon Eclipse TE2000-U mikroszkóp segítségével 400-szoros nagyítás mellett történt.

Az MPF aktivitásának meghatározása

Mindhárom aktiválási módszer esetében 10 petesejt került fixálásra óránként, az első hat órában. Az aktivált petesejteket PBS-PVA médiumban háromszor átmostuk, majd 4 µl-es CelLytic™-M puffert tartalmazó 0,5 ml-es PCR csőbe helyeztük őket. Felhasználásig -80°C-on tároltuk a mintákat. Az MPF aktivitás meghatározásához cdk1/cdc2 Kinase Assay Kit-et (#17-137, Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY, USA) használtunk. A kit működése azon alapszik, hogy mérjük annak a radióaktív γ -foszfátnak a mennyiségét, amelyet a petesejtben található cdc2 (kináz aktivitása révén) átrak a szubsztrátjára (a specifikus szubsztrát cdc2 esetében hiszton H1) a reakcióelegyhez adott [γ -³²P]ATP-ről. A vizsgálat kivitelezésénél a gyártó által megadott protokollt követtük. A petesejteket tartalmazó oldatot 10 µl 2 mg/ml hiszton H1 oldattal (összetevők: 20mM MOPS, pH 7.2; 25 mM b-glicerol foszfát; 5 mM EGTA; 1 mM nátrium-orthovanadate; 1mM dithiothreitol) inkubáltuk. Az oldatot kiegészítettük 20 µM protein kináz C inhibitorral, 2 µM protein kináz A inhibitorral, valamint 20 µM R24571-gyel, ami a Ca²⁺/kalmodulin-függő fehérje kinázok inhibitora. Az említett inhibitorokat a szerin/treonin kinázok általi interferencia csökkentésének céljából alkalmaztuk. A reakció a 10 mCi [γ -³²P]ATP-t (~3000 Ci/mmol, Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA), 75 mM MgCl₂-t és 500 µM ATP-t tartalmazó puffer hozzáadásával vette kezdetét. Tíz perces, 30°C-on történő inkubálás után 25 µl-nyi folyadékot blottoltunk foszfocellulóz papírra. Ezután a papírt 0,75%-os foszforsavban háromszor átmostuk (egyenként 10 percig), majd egyszer acetonban 5 percig. A papírt 5 ml szcintillációs médiumba

helyeztük, és szcintillációs kamra segítségével meghatároztuk rádióaktivitását. Kiszámoltuk a nem specifikus kötődés és a foszforilált endogén fehérjék aktivitását, majd azzal csökkentettük a pmol/petesejt/perc dimenzióban kapott eredményt.

A MAPK aktivitásának meghatározása

A MAPK aktivitásának vizsgálatához mintánként újból 10 petesejtet gyűjtöttünk és az előző pontban leírtakkal megegyezően tároltuk felhasználásig. A MAPK aktivitását MAPK/Erk assay kit (#17-133; Upstate, Lake Placid, NY, USA) segítségével határoztuk meg. Ebben az esetben a foszforilált szubsztrát Myelin Basic Protein (MBP) volt. A mérés kivitelezése az MPF vizsgálattal megegyezően történt.

1. kísérlet

Az első kísérletben három aktivációs módszer, valamint két tenyésztőmédium (NCSU-23 és PZM-3) hatását vizsgáltuk. Elektroporáció után 6 csoportot alakítottunk ki véletlenszerűen: mindkét tenyésztőmédium esetében elektroporáció (EP), elektroporáció + butyrolactone I (EP+BL) valamint elektroporáció + cycloheximide (EP+CHX) csoportokat hoztunk létre. A kezdeti kultiváció mindhárom aktiválás során cytochalasin B jelenlétében történt, ezáltal biztosítva a diploid kromoszóma-szerelvény kialakulását a létrejött embriók esetében. A pronukleusz-képződés, az osztódott embriók, valamint a kifejlődött blasztociszták aránya került feljegyzésre.

2. kísérlet

A második kísérletben a légteri oxigén-nyomás hatását vizsgáltuk a parthenogenetikus embriók fejlődésére két tenyésztőmédium esetében. A kísérlet során az első kísérletben leghatékonyabbnak ítélt petesejttaktiválási módszert alkalmaztuk. A petesejteket elektroporációt követően két csoportba osztottuk: NCSU-23-ban ill. PZM-3-ban inkubáltuk őket butyrolactone I és cytochalasin B jelenlétében. 4 óra elteltével mindkét csoportot további két alcsoportra osztottuk és 7 napig 39°C-on ~20% O₂ (5% CO₂ légköri levegőben), valamint 5% O₂ (5% CO₂, 5% O₂ és 90% N₂) szint mellett tenyésztettük őket.

3. kísérlet

A 3. kísérletben a különböző aktiválási módszerek hatását vizsgáltuk az MPF és MAPK aktivitás-változására sertés petesejtekben. A petesejtek gyűjtése és in vitro

maturációja a fent leírtakkal megegyezően történt. A petesejteket véletlenszerűen 3 csoportra bontottuk, egy elektroporáció (EP), egy elektroporáció + butyrolactone I (EP+BL) és egy elektroporáció + cycloheximide csoportra (EP+CHX). Az MPF és MAPK aktivitásának méréséhez 10 petesejtet használtunk, a mérésekhez a petesejteket az elektroporáció után 0, 1, 2, 3, 4, 5 és 6 órával gyűjtöttük össze a minden kezelés esetében.

Alkalmazott statisztika

Az adatokat varianciaanalízissel (ANOVA) értékeltük PROC MIX eljárást alkalmazva, a Statistical Analysis System programcsomag segítségével. A százalékos adatok esetében arc sin transzformációt alkalmaztunk. A kezelések közötti különbségek feltárásához Tukey-tesztet használtunk. Szignifikáns különbségnek azt tekintettük, ahol a valószínűség $p < 0,05$ volt.

EREDMÉNYEK

1. kísérlet: Parthenogenetikus aktiválási módszerek és a tenyésztőmédiumok embriófejlődésre kifejtett hatásának vizsgálata

A különböző aktiválási módszerek szignifikáns ($p < 0,001$) hatást gyakoroltak a pronukleusz-képződésre. Az egy vagy két pronukleusszal rendelkező zigóták főátlagos elektroporáció után szignifikánsan alacsonyabb volt ($83,9 \pm 1,7\%$), mint az EP+BL ($92,8 \pm 0,8\%$) vagy EP+CHX ($93,0 \pm 1,0\%$) csoportokban (1. táblázat). A médiumoknak nem volt hatása az eredmények alakulására, a pronukleusszal rendelkező petesejtek aránya NCSU-23 tenyésztőmédium használatakor $89,9 \pm 1,4\%$, míg PZM-3 alkalmazása esetén $89,9 \pm 1,6\%$ volt. Az osztódott, vagyis kétsejtes embriók arányának alakulása hasonló képet mutatott az összes kezelés esetén, sem az alkalmazott aktiválási módszereknek, sem a tenyésztőmédiumoknak hatásuk nem volt. A tenyésztőmédiumokon belüli analízis megállapította, hogy a PZM-3 használatakor az EP+CHX csoportban magasabb volt a kétsejtes embriók aránya, mint a csak elektroporált csoportban, míg az EP+BL csoport a fent említett két kezelés közötti eredményt produkálta.

A blasztociszta stádiumig való fejlődés vizsgálatakor megállapítottuk, hogy ezen paraméterre egyedül a médiumnak volt szignifikáns hatása ($p < 0,001$): a PZM-3

médium ($59,7 \pm 3,6\%$) magasabb fejlődési rátát eredményezett, mint az NCSU-23 ($39,9 \pm 3,1\%$). Az aktivációs módszerek hatását a blasztociszta-képződésre nem tudtuk kimutatni. A tenyésztőmédiumokon belüli analízis szerint NCSU-23 médiumban a három kezelés eredménye nem különbözött statisztikailag egymástól, míg PZM-3 tenyésztőmédiumot használva a kombinált aktivációs módszerek szignifikánsan magasabb embriófejlődést eredményeztek. Nyilvánvaló különbséget mutatott a 7. napra kikelt blasztociszták aránya, a PZM-3 médium használata magasabb kikelési százalékot eredményezett ($10,6 \pm 1,3\%$), mint az NCSU-23 médium ($0,2 \pm 0,2\%$) (1. táblázat).

A blasztociszták össz-sejtszámának alakulására ugyancsak a médiumoknak volt egyértelmű hatása ($p < 0,001$). A PZM-3 tenyésztőoldatban fejlődött blasztociszták magasabb sejtszámot mutattak ($50,2 \pm 1,3$), mint azok, melyeket NCSU-23-ban ($35,3 \pm 1,1$) tenyésztettünk. A médiumokon belül a kezelések eredményei nem különböztek egymástól. Az apoptotikus sejtek arányának alakulására sem a kezelés, sem a tenyésztő oldatok nem voltak hatással, a TUNEL próba segítségével megállapított fragmentálódott DNS-sel rendelkező sejtek aránya hasonló volt valamennyi csoportban (1. táblázat).

2. kísérlet: Az embriótenyésztés alatti O_2 koncentráció és a tenyésztőmédium kölcsönhatásának vizsgálata

A második kísérletben különböző O_2 koncentrációk és tenyésztőmédiumok együttes hatását vizsgáltuk elektroporációt követő butyrolactone I kezeléssel aktivált sertés petesejtek fejlődésére. A kifejlődött kétsejtes embriók aránya minden csoportban hasonló volt, sem a médium típusa, sem a tenyésztedény fölötti légtér O_2 koncentrációja nem gyakorolt szignifikáns hatást a kezdeti osztódásra. Ehhez hasonlóan nem találtunk különbséget alacsony és magas O_2 koncentráció mellett tenyésztett blasztociszták arányában sem. Szignifikáns volt azonban a tápoldat hatása: a PZM-3 oldat magasabb blasztociszta fejlődést eredményezett ($60,4 \pm 2,8\%$), mint az NCSU-23 használata ($40,4 \pm 4,9\%$; $p < 0,05$). Ezen túlmenően, a tenyésztés 7. napján az NCSU-23 médiumban nem találtunk kikelt blasztocisztát, míg PZM-3 médium használatakor az embriók $9,6 \pm 1,9\%$ -a érte el a kikelt blasztociszta stádiumot ($p < 0,001$; 2. táblázat).

1. táblázat. Az aktivációs módszerek és a tenyésztőmédiumok hatása parthenogenetikusan aktivált sertés petesejtek fejlődésére

Médium	Kezelés	Pronukleusz-képződés			Embriótenyésztés					
		N	Pronukleusz-képződés		N	Oszódott embriók N (%±S.E.M.)	Képződött blasztociszták N (%±S.E.M.)	Kikelt blasztociszták N (%±S.E.M.)	Sejtek száma	
			N	N (%±S.E.M.)					bl.-ként $\bar{x} \pm S.E.M.$	Apop. sejtek aránya bl.-ként
NCSU-23	EP	110	92 (84,4±2,1) ^a		173	134 (77,1±6,6) ^c	69 (40,8±7,5) ^c	0 (0,0±0,0) ^a	34,2±1,7 ^a	5,1±0,5
	EP+BL	117	108 (92,7±1,4) ^b		180	138 (77,0±5,4) ^c	71 (39,6±1,9) ^c	0 (0,0±0,0) ^a	36,8±2,0 ^a	4,9±0,5
	EP+CHX	112	104 (92,9±1,8) ^b		173	131 (76,6±6,1) ^c	65 (39,4±6,4) ^c	1 (0,6±0,6) ^a	34,9±2,0 ^a	5,3±0,6
PZM-3	EP	116	96 (83,4±3,0) ^a		173	134 (76,0±5,6) ^c	79 (45,6±4,7) ^c	17 (10,2±2,9) ^b	49,9±2,5 ^b	5,2±0,5
	EP+BL	110	103 (92,8±1,1) ^b		181	151 (83,3±3,7) ^{cd}	114 (64,9±5,2) ^d	23 (12,5±1,7) ^b	49,7±2,2 ^b	5,2±0,5
	EP+CHX	112	104 (93,1±0,8) ^b		173	154 (89,9±2,9) ^d	117 (68,6±3,5) ^d	17 (9,1±2,4) ^b	50,8±2,1 ^b	4,7±0,4

^{a, b, c, d} az oszlopok adatai közötti statisztikailag igazolható szignifikáns különbségeket jelöli; ^{a, b} - p<0,001; ^{c, d} - p<0,05

2. táblázat. A tenyésztés alatti oxigén koncentráció és a tenyésztőmédium hatása az elektroporáció + butyrolactone I segítségével aktivált sertés petesejtek fejlődésére

Médium	O ₂ konc. (%)	N	Oszódott embriók N (%±S.E.M.)	Képződött blasztociszták N (%±S.E.M.)	Kikelt blasztociszták N (%±S.E.M.)	Sejtek száma Blasztocisztánként $\bar{x} \pm S.E.M.$	Apop. sejtek aránya bl.-ként
NCSU-23	20	131	96 (73,2±7,1)	49 (37,5±7,8) ^a	0 (0,0±0,0) ^c	32,2±2,1 ^c	5,0±0,9
	5	133	98 (74,0±3,7)	57 (43,2±3,2) ^a	0 (0,0±0,0) ^c	34,9±1,9 ^c	4,9±0,5
PZM-3	20	128	105 (82,0±3,7)	76 (59,4±6,6) ^b	13 (10,2±2,1) ^d	44,6±2,4 ^d	4,9±0,6
	5	134	107 (79,8±4,0)	82 (61,3±4,9) ^b	13 (9,0±3,4) ^d	46,5±2,4 ^d	4,9±0,4

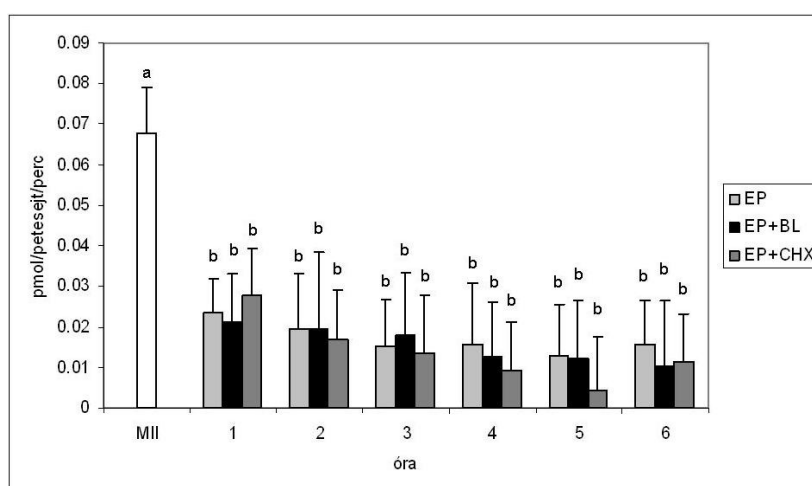
^{a, b, c, d} az oszlopok adatai közötti statisztikailag igazolható szignifikáns különbségeket jelöli; ^{a, b} - p<0,05; ^{c, d} - p<0,001.

^{a, b, c, d} az oszlopok adatai közötti statisztikailag igazolható szignifikáns különbségeket jelöli; ^{a, b} - p<0,05; ^{c, d} - p<0,001.

Az átlagos blasztocisztánkénti sejtszám magasabb értéket mutatott PZM-3 médium használatakor ($45,5 \pm 1,7$), mint NCSU-23 ($33,8 \pm 1,4$) esetében ($p < 0,001$). A TUNEL próba eredményére a kezelésnek, az oxigén nyomásnak vagy a kezelés x médium interakciónak nem volt hatása. Az apoptotikus, vagyis a programozott sejthalált mutató sejtek aránya 5% körül alakult minden kísérleti kezelésben (2. táblázat).

3. kísérlet: Az MPF és a MAPK aktivitásának változása sertés petesejtekben különböző aktivációs módszerek alkalmazása esetén

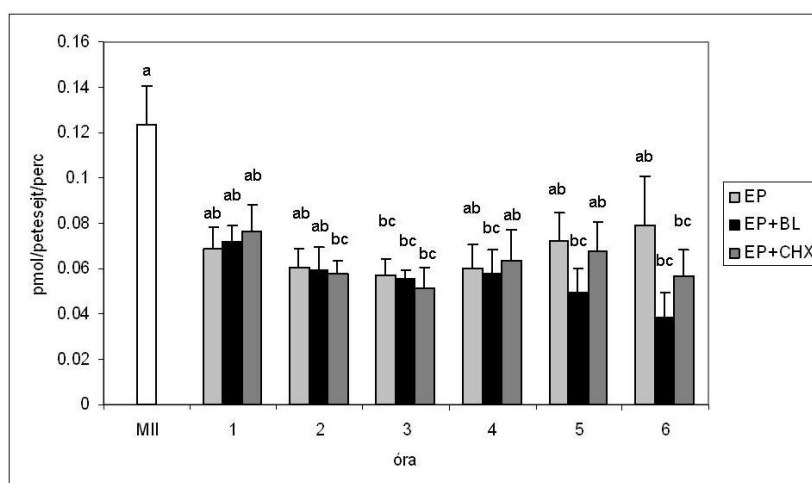
Ebben a kísérletben azt tanulmányoztuk, hogy a különböző aktiválási módszerek hogyan befolyásolják az MPF és MAPK aktivitásának változását sertés petesejtekben. A kísérlet során a korábban már hatékonyabbnak ítélt PZM-3 médiumot használtuk az aktivált petesejtek inkubálásához. A cdc2 (az MPF katalitikus alegysége), valamint a MAPK foszfortranszferáz aktivitását a histone H1 és a myelin basic protein (MBP), mint *in vitro* szubsztrátjaik foszforilációjának mérésével értékeltük radióaktív [γ - 32 P]ATP segítségével.



1. ábra. Az MPF aktivitásának változása a korai embriófejlődés során parthenótákban különböző aktiválási módszerek alkalmazása esetén.

a, b az oszlopok közötti statisztikailag igazolható szignifikáns különbségeket jelöli, $p < 0,05$

A cdc2, vagyis az MPF kezdeti, MII-es aktivitása (0,068 pmol/petesejt/perc) mindhárom aktivációs módszer esetében lecsökkent az elektromos pulzus alkalmazása után egy órával (EP: 0,024, EP+BL: 0,021, EP+CHX: 0,028 pmol/petesejt/perc; $p<0,05$; 1. ábra). Az MPF aktivitása a csak elektroporált csoportban az eredeti aktivitási szint 34,4%-ára csökkent. Ehhez képest a további kezelés butyrolactone I vagy cycloheximide használatával nem okozott további aktivitás-csökkenést. A cdc2 kináz aktivitása, vagyis az általa időegység alatt foszforilált hiszton H1 mennyisége alacsony maradt mindhárom csoportban minden időpontban az elektroporációt követő 6 órában; ennek az időszaknak a vége nagyjából egybeesik az előmag (pronukleusz) képződésével. Az egyes időpontokban nem tapasztaltunk eltéréseket az MPF aktivitását illetően az egyes aktivációs módszerek között.



2. ábra. A MAPK aktivitásának változása a korai embriófejlődés során parthenótákban különböző aktiválási metódusok alkalmazása esetén.

a, b az oszlopok közötti statisztikailag igazolható szignifikáns különbségeket jelöli, $p<0,05$

A MAPK kezdeti aktivitása 0,123 pmol/petesejt/perc volt (2. ábra). Egy órával a elektromos impulzus alkalmazása után a MAPK aktivitása a kezdeti szint 54,4-62,6%-ára csökkent. Az aktiválást követő második órában a kináz aktivitása az EP+CHX csoportban (0,058 pmol/petesejt/perc) szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a nem kezelt petesejtekben ($p<0,05$), majd három órával az elektroporációt követően már minden csoportban jelentősen lecsökkent ($p<0,05$). Ezt követően a butyrolactone I-gyel kezelt petesejtek a vizsgált időszak végéig csökkentett MAPK aktivitást mutattak. Ezzel szemben 3 órával az aktiválást követően a csak elektroporált

csoportban a kinázaktivitás növekedni kezdett, majd a negyedik óra végén a MAPK aktivitása (0,060 pmol/petesejt/perc) statisztikailag már nem különbözött a kezdeti MII-es petesejtekben mért értéktől és magas maradt a 6. óra végéig. Három óra elteltével a MAPK aktivitásának enyhe emelkedése volt tapasztalható azon petesejtek esetében, amelyek a kombinált EP+CHX kezeléssel lettek aktiválva, de a 6. óra végén mért kináz-aktivitási érték ismét különbözött az aktiválás előtti értéktől ($p < 0,05$).

A kísérlet során meghatároztuk továbbá azt, hogy a különböző parthenogenetikus aktiválási módszerek milyen hatékonysággal tudták stimulálni a sejtciklus újraindulását, azaz a petesejt aktiválódását. Azt tapasztaltuk, hogy a kombinált aktivációs módszerek hatékonyabbnak bizonyultak pronukleusz-képződés indukálására ($p < 0,05$). Hat órával az aktivációt követően az előmag képződés szignifikánsan magasabb volt azokban a petesejtekben, amelyeket butyrolactone I ($86,32 \pm 3,27\%$) vagy cycloheximide ($87,56 \pm 3,73\%$) jelenlétében inkubáltunk elektroporáció után, mint azokban, amelyek csak elektroporáció ($69,39 \pm 3,32\%$) segítségével lettek aktiválva.

KÖVETKEZTETÉSEK

Parthenogenetikus aktiválási módszerek és a tenyésztőmédiumok embriófejlődésre kifejtett hatásának vizsgálata

Kísérleteink során a pronukleusz-képződés alacsonyabb volt a csak elektroporált petesejteknel, mint a butyrolactone I illetve cycloheximide kiegészítéssel aktivált petesejtek esetében. Ez a kezdeti fejlődésbeli előny a proteinszintézis/proteinkináz gátlóknak volt köszönhető, azonban NCSU-23 médiumban ez az előny megszűnt, amint az embriók elérték a kétsejtes állapotot. Ezzel szemben PZM-3 médium használatakor a kétsejtes, osztódott embriók aránya szignifikánsan magasabb volt a cycloheximide-kezelt csoportban, mint az elektroporált csoportban. Megállapítható volt továbbá, hogy a PZM-3 tenyésztőmédium használatának eredményeképpen a blasztocisza stádiumig való fejlődés is magasabb volt a kombinált kezeléseknél köszönhetően, mint a csak elektroporációval aktivált petesejtek esetében. NCSU-23 médium használata esetén a fehérjészintézis/fehérjefoszforyláció gátlók jótékony hatása nem fejeződött ki a pronukleusz stádiumon túl, ami azt mutatja, hogy ez a médium valamilyen módon

korlátozza a parthenogenetikus embriók fejlődési potenciálját. Ez összhangban van azokkal a korábbi megállapításokkal, amelyek szerint az elektroporált petesejteknel a cycloheximide kezelés nem javította a blasztocisza stádiumig való fejlődést 1%-os MEM nem-esszenciális aminosavakkal kiegészített NCSU-23 médiumban. Habár kísérleteinkben a két médium hasonló pronukleusz-képződést (kivéve az elektroporált + cycloheximide csoportot) és osztódási százalékot eredményezett, a blasztocisza stádiumig való fejlődés és az embriók átlagos sejtszáma jelentősen javult PZM-3 médium használatakor.

Sertés zigóták blasztocisza stádiumig való tenyésztésére számos médium került kifejlesztésre, többek között a Whitten's médium, North Carolina State University (NCSU)-23 és NCSU-37 médium, Beltsville embrió tenyésztő médium (BECM)-3 valamint sertés zigóta médium (PZM)-3 and PZM-4. Az NCSU-23 médium a leginkább elterjedt, és a legszélesebb körben alkalmazott tenyésztőmédium sertés embriók fejlődésének elősegítésére *in vitro* fertilizációt vagy sejtmagátültetési klónozást követően. Ezzel szemben egyes szerzők szerint a PZM-3 médium tűnik a napjaink leghatékonyabb tenyésztőmédiumának, jótékony hatását sikerült igazolni *in vivo* előállított embriók, valamint parthenogenetikusán aktivált petesejtek tenyésztése során. YOSHIOKA et al. (2002) magasabb blasztocisza arányt tapasztalt PZM-3 tenyésztőmédium használatakor, mint NCSU-23 esetében *in vivo* eredetű embriók fejlődésének tanulmányozásakor. Saját kísérleteink során az embriófejlődés hatékonyabb volt PZM-3 médiumban, mint NCSU-23-ban. Ugyancsak kimutattuk, hogy szignifikánsan magasabb a kikelt blasztociszták aránya PZM-3 médiumban, mint NCSU-23 esetén a 7 napos embriótenyésztés végén. A legújabban közzétett kutatási eredmények szerint az *in vitro* fertilizációval létrehozott embriók között a kikelt blasztociszták aránya magasabb volt PZM-3 tenyésztőmédiumban, mint NCSU-23-ban a 7. napon, habár a 9. nap végére a különbség kiegyenlítődt. Ezek szerint a PZM-3 médium gyorsabb blasztocisza fejlődést és ezáltal korábbi kikelést eredményezett. Az NCSU-23 médium a sertés embrió metabolikus és tápanyag szükségletének figyelembevételével készült, míg a PZM-3 a sertés petevezető-folyadék kémiai összetétele alapján meghatározott tápoldat. A PZM-3 sertés embriók fejlődésére kifejtett jótékony hatása (legalább részben) a tenyésztőoldat aminosav kiegészítésnek köszönhető. Korábbi vizsgálatok szerint a nem-esszenciális aminosavak a korai osztódást valamint a blasztociszták expanszióját segítik elő, míg az esszenciális aminosavak a blasztociszták sejtszámának emelkedését okozzák.

Az embriótenyésztés alatti O₂ koncentráció és a tenyésztőműködium kölcsönhatásának vizsgálata

Az oxigén koncentráció az emlősök reprodukciós traktusában $\leq 8,7\%$ körül mozog. Ezzel szemben a legáltalánosabban használt embriótenyésztő gázkeverék 5% CO₂-ot és 95% levegőt tartalmaz, ami körülbelül 20% O₂-t jelent az inkubátorban. A tenyésztés alatti magas O₂ koncentráció a reaktív oxigén gyökök (ROS) formációjának növekedéséhez vezet, aminek káros hatása lehet a sejtekre, DNS rongálódást, lipid peroxidációt, valamint a fehérjék oxidatív változását okozva. A kultivációs periódus alatti csökkentett (5%) O₂ koncentráció növelte az *in vitro* fertilizációval előállított embriók fejlődési erélyét a blasztociszta stádiumig, más esetekben magasabb blasztocisztánkénti sejtszámot eredményezett. *In vivo* eredetű embriók esetén mindkét paraméter értéke emelkedett. Ezzel szemben a parthenogenetikus aktiválással létrehozott embriók tenyésztését leíró tanulmányok egymásnak ellentmondóak. CALLESEN et al. (2000) javulást tapasztalt a blasztociszták fejlődését tekintve csökkentett O₂ nyomás esetén. Más szerzők nem kaptak emelkedett blasztociszta képződést, azonban az alacsonyabb O₂ nyomás magasabb embriókénti sejtszámot eredményezett. Megint más esetekben sem a blasztociszta képződés aránya sem az átlagos blasztocisztánkénti sejtszám nem változott az O₂ koncentráció függvényében. Kísérleteink során nem tudtuk kimutatni alacsonyabb O₂ nyomás használatakor az osztódás illetve a blasztociszta formáció signifikáns javulását. Az átlagos embriókénti sejtszám ugyancsak hasonló volt a két oxigén koncentráció melletti embriótenyésztés esetében. Lehetséges, hogy az aktiválás előtti szigorú petesejtszelekció, vagyis a kísérletekhez a csak jó minőségű oociták használata az oka a kapott eredményeknek. Ezek a petesejtek valószínűleg nagyobb toleranciát mutattak az oxigén gyökökkel szemben. Valószínű, hogy a ROS nagyobb hatást gyakorol a gyengébb minőségű petesejtekre, ami a későbbiekben alacsonyabb embriófejlődési potenciálban nyilvánul meg. A fentiek alapján úgy tűnik, hogy különböző O₂ koncentrációk sertés parthenóták fejlődésére gyakorolt hatásának tisztázásához további vizsgálatok szükségesek.

Az apoptózis, mint a szuboptimális tenyésztési körülményekre és stresszre adott válasz széles körben tanulmányozott embrionális sejtekben. Az apoptózis vagy programozott sejthalál egy fiziológiás folyamat, mind *in vivo*, mind *in vitro* előállított embriókban megfigyelhető. Egyes vélemények szerint szükséges, hogy korai embriók

esetében az apoptotikus sejtek gyakoriságának meghatározása a minőség-értékelési protokollok részét képezze. Saját kísérleteinkben nem találtunk különbséget az apoptózisos sejtek arányában sem az aktivációs módszer, sem a tenyésztőmédium, sem az O₂ koncentráció hatására. Az apoptózis előfordulása kísérleteinkben 5% körüli értéket mutatott, ez az arány némileg kisebb, mint arról a szakirodalom beszámol (7%). Az apoptotikus sejtek alacsonyabb szintű jelenléte valószínűleg az elektroporált petesejtek cytochalasin B kezelésével magyarázható. A cytochalasin B gátolja a mikrofilamentumok polarizációját, ezáltal megakadályozza a második sarkitest kizáródását és elősegíti diploid embriók előállítását. A haploid kromoszóma-garnitúra kimutathatóan növeli az apoptózis előfordulását a Bcl-xL gén expressziójának csökkentése és a Bak gén expressziójának növelése által. Ezen túlmenően, a cytochalasin B védi az embriókat a tenyésztés során a fragmentálódástól, valamint sertés esetében növelte az *in vitro* embriók blasztocisza stádiumig történő fejlődését is.

Következtetésképpen megállapíthatjuk, hogy az elektroporációval kombinált protein szintézis- vagy speciális protein foszforiláció gátlók használata előnyösebb aktivációs stimulust szolgáltat, mely jobb blasztocisza stádiumig való fejlődést eredményez, mint az elektroporáció egyedüli alkalmazása. Kimutatható volt, hogy a PZM-3 médium előnyösebb parthenogenetikus sertés embriók blasztocisza stádiumig való kultiválásra, mint az NCSU-23 tenyésztőmédium. Az optimális aktivációs módszerek, valamint a tenyésztéskori paraméterek meghatározása kritikus jelentőséggel bír a különböző asszisztált reprodukciós technikák, köztük a sejtmagátültetési klónozás hatékonyságának javítása szempontjából.

Az MPF és a MAPK aktivitásának változása sertés petesejtekben különböző aktivációs módszerek alkalmazása esetén

Általánosan elfogadott az a hipotézis, miszerint a Ca²⁺ legfontosabb szerepe termékenyüléskor a ciklin B szintjének csökkentése. Emlős petesejtekben a proteinszintézis folyamatosan zajlik, mialatt a petesejt felkészül a termékenyülésre. Úgy tűnik továbbá, hogy a folyamatos ciklin szintézis szükséges a meiotikus megrekedés fenntartásához. Ennek köszönhető, hogy a proteinszintézis gátlók elősegítik a petesejt aktiválását egyes fajok, mint például egér esetében. Az *Ascidiák* petesejtjeinél a spermium indukálta Ca²⁺ hullámok szoros korrelációban vannak a

ciklin lebomlásával. Az ismétlődő Ca^{2+} hullámoknak fontos szerepe van a ciklin szintjének hatékony csökkentésében, előidézve az MPF teljes inaktiválódását. Azonban a leggyakrabban alkalmazott parthenogenetikus aktiválási módszer, az elektroporáció (magas feszültségű egyenáramú pulzus alkalmazása alacsony iontartalmú médiumban) csak egyszeri Ca^{2+} szintemelkedést okoz a cytoplazmában, Ca^{2+} oszcilláció nem jön létre. Egérben az egyszeri Ca^{2+} szintemelkedés aktiválja az idősebb petesejteket, ahol a protein szintézisének kapacitása alacsonyabb hatásfokú, mint a frissen ovulált petesejtekben. Szarvasmarha petesejtek esetében hasonló jelenséget tapasztaltak. Ezekben a petesejtekben az egy elektromos impulzussal végrehajtott aktiválás MPF inaktiválódást eredményez 1 órán belül, azonban két óra elteltével az MPF újra-aktiválódik, és 6 óra elteltével a kezdeti MII-es szintnél is magasabb aktivitást észleltek. Három elektromos impulzus alkalmazása esetén az MPF aktivitása csak 4 óra elteltével kezdett visszatérni, és hat pulzus képes volt az MPF aktivitását legalább 8 óráig alacsony szinten tartani. A hosszan tartó Ca^{2+} szignálok jelentőségét egérkísérletekben bizonyították, ahol pontosan meghatározásra került a Ca^{2+} szintemelkedések pontos száma, illetve azok hatása. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy az elektromos aktiváció tartama és frekvenciája meghatározza a sejtválaszt, beleértve az MPF és a MAPK inaktiválódását is. Az MPF teljes inaktiválódása 24 elektromos pulzus alkalmazásakor következett be, míg ennél kevesebb számú hullám indukálása esetén az inaktiválódás hiánya vagy újra-aktiválódás volt tapasztalható. Sertés petesejtekben az egy 15 μsec -os, 180 V/mm-es elektromos pulzus hatékonyan inaktiválta az MPF-et, de érdekes módon csak mintegy 4 órával az elektromos stimulus alkalmazása után. Kísérleteink során mi két egymást követő, 120 V/mm-es, 60 μsec -os egyenáramú pulzust használtunk a meiózis újraindítására a második metafázisban megrekedt petesejteknél. Ezen paraméterek használata mellett az MPF aktivitásának szignifikáns csökkenését tapasztaltuk 1 órával a kezelést követően, és a pronukleusz-képződés kezdetéig, mintegy 6 órán keresztül alacsony szinten maradt. Mivel az elektroporáció során alkalmazott feszültség nagysága, az elektromos pulzus hossza és az extracelluláris Ca^{2+} koncentrációja meghatározzák a Ca^{2+} szintemelkedés amplitúdóját és hosszát, megállapítható, hogy a Ca^{2+} jelzés karakterisztikája befolyásolja az MPF inaktiválódásának mechanizmusát. Az elektromos pulzusok által indukált intracelluláris Ca^{2+} szint változás hatékonyan csökkenti az MPF aktivitását, a cdc2 alegység gátlása butyrolactone I segítségével, vagy a ciklin B szintézisének

blokkolása cycloheximide használatával nem okozott további változást az MPF aktivitásának szintjében.

A termékenyülés előidézi a MAPK inaktiválódását is, de az MPF esetén tapasztalt gyors csökkenés helyett a Mos/MEK1/MAPK/p90^{Rsk} kaszkád még mintegy 30-45 percig aktív marad. Az, hogy a MAPK inaktiválódása az MPF inaktiválódása után következik be, arra enged következtetni, hogy az MII fázisban a sejtciklus újraindulása nem függ a MAPK-tól. Egér esetében a MAPK szerepet játszik a mikrotubulusok regulációjában valamint a magorsó létrejöttében, inaktiválódása a petesejt aktiválódása után feltétele a pronukleuszok képződésének. Fertilizáció után mesterségesen magasan tartott MAPK aktivitás hatására a második sarkitest kizáródik ugyan, de pronukleusz-képződés nem tapasztalható, a petesejt egy ún. MIII fázisba kerül az MPF inaktiválódásának ellenére is. Sertés petesejtek aktivációja után a p90^{Rsk} defoszforilálódik (inaktiválódik) röviddel a pronukleusz-képződés előtt, ami a MAPK inaktivációját is jelenti, ezzel jelezve, hogy a MAPK kaszkád szabályozó szerepet játszik a nukleusz állapotának szabályozásában és a mikrotubulusok szerveződésében. Kísérleteink során a MAPK aktivitásának változása egyedi képet mutatott a különböző aktivációs módszerek alkalmazása után. A csak elektroporált petesejtekben a MAPK aktivitása jelentősen csökkent az eredeti értékről egy óra után, és legalacsonyabb szintjét 3 órával az elektromos impulzus alkalmazása után érte el. Azonban az aktiválást követő negyedik órától az aktivitása újra emelkedni kezdett és ezen a szinten maradt a pronukleusz-képződéséig. A magas MAPK aktivitás a p90^{Rsk} szubsztrátján keresztül a zavarja a Myt1 cdc2 kinázra kifejtett gátló hatását, valamint a pronukleusz-képződést, ami nyilvánvalóan kedvezőtlenül hat a korai embriófejlődésre. A MAPK újra-aktiválódását a kezdeti csökkenés után nem tapasztaltuk, amikor az elektroporációt követően a petesejtet butyrolactone I jelenlétében inkubáltuk. Az aktivitás ezekben a petesejtekben a pronukleusz-képződésig alacsony maradt. A butyrolactone I elsődlegesen az MPF aktivitását gátolja az ATP kompetitoraként, de elképzelhető, hogy egy nem-specifikus gátló hatást kifejt egyéb kinázokra, pl. a MAPK-ra is. Butyrolactone I egyedüli használata fokozatos MAPK inaktiválódást eredményez (3 órával aktiválást követően a MAPK még aktív), míg elektroporációt követő alkalmazása hatékonyan támogatta az embriók blasztociszta stádiumig történő fejlődését.

Az elektroporáció cycloheximide kezeléssel kombinálva szintén hatásosan csökkentette a MAPK szintjét. Az így aktivált petesejteknel némi emelkedés

tapasztható volt ugyan a MAPK szintjében, de a pronukleusz-képződés idején a MAPK aktivitása mintegy fele volt csak a kezdeti szintnek. A cycloheximide az aktivált petesejtek fejlődésére előnyös hatást gyakorol a ciklin B képződés gátlásával, ezen proteinszintézis gátló jelenlétében a MAPK foszforilációja, aktiválódása ugyancsak gátolt. A hatékony parthenogenetikus petesejt aktiválás szempontjából szükséges mind a ciklin B/cdc2, mind a MAPK aktivitásának csökkentését elősegítő módszerek használata. A butyrolactone I vagy cycloheximide nélküli petesejt aktiválás tökéletlen MAPK inaktiválódáshoz vezet, amely egyik lehetséges oka az alacsony pronukleusz-képződésnek. Ez lehet egy további magyarázata a cycloheximide petesejt-aktivációra gyakorolt pozitív hatásának. Ezek az eredmények egybevágóak azzal a megállapításunkkal, mely szerint a pronukleusz-képződés, az osztódott embriók aránya valamint a blasztocishta formáció szignifikánsabban magasabb volt kombinált aktivációs kezelések esetében, amikor elektroporációt követően a petesejtek proteinszintézis vagy protein kináz inhibitorokkal lettek kezelve.

Következtetésül megállapítható, hogy két egymást követő elektromos pulzus alkalmazása hatékonyan inaktiválja sertés petesejtek citoplazmájában az MPF-et, de a MAPK aktivitása az elektroporációt követő 4. órára visszaáll az eredetihez közeli értékre. A tökéletlen MAPK inaktiváció alacsony pronukleusz-képződésben nyilvánul meg. A gyors és tartós MAPK inaktiválódás előidézhető fehérjeszintézis- vagy speciális protein kináz gátlók elektroporációt követő alkalmazásával. A kombinált aktivációs módszerek magasabb pronukleusz-képződést is indukáltak, így ezek a módszerek hatékonyan alkalmazhatók sejtmagátültetési klónozási protokollok részeként a petesejtek mesterséges aktiválására.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Sertés petesejtek parthenogenetikus aktivációja során a kombinált aktivációs kezelések – melynek során a petesejtekben előbb egy Ca^{2+} beáramlást idézünk elő elektroporáció segítségével, majd az elektroporált petesejteket fehérjeszintézis vagy cdc2/cdk2 (speciális protein kináz) inhibitorokkal kezeljük – eredményesebben stimuláltak embriófejlődést, mint az elektroporáció egyedüli alkalmazása.
2. Parthenogenetikus sertés embriók tenyésztése szempontjából a PZM-3 médium előnyösebb feltételeket képes biztosítani, mint az NCSU-23 médium.
3. PZM-3 tenyésztő oldat alkalmazása esetén a légtér magas (~20%) oxigén tartalma nem befolyásolja károsan a parthenogenetikus sertés embriók fejlődését. Ily módon hagyományos (5% széndioxid plusz 95% levegőt biztosító) inkubátorok használatával is lehetséges hatékony embriófejlődést elérni.
- 4a. Az MPF aktivitásának gyors és hatékony csökkenése idézhető elő elektroporációval, két egymást követő, 120 V/mm-es, 60 μsec -os egyenáramú impulzus alkalmazásával.
- 4b. Az elektroporáció önmagában alkalmazva a MAPK aktivitásának csökkenését indukálja ugyan, azonban a kezdeti csökkenést az enzim gyors újraktiválódása követi.
- 4c. A petesejtek elektroporációját követően a MAPK aktivitásának tartósan alacsony szinten tartásához eredményesen alkalmazhatók a proteinszintézist vagy cdc2/cdk2 kinázokat gátló inhibitorok. E tény indokolja a kombinált aktivációs kezelések magas hatékonyságát.

A DOLGOZAT TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

Lektorált cikkek

Nánáássy L., Lee K., Jávör A., Macháty Z. (2007): The effect of activation methods and culture conditions on the development of parthenogenetic porcine embryos. *Animal Reproduction Science*, doi:10.1016/j.anireprosci.2007.01.019

Nánáássy L., Lee K., Jávör A., Macháty Z. (2007): Changes in MPF and MAPK activities in porcine oocytes activated by different methods. *Theriogenology* (*elfogadva*)

Konferencia absztraktok

Nánáássy L., Lee K., Jávör A., Macháty Z. (2007): Dynamics of mitogen-activated protein kinase activity in pig oocytes following parthenogenetic activation by different methods. 33rd Annual Conference of the International Embryo Transfer Society; *Reproduction, Fertility and Development* 19(1):282. p.

Nánáássy L., Lee K., Jávör A., Cabot R., Macháty Z. (2006): Optimization of parthenogenetic oocyte activation for porcine nuclear transfer. 39th Annual Meeting of the Society of Study for Reproduction Biology of Reproduction Special Issue 123. p.

Lee K., **Nánáássy L.**, Macháty Z. (2006): The distribution of STIM 1 in porcine oocytes and its potential role in capacitative Ca^{2+} entry. 39th Annual Meeting of the Society of Study for Reproduction Biology of Reproduction Special Issue 142. p.

Nánáássy L., Lee K., Jávör A., Macháty Z. (2006): Changes in MPF activity in porcine oocytes following activation by various methods. 32nd Annual Conference of the International Embryo Transfer Society; *Reproduction, Fertility and Development* 18(1,2):265. p.