

DEBRECENI EGYETEM
AGRÁRTUDOMÁNYI CENTRUM
MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR
ÁLLATTENYÉSZTÉSTUDOMÁNYI INTÉZET

ÁLLATTENYÉSZTÉSI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

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

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**

PARTHENOGENETIKUS SERTÉS EMBRIÓK ELŐÁLLÍTÁSÁNAK
VIZSGÁLATA

*Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Állattenyésztési Tudományok tudományágban*

Írta: Nánássy László doktorjelölt

A doktori szigorlati bizottság:

	Név	Tud. fokozat
Elnök:		
Tagok:		
		

A doktori szigorlat időpontja: 200..... hó nap

Az értekezés bírálói:

Név	Tud. fokozat	Aláírás
.....		
.....		
.....		

A bíráló bizottság:

	Név	Tud. fokozat	Aláírás
Elnök:			
Titkár:			
Tagok:			
			
			
			
			
			
			
			

Az értekezés védésének időpontja: 200..... hó nap

TARTALOMJEGYZÉK

	oldal
Rövidítések jegyzéke.....	5
1. BEVEZETÉS	7
1. 1. Bevezetés.....	7
1. 2. Célkitűzések	10
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	11
2. 1. A petesejt érése.....	11
2. 2. Metafázist elősegítő faktor (MPF)	12
2. 3. A citostatikus faktor (CSF) és alkotói	17
2. 3. 1. A Mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) kaszkád.....	17
2. 3. 2. A ciklin E/Cdk2.....	22
2. 3. 3. Az <i>Emi1</i>	22
2. 4. A megtermékenyülés.....	23
2. 5. Parthenogenetikus aktiválás	29
2. 5. 1. A Ca^{2+} szintjének emelkedését előidéző módszerek	29
2. 5. 2. A sejtciklus szabályozók manipulálása	31
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	34
3. 1. Parthenogenetikus aktiválási módszerek és a tenyésztőmédium embriófejlődésre kifejtett hatásának vizsgálata.....	34
3. 1. 1. Alkalmazott vegyszerek	34
3. 1. 2. A petesejtek gyűjtése.....	34
3. 1. 3. A petesejtek <i>in vitro</i> érlelése.....	34
3. 1. 4. Az <i>in vitro</i> maturáció eredményességének meghatározása.....	35
3. 1. 5. A petesejtek aktivációja	35
3. 1. 6. <i>In vitro</i> embriótenyésztés.....	36
3. 1. 7. A pronukleusz-képződés meghatározása	36
3. 1. 8. Az osztódott és a blasztocisza stádiumú embriók meghatározása	37
3. 1. 9. Az apoptotikus sejtek meghatározása.....	37
3. 1. 10. Kísérleti elrendezés	38
3. 1. 11. Alkalmazott statisztika.....	38
3. 2. Az embriótenyésztés alatti O_2 koncentráció és a tenyésztőmédium kölcsonhatásának vizsgálata.....	38
3. 2. 1. Alkalmazott vegyszerek	38
3. 2. 2. A petesejtek gyűjtése.....	38
3. 2. 3. A petesejtek <i>in vitro</i> érlelése.....	39
3. 2. 4. A petesejtek aktivációja	39
3. 2. 5. <i>In vitro</i> embriótenyésztés.....	39
3. 2. 6. Az osztódott és a blasztocisza stádiumú embriók meghatározása	39
3. 2. 7. Apoptotikus sejtek meghatározása	39
3. 2. 8. Kísérleti elrendezés	39
3. 2. 9. Alkalmazott statisztika.....	40
3. 3. Az MPF és a MAPK aktivitásának változása sertés petesejtekben különböző aktivációs módszerek alkalmazása esetén	40
3. 3. 1. Alkalmazott vegyszerek	40
3. 3. 2. A petesejtek gyűjtése.....	40
3. 3. 3. A petesejtek <i>in vitro</i> érlelése.....	40
3. 3. 4. A petesejtek aktivációja	41
3. 3. 5. <i>In vitro</i> embriótenyésztés.....	41

3. 3. 6. A pronukleusz-képződés meghatározása	41
3. 3. 7. Az MPF aktivitásának meghatározása	41
3. 3. 8. A MAPK aktivitásának meghatározása	42
3. 3. 9. Kísérleti elrendezés	42
3. 3. 10. Alkalmazott statisztika	42
4. EREDMÉNYEK ÉS AZOK ÉRTÉKELÉSE	44
4. 1. Parthenogenetikus aktiválási módszerek és a tenyésztőmédium embriófejlődésre kifejtett hatásának vizsgálata.....	44
4. 1. 1. Eredmények értékelése, következtetések.....	50
4. 2. Az embriótenyésztés alatti O ₂ koncentráció és a tenyésztőmédium kölsönhatásának vizsgálata.....	51
4. 2. 1. Eredmények értékelése, következtetések.....	53
4. 3. Az MPF és a MAPK aktivitásának változása sertés petesejtekben különböző aktivációs módszerek alkalmazása esetén	54
4. 3. 1. Eredmények értékelése, következtetések.....	57
5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	61
6. ÖSSZEFOGLALÁS	62
7. SUMMARY	65
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	67
MELLÉKLETEK.....	93
A dolgozat témakörében megjelent publikációk	94
Táblázatok jegyzéke	95
Ábrák jegyzéke.....	96
Képek jegyzéke	97
Nyilatkozatok	98
Köszönetnyilvánítás	99

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

APC/C	– anafázist elősegítő komplex/cikloszóma
BSA	– marha szérum albumin (bovine serum albumin)
BL	– butyrolactone I
<i>bub1-3</i>	– <u>b</u> udding <u>u</u> ninhibited by <u>b</u> enzimidazole 1, 2, 3
Ca²⁺	– kalcium ion
[Ca²⁺]_i	– intracelluláris szabad kalcium koncentráció
CaM	– kalmodulin
CaMKII	– kalmodulin-függő protein kináz II
Cdc2	– cell division control 2
Cdk	– ciklin-függő kináz
CHX	– cycloheximide, 3-[2-(3,5-dimethyl-2-oxocyclohexyl)-2-hydroxyethyl]
CSF	– citostatikus faktor
Emi1	– early mitotic inhibitor 1
EP	– elektroporáció
ER	– endoplazmatikus retikulum
GV	– germinális vezikulum
GVBD	– germinális vezikulum lebomlása
HEPES	– N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
IP₃	– inozitol 1,4,5-trifoszfát
IP₃R	– inozitol 1,4,5-trifoszfát receptor
IVF	– <i>in vitro</i> fertilizáció
<i>mad1-3</i>	– mitotic arrest defective 1, 2, 3
MI	– első meiózis metafázisa
MII	– második meiózis metafázisa
MAPK	– mitogén-aktivált protein kináz
MPF	– metafázist elősegítő faktor
NCSU-23	– North Carolina State University médium 23
NEBD	– sejtmaghártya lebomlása
NT	– sejtmagátültetési klónozás
PB	– sarkitest, polocyta
p.c.	– post coitum
PG	– progeszteron

PIP₂	– foszfatidilinozitol 4,5-biszfoszfát
PLCζ	– foszfolipáz C ζ (zéta)
Plk, xPlk	– Polo-szerű kináz, <i>Xenopus</i> Polo-szerű kináz
Plkk, xPlkk	– Polo-szerű kináz kináz, <i>Xenopus</i> Polo-szerű kináz kináz
PZM-3	– sertés zigóta médium 3
ROS	– reaktív oxigén-gyökök
SAC	– magorsó kialakulás ellenőrzőpontja
TUNEL	– <u>t</u> erminal deoxynucleotidyl transferase biotin-d <u>U</u> TP <u>n</u> ick <u>e</u> nd <u>l</u> abeling
UPS	– ubiquitin proteaszóma rendszer
6-DMAP	– 6-dimetilaminopurin

1. BEVEZETÉS

1. 1. Bevezetés

Dolly megszületése óta (WILMUT et al., 1997) eltelt mintegy 10 évben az összes gazdasági haszonállat esetében sikerült alkalmazni a sejtmagátültetéssel történő klónozás technológiáját (VAJTA et GJERRIS, 2006). A sertés fajnál - némileg lemaradva az egér, a szarvasmarha és a juh után - POLEJAEVA et al., (2000) számolt be először szomatikus sejtből 5 klónozott malac megszületéséről. Ezt követően óriási előrehaladás következett be ezen a téren. Rövid időn belül számos kutatócsoport írta le a technika sikeres alkalmazását random (PARK et al., 2001; LAI et al., 2001; LAI et al., 2002a), vagy specifikus genetikai módosítás után (LAI et al., 2002b; DAI et al., 2002; RAMSOONDAR et al., 2003; SHARMA et al., 2003).

Sertésben a hatékony reprodukciós technikák fejlesztésére egyre nagyobb hangsúly helyeződik, mivel a transzgénikus sertés-előállítás napjainkban a kutatási fázisból mind inkább a felhasználás felé mozdult el. A sertés a humán betegségek kórlefolyásának jobb megértéséhez, valamint műtétek és szervátültetések tanulmányozásához használt gyógyászati modellállat volt évtizedeken keresztül. A reprodukciós technikák fejlesztése felgyorsította a sertés genomjának specifikus és nem specifikus megváltoztatását is. Háziállatok esetében a genetikai anyag specifikus, célzott módosítása kizárólag sejtmagátültetés segítségével érhető el. Bár a módszer hatékonysága rendkívül alacsony, a genetikailag módosított transzgénikus állatok számos gyógyászati és mezőgazdasági előnnyel kecsegtetnek. Felhasználhatók például orvosi szempontból fontos humán fehérjék termeltetésére, lehetővé válik többek között inzulin vagy interferon olcsó és nagyméretű előállítása. A módosított génállományú háziállatok sikerrel használhatók modellként különböző emberi betegségek tanulmányozására és hatékony kezelések kidolgozására. Számos betegség egérmodellje létezik már ugyan, de nyilvánvaló előnyökkel jár nagyobb méretű, az emberhez fiziológiailag közelebb álló állatok használata (PATTERSON et al., 2003).

A transzgénikus sertések ezen felül alapanyagot biztosíthatnak sejt-, szövet-, ill. szervátültetéshez is. A szervátültetés klinikai alkalmazása az egyik leginkább használt kezeléssé vált sok szervelégtelenség okozta betegség esetében. A United Network of

Organ Sharing (www.unos.org) kimutatása szerint csak az Egyesült Államokban több mint 90,000-en várnak szervre. A xenotranszplantáció (állati szervek emberbe történő beültetése) megoldást nyújthat erre a problémára. Meglepő módon a sertés a legalkalmasabb nem-humán szerv „forrás”. A legfontosabb szervek fiziológiája hasonló az emberéhez, a sertés könnyen szaporítható, az alomszám nagy, a vemhesség ideje viszonylag rövid, szerveinek mérete pedig közel megegyezik az emberével (MACHÁTY et al., 2002; PRATHER et al., 2003).

A sertés genetikai módosítása számos előnnyel kecsegtet a mezőgazdaság területén is. Ily módon lehetségessé válik a vágott test minőségének javítása és egészségesebb termék létrehozása, viszonylag rövid idő alatt nagyobb mennyiségű sertéshús előállítás válik lehetővé, bizonyos betegségek ellen rezistens állatok hozhatóak létre, csökkenteni lehet a vemhesség első periódusában bekövetkező embrió mortalitást, valamint a jelenlegi tartástechnológiába könnyebben beilleszhető állatok állíthatók elő (PATTERSON et al., 2003).

A sejtmagátültetési klónozás napjainkban széles körben alkalmazott módszerre fejlődött, azonban az intenzív kutatások ellenére is az eljárás hatékonysága csak 1-4%-ra tehető (LAI et PRATHER, 2003; PATTERSON et al., 2003; IM et al., 2004). A módszer hatékonyságának növelése céljából a technológia összes lépésének javítására szükség van. A petesejt mesterséges aktiválása az egyik kulcslépése a sejtmagátültetési klónozásnak, ami által az előállított petesejt fejlődési programja elindul a genetikai információ kicserélését követően. Számos tanulmány született napjainkig a sertéspetesejt parthenogenetikus aktiválásának témakörében. E publikációk nagy része különböző aktiválási technikák eredményességét értékeli oly módon, hogy azok milyen hatékonysággal képesek előidézni a pronukleuszok képződését vagy blasztociszták kifejlődését a tenyésztés során. A jelenleg használt módszerek nagy része korántsem nevezhető tökéletesnek elsősorban azért, mert azok nem képesek előidézni a sejtciklus szabályozásában fontos szerepet játszó fehérjék (MPF, MAPK) aktivitás-csökkenését, ami a későbbiekben alacsony embriófejlődésben nyilvánulhat meg.

A sejtmagátültetési klónozás alacsony hatékonyságához hozzájárulnak a szuboptimális embriótenyésztési körülmények is. Számos tenyésztőoldat került kifejlesztésre az elmúlt évtizedben, ezek hatékonyságának vizsgálata nem egyszer

egymásnak ellentmondó eredményeket adott. A tenyésztőmédium mellett az embrió-előállítás szerves része a légtér oxigén koncentrációja is; ezen oxigénszint hatásának vizsgálata ugyancsak hozzájárulhat egy pontosabban definiált rendszer megteremtéséhez.

Az európai élelmiszer-előállítás során nem alkalmazzák a klónozást, a klónozott állatokból származó termékek még nem kerültek be az európai élelmiszerláncba. Az elmúlt év végén az Amerikai Egyesült Államok Országos Élelmiszerbiztonsági és Gyógyszerészeti Hivatala által közzétett tanulmány szerint a klónozott szarvasmarhából, sertésből és kecskéből készült termékek ugyanolyan biztonságosak, mint a mindennapi élelmiszerek. A közlemény, melyet többnyire tudományos intézetek vizsgálati eredményei is alátámasztanak, nagy lépés afelé, hogy klónozott állatoktól származó élelmiszerek megjelenjenek a boltok polcain. Az öt éves kutatómunka eredményei alapján a klónozott állatok húsból előállított termékek gyakorlatilag megkülönböztethetetlenek a hagyományos farmergazdaságok termékeitől. Ezek alapján az Európai Bizottság is elérkezettnek látta az időt a terület felmérésére, és felkérte az Európai Élelmiszer Biztonsági Hatóságot a haszonállatok klónozásának jövőbeli hatásainak vizsgálatára. A vizsgálat egyértelmű célja, hogy Európa ne maradjon le az Egyesült Államoktól. Szakértők véleménye szerint a kereskedelmi célú állatklónozás széles körű felhasználása elkerülhetetlen, egyes becslések szerint a 2010-es évek vége előtt a klónozott állatokból származó termékek elérhetőek lesznek szupermarketekben. Jelenleg Magyarország gazdasági haszonállatok klónozására irányuló kutatást nem folytat, de a fent említett tények tükrében a versenyképesség megőrzése céljából elkerülhetetlenné válik, a konzervatívabb rétegek tiltakozása ellenére is. Szükséges tehát, hogy a szabályozások várható változása esetén az európai kutatók kezében is jól használható, korszerű módszerek álljanak rendelkezésre.

Hazánkban jelenleg több műhely is foglalkozik sertés biotechnológiai kutatásokkal. A Nyugat-Magyarországi Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Karának Állattudományi Intézetében különböző növekedési faktorok sertés petesejtek *in vitro* maturációjára gyakorolt hatását tanulmányozzák (BALI PAPP et al., 2005). Vizsgálják továbbá a petesejtek vitrifikációjának hatékonyságát és a vitrifikáció *in vitro* fertilizációs eredményekre gyakorolt hatását (VARGA et al., 2006). A herceghalmi Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet Szaporodásbiológiai Kutatócsoportja

kocasüldők nemi ciklusának endokrinológiai és morfológiai vizsgálatával (RÁTKY et al., 2005a; RÁTKY et al., 2005b), valamint a kocasüldők ivarzásélettanával és az ivarzásindukcióval (RÁTKY et al., 2003) kapcsolatos kutatásokat végez. A sejtmagátültetéses klónozás témakörében hazánkban a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban folynak kutatásokat egér fajban Dr. Dinnyés András vezetésével.

1. 2. Célkitűzések

A dolgozat elkészítésekor az alábbiakban megfogalmazott célokat tűztük ki:

- Különböző parthenogenetikus aktiválási módszerek *in vitro* érlelt sertés petesejtekre kifejtett hatásának vizsgálata;
- Különböző embrió-tenyésztési rendszerek parthenogenetikusán aktivált sertés petesejtek fejlődésére gyakorolt hatásának értékelése;
- A sejtciklus szabályozásában kulcsszerepet játszó két fehérje, az MPF (M-fázist elősegítő faktor) és MAPK (Mitogen-aktivált protein kináz) aktivitásváltozásának nyomon követése sertés petesejtekben különböző aktiválási módszerek alkalmazását követően.

A bemutatott kísérleteket témavezetőim segítségével terveztem meg és irányításuk alatt a Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum, Állattenyésztéstudományi Intézetében és a Purdue Egyetem (West Lafayette, Indiana, USA), Állati Tudományok Tanszékén kiviteleztem doktori tanulmányaim során 2003 és 2006 között.

„There is perhaps no phenomenon in the field of biology that touches so many fundamental questions as the union of the germ cells in the act of fertilization; in this supreme event all the strands of the webs of two lives are gathered in one knot, from which they diverge again and are re-woven in a new individual life-history.”

LILLIE, Problems of Fertilization, 1919

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2. 1. A petesejt érése

A legtöbb állatfajnál az éretlen petesejt termékenyíthető gamétává fejlődését nevezzük a petesejt érésének, amely magába foglalja a meiotikus sejciklus bizonyos pontján való megrekedést, mint a termékenyítésre való várakozást.

A termékenyülőképességet és az azt követő fejlődésre való alkalmasságot a petesejt hosszú növekedés és fejlődés után éri el. Emlős petesejtek és follikulusok fejlődése már magzati korban megindul. Az embrionális gonád a sertés embrióban 24-26 nappal a termékenyülés után figyelhető meg (BLACK et ERICSON, 1968). A csírasejtek mitotikus osztódása 13 nappal az embrionális élet kezdetétől a születés utáni 7. napig tart. A sejtek száma a 20. nap körüli mintegy 5,000-ról 1,100,000-re növekszik az 50. napra, ahol eléri maximumát. Ezután a mitotikus aktivitás megszűnik, számos csírasejtben nekrosis következik be. A meiózis a 40. nap körül kezdődik, és a születés utáni 35. napon minden oogónium az első meiózis profázisában van (HUNTER, 2000). A primordiális csírasejtek mitózissal osztódnak, majd a DNS szintézis fázisa következik, melynek során az oogóniumból elsődleges (primer) oocita lesz. Ezzel egy időben formálódik a primordiális follikulus (BYSKOV et al., 1977). A fejlődő ivarsejtek ezt követően belépnek a meiózisba (ERICKSON, 1966). Ez a jelenség általános állatok esetében. Az előrehaladás folyamatos a profázisban egészen a diplotén stádiumig, a sejciklus ezen fázisában az első meiotikus osztódás megreked (MOOR et al., 1990; FAIR, 2003). Ezt a fázist petesejtek esetében germinális vezikulum (GV) fázisnak nevezik (FUN et SUN, 2004), ebben az állapotban a petesejt éretlen, termékenyülésre alkalmatlan. A meiózis az ovulációt közvetlenül megelőzően indul újra, a petesejt maturációja során (KISHIMOTO, 2003). *In vivo* a meiózis újraindulása egy preovulációs gonadotropin hullámnak köszönhető; *in vitro* körülmények között az

újraindulást a petesejt áthelyezése indukálja a follikulusból a megfelelő tenyésztési környezetbe (PINCUS et ENZMANN, 1935).

A meiózis I újraindulása során a kromoszómák kondenzálódnak, a germinális vezikulum lebomlik (GVBD), a metafázis I orsó megjelenik majd az első sarkitest kilökődik. Ezt követően a petesejt azonnal belép a meiózis II-be, ahol az osztódás ismét megreked, ezúttal annak metafázisában (SUN et NAGAI, 2003). A sejtmagban és a citoplazmában a meiózis első profázisa és második metafázisa között fellépő változásokat összefoglaló néven maturációnak nevezzük, amely előfeltétele a monospermiás termékenyülésnek és a normális korai embrionális fejlődésnek (WEHREND et MEINECKE, 2001).

Fajonként változó, hogy a sejtciklus mely fázisában reked meg az érett petesejt: az érési blokk az első meiotikus profázisban figyelhető meg a *Spisula* kagyló, valamint a tengeri giliszta (*Urechis*) esetében, az első meiotikus metafázisban *Ascidiák* esetében, a második metafázisban a legtöbb gerinces esetében és az első mitózis G1 fázisában tengeri sünök esetében (STICKER, 1999). A sertés petesejtek fejlődését vázlatosan az 1. ábra mutatja be.



1. ábra. Sertés petesejtek fejlődése. A csírasejtek (oogóniumok) mitotikus osztódása magzati korban kezdődik, az első Graaf tüsző 5-6 hónapos korban, az első ovuláció idején jelenik meg. *Forrás: HUNTER, 2000 nyomán*

2. 2. Metafázist elősegítő faktor (MPF)

Az MPF-et elsőként MASUI et MARKERT (1971) írta le, a leopárdbéka (*Rana pipiens*) MII fázisában lévő petesejtek citoplazmájának „aktív” összetevőjeként, amely

képes maturáció indukálására nyugvó petesejtbe való injektáláskor. Az 1980-as évek végére az MPF-et egy szerin/treonin kinázként azonosították, a B-típusú ciklinek, mint regulátor alegység és a cdk1, mint egy 34-kDa tömegű katalitikus alegység komplexeként; ez utóbbi alegység homológ az élesztő cdc2 gén termékével (DUNPHY et al., 1988; LOHKA et al., 1998; MASUI, 2001). Ma általánosan elfogadott, hogy az MPF vezeti a sejtet (testi- és ivarsejteket egyaránt) a mitózis ill. meiózisba, ez a szabályozás élesztőktől az emberig általános (NURSE, 1990).

A növekedési fázison már átesett, de még éretlen petesejt már tartalmaz egy elő-MPF-nek (pre-MPF) nevezett komplexet. Az elő-MPF-ben a cdc2 inaktív állapotban van a treonin 14 és a tirozin 15 foszforilált állapota miatt (GAUTIER et al., 1989; GAUTIER et MALLER, 1991a).

A sejtciklus a G₂/M fázisok határán az eukarióták legtöbb testi sejtjében a következőképpen zajlik. A cdc2/ciklin B inaktív formájában a cdc2 foszforilálva van a treonin (Thr) 14, a tirozine (Tyr) 15 és a treonin (Thr) 161 pontokon. Az inaktív komplex közvetlen aktivátora a Cdc25C, amely defoszforilálja a cdc2-t a Thr14 és a Tyr15 pozíciókban. A komplexet a Wee1 és a Myt1 enzimek képesek inaktíválni azáltal, hogy foszforilálják a cdc2-t a fentebb említett (Thr14-es és Tyr15-ös) pontokon (PALMER et NEBREDÁ, 2000). Az egyensúly az aktivátorok és inaktivátorok között a ciklin B és cdc2 inaktivátorai felé lejt a G₂ fázis során. A sejtciklus M fázisába való belépéskor az egyensúly átbillen az ellenkező oldalra, elindítva a cdc2/ciklin B aktivációját, így csak a cdc2 Thr161 része marad foszforilált. *In vivo* nem tisztázott mi billenti az egyensúlyt a másik oldalra, *in vitro* a Cdc25C hozzáadása önmagában is képes átalakítani az inaktív formát aktívvá (KISHIMOTO, 1999).

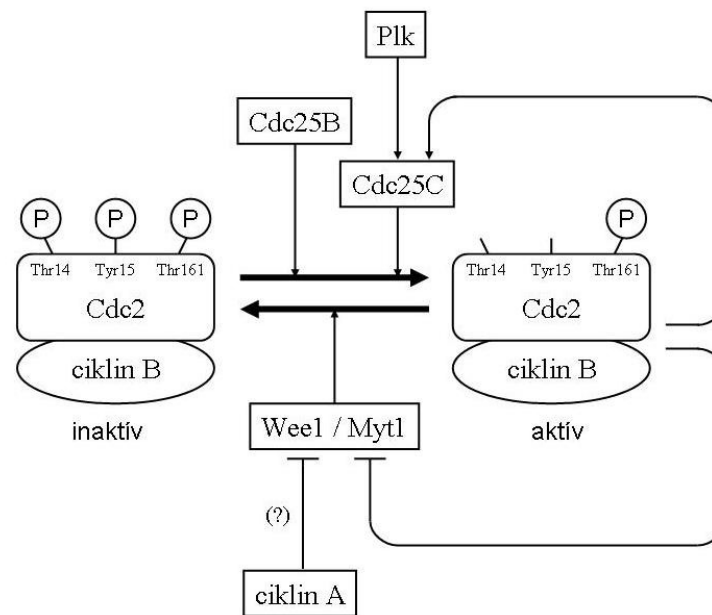
Testi sejtekben két lehetséges jelölt van, melynek szerepe lehet az egyensúly átbillentésében, a Cdc25B (BALDINI et al., 1997; GABRIELLI et al., 1997), valamint a polo-szerű kináz (Plk) (GLOVER et al., 1998; NIGG, 1998).

Emlősökben a Cdc25 kinázcsalád három tagjának, a Cdc25A, a Cdc25B és a Cdc25C-nek van hatása a ciklin/Cdk komplexekre. Míg a Cdc25A az S fázisba való belépést segíti a cdc2/ciklin A és cdc2/ciklin E aktiválásával, a Cdc25B és a Cdc25C a mitózis elindításában játszik szerepet. A Cdc25C a felelős foszfatáz a cdc2/ciklin B

aktiválásáért, a cdc2 gátló részeinek, a Thr14 és a Tyr15 defoszforilálásáért (SMITH et MEDEMA, 2001).

A Polo-szerű kinázok (Polo-like kinase – Plk) döntő szerepet játszanak a mitotikus osztódáskor. Az első kináz ebben a családban a *Drosophila* polo volt, azóta homológjait számos más eukariótánál is azonosították. Ilyenek a Plo1 és a Cdc5 élesztőknél, xPlk1 (vagy Plx1) *Xenopus*-oknál és Plk1, Snk, Fnk/Prk emlősöknél, ahol a Plk1 mutat leginkább hasonlóságot a *Drosophila* polo-hoz (GLOVER et al., 1998; NIGG, 1998). Mindegyik „családtag” rendelkezik egy azonos régióval a nem-katalitikus terület C-végén, melyet „polo box”-nak nevezünk, és szerepet játszik a mitotikus funkciókban. A *Xenopus* polo család egy tagja, a xPlk1 (Plx1) a felelős a Cdc25C aktiválásáért; az xPlk1 pedig a *Xenopus* polo-like kináz kináz, az xPlk1 által aktiválódik (KUMAGAI et DUNPHY, 1996; ABRIEU et al., 1998; PALMER et NEBRED, 2000). A Plk1 szerepét az MPF aktiválódásában emlősök esetében is kimutatták (YAO et al., 2003), de pontos szerepének tisztázásához további kutatások szükségesek (SMITH et MEDEMA, 2001; FAN et SUN, 2004).

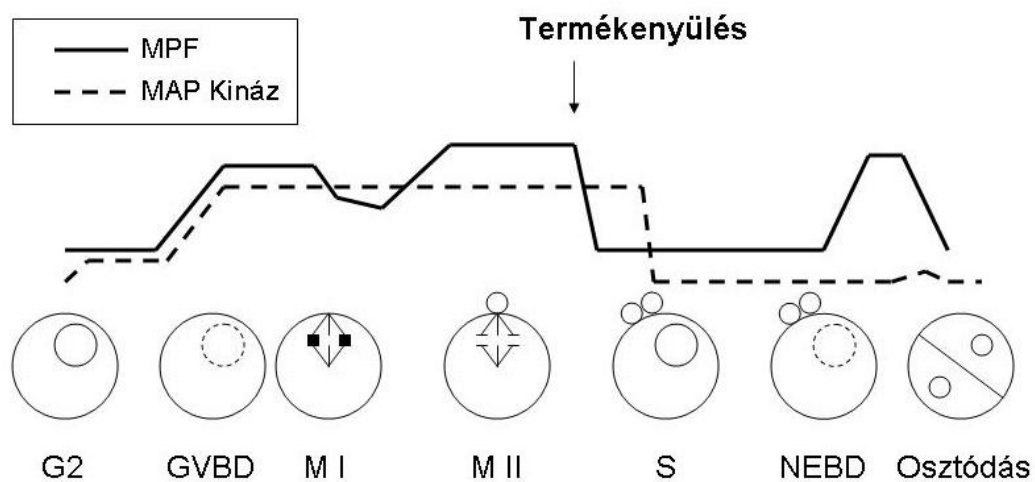
Petesejtekben az MPF aktiválódása progeszteron (PG) hatására következik be, melynek során az elő-MPF MPF-é alakul (DUNPHY et KUMAGAI, 1991; GAUTIER et al., 1991b). A G₂ fázis végén a Cdc25B mennyiségének növekedése és/vagy a Cdc25C Plk-függő foszforilációja a kezdeti cdc2/cyclin B aktiválódását eredményezheti. Ezek után egy pozitív feedback mechanizmus a felelős az ezt követő gyors MPF aktiválódásért (COLEMAN et DUNPHY, 1994; GLOVER et al., 1998). Az egyik oldalról az aktív cdc2/cyclin B stimulálja a Plk-t és ezáltal a Cdc25C-t, míg a másik oldalról gátolja a Wee1 és Myt1 enzimeket (auto-amplification loop of MPF). Ezen szabályozások többnyire foszforiláció függőek, azonban a Wee1 részleges degradációja is szerepet játszhat (MICHAEL et NEWPORT, 1998). Nem zárható ki továbbá, hogy az MPF aktiválódásában a G₂/M-fázis határán már aktív ciklin A/cdc2 komplex is szerepet játszik testi sejtekben, a Wee1 és Myt1 kinázok gátlása révén (DEVAULT et al., 1992). Az MPF aktiválódását a 2. ábra szemlélteti.



2. ábra. Az MPF aktiválódásának modellje. A G_2 fázis végén a Cdc25C-függő aktiválódás és a Wee1/Myt1-függő inaktiválódás a cdc2/ciklin B inaktiválódása felé lejt. A M-fázisba való belépéskor ez a cdc2/ciklin B aktiválódása felé tolódik el, valószínűleg a Cdc25B és/vagy a Plk-függő mechanizmus hatására. A Wee1 részleges lebomlása és/vagy a Wee1/Myt1 ciklin A-függő gátlása ugyancsak hozzájárul a kezdeti cdc2/ciklin B aktiválódáshoz. Az aktív cdc2/ciklin B ezután stimulálja a Cdc25C-t valamint gátolja a Wee1/Myt1-et, elősegítve a cdc2/ciklin B további gyors aktiválódását. *Forrás: KISHIMOTO, 1999 nyomán*

A meiózist az MPF aktivitás meghatározott hullámszerűsége irányítja (HASHIMOTO et KISHIMOTO, 1988; FULKA Jr. et al., 1992; MOTLIK et al., 1998, NURSE, 1990). Az MPF aktivitása közvetlenül a GVBD előtt megnövekszik, és magas marad az első meiózis M-fázisában, az első a homológ kromoszómák szegregációja előtt. Az első meiotikus orsó kialakulásakor egy átmeneti MPF inaktiválódás figyelhető meg, mely szükséges a homológ kromoszómák különválásához (JONES, 2004). Az MPF részleges inaktiválódását és az első metafázisból való kilépést a ciklin B szintjének 50% körüli degradációja okozza. Ennek eredményeképpen a sejt továbblép anafázisba, és az első sarkit test kilökődik (BRUNET et al., 2003; HASHIMOTO et KISHIMOTO, 1988; JONES, 2004). A meiózis I befejezése után a ciklin B szintézise ismét megnövekszik, a petesejt a meiózis második szakaszába lép (LEDAN et al., 2001; TAIEB et al., 2001).

A visszatérő magas MPF aktivitás hatására kialakul a második meiotikus orsó, majd ebben a fázisban, a meiózis második metafázisában (MII) a petesejt megreked (HAMPL et EPPIG, 1995; HASHIMOTO et KISHIMOTO, 1988; VERLHAC et al., 1996). A petesejt termékenyülése, vagy parthenogenetikus aktiválása után az MPF kalcium (Ca^{2+})-függő inaktiválódása figyelhető meg, ami előfeltétele a metafázis-anafázis átmenetnek (NIXON et al., 2002; HYSLOP et al., 2004). A metafázis I és II-ből való kilépés egyaránt az aktív MPF szint csökkenésével jár együtt, ami jelzi, hogy a sejtciklus zavartalan továbbhaladásához az MPF periodikus inaktiválódása szükséges (NURSE, 1990). Az MPF aktivitásának változását *Xenopus*-ok esetében a 3. ábra mutatja.



3. ábra. Az MPF és MAPK aktivitásának változása *Xenopus* petesejtekben a meiózis során. Az MPF és a MAPK a GVBD körül aktiválódik. Az MPF aktivitása lecsökken a két meiózis közötti átmenet idején, a MAPK aktivitása ezzel szemben magas marad a meiózis alatt. Az MPF aktivitása röviddel a termékenyülés vagy parthenogenetikus aktiválás után lecsökken, a MAPK inaktiválódása viszont csak 6-8 órával ezt követően következik be, a pronukleusz-képződés előtt. *Forrás: ABRIEU et al., 2001 nyomán*

2. 3. A citostatikus faktor (CSF) és alkotói

2. 3. 1. A Mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) kaszkád

A már említett YOSIO MASUI és CLEMENT MARKERT (1971) által írt történelmi jelentőségű publikáció beszámolt arról a jelenségről is, hogy az MII fázisú béka (*Rana pipiens*) petesejt citoplazmájának egy kétsejtes embrió egyik blasztomérájába való mikroinjektálása az osztódás leállítását okozza, míg a nem injektált blasztoméra tovább folytatja osztódását. Megfigyelték, hogy az injektált blasztoméra „mitotikus apparátus”-a metafázisban megrekedt. Kontrollként éretlen petesejt, valamint korai embrió citoplazmáját injektáltak blasztomérákba, de azok nem okozták az osztódás leállítását. Ez a megfigyelés vezetett ahhoz a feltevéshez, mely szerint „specifikus citoplazmikus faktor vagy faktorok a felelősek a meiózis és a mitózis gátlásáért”. A feltételezett citoplazma összetevő a későbbiekben a citostatikus faktor (cytostatic factor, CSF) elnevezést kapta. A CSF a definíció szerint nem egy molekula vagy fehérje, annál inkább egy aktivitás megnevezésére szolgál. A békapetesejt citostatikus faktorának tulajdonágait MASUI et MARKERT (1971) a következőképpen foglalta össze: progeszteron hatás eredményeként jelentkezik a petesejtben, metafázisban megrekedést okoz, hatása fennmarad a petesejt aktiválódásáig, valamint termékenyülés vagy mesterséges aktiválás után a sejtciklust gátló hatása megszűnik az osztódás megindulását eredményezve.

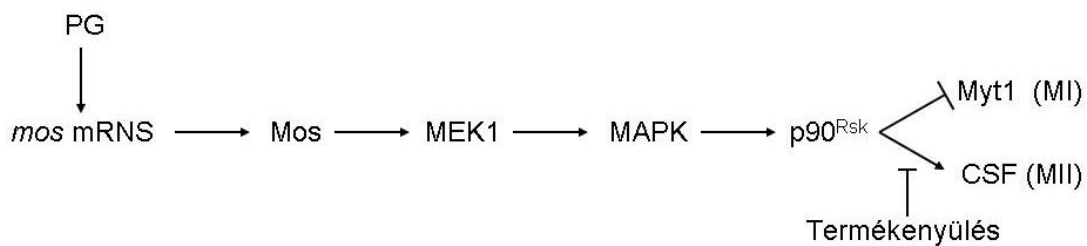
Az emlősök esetében leírtakhoz hasonlóan, a növekedési fázison átesett, éretlen béka petesejt a meiózis I G₂/M átmenetnél megrekedt állapotban van. A petefészekben a szomszédos follikulusok progeszteron (PG) szekréciójának, vagy a progeszteron *in vitro* maturáció alatti hozzáadásának hatására a petesejt belép a meiózis I-be, és megkezdődik maturációja (TUNQUIST et MALLER, 2003).

A CSF legfontosabb összetevője a Mos fehérje (SAGATA, 1989), melynek szintézise 30 perccel a PG kezelés után kezdődik a maternális *mos* mRNS poliadenilációja, majd transzlációja eredményeképpen (SAGATA et al., 1988). A Mos küszöbérték feletti felhalmozódása a MAPK kaszkád aktiválását okozza (NEBREDÁ et HUNT, 1993). A Mos fehérje MAPK kináz kinázként (MEKK) funkcionál, a MAPK kináz (MEK1) aktivációját okozza, annak szerin 218-as és szerin 222-es végeinek foszforilációjával

(NEBREDA et HUNT, 1993; POSADA et al., 1993; HUANG et al., 1995). A MEK1-et a MAPK aktivátoraként azonosították *Xenopus* petesejtek maturációja során. A MEK1 a MAPK-t annak treonin 183 és tirozin 185-ös végeinek foszforilációjával aktiválja (CREWS et ERIKSON, 1992). A MAPK, melyet más néven ERK-nak (extracellular-regulated kinase) is neveznek, a szerin/treonin protein kináz család tagja. Két izoformája, az ERK1 és ERK2 fejeződik ki emlősökben (SUN et al., 1999a). A MAPK legismertebb szubsztrátja egy 90-kD nagyságú protein kináz, a $p90^{\text{Rsk}}$ (riboszóma S6 kináz) (STURGILL et al., 1988). A MAPK mindkét izoformája (ERK1 és 2) képes a $p90^{\text{Rsk}}$ -t aktiválni *in vivo* és *in vitro* körülmények között egyaránt a szerin 369 és a treonin 577-es végek foszforilációjával (DALBY et al., 1998).

A CSF hatása a Mos/MEK1/MAPK/ $p90^{\text{Rsk}}$ kaszkádon keresztül érvényesül. Béka petesejtek esetében kimutatták, hogy a kaszkád minden tagja a PG által indukált petesejtérés során szintetizálódik, vagy aktiválódik. Bármelyik tag aktív formája egyedül is elegendő a petesejt érésének indukálásához. A CSF okozta metafázis megrekedés létrejötté az egyes kinázok aktiválódásától függ, ami a kaszkádban előtte lévő elem aktiválódásának eredménye. A Mos protein lebomlik, a mos mRNS deadenilálódik termékenyülés vagy mesterséges aktiváció után, a MAPK kaszkád ezzel inaktiválódik. A MEK1, a MAPK és a $p90^{\text{Rsk}}$ nem bomlik le és a transzlációjuk sem gátolt, inaktiválódásuk defoszforilációjuk által következik be a termékenyülés vagy aktiváció kiváltotta Ca^{2+} szint emelkedés hatására (TUNQUIST et MALLER, 2003).

A $p90^{\text{Rsk}}$ a cdc2-re gátlóan ható Myt1 foszforilációját, és ezáltal inaktiválódását okozza (NEBREDA et FERBY, 2000). A MAPK kaszkád a Myt1 gátlásával elősegíti a Cdc25 általi MPF aktivációt és a MI-be való belépést (PALMER et al., 1998). A meiózis során a petesejtekben két egymást követő osztódás zajlik le S fázis nélkül, ami végül haploid csírasejtet eredményez. Az MPF aktivitása leesik ugyan a két meiotikus osztódás közötti átmenet idején, de eközben a MAPK aktivitása magas marad. A megmaradó MAPK aktivitás szükséges a DNS replikáció elkerülése céljából (SAGATA, 1997; FUN et SUN, 2004). A MAPK kaszkád aktiválódását a 4. ábra szemlélteti.



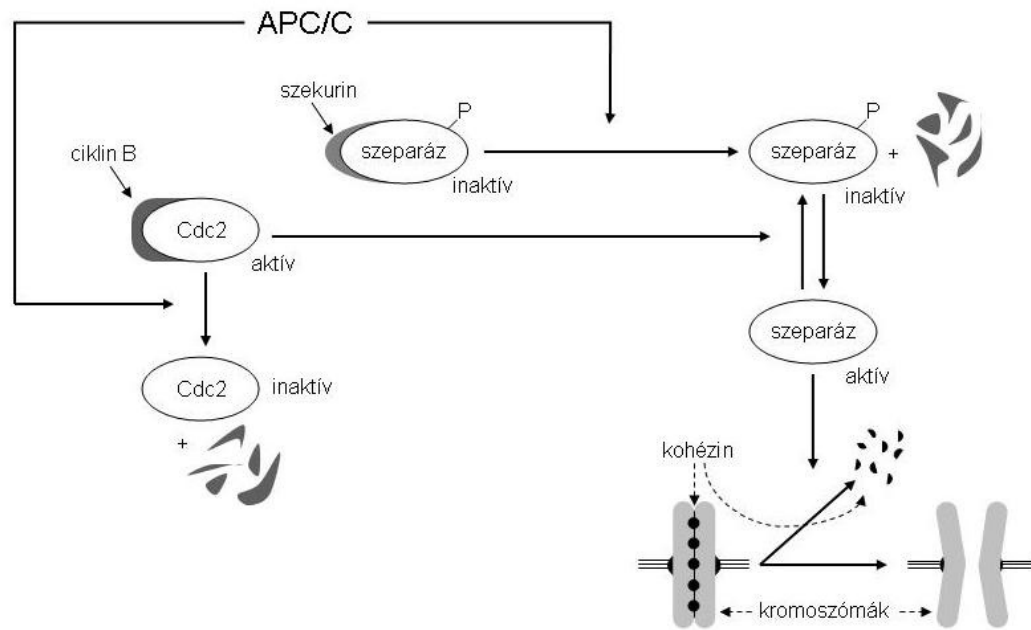
4. ábra. A MAPK aktiválódásának folyamata. Az éretlen béka petesejtben a progeszteron stimulációja vezet a Mos (MEKK) szintéziséhez maternális *mos* mRNS-ből. A Mos aktiválja a MAPK kinázt (MEK1), mely aztán aktiválja a MAPK-t, ami a szerin/treonin protein kináz p90^{Rsk} aktiválódásához vezet. A MAPK kaszkád a meiózis I során a Myt1 gátlásával hozzájárul az MPF általi petesejteréshez, valamint a későbbiekben a CSF okozta metafázis megrekedéshez. *Forrás: TUNQUIST et MALLER, 2003 nyomán*

A testi sejtek sejtciklusa ún. „ellenőrzőpontok”-at foglal magába, ami az S fázisban biztosítja a genom teljes replikációját és az azt követő M fázisban a kromoszómák egyenlő szegregációját. A magorsó kialakulás ellenőrzőpontja (spindle assembly checkpoint - SAC) megállítja a sejtet a mitózis metafázisában, amíg a kromoszómák a metafázis lemezen sorbarendeződnek és a kromatidák centromérái kapcsolódnak a magorsó mikrotubulusaihoz a kinetokor-on keresztül (BURKE, 2000). Ha a magorsó hibátlanul kialakul, az ellenőrzőponton a sejtciklus megrekedése megszűnik, a sejt anafázisba lép, majd a sejtosztódás eredményeképpen két azonos utódsejt keletkezik (TUNQUIST et MALLER, 2003). Gerincesek és gerinctelenek esetében egyaránt a meiotikus osztódás asszimmetrikus, eredményeképpen egy viszonylag nagy petesejt és egy kisebb sarkitest keletkezik. Az utódsejtek méretbeli különbségét a magorsó citokinézist megelőző asszimmetrikus elhelyeződése eredményezi. Kísérletek bizonyítják, hogy a Mos/MAPK kaszkád felelős a magorsó és a kromoszómák szabályos morfológiájáért. A jelenség pontos mechanizmusa azonban napjainkig ismeretlen (FUN et SUN, 2004).

A SAC a metafázisban való megrekedést a szabályozó fehérjék lebomlásának gátlásával tartja fenn. A kohézin nevű fehérje-komplex a testvérkromoszómákat tartja

össze a mitózis és a meiózis alatt, az anafázisba való belépés során lebomlik, ezzel lehetővé téve a testvérkromoszómák szegregációját (TUNQUIST et MALLER, 2003). A kohézin egyik alegységét, az Scc1-et a szeparáz nevű cisztein proteáz bontja le a korai anafázisban, ezzel lehasítva a kohézin a kromoszómákról (ULHMANN, 2004). A szeparáz a szekurin direkt kötődése által tartja inaktív állapotban az anafázis kezdetéig. Kimutatták továbbá, hogy a cdc2 magas aktivitása is gátolja a testvérkromoszómák szegregációját a szeparáz gátló foszforilálásával. A SAC védi a cdc2-t az ubiquitinizációtól, valamint a szekurin és a ciklin B lebomlását a metafázis megkezdés alatt (PETERS, 2002; TUNQUIST et MALLER, 2003; JONES, 2004; PINES, 2006). Az ubiquitinizáció során lebontásra ítélt fehérjékhez ubiquitin molekulalánc kapcsolódik. Az ubiquitinnel megjelölt fehérjék enzimatis bontását aztán egy multikatalitikus proteáz komplex, a 26 S proteasóma komplex végzi kis, átlagban 8 aminosav hosszúságú peptidekké, miközben szabad, „újrahasznosítható” ubiquitin szabadul fel (HUO et al., 2004). A vázolt ubiquitin-proteasóma rendszer (ubiquitin-proteasome system – UPS) hatékonyan és gyorsan képes elbontani a sejtciklusban fontos szerepet játszó fehérjéket, és mivel a proteasóma a sejtciklus folyamán végig aktív állapotban van, a szubsztrát szelekció az ubiquitinizáció helyének és idejének függvénye (PINES, 2006).

A SAC végső célpontja az anafázist elősegítő komplex/cikloszóma (APC/C). Az APC/C holoenzim E3 ubiquitin ligázként működik, többek között a ciklin B és a szekurin ubiquitinizációját végzi az anafázisba való belépést elősegítve. Az APC/C egy legalább 11 alegységből álló, nagy molekulatömegű komplex. Ubiquitinizációs aktivitását a Cdc20-hoz és/vagy a Cdh1-hez való kötődése után nyeri el (PETERS, 2002). A Cdc20 szükséges az APC/C ubiquitinizációs aktivitásának eléréséhez mitotikus és meiotikus sejtciklusban, míg a Cdh1 az APC/C aktivitását a késői mitózisban és a G1 fázisban segíti elő. A Cdc20 és a Cdh1 kötődése nemcsak aktiválja a APC/C általi ubiquitinizációt, de szabályozza az APC/C szubsztrát-specifikusságát is (TUNQUIST et MALLER, 2003; PINES, 2006). Az APC/C komplex működését vázlatosan az 5. ábra szemlélteti.



5. ábra. Az APC/C komplex működése. Az APC/C aktiválja a szeparáz proteázt a szekurin lebomlása által. Az aktív szeparáz szétválasztja a testvérkromoszómákat egymástól a kohézin komplexek bontásával. Az APC/C ugyancsak előidézi a szeparáz aktiválódását a ciklin B és egyéb mitotikus ciklinek lebomlásán keresztül. A ciklin B lebomlása inaktíválja cdc2-t, ami elősegíti a gátló foszfát maradékok eltávolítását a szeparázzal. *Forrás: PETERS, 2002 nyomán*

A SAC számos fehérje komplexe. A *mad1*, *mad2* és *mad3* (mitotic arrest defective), valamint a *bub1*, *bub2* és a *bub3* (budding uninhibited by benzimidazole), továbbá az *mps1* (monopolar spindle 1) gének termékeit találták fontosnak a metafázis megkezdésének előidézésében. A Mad1, Mad2, Mad3, BubR1, Bub2, Bub3 és az Mps1 proteinek konzerválódtak gerincesekben, amelyek a SAC aktiválódásáért felelősek. *Xenopus*-ban a Mos/MEK1/MAPK/p90^{Rsk} kaszkád a metafázisban való megkezdést az xBub1 aktiválásával éri el (SCHWAB et al., 2001). Az xBub1 a Mad1/2 aktiválódását okozza, míg a Mad1 feladata a Mad2 Cdc20-hoz való kötődésének elősegítése (TUNQUIST et al., 2003). A Mad2, vagy Mad3/BubR1 a Cdc20-hoz, vagy Chd1-hez kötődve gátolják az APC/C általi ciklin, szekurin és egyéb fehérjék poliubiquitinizációját (TUNQUIST et MALLER, 2003).

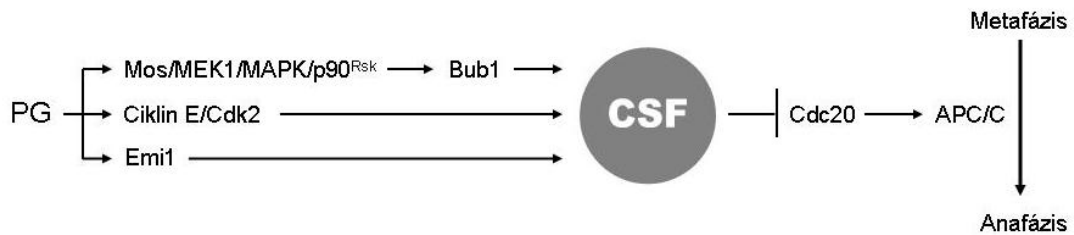
2. 3. 2. A ciklin E/cdk2

Fontos kérdés, hogy a sejtciklus CSF által előidézett megrekedése miért csak MII fázisban történik, és MI fázisban miért nem. Minden ismert megrekedést okozó fehérje (Mos/MEK/MAPK/p90Rsk/Bub1) már az MI fázisban is rendelkezésre áll, és nélkülözhetetlen a meiotikus osztódás közötti S fázis gátlásáért. Egy lehetséges magyarázat az, hogy a második metafázisban egy másik kaszkád tűnik fel, mely ugyancsak közrejátszik a sejtciklus megrekedésében. A ciklin E/cdk2 képes metafázis megrekedést okozni a meiózis második ciklusában. Ez a megrekedés metafázisban történik, amit a maximális hiszton H1 kináz aktivitás, maximális ciklin B szint, kondenzált kromoszóma-morfológia és a metafázisban megrekedt magorsó jelez (TUNQUIST et al., 2002). Tehát a CSF általi metafázis megrekedéshez a Mos/MEK/MAPK/p90Rsk/xBub1 kaszkád mellett a ciklin E/Cdk2 aktivitás is hozzájárul (TUNQUIST et al., 2002; TUNQUIST et MALLER, 2003).

2. 3. 3. Az *Emi1*

Gerincesek testi sejtjeiben az *Emi1* (early mitotic inhibitor 1) az S fázisban szintetizálódik, majd kötődik és ezzel inaktiválja az APC/C aktivátorát, a Cdc20-at G₂ és korai profázisban, ezzel elősegítve az MPF aktiválódását a mitotikus ciklinek felhalmozódásán keresztül a sejtben. A mitózis későbbi szakaszában (késői profázis) aztán lebomlik, valószínűleg ubiquitin-függő degradáció útján, lehetővé téve ezáltal az APC/C komplex aktiválódását (JONES, 2005; PINES, 2006; SCHMIDT et al., 2006).

Mivel az *Emi1* képes az APC/C komplex gátlására, jó jelöltnek tűnik, mint a CSF általi megrekedés egyik alkotója. Az *Emi1* kétsejtes embrió egyik sejtjébe injektálva az osztódás leállítását eredményezi magas cdc2 aktivitás mellett, valamint az *Emi1* specifikus antitest az APC/C aktivációját okozza Ca²⁺ oszcilláció hiányában is (SCHMIDT et al., 2006). A CSF által okozott fejlődési blokk szabályozását vázlatosan a 6. ábrán mutatjuk be.



6. ábra. A CSF által előidézett sejtciklus-megrekedés összetevői. A progeszteron éretlen béka petesejtekben a MAPK kaszkád aktiválódását okozza meiózis I-ben, és a ciklin E/Cdk2-ét meiózis II-ben. Az aktív MAPK kaszkád a Bub1-en keresztül, a ciklin B/Cdk2 aktivitása az APC/C gátlása révén járul hozzá a CSF általi megrekedés létrejöttéért. Az Emi1 a Cdc20 gátlásán keresztül a CSF általi megrekedés fenntartását segíti elő. *Forrás: TUNQUIST et al, 2002; TUNQUIST et MALLER, 2003 nyomán*

2. 4. A megtermékenyülés

Az emlős petesejtek - a kutya kivételével, ahol az érett petesejtek a meiózis első profázisában maradnak - ovulációkor a meiózis második metafázisában (MII) rekednek meg (ALBERIO et al., 2001). Természetes körülmények között ezalól a gátlás alól a petesejt a megtermékenyüléskor szabadul fel, ami után megindul az embrionális fejlődés. A megtermékenyülés az a folyamat, melynek során két differenciálódott haploid ivarsejt – a spermium és a petesejt – egyesül, és egy új organizmus jön létre, mely genetikailag mindkét szülőtől származik. Megtermékenyüléskor a petesejt aktiválódik, mely jelenség nagyszámú, jól meghatározott morfológiai és biokémiai végpontot foglal magába, néhányuk másodpercekkel, percekkel, míg megint mások több órával a spermium-petesejtmembrán kölcsönhatása után következik be. Lezajlik a kortikális reakció, a meiózis újraindul, a második sarki test kizáródik, megtörténik a pronukleuszok képződése, bekövetkezik a DNS replikáció és az első mitotikus osztódás (KOPF et al., 1989; SCHULTZ et KOPF, 1995).

Az ivarsejtek egyesülése után megfigyelhető egyik legkorábbi jelenség az intracelluláris szabad Ca^{2+} szint ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) növekedése, mely általános kísérő jelensége az aktiválódásnak. Ezt a vizsgált összes állat-, és növényfaj esetében megfigyelték (RUNFT et al., 2002), parameterei azonban az egyes fajok között jelentős eltéréseket mutatnak (KUOKAWA et al., 2004).

A Ca^{2+} szerepének fontosságát a petesejt aktiváció során az 1920-as, 30-as években fedezték fel. Különböző tengeri állatok petesejtjeit aktiválták Ca^{2+} -mal dúsított oldatok használatával, vagy plazmamembrán roncsolás útján Ca^{2+} -ot tartalmazó médiumokban. Ezek a felfedezések vezettek aztán a „ Ca^{2+} aktiváció elméletéhez” (JAFFE, 1985), mely szerint a Ca^{2+} beáramlás az embrionális fejlődés beindításához vezet. A hipotézis azonban bizonyítást csak mintegy 40 évvel később nyert. STEINDHARDT et al. (1974) figyelte meg, hogy Ca^{2+} ionofór A23187 képes aktiválni tengeri sünn, tengeri csillag, varangy és hörcsög petesejtet.

A Ca^{2+} oszcilláció jelenségét először hörcsög esetében írták le. Hörcsögben a kezdeti $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés a spermium behatolás helyéről indul, mely az ezt követő egy vagy két $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedéshez hasonlóan hullámszerűen terjed szét a petesejtben (MYAZAKI et al., 1986; JAFFE, 1983; WHITAKER et SWANN, 1993). A további $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedések azonban már nem hullámszerűen terjednek, ezek esetében a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változása az egész citoplazmában egyszerre történik. Hasonló jelenséget figyeltek meg egér (CUTHBERTSON et COBBOLD, 1985; KLINE et KLINE, 1992), patkány (BEN-YOSEF et al., 1993), nyúl (FISSORE et ROBL, 1993), szarvasmarha (FISSORE et al., 1992; SUN et al., 1994) és sertés (SUN et al., 1992; MACHÁTY et al., 1997) esetében is. Ellentétben az emlősökkel, a tengeri sünnök és a béka (*Xenopus*) fajok esetében a spermium behatolása egyszeri Ca^{2+} hullámot hoz létre (KUOKAWA et al., 2004). Emlősöknél a spermium által indukált hosszan tartó Ca^{2+} oszcilláció a termékenyülés kísérő jelensége (JONES, 1998), frekvenciája, amplitúdója, hossza a későbbi fejlődés szempontjából is fontos információkat is kódol (VITULLO et OZIL, 1992; BERRIDGE, 1993).

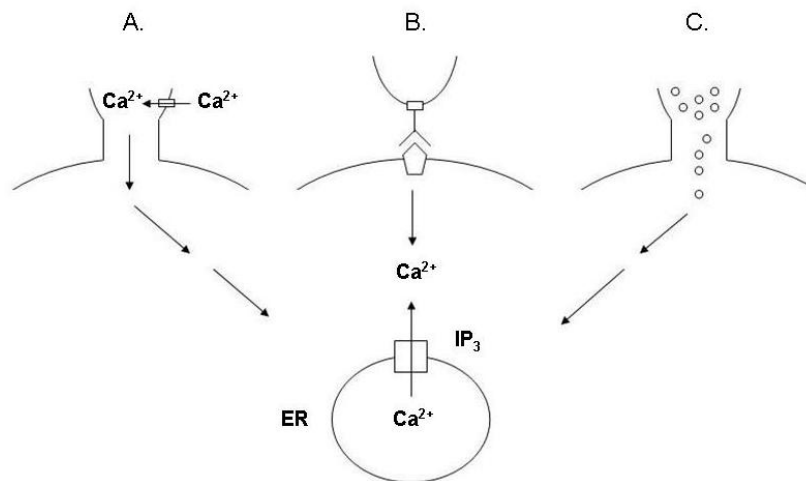
A megnövekedett Ca^{2+} mennyiség az intracelluláris raktárakból származik, elsődlegesen a sima endoplazmatikus retikulumból (ER) (MACHÁTY et al., 1997; KUOKAWA et al., 2004; WHITAKER, 2006). A raktárakban a Ca^{2+} kötőfehérjékhez (*calsequestrin* és a *calreticulin*) kapcsolódva tárolódik. A tárolt Ca^{2+} mobilizációját kétféle Ca^{2+} csatorna irányítja: az inozitol 1,4,5-trifoszfát receptorok (IP_3R) és a ryanodine receptorok. Ezek a receptorok az endoplazmatikus reticulumon helyezkednek el és Ca^{2+} kieresztő csatornaként is funkcionálnak: a megfelelő ligandumok receptorhoz kötődése esetén a csatornák kinyílnak, mely Ca^{2+} felszabadulást eredményez (MACHÁTY et al., 1997).

A $[Ca^{2+}]_i$ felszabadulás általános jelentőségével ellentétben a szignál transzdukciós mechanizmus, - ami által a spermium kiváltja a $[Ca^{2+}]_i$ növekedést - sokáig nem volt tisztázott egyetlen faj esetében sem. Három (KUOKAWA et al., 2004), egyes szerzők szerint két (ANTHONY et al., 2000; SANTELLA et al., 2004; JONES, 2005) általánosan elfogadott hipotézis létezik a mechanizmus magyarázatára.

Az első az ún. „csatorna” hipotézis (7/A ábra), amely feltételezi, hogy a termékenyítő spermium szállít Ca^{2+} -ot a petesejtbe a gaméták egyesülésekor, így stimulálva oszcillációt. Ilyenkor az extracelluláris Ca^{2+} a plazma membrán Ca^{2+} csatornáin keresztül lép be a spermiumba, majd onnan diffundál a petesejtbe (KUOKAWA et al., 2004; RUNFT et al., 2002). Ennek ellentmond, hogy a termékenyülés kiváltotta $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés Ca^{2+} mentes médiumban is bekövetkezik (JONES et al., 1998), valamint, hogy önmagában a Ca^{2+} injektálás a petesejtbe nem elegendő az oszcillációhoz (SWANN et OZIL, 1994).

A második, a „receptor” hipotézis (7/B ábra), mely szerint a spermium egy, a petesejt plazmamembránján lévő receptorhoz kötődik, és ez vezet a Ca^{2+} oszcillációhoz. Napjainkig azonban sem a petesejt felületén lévő receptort, sem a spermium ligandot nem sikerült azonosítani, amely a petesejt aktiválásában szerepet játszana (EVANS et KOPF, 1998).

A harmadik a „fúziós” hipotézis (7/C ábra). Itt a plazma membránok fúzióját követően egy anyag, az ún. spermium faktor (sperm factor - SF) a termékenyítő spermiumból az ooplazmába diffundál és $[Ca^{2+}]_i$ oszcillációt okoz. Ezt alátámasztja, hogy a spermium-petesejt fúziója szükséges a $[Ca^{2+}]_i$ oszcilláció kiváltásához, valamint spermium kivonat (de más szövet kivonata nem) képes előidézni az oszcillációt (JONES et al., 2000). Ez utóbbi a jelenleg legelfogadottabb hipotézis (MYAZAKI et ITO, 2006). A Ca^{2+} oszcilláció kialakulásáról alkotott különféle hipotéziseket a 7. ábra foglalja össze.



7. ábra. A Ca^{2+} oszcilláció kialakulásának különböző magyarázatai. A „csatorna” hipotézis (A.), mely során a spermium szállít Ca^{2+} -ot a petesejtbe; a „receptor” hipotézis (B.), mely szerint a spermium a petesejt plazmamembránján lévő receptorhoz kötődik, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oszcillációt idézve elő; a „fúziós” hipotézis (C.) szerint a membránok fúzióját követően az ún. spermium faktor idézi elő a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oszcillációt. *Forrás: RUNFT et al., 2002; KUOKAWA et al., 2004 nyomán*

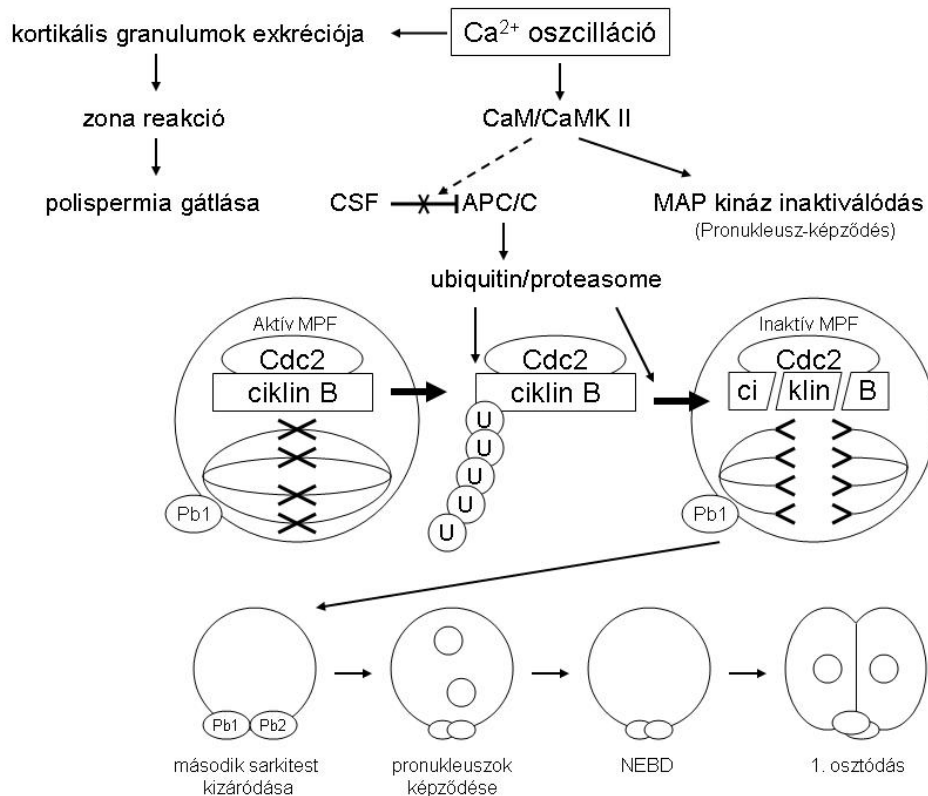
A nagy áttörést ezen a téren az jelentette, amikor felfedezték, hogy az egér spermiumok tartalmaznak egy foszfolipáz C izoformát, a foszfolipáz C ζ -át (PLC ζ [zeta]), melyből elegendő mennyiség van jelen a spermiumban a Ca^{2+} szint emelkedés kiváltásához, és amely petesejtbe injektálva Ca^{2+} oszcillációt képes okozni (SAUNDERS et al., 2002). Jelenleg úgy tűnik, hogy a PLC ζ a régóta keresett spermium faktor.

A spermium indukálta Ca^{2+} oszcilláció pontos mechanizmusának létrejötte nem teljesen tisztázott (MALCUIT et al., 2006). A petesejt aktiválás kezdő lépése valószínűleg az, hogy a spermiumból a petesejtbe jutó PLC ζ kiváltja a foszfatidilinozitol 4,5-biszfoszfát (PIP₂) hidrolízisét, így inozitol 1,4,5-trifoszfát (IP₃) és diacilglicerol (DAG) keletkezik. Ezt követően az IP₃ az intracelluláris Ca^{2+} felszabadulását okozza az IP₃ receptorokon keresztül (MACHÁTY et PRATHER, 1998; RUNFT et al., 2002). Az IP₃ receptorok mindhárom típusa (1-3) expresszálódik emlősök petesejtében, legnagyobb jelentősége az 1-es típusnak van, mely a kortikális régióban található, ahol a kezdeti $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hullám indul (KUOKAWA et al., 2004). A kezdeti Ca^{2+} felszabadulást aztán a Ca^{2+} sejtraktárakba történő visszapumpálása majd ismétlődő, periodikus kibocsátása követi.

A Ca^{2+} oszcilláció szükséges és elegendő inger a petesejt teljes aktiválásának kiváltásához (SCHULTZ et KOPF, 1995). Egyes fajok esetében a plazmamembrán gyors depolarizációja a polispermia elsődleges gátja (WYRICK et al., 1974), emlősök esetében ezt nem sikerült meggyőzően kimutatni. Ezesetben a Ca^{2+} szint emelkedés hatására megtörténik a speciális enzimeket és glikoproteineket tartalmazó kortikális granulumok (SZŐLLŐSI, 1967) perivitellinális térbe történő exkréciója. A felszabaduló anyag módosítja a zona pellucida fehérjeit, ez az ún. zona reakció teszi a zona pellucidát ellenállóvá további spermiumok kötődésével és penetrációjával szemben, megakadályozva ezzel a polispermia létrejöttét (CRAN et al., 1988; HATANAKA et al., 1992).

A termékenyülést követő Ca^{2+} szint emelkedés hatására a petesejt felszabadul a CSF által fenntartott gátlás alól, a metafázis II/anafázis II átmenet megtörténik. A Ca^{2+} a kalmodulinhoz (CaM) kötődik, ami aztán aktiválja a kalmodulin-függő protein kináz II-t (CaMKII) (LORCA et al., 1991, 1993). A CaMKII a közbeeső aktivátora az APC/C komplexnek. Az APC/C az Emi1-hez kötődve, inaktív állapotban van, majd a Cdc20 és/vagy a Chd1 kötődése után aktiválódik. Később az anafázisban elősegíti a szeparált kromoszómák dekondenzációját és telofázisban az utódsejtek sejtmagja körüli membrán képződését és a citokinézist (PETERS, 2002).

A Ca^{2+} oszcillációt követően az MPF inaktiválódik az APC/C komplex általi ciklin B degradáció eredményeképpen (NIXON et al., 2002; HYSLOP et al., 2004); a ciklin B gyors lebomlásáért a fentebb már említett ubiquitin-proteaszóma rendszer (ubiquitin-proteasome system – UPS) a felelős (KING et al., 1996). A Ca^{2+} oszcilláció hatását a meiózis újraindulására a 8. ábra szemlélteti.



8. ábra. A Ca^{2+} oszcilláció és a meiózis újraindulása. A Ca^{2+} oszcilláció egyrészt a kortikális granulumok exkréciónját okozza, gátolva ezzel a polispermia kialakulását, emellett aktiválja a CaM/CaMKII-t előidézve a kilépést a CSF általi megrekedésből, valamint inaktiválja a MAPK kaszkádot. Az APC/C aktiválódása a ciklin B ubiquitinizációján keresztül inaktiválja az MPF-et, a meiózis újraindulását eredményezve. *Forrás: MYAZAKI et ITO, 2006 nyomán*

A második meiotikus osztódás végén második sarkitest kizáródik, majd létrejön a hím és női pronukleusz. A pronukleuszok kialakulásával nagyjából egyidőben megszűnik a Ca^{2+} szint oszcillációja, ennek felismeréséhez az a megfigyelés vezetett, mely szerint a pronukleusz képződésének nocodazollal történő gátlása után a Ca^{2+} oszcilláció órákkal a természetes körülmények közötti leállás után is folytatódott (JONES et al., 1995). Bár termékenyülést követően az MPF rövid időn belül inaktiválódik, a MAPK kaszkád defoszforilációjához/inaktiválódásához hosszabb idő szükséges: a CSF aktivitása még mintegy 30-45 percig fennáll. Aktív CSF később már nem mutatható ki az osztódó embrióban (NISHIZAWA, et al., 1993; TUNQUIST et MALLER, 2003); ezt támasztja alá az a megfigyelés is, hogy alacsony MAPK aktivitás szükséges a pronukleuszok képződéséhez is (LIU et al., 1998; SUN et al., 1999b).

2. 5. Parthenogenetikus aktiválás

A petesejtek parthenogenetikus aktiválása jó eszköznek tűnik az anyai és apai genom szerepének összehasonlítására a korai fejlődés során. A módszer jól használható modellként, a termékenyülés és korai embriófejlődés során bekövetkező biokémiai és morfológiai változások tanulmányozására. A petesejt-aktiváció alapvető módszer nemcsak a petesejt molekuláris mechanizmusainak feltárására, de sejtmagátültetési klónozás során egy igen fontos lépés, amely biztosítja a petesejt továbbhaladását az interfázisba és az azt követő első mitotikus sejtosztódásba. Egyes fajoknál szükséges a mesterséges petesejt aktiválás az intracitoplazmatikus spermium injektálás (ICSI) utáni fejlődés beindítására is (MACHÁTY et PRATHER, 1998; AMANO et al., 2004; KRAGH et al., 2005; IBANEZ et al., 2005). Parthenogenezis során a létrejövő embrió kizárólag a női gamétából származik, a hím gaméta közreműködése nélkül (KAUFMAN, 1979).

Mint ahogy az korábban megjegyzésre került, természetes körülmények között a termékenyítő spermium aktiválja a petesejtet, és a meiózis újraindulását okozza (PRATHER et al., 1999). A mesterséges petesejt-aktiválás célja a termékenyítő spermium által előidézett folyamatok modellezése (NAKADA et MIZUNO, 1998). Az egyes aktivációs módszerek elsődleges célja az intracellulárisan szabad Ca^{2+} koncentráció emelése, amelyet egyes eljárások a citoplazmatikus Ca^{2+} tárolók stimulálásával érik el, míg mások a Ca^{2+} beáramlását idézik elő az extracelluláris médiumból. Megint más kezelések a fehérjeszintézis, vagy protein foszforiláció gátlásán keresztül fejtik ki hatásukat a sejtciklus szabályozásában fontos fehérjék manipulálásával (MACHÁTY et PRATHER, 1998; MEO et al., 2004).

2. 5. 1. A Ca^{2+} szintjének emelkedését előidéző módszerek

Számos kísérlet bizonyítja, hogy a petesejt plazmamembránjának a Ca^{2+} számára átjárhatóvá tétele Ca^{2+} beáramlást okoz, ezzel előidézve a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedését. A plazmamembrán egy finom tűvel való roncsolása békánál aktiválódást eredményezett (KAWAMURA, 1939), míg külső Ca^{2+} jelenlétében a tűvel megszúrt hörcsög petesejtek 80%-a mutatta a kortikális granulomok exkrécióját, a második sarkitest

kizáródását, valamint a pronukleuszok képződését (UEHARA et YANAGIMACHI, 1977).

Egy másik módszer a plazmamembrán szerepének kikerülésére a Ca^{2+} direkt módon történő injekciója a petesejt citoplazmájába. Számos fajnál alkalmazták eredményesen, sertésben CaCl_2 intracelluláris injektálása a kortikális granulomok exkrécióját, a cdc2 aktivitás csökkenését, a fehérje szintézis változását, pronukleusz-képződést és embrionális fejlődést indukált (MACHÁTY et al., 1996).

Rövid ideig tartó, magas feszültségű egyenáramú elektromos pulzus használata a kettős foszfolipid membrán destabilizációját okozza. A hatás reverzibilis, az elektromos impulzus ideiglenes pórusokat nyit a plazmamembránon, lehetővé téve az extracelluláris és intracelluláris ionok kicserélődését (ZIMMERMANN et VIENKEN, 1982; ALBERIO et al., 2001). A létrejövő pórusok mérete számos paraméter függvénye, így pl. az elektromos impulzus általi membránpotenciál változás, az impulzus hossza vagy a sejt típusa bír jelentős befolyással (SERPERSU et al., 1985). Sikertült ezzel a módszerrel $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedést indukálni egér (RICKORDS et WHITE, 1992), nyúl (FISSORE et ROBL, 1992), szarvasmarha (ROBL et al., 1992) és sertés (SUN et al, 1992) esetében, azonban a kezdeti koncentráció emelkedés nem gerjeszt további hullámokat, oszcillációt.

Az elektromos pulzussal előidézett membrán destabilizáció két sejt fúzióját is eredményezheti. Ezt a jelenséget használják ki sejtmagátültetési klónozás során az enukleált petesejt és a genetikai anyagot tartalmazó sejt „egyesítésekor” (KINOSHITA et TSONG, 1977).

Az intracellulárisan szabad Ca^{2+} szintje növelhető és a petesejt aktivációja kiváltható Ca^{2+} ionofór használatával is. A Ca^{2+} , Mg^{2+} és H^+ ionofór A23187 használata kortikális granulomok exkrécióját, második sarkitest kizáródását, valamint pronukleusz-képződést indukál számos gerinctelen és gerinces faj esetében (CHAMBERS et al., 1974; STEINHARDT et EPEL, 1974; STEINHARDT et al., 1974; KLINE et KLINE, 1992).

Egy másik hatékony Ca^{2+} ionofór, az ionomycin kezelés hatására ugyancsak Ca^{2+} beáramlást tapasztaltak, de a direkt plazmamembránon keresztüli Ca^{2+} transzport helyett az intracelluláris Ca^{2+} tárolók kiürülését eredményezi, ami aztán kapacitatív Ca^{2+} beáramláshoz vezet (MORGAN et JACOB, 1994; PRATHER et al., 1999). Juhnál magas pronukleusz-képződést és blasztociszta formációt figyeltek meg ionomycin kezelés hatására (LOI et al., 1998).

Az etanol használata ugyancsak a petesejtek aktivációját okozza egér (CUTHBERTSON et al., 1981), szarvasmarha (NAGAI., 1987) és sertés (DIDION et al., 1990) fajoknál. 5-7%-os etanolban rövid ideig tartó (5-7 perces) inkubáció pronukleusz-képződést, valamint blasztociszta stádiumig való fejlődést eredményez. Az etanol egyszeri intracelluláris Ca^{2+} emelkedést okoz, ami egér petesejtek esetében magasabb és nagyobb amplitudójú, mint a termékenyülés során megfigyelt (VITULLO et OZIL, 1992); a Ca^{2+} mind az extracelluláris beáramlásból, mind az intracelluláris tárolókból származik (LOI et al., 1998). IP_3 általi Ca^{2+} felszabadulást okoz, IP_3 képződés stimulálásával a plazmamembránon (ILYIN et PARKER, 1992). Sertésben az etanol partenogenetikus aktiválás céljából való alkalmazása a petesejtek alacsony hányadának osztódását eredményezte, az aktivált petesejtek nem jutottak el a blasztociszta stádiumig (YI et PARK, 2005).

A stroncium ugyancsak széles körben alkalmazott aktivációs ágens, jelenleg egér sejtmagátültetési klónozási protokollok eleme (WAKAYAMA et al., 1998). A stroncium a Ca^{2+} kötődését változtatja meg a petesejtben (WHITTINGHAM et SIRACUSA, 1978), de ugyancsak elősegíti az intracelluláris Ca^{2+} tárolókból való felszabadulást ismétlődő Ca^{2+} csúcsokat előidézve. Ezek a Ca^{2+} csúcsok azonban alacsonyabb frekvenciájúak, kisebb amplitudójúak, és időben tovább tartanak, mint amiket termékenyüléskor észleltek (KLINE et KLINE, 1992).

2. 5. 2. A sejtciklus szabályozók manipulálása

A Ca^{2+} jelek elsődleges feladata termékenyüléskor a sejtciklus szabályozásában fontos fehérje, az MPF szintjének csökkentése, ami a sejtciklus metafázisban történő megrekedésből való felszabadulását eredményezi (LORCA et al., 1993). Számos eljárás használható az intracelluláris Ca^{2+} szintjének átmeneti emelésére petesejtekben,

azonban az alacsony frekvenciájú Ca^{2+} oszcilláció indukálása mesterségesen meglehetősen nehéz (MACHÁTY et PRATHER, 1998). Emiatt kívánatos lenne olyan parthenogenetikus aktiválási módszerek alkalmazása, melyek a termékenyülés során bekövetkező összes változást indukálni képesek, valamint ezek eredményeképpen magas embrionális fejlődés érhető el. Az elektroporáció hatására fellépő egyszeri Ca^{2+} felszabadulás nem mindig képes előidézni az MPF inaktivációját, egyes esetekben kezdeti aktiváció-csökkenés után az MPF újra-aktiválódása figyelhető meg (DUCIBELLA et al., 2002). A CSF-nek ugyancsak megvan az a képessége, hogy ismétlődő Ca^{2+} jelek hiányában a kezdeti inaktiválódás után az aktivitása visszaálljon a kezdeti szintre (JONES, 2005). Egy lehetséges megoldás az MPF újra-aktiválódásának elkerülésére fehérje szintézis, vagy protein kináz gátlók használata. Ilyenkor a kezdeti Ca^{2+} szint emelkedés kiváltotta folyamatok szabályozásának befolyásolása a cél (MACHÁTY et PRATHER, 1998).

A cycloheximide általános fehérjeszintézis gátló, ami az MPF szabályozó alegységének, a ciklin B-nek a képződését is akadályozza (LEVESQUE et SIRARD, 1996). A ciklin B a sejtciklus interfázisban szintetizálódik és a sejtsztódás kezdetekor azonnal lebomlik (HUNT, 1991). Képződésének gátlása az MPF szint markáns csökkenését eredményezi (ALBERIO et al., 2001). A cycloheximide kezelés eredményesen használható a meiózis újraindításához egér (SIRACUSA et al., 1978) és szarvasmarha (SIRARD et al., 1989) petesejtek esetén, azonban sertésben ezen vegyület alkalmazása önmagában nem vezetett aktiválódáshoz (NUSSBAUM et PRATHER, 1995). Megfigyelték továbbá, hogy a cycloheximide nemcsak az MPF inaktiválódását okozza, de a DNS szintézis kezdetét is késlelteti (ALBERIO et al., 2000), valamint ugyancsak kimutatták káros hatását sejtmagátültetési klónozással létrehozott embriók posztimplantációs fejlődésére is (ZAKHARTCHENKO et al., 1999a,b). Számos állatfajnál sikerült élő utódot előállítani cycloheximide egyedüli vagy kombinált alkalmazásával aktivált petesejtekből sejtmagátültetési klónozást követően (MACHÁTY, 2006). LEE et al. (2003) életképes malacokat klónozott elektroporált petesejtek cycloheximide-dal való kezelése után.

Az MPF gátlása ugyancsak lehetséges a fehérje-foszforiláció gátlása révén. A széles spektrumú kináz gátló, a 6-dimetilaminopurin (6-DMAP) eredményesen alkalmazható puhatestű és *Xenopus* petesejtek esetében a meiózis újraindítására (NEANT et

GURRIER, 1988; ZHANG et MASUI, 1992). Számos fajnál használatos aktivációs módszerek részeként korai embrionikus fejlődés stimulálásához, annak ellenére, hogy számos sejtfunkciót zavar: a 6-DMAP gátolja például a Cdc25 foszfatáz foszforilációját (ALBERIO et al., 2001).

A 6-DMAP-nál specifikusabb protein foszforiláció blokkoló a butyrolactone I, mely az ATP kompetitoraként képes a cdc2 és a cdk2 kinázok gátlására (KITAGAWA et al., 1993). Így módon a cdc2, vagyis az MPF katalitikus alegységének szelektív gátlása lehetséges butyrolactone I segítségével (KITAGAWA et al., 1994; KUBELKA et al., 2002). Ca^{2+} emelkedést követően alkalmazva a butyrolactone I eredményesen indukálta parthenogenetikus sertés embriók blasztociszta stádiumig történő fejlődését (DINNYÉS et al., 2000; BING et al., 2003).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

A dolgozatban szereplő kísérleteket a Purdue Egyetem, Állati Tudományok Tanszékén (West Lafayette, Indiana, USA) végeztem 2005 márciusa és 2006 augusztusa között.

3. 1. Parthenogenetikus aktiválási módszerek és a tenyésztőmédium embriófejlődésre kifejtett hatásának vizsgálata

3. 1. 1. Alkalmazott vegyszerek

Amennyiben külön nem került megjegyzésre, az alkalmazott vegyszereket a Sigma-Aldrich Company-től (St. Louis, MO, USA) szereztük be.

3. 1. 2. A petesejtek gyűjtése

A kísérletekhez a helyi vágóhídról (Indiana Packers, Delphi, Indiana, USA) 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. Azokat a komplexeket érleltük tovább, amelyek esetében a petesejteket számos kumulusz sejtréteg borította.

3. 1. 3. A petesejtek in vitro érlelése

A KPK-eket ezek után 4 vájatú NUNC (Nunc, Roskilde, Dánia) tenyésztőedényben, 500 µl maturációs oldatban (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), 400 µl olajjal fedve érleltük. A petesejtek maturáltatása 42-44 óráig tartott, 39°C-on, 5% CO₂ szint mellett.

3. 1. 4. Az *in vitro* maturáció eredményességének meghatározása

A 42-44 órás maturáció végén a petesejtek egy részének esetében ellenőriztük azok kromatin konfigurációját. A kumuluszsejteket maturáció után a petesejtek felszínéről 0,1% hialuronidázt tartalmazó TL-Hepes médiumban való 8 perces vortexeléssel eltávolítottuk. A petesejteket ezt követően tárgylemezre helyeztük, fedőlemezzel fedtük, és a fedőlemezt ragasztóval rögzítettük. Ezt követően a mintákat etilalkohol-ecetsav 3:1 arányú elegyében 4 napig fixáltuk, a fixált petesejteket 1%-os ecetsavas orceinnel megfestettük, majd fáziskontraszt mikroszkóp alatt 400-szoros nagyítással vizsgáltuk.

3. 1. 5. A petesejtek aktivációja

A kumuluszsejteket a fent leírtakkal megegyezően eltávolítottuk, majd az 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, majd egy elektroporációs kamra két, egymástól 0,5 mm-re lévő elektródja közé helyeztük őket és Electro Cell Manipulator (BTX Instrument Division, Harvard Apparatus, Inc., Holliston, MA, USA) segítségével elektroporáltuk a sejteket két, egyenként 60 μsec -ig tartó, 1,2 kV/cm-es feszültségű egyenáramú impulzust alkalmazásával. Ezt követően 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 $\mu\text{g/ml}$ cytochalsin B-vel kiegészített tenyésztőmédiumba helyeztük 4 órára. A második csoportban az elektroporált petesejteket 100 μM butyrolactone I-et tartalmazó tenyésztőmédiumba kultiváltuk 4 órán keresztül, a tenyésztő oldat ebben az esetben is tartalmazott 7,5 $\mu\text{g/ml}$ cytochalsin 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 $\mu\text{g/ml}$ cytochalsin B-t is tartalmazott.

3. 1. 6. *In vitro* embriótenyésztés

Az aktivált petesejteket a különböző aktivációs kezelések után az aktuális tenyésztőmédiumban négyszer átmostuk, majd a tenyésztő oldatok 20 µl-es, olajjal fedett cseppeibe helyeztük. Az egyes cseppekbe 10 aktivált petesejt került. Kétféle tenyésztőoldat (NCSU-23 ill. PZM-3) hatását vizsgáltuk mindegyik aktivációs kezelés esetében; a cseppekben az embriótenyésztést 7 napig végeztük 39°C-on, 5% CO₂ szint mellett. Az oldatok összetételét az 1. táblázat mutatja.

1. táblázat. Az NCSU-23 és a PZM-3 tenyésztőmédiumok összetétele

	NCSU-23	PZM-3
NaCl	108,73 mM	108,00 mM
KCl	4,78 mM	10,00 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,70 mM	-
KH ₂ PO ₄	1,19 mM	0,35 mM
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,19 mM	0,40 mM
NaHCO ₃	25,07 mM	25,07 mM
Na-piruvát	-	0,20 mM
Ca-laktát x 5H ₂ O	-	2,00 mM
Glükóz	5,55 mM	-
L-Glutamin	1,00 mM	1,00 mM
Taurin	7,00 mM	-
Hypotaurin	5,00 mM	5,00 mM
BME (Sigma B6766)	-	20,00 ml/l
MEM (GIBCO 11140-050)	-	10,00 ml/l
Penicillin	0,065 mg/ml	0,065 mg/ml
Sztreptomycin (Sigma S1277)	0,050 mg/ml	0,050 mg/ml
BSA (Sigma A7906)	4,00 mg/ml	3,00 mg/ml

Az oldatok pH-ja 7,2-7,4 közötti, elkészítés után az oldatokat 22 µm-es szűrővel sterilizáltuk.

3. 1. 7. A pronukleusz-képződés meghatározása

A pronukleusz-képződést 10 órával az aktiválás után vizsgáltuk. Az aktivált petesejtek egy részét tárgylemezre helyeztük, fedőlemezzel óvatosan lefedtük, és a fedőlemez ragasztóval történő rögzítését követően 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 fáziskontraszt mikroszkóp alatt 400-szoros nagyítással vizsgáltuk.

3. 1. 8. Az osztódott és a blasztocishta stádiumú embriók meghatározása

Az embriók a 7 napos tenyésztés végén kerültek kiértékelésre. Azon embriók, melyeknél látható volt a blasztocöl, blasztocishta stádiumú embriókként értékeltük. A fennmaradó embriók DNS-ét 5 µg/ml Hoechst 33342 festéket tartalmazó TL-Hepes médiumban történő 10 perces inkubálással megfestettük, majd tárgylemezre helyezve, epifluoreszcens mikroszkóp segítségével UV fény alatt értékeltük. A két, vagy több sejtmagot tartalmazó embriókat osztódott embriókként azonosítottuk.

3. 1. 9. Az apoptotikus sejtek meghatározása

A 7 napos tenyésztési periódus végén a blasztocisztákat 3,7%-os paraformaldehidben fixáltuk 4°C-on 12-14 órán keresztül. Az apoptotikus sejtek arányának meghatározására In Situ Cell Death Detection Kit-et (Kat. #11648795910; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) használtunk. A vizsgálat során a kit utasításainak megfelelően jártunk el. PBS-ben kétszer átmostuk a fixált embriókat, majd a plazmamembránt 0,1% Triton-X-et és 0,1% nátrium citrátot tartalmazó PBS oldatban 2 percig permeabilizáltuk. Ezt követően egy újabb, PBS-ben való mosás következett, majd a TUNEL reakció médiumba helyeztük a blasztocisztákat és 1 órán keresztül inkubáltuk őket 39°C-on. Az inkubáció során a TUNEL médium egy fluorokrómmal jelöli az apoptotikus sejtmagokban a fragmentálódott DNS végeket. Egy óra elteltével az embriók sejtmagjait 5 µg/ml Hoechst 33342 festéket tartalmazó PBS médiumban festettük 10 percig, majd a megfestett embriókat tárgylemezre helyeztük és fedőlemezzel (24x24mm-es) letakartuk. Az apoptotikus sejtek számát és az összes sejtszámot Nikon Diaphot mikroszkóp segítségével 400-szoros nagyítás mellett értékeltük.

A pozitív kontrollként használt blasztocisztákat a fent leírtakkal megegyezően fixáltuk. Fixálás után PBS-ben átmostuk őket kétszer, majd 200 U/ml DNázt, 50 mM Tris-HCl-t és 1 mg/ml BSA-t tartalmazó PBS-ben (pH 7,5) inkubáltuk őket 10 percig. Ezt követően 1 órán át TUNEL reakció médiumban, majd 5 µg/ml Hoechst 33342 festéket tartalmazó PBS-ben 10 percig tartottuk őket, és a fent leírtakkal megegyezően készítettük elő a mintákat az értékelésre.

3. 1. 10. Kísérleti elrendezés

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.

3. 1. 11. Alkalmazott statisztika

A kísérleteket 5 ismételtsben végeztük. A pronukleusz-képződést, az osztódási százalékot, a blasztociszta százalékot, az embriók sejtszámát valamint az apoptotikus sejtek arányát többtényezős varianciaanalízissel (ANOVA) értékeltük, PROC MIX eljárás alkalmazva, Statistical Analysis System (SAS Institute, Cary, NC, USA) programcsomag segítségével. A százalék dimenziójú adatok esetében az elemzés során arc sine transzformációt alkalmaztunk. Az egyes kezelések közötti különbségek feltárására Tukey-tesztet használtunk. A kikelt blasztociszták arányát χ^2 próbával hasonlítottuk össze. Szignifikáns különbségként értékeltük, ahol a valószínűség $p < 0,05$ volt.

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

3. 2. 1. Alkalmazott vegyszerek

Amennyiben külön nem került megjegyzésre, az alkalmazott vegyszereket a Sigma-Aldrich Company-től szereztük be.

3. 2. 2. A petesejtek gyűjtése

A petesejtek gyűjtése a 3. 1. 2. pontban leírtakkal megegyezően történt.

3. 2. 3. A petesejtek *in vitro* érlelése

A petesejtek *in vitro* érlelése a 3. 1. 3. pontban leírtakkal megegyezően történt.

3. 2. 4. A petesejtek aktivációja

A kumulusz sejtek eltávolítása után (ld. 3. 1. 4. pontban) a petesejteket aktiváltuk oly módon, hogy elektroporációt követően 4 órán keresztül 100 μ M butyrolactone I jelenlétében inkubáltuk őket. Az inkubáció során a tápoldat 7,5 μ g/ml cytochalasin B-t is tartalmazott.

3. 2. 5. *In vitro* embriótenyésztés

Az embriók tenyésztését NCSU-23 ill. PZM-3 médium 20 μ l-es, ásványi olajjal fedett cseppjeiben végeztük 39°C-on. A tenyésztés során kétféle O₂ koncentráció hatását hasonlítottuk össze. Az egyik esetben az embriók 5% CO₂-t tartalmazó levegőben (~20% O₂) kerültek inkubálásra, a másik esetben a légtér 5% CO₂-t, 5% O₂-t és 90% N₂-t tartalmazott.

3. 2. 6. Az osztódott és a blasztociszta stádiumú embriók meghatározása

Az osztódott és a blasztociszta stádiumú embriók arányát a 3. 1. 7. pontban leírtakkal megegyezően határoztuk meg.

3. 2. 7. Apoptotikus sejtek meghatározása

Az apoptotikus sejtek meghatározása a 3. 1. 8. pontban leírtakkal megegyezően történt.

3. 2. 8. Kísérleti elrendezés

A második kísérletben a légtéri 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. 2. 9. Alkalmazott statisztika

A kísérleteket 5 ismételtsben végeztük. Az osztódási százalékot, a blasztociszta százalékot, az embriók sejtszámát valamint az apoptotikus sejtek arányát többtényezős varianciaanalízissel (ANOVA) értékeltük PROC MIX eljárást alkalmazva, a Statistical Analysis System programcsomag segítségével. A százalék dimenziójú adatok esetében az analízis előtt arc sin transzformációt alkalmaztunk. A kezelések közötti különbségeket Tukey-teszt segítségével határoztuk meg. A kikelt blasztociszták arányát Chi² próbával hasonlítottuk össze. Szignifikáns különbségként értékeltük, ahol a valószínűség $p < 0,05$ volt.

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

3. 3. 1. Alkalmazott vegyszerek

Amennyiben külön nem került megjegyzésre, az alkalmazott vegyszereket a Sigma-Aldrich Company-től szereztük be.

3. 3. 2. A petesejtek gyűjtése

A petesejtek gyűjtése a 3. 1. 2. pontban leírtakkal megegyezően történt.

3. 3. 3. A petesejtek *in vitro* érlelése

A petesejtek *in vitro* érlelése a 3. 1. 3. pontban leírtakkal megegyezően történt.

3. 3. 4. A petesejtek aktivációja

A petesejtek aktivációja a 3. 1. 4. pontban leírtakkal megegyezően történt.

3. 3. 5. *In vitro* embriótenyésztés

Az aktivált petesejtek tenyésztését PZM-3 médiumban végeztük egyszerhasználatos Petri-csészében, 20 µl-es cseppekben ásványi olajjal fedve, 7 napig 39°C-on, 5% CO₂ szint alkalmazása mellett.

3. 3. 6. A pronukleusz-képződés meghatározása

A pronukleusz-képződés 6 órával az aktiválás után került meghatározásra. Az aktivált petesejteket tárgylemezre helyeztük, fedőlemezzel fedtük, a fedőlemez két horizontális szélét leragasztottuk, majd etilalkohol-ecetsav 3:1 arányú elegyében 4 napig fixáltuk. Ezután 1%-os ecetsavas orceinnel festettünk, majd a kromatin konfigurációt fáziskontraszt mikroszkóp alatt 400-szoros nagyítással vizsgáltuk.

3. 3. 7. 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 CelLyticTM-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. Segítségével mérhető annak a radióaktív γ -foszfátnak a mennyisége, 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 - 32 P]ATP-t (~3000 Ci/mmol, Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA), 75 mM MgCl₂-t és 500 μ M ATP-t tartalmazó puffer hozzáadásával vette kezdetét. Tíz perces, 30°C-on történő inkubálás után 25 μ l-nyi folyadékot blottoltunk foszocellulóz 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.

3. 3. 8. 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.

3. 3. 9. Kísérleti elrendezés

Az egyes vizsgálatokat legalább 5 ismétlésben végeztük. Ebben a kísérletben az MPF és a MAPK aktivitásának változását vizsgáltuk aktiváció után az első 6 órában, a pronukleusz-képződés kezdetéig. Mindhárom aktivációs módszer esetében 1, 2, 3, 4, 5 és 6 órával az aktiváció után mintát vettünk. Mintánként 10 petesejt került véletlenszerűen kiválasztásra. A kezdeti kinázaktivitás meghatározásához aktiváció előtti (MII fázisú) petesejteket használtunk.

3. 3. 10. 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.

4. EREDMÉNYEK ÉS AZOK ÉRTÉKELÉSE

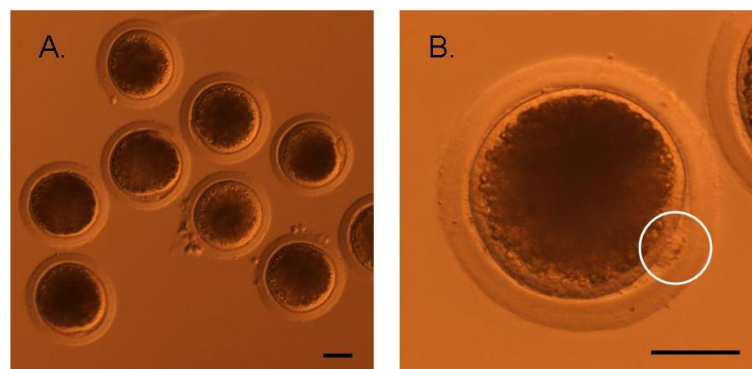
4. 1. Parthenogenetikus aktiválási módszerek és a tenyésztőmédiümok embriófejlődésre kifejtett hatásának vizsgálata

A kísérlethez az érett petesejteket *in vitro* maturáció során állítottuk elő. A 42-44 órás maturáció végén a petesejtek kisebb hányada GV fázisban ($5,12 \pm 0,51\%$) maradt, azonban nagy részük elérte az MII-es állapotot ($88,12 \pm 0,62\%$; 2. táblázat).

2. táblázat. Az *in vitro* maturációs rendszer hatékonysága (az egyes adatok a maturációs időszak végén az adott fejlődési stádiumban talált petesejtek számát jelölik)

Érlelt petesejtek (N)	GV fázis	Metafázis I	Anafázis I	Telofázis I	Metafázis II
	N (% $\pm$ S.E.M.)				
428	22 ($5,12 \pm 0,51$)	16 ($3,72 \pm 0,39$)	7 ($1,65 \pm 0,31$)	6 ($1,39 \pm 0,21$)	377 ($88,12 \pm 0,62$)

Az érett petesejteket az *in vitro* maturációt és a kumuluszsejtek eltávolítását követően az 1. kép szemlélteti.



1. kép. Sertés petesejtek *in vitro* maturációt követően 40- (A.) és 300-szoros (B.) nagyításon kiemelve a sarkitestet. A jelölt szakasz 50 µm-es nagyságú. *Forrás: saját felvétel.*

Az így módon előállított, morfológiailag megfelelőnek ítélt sertés petesejteket használtuk a kísérlet további részében, melynek során három különböző aktiválási

módszer és két tenyésztőmédium (NCSU-23 ill. PZM-3) egyidejű hatását vizsgáltuk a korai embriófejlődésre.

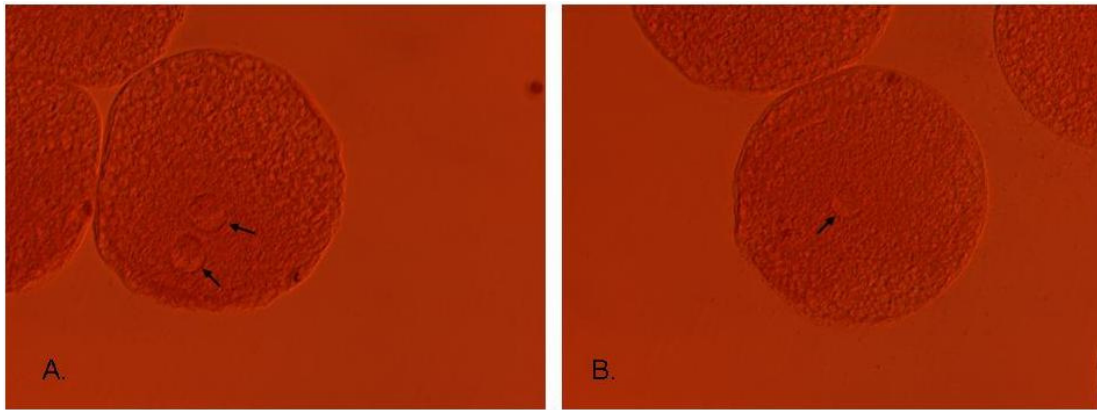
A különböző aktiválási módszerek szignifikáns ($p < 0,001$) hatást gyakoroltak a pronukleusz-képződésre. Az egy vagy két pronukleusszal rendelkező zigóták főátlagos elektroporáció után szignifikánsan alacsonyabb volt ($83,9 \pm 1,7\%$), mint az EP+BL ($92,8 \pm 0,8\%$) vagy EP+CHX ($93,0 \pm 1,0\%$) csoportokban (3. 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.

3. táblázat. Az aktiválási módszerek és a különböző médiumok hatása a pronukleusz-képződésre

Médium	Kezelések	Aktivált petesejtek N	Pronukleusszal rendelkező petesejtek N (% $\pm$ S.E.M.)
NCSU-23	EP	110	92 ($84,4 \pm 2,1$) ^a
	EP+BL	117	108 ($92,7 \pm 1,4$) ^b
	EP+CHX	112	104 ($92,9 \pm 1,8$) ^b
PZM-3	EP	116	96 ($83,4 \pm 3,0$) ^a
	EP+BL	110	103 ($92,8 \pm 1,1$) ^b
	EP+CHX	112	104 ($93,1 \pm 0,8$) ^b

^{a, b} az oszlopok közötti statisztikailag igazolható szignifikáns különbségeket jelöli, $p < 0,001$

Aktivációt követően az egyes petesejtek leggyakrabban két, néhány esetben egy pronukleuszt tartalmaztak. Pronukleusszal rendelkező petesejteket orcein festést követően a 2. kép szemlélteti.



2. kép. Aktivált petesejtek 10 órával az aktivációt követően. Az „A.” képen bemutatott petesejt két pronukleusszal, míg a „B.” képen egy pronukleusszal rendelkezik. A nyilak az egyes pronukleuszokat jelölik. *Forrás: saját felvétel*

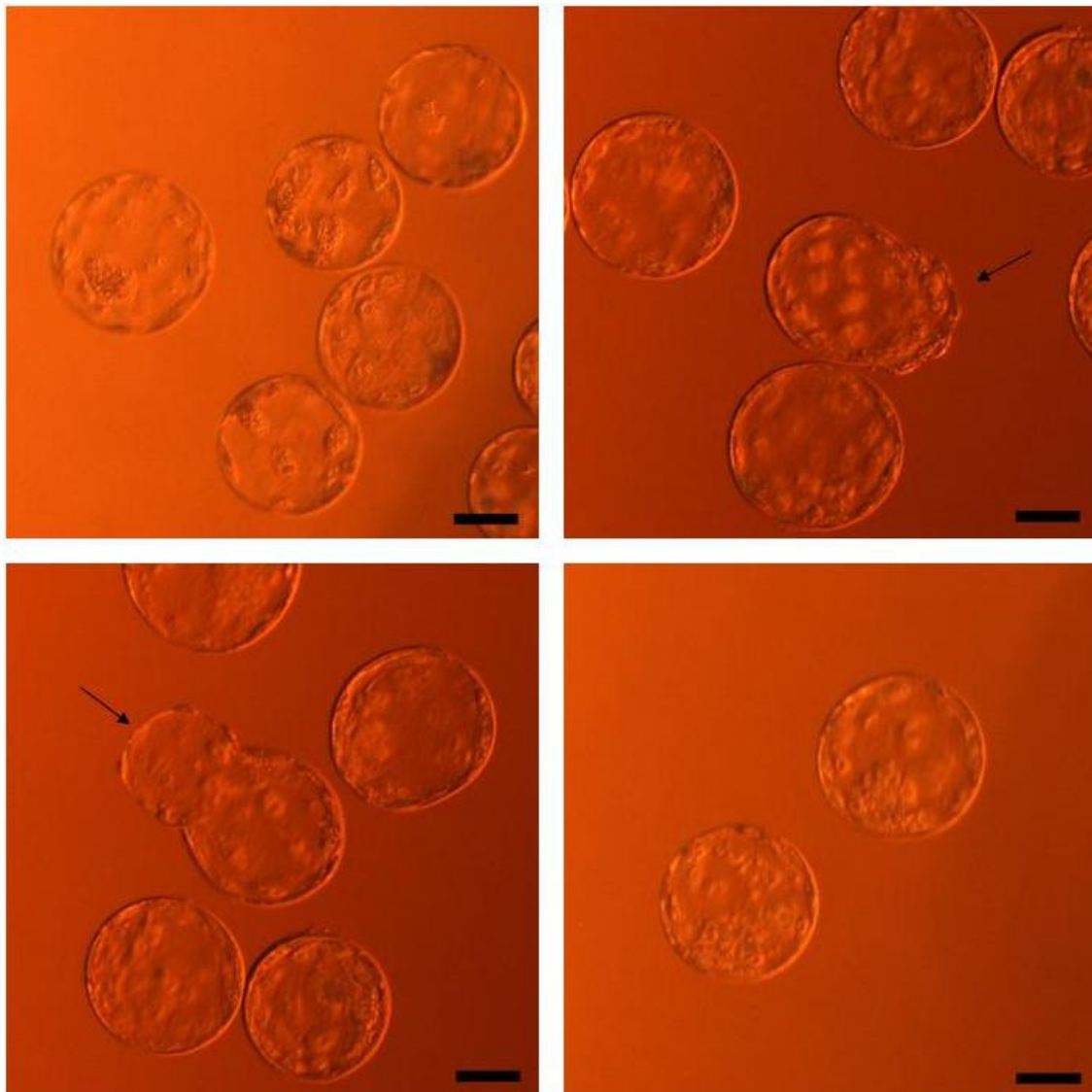
Az osztódott, vagyis kétsejtes embriók arányának alakulása hasonló képet mutatott az összes kezelés esetén, sem az alkalmazott aktiválási módszereknek, sem a tenyésztőmédiumoknak hatásuk nem volt. A tenyésztőmédiumokon belüli analízis megállapította, hogy a PZM-3 használatakor az EP+CHX csoportban magasabb volt a kétsejtes embriók aránya, mint a csak elektroporált csoportban, míg az EP+BL csoport a fent említett két kezelés közötti eredményt produkálta. NCSU-23 médiumon belül különbségeket nem észleltünk az osztódott embriók számának vonatkozásában.

A blasztociszta stádiumig való fejlődés vizsgálatok 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 ($0,2 \pm 0,2\%$) (4. táblázat). A 7 napos embriótenyésztés végén kapott blasztociszták a 3. képen kerülnek bemutatásra.

4. táblázat. Az aktiválási módszerek és a médiumok hatása parthenogenetikusan aktivált sertés petesejtek fejlődésére

Médium	Kezelés	N	Osztódott embriók N (% $\pm$ S.E.M.)	Képződött blasztociszták N (% $\pm$ S.E.M.)	Kikelt blasztociszták N (% $\pm$ S.E.M.)
NCSU-23	EP	173	134 (77,1 $\pm$ 6,6) ^a	69 (40,8 $\pm$ 7,5) ^a	0 (0,0 $\pm$ 0,0) ^c
	EP+BL	180	138 (77,0 $\pm$ 5,4) ^a	71 (39,6 $\pm$ 1,9) ^a	0 (0,0 $\pm$ 0,0) ^c
	EP+CHX	173	131 (76,6 $\pm$ 6,1) ^a	65 (39,4 $\pm$ 6,4) ^a	1 (0,6 $\pm$ 0,6) ^c
PZM-3	EP	173	134 (76,0 $\pm$ 5,6) ^a	79 (45,6 $\pm$ 4,7) ^a	17 (10,2 $\pm$ 2,9) ^d
	EP+BL	181	151 (83,3 $\pm$ 3,7) ^{ab}	114 (64,9 $\pm$ 5,2) ^b	23 (12,5 $\pm$ 1,7) ^d
	EP+CHX	173	154 (89,9 $\pm$ 2,9) ^b	117 (68,6 $\pm$ 3,5) ^b	17 (9,1 $\pm$ 2,4) ^d

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



3. kép. 7 napos sertés blasztociszták 40-szeres nagyításon. (A jelölt szakasz 100 μ m-es nagyságú; a nyíllal jelölt blasztociszták kikelés közben láthatók). *Forrás: saját felvétel*

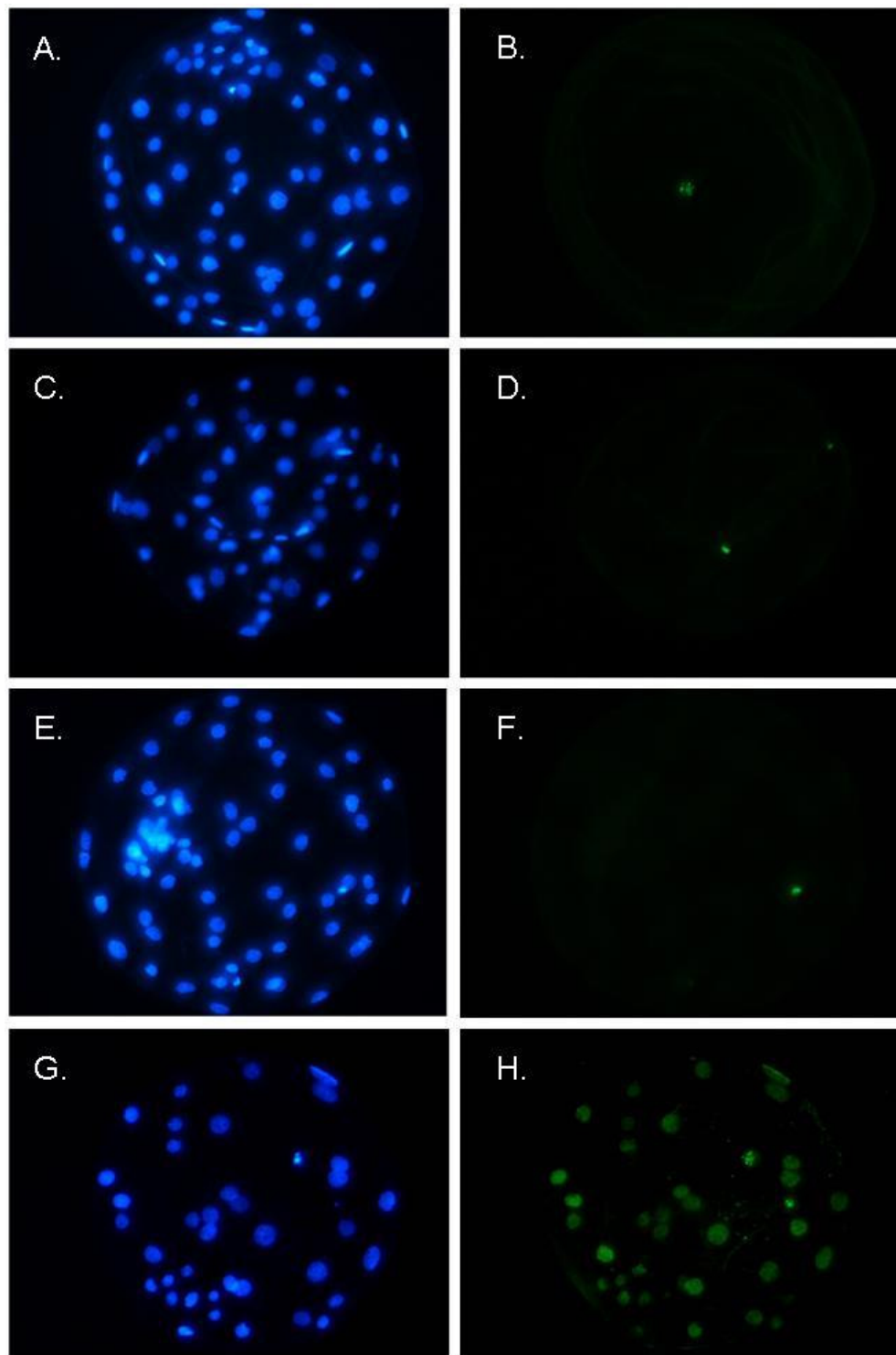
A blasztociszták össz-sejtszámának alakulására ugyancsak a médiumoknak volt egyértelmű hatása ($p < 0,001$). A PZM-3 tenyésztőoldatban fejlődött blasztociszták magasabb sejtszámot mutattak ($50,2 \pm 1,3$), mint azok, melyeket NCSU-23-ban ($35,3 \pm 1,1$) tenyésztettünk. A médiumokon belül a kezelések 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 (5. táblázat).

5. táblázat. Az aktiválási módszerek és a média hatása az *in vitro* aktivált sertés parthenóták sejtszámára és az apoptotikus sejtek arányára

Médium	Kezelés	N	Sejtek száma blasztocisztánként	Apoptotikus sejtek aránya blasztocisztánként
			$\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$	$\% \pm \text{S.E.M.}$
NCSU-23	EP	55	$34,2 \pm 1,7^a$	$5,1 \pm 0,5$
	EP+BL	49	$36,8 \pm 2,0^a$	$4,9 \pm 0,5$
	EP+CHX	48	$34,9 \pm 2,0^a$	$5,3 \pm 0,6$
PZM-3	EP	55	$49,9 \pm 2,5^b$	$5,2 \pm 0,5$
	EP+BL	75	$49,7 \pm 2,2^b$	$5,2 \pm 0,5$
	EP+CHX	77	$50,8 \pm 2,1^b$	$4,7 \pm 0,4$

^{a, b} az oszlopok közötti statisztikailag igazolható szignifikáns különbségeket jelöli, $p < 0,001$

Néhány reprezentatív blasztociszta, amelyekben az összes, valamint az apoptotikus sejteket TUNEL festéssel láthatóvá tettük, a 4. képen kerül bemutatásra.



4. kép. Sertés blasztociszták TUNEL festést követően. A., C., E., G.: a sejtmagok jelölése Hoechst 33342 segítségével; B., D., E., H.: FITC-vel jelölt apoptotikus sejtek. Pozitív kontrollként (G., H.) DNázzal kezelt blasztocisztákat használtunk. *Forrás: saját felvétel*

4. 1. 1. Eredmények értékelése, következtetések

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 blasztociszta stádiumig való fejlődés is magasabb volt a kombinált kezeléseknek köszönhetően, mint a csak elektroporációval aktivált petesejtek esetében. NCSU-23 médium használata esetén a fehérjesszintézis/fehérjefoszforiláció 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 blasztociszta stádiumig való fejlődést 1%-os MEM nem-esszenciális aminosavakkal kiegészített NCSU-23 médiumban (NUSSBAUM et PRATHER, 1995; LEE et al., 2004). Habár kísérleteinkben a két médium hasonló pronukleusz-képződést (kivéve az elektroporált + cycloheximide csoportot) és osztódási százalékot eredményezett, a blasztociszta stádiumig való fejlődés és az embriók átlagos sejtszáma jelentősen javult PZM-3 médium használatakor.

Sertés zigóták blasztociszta stádiumig való tenyésztésére számos médium került kifejlesztésre, többek között a Whitten's médium (WRIGHT, 1977; BECKMANN et DAY, 1993), a North Carolina State University (NCSU)-23 és az NCSU-37 médium (PETTERS et WELLS, 1993), a Beltsville embrió tenyésztő médium (BECM)-3 (DOBRINSKY et al., 1996) valamint a sertés zigóta médiumok (PZM-3 és PZM-4; YOSHIOKA et al., 2002). Az NCSU-23 médium a leginkább elterjedt, és a legszélesebb körben alkalmazott tenyésztőmédium sertés embriók fejlődésének elősegítésére *in vitro* fertilizációt vagy sejtmagátültetési klónozást követően (MACHÁTY et al., 1998). Ezzel szemben egyes szerzők szerint a PZM-3 médium tűnik a napjaink leghatékonyabb tenyésztőmédiumának, jótékony hatását sikerült

igazolni *in vivo* előállított embriók (YOSHIOKA et al., 2002), valamint parthenogenetikusan aktivált petesejtek tenyésztése során (IKEDA et TAKAHASHI, 2003; IM et al., 2004). YOSHIOKA et al. (2002) magasabb blasztociszta arányt tapasztalt PZM-3 tenyésztőműdium használatakor, mint NCSU-23 esetében *in vivo* eredetű embriók fejlődésének tanulmányozásakor. Saját kísérleteink során az embriófejlődés hatékonyabb volt PZM-3 műdiumban, mint NCSU-23-ban. Ugyancsak kimutattuk, hogy szignifikánsan magasabb a kikelt blasztociszták aránya PZM-3 műdiumban, 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 tenyésztőműdiumban, mint NCSU-23-ban a 7. napon, habár a 9. nap végére a különbség kiegyenlített (AGCA et al., 2006). Ezek szerint a PZM-3 műdium gyorsabb blasztociszta fejlődést és ezáltal korábbi kikelést eredményezett. Az NCSU-23 műdium a sertés embrió metabolikus és tápanyag szükségletének figyelembevételével készült (PETTERS et WELLS, 1993), míg a PZM-3 a sertés petevezető-folyadék kémiai összetétele alapján meghatározott tápoldat (YOSHIOKA et al., 2002). 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 expanzióját segítik elő, míg az esszenciális aminosavak a blasztociszták sejtszámának emelkedését eredményezik (VAN THUAN et al., 2002).

4. 2. Az embriótenyésztés alatti O₂ koncentráció és a tenyésztőműdium kölcsönhatásának vizsgálata

A második kísérletben különböző O₂ koncentrációk és tenyésztőműdiumok együttes hatását vizsgáltuk elektroporációt követő butyrolactone I kezeléssel aktivált sertés petesejtek fejlődésére.

A kifejlődött kétsejtes embriók aránya minden csoportban hasonló volt, sem a műdium típusa, sem a tenyészemény fölötti légtér O₂ koncentrációja nem gyakorolt szignifikáns hatást a kezdeti osztódásra. Ehhez hasonlóan nem találtunk különbséget alacsony és magas O₂ 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 ($p < 0,001$). Az eredményeket a 6. táblázatban mutatjuk be.

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

Médium	O ₂ konc. (%)	N	Osztódott embriók N (% $\pm$ S.E.M.)	Képződött blasztociszták N (% $\pm$ S.E.M.)	Kikelt blasztociszták N (% $\pm$ S.E.M.)
NCSU-23	20	131	96 (73,2 $\pm$ 7,1)	49 (37,5 $\pm$ 7,8) ^a	0 (0,0 $\pm$ 0,0) ^c
	5	133	98 (74,0 $\pm$ 3,7)	57 (43,2 $\pm$ 3,2) ^a	0 (0,0 $\pm$ 0,0) ^c
PZM-3	20	128	105 (82,0 $\pm$ 3,7)	76 (59,4 $\pm$ 6,6) ^b	13 (10,2 $\pm$ 2,1) ^d
	5	134	107 (79,8 $\pm$ 4,0)	82 (61,3 $\pm$ 4,9) ^b	13 (9,0 $\pm$ 3,4) ^d

^{a, b, c, d} az oszlopok adatai közötti statisztikailag igazolható szignifikáns különbségeket jelöli; ^{a,b} - $p < 0,05$; ^{c,d} - $p < 0,001$. A százalékos értékek a kiindulási petesejtek száma alapján lettek kiszámolva.

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 (7. táblázat).

7. táblázat. Az O₂ koncentráció és a tenyésztőmédium hatása a sejtszám és az apoptotikus sejtek gyakoriságára sertés parthenótákban

Médium	O ₂ konc. (%)	N	Sejtek száma blasztocisztánként	Apoptotikus sejtek aránya blasztocisztánként
			$\bar{x} \pm$ S.E.M.	% $\pm$ S.E.M.
NCSU-23	20	30	32,2 $\pm$ 2,1 ^a	5,0 $\pm$ 0,9
	5	48	34,9 $\pm$ 1,9 ^a	4,9 $\pm$ 0,5
PZM-3	20	57	44,6 $\pm$ 2,4 ^b	4,9 $\pm$ 0,6
	5	56	46,5 $\pm$ 2,4 ^b	4,9 $\pm$ 0,4

^{a, b} az oszlopok közötti statisztikailag igazolható szignifikáns különbségeket jelöli, $p < 0,001$

4. 2. 1. Eredmények értékelése, következtetések

Az oxigén koncentráció az emlősök reprodukciós traktusában $\leq 8,7\%$ körül mozog (FISHER et BAVISTER, 1993). 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 (JOHNSON et NASR-ESFAHANI, 1994). A kultivációs periódus alatti csökkentett (5%) O₂ koncentráció növelte az *in vitro* fertilizációval előállított embriók fejlődési erélyét a blasztociszta stádiumig (KITAGAWA et al., 2004), más esetekben magasabb blasztocisztánkénti sejtszámot eredményezett (KARJA et al., 2004). *In vivo* eredetű embriók esetén mindkét paraméter értéke emelkedett (YOSHIOKA et al., 2002). 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 (IM et al., 2004). Megint más esetekben sem a blasztociszta képződés aránya sem az átlagos blasztocisztánkénti sejtszám nem változott az O₂ koncentráció függvényében (BING et al., 2003). 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 (BETTS et KING, 2001). Az apoptózis vagy programozott sejthalál egy fiziológiás folyamat, mind *in vivo*, mind *in*

vitro előállított embriókban megfigyelhető (RUBIO POMAR et al., 2005). Egyes vélemények szerint szükséges, hogy korai embriók esetében az apoptotikus sejtek gyakoriságának meghatározása a minőség-értékelési protokollok részét képezze (MADDOX-HYTTELL et al., 2003). Saját kísérleteinkben nem találtunk különbséget az apoptózisos sejtek arányában sem az aktivációs módszer, sem a tenyésztőmédiüm, sem az O₂ koncentráció hatására. Az apoptózis előfordulása kísérleteinkben 5% körüli értéket mutatott, ez az arány némileg kisebb, mint arról a szakirodalom beszámol (7%; HAO et al., 2004). 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 (FUKUI et al., 1992). A haploid kromoszóma-garnitúra kimutathatóan növeli az apoptózis előfordulását a Bcl-xL gén expressziójának csökkentése és a Bak gén expressziójának növelése által (LIU et al., 2002; JEONG et al., 2005). Ezen túlmenően, a cytochalasin B védi az embriókat a tenyésztés során a fragmentálódástól (COLLAS et ROBL., 1990; KAWAHARA et al., 2002), valamint sertés esetében növelte az *in vitro* embriók blasztocisza stádiumig történő fejlődését is (CHA et al., 1997).

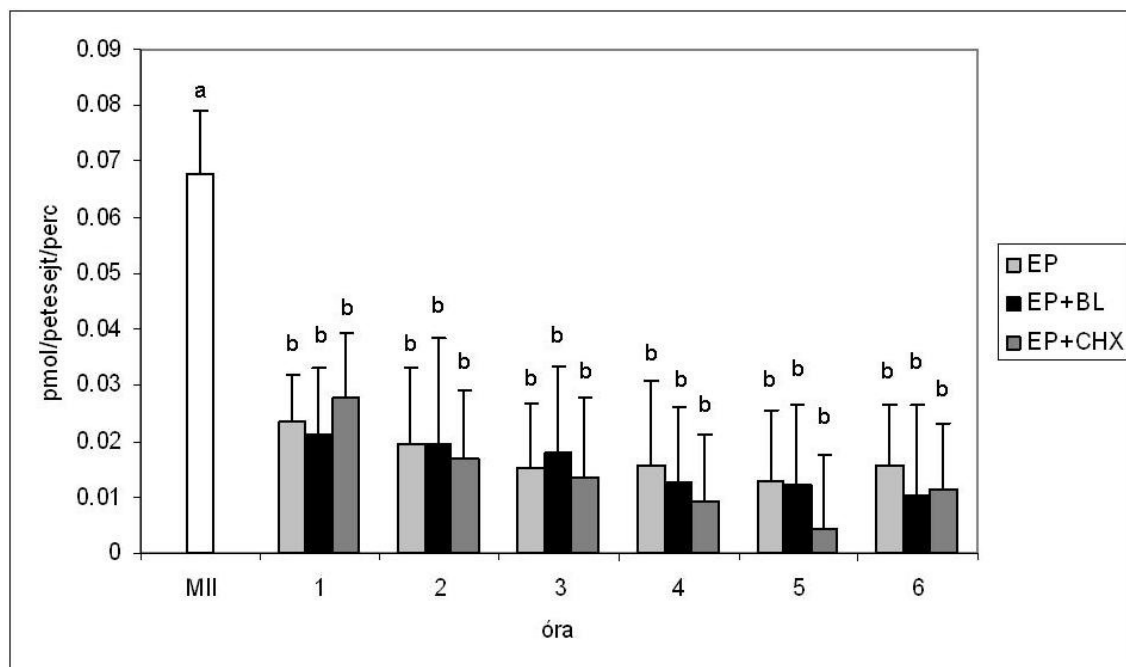
Következtetésképpen megállapíthatjuk, hogy az elektroporációval kombinált proteinszintézis- vagy speciális protein foszforiláció gátlók használata előnyösebb aktivációs stimulust szolgáltat, mely jobb blasztocisza stádiumig való fejlődést eredményez, mint az elektroporáció egyedüli alkalmazása. Kimutatható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

4. 3. 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.

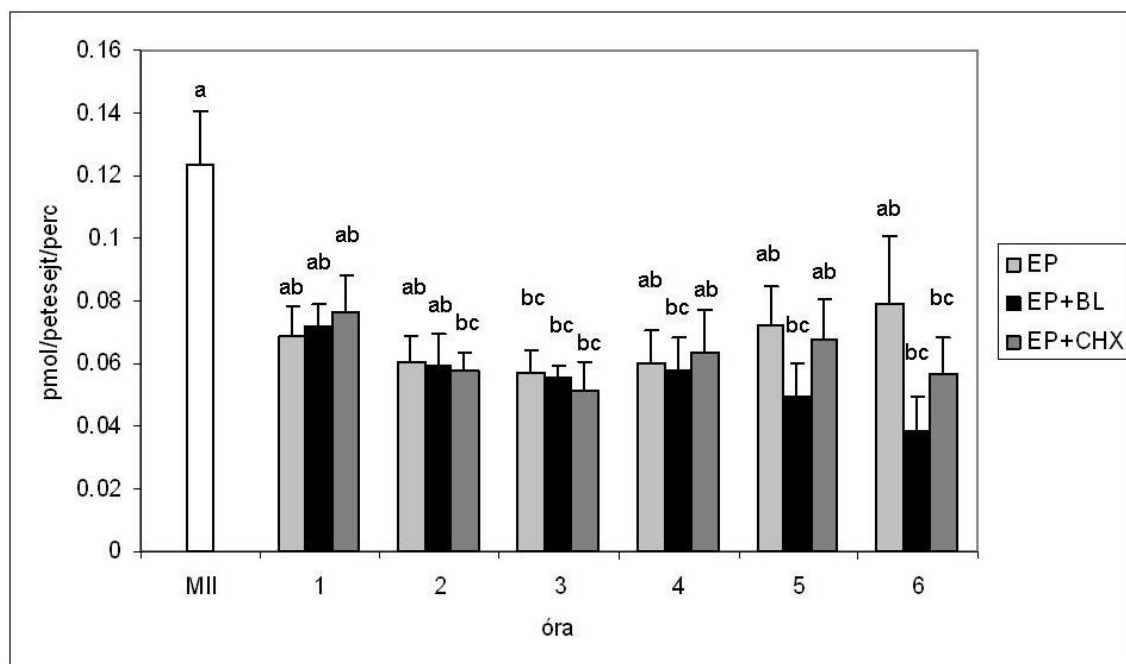
A cdc2, vagyis az MPF kezdeti, MII-es aktivitása (0,068 pmol/petesejt/perc) mindhárom aktivációs módszer esetében lecsökkent az elektromos pulzus alkalmazása után egy órával (EP: 0,024, EP+BL: 0,021, EP+CHX: 0,028 pmol/petesejt/perc; $p < 0,05$; 9. ábra). Az MPF aktivitása a csak elektroporált csoportban 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.



9. 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 MAPK kezdeti aktivitása 0,123 pmol/petesejt/perc volt (10. 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 ($p < 0,05$).

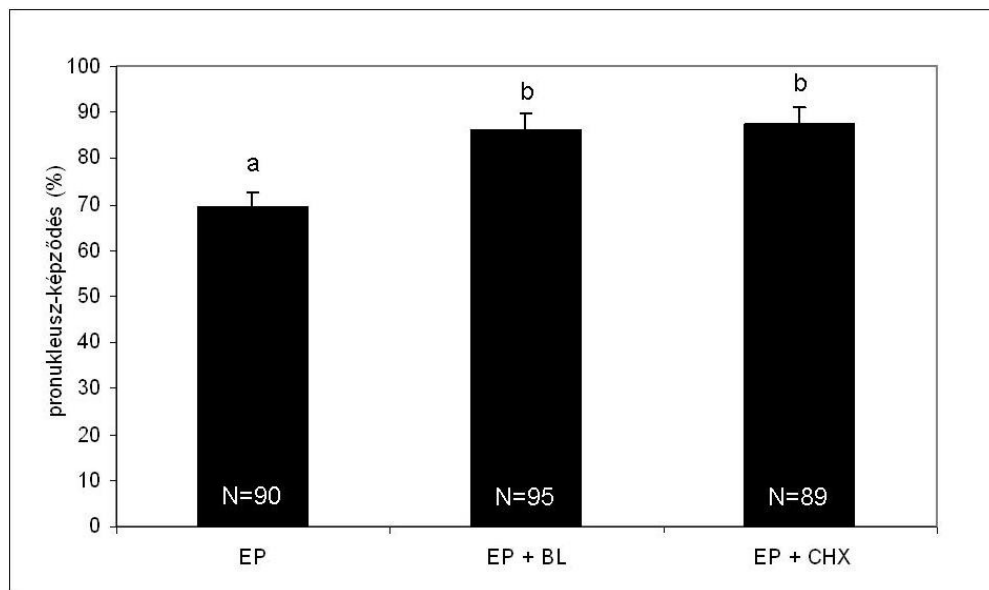


10. ábra. A MAPK aktivitásának változása a korai embriófejlődés során parthenótákban különböző aktiválási módszerek alkalmazása esetén.

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

A 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 ($p < 0,05$; 11. ábra). 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.



11. ábra. Az aktivációs módszerek hatása a pronukleusz-képződésre *in vitro* érlelt sertés petesejtekben.

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

4. 3. 1. Eredmények értékelése, következtetések

Általánosan elfogadott az a hipotézis, miszerint a Ca^{2+} 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 (MOSES et KLINE, 1995). Ennek köszönhető, hogy a proteinszintézis gátlók elősegítik a petesejt aktiválását egyes fajok, mint például egér esetében (SIRACUSA et al., 1978). *Ascidiák* petesejtjeinél a spermium indukálta Ca^{2+} hullámok szoros korrelációban vannak a ciklin lebomlásával (LEVASSEUR et

McDOUGALL, 2000). Az ismétlődő Ca^{2+} hullámoknak fontos szerepe van a ciklin szintjének hatékony csökkentésében, előidézve az MPF teljes inaktiválódását. Azonban a sertés esetében leggyakrabban alkalmazott parthenogenetikus aktiválási módszer, az elektroporáció (magas feszültségű egyenáramú pulzus alkalmazása alacsony iontartalmú médiumban) csak egyszeri Ca^{2+} szint emelkedést okoz a citoplazmában, Ca^{2+} oszcilláció nem jön létre (SUN et al., 1992). Egérben az egyszeri Ca^{2+} szint emelkedés aktiválja az idősebb petesejteket, ahol a proteinszintézis kapacitása alacsonyabb határfokú, mint a frissen ovulált petesejtekben (OZIL et SWANN, 1995). 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 (COLLAS et al., 1993b). 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+} szint emelkedések pontos száma illetve azok hatása (DUCIBELLA et al.; 2002). 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 (KOO et al., 2005). 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 az 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+} szint emelkedés amplitúdóját és hosszát (SUN et al., 1992; COLLAS et al., 1993a), 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 (NISHIZAWA et al., 1993, TUNQUIST et MALLER, 2003). 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 (FAN et SUN, 2004). Egér esetében a MAPK szerepet játszik a mikrotubulusok regulációjában valamint a magorsó létrejöttében, inaktiválódása a petesejt aktiválódása után feltétele a pronukleuszok képződésének (VERLHAC et al., 1996; SUN et al., 2001b). Fertilizáció után mesterségesen magas 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 (MOOS et al., 1996). 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 (FAN et al., 2003). 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 (PALMER et al., 1998), 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 (KITAGAWA et al., 1993), de elképzelhető, hogy egy nem-specifikus gátló hatást kifejt egyéb kinázokra, pl. a MAPK-ra is (KITAGAWA et al., 1994; DINNYÉS et al., 2000). Butyrolactone I egyedüli használata fokozatos MAPK inaktiválódást

eredményez (3 órával aktiválást követően a MAPK még aktív; KUBELKA et al., 2002), míg elektroporációt követő alkalmazása hatékonyan támogatta az embriók blasztociszta stádiumig történő fejlődését (DINNYÉS et al., 2000; BING et al., 2003).

Az elektroporáció cycloheximide kezeléssel kombinálva szintén hatásosan csökkentette a MAPK szintjét. Az így aktivált petesejteknel némi emelkedés tapasztalható 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 (SUN et al., 2001a). A hatékony parthenogenetikus petesejt aktiválás szempontjából szükséges mind a ciklin B/cdc2, mind a MAPK aktivitásának csökkentését elősegítő módszerek használata (ITO et al., 2003). 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 (NUSSBAUM et PRATHER, 1995). Ezek az eredmények egybevágnak azzal a megállapításunkkal, mely szerint a pronukleusz-képződés, az osztódott embriók aránya valamint a blasztociszta formáció szignifikánsabban magasabb volt kombinált aktivációs kezelések esetében, amikor elektroporációt követően a petesejtek proteinszintézis vagy protein kináz inhibitorokkal lettek kezelve (NÁNÁSSY et al., 2007).

Következetesül 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.

5. 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 tenyésztőoldat alkalmazása esetén a légtér magas (~20%) oxigén tartalma nem befolyasolja károsan a partenogenetikus 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 újra-aktiválódása 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.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Dolly, az első testi sejtől klónozott állat megszületése óta eltelt 10 évben sikerült minden gazdasági haszonállat esetében alkalmazni a sejtmagátültetés módszerét, de dacára az intenzív kutatásoknak a sejtmagátültetéssel módosított embriók csak mintegy 1-4%-ából lesz élő utód. Az alacsony hatékonyságért a rendszer bonyolultságából adódóan számos tényező a felelős, növelése érdekében a technika összes lépésének javítása szükséges. A petesejt mesterséges aktiválása a sejtmagátültetési klónozás fontos lépése, ami az embrionális fejlődés beindításáért felelős, gyakorlati alkalmazásán túl lehetőséget nyújt a termékenyülés alatt bekövetkező sejt- és molekuláris szintű változások tanulmányozására is. Az elmúlt évtizedekben számos eljárás került kifejlesztésre a meiotikus sejtciklus újraindítására, azonban e területen további kutatások szükségesek.

A dolgozat elkészítése során célul tűztük ki a különböző parthenogenetikus aktiválási módszerek *in vitro* érlelt sertés petesejtekre kifejtett hatásának vizsgálatát. Kísérleteink során elvégeztük a tenyésztési környezet embriófejlődésére gyakorolt hatásának értékelését, mely során összehasonlítottunk két tenyésztőmédiumot, valamint különböző oxigén koncentrációkat. Meg kívántuk vizsgálni a sejtciklus szabályozásában kulcsszerepet játszó két fehérje, az MPF (M-fázist elősegítő faktor) és MAPK (mitogen-aktivált protein kináz) aktivitás-változását az alkalmazott aktiválási módszereket követően.

Kísérleteinkhez vágóhídi petefészekből származó, *in vitro* érlelt sertés petesejteket használtunk. Három parthenogenetikus aktiválási módszer hatását vizsgáltuk. Az első módszer szerint a petesejteket két, egyenként 60 μ sec-ig tartó, 1,2 kV/cm-es feszültségű egyenáramú impulzussal aktiváltuk (EP). A második módszer alapján a petesejteket elektroporációt követően butyrolactone I (specifikus cdc2/cdk2 blokkoló) kezelésnek vetettük alá (EP+BL); míg a harmadik csoportban az elektroporációt a petesejtek cycloheximide (általános fehérjeszintézis gátló) jelenlétében történő inkubációja követte (EP+CHX). A tenyésztőmédium mindhárom aktiválási módszer esetében tartalmazott cytochalasin B-t is, ezáltal biztosítva a kifejlődő embriókban a diploid kromoszóma-szerelvény kialakulását. Az első kísérletsorozatban az aktivált petesejteket 7 napig tenyésztettük 39°C-on, 5% CO₂ szint mellett NCSU-23 illetve PZM-3

médiumban. A tenyésztés során meghatároztuk a pronukleuszt-képződést, az osztódott embriók számát, valamint a blasztocishta stádiumig jutott embriók arányát. Megállapítottuk továbbá a 7 napos blasztociszták sejtszámát és az egyes blasztocisztákban található, programozott sejthalált mutató nukleóluszok arányát is.

A második kísérletben az aktivált petesejteket PZM-3 médiumban, 5% ill. 20% O₂ koncentrációt tartalmazó légtérben inkubáltuk. Ezen embriók esetében is meghatároztuk az osztódott, a blasztocisztát képzett és a kikelt embriók arányát, valamint a blasztociszták sejtszámát és apoptotikus sejteik arányát. Egy további kísérletsorozatban meghatározásra került ezen túlmenően a különböző módszerekkel aktivált petesejtek citoplazmájában az MPF és a MAPK aktivitásának változása is az aktiválást követő 6 óra folyamán, amit a vizsgált enzimek foszfortranszferáz aktivitásának mérésével állapítottunk meg.

Kísérleteink során azt találtuk, hogy az EP+BL és az EP+CHX kezelés hatékonyabban segíti elő a pronukleusz-képződést a használt tenyésztőmédiumtól függetlenül. A protein kinázt blokkoló vagy fehérjeszintézist gátló, kombinált módszerek hatékonyabban stimuláltak embriófejlődést PZM-3 médiumban, mint az elektroporáció önmagában, ily módon magasabb fejlődést tapasztaltunk a blasztocishta stádiumig. NCSU-23 médium használata az előmag-képződés után nem engedte kibontakozni a kombinált eljárások kedvező hatását, kezeléstől függetlenül hasonló fejlődést eredményezve.

A PZM médium ezzel szemben kedvezőbb környezetet teremtett parthenogenetikusan aktivált sertés petesejtek számára a kultiváció során, ez a magasabb blasztocishta fejlődésben, magasabb sejtszámban és magasabb kikelési arányban is megmutatkozott.

PZM médiumban tenyésztve az embriókat a légtér magas (~20%) O₂ koncentrációja nem befolyásolta károsan a parthenogenetikus embriók fejlődését az 5% oxigénnyomás használatához viszonyítva. Hagyományos (5% széndioxid plusz 95% levegőt biztosító) inkubátorok használatával is hatékony embrió-előállításra nyílik lehetőség.

Az elektroporáció két egymást követő egyenáramú impulzus alkalmazásával képes az MPF aktivitásának gyors és tartós csökkentésére, azonban a MAPK kezdeti csökkenése

után annak újra-aktiválódása figyelhető meg. A MAPK aktivitásának tartósan alacsony szinten tartása megvalósítható kombinált, a proteinszintézist vagy cdc2/cdk2 kinázokat gátló inhibitorok használatával, aminek jótékony hatása megmutatkozott a jobb korai embrionális fejlődésben.

Összességében megállapíthatjuk, hogy PZM-3 médium használatával, kombinált parthenogenetikus petesejt aktiválási módszerek, függetlenül a tenyésztés alatti O₂ koncentrációtól, hatékonyan alkalmazhatók sertés sejtmagátültetési klónozási protokollok részeként.

7. SUMMARY

Since the birth of Dolly, the first animal derived from a single somatic cell, nuclear transfer has successfully been applied in all domestic animal species. However, the efficiency of the technique is still very low, only about 1 to 4% of the embryos produced are able to develop to term. This low efficiency is due mainly to the complexity of the the procedure, and in order to enhance productivity all the individual steps of the technology need to be improved. Parthenogenetic activation of oocytes is one of the most important steps during which the developmental program of the reconstructed oocyte is artificially stimulated. Oocyte activation is also a reliable tool for investigating the changes that occur during fertilization. Although extensive research has been carried out in the past decade in this field, further research is necessary for the better understanding of the regulation of the meiotic cell division.

The aim of this study was to investigate the effects of different parthenogenetic activation methods and various culture systems on the development of *in vitro*-matured porcine oocytes. We also evaluated the dynamics of the activity of cell cycle-related regulatory proteins such as MPF (M-phase promoting factor) and MAPK (Mitogen activated protein kinase) in the oocyte following different activation methods.

In vitro matured oocytes obtained from ovaries of prepubertal gilts were used for the experiments. Three different activation methods were tested. The first method included electroporation of the oocytes using two subsequent direct current pulses of 120 V/mm and 60 μ s each (EP). According to the second method, the oocytes were electroporated as described and then treated with butyrolactone I, a specific blocker of cdc2 and cdk2 kinases (EP+BL). During the third treatment, electroporated oocytes were incubated in the presence of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor for 5 hours (EP+CHX). In the case of all three treatments, the culture media was supplemented with cytochalasin B, an inhibitor of microfilament polymerization, to facilitate the formation of diploid embryos. The activated oocytes were cultured in NCSU-23 or PZM-3 media for 7 days at 39°C under 5% CO₂ in air. After the 7-day culture period the formation of pronuclei, cleaved embryos and blastocysts as well as the number of nuclei and apoptotic nuclei per blastocysts were recorded.

In the second experiment, the activated oocytes were cultured in PZM-3 medium under low (5%) or high (~20%) O₂ in the air. The frequency of cleaved embryos, blastocysts, hatched blastocysts, the number of nuclei per blastocysts and the percentage of apoptotic nuclei per blastocysts were determined. In the third experiment, changes in the activities of MPF and MAPK in the oocyte cytoplasm were evaluated after various activation treatments.

We found that electroporation induced lower percentage of pronuclear formation compared to EP+BL or EP+CHX in both media. Furthermore, in PZM-3 using protein kinase or protein synthesis inhibitors after electroporation induced greater development to the blastocyst stage than electroporation alone. The beneficial effects of protein synthesis or protein phosphorylation inhibition were not observed in NCSU-23 medium beyond the pronuclear stage, in this medium development beyond the pronuclear stage was similar after every treatment.

The PZM-3 medium proved superior to NCSU-23 in supporting development of parthenogenetic porcine embryos up to the blastocyst stage during the culture period.

During culture in PZM-3, high O₂ tension (~20%) had no detrimental effect on the development of parthenogenetic porcine embryos indicating that traditional CO₂ incubators (that provide 5% CO₂ in air) can efficiently be used for embryo production.

Electroporation by two consecutive DC pulses causes rapid and efficient MPF inactivation; however, MAPK reactivated following an initial drop in enzyme activity. After electroporation, using protein synthesis- or cdc2/cdk2 kinase inhibitors can efficiently keep MAPK activity at low levels resulting in better preimplantation embryo development.

In conclusion, electroporation combined with chemical treatments that inhibit protein synthesis or block protein phosphorylation by cdc2/cdk2 kinases provides a stimulus that triggers development to the blastocyst stage more effectively than electroporation alone in PZM-3 medium, regardless of the O₂ concentration during culture. The combined activation method can be used successfully as part of an oocyte activating scheme during porcine nuclear transfer.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. ABRIEU A., BRASSAC T., GALAS S., FISHER D., LABBE J. C., DOREE M. (1998): The polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in *Xenopus* eggs. J. Cell Sci. 111:1751-1757. p.
2. ABRIEU A., DORÉE M., FISHER D. (2001): The interplay between cyclin-B-cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. J. Cell Sci. 114:257-267. p.
3. AGCA Y., MEN H., MULLEN S. F., RILEY L. K., PRATHER R. S., CRISTER J. K. (2006): Quality of porcine embryo produced in two embryo culture media as assessed by total cell number and time course of blastocyst hatching. Reprod. Fertil. Dev. 18:85. p. (abstr.)
4. ALBERIO R., KUBELKA M., ZAKHARTCHENKO V., HAJDUCH M., WOLF E., MOTLIK J. (2000): Activation of bovine oocytes by specific inhibition of cyclin-dependent kinases. Mol. Reprod. Dev. 55:422-432. p.
5. ALBERIO R., ZAKHARTCHENKO V., MOTLIK J., WOLF E. (2001): Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. Int. J. Dev. Biol. 45:797-809. p.
6. AMANO T., MORI T., WATANABE T. (2004): Activation and development of porcine oocytes matured *in vitro* following injection of inositol 1,4,5-trisphosphate. Anim. Reprod. Sci. 80:101-112. p.
7. ANTHONY C. F. P., WAKAYAMA T., COOKE I. M., YANAGIMACHI R. (2000): Mammalian oocyte activation by the synergistic action of discrete sperm head components: induction of calcium transients and involvement of proteolysis. Dev. Biol. 217:386-393. p.

8. BALDINI V., CANS C., KNIBIEHLER M., DUCOMMUN B. (1997): Phosphorylation of human CDC25B phosphatase by CDK1-cyclin A triggers its proteasome-dependent degradation. *J. Biol. Chem.* 272:32731-32734. p.
9. BALI PAPP A., SOMFAI T., TARTAGLIONE M., VARGA E., GARDON J. C. (2005): The effect of nerve growth factor on nuclear progression of porcine oocytes during *in vitro* maturation and embryo development. *Acta Vet. Hung.* 53:91-101. p.
10. BECKMANN L. S., DAY B. N. (1993): Effects of media NaCl concentration and osmolarity on the culture of early-stage porcine embryos and viability of embryos cultured in a selected superior medium. *Theriogenology* 39:611-622. p.
11. BEN-YOSEF D., ORON Y., SHALGI R. (1993): Prolonged repetitive calcium transients in rat oocytes fertilized *in vitro* and *in vivo*. *FEBS Lett.* 331:239-242. p.
12. BERRIDGE M. J. (1993): Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* 361:315-325. p.
13. BETTS D. H., KING W. A. (2001): Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology* 55:171-191. p.
14. BING Y. Z., CHE L., HIRAO Y., TAKENOUCI N., RODRIGUEZ-MARTINEZ H., NAGAI T. (2003): Parthenogenetic activation and subsequent development of porcine oocytes activated by a combined electric pulse and butyrolactone I treatment. *J. Reprod. Dev.* 49:159-166. p.
15. BLACK J. L., ERIKSON B. H. (1968): Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *Anat. Rec.* 161:45-55.
16. BRUNET S., PAHLAVAN G., TAZLOR S., MARO B. (2003): Functionality of the spindle checkpoint during the first meiotic division of mammalian oocyte. *Reproduction* 126:443-450. p.

17. BURKE D. J. (2000): Complexity in the spindle checkpoint. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10:26-31. p.
18. BYSKOV A. G., SKAKKEBAEK N. E., STAFANGER G., PETERS H. (1977): Influence of ovarian surface epithelium and rete ovarii on follicle formation. *J. Anat.* 123:77-86. p.
19. CALLESEN H., BOOTH P. J., HOLM P. (2000): Effect of oxygen concentration on pig embryo development *in vitro*. *Theriogenology* 53:290. p. (abstr.)
20. CHA S. K., KIM N. H., LEE S. M., BAIK C. S., LEE H. T., CHUNG K. S. (1997): Effect of cytochalasin B and cycloheximide on the activation rate, chromosome constituent and *in vitro* development of porcine oocytes following parthenogenetic stimulation. *Reprod. Fertil. Dev.* 9:441-446. p.
21. CHAMBERS E. L., PRESSMAN B. C., ROSE B. (1974): The activation of sea urchin eggs by the divalent ionophores A23187 and X-537A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60:126-132. p.
22. COLEMAN T. R., DUNPHY W. G. (1994): Cdc2 regulatory factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:877-882. p.
23. COLLAS P., FISSORE., ROBL J. M., SULLIVAN E. J., BARNES F. L. (1993a): Electrically induced calcium elevation, activation and parthenogenetic development of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 34:212-223. p.
24. COLLAS P., ROBL J. M. (1990): Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol. Reprod.* 43:877-884. p.
25. COLLAS P., SULLIVAN E. J., BARNES F. L. (1993b): Histone H1 kinase activity in bovine oocytes following calcium stimulation. *Mol. Reprod. Dev.* 34:224-231. p.

26. CRAN D. G., MOOR R. M., IRVINE R. F. (1988): Initiation of the cortical reaction in hamster and sheep oocytes in response to inositol trisphosphate. *J. Cell Sci.* 91:139-144. p.
27. CREWS C. M., ERIKSON R. L. (1992): Purification of a murine protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: relationship to the fission yeast byrl gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:8205-8209. p.
28. CUTHBERTSON K. S. R., COBBOLD P. H. (1985): Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by inducing sustained oscillation in cell Ca^{2+} . *Nature* 316:541-542. p.
29. CUTHBERTSON K. S. R., WHITTINGHAM D. G., COBBOLD P. H. (1981): Free Ca^{2+} increases in exponential phases during mouse oocyte activation. *Nature* 294:754-757. p.
30. DALBY K. N., MORRICE N., CAUDWELL F. B., AVRUCH J., COHEN P. (1998): Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90rsk that are inducible by MAPK. *J. Biol. Chem.* 273:1496-1505. p.
31. DAY Y. F., VAUGHT T. D., BOONE J., CHEN S. H., PHELPS C. J., BALL S., MONAHAN J. A., JOBST P. M., McCREATH K. J., LAMBORN A. E., COWELL-LUCERO J. L., WELLS K. D., COLMAN A., POLEJAEVA I. A., AYARES D. L. (2002): Targeted disruption of the alpha 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat. Biotechnol.* 20:251-255. p.
32. DEVAULT A., FESQUET D., CAVADORE J. C., GARRIGUES A. M., LABBE J. C., LORCA T., PICARD A., PHILIPPE M., DOREE, M. (1992): Cyclin A potentiates maturation-promoting factor activation in early *Xenopus* embryo via inhibition of the tyrosine kinase that phosphorylates cdc2. *J. Cell Biol.* 118:1109-1120. p.

33. DIDION B. A., MARTIN M. J., MARKERT C. L. (1990): Parthenogenetic activation of mouse and pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 33:1165-1175. p.
34. DINNYÉS A., HIRAO Y., NAGAI T. (2000): Parthenogenetic activation of porcine oocytes by electric pulse and/or butyrolactone I treatment. *Cloning* 1:209-216. p.
35. DOBRINSKY J. R., JOHNSON L. A., RATH D. (1996): Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development *Biol. Reprod.* 55:1069-1074. p.
36. DUCIBELLA T., HUNEAU D., ANGELICHIO E., XU Z., SCHULTZ R. M., KOPF G. S., FISSORE R., MADOUX S., OZIL J. P. (2002): Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca^{2+} oscillation number. *Dev. Biol.* 250:280-291. p.
37. DUNPHY W. G., BRIZUELA L., BEACH D., NEWPORT J. (1988) The *Xenopus cdc2* protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* 54:423-431. p.
38. DUNPHY W. G., KUMAGAI A. (1991): The *cdc25* protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell* 67:189-196. p.
39. ERICKSON B. H. (1966): Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J. Anim. Sci.* 25:800-805. p.
40. EVANS J. P., KOPF G. S. (1998): Molecular mechanisms of sperm-egg interaction and egg activation. *Andrologia* 30:297-307. p.
41. FAIR T. (2003): Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim. Reprod. Sci.* 78:203–216. p.

42. FAN H Y., SUN Q Y. (2004): Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol. Reprod.* 70:535-547. p.
43. FAN H. Y., TONG C., LIAN L., LI S. W., GAO W. X., CHENG Y., CHEN D. Y., SCHATTEN H., SUN Q. Y. (2003): Characterization of ribosomal S6 protein kinase p90rsk during meiotic maturation and fertilization in pig oocytes: mitogen-activated protein kinase-associated activation and localization. *Biol. Reprod.* 68:968-977. p.
44. FISHER B., BAVISTER B. D. (1993): Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters, and rabbits. *J. Reprod. Fertil.* 99:673-679. p.
45. FISSORE R. A., DOBRINSKY J. R., BALISE J. J., DUBY R. T., ROBL J. R. (1992): Patterns of intracellular Ca^{2+} concentration in fertilized bovine eggs. *Biol. Reprod.* 47:960-969. p.
46. FISSORE R. A., ROBL J. M. (1992): Intracellular Ca^{2+} response of rabbit oocytes to electrical stimulation. *Mol. Reprod. Dev.* 32:9-16. p.
47. FISSORE R. A., ROBL J. M. (1993): Sperm, inositol trisphosphate, and thimerosal-induced intracellular Ca^{2+} elevation in rabbit eggs. *Dev. Biol.* 159:122-30. p.
48. FUKUI Y., SAWAI K., FURUDATE M., SATO N., IWAZUMI Y., OHSAKI K. (1992): Parthenogenetic development of bovine oocytes treated with ethanol and cytochalasin B after *in vivo* maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 33:357-362. p.
49. FULKA J. Jr., JUNG T., MOOR R. M. (1992): The fall of biological maturation promoting factor (MPF) and histone H1 kinase activity during anaphase and telophase in mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 32:378-382. p.

50. FUN H. Y., SUN Q. Y. (2004): Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol. Reprod.* 70:535-547. p.
51. GABRIELLI B. G., CLARK J. M., McCORMACK A. K., ELLEM K. A. O. (1997): Hyperphosphorylation of the N-terminal domain of Cdc25 regulates activity toward cyclin B1/Cdc2 but not cyclin A/Cdk2. *J. Biol. Chem.* 272:28607-28614. p.
52. GAUTIER J., MALLER J. L. (1991a): Cyclin B in *Xenopus* oocytes: implication for the mechanism of pre-MPF activation. *EMBO J.* 10:177-182. p.
53. GAUTIER J., MATSUKAWA T., NURSE P., MALLER J. (1989): Dephosphorylation and activation of *Xenopus* p34cdc2 protein kinase during the cell cycle. *Nature* 339:626-629. p.
54. GAUTIER J., SOLOMON M. J., BOOMER R. N., BAZAN J. F., KIRSCHNER M. W. (1991b): Cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34^{cdc2}. *Cell* 67:197-211. p.
55. GLOVER D. M., HAGAN I. M., TAVARES A. A. (1998): Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. *Genes. Dev.* 12:3777-3787. p.
56. HAMPL A., EPPIG J. J. (1995): Analysis of the mechanism(s) of the metaphase I arrest in maturing mouse oocytes. *Development* 121:925-933. p.
57. HAO Y., LAI L., MAO J., IM G. S., BONK A., PRATHER R. S. (2004): Apoptosis in parthenogenetic preimplantation porcine embryos. *Biol. Reprod.* 70:1644-1649. p.

58. HASHIMOTO N., KISHIMOTO T. (1988): Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Dev. Biol.* 126:242-52. p.
59. HATANAKA Y., NAGAI T., TOBITA T., NAKANO M. (1992): Changes in the properties and composition of zona pellucida of pigs during fertilization *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 95:431-440. p.
60. HUANG W., KESSLER D. S., ERIKSON R. L. (1995): Biochemical and biological analysis of Mek1 phosphorylation site mutant. *Mol. Biol. Cell* 6:237-245. p.
61. HUNT T. (1991): Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. *Semin. Cell Biol.* 2:213-222. p.
62. HUNTER M. G. (2000): Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Rev. Reprod.* 5:122-130. p.
63. HUO L. J., FAN H. Y., ZHONG Z. S., CHEN D. Y., SCHATTEN H., SUN Q. Y. (2004): Ubiquitin-proteasome pathway modulates mouse oocyte meiotic maturation and fertilization via regulation of MAPK cascade and cyclin B1 degradation. *Mech. Dev.* 121:1275-1287. p.
64. HYSLOP L. A., NIXON V. L., LEVASSEUR M., CHAPMAN F., CHIBA K., McDOUGALL A., VENABLES J. P., ELLIOTT D. J., JONES K. T. (2004): Ca^{2+} -promoted cyclin B1 degradation in mouse oocytes requires the establishment of a metaphase arrest. *Dev. Biol.* 269:206-219. p.
65. IBANEZ E., ALBERTINI D. F., OVERSTROM E. W. (2005): Effect of genetic background and activating stimulus on the timing of meiotic cell cycle progression in parthenogenetically activated oocytes. *Reproduction* 129:27-38. p.

66. IKEDA K., TAKAHASHI Y. (2003): Comparison of maturational parameters of oocytes recovered from prepubertal and adult pigs. *Reprod. Fert. Dev.* 15:215-221. p.
67. ILYIN V., PARKER I. (1992): Effects of alcohols on responses evoked by inositol triphosphate in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 448:339-354. p.
68. IM G. S., LAI L., LIU Z., HAO Y., WAX D., BONK A., PRATHER R.S. (2004): *In vitro* development of preimplantation porcine nuclear transfer embryos cultured in different media and gas atmospheres. *Theriogenology* 61:1125-1135. p.
69. ITO J., SHIMADA M., TERADA T. (2003): Effect of protein kinase C activator on mitogen-activated protein kinase and p34^{cdc2} kinase activity during parthenogenetic activation of porcine oocytes by calcium ionophore. *Biol. Reprod.* 69:1675-1682. p.
70. JAFFE L. F. (1983): Sources of calcium in egg activation: a review and a hypothesis. *Dev. Biol.* 99:256-276. p.
71. JAFFE L. F. (1985): The role of calcium explosions, and pulses in activating eggs. In *Biology of Fertilization* (Metz CB and Monroy A. eds); pp. 127-165, Academic Press
72. JEONG Y. J., CUI X. S., KIM B. K., KIM I. H., KIM T., CHUNG Y. B., KIM N. H. (2005): Haploidy influences Bak and Bcl-xL mRNA expression and increases incidence of apoptosis in porcine embryos. *Zygote* 13:17-21. p.
73. JOHNSON M. H., NASR-ESFAHANI M. H. (1994): Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? *Bioessays* 16:31-38. p.

74. JONES K. T. (1998): Ca^{2+} oscillations in the activation of the egg and development of the embryo in mammals. *Int. J. Dev. Biol.* 42:1-10. p.
75. JONES K. T. (2004): Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Mol. Hum. Reprod.* 10:1-5. p.
76. JONES K. T. (2005): Mammalian egg activation: from Ca^{2+} spiking to cell cycle progression. *Reproduction* 130:813-823. p.
77. JONES K. T., CARROLL J., MERRIMAN J. A., WHITTINGHAM D. G., KONO T. (1995): Repetitive sperm-induced Ca^{2+} transients in mouse oocytes are cell cycle dependent. *Development* 121:3259-3266. p.
78. JONES K. T., MATSUDA M., PARRINGTON J., KATAN M., SWANN K. (2000): Different Ca^{2+} realising abilities of sperm extracts compared with tissue extracts and phospholipase C isoform in sea urchin egg homogenate and mouse eggs. *Biochem. J.* 346:743-749. p.
79. JONES K. T., SOELLER C., CANNELL M. B. (1998): The passage of Ca^{2+} and fluorescent markers between the sperm and egg after fusion in the mouse. *Development* 125:4627-4635. p.
80. KARJA N. W., WONGSRIKEAO P., MURAKAMI M., AGUNG B., FAHRUDIN M., NAGAI T., OTOI T. (2004): Effect of oxygen tension on the development and quality of porcine *in vitro* fertilized embryos. *Theriogenology* 62:1585-1595. p.
81. KAUFMAN M. H. (1979): Mammalian parthenogenetic development. *Bibliography (with review). Bib. Reprod.* 33:261-264; 341-343. p.
82. KAWAHARA M., MORI T., TANAKA H., SHIMIZU H. (2002): The suppression of fragmentation by stabilization of actin filament in porcine enucleated oocytes. *Theriogenology* 58:1081-1095. p.

83. KAWAMURA T. (1939): Artificial parthenogenesis in frog. I. Chromosome numbers and their relation to cleavage histories. J. Sci. Hiroshima. Univ. B. Div. 1. 6:115-218. p.
84. KING R. W., DESHAIES R. J., PETERS J. M., KIRSCHNER N. W. (1996): How proteolysis drives the cell cycle. Science 274:1652-1659. p.
85. KINOSITA K., TSONG Y. T. (1977): Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane. Nature 268:438-441. p.
86. KISHIMOTO T. (1999): Activation of MPF at meiosis reinitiation in starfish oocytes. Dev. Biol. 214:1-8. p.
87. KISHIMOTO T. (2003): Cell-cycle control during meiotic maturation. Curr. Opin. Cell Biol. 15:654-663. p.
88. KITAGAWA M., HIGASHI H., TAKAHASHI I. S., OKABE T., OGINO H., TAYA Y., HISHIMURA S., OKUYAMA A. (1994): A cyclin-dependent kinase inhibitor, butyrolactone I, inhibits phosphorylation of RB protein and cell cycle progression. Oncogene 9:2549-2557. p.
89. KITAGAWA M., OKABE T., OGINO H., MATSUMOTO H., SUZUKI-TAKAHASHI I., KOKUBO T., HIGASHI H., SAITOH S., TAYA Y., YASUDA H., OHBA Y., NISHIMURA S., TANAKA N., OKUYAMA A. (1993): Butyrolactone I, a selective inhibitor of cdk2 and cdc2 kinase. Oncogene 8:2425-2432. p.
90. KITAGAWA Y., SUZUKI K., YONEDA A., WATANABE T. (2004): Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. Theriogenology 62:1186-1197. p.

91. KLINE D., KLINE J. T. (1992): Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev. Biol.* 149:80-89. p.
92. KOO D., CHAE J. I., KIM J. S., WEE G., SONG B. S., LEE K. K., HAN Y. M. (2005): Inactivation of MPF and MAP kinase by single electrical stimulus for parthenogenetic development of porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 72:542-549. p.
93. KRAGH P. M., DU Y., CORYDON T. J., PURUP S., BOLUND L., VAJTA G. (2005): Efficient *in vitro* production of porcine blastocysts by handmade cloning with a combined electrical and chemical activation. *Theriogenology* 64:1536-1545. p.
94. KOPF G. S., ENDO Y., MATTEI P., KURASAWA S., SCHULTZ R. M. (1989): Egg-induced modification of the murine zona pellucida. In "Mechanisms of egg activation." (Eds R. Nuccitelli, G.N. Cherr, W.H. Clark Jr.) pp. 249-272. p. (Plenum Press: New York.)
95. KUBELKA M., ANGER M., PAVLOK A., KALOUS J., SCHULTZ R. M., MOTLIK J. (2002): Activation of pig and cattle oocytes by butyrolactone I: morphological and biochemical study. *Zygote* 10:47-57. p.
96. KUMAGAI A., DUNPHY W. G. (1996): Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts. *Science* 273:1377-1380. p.
97. KUROKAWA M., SATO K., FISSORE R. A. (2004): Mammalian fertilization: from sperm factor to Phospholipase C ζ . *Biol. Cell* 96:37-45. p.
98. LAI L. X., KOLBER-SIMONDS D., PARK K. W., CHEONG H. T., GREENSTEIN J. L., IM G. S., SAMUEL M., BONK A., RIEKE A., DAY B. N., MURPHY C. N., CARTER D. B., HAWLEY R. J., PRATHER R. S.

- (2002b): Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295:1089-1092. p.
99. LAI L. X., PARK K. W., CHEONG H. T., KUHHLER B., SAMUEL M., BONK A., IM G. S., RIEKE A., DAY B. N., MURPHY C. N., CARTER D. B., PRATHER R. S. (2002a): Transgenic pig expressing the enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicine-treated fibroblasts as donor cells. *Mol. Reprod. Dev.* 62:300-306. p.
100. LAI L., PRATHER R. S. (2003): Production of cloned pigs by using somatic cells as donors. *Cloning Stem Cells* 5:233-241. p.
101. LAI L. X., TAO T., MACHÁTY Z., KUHHLER B., SUN Q. Y., PARK K. W., DAY B. N., PRATHER R. S. (2001): Feasibility of producing porcine nuclear transfer embryos by using G2/M-stage fetal fibroblast as donors. *Biol. Reprod.* 65:1558-1564. p.
102. LEE J. W., TIAN X. C., YANG X. (2004): Optimization of parthenogenetic activation protocol in porcine. *Mol. Reprod. Dev.* 68:51-57. p.
103. LEE J. W., WU S. C., TIAN X. C., BARBER M., HOAGLAND T., RIESEN J., LEE K. H., TU C. F., CHENG W. T., YANG X. (2003): Production of cloned pigs by whole-cell intracytoplasmic microinjection. *Biol. Reprod.* 69, 995-1001. p.
104. LEDAN E., POLANSKI Z., TERRET, M. E., MARO B. (2001): Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. *Dev. Biol.* 232:400-413. p.
105. LEVASSEUR M., McDOUGALL A. (2000): Sperm-induced calcium oscillations at fertilization in ascidians are controlled by cyclin B1-dependent kinase activity. *Development* 127:631-641. p.

106. LEVESQUE J. T., SIRARD M. A. (1996): Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B in bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 55:1427-1436. p.
107. LILLIE F. R. (1919): Problems of Fertilization. The University of Chicago Press, Chicago, IL.
108. LIU L., JU J. C., YANG X. (1998): Differential activation of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 59:537-545. p.
109. LIU L., TRIMARCHI J. R., KEEFE D. L. (2002): Haploidy but not parthenogenetic activation leads to increased incidence of apoptosis in mouse embryos. *Biol. Reprod.* 66:204-210. p.
110. LOHKA M. J., HAYES M. K., MALLER J. L. (1998): Purification of maturation promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:3009-3013. p.
111. LOI P., LEDDA S., FULKA Jr. J., CAPPAL P., MOOR R. M. (1998): Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. *Biol. Reprod.* 58:1177-1187. p.
112. LORCA T., CRUZALEGUI F. H., FESQUET D., CAVADORE J. C., MERY J., MEANS A., DOREE M. (1993): Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* 366:270-273. p.
113. LORCA T., GALAS S., FESQUET D., DEVAULT A., CAVADORE J. C., DOREE M. (1991): Degradation of the proto-oncogene product p39mos is not necessary for cyclin proteolysis and exit from meiotic metaphase requirement for a Ca^{2+} -calmodulin dependent event. *EMBO J.* 10:2087-2093. p.

114. MACHÁTY Z. (2006): Activation of oocytes after nuclear transfer. *Methods Mol. Biol.* 348:43-58. p.
115. MACHÁTY Z., BONDIOLI K. R., RAMSOONDAR J. J., FODOR W. L. (2002): The use of nuclear transfer to produce transgenic pigs. *Cloning Stem Cells* 4:21-27. p.
116. MACHÁTY Z., DAY B. N., PRATHER R. S. (1998): Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Reprod.* 59:451-455. p.
117. MACHÁTY Z., FUNAHASHI H., DAY B. N., PRATHER R. S. (1997): Developmental changes in the intracellular Ca^{2+} release mechanisms in porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 56:921-930. p.
118. MACHÁTY Z., FUNAHASHI H., MAYES M. A., DAY B. N., PRATHER R. S. (1996): Effects of injecting calcium chloride into *in vitro*-matured porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 54:316-322. p.
119. MACHÁTY Z., PRATHER R. S. (1998): Strategies for activating nuclear transfer oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.* 10:599-613. p.
120. MADDOX-HYTTELL P., GJORRET J. O., VAJTA G., ALEXOPOULOS N. I., LEWIS I., TROUNSON A., VIUFF D., LAURINCIK J., MULLER M., TVEDEN-NYBORG P., THOMSEN P. D. (2003): Morphological assessment of preimplantation embryo quality in cattle. *Reprod. Suppl.* 61:103-116. p.
121. MALCUIT C., KUROKAWA M., FISSORE R. A. (2006): Calcium oscillation and mammalian egg activation. *J. Cell Physiol.* 206:565-573. p.
122. MASUI Y. (2001): From oocyte maturation to the *in vitro* cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). *Differentiation* 69:1-17. p.

123. MASUI Y., MARKERT C. L. (1971): Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 177:129-145. p.
124. MEO S. C., LEAL C. L., GARCIA J. M. (2004): Activation and early parthenogenesis of bovine oocytes treated with ethanol and strontium. *Anim. Reprod. Sci.* 81:35-46. p.
125. MICHAEL, W. M., NEWPORT, J. (1998): Coupling of mitosis to the completion of S phase through Cdc34-mediated degradation of Wee1. *Science* 282:1886-1889. p.
126. MOOR R. M., MATTIOLI M., DING J., NAGAI T. (1990): Maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 40:197-210. p.
127. MOOS J., XU Z., SCHULTZ R. M., KOPF G. S. (1996): Regulation of nuclear envelope assembly/disassembly by MAP kinase. *Dev. Biol.* 175:358-361. p.
128. MORGAN A., JACOB R. (1994): Ionomycin enhances Ca^{2+} influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochem. J.* 300:665-672. p.
129. MOSES R. M., KLINE D. (1995): Release of mouse eggs from metaphase arrest by protein synthesis inhibition in the absence of a calcium signal or microtubule assembly. *Mol. Reprod. Dev.* 41:264-273. p.
130. MOTLIK J., PAVLOK A., KUBELKA M., KALOUS J., KALAB P. (1998): Interplay between cdc2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology* 49:461-469. p.
131. MYAZAKI S., HASHIMOTO N., YOSHIMOTO Y., KISHIMOTO T., IGUSA Y., HIRAMOTO Y. (1986): Temporal and spatial dynamics of the periodic increase in intracellular free calcium at fertilization of golden hamster eggs. *Dev. Biol.* 118:259-267. p.

132. MYAZAKI S., ITO M. (2006): Calcium signals for egg activation in mammals. J. Pharmacol. Sci. 100:545-552. p
133. NAGAI T. (1987): Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes *in vitro* with ethanol. Gamete Res. 16:243-249. p.
134. NAKADA K., MIZUNO J. (1998): Intracellular calcium responses in bovine oocytes induced by spermatozoa and by reagents. Theriogenology 50:269-282. p.
135. NÁNÁSSY L., LEE K., JÁVOR A., MACHÁTY Z. (2007): Effects of activation methods and culture conditions on development of parthenogenetic porcine embryos. Anim. Reprod. Sci. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.01.019
136. NEANT I., GURRIER P. (1988): Meiosis reinitiation in the mollusc *Patella vulgata*. Regulation of MPF, CSF and chromosome condensation activity by intracellular pH, protein synthesis and phosphorylation. Development 102:505-516. p.
137. NEBRED A. R., FERBY I. (2000): Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. Curr. Opin. Cell Biol. 12:666-675. p.
138. NEBRED A. R., HUNT T. (1993): The c-mos proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell-free extracts of *Xenopus* oocytes and eggs. EMBO J. 12:1979-1986. p.
139. NISHIZAWA. M., FURUNO N., OKAZAKI K., TANAKA H., OGAWA Y., SAGATA N. (1993): Degradation of Mos by the N-terminal proline (Pro2)-dependent ubiquitin pathway on fertilization of *Xenopus* eggs: possible significance of natural selection for Pro2 in Mos. EMBO J. 12:4021-4027. p.
140. NIGG, E. A. (1998): Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish. Curr. Opin. Cell Biol. 10:776-783. p.

141. NIXON V. L., LEVASSEUR M., McDOUGALL A., JONES K. T. (2002): Ca^{2+} oscillation promote APC/C-dependent cyclin B1 degradation during metaphase arrest and completion of meiosis in fertilizing mouse eggs. *Curr. Biol.* 12:746-750. p.
142. NURSE P. (1990): Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344:503-508. p.
143. NUSSBAUM D. J., PRATHER R. S. (1995): Differential effects of protein synthesis inhibitors on porcine oocyte activation. *Mol. Reprod. Dev.* 41:70-75. p.
144. OZIL J. P., SWANN K. (1995): Stimulation of repetitive calcium transients in mouse eggs. *J. Physiol.* 483(Pt 2):331-346. p.
145. PALMER A., GAVIN A. C., NEBRED A. R. (1998): A link between MAP kinase and p34^{cdc2}/cyclin B during oocyte maturation: p90^{rsk} phosphorylates and inactivates the p34^{cdc2} inhibitory kinase Myt1. *EMBO J.* 17:5037-5047. p.
146. PALMER A., NEBRED A. R. (2000): The activation of MAP kinase and p34cdc2/cyclin B during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *Prog. Cell Cycle Res.* 4:131-143. p.
147. PARK K. W., CHEONG H. T., LAI L. X., IM G. S., KUHHLER B., BONK A., SAMUEL M., RIEKE A., DAY B. N., MURPHY C. N., CARTER D. B., PRATHER R. S. (2001): Production of nuclear transfer-derived swine that express the enhanced green fluorescent protein. *Anim. Biotechnol.* 12:173-181. p.
148. PATTERSON L., DeSOUZA P., RITCHIE W., KING T., WILMUT I. (2003): Application of reproductive biotechnology in animals: implications and potentials. *Application of reproductive cloning. Anim. Reprod. Sci.* 79:137-143. p.

149. PETERS J. M. (2002): The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell* 9:931-943. p.
150. PETTERS R. M., WELLS K. D. (1993): Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 48:61-73. p.
151. PINCUS G., ENZMANN E. V. (1935): The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Zool.* 62:665-675. p.
152. PINES J. (2006): Mitosis: a matter of getting rid of the right protein at the right time. *Trends Cell Biol.* 16:51-63. p.
153. POLEJAEVA I. A., CHEN S. H., VAUGHT T. D., PAGE R. L., MULLINS J., BALL S., DAI Y. F., BOONE J., WALKER S., AYARES D. L., COLMAN A., CAMPBELL K. H. (2000): Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407, 86-90. p.
154. POSADA J., YEW N., AHN N. G., VANDE WOUNDE G. F., COOPER J. A. (1993): Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activated MAP kinase kinase *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* 13:2546-2553. p.
155. PRATHER R. S., HAWLEY R. J., CARTER D. B., LAI L., GREENSTEIN J. L. (2003): Transgenic swine for biomedicine and agriculture. *Theriogenology* 59:115-123. p.
156. PRATHER R. S., TAO T., MACHÁTY Z. (1999): Development of the techniques for nuclear transfer in pigs. *Theriogenology* 51:487-498, p.
157. RAMSOONDAR J. J., MACHATY Z., COSTA C., WILLIAMS B. L., FODOR W. L., BONDIOLI K. R. (2003): Production of α 1,3-galactosyltransferase-knockout cloned pigs expressing human α 1,2-fucosyltransferase. *Biol. Reprod.* 69:437-445. p.

158. RÁTKY J., BRUSSOW K. P., EGERSEGI I., TORNER H., SCHNEIDER F., SOLTÍ L., MANABE N. (2005b): Comparison of follicular and oocyte development and reproductive hormone secretion during the ovulatory period in Hungarian native breed, Mangalica, and Landrace gilts. *J. Reprod. Dev.* 51:427-432. p.
159. RÁTKY J., RATH D., BRUSSOW K. P. (2003): *In vitro* fertilisation of *in vitro* matured porcine oocytes obtained from prepubertal gilts at different time intervals after hCG injection. *Acta Vet. Hung.* 51:95-101. p.
160. RÁTKY J., TORNER H., EGERSEGI I., SCHNEIDER F., SARLOS P., MANABE N., BRUSSOW K. P. (2005a): Ovarian activity and oocytes development during follicular development in pigs at different reproductive phases estimated by the repeated endoscopic method. *J. Reprod. Dev.* 51:109-115. p.
161. RICKORDS L. F., WHITE K. L. (1992): Electrofusion-induced intracellular Ca^{2+} flux and its effect on murine oocyte activation. *Mol. Reprod. Dev.* 31:152-159. p.
162. ROBL J. M., FISSORE R. A., COLLAS P., DUBY R. T. (1992): Cell fusion and oocyte activation. In *Proceedings of the Symposium on Cloning Mammals by Nuclear Transplantation*. (Ed. G. E. Siedel) pp. 24-25. p.
163. RUBIO POMAR F. J., TEERDS K. J., KIDSON A., COLENBRANDER B., THARASANIT T., AGUILAR B., ROELEN B. A. (2005): Differences in the incidence of apoptosis between *in vivo* and *in vitro* produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology* 63:2254-2268. p.
164. RUNFT L. L., JAFFE L. A., MEHLMANN L. M. (2002): Egg activation at fertilization: where it all begins. *Dev. Biol.* 245:237-254. p.
165. SAGATA N. (1997): What does Mos do in oocytes and somatic cells? *Bioessays* 19:13-21. p.

166. SAGATA N., OSKARSSON M., COPELAND T., BRUMBAUGH J., VANDE WOUNDE G F. (1988): Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Nature* 335:519-525. p.
167. SAGATA N., WATANABE N., VANDE WOUNDE G. F., IKAWA Y. (1989): The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* 342:512-518. p.
168. SANTELLA L., LIM D., MOCCIA F. (2004): Calcium and fertilization: the beginning of life. *Trends Biochem. Sci.* 29:400-407. p.
169. SAUNDERS C. M., LARMAN M. G., PARRINGTON J., COX L. J., ROYSE J., BLAYNEY L. M., SWANN K., LAI F. A. (2002): PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillation in eggs and embryo development. *Development* 129:3533-3544. p.
170. SCHMIDT A., RAUH N. R., NIGG E. A., MAYER T. U. (2006): Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold. *J. Cell Sci.* 119:1213-1218. p.
171. SCHULTZ R. M., KOPF G. S. (1995): Molecular basis of mammalian egg activation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 30:21-62. p.
172. SCHWAB M. S., ROBERTS B. T., GROSS S. D., TUNQUIST B. J., TAIEB F. E., LEWELLYN A. L., MALLER J. L. (2001): Bub1 is activated by the protein kinase p90^{Rsk} during *Xenopus* oocyte maturation. *Curr. Biol.* 11:141-150. p.
173. SERPERSU E. H., KINOSITA K. Jr., TSONG T. Y. (1985): Reversible and irreversible modification of erythrocyte membrane by electric field. *Biochim. Biophys. Acta* 812:779-785. p.
174. SHARMA A., NAZIRUDDIN B., CUI C., MARTIN M. J., XU H., WAN H., LEI Y., HARRISON C., YIN J., OKABE J., MATHEWS C., STARK A., ADAMS C. S., HOUTS J., WISEMAN B. S., BYRNE G. W., LOGAN J. S.

- (2003): Pig cells that lack the gene for alpha 1,3 galactosyltransferase express low levels of the gal antigen. *Transplantation* 75:430-436. p.
175. SIRACUSA G., WHITTINGHAM D. G., MOLINARO M., VIVARELLI E. (1978): Parthenogenetic activation of mouse oocytes induced by inhibitors of protein synthesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 43:157-166. p.
176. SIRARD M. A., FLORMAN H. M., LEIBFRIED-RUTLEDGE M. L., BARNES F. L., SIMS M. L., FIRST N. L. (1989): Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 40:1257-1263. p.
177. SMITH V. A., MEDEMA R. H. (2001): Checking out the G₂/M transition. *Biochim. Biophys. Acta* 1519:1-12. p.
178. STEINHARDT R. A., EPEL D. (1974): Activation of sea-urchin eggs by a calcium ionophore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71:1915-1919. p.
179. STEINHARDT R. A., EPEL D., CARROLL E. J. Jr., YANAGIMACHI R. (1974): Is calcium ionophore a universal activator for unfertilized eggs? *Nature* 252:41-43. p.
180. STICKER S. A. (1999): Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Dev. Biol.* 211:157-176. p.
181. STURGILL T. W., RAY L. B., ERIKSON E., MALLER J. L. (1988): Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature* 334:715-718. p.
182. SUN F. Z., BRADSHAW J. P., GALLI C., MOOR R. M. (1994): Changes in intracellular calcium concentration in bovine oocytes following penetration by spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 101:713-719. p.

183. SUN F. Z., HOYLAND J., HUANG X., MASON W., MOOR R. M. (1992): A comparison of intracellular changes in porcine eggs after fertilization and electroporactivation. *Development* 115:947-956. p.
184. SUN Q. Y., BREITBART H., SCHATTEN H. (1999a): Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells. *Reprod. Fertil. Dev.* 11:443-450. p.
185. SUN Q. Y., LAI L., BONK A., PRATHER R. S., SCHATTEN H. (2001a): Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo developmental potential of porcine oocytes: effects of gonadotropins, cumulus cells, follicular size, and protein synthesis inhibition. *Mol. Reprod. Dev.* 59:192-198. p.
186. SUN Q. Y., LAI L., WU G. M., PARK K. W., DAY B. N., PRATHER R. S., SCHATTEN H. (2001b): Microtubule assembly after treatment of pig oocytes with taxol: correlation with chromosomes, gamma-tubulin, and MAP kinase. *Mol. Reprod. Dev.* 60:481-490. p.
187. SUN Q. Y., NAGAI T. (2003): Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *J. Reprod. Dev.* 49:347-359. p.
188. SUN Q. Y., RUBINSTEIN S., BREITBART H. (1999b): MAP kinase activity is downregulated by phorbol ester during mouse oocyte maturation and egg activation *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 52:310-318. p.
189. SWANN K., OZIL J. P. (1994): Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *Int. Rev. Cytol.* 152:183-222. p.
190. SZÖLLÖSI D. (1967): Development of cortical granules and the cortical reaction in rat and hamster eggs. *Anat. Rec.* 159, 431-446. p.
191. TAIEB F. E., GROSS S. D., LEWELLYN A. L., MALLER J. L. (2001): Activation of the anaphase-promoting complex and degradation of cyclin B is

- not required for progression from Meiosis I to II in *Xenopus* oocytes. Curr. Biol. 11:508-513. p.
192. TUNQUIST B. J., EYERS P. A., CHEN L. G., LEWELLYN A. L., MALLER J. L. (2003): Spindle checkpoint proteins Mad1 and Mad2 are required for cytostatic factor-mediated metaphase arrest. J. Cell Biol. 163:1231-1242. p.
193. TUNQUIST B. J., MALLER J. L. (2003): Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. Genes Dev. 17:683-710. p.
194. TUNQUIST B. J., SCHWAB H. S., CHEN L. G., MALLER J. L. (2002): The spindle checkpoint kinase bub1 and cyclin E/cdk2 both contribute to the establishment of meiotic metaphase arrest by cytostatic factor. Curr. Biol. 12:1027-1033. p.
195. UEHARA T., YANAGIMACHI R. (1977): Activation of hamster eggs by pricking. J. Exp. Zool. 199:269-274. p.
196. UHLMANN F. (2004): The mechanism of sister chromatid cohesion. Exp. Cell Res. 296:80-85. p.
197. VAJTA G., GJERRIS M. (2006): Science and technology of farm animal cloning: state of the art. Anim. Reprod. Sci. 92:211-230. p.
198. VAN THUAN N., HARAYAMA H., MIYAKE M. (2002): Characteristics of preimplantational development of porcine parthenogenetic diploids relative to the existence of amino acids *in vitro*. Biol. Reprod. 67:1688-1698. p.
199. VARGA E., GARDON J. C., PAPP A. B. (2006): Effect of open pulled straw (OPS) vitrification on fertilisation rate and developmental competence of porcine oocytes. Acta Vet. Hung. 54:107-116. p.
200. VERLHAC M. H., KUBIAK J. Z., WEBER M., GERAUD G., COLLEDGE W. H., EVANS M. J., MARO B. (1996): Mos is required for MAP kinase

- activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development* 122:815-822. p.
201. VITULLO A. D., OZIL J. P. (1992): Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear formation during mouse oocyte activation. *Dev. Biol.* 151:128-136. p.
202. WAKAYAMA T., PERRY A. C., ZUCCOTTI M., JOHNSON K. R., YANAGIMACHI R. (1998): Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394:369-374. p.
203. WEHREND A., MEINECKE B. (2001): Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during *in vitro* maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. *Anim. Reprod. Sci.* 66:175-184. p.
204. WHITAKER M. J., SWANN K. (1993): Lighting the fuse at fertilization. *Development* 177:1-12. p.
205. WHITAKER M. (2006): Calcium at fertilization and in early development. *Physiol. Rev.* 86:25-88. p.
206. WHITTINGHAM D. G., SIRACUSA G. (1978): The involvement of calcium in the activation of mammalian oocytes. *Exp. Cell Res.* 113:311-317. p.
207. WILMUT I., SCHNIEKE A. E., McWHIR J., KIND A. J., CAMPBELL, K. H. (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813. p.
208. WRIGHT R. W. Jr. (1977): Successful culture *in vitro* of swine embryos to the blastocyst stage. *J. Anim. Sci.* 44:854-858. p.

209. WYRICK R. E., NISHIHARA T., HEDRICK J. L. (1974): Agglutination of jelly coat and cortical granule components and the block to polyspermy in the amphibian *Xenopus laevis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71:2067-2071. p.
210. YAO L. J., FAN H. Y., TONG C., CHEN D. Y., SCHATTEN H., SUN Q. Y. (2003): Polo-like kinase-1 in porcine oocyte meiotic maturation, fertilization and early embryonic mitosis. Cell. Mol. Biol. 49:399-405. p.
211. YI Y. J., PARK C. S. (2005): Parthenogenetic development of porcine oocytes treated by ethanol, cycloheximide, cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine. Anim. Reprod. Sci. 86:297-304. p.
212. YOSHIOKA K., SUZUKI C., TANAKA A., ANAS I. M., IWAMURA S. (2002): Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. Biol. Reprod. 66:112-119. p.
213. ZAKHARTCHENKO V., ALBERIO R., STOJKOVIC M., PRELLE K., SCHERNHANER W., STOJKOVIC P., WENIGERKIND H., WANKE R., DÜCHLER M., STEINBORN R., MUELLER M., BREM G., WOLF E. (1999a): Adult cloning in cattle: potential of nuclei from a permanent cell line and from primary cultures. Mol. Reprod. Dev. 54:264-272. p.
214. ZAKHARTCHENKO V., DURCOVA-HILLS G., SCHERNTHANER W., STOJKOVIC M., REICHENBACH H. D., MUELLER S., STEINBORN R., MUELLER M., WENIGERKIND H., PRELLE K., WOLF E., BREM G. (1999b): Potential of germ cells for nuclear transfer in cattle. Mol. Reprod. Dev. 52:421-426. p.
215. ZHANG S. C., MASUI Y. (1992): Activation of *Xenopus laevis* eggs in the absence of intracellular Ca activity by the protein phosphorylation inhibitor, 6-dimethylaminopurine (6-DMAP). J. Exp. Zool. 262:317-329. p.
216. ZIMMERMANN U., VIENKEN J. (1982): Electric field-induced cell-to-cell fusion. J. Membr. Biol. 67:165-182. p.

MELLÉKLETEK

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.

ÁBRÁK JEGYZÉKE

	oldal
1. ábra Sertés petesejtek fejlődése.....	12
2. ábra Az MPF aktiválódásának modellje	15
3. ábra Az MPF és MAPK aktivitásának változása <i>Xenopus</i> petesejtekben a meiózis során	16
4. ábra A MAPK aktiválódásának folyamata.....	19
5. ábra Az APC/C komplex működése	21
6. ábra A CSF által előidézett sejtciklus-megrekedés összetevői	23
7. ábra A Ca^{2+} oszcilláció kialakulásának különböző magyarázatai.....	26
8. ábra A Ca^{2+} oszcilláció és a meiózis újraindulása.....	28
9. ábra Az MPF aktivitásának változása a korai embriófejlődés során parthenótákban különböző aktiválási módszerek alkalmazása esetén.....	55
10. ábra A MAPK aktivitásának változása a korai embriófejlődés során parthenótákban különböző aktiválási metódusok alkalmazása esetén.....	56
11. ábra Az aktivációs metódusok hatása a pronukleusz-képződésre <i>in vitro</i> érlelt sertés petesejtekben.....	57

TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

	oldal
1. táblázat	Az NCSU-23 és a PZM-3 tenyésztőmédiumok összetétele 36
2. táblázat	Az <i>in vitro</i> maturációs rendszer hatékonysága..... 44
3. táblázat	Az aktiválási módszerek és a különböző médiumok hatása a pronukleusz-képződésére 45
4. táblázat	Az aktiválási módszerek és a médiumok hatása parthenogenetikusan aktivált sertés petesejtek fejlődésére 47
5. táblázat	Az aktiválási módszerek és a média hatása az <i>in vitro</i> aktivált sertés parthenóták sejtszámára és az apoptotikus sejtek számára 48
6. táblázat	A tenyésztés alatti oxigén koncentráció és a tenyésztőmédium hatása az elekroporáció + butyrolactone I segítségével aktivált sertés petesejtek fejlődésére 52
7. táblázat	Az O ₂ koncentráció és a tenyésztőmédium hatása a sejtszám és az apoptotikus sejtek gyakoriságára sertés parthenótákban 52

KÉPEK JEGYZÉKE

	oldal
1. kép Sertés petesejtek <i>in vitro</i> maturációt követően.....	44
2. kép Aktivált petesejtek 10 órával az aktivációt követően.....	46
3. kép 7 napos sertés blasztociszták 40-szeres nagyításon.....	47
4. kép Sertés blasztociszták TUNEL festést követően.....	49

NYILATKOZAT

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum Mezőgazdaságtudományi Karán az Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola keretében készítettem a Debreceni Egyetem ATC MTK doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 200.....

.....
a jelölt aláírása

NYILATKOZAT

Tanusítom, hogy Nánássy László doktorjelölt 2003 – 2006 között a fent megnevezett Doktori Iskola keretében irányításunkkal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult, az értekezés a jelölt önálló munkája. Az értekezés elfogadását javasoljuk.

Debrecen,

a témavezető(k) aláírása

.....
.....

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom a dolgozatom elkészítése során nyújtott segítségért témavezetőimnek, **Jávor Andrásnak** és **Macháty Zoltánnak**. Köszönöm, hogy a kutatómunkám során megosztották velem elméleti és gyakorlati tapasztalataikat, és mindenkor hozzájárultak előrehaladásomhoz.

Megköszönöm dolgozatom opponálását **Dr. Kovács András** egyetemi tanár úrnak és **Dr. Bodó Szilárd** tudományos munkatársnak.

Külön köszönöm a **Magyar Ösztöndíj Bizottságnak**, hogy a Széchenyi István, illetve a Magyar Állami Eötvös Ösztöndíj odaítélésével lehetőséget és támogatást nyújtottak külföldi tanulmányúton való részvételre.

A baráti segítségnyújtásért köszönettel tartozom **Dr. Somfai Tamásnak** és **Kiho Lee** PhD hallgatónak, továbbá **Dr. Mark Einstein** egyetemi tanár úrnak a statisztikai elemzéshez nyújtott segítségért.

Megköszönöm a DE ATC **Állattenyésztéstudományi** Intézetében dolgozó minden **Kolléga** önzetlen együttműködését, segítségét.

Hálával gondolok a **Macháty családra**, a **Kovács családra**, **Molnár Leventére**, **Pszota Gáborra** és a **Lafayette-i Oroszlánokra**, akik nem hagyták, hogy egyedül érezzem magam a hosszú külföldi tanulmányút alatt.

Külön köszönöm az önzetlen segítségét **Családomnak**, különösen köszönöm **Páromnak** és **Édesanyámnak** a türelmet és a munkámhoz biztosított nyugodt háttérrel.