



**SZENT ISTVÁN  
EGYETEM**

**SZENT ISTVÁN EGYETEM**

**Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola**

**BIOTECHNOLÓGIAI ELJÁRÁSOKKAL ELŐÁLLÍTOTT EMLŐS  
EMBRIÓK FEJLŐDÉSÉT KÍSÉRŐ GÉNEXPRESSZIÓS MINTÁZATOK  
VIZSGÁLATA MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Bock István**

Gödöllő

2015

**A doktori iskola**

**megnevezése:** Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Állattenyésztési tudományok

**vezetője:** **Prof. Dr. Mézes Miklós az MTA levelező tagja**

tanszékvezető, egyetemi tanár,

SZENT ISTVÁN EGYETEM,

Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,

Állattudományi Alapok Intézet,

Takarmányozástani Tanszék

**témavezető:** **Prof. Dr. Dinnyés András az MTA doktora**

Laboratóriumvezető, egyetemi magántanár,

SZENT ISTVÁN EGYETEM,

Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,

Állattudományi Alapok Intézet,

Molekuláris Állatbiotechnológiai Laboratórium

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

## 1. AZ ÉRTEKEZÉS ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

A reproduktív sejtek és szövetek fagyasztásának lehetősége forradalmasította az állattenyésztés, a biotechnológia és a humán gyógyászat területeit azáltal, hogy térben és időben megválaszthatóvá tette a megtermékenyítés és az embrió-fejlődés folyamatát. Annak ellenére azonban, hogy e technika új mérföldkövet jelentett számos biotechnológiai eljárás tekintetében, napjainkban is jelentős problémát okoznak azok a károk, amelyek a mélyhűtési eljárások során jelentkeznek, csökkentve ezzel a felhasználható ivarsejtek és embriók mennyiségét és minőségét egyaránt. A nehézségeket jól mutatja, hogy az első valóban sikeres sejtfagyasztási kísérletek óta (Polge 1949) eltelt több mint fél évszázad során a legtöbb állatfaj esetében egyelőre csak a hímivarsejtek fagyasztását sikerült megbízható módon megoldani, a petesejt és az embrió krioprezervációt azonban nem. A mélyhűtés során jelentkező károkat a kutatók hagyományosan mindig is egyfajta védekező szemlélettel próbálták minimalizálni. Megkísérelték tehát minél tökéletesebben megállapítani a sejtek elméletileg fennálló fiziológiai szükségleteit (pl.: a megfelelő hőmérséklet, pH és médium összetevők kiválasztásával), illetve csökkenteni a sejtek érzékenységet, és ezek biztosításával próbálták jobb mélyhűtési hatékonyságot elérni (Saragusty és Arav 2011).

Az elmúlt években a Szent István Egyetem, Állatorvos-Tudományi Kar, Szülészeti és Szaporodásbiológiai tanszékének kutatócsoportja egy radikálisan új megközelítéssel próbálta meg növelni a sejtek mélyhűtési toleranciáját. Kísérleteik során abból indultak ki, hogy a sejteket előzetesen érő és megfelelő mértékben alkalmazott stresszhatás a károkozás helyett akár védőhatást is kifejthet, amely a következő (pl.: fagyasztás okozta) sokkhatás során nyilvánul meg (Pribenszky et al. 2005a). A kutatók elsődleges stresszhatásnak a magas hidrosztatikus nyomást (High Hydrostatic Pressure; HHP) választották, amellyel emlős embriókat és ivarsejteket kezeltek a tolerancia határukhoz közeli nyomásértékekkel, majd mélyhűtötték őket, és azt vizsgálták, hogy lehetséges-e így javítani a sejtek mélyhűtési toleranciáját. A módszer olyannyira hatásosnak bizonyult, hogy napjainkban már számos gazdasági állatfaj (pl. sertés, szarvasmarha, juh) esetében is sikerrel alkalmazzák, nem csak a mélyhűtés, hanem több más asszisztált reprodukciós eljárás hatékonyságának a javítására is (Pribenszky és Vajta 2011).

A magas hidrosztatikus nyomáskezelés alkalmazása az embriológiai kísérletek során új utakat nyitott a krioprezervációs technikák tudományában, ennek ellenére azonban a jótékony hatás hátterében álló intracelluláris folyamatok napjainkban még nem ismertek. Elengedhetetlenül fontos lenne ezért megértenünk a magas hidrosztatikus nyomáskezelés által befolyásolt molekuláris biológiai folyamatokat, amelyek a védőhatás hátterében állnak, mivel ez a mélyhűtési protokollok

további tökéletesítését is lehetővé tehetné. Munkám során ezért a HHP-technika korai (preimplantációs) génaktivációra kifejtett hatásának tanulmányozását tűztem ki célul, amellyel választ kívántam kapni arra a kérdésre, hogy mi állhat a HHP-technika mélyhűtési toleranciát növelő hatásának hátterében. Mivel a HHP-kezelés a különböző mélyhűtési módszereken túl olyan egyéb asszisztált reprodukciós eljárások esetében is hatásosnak bizonyult, mint például a sejtmagátültetési klónozás (Pribenszky és Vajta 2011), ezért munkám során egy olyan általános védekezési mechanizmusba nyerhettem bepillantást, amely az ivarsejtek és embriók túlélését segíti *in vitro* körülmények között.

Kísérleteim fő céljai a következők voltak:

1. Első lépésben bizonyítani kívántam, hogy a HHP-technika az általunk választott modellrendszerben transzkripcionális szintű változásokat okoz egyes géneknél.
2. A továbbiakban egér petesejteket vizsgálva választ kívántunk kapni arra a kérdésre, hogy a HHP-kezelés befolyásolja-e a bennük eltárolt anyai RNS készletet. A genom egészét lefedő génexpressziós microarray technika segítségével a teljes transzkriptumban (transzkriptomban), azaz az összes expresszált génre vonatkozóan vizsgáltuk az esetlegesen bekövetkező változásokat.
3. Ahhoz, hogy a HHP hatását az embrionális genom aktiváció (EGA) után is vizsgálhassuk, a magas hidrosztatikus nyomással kezelt, majd intracitoplazmatikus spermium injektálás (ICSI) útján megtermékenyített egér petesejteket négysejtes-embrió állapotig tenyésztettük. Az így nyert embriók transzkriptomát szintén génexpressziós microarray technika alkalmazásával vizsgáltuk.
4. A globális génexpressziós vizsgálatok során nyert nagy mennyiségű adatot bioinformatikai programok segítségével részletesen elemeztem azzal a céllal, hogy bepillantást nyerjek a HHP-eljárás által befolyásolt mechanizmusokba, amelyek szerepet játszhatnak a petesejtekben és az embriókban a mélyhűtés okozta stressz leküzdése során.

## 2. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 2.1. A kísérleti minta előállítása

#### 2.1.1. Hólyagcsíra stádiumú embriók kinyerése, tenyésztése, HHP kezelése

Kísérletsorozatunk első részében a célunk a HHP-kezelés hatására bekövetkező génexpressziós változások tanulmányozása volt nyomáskezelt egér blasztocisztákban. A vizsgálatokhoz szükséges korai blasztociszták méhből való kimosása után, a kinyert embriókat *in vitro* tenyésztettük, az expandálódott blasztociszta stádium eléréséig.

A kezeléshez illetve kontrollként az egyenként 10 darab expandálódott blasztocisztából álló csoportokat 0,25 ml térfogatú műszalmába töltöttük (IMV, L'Aigle, Franciaország), majd az embriókat szobahőmérsékleten 60 MPa nyomással kezeltük 30 percig. A hidrosztatikus nyomáskezelést a HHP 100 (Cryo-Innovation Kft., Budapest, Magyarország) készülékkel végeztünk el. Ahhoz, hogy a nyomáskezelés hosszabbtávú hatását is tanulmányozni lehessen, a kezelt és kontroll minták nyomáskezelést követő azonnali begyűjtésén kívül, a kezelés után meghatározott idővel további csoportokat gyűjtöttünk. Ehhez a HHP-kezelt blasztocisztákat és nem kezelt kontrolljaikat további 120 percig 37°C-on *in vitro* tenyésztettük KSOM (Millipore, Billerica, USA) médiumban.

#### 2.1.2. Petesejtek kinyerése és kezelése magas hidrosztatikus nyomással, megtermékenyítésük intracitoplazmatikus spermium injektálással, embriótenyésztés

Kísérletsorozatunk második felében célunk a petesejteken alkalmazott szubletális nyomáskezelés azonnali és a preimplantációs embrionális korban megnyilvánuló génexpressziós hatásának tanulmányozása volt. A nyomáskezelés hatását először egér petesejteken vizsgáltuk, a teljes genomot lefedő génexpressziós microarray technika segítségével.

Ehhez B6D2F1 nőtény egerek szuperovuláltatása után, petesejteket mostunk ki a petevezetőkől. A kumulusz-petesejt komplex csoportokat 0,25 ml térfogatú műszalmába töltöttük, majd 37°C-on 20 MPa nyomással kezeltük 60 percig. A hidrosztatikus nyomáskezelést a HHP 100 (Cryo-Innovation Kft., Budapest, Magyarország) készülékkel végeztük el. Ezután a nyomáskezelt és kontroll petesejteket körülvevő kumuluszsejteket 0,1% hialuronidáz (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) használatával távolítottuk el, amelyet CZB-Hepes médiumban adtunk a sejtekhez 1 percig. A kezelés után, több ismétlésben -80°C-ra fagyasztottunk petesejt csoportokat az RNS izolálásig. A

további megtermékenyítésre szánt petesejt csoportokat Chatot-Ziomek-Bavister (CZB, Chatot et al. 1989) médiumban inkubáltuk a spermium injektálásig.

A nyomáskezelt és kontroll petesejteken a mikromanipulációs lépéseket egy Olympus IX 71 inverz mikroszkópra (Olympus Optical, Tokyo, Japán) telepített piezo-elektromos mikromanipulációs rendszeren végeztük (PMAS-CT150, Prime Tech, Ibaraki, Japán) CZB-Hepes médiumban. Az injektáló tűbe egyenként felszívott hímivarsejtek flagellumát néhány piezo-rezgéssel választottuk le a feji részről (Kuretake et al. 1996). A flagellum nélküli feji részeket azonnal a már előkészített kezelt és kontroll egér petesejtekbe injektáltuk.

Az injektálás után a nyomáskezelt és kontroll egér petesejteket tovább tenyésztettük, majd Hoffmann-féle modulációs kontraszttal ellátott Olympus IX mikroszkóppal (Olympus Optical, Tokyo, Japán) vizsgáltuk, hogy az aktiváció megtörtént-e. Azokat a zigótákat tenyésztettük tovább, amelyekben a két pronukleusz és a második poláris test látható volt. Az embriók *in vitro* fejlődését a négysejtes stádium eléréséig figyelemmel kísértük. A fertilizáció után a HHP-kezelt embriók 78%-a és a kontroll embriók 82%-a maradt életben, amelynek 76 illetve 65%-a fejlődött tovább a négysejtes állapot eléréséig.

## **2.2. A HHP-kezelt hólyagsíra állapotú embriók kvantitatív reverz-transzkripció PCR (RT-qPCR) vizsgálata**

A HHP-kezelt és kontroll, blasztociszta csoportokból a hírvivő RNS (mRNS) izolálása Dynabeads mRNA DIRECT Micro Kit (DynaL, Oslo, Norvégia) használatával történt meg, a gyártó utasításai szerint. A kioldott mRNS-ből M-MLV RT Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) felhasználásával cDNS-t szintetizáltunk, 20 µl-es reakció térfogatban.

A real-time PCR vizsgálatokhoz kilenc választott génre terveztünk primereket, amelyeket ezt követően optimalizáltuk. A normalizáláshoz a kutatócsoportunk által korábban publikált, két legstabilabb egér preimplantációs referenciagén (Mamo et al. 2007) expressziójának stabilitását a HHP-kezelés során  $2^{-\Delta Ct}$  módszerrel vizsgáltuk (Schmittgen és Zakrajsek 2000).

Az mRNS mennyiségi meghatározása során génenként 3-3 biológiai ismétlésben elemeztük a 10 darabos blasztociszta csoportokból álló kezelt mintákat és a kontrolljaikat, emellett pozitív és negatív kontrollokat használtunk minden reakcióban. A reakciókat Rotor-Gene 3000 real-time PCR készüléken (Corbett Research, Mortlake, Australia) futtattuk SYBR Green JumpStart Taq Ready Mix (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) használatával. A relatív mennyiségi változásokat a Relative Expression Software Tool - 384 version 2 (Pfaffl et al. 2002) program segítségével állapítottuk meg.

### **2.3. A HHP-kezelt petesejtek, valamint a belőlük fejlődő négysejtes embriók génextpressziós microarray vizsgálata**

A kezelt és kontroll petesejt és négysejtes embrió csoportokból RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, Hilden, Németország) használatával totál RNS-t izoláltunk. Az RNS integritás, koncentráció és az esetleges DNS szennyeződés ellenőrzése Agilent 2100 Bioanalyzer készülék és RNA 6000 Pico Chip Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) használatával történt meg.

A petesejtekből és négysejtes embriókból izolált RNS mennyisége önmagában nem volt elegendő ahhoz, hogy microarray hibridizációra közvetlenül felhasználható legyen, ezért az RNS jelölés előtt kétkörös amplifikációra volt szükség a megfelelő RNS mennyiség biztosítása érdekében, amit a TrueLabeling-PicoAMP Kit (SABiosciences, Frederick, USA) segítségével végeztünk el. Az RNS-amplifikálást követően kétszínű jelölést végeztünk, Cy3/Cy5 Post-Labeling Reactive Dye Pack (GE Healthcare, Waukesha, USA) kit alkalmazásával. A legyűjtött mintákból és kontrolljaikból készült amplifikált/jelölt RNS hibridizációjához mindkét microarray kísérlet esetében Agilent 4x44k whole mouse genome chipet használtunk (GPL4134; Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Ezekhez a chipekhez a gyártó Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (kétszínű microarray-alapú génextpressziós elemzés) protokollját követtük. A leolvasás során a scanner által készített nagyfelbontású képfájlok adatbeolvasása automatikusan, a Feature Extracion (version 9.5.1.1, Agilent Technologies, Palo Alto, USA) szoftver segítségével történt. A normalizált adatokat a továbbiakban a GeneSpring GX 11 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) szoftver használatával elemeztük. Az így kapott eredményeket a továbbiakban RT-qPCR módszerrel validáltuk.

A validáláshoz a két microarray kísérlet esetében 12 illetve 8 db, az adatelemzés alapján szignifikáns expressziós változást mutató gént választottunk ki. A kiválasztott génekre specifikus primereket terveztünk, amelyek mRNS szintjét kvantitatív real-time PCR-el mértük meg. Belső kontrollnak az előzőekben általunk már optimalizált H2afz, Ppia illetve a Hprt1 (Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) génekre specifikus primereket használtunk. Az RT-qPCR-el történő validálásához a petesejtekből és embriókból izolált RNS-ből SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) használatával cDNS-t szintetizáltunk. Az mRNS mennyiségi meghatározása során a real-time PCR reakciókat QIAgility pipettázó robottal (Qiagen, Hilden, Germany) állítottuk össze és Rotor-Gene Q real-time PCR készüléken (Qiagen, Hilden, Germany) futtattuk, SYBR Green JumpStart Taq Ready Mix (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) használatával. Az adatok további elemzése a Relative Expression Software Tool 2008 V2.0.7 (Pfaffl et al. 2002) program alkalmazásával történt. A microarray és RT-qPCR vizsgálatok által meghatározott génextpressziós értékek közötti hasonlóságot Pearson-féle korrelációval vizsgáltuk.

A biológiai ismétlések közötti hasonlóságot, így az ismétlések közötti varianciát hierarchikus klaszterezés segítségével vizsgáltuk. GenesisWeb Hierarchical Clustering analysis program (Rainer et al. 2006) Spearman-féle rangkorreláció beállításával fadiagramot készítettünk, amely a kezelt mintákat és kontrolljaikat a szignifikáns változást mutató gének expressziója alapján csoportosította. A szignifikánsan megváltozott kifejeződésű gének közötti esetleges funkcionális kapcsolatokat a functional annotation tools of DAVID Bioinformatics Resources szoftver (Dennis et al. 2003; Huang et al. 2009b) segítségével azonosítottuk. Az összes adatot, amely a microarray kísérletek feldolgozása során keletkezett a NCBI Gene Expression Omnibus adatbázisba töltöttük fel, amely az analízis paraméterek minőségi ellenőrzése után az adatokat befogadta és a GSE28443 azonosítót rendelte hozzájuk.



### 3. EREDMÉNYEK

#### 3.1. A referenciagének stabil expressziója a HHP-kezelés után

Mivel az RT-qPCR vizsgálatok megfelelő normalizálásához stabil expressziójú referenciagének szükségesek, ezért előzetesen bizonyítani kell, hogy az adott kísérleti tényező nem befolyásolja a használni kívánt referenciagének expresszióját (Bustin et al. 2009). A választott gének HHP-kezelésre adott válaszát egy 2 órás időskálán belül kívántuk vizsgálni, ezért a referencia gének expresszióját a nyomáskezelést követően ebben a tartományban, négy időpontban mértük meg. A  $2^{-\Delta Ct}$  módszer alapján kivitelezett egyutas varianciaanalízissel megállapítottuk, hogy a vizsgált időszak folyamán a H2afz és a Ppia gének expressziós szintje nem változik meg a kezeletlen kontrollhoz képest, ezek a gének tehát alkalmasak a HHP-kezelt mintákban végzett RT-qPCR mérések normalizálására.

#### 3.2. A HHP-kezelésre adott azonnali és elhúzódó transzkripciós válasz egér blasztocisztákban

Kísérleteink során először a közvetlenül a HHP-kezelés után begyűjtött minták expressziós szintjét vizsgáltuk RT-qPCR mérésekkel. Megállapítottuk, hogy egyik vizsgált génnek sem csökkent az expressziója, azonban közel kétszeres, szignifikáns növekedés volt tapasztalható az antizyme inhibitor 1 (Azin1) gén esetében, valamint a mitokondriális szuperoxid dizmutáz (Sod2) gén mRNS szintje is szignifikánsan megemelkedett ( $P < 0,05$ ).

A nyomáskezelést követő 120 perces *in vitro* tenyésztés folyamán általános transzkriptum csökkenést figyeltünk meg a vizsgált géneknél. A csökkenés mértéke a réz/cink szuperoxid dizmutáz (Sod1) génnél már szignifikáns volt. A growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma (Gadd45g) és a RNA binding motif protein 3 (Rbm3) gének ez alól kivételt jelentettek, mert expressziójuk szignifikánsan emelkedett a tenyésztés alatt, ráadásul az összes vizsgált gén közül a Gadd45g mutatta a legnagyobb mértékű változást. Megállapítottuk tehát, hogy a HHP-kezelés hatással van a különböző stressz válaszokban résztvevő gének kifejeződésére. A kezelés hatására transzkriptum csökkenés és növekedés egyaránt tapasztalható volt.

### 3.3. A HHP-kezelésre adott globális génexpressziós válasz egér petesejtekben és négysejtes embriókban

A HHP-kezelés egér petesejtek és beágyazódás előtti embriók teljes transzkriptómára (transzkriptómára) kifejített hatásának tanulmányozása céljából nyomáskezelt petesejteket és a belőlük fejlődött négysejtes embriókat vizsgáltunk a teljes egér genomot lefedő génexpressziós microarray segítségével. Mivel a Benjamini Hochberg-féle módszerrel nem volt lehetőségünk a fals pozitív találatok kiszűrésére, ezért kísérletenként megfelelő számú gén expressziós szintjét RT-qPCR módszerrel validáltuk, amely alapján egyértelműen megállapíthatóvá vált, hogy valós változásokat detektáltak-e a microarray vizsgálatok. A petesejt microarray eredmények validálása során az RT-qPCR elemzés a 12 vizsgált gén közül egyik esetében sem igazolta vissza a microarray analízisből származó értékeket (Pearson-féle korrelációs együttható,  $r=0,02$ ). Az összes vizsgált gén expressziója a kontrolléval közel megegyező értéket mutatott, melyből egyértelműen kiderült, hogy a HHP-kezelés transzkripciós szinten nem gyakorolt detektálható mértékű hatást az egér petesejtekre. A HHP-kezelés biztonságosságának szempontjából további fontos megfigyelés, hogy az Agilent 2100 Bioanalyzer készülék (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) használatával történt RNS minőség ellenőrzés során egyik mintában sem találtunk RNS-lebomlásra utaló RNS integritás értéket ( $RIN=8.975\pm 0.206$ ;  $n=4$ ).

A kezelt petesejtekből létrehozott négysejtes embriókkal végzett kísérlet során szintén RT-qPCR módszerrel validáltuk a microarray vizsgálat eredményeit. A validálás itt már mind a nyolc vizsgált gén esetében a microarray eredményekkel megegyező irányú változást detektált ( $p\leq 0,015$ ; Pearson-féle korrelációs együttható,  $r=0,93$ ), igazolva, hogy az ebben a mérésorozatban beazonosított gének expressziója valóban megváltozott a nyomáskezelés hatására, tehát a microarray eredménye valós változásokat tükröz. A négysejtes embriók vizsgálata során így 505 darab eltérően expresszáló gént azonosítottunk ( $p<0.05$ ; változás mértéke  $\geq 1.5$ ), ezek közül 250 és 255 mutatott növekedést, illetve csökkenést. Megállapítottuk tehát, hogy az egér petesejtek transzkriptoma a HHP-kezelés hatására nem változik meg, azonban négysejtes stádiumban már egyértelmű génexpressziós válasz tapasztalható, mely a petesejt-kezelés hosszabbtávú, az embriófejlődés során manifesztálódó hatásaként értelmezhető. A következőkben ezért kizárólag a négysejtes embrió microarray vizsgálat eredményeit elemeztük részletesen, az anyagok és módszerek részben bemutatott bioinformatikai programok segítségével.

A teljes génlistán először az ismétlések közötti varianciát kívántuk vizsgálni fadiagram készítésével, amelyhez a GenesisWeb Hierarchical Clustering analysis programot használtuk. Ez a program a vizsgált gének különböző mintákban mért expressziós értékének összehasonlítása alapján olyan csoportokba rendezi a minták ismétléseit, melyekben a gének változásának az iránya és

mértéke is hasonló. Az így elkészült fadiagram azt mutatta, hogy a program a kezelt mintákat és a kontrolljaikat lefedő 3-3 ismétlést két külön szuperkategóriába csoportosította az 505 db szignifikánsan megváltozott expressziójú gén kifejeződése alapján.

### **3.4. A translációban résztvevő gének jelentős expresszió csökkenése a négysejtes embriókban**

Az előzetes validálási módszereket követően, a továbbiakban a valós változásokat tükröző négysejtes embrió microarray analízise során talált gének funkcionális kapcsolatait vizsgáltuk a DAVID Bioinformatics Resources program alkalmazásával. A szoftver segítségével olyan Gene Ontology (GO) kategóriákat kerestünk, amelyekben a véletlen előfordulás alapján vártnál jelentősen több gén szerepel a szignifikáns változást mutató 505 db gén közül. Az elemzés 21 db olyan GO kategóriát talált, amelyben a vártnál szignifikánsan magasabb volt a megváltozott expressziójú gének száma, és amelyekből a fals pozitív találatok statisztikailag ki lettek szűrve (FDR < 0,05). Ezek közül a „transzláció” (translation) volt az egyetlen, rendkívül erős P-értékkel azonosított GO biológiai folyamat. Ezzel összhangban a GO molekuláris funkció kategóriából a „riboszóma strukturális alkotórésze” (structural constituent of ribosome;  $P=2,20E-19$ ) és a GO sejt alkotórész kategóriából a „riboszóma” (ribosome;  $P=1,60E-21$ ) csoportok rendelkeztek a legerősebb szignifikancia értékekkel. Ezek mellett számos további, a transláció folyamatához tartozó kategóriát szignifikánsként azonosított a program, amely arra utal, hogy a fehérje szintézis folyamatát jelentősen befolyásolja a HHP-kezelés. A Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) adatbázisban való keresés eredménye is megerősítette a GO adatbázisban találtakat, mivel itt az egyetlen szignifikáns kategóriának a „riboszóma” (ribosome  $P=8,2E-26$ ) csoport bizonyult. Az elemzés kiemelten fontos megfigyelése volt továbbá, hogy a translációval kapcsolatos csoportok mindegyike döntő többségben (94-100%-ban) csökkent expressziójú géneket tartalmazott. A funkcionális elemzés eredményei alapján tehát nagy valószínűséggel megállapíthatóvá vált, hogy a HHP-kezelés hatására a fehérje szintézis mértéke csökken a kezelt petesejtekből fejlődött beágyazódás előtti egér embriókban.

#### 4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Napjainkban egyre több információ áll rendelkezésünkre arról, hogy a magas hidrosztatikus nyomáskezelés hogyan befolyásolja az emlős ivarsejtekben vagy embriókban lezajló sejtbiológiai folyamatokat, azonban munkám megkezdésekor kizárólag Huang és munkatársai (2009a) eredményei álltak rendelkezésre erről a területről.

Munkám során először azt kívántam vizsgálni, hogy a magas hidrosztatikus nyomáskezelés hatással van-e egér blasztociszták génexpressziójára. Ehhez a vizsgálathoz a mikróbákra vonatkozóan rendelkezésre álló irodalom alapján olyan géneket kerestünk, amelyek az emlős embriókban is aktiválódhatnak a HHP-kezelés hatására. Figyelembe vettük továbbá kutatócsoportunk korábbi eredményeit, melyek vitrifikált nyolcsejtes egér embriók microarray vizsgálata során születtek (Mamo et al. 2006), így olyan géneket választhattunk, amelyek esetleg a fagyasztás okozta stressz elleni védekezésben is részt vesznek. Így a vizsgált stressz útvonalak közé került a sejtosztódás-gátlás, az apoptózis, az oxidatív-stressz és a hideg-sokk. Azért, hogy a HHP-kezelés közvetlen és hosszabb távú hatását is tanulmányozhassuk, a kezelt blasztocisztákból a dekompreszió után azonnal és a nyomáskezelést követő 120 perces *in vitro* tenyésztés után is mintát vettünk.

Eredményeink azt mutatták, hogy a HHP-kezelés után közvetlenül az Azin1 és az Sod2 gének, a további 120 perces *in vitro* tenyésztés során pedig a Gadd45g és az Rbm3 gének expressziós szintje szignifikáns mértékben megemelkedett. Mivel az utóbbi gének a kezelést követően azonnal nem mutattak génexpressziós változást, megállapítható volt, hogy az embriók hosszabb távú válaszreakciójában vesznek részt. Az említett két génen kívül, a nyomáskezelést követő 120 perc folyamán általános transzkriptum csökkenés volt megfigyelhető, melyből a Sod1 gén csökkenése szignifikánsnak bizonyult. Ez a megfigyelés összhangban van a Siqueira Filho és munkatársai (2011) által szarvasmarha blasztocisztákon végzett kísérletek eredményével, amely azt mutatta, hogy a vizsgált gének expressziója a nyomáskezelés után 1 órával volt a legmagasabb, majd újra csökkenésnek indult. Az Rbm3 egy hideg-sokk hatására aktiválódó gén, és fő funkciója a fehérje-szintézis lehetővé tétele a fiziológiáznál hidegebb környezetben (Dresios et al. 2005). Ennek a génnek a megemelkedett mRNS szintje tehát arra utalhat, hogy a HHP-kezelés olyan védekezési folyamatokat is aktivál, amelyek a sejteket fagyasztáskor/kiolvasztáskor érő hideg-sokk során is biztosítják a stabil működést. A réz/cink szuperoxid dizmutáz (Sod1) és a mitokondriális szuperoxid dizmutáz (Sod2) géneknél tapasztalt eltérő expressziós szint arra utalhat, hogy a citoplazma kevésbé, de a mitokondrium jobban ki van téve az oxidatív stressznek a nyomáskezelés következtében. A Gadd45g a sejtosztódás gátlásában is részt vesz (Zhan et al. 1994), illetve a

szignifikánsan megemelkedett szintet mutató Azin1 is fontos szerepet tölt be a sejtnövekedés szabályozásában, a poliamin szintézis befolyásolásán keresztül (Tang et al. 2009). Az említett génnek magasabb mRNS szintje arra utalhat, hogy az embrió úgy védekezik a nyomáskezelés okozta stressz ellen, hogy lelassítja vagy akár teljesen felfüggeszti a növekedését, egészen addig, amíg újra megfelelő körülmények közé kerül. Ez a visszafogott növekedési állapot segítséget jelenthet a következő (pl.: fagyasztás okozta) stressz leküzdésében, mert így a már védekező állapotban lévő sejteket a megváltozott környezet kevésbé tudja károsítani. Több tanulmány szerint a Gadd45g és az Azin1 génnek az endoplazmás retikulum (ER) stressz válaszában is részt vesznek (Williams és Lipkin 2006; Belmont et al. 2008), továbbá az is bizonyított, hogy az ER membrán érzékeny a magas hidrosztatikus nyomásra (Mentré et al. 1999; Frey et al. 2008). Az endoplazmás retikulomot ért stressz hatására kialakuló zavar a fehérjék gombolyodásában a nem megfelelő szerkezetű fehérjék felgyülemelését okozza a durva felszínű ER lumenében. Emiatt a sejtben különböző fehérje gombolyító és lebontó útvonalak aktiválódnak, ami a fehérje szintézis gátlásával jár (Rutkowski és Kaufman 2004). Valószínűsíthető, hogy az említett génnek expressziós szintje az endoplazmás retikulomot ért stressz következtében emelkedik meg, ez a változás pedig olyan következményekkel járhat, mint például a sejtnövekedés vagy a fehérje transzláció lassulása. Ezzel összhangban az ún. GADD géncsaládról azt feltételezik, hogy az ER stressz következtében fejt ki szabályozó tevékenységét sejtek osztódására és növekedésére (Outinen et al. 1999).

Az egér blasztocisztákon végzett RT-qPCR-es kísérletünkkel sikeresen bizonyítottuk, hogy a HHP-kezelés befolyásolja az emlős embriók transzkripcióját, majd ezt követően több kutatócsoport is hasonló eredményekről számolt be (Bogliolo et al. 2011; Siqueira Filho et al. 2011). Mivel azonban ezek a kísérletek csak néhány kiválasztott gén vizsgálatára terjedtek ki, ahhoz hogy a nyomás-stressz kiváltotta folyamatokat átfogóan tanulmányozhassuk a teljes genomot lefedő vizsgálatokra volt szükség. Az ilyen vizsgálatokhoz a leggyakrabban génexpressziós microarrayeket használnak. A rendkívül kevés sejtet tartalmazó minták (mint például petesejtek és embriók) vizsgálata azonban sokáig nem volt lehetséges a microarray módszer magas RNS igénye miatt (Bermudez et al. 2004; Kalisky and Quake 2011). Erre a problémára a megoldást az exponenciális és a lineáris amplifikációs módszerek hozták el (Eberwine et al. 1992; Van Gelder et al. 1990). Napjainkban a legelterjedtebben a polimeráz láncreakción (PCR) és az *in vitro* transzkripción (IVT) alapuló technikákat használják (Chiang and Melton 2003; Luo et al. 1999). Ezek az amplifikációs eljárások lehetővé teszik, hogy akár egyetlen sejt teljes transzkriptomát vizsgálhassuk microarray technika segítségével. A globális génexpressziós vizsgálatok során ezért a megfelelő RNS mennyiség biztosítása érdekében a petesejtekből és embriókból származó RNS-t kétkörös IVT-n alapuló módszerrel amplifikáltuk, így elegendő komplementer RNS állt rendelkezésre a hibridizáláshoz.

A microarray vizsgálataink során egér petesejtek és embriók teljes transzkriptumának a változását kívántuk vizsgálni. Azért az egérre, mint modellszervezetre esett a választásunk, mert ennél a fajnál már bizonyított a nyomáskezelés előnyös hatása (Pribenszky et al. 2010b; Pribenszky et al. 2012), valamint az emberi genom után az egér genomja a leginkább karakterizált (Stamatoyannopoulos et al. 2012).

Munkánk során először egér petesejtek transzkripcionális válaszát vizsgáltuk génexpressziós microarray technika alkalmazásával. Az anya-zigóta átmenet (maternal-to-zygotic transition, MZT) elindulásáig a petesejt számára létfontosságú az anyai RNS készlet, ezért első vizsgálatunk során azt kívántuk tanulmányozni, hogy az ekkor bekövetkező nyomás-stressz hatással van-e az anyai RNS készletre, például szelektív degradáció előidézésével (Sirard 2012). Az egérben a *de novo* RNS szintézis kétsejtes állapotban indul el az EGA során (Bolton et al. 1984; Li et al. 2010), ezért a petesejtet ért hatások által indukált olyan rejtett változások, amelyek a transzkripciót befolyásolják, ekkortól válnak láthatóvá. Azért, hogy azt is tanulmányozhassuk, hogy a HHP-kezelés generál-e ilyen változásokat, a nyomáskezelt egér petesejteket ICSI-módszer segítségével megtermékenyítettük, majd az ezt követően kifejlődő embriók expressziós profilját négysejtes állapotban elemeztük, génexpressziós microarray technika alkalmazásával. Így tehát lehetőségünk nyílt a petesejtet ért HHP-stressz beágyazódás előtti embriófejlődés során megnyilvánuló hatásának tanulmányozására.

A microarray kísérletek kiértékelésekor egyértelművé vált, hogy a HHP-kezelt petesejtekben és a belőlük létrehozott négysejtes embriókban teljesen eltérő reakciót vált ki a szubletális stressz. Vizsgálataink eredménye szerint a petesejtek RNS állományában nem következett be kimutatható változás a nyomáskezelés hatására, valamint a megállapított RNA integritás érték alapján sem volt tapasztalható RNS-bomlás. Ez utóbbi egy fontos megállapítás a HHP-kezelés biztonságosságának szempontjából, hiszen a kísérletünkben a petesejteket a normális nyomásérték több mint százszorosa (20 MPa) érte 60 percig, ez azonban eredményeink szerint nem okoz károsodásokat a petesejtek RNS készletében.

A közvetlen hatástól eltérően a petesejteket ért nyomás-stressz a négysejtes embrió stádiumban már figyelemre méltó transzkripcionális válaszreakciót váltott ki. Az eredmények arra utalnak, hogy a magas hidrosztatikus nyomáskezelés jelentős hatást fejt ki a petesejtek intracelluláris folyamataira, ez azonban transzkripcionális szinten a kezelés után közvetlenül még nem detektálható. A továbbiakban viszont, az EGA elindulásával ez a hatás az embriók RNS készletében lényeges változásokat generálva láthatóvá válik.

Azért, hogy betekintést nyerjünk a négysejtes egér embrióknál szignifikánsan megváltozott kifejeződésű gének sejtműködésben betöltött szerepébe, a továbbiakban funkcionális kategorizálással csoportosítottuk őket. Az elemzés azt mutatta, hogy a HHP-kezelésre nagyszámú, a

transzlációban résztvevő gén reagált jelentős expresszió változással. Ez a gének döntő többségénél expresszió csökkenést jelentett. Az r-fehérjék jelentős gátlása arra utal, hogy a HHP-stressz megállította/felfüggesztette a sejtekben a riboszóma összeszerelést, ezáltal pedig ideiglenesen korlátozta a fehérje szintézis mértékét. Ezek az eredmények összhangban vannak a mikrobáknál már jól ismert jelenséggel, miszerint a magas hidrosztatikus nyomáskezelés a riboszómák disszociációjával jár (Schulz et al. 1976; Gross és Jaenicke 1990; Gross et al. 1993; Niven et al. 1999; Alpas et al. 2003) és ez a sejtek osztódását is jelentősen gátolja (Gross et al. 1993). Mindazonáltal, meghatározott nyomásérték alatt ez a folyamat teljesen visszafordítható, tehát a dekompreszió után a fehérje szintézis újraindul. *Escherichia coli* baktériumoknál ez a határ 100 MPa (Mackey és Mañas 2008). Patkány májsejtekben is megfigyelték már, hogy a riboszómák működése gátolódik a magas hidrosztatikus nyomás következtében, amely azonban 120 MPa alatt teljesen visszafordíthatónak bizonyult (Lu et al. 1997). Így feltételezhető, hogy az emlős ivarsejteknél és embrióknál az előbbiekhöz hasonló módon, a szubletális HHP-kezelés a fehérje szintézis reverzibilis gátlását okozza.

Mivel a riboszóma bioszintézis a leginkább energiaigényes folyamat az eukarióta sejtekben (Warner 1999; 2001), ezért az r-fehérjék transzkripciójának csökkenésével illetve a transzlációs folyamatok átmenteti lassulásával a sejtek jelentős mennyiségű intracelluláris energiát takaríthatnak meg, amely segítséget jelenthet egy következő stresszhatás leküzdése során. Ezzel összhangban mélyfagyasztott, majd kiolvasztott humán embriók vizsgálatokor azt mutatták ki, hogy azok az embriók, amelyek nem tudnak a blasztociszta állapotig fejlődni, túl aktív aminosav metabolizmussal rendelkeznek. A sikeresen fejlődő társaik ehhez képest sokkal lassabban állítják elő és használják fel az aminosav készletüket (Stokes et al. 2007). Ezek az eredmények és az általunk felvázolt teória is jól beleillenek az úgynevezett Csendes Embrió Hipotézisbe (Quiet Embryo Hypothesis), amely részletes adatok alapján azt feltételezi, hogy azok a beágyazódás előtti embriók az életképesebbek, amelyek anyagcsere folyamatai általánosságban alacsonyabb szinten zajlanak (Leese et al. 2008; Leese 2012). A HHP módszerhez hasonlóan emlős petesejtekben már többféle stressz kezeléssel próbáltak valamilyen védőhatást előidézni. Ilyen volt a szubletális ozmotikus kezelés (Lin et al. 2009), amellyel sertés petesejtek kriotoleranciáját lehetett fokozni. Hasonló, jótékony hatás volt megfigyelhető szarvasmarha petesejtek hidrogén-peroxiddal végzett kezelése során (Vandaele et al. 2010), amellyel az *in vitro* embriótenyésztés hatékonysága volt javítható. Ezzel összefüggésben fontos megjegyezni, hogy mind az ozmotikus mind az oxidatív stressz a fehérje szintézis időleges gátlását okozza emlős sejtekben (Wiese et al. 1995; Morley and Naegele 2002). Így tehát nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét, hogy ezek a sokkhatások is a HHP-hoz hasonló módon fejtik ki a hatásukat a petesejtekre.

#### **4.1. Hipotézis a magas hidrosztatikus nyomáskezelés emlős ivarsejtekre és embriókra kifejtett előnyös hatására vonatkozóan**

Eredményeink megmutatták, hogy a magas hidrosztatikus nyomáskezelés a fehérje szintézis gátlásával jár transzkripciós szinten, egér embriókban. A rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján feltételezem, hogy az egér petesejtekben működő riboszómák a nyomás-stressz hatására szétesnek, azonban ha a sejteket optimális mértékű nyomás-stressz éri ez a hatás teljesen reverzibilis. Miután a nyomás visszaáll a fiziológiás értékre, a riboszómák újra összeszerelődnek és a sejtekben újraindul a fehérje szintézis. Az ideiglenes lassulás a sejtek anyagcseréjében önmagában természetesen nem előnyös, azonban egy újabb sokkhatás megjelenésekor (például a mélyhűtés okozta sokk esetében) a sejtek már egy leszabályozott állapotban találkoznak a károsító körülményekkel, ezáltal veszteségeik is mérsékeltebbek lesznek. A magas hidrosztatikus nyomáskezelés véleményem szerint a sejtek anyagcseréjének időleges csökkenését és ezáltal a metabolitok felhalmozódását okozhatja, az így felkészített sejtek pedig rugalmasabban alkalmazkodhatnak egy következő stressz során a megváltozott környezethez, mint a fiziológiai körülmények között növekvő társaik. A HHP-hatás tehát ily módon járulhat hozzá az egér petesejtek fokozottabb stressztoleranciájához, amely segítséget jelent a krioprezerváció káros hatásaival szembeni védekezésben. A fenti eredmények összhangban állnak azokkal a megfigyelésekkel, melyek szerint az optimális határok között alkalmazott HHP-kezelés nincs káros hatással a petesejtek fejlődésére, sőt, egy további stresszhatással kombinálva jelentősen javítja a belőlük létrehozott embriók fejlődési képességét, blasztociszta sejttségét és az utódtszámot (lásd irodalmi áttekintés).

#### **4.2. További javaslatok**

Az általunk elvégzett microarray vizsgálat az egér petesejtek és embriók teljes transzkriptumának vizsgálatát tette lehetővé, ezért kísérletünk eredménye átfogó képet adott a sejtek RNS készletében bekövetkező változásokról. Eredményeink fontos információkat szolgáltatnak a magas hidrosztatikus nyomáskezelés emlős ivarsejtekre és embriókra kifejtett hatásmechanizmusának megértéséhez, azonban a továbbiakban fontos lenne a HHP-kezelés génexpresszióra kifejtett hatását egy másik (pl.: mélyhűtés okozta) stresszhatás kombinálásával is vizsgálni, hogy így még pontosabb képet kaphassunk arról a védekezési folyamatról, amelyet a nyomáskezelés aktivál.

Mivel hipotézisem egy általánosan bekövetkező folyamatot feltételez, ezért érdemes lenne megvizsgálni a nyomáskezelés transzkripcionális hatását a preimplantációs embriófejlődés további



stádiumaiban is. Amennyiben a négysejttest követő állapotokban ugyancsak ki lehetne mutatni a transláció időleges gátlását, az újabb bizonyítékot szolgáltatna az előzőekben bemutatott hipotézisre. Megfelelően megválasztott időpontokban végzett vizsgálatokkal véleményem szerint nem csak a gátlást, hanem a fehérjeszintézis újraindulását is nyomon lehetne követni a beágyazódás előtti embriókban.

Azt is érdemes lenne tanulmányozni, hogy a fehérje szintézis reverzibilis gátlása az embriókban és ivarsejtekben kiváltható-e egyéb módszerekkel is. Ha sikerülne ilyen hatást előidézni, akkor megvizsgálhatnánk, hogy az a sejtek számára jár-e valamilyen előnnyel. Az már bizonyított, hogy például hidrogén-peroxiddal előidézhető egyfajta védőhatás (Vandaele et al. 2010), valamint azt is tudjuk, hogy ez a vegyület a fehérje szintézis időleges gátlását okozza (Wiese et al. 1995). Így elképzelhető, hogy ha kémiai úton valósítjuk meg a fehérje szintézis gátlását, akkor az ugyancsak jótékony hatásokat eredményezne ivarsejtekben és embriókban. Erre a célra használhatnánk különböző, az eukarióta sejtekben transláció-gátlást okozó antibiotikumokat, mint például a cycloheximidet vagy a puromycint. A cycloheximiddel kapcsolatban már bizonyított tény, hogy optimálisan alkalmazott koncentrációban előnyös hatással van emlős petesejtek parthenogenetikus aktivációt követő továbbfejlődésére (Mori et al. 2008).

Véleményem szerint elképzelhető, hogy a folyamat megfelelő pontján ható vegyület optimalizált alkalmazásával pozitív eredményeket tudnánk elérni, azonban nem valószínű, hogy az a HHP-nél eredményesebb lehetne. Ezt arra alapozom, hogy a kémiai úton történő gátlásra nem jellemzőek a nyomáskezelés előnyös tulajdonságai. Nem alkalmazható olyan standardizáltan, a minta minden pontján ugyanakkora mértékben, ezért az optimalizálása sokkal nehezkesebb lenne. A HHP kezelés további előnye egy kémiai kezeléssel szemben, hogy sokkal gyorsabban közvetíthető a nyomás stressz és gyorsan el is távolítható, így az embriófejlődés során csak egy nagyon rövid időszakot érint. Figyelembe véve, hogy a kémiai gátlásnak teljesen más a hatásmechanizmusa, mint a magas nyomásnak, csak akkor lehetne sikerrel alkalmazni, ha hatása visszafordítható (a hidrogén-peroxidnál bizonyítottan ilyen) és nem jár káros mellékhatásokkal.

A globális génexpressziós mintázat tanulmányozásakor nem szabad elfeledkeznünk arról, hogy nincs mindig egyértelmű összefüggés adott gén transzkriptumának és a belőle készülő fehérje mennyiségének illetve az aktivitásának változása között, valamint hogy a génexpresszió kívül egyéb közvetett okok is szerepet játszhatnak egy gén mRNS szintjének megváltozásában, például az eltérő mértékű degradáció. A továbbiakban ezért célszerű és meggyőző lenne a microarray kísérletek fehérje szintű validálásának elvégzése. Amennyiben az eredményeinket fehérje szinten is sikerül visszaigazolni, úgy a következőkben érdemes lehet hasznosítani azokat az asszisztált reprodukciós eljárások területén.

## 5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A világon elsőként mutattam ki, hogy egér embriókban a magas hidrosztatikus nyomáskezelés befolyásolja egyes gének mRNS szintjét.
2. A világon elsőként vizsgáltam egér petesejtekben és négysejtes embriókban a magas hidrosztatikus nyomáskezelés hatására bekövetkező teljes transzkriptum változásokat.
3. Kimutattam, hogy egér petesejtekben az optimális szintű magas hidrosztatikus nyomáskezelés nem idéz elő génexpressziós változásokat, illetve nem okoz RNS bomlást, ezzel bizonyítékot szolgáltatottam a technika biztonságosságára vonatkozóan.
4. Kimutattam, hogy az optimális mértékű magas hidrosztatikus nyomással kezelt egér petesejtekből létrehozott négysejtes embriókban a kezelés hatására jelentősen csökken számos, a fehérje szintézisben résztvevő gén expressziója.
5. Eredményeim és a szakirodalomban fellelhető adatok felhasználásával felállítottam egy hipotézist, mely szerint az optimális szintű magas hidrosztatikus nyomáskezelés a sejtek fehérje szintézisének időleges csökkenését, így egyes metabolitok felhalmozódását okozhatja, amely segítséget jelenthet egy további stressz káros hatásaival szembeni védekezésben.

## 6. PUBLIKÁCIÓS LISTA

### Nemzetközi impakt faktorral rendelkező folyóiratokban az értekezés témakörében megjelent közlemények

**Bock I.**, Raveh-Amit H., Losonczy E., Carstea A.C., Feher A., Mashayekhi K., Matyas S., Dinnyes A., Pribenszky C. (2014): Controlled hydrostatic pressure stress downregulates the expression of ribosomal genes in preimplantation embryos: a possible protection mechanism? *Reproduction, Fertility and Development* (in press; <http://dx.doi.org/10.1071/RD14346>) [IF: 2,56]

**Bock I.**, Losonczy E., Mamo S., Polgar Z., Harnos A., Dinnyes A., Pribenszky C. (2010): Stress tolerance and transcriptional response in mouse embryos treated with high hydrostatic pressure to enhance cryotolerance. *CryoLetters* 31:401-12. [IF: 1,12]

Kobolák J., Kiss K., Polgar Z., Mamo S., Rogel-Gaillard C., Tancos Z., **Bock I.**, Baji A.G., Tar K., Pírity M.K., Dinnyes A. (2009): Promoter analysis of the rabbit POU5F1 gene and its expression in preimplantation stage embryos. *BMC Molecular Biology* 10:88. [IF: 2,89]

### Nemzetközi impakt faktorral rendelkező folyóiratokban megjelent további közlemények

Lovrics A., Gao Y., Juhasz B., **Bock I.**, Byrne H.M., Dinnyes A., Kovacs. K.A. (2014): Boolean Modelling Reveals New Regulatory Connections between Transcription Factors Orchestrating the Development of the Ventral Spinal Cord. *PLoS ONE* 9: e111430. [IF: 4,24]

Rungarunlert S., Klincumhom N., **Bock I.**, Nemes Cs., Techakumphu M., Pírity M.K., Dinnyes A. (2011): Enhanced cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells by use of the slow turning lateral vessel (STLV) bioreactor. *Biotechnology Letters* 33:1565-1573. [IF: 1,68]

## Nemzetközi impakt faktorral rendelkező folyóiratban megjelent konferencia absztraktok

**Bock I.**, Losonczy E., Carstea A.C., Feher A., Dinnyes A., Pribenszky C. (2011): Hydrostatic pressure stress treatment of mouse oocytes influences protein synthesis at the 4-cell stage. Proceedings of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Phoenix, Arizona, 7–10.01.2012. *Reproduction, Fertility and Development* 24:186-186. [IF: 2,56]

Pribenszky C., Matyas S., Losonczy E., Stanca C., **Bock I.**, Vajta G. (2010): Stress for stress tolerance: improving cell survival by sublethal stress treatment of eggs before vitrification – pilot study. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine, Denver, 23-27.10.2010. *Fertility and Sterility* 94:S32. O-106. [IF: 3,12]

**Bock I.**, Mamo S., Polgar Zs., Pribenszky C. (2008): Changes in gene expression of mouse blastocysts treated with high hydrostatic pressure pulse. 16<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction, Budapest, 13-17.07.2008. *Reproduction in Domestic Animals* 43:145-46. [IF: 1,6]

## Nemzetközi konferencián bemutatott poszterek, előadások

Polgar Zs., Tar K., Rungarunlert S., Muenthaisong S., **Bock I.**, Purity M., Dinnyes A. (2009): Improved derivation of embryonic stem cell lines from inbred c57BL/6J mouse strains. 7th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Barcelona, 8-11.09.2009. p. 104.

Rungarunlert S., Muenthaisong S., **Bock I.**, Tar K., Techakumphu M., Purity M., Dinnyes A. (2009): Differentiation of mouse embryonic stem (ES) cells into cardiomyocytes by using slow turning lateral vessel bioreactor. 7th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Barcelona, 8-11.09.2009.

## Hazai konferencián bemutatott poszterek, előadások

**Bock I.**, Raveh-Amit H., Losonczy E., Carstea A.C., Feher A., Mashayekhi K., Dinnyes A., Pribenszky C. (2014): Controlled stress temporarily reduces cellular protein synthesis – a possible way to increase stress tolerance of oocytes and embryos? Fialat Biotechnológusok Országos Konferenciája 2014, Szeged, 07.03.2014. ps. ÁB3.

Pribenszky C., **Bock I.**, Raveh-Amit H., Losonczy E., Carstea C., Fehér A., Mashayekhi K., Dinnyés A., Mátyás S. (2014): Egér petesejtek kontrollált stressz kezelése átmenetileg csökkenti a fehérjék szintézisét - “a sejtek edzése”. MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága és a SziE Állatorvos-tudományi Doktori Iskolája 40. „akadémiai beszámolója”, Budapest, 27-30.01.2014. ea. 8.

**Bock I.**, Losonczy E., Mamo S., Polgar Z., Dinnyes A., Harnos A., Pribenszky C. (2009): Transcriptional response and stress tolerance in high hydrostatic pressure treated mouse embryos. XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Nyíregyháza, 17-19.04.2009.

Polgar Zs., Tar K., Rungarunlert S., Muenthaisong S., **Bock I.**, Purity M., Dinnyes A. (2009): Generation of new C57B1/6J mouse embryonic stem cell lines. XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Nyíregyháza, 17-19.04.2009. PS13.

Rungarunlert S., Muenthaisong S., Feher A., **Bock I.**, Tar K., Techakumphu M., Purity M., Dinnyes A. (2008): Differentiation of embryonic stem (ES) cells into cardiac lineage MBK-Napok, Gödöllő, 17-18.11.2008.

## 7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok témavezetőmnek **Dr. Dinnyés Andrásnak**, hogy megteremtette a lehetőséget a kutatásaimhoz és, hogy munkám során végig támogattott.

Köszönöm **Dr. Pribenszky Csabának**, hogy megismertette velem találmányát, az ivarsejteken és embriókon alkalmazott magas hidrosztatikus nyomáskezelést, új ötleteket adott és kutatásaim során rengeteg segítséget nyújtott.

Köszönöm **Dr. Fehér Anitának**, a folyamatos támogatást a kísérleteim során és a sok szakmai segítséget, amellyel hozzájárult a sikeres eredményekhez.

Köszönöm **Dr. Solomon Mamonak**, hogy nélkülözhetetlen segítséget nyújtott a real-time PCR mérések elvégzéséhez.

Köszönöm **Dr. Polgár Zsuzsanna**, **Dr. Losonczy Eszter** és **Dr. Ana Claudia Carstea** rendkívül hasznos segítségét a kísérleti minta előállításához.

Köszönöm **Dr. L. Éder Katalin** értékes munkáját a microarray kísérletek során. Továbbá köszönöm **Dr. Johannes Beckersnek**, **Dr. Martin Irmlernek** és **Barbara Susanne Fridrichnek**, hogy részletesen megismertették velem a génexpressziós microarray technikát, mind elméleti, mind gyakorlati téren.

Köszönöm munkatársaimnak: **Dr. Kobolák Juliannának**, **Dr. Hadas Raveh-Amitnak**, és **Tolnainé Csákány Hajnalkának** a sok támogatást, amellyel hozzájárultak munkám elvégzéséhez.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm feleségemnek **Dr. Csadó Kingának** és lányaimnak, **Bock Enikőnek** és **Tündének**, amiért támogató és inspiratív környezetet nyújtottak nekem, és szüleimnek, akik szintén mellettem álltak és támogattak, hogy munkámat sikeresen befejezhessem.

Külön köszönet illeti az alábbi projekteket, amelyek anyagi és képzési segítséget nyújtottak munkám során: OMFB-00364/2007, NKFP07\_1-EGG\_CARE-HU - OM-00069/2008, NKTH/KPI Kozma F. TUDAS-1-2006-0005, EU FP6 CLONET (MRTN-CT-2006-035468), EU FP6 MED-RAT (LSHG-CT-2006-518240), Research Centre of Excellence - 8526-5/2014/TUDPOL, Bonus-Resolve OMFB-01660/2009, EpiConcept COST Action FA1201, EU FP7 Anistem PIAPP-GA-2011-286264, EU FP7 EpiHealth HEALTH-2012-F2-278418, EU FP7 EpiHealthNet PITN-GA-2012-317146, EU FP7 IDPbyNMR PITN-GA-2010-264257, EU FP7 RESOLVE FP7-HEALTH-F4-2008-202047.