



Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

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

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Varga Eszter

Gödöllő

2015

A doktori iskola

megnevezése:

Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

tudományága:

Állattenyésztés-tudomány

Vezetője:

Professzor Dr. Mézes Miklós CMHA, akadémikus

Tanszékvezető, egyetemi tanár

Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és

Környezettudományi Kar, Állattudományi Alapok Intézet,

Takarmányozástani Tanszék

Témavezető:

Professzor Dr. Dinnyés András D.Sc.

Laboratóriumvezető, egyetemi tanár

Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és

Környezettudományi Kar, Állattudományi Alapok Intézet,

Molekuláris Állatbiotechnológiai Laboratórium

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

1. AZ ÉRTEKEZÉS ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

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

Többféle pluripotens őssejt típus ismert, amelyek közül a kutatásokban az embrionális őssejtek (ESC: Embryonic Stem Cell) használata az általánosan elterjedt. Laboratóriumi körülmények között ESC-k hólyagcsíra állapotú embriók embriócsomójából nyerhetők. Számos faj esetében az ESC-k alapítása komoly biológiai korlátokba ütközik, mind ez idáig csak néhány faj ismert (egér, patkány és főemlősök), beleszámítva az embert is, ahol a pluripotens embrionális őssejt vonalak izolálása sikerrel járt. Ezen felül a humán embrionális őssejt vonalak létrehozásához szükséges humán embriók kinyerése további nehézségekbe ütközik, mind biológiai mind pedig etikai okokból. Ezért, egy az embriók felhasználását elkerülő pluripotens sejt vonal előállításának eljárás komoly előnyt nyújthat az őssejt kutatás és terápia területén. Az indukált pluripotens őssejtek (iPSC: Induced Pluripotent Stem Cell) alkalmazása egy alternatív megoldást jelenthet e problémák leküzdésére, mivel azok felnőtt testi sejtek genetikai újraprogramozásával hozhatóak létre, a pluripotenciáért felelős faktorok bizonyos kombinációjának a sejtekbe való túlexpresszáltatásával. Az első iPSC vonalat Takahashi és Yamanaka hozta létre 2006-ban, ahol számos faktor tesztelése után az OCT-4, SOX2, KLF4, C-MYC faktorokat találták a leghatékonyabbnak a sejtek újraprogramozásában. Az iPSC vonalak jelentősége abban rejlik, hogy elméletileg bármilyen sejt típusból létrehozhatóak és a sejt donorra jellemző genotípust hordozzák (betegség-specifikus). Alkalmazásuk a humán gyógyászatban terjedt el, például betegség modellezésben, gyógyszer felfedezés és tesztben, illetve terápiás gyógymódok kidolgozásában. Továbbá az állattenyésztés területén is fontos szerepet tölthetnek be transzgenikus állatok előállítása során, vagy az állatgyógyászatban.

Az iPSC alapításban tradicionálisan azok a rendszerek terjedtek el, amelyek a pluripotencia faktorokat stabilan integrálják a sejtek genomjában, azok magas újraprogramozó hatékonysága miatt. Azonban mára már ismert, hogy az integrálódott transzgen negatív hatással lehet az iPSC sejtek molekuláris és funkcionális tulajdonságaira egyaránt. Ez a transzgen random integrációjából következhet, amely inszercionális mutagenezist is okozhat. Számos transzgen-

mentes újraprogramozó rendszer fejlődött az elmúlt években, amelyek DNS-vektor alapúak, vagy DNS-mentes fehérje, illetve RNS formájú bevitelt alkalmaznak. Azonban e rendszerek hatékonysága például nehezen újraprogramozható sejtípusok esetében az integratív rendszerek alatt maradnak. E problémák leküzdésére nyújthat megoldást olyan integratív rendszerek alkalmazása, amelyeket úgy terveztek meg, hogy az újraprogramozást követően kivághatóak a sejtek genomjából (kivágható vírusvektor, transzpozon-transzpozáz). Munkám főként e rendszerek megismerésére koncentrált.

A kísérletek főbb célkitűzései:

1. Megbízható újraprogramozási rendszer beállítása és optimalizálása egér sejteken. E munka keretében integratív (lentivírus, transzpozon) és nem-integratív (fehérje bevitel) rendszerek tanulmányozása.
2. Az egér modellen tesztelt három újraprogramozó rendszerből a tapasztalataim alapján leghatékonyabbnak bizonyuló rendszer/rendszerek humán sejtek újraprogramozásához való adaptálása.
3. A létrehozott iPSC vonalak teljes körű pluripotencia jellemzése, szaporítása hosszú távú tárolása kutatócsoportunk részére.
4. Transzgén-mentesített iPSC vonalak alapítása integrálódó/kivágható rendszerek tesztelése során (kivágható lentivírus, transzpozon-transzpozáz). A pluripotenciáért felelős transzgén eltávolíthatóságának és hatásának széleskörű vizsgálata.
5. Távlati célok: laboratóriumunkban folyó kísérletekhez transzgén-mentes, betegség-specifikus iPSC vonalak alapítása a gyűjtött tapasztalatok alkalmazásával, amelyekhez e kísérletek során előállított és karakterizált egér/humán iPSC vonalak szolgálnak majd kontrollként.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Az iPSC vonalak generálásához kapcsolódó standard eljárások

2.1.1. Sejtenyésztés

Az egér és humán sejteket ún. sejtenyésztő inkubátorban, 37°C-on, 5% (v/v) CO₂ szint mellett tenyésztettük a standard tenyésztési eljárásoknak megfelelően. Az egér iPSC alapítási kísérletekben kontrollként minden esetben az azonos genetikai háttérű egér ESC vonalakat használtuk.

2.1.2. A pluripotencia igazolása

A létrehozott egér iPSC vonalak pluripotens státuszát az alábbi módszerekkel igazoltuk:

- **Génexpressziós vizsgálat:** a pluripotenciáért felelős gének expresszióját RT-PCR-el végeztük az *Oct-4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*, *Nanog*, *Rex1*, *Dax1*, *FoxD3*, *Fbxo15*, *Eras* génekre.
- **Fehérjék és sejtfelszíni markerek kimutatása:** immuncitokémiai (ICC)-festésekkel végeztük az OCT-4, NANOG és SSEA-1 markerekre, amelyeket fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltunk.
- **In vitro spontán differenciáció:** az embrionális testecskék létrehozásához a függőcseppees módszert alkalmaztuk. A képződött embrionális testecskéket a differenciáció 2. napján 24-lyukú tenyésztőedényekbe tettük ki és a spontán kontrakciót mutató sejtsomók számát feljegyeztük. A sejtsomókat a differenciáció 14. és 21. napján fixáltuk, amelyeken ICC-festéseket végeztünk differenciációs markerekre specifikus ellenanyagokkal (DESMIN, TROPONIN T) és azokat fluoreszcens mikroszkóppal vizualizáltuk.
- **In vitro neurális differenciáció:** a differenciációt egy publikált protokoll alapján végeztük (Klincumhom et al. 2012). Az embrionális testecskéket a szuszpenziós módszerrel hoztuk létre. A 4.-ik napon a differenciációs médiumot retinsavval (5 µM) egészítettük ki. A 8.-ik napon az embrionális testecskéket disszociáltuk és a sejtsuszpenzióból 2×10^5 sejt/cm² tettünk ki fedőlemezt tartalmazó 24-lyukú tenyésztőedényekbe (ICC-festéshez), vagy 6-lyukú tenyésztőedényekbe, amelyet előzőleg 0,01% poly-L-ornithin és 1 µg/cm² laminin-el vontuk be. A sejteken a differenciáció 10-, 12- és 14.-ik napján ICC-festéseket végeztünk NESTIN és βIII-TUBULIN markerekre, amelyet fluoreszcens mikroszkóppal és a NESTIN esetén áramlási citométerrel (FACS) is analizáltunk.
- **In vivo differenciáció:** a sejtek *in vivo* differenciációs potenciáját kiméra tesztekkel vizsgáltuk. A kiméra állatok létrehozása hólyagcsíra állapotú embriók (E3.5) mikroinjektálásával (PrimeTech, Ibaraki, Japán) történt, amely során 10-15 sejt/embrió került injektálásra (Kawase et al. 2001). A befogadó embrió a C57BL/6xDBA/2J hibrid és C57BL/6 genetikai háttérű iPSC vonalak esetében ICR, az ICR-iPSC vonalak esetében pedig C57BL/6xDBA/2J volt. Az élve

születő kimérák számát feljegyeztük. A csírvonal transzmissziójára a kimérák párosításából születő utódok szőrszíne utalt.

A létrehozott humán iPSC vonalak pluripotens státuszát az alábbi módszerekkel igazoltuk:

- **Fehérjék és sejtfelszíni markerek kimutatása:** ICC-festésekkel végeztük az OCT-4, NANOG, TRA-1-60, TRA-1-81 és E-CADHERIN markerekre és azokat fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

- ***In vitro* spontán differenciáció:** az embrionális testecskéket szuszpenziós módszerrel hoztuk létre, ahol a képződött embrionális testecskéket a differenciáció 5. napján 24-lyukú tenyésztőedényekbe tettük ki. A sejtcsomókon a differenciáció 14. napján ICC-festéseket végeztünk a három csírrétegre specifikus ellenanyagokkal (NESTIN, β III-TUBULIN, GATA4, AFP, BRACHYURY, VIMENTIN) és azokat fluoreszcens mikroszkóppal vizualizáltuk.

2.2 Különböző genetikai háttérű egér iPSC vonalak létrehozása lentivírus transzdukcióval

A kísérletek során három különböző genetikai háttérű egértörzset alkalmaztunk: C57BL/6 (beltenyésztett), C57BL/6xDBA/2J (hibrid) és ICR (nem-beltenyésztett), továbbiakban BL6, F1 és ICR-ként jelölve. A három egértörzsből izolált egér embrionális fibroblasztok (MEF: Mouse Embryonic Fibroblast) újraprogramozását egy általunk létrehozott lentivírus alapú, kivágható, policisztronos plazmiddal végeztük (pF-EF1 α /OSKM/IRES/EGFP-W). A vektor tartalmazta az egér pluripotencia cDNS szekvenciákat (*Oct-4-Sox2-Klf4-c-Myc*) és az EGFP riportert az EF1 α promóter irányítása alatt. A konstrukt egy LoxP helyet is magába foglalt, amely lehetővé teszi az integrálódott vektor eltávolítását a Cre-plazmid tranziens transzfekciójával (Cre/LoxP rendszer).

A vírus transzdukcióhoz 3×10^4 MEF-et ültettünk ki ($0,75 \times 10^4$ sejt/cm²) *Fibroblaszt-médiumban*. Hat óra elteltével az előzetesen létrehozott és szűrt lentivírust tartalmazó felülúszót (MOI 2-5) 1 ml *mESC-médiumm*al hígítottuk ki, amely 8 μ g polibrént is tartalmazott, és ezt az oldatot hozzáadtuk a sejtekhez. 24 órával a transzdukciót követően a médiomot lecseréltük és további 24 óra elteltével a sejteket tripszin-EDTA-val disszociáltuk és egy 10 cm-es tenyésztő edénybe tettük *mESC-médiumban*. A médiomot naponta cseréltük a sejteken. A megjelent EGFP pozitív ESC-szerű kolóniákat fluoreszcens mikroszkóp alatt egyesével felszedtük. A további analízishez és az EGFP expressziós szint FACS-al történő meghatározásához a klónokat felszaporítottuk.

2.3. Transzgén-mentes vonalak létrehozása lentivírus-mediált egér iPSC vonalaktól és a transzgén kivágásának igazolása

A 2.2-es pontban alapított egér iPSC vonalak egyikén teszteltük a transzgén eltávolíthatóságát. A Cre-plazmid (40 µg, pTriEx-HTNC; Addgene plazmid szám: 13763) transzfekcióját a Gene Pulser® II Elektroporációs rendszerrel végeztük a gyártó előírásainak megfelelően. Az elektroporációt követően a sejtszuspenziót 6 cm-es MitC-MEF-el fedett tenyésztőedényekbe tettük ki *mESC-médiumban*. Két nappal a transzfekciót követően a sejteket a tripszin-EDTA-val disszociáltattuk és 200 sejtet 0,1% zselatinnal fedett 10 cm-es tenyésztő edénybe tettünk. A megjelölt EGFP negatív kolóniákat fluoreszcens mikroszkóp alatt egyesével felszedtük, szaporítottuk és a kivágódást FACS-al ellenőriztük.

A FACS alapján EGFP negatívítást mutató klónok transzgén-mentes státuszát transzgén-specifikus PCR reakciókkal erősítettük meg (GoTaq® Green Master Mix; Promega, Madison, USA). A transzgén jelenlétét/hiányát Southern blot analízissel is igazoltuk (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II; Roche, Bazel, Svájc). A genomiális DNS-t a SphI enzimmal emésztettük és a *c-Myc* szekvenciára illeszkedő (1305 bp) próbát használtuk. Kontrollként egér ESC vonalat használtunk, ahol csak az endogén *c-Myc* detektálását vártuk (2,6 kB).

2.4. Az egér iPSC vonalak létrehozása fehérje bevitellel

Az újraprogramozáshoz 5×10^4 ICR-MEF-et ($0,5 \times 10^4$ sejt/cm²) ültettünk ki. A sejteket kiültetésüktől számított 48 órás időközönként, négy ciklusban, a négy pluripotencia faktorból származó (OCT-4, KLF4, SOX2, C-MYC) tisztított fehérjével transzdukáltuk (8 µg/ml/fehérje), egy korábban közölt protokollt követve (Kim et al. 2009; Zhou et al. 2009). A 9. napon a sejteket tripszin-EDTA-val disszociáltattuk és 10 cm-es tenyésztőedényekbe tettük ki *mESC-médiumban*. A transzdukciót követő 40. nap körül egér ESC-szerű kolóniák kezdtek megjelenni, amelyeket felszedtünk és felszaporítottunk a további karakterizációs kísérletekhez.

2.5. Transzgén-mentesíthető humán iPSC vonalak létrehozása lentivírus transzdukcióval

2.5.1. Humán iPSC vonalak létrehozása

Az újraprogramozáshoz öt egészséges donortól (B#1-5; B=blood) származó perifériás vér mononukleáris sejteket (PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell) használtunk. A vérvétel körülményei az arra vonatkozó „lege artis” előírások betartásával történt, az ETT TUKEB által adott kutatási engedély alapján. A vért ficoll tartalmú 8 ml-es BD Vacutainer (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) csövekbe gyűjtöttük le. A vérből a PBMC-eket izoláltuk a csövek centrifugálásával majd PBMC-eket tartalmazó réteget izoláltuk és azonnal felhasználtuk vagy

későbbi felhasználásig lefagyasztottuk. A PBMC-k újraprogramozásához egy korábban publikált (Voelkel et al. 2010; Warlich et al. 2011) kivágható, policisztronos újraprogramozó plazmidot használtunk (pRRL.PPT.SF.hOKSMco.idTomato.preFRT). A vektor tartalmazta a humán kodon-optimalizált pluripotencia cDNS szekvenciákat (*OCT-4-KLF4-SOX2-C-MYC*) és a dTomato riportert az SFFV promóter irányítása alatt. A konstrukt egy FRT helyet is magába foglalt, amely lehetővé teszi az integrálódott vektor eltávolítását a Flp-plazmid tranzienstanszfekciójával (Flp/FRT rendszer).

A transzdukció előtt három nappal 1×10^6 PBMC-t ($0,25 \times 10^6$ sejt/cm²) tettük ki *Humán PBMC-médiumban*. Három nap elteltével a sejteket transzdukáltuk az előzetesen létrehozott és szűrt lentivírus felülúszóval (1 ml), amihez 5 µg polibrént is adtunk és egy 12-lyukú tenyésztőedény 1 lyukába tettük ki azt. A tenyésztőedényt centrifugáltuk, majd inkubáltuk. Másnap a sejteken médiumot cseréltünk. Két nap elteltével a sejteket összegyűjtöttük és 6 cm-es MEF-et tartalmazó Petri-csészébe tettük ki. A transzdukciótól számolt 13. napon a tenyésztő médiumot *hESC-médiumba* váltottuk és kétnaponta cseréltük. A megjelent ESC-szerű kolóniákat egyesével felszedtük és szaporítottuk.

2.5.2. A transzgén kivágása és annak igazolása a humán lentivírus iPSC vonalakban

A humán lentivírus iPSC vonalakat a pLV.hCMV-IE.FLPe.IRES.PurR.hHBVPRE (Gonçalves et al. 2010) plazmiddal transzfektáltuk a FuGENE-6 (Roche, Bazel, Svájc) transzfekciós reagens felhasználásával, a gyártó előírásainak megfelelően. 100 µl FuGENE-6/DNS keveréket, amely 1 µg Flp-rekombinázt expresszáló plazmidot tartalmazott cseppenként adtuk hozzá a sejtekhez. Egy napos inkubációt követően a sejteket 48 órán át puromicin-el (1 µg/ml) szelektáltuk.

A megjelent kolóniákban a transzgén jelenlétét/hiányát transzgén-specifikus PCR reakciókkal ellenőriztük (GoTaq[®] Green Master Mix; Promega, Madison, USA) és az alapján csak a transzgén-mentesnek bizonyult kolóniákat szedtük fel mechanikusan és tenyésztettük tovább.

2.6. Transzgén-mentesíthető humán iPSC vonalak létrehozása Sleeping Beauty-transzpozonnal

2.6.1. Humán SB-iPSC vonalak létrehozása

A kísérletek első lépése Hollandiában, az LUMC-n egy Európai Unió projektéhez kapcsolódó tudományos együttműködés keretében történt. A holland kutatócsoport etikai engedélye keretében egy kutatási célokra felajánlott 14 hetes abortált magzattól a standard eljárással humán magzati fibroblasztot izoláltunk. A sejtek újraprogramozásához a pT2BH-

OSKM-IRES/eGFP transzpozont használtuk, amelyet kutatócsoportunk hozott létre és tesztelt korábban (Muenthaisong et al. 2012). A transzpozon plazmid tartalmazta az egér pluripotencia cDNS szekvenciákat (*Oct-4-Sox2-Klf4-c-Myc*) és az EGFP riportert az EF1 α promóter irányítása alatt. $2,5 \times 10^5$ fibroblaszt sejtet a pT2BH-OSKM-IRES/eGFP transzpozonnal (2 μ g) és a pCMV-SB100X transzpozázzal (200 ng) a Nucleofector kit-el nukleoporáltuk (Lonza, Bázél, Svájc) a gyártó által előírt protokollt követve. A transzfektált sejteket tenyésztőedényekbe tettünk ki *Fibroblaszt-médiumban*, amelyet *hESC-médiumba* cseréltünk egy nappal a transzfekciót követően. A transzfekciótól számított 7. napon a sejteket passzáltuk és *hESC-médiumban* szuszpendáltuk fel, amelyet MitC-MEF-et tartalmazó tenyésztőedényre tettünk ki. A megjelent ESC-szerű kolóniákat mechanikusan felszedtük és tenyésztettük.

2.6.2. A transzgén kivágása és annak igazolása a humán SB-iPSC vonalakban

Az iPSC vonalakba beépült SB-transzgének számát Southern blot analízissel (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II; Roche, Bázél, Svájc) határoztuk meg. A genomiális DNS-t a PstI vagy SacI enzimekkel emésztettük és az *EGFP* (Life Technologies, Carlsbad, USA, 712 bp) vagy *c-Myc* (1305 bp) kódoló szekvenciára specifikus próbát használtuk. Az endogén *C-MYC*-et egy ~1,5 kB méretű sáv detektálásával vártuk. Az SB-iPSC vonalak transzgén-mentesítését egy módosított hiperaktív transzpozáz (pEFBOS-SB100X-iresPuro) újra-transzfektálásával kíséreltünk meg. A transzfekciót a 2.5.2-es pontban ismertetett módon végeztük. Egy napos inkubációt követően a sejteket 48 órán át puromicin-el (1 μ g/ml) szelektáltuk.

A megjelent kolóniákban a transzgén jelenlétét/hiányát transzpozon-specifikus PCR reakciókkal ellenőriztük (GoTaq[®] Green Master Mix-et; Promega, Madison, USA) és az alapján csak a transzgén-mentesnek bizonyult kolóniákat szedtük fel mechanikusan és tenyésztettük tovább. Az integrációk genomban való elhelyezkedését az ún. Splinkerette PCR-el határoztuk meg, amely eredmények ismeretében a transzgén jelenlétét/hiányát lókus-specifikus PCR reakciókkal is igazolni tudtuk. A Splinkerette PCR-t egy korábban közölt protokoll alapján végeztük (Uren et al. 2009). A genomiális DNS-t CviQI vagy DpnII enzimekkel emésztettük, majd ligáltuk a megfelelő splinkerette adaptorokkal. A Splinkerette PCR reakciókhoz a Platinum Taq high fidelity DNA polimerázt használtuk. A TA-klónozott PCR termékeket két oldalról az M13 forward és reverz primerekkel megszekvenáltuk. A szekvenálási eredményeket az NCBI Homo Sapiens build 37.3 genom adatbázis BLAST kereséssel analizáltuk.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Különböző genetikai háttérű egér iPSC vonalak létrehozása lentivírus transzdukcióval

Egy általunk létrehozott policisztronos lentivírus vektorral, megbízható és robosztus egér iPSC generálási rendszert sikerült laboratóriumunkban beállítani. A rendszer alkalmas volt arra, hogy beltenyésztett (BL6), nem-beltenyésztett (ICR) és hibrid (F1) genetikai háttérű MEF-ből nagyszámú stabil egér iPSC vonalat hozzon létre. Hat vonalat szaporítottunk fel genetikai háttérként, amelyek morfológiájukban, és pluripotencia marker expressziós mintázatukban hasonlóak voltak az azonos genetikai háttérű egerekből alapított kontroll ESC vonalakhoz. A három vizsgált genetikai háttérből származó sejtek újraprogramozhatósága és annak hatékonysága között nem találtunk lényeges különbséget.

3.2. Transzgén-mentes vonalak létrehozása lentivírus-mediált egér iPSC vonalakkól

Az egyik F1-iPSC vonalban a Cre-plazmid expresszióját követően a 15 felszedett klónból 13 mutatott EGFP negativitást, amely a transzgén kivágódását jelezte. A 13 klónból morfológiai kritériumok alapján 2 klónt választottunk ki (iPS-Af.4 és iPS-Af.15), amelyekben a transzgén kivágását transzgén-specifikus PCR reakciókkal és Southern blot-al is igazoltunk. A két kivágott szubklón morfológiájában és a pluripotenciáért felelős marker expressziós mintázatában nem tért el a transzgént-tartalmazó őstől (iPS-Bef) illetve az egér ESC vonalaktól sem. A transzgén-mentes iPSC vonalakon a transzgén eltávolításának az *in vitro* differenciációs képességre gyakorolt hatását is tanulmányoztuk. Azt találtuk, hogy a transzgén kivágása növelte a megjelent pulzáló sejtcsoportok számát azok *in vitro* spontán differenciációja során (iPS-Bef: 39,3%, iPS-Af.4: 66,71%, iPS-Af.15: 54,17%). A transzgén kivágásának következtében az *in vitro* neurális differenciáció hatékonyság is növekedett, amelyet a FACS-al mért NESTIN expresszióval igazoltunk (Diff. 10.-ik napja: iPS-Bef, $10,7 \pm 0,3\%$; iPS-Af.4, $10,7 \pm 0,3\%$; iPS-Af.15, $25,1 \pm 0,8\%$; ESC, $57,1 \pm 1,7\%$). A létrehozott transzgén-mentes iPSC vonalak *in vivo* differenciációra is képesek voltak. Kivágható lentivírus vektorral újraprogramozott egér iPSC sejtekkel sikerült elsőként megvalósítanunk és publikálnunk csírvonal-kompatibilis kimérák létrehozását.

3.3 Egér iPSC vonalak létrehozása fehérje bevitellel

Az ICR genetikai háttérű MEF-en tesztelt, tisztított rekombináns fehérjék ismételt transzdukcióját követően egyetlen stabil egér iPSC vonalat tudtunk létrehozni (piPS-H1). A létrehozott vonal morfológiájában, és pluripotencia marker expressziós mintázatában hasonló volt az azonos genetikai háttérű egerekből alapított kontroll ESC vonalhoz, emellett *in vitro* spontán differenciációs potenciájában sem tért el attól. Képes volt *in vitro* neurális differenciációra is ahol a mért NESTIN expressziós szint a differenciáció 10.-ik napján 49,5% volt. A piPS-H1 vonal *in vivo* differenciációja során sikerült kimérákat létrehozni azonban az iPSC sejtek nem mutattak csíravonal kompetenciát.

3.4 Transzgén-mentesíthető humán iPSC vonalak létrehozása lentivírus transzdukcióval

Egy policisztronos lentivírus újraprogramozó vektorral öt donor vér mononukleáris sejtjeiből sikerült stabil humán iPSC vonalakat alapítani. A megjelent kolóniák száma a donorok esetén nagy varianciát mutatott (B#1: ~70, B#2: ~80, B#3: ~40, B#4: ~30, B#5: 1). Az alapított iPSC vonalak mindegyike human ESC-szerű morfológiát mutatott és expresszálta a vizsgált pluripotencia markereket. Emellett képesek voltak *in vitro* spontán differenciálódásra, amelyet a három csírarétegre-specifikus markerekkel igazoltunk.

Hét humán lentivírus-mediált iPSC vonalat teszteltünk a transzgén eltávolíthatóságának hatékonyságára. A vonalakban a Flp-plazmid expresszióját, majd puromicin szelekcióját követően a megjelent kolóniák transzgén-mentességét transzgén-specifikus PCR reakciókkal igazoltuk. A hét vonal esetében a transzgén eltávolíthatóságának hatékonysága az alábbiak szerint alakult: hiPS#1: 98%, hiPS#2: 24%, hiPS#3: 60%, hiPS#4: 20%, hiPS#9: 0%, hiPS#12: 43%, hiPS#13: 40%.

3.5 Transzgén-mentesíthető humán iPSC vonalak létrehozása SB-transzpozonnal

Egy korábban általunk egér sejtek újraprogramozásában tesztelt SB-transzpozon újraprogramozó vektor és az SB100X transzpozáz vektor együttes transzfekeciójával humán magzati fibroblaszt sejteket programoztunk vissza. A transzfekeciót követően 4 kolónia jelent meg, amelyekből stabil vonalakat alapítottunk (SB1, SB2, SB4, SB5). A négy vonal hESC-szerű morfológiát mutatott és expresszálta a vizsgált pluripotencia markereket, emellett képesek voltak *in vitro* spontán módon differenciálódni, amelyet a három csírarétegre-specifikus markerekkel igazoltunk.

A Southern blot analízis alapján mind a négy SB-iPSC vonal legalább 3 transzpozon-kópiát tartalmazott, így morfológiai kritériumok alapján az SB2 és SB5 vonalakat teszteltük a transzgén eltávolíthatóságának hatékonyságára nézve. Splinkerette PCR segítségével mindkét vonal esetén egy-egy transzpozon integráció genomi pozícióját sikerült meghatároznunk, amely ismeretek alapján a transzgén-specifikus PCR reakciók mellett lókusz-specifikus PCR-ekkel is igazolni tudtuk az esetleges kivágódást. Azonban a puromicin szekvenciával módosított SB100X transzfekecióját, majd szelekcióját követően egyik vonal esetén sem sikerült transzgén-mentes klónokat létrehozni. Azt is megvizsgáltuk, hogy a transzpozáz ismételt újra-transzfekeálása emeli-e a kivágás hatékonyságát. A vektor 3-szori újra-transzfekeálása az SB5-ös vonalban az egyik transzpozon integráció eredeti pozíciójából való kimozdulását eredményezte, azonban az egy másik genomi lokációban újra-integrálódott, amelyet PCR reakciókkal és Southern blot-al is igazoltunk.

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

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

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1. Különböző genetikai háttérű egér iPSC vonalak létrehozása lentivírus transzdukcióval

Korábbi publikációk azt mutatták, hogy az egér ESC alapítás általában a 129/SV vagy a C57BL/6 beltenyésztett törzsekből a legeredményesebb, míg egyéb beltenyésztett/nem-beltenyésztett törzsekből a sejtvonala alapítás jelentősen komplikáltabb (Suzuki et al. 1999; Kawase et al. 1994). Azonban a genetikai hátterek egér iPSC alapításra való hatásáról, eddig igen csekély számú tanulmány jelent meg (Schnabel et al. 2012; Muenthaisong et al. 2012). Kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy az általunk létrehozott vektort alkalmazva a genetikai hátterek, ezen belül is a beltenyésztés/nem-beltenyésztés hatása tapasztalható-e az újraprogramozási hatékonyságára nézve. Megfigyeléseink alapján a három általunk vizsgált egértörzsből (BL6, F1, ICR) származó egér testi sejtek újraprogramozhatóságában és a megjelent iPSC kolóniák mennyiségében nem találtunk különbséget. Ezt a megfigyelést korábban már egér SB-iPSC vonalak létrehozása esetén is leírtuk (Muenthaisong et al. 2012). E kísérletsorozatok alapján megállapítható, hogy integrálódó iPSC újraprogramozó rendszerek használata esetén a rendszerek robusztussága lehetőséget nyújt arra, hogy még az ESC alapításban nehézkesen alkalmazható egértörzsekből is pluripotens vonalakat hozzunk létre. Ennek az állattenyésztésben transzgenikus haszonállatok előállításánál történő genetikai módosításán keresztül lehet jelentősége, valamint humán genetikai betegségek tanulmányozása/modellezése során, mivel az eltérő genetikai háttérű törzsek, egymástól eltérő fenotípust mutathatnak (Erickson 1996; Sullivan et al. 2007).

5.2. Transzgén-mentes vonalak létrehozása lentivírus-mediált egér iPSC vonalakkal

Korábbi publikációból ismert volt számunkra az iPSC vonalakba integrálódott transzgén negatív hatása (Soldner et al. 2009; Chakraborty et al. 2013). A kivágás előtti és kivágás utáni iPSC vonalak differenciációs képességének összehasonlításával nekünk is lehetőségünk nyílt a transzgén meglétének/hiányának hatását tanulmányozni. Annak ellenére, hogy a vizsgált mintaszám alacsony volt, mégis kimutatható volt a transzgén drasztikus hatása az iPSC-k *in vitro* differenciációs képességére. Az *in vitro* spontán és neurális differenciáció esetében is azt találtuk, hogy a kivágás előtti differenciációs hatékonyság igen alacsony volt, míg a kivágott szubklónokban ez megnövekedett a transzgén eltávolításával. Ez a jelenség magyarázható egyrészt azzal, hogy a lentivírus vektorok esetén az integrációk gyakorta történnek transzkripciós egységekbe (Schröder et al. 2002). Mivel a transzgén lokációja az alapított vonalban általunk nem ismert ezért csak feltételezni lehet, hogy az integráció valamilyen differenciációban kulcsfontosságú génbe történt, csökkentve, vagy megszüntetve az inszerció által érintett gén

működését. Egy másik magyarázat lehet az is, hogy az újraprogramozó vektor egy stabilan expresszáló promótert tartalmaz, amely a transzgén által kódolt exogén pluripotencia gének folyamatos expresszióját eredményezi. A pluripotencia gének folyamatos expressziója mellett pedig valószínűsíthető, hogy a sejtek nem képesek differenciálódni. A β III-TUBULIN festéseinken az ektopikus EGFP expressziója igen erős a transzgént tartalmazó vonalban, ami az aktívan expresszáló transzgén jelenlétét jelzi.

Nagyszámú tanulmány bizonyítja az egér iPSC vonalak *in vivo* differenciációs potenciálját teratoma formálódási kísérletekkel vagy kiméra előállításával, habár e módszerek még nem bizonyítják a vonalak csírvonal kompetenciáját. Azonban a csírvonal kompetens kimérák formálódásának képessége a pluripotencia meglétének legszigorúbb kritériuma, a differenciációs kapacitás valódi mércéje, ezért e teszt megléte kiemelkedő fontosságú. A kiméra előállítási kísérleteinkkel az irodalomban elsőként mutattuk be, lentivírussal generált csírvonal kompetens iPSC vonalak létrehozását, a transzgén sejtekből való eltávolítását követően.

5.3. Egér iPSC vonalak létrehozása fehérje bevitellel

A lentivírus-mediált egér iPSC vonalokból a transzgén-mentes vonalak létrehozása egy megbízható módszernek bizonyult. Habár aktív transzgén szakasz nem maradt a genomban, amely negatívan befolyásolhatja a differenciációs potenciált, azonban a kivágás néhány száz bázispár „footprint”-et hagy hátra, vagyis a vonalak nem teljesen transzgén-mentesek. Ezen okok miatt fontosnak tartottuk integrációktól mentes újraprogramozó rendszer tanulmányozását is, ahol az újraprogramozást rekombináns fehérjékkel végeztük. Ezzel a módszerrel egyetlen transzgén-mentes egér iPSC vonalat sikerült létrehozunk. Habár a vonal igen jól szerepelt *in vitro* és *in vivo* pluripotencia tesztekben, a kimérák nem voltak csírvonal kompatibilisek, így a sejtek újraprogramozódásának mértéke nem teljesen egyértelmű.

A fehérjével való újraprogramozás a vizsgált integratív rendszerekhez képest nagyon munkaigényes és alacsony hatékonyságú volt. Így az adott rendszert a további humán iPSC alapításos kísérletekben nem alkalmaztuk.

5.4. Transzgén-mentesíthető humán iPSC vonalak létrehozása lentivírus transzdukcióval

Ezekben a kísérletekben egy korábban publikált (Voelkel et al. 2010; Warlich et al. 2011) kivágható, polycisztronos újraprogramozó vektort használtunk. A vektor készítőinek egér és humán fibroblasztból sikerült nagyszámú iPSC vonalat előállítaniuk. Habár ismert, hogy a fibroblasztok újraprogramozása igen hatékony, nekünk vér mononukleáris sejtekből sikerült az iPSC alapítás, amely sejtípusok köztudottan alacsony hatékonysággal programozhatóak vissza. Azonban előnyük a fibroblasztokhoz képest, hogy nagy számban non-invazív módon nyerhetőek

a donoroktól. A módszerrel sikerült lentivírus-mediált humán iPSC vonalakat előállítanunk öt vérdonor mintájából. A megjelölt ESC-szerű kolóniák mennyisége az öt donor esetében nagy variációt mutatott, amit valószínűsíthetően a donorok eltérő genetikai háttere okozhatott.

Lentivírus-mediált humán iPSC vonalakkól is megkíséreltük az újraprogramozó vektor eltávolítását a FLP/FRT-rekombináz rendszer használatával. Hét vonalból hatban sikerült transzgen-mentes szubklónokat előállítanunk. Annak ellenére, hogy mindegyik esetben ugyanazt a rendszert használtuk, egy vonalban a kivágás sikertelen volt, a másik hat esetében a kivágás hatékonysága igen nagy variációt mutatott. Ez azzal magyarázható, hogy a lentivírus transzdukcióval a transzgen random számban és pozícióban integrálódik a genomba. Feltételezhetően az egyes lokuszokból a kivághatóság mértéke eltérő. A vektor egy korábbi, nem kodon-optimalizált verzióját egér iPSC vonalak létrehozásával és a transzgen eltávolításával tesztelték (Voelkel et al. 2010). Egy a vektort három kópiaszámban tartalmazó egér iPSC vonalból próbálták meg a transzgent eltávolítani a FLP-rekombináz fehérje transzdukciójával. A 12 tesztelt szubklón egyikéből sem sikerült mindhárom transzgent eltávolítani. Azt a szubklónt, amely már csak egyetlen transzgent tartalmazott FLP-rekombinázzal újra transzdukálták és a 8 vizsgált szubklón közül háromból sikerült eltávolítaniuk a fennmaradó egy transzgent is. Ezzel ellentétben mi már egyszeri transzdukcióval is számos transzgen-mentes vonalat figyeltünk meg.

5.5. Transzgen-mentesíthető humán iPSC vonalak létrehozása SB-transzpozonnal

Korábbi tanulmányokból tudjuk, hogy transzpozonnal (PB: PiggyBac) már sikerült egér és humán testi sejteket újraprogramozni iPSC-ké, hasonló hatékonysággal, mint a vírus alapú génbeviteli eljárásokkal (Kaji et al. 2009; Woltjen et al. 2009; Yusa et al. 2009). A transzpozon rendszer előnyei közé sorolható, hogy nem vírus alapú, így alkalmazása során nincs szükség speciális biztonsági eljárásokra. Emellett a transzpozon vektor egy DNS molekula, amely előállítása egyszerűbb és olcsóbb, mint a jelenlegi vírus előállítási protokollok, illetve lehetővé teszi a xeno-free iPSC vonalak előállítását. Az integrálódó rendszerek negatív tulajdonságai közé sorolható, hogy azok random módon integrálódnak a genomba, azonban egy korábbi tanulmány azt mutatta, hogy a lentivírussal, retrovírussal és PB-transzpozonnal szemben az SB-transzpozon nem szokott transzkripciós egységekbe beépülni (Mátés et al. 2009; Schröder et al. 2002; Wilson et al. 2007; Wu et al. 2003).

SB-transzpozon-alapú rendszer használatával sikerült humán iPSC vonalakat előállítanunk humán magzati fibroblasztból. Míg az SB-transzpozonnal négy darab iPSC vonal jelent meg, addig a lentivírusos rendszerrel ez a szám igen változó volt. Azonban, két újraprogramozó rendszer hatékonyságát pontosan összehasonlítani nem lehet, mivel az függhet például az újraprogramozandó sejtípustól, annak osztódásától, genetikai háttérétől, a vektorban alkalmazott faktorok típusától, illetve az újraprogramozás során használt kismolekuláktól is.

A transzpozon alapú rendszerek természetüknél fogva lehetőséget nyújthatnak az újraprogramozó vektor „footprint” mentes eltávolítására a transzpozáz enzim újraaktiválódása révén. Amíg ezt az elképzelést PB-transzpozonnal egér sejtekben sikerült megvalósítani (Woltjen et al. 2009; Yusa et al. 2009) és transzgén-mentes iPSC vonalakat létrehozni, addig hasonló transzgén-mentes humán iPSC vonalak generálása e rendszerekkel eddig még nem sikerült. Ennek tesztelésére a humán SB-iPSC vonalainkat puromicint kódoló SB100X transzpozáz vektorral újra-transzfektáltuk, azonban a transzpozon eltávolítása ezzel a módszerrel eredménytelen volt. Az egyik integrálódott transzpozont az SB5 vonalban sikerült ugyan az eredeti lókuszból kimozdítanunk a transzpozáz többszöri ismételt transzfekeciójával, azonban az újraintegrálódott a genom más részébe. Tapasztalataink tehát azt mutatták, hogy a transzpozonok újraintegrálódó természetéből adódóan e rendszer jelenlegi formájában alkalmatlan transzgén-mentes iPSC vonalak előállítására.

Kísérleteink alapján tehát az alábbi megállapításokra jutottunk:

Mivel a transzgén jelenléte negatívan befolyásolhatja az *in vitro* differenciációs képességet, ezért annak eltávolítása még laboratóriumi felhasználás esetén is elengedhetetlen.

Az eredmények azt mutatják, hogy a vektorok különböző jellegéből adódóan a rekombináz rendszereken alapuló kivágható/lentivírus vektorok eltávolítása nagyobb hatékonysággal, ismételhető módon, fajtól függetlenül működik, ezért e rendszer használata javasolt transzgén-mentes iPSC vonalak generálásához.

A lentivírus kivágása után néhány száz bázispár „footprint” marad a genomban, amely szekvencia ugyan nem tartalmaz aktív régiót, azonban a genommanipulációk miatt ez a rendszer leginkább *in vitro* tesztrendszerek létrehozására alkalmas.

6. PUBLIKÁCIÓS LISTA

6.1. Az értekezés témakörében megjelent lektorált magyar és idegen nyelvű publikációk felsorolása

6.1.1. Impakt faktoralal rendelkező, idegen nyelvű folyóirat

Dambrot, C., Buermans, H.P.J., **Varga, E.**, Kosmidis, G., Langenberg, K., Casini, S., Elliott, D.A., Dinnyes, A., Atsma, D., Mummery, C., Braam, S., Davis, R.P Strategies to rapidly map proviral integration sites and assess cardiogenic potential of nascent human induced pluripotent stem cell clones. *Exp Cell Res.* 2014 Oct 1;327(2):297-306. IF: 3,557

Varga, E., Nemes C., Davis, R.D., Ujhelly, O., Klincumhom, N., Polgar, Z., Muenthaisong, S., Pirity, M.K., Dinnyes, A. Generation of transgene-free mouse induced pluripotent stem cells using an excisable lentiviral system. *Experimental Cell Research*, 2014 Apr 1;322(2):335-44. IF: 3,557

Nemes, C., **Varga, E.**, Polgar, Z., Klincumhom, N., Pirity, M., Dinnyes, A. Generation of mouse induced pluripotent stem cells by protein transduction. *Tissue Eng Part C Methods.* 2014 May;20(5):383-92. IF: 4,065

Davis, R., Nemes, C., **Varga, E.**, Freund, C., Kosmidis, G., Gkatzis, K., de Jong, D., Szuhai, K., Dinnyes A., Mummery, C. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Foetal Fibroblasts Using the Sleeping Beauty transposon Gene Delivery System. *Differentiation*, 2013 Jul-Sep;86(1-2):30-7. IF: 2,855

Muenthaisong, S., Ujhelly, O., Polgar, Z., **Varga, E.**, Ivics, Z., Pirity, M., Dinnyes, A. Generation of mouse induced pluripotent stem cells from different genetic backgrounds using Sleeping Beauty transposon mediated gene transfer. *Experimental Cell Research*, 2012 Nov 15;318(19):2482-9. IF: 3,557

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

Kobolák J, Chandrasekaran A, Ochalek A, Bellák T, Szegedi V, **Varga E**, Avci H, Zhou S, Szczesna K, Smidh B, Dinnyés A. Patient specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) and their neuronal differentiation in Alzheimer's disease "Hungarian Molecular Life Sciences 2015" Conference Eger, Hungary 27-29 March 2015. Presentation

Bellak T, Chandrasekaran A, Ochalek A, Szegedi V, **Varga E**, Nemes C, Zhou S, Avci H, Kobolák J, Dinnyes A. 3D engineered neural tissue from human induced pluripotent stem cells. "Hungarian Molecular Life Sciences 2015" Conference Eger, Hungary 27-29 March 2015 Abstract and Poster

Chandrasekaran A, Neelchen Roesingh L, Ochalek A, Nemes C, **Varga E**, Bock I, Szczesna K, Avci H, Kobolák J, Dinnyes A. Comparison of 2D and 3D neuronal differentiation of patient specific induced pluripotent stem cells XV. Biannual Conference of the Hungarian Neuroscience Society, Budapest, Hungary 22-23 Jan. 2015. Abstract and Poster

Tancos, Zs., Ochalek A., Bock I., **Varga E.**, Nemes Cs., Dinnyes A. Generation of rabbit induced pluripotent stem cells (rbiPSCs) by human reprogramming factors. Salaam Opening Conference. Munich, Germany. 15. Dec. 2014. Abstract (p38) and Poster

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

- Nemes, C., **Varga, E.**, Polgar, Z., Klincumhom, N., Pirity, M., Dinnyes, A. Generation of mouse induced pluripotent stem cells by protein transduction. ISSCR International Society for Stem Cell Research 9th Annual Meeting. Toronto, Canada, 15-18. Jun. 2011. Abstracts (p.181.) and Poster
- Varga, E.**, Nemes, C., Klincumhom, N., Polgar, Z., Muenthaisong, S., Ujhelly, O., Pirity, M., Dinnyes, A. Generation of transgene-free mouse induced pluripotent stem cells by an excisable lentiviral system. DSSCR 4th Dutch Stem Cell Meeting. Leiden, The Netherlands, 15. Apr. 2011. Abstract and Presentation
- Muenthaisong, S., Ujhelly, O., **Varga, E.**, Polgar, Z., Carstea, A.C., Ivics, Z., Pirity, M., Dinnyes, A. Induction of pluripotent stem (ips) cells by Sleeping Beauty Transposon mediated gene transfer. in 3rd conference on "A Focus On Stem Cells". Debrecen, Hungary, 10-11. Mar. 2011. Abstract (p.14.)
- Muenthaisong, S., Ujhelly, O., **Varga, E.**, Carstea, A.C., Ivics, Z., Pirity, M., Dinnyes, A. Generation of mouse induced pluripotent stem cells from various genetic background by sleeping beauty transposon mediated gene transfer. IETS 37th Annual Conference. Orlando, USA: Reproduction, 8-12. Jan. Fertility and Development, 2011, 23(1): p. 243-244. Abstract and Poster
- Dinnyes, A., Ujhelly, O., Nemes, C., Muenthaisong, S., Rungarunlert, S., Klincumhom, N., **Varga, E.**, Polgar, Z., Pirity, M. Pluripotent stem cells for drug testing and regenerative medicine. in Proceedings of the Advances in Medical Biotechnology Conference. Pécs, Hungary, 29. Nov. – 1. Dec. 2010. Abstract (p. 21.)
- Muenthaisong, S., Ujhelly, O., **Varga, E.**, Ivics, Z., Pirity, M., Dinnyes, A. Generation and Characterization of mouse induced pluripotent stem (iPS) cells line by Sleeping Beauty transposon. in 7th. Annual Conference of ARBs. Kuala Lumpur, Malaysia, 8-12. Nov. 2010. Abstract (p. 69) and Poster
- Muenthaisong, S., Ujhelly, O., **Varga, E.**, Ivics, Z., Pirity, M., Dinnyés, A. Generation of induced pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Sleeping Beauty Transposon. 9th Transgenic Technology Meeting (TT2010). Berlin, Germany, 22-24. Mar. Transgenic Research, 2010. 19(2): p. 344. Abstract and Poster

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

- Tancos, Z., Ochalek A., Nemes C., **Varga E.**, Bock I., Dinnyes A. Generation of rabbit induced pluripotent stem cells (iPSCs) by human reprogramming factors. in Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája (FIBOK 2014). Szeged, Hungary. 7. March 2014. Abstract and Poster (p.86)
- Varga, E.** Transzgén-mentes Indukálható Pluripotens Össejt vonalak alapítása Egér modellben. Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola fórum. Szent István Egyetem, Gödöllő, Magyarország, 19. Jún. 2013. Absztrakt
- Dinnyes, A., **Varga, E.**, Berzsenyi, S. Betegspecifikus őssejtek, majd idegsejtek előállítására bőr és vér minták genetikai újraprogramozásával. Magyar Tudományos Parkinson Társaság konferenciája. Budapest, Magyarország, 31. Máj. - 1. Jún. 2013. Absztrakt (p. 1-3.) és Előadás
- Dinnyes, A., Berzsenyi, S., Nemes, C., **Varga, E.**, Kobolak, J. Emberi indukált pluripotens őssejtek az

idegrendszeri és más örökletes betegségek kutatásának szolgálatában. Transzlációs klinikai idegtudományok: az omikától a proteomikáig. Velence, Magyarország, 6-7. Dec. 2013. Absztrakt

Varga, N., **Varga, E.**, Almássy, Z., Dinnyes, A. Össejt terápia, össejt nélkül. 18. Magyar Mucopolysaccharidózis és társult betegségek Konferencia. Gödöllő, Magyarország, 14-16. Szept. 2012. Absztrakt és Előadás

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

6.2. Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó lektorált magyar és idegen nyelvű

publikációk felsorolása

6.2.1. Impakt faktorral rendelkező, hazai, magyar nyelvű folyóirat

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

6.2.2. Impakt faktorral nem rendelkező, hazai, magyar nyelvű folyóirat

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

6.2.3. Poszter/Absztrakt/Előadás/Konferencia publikáció alkalmi kongresszusi kiadványban,

idegen nyelven

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

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

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

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

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

7. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

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

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

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

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

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

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

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