



INTÉZMÉNYI TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

2024. május 24.

A zebradánió ivarszerv kialakulásának tanulmányozása az áttetsző gáspár vonalon

Készítette: Szabó Olivér Máté
HY53VC
Osztatlan Agrármérnök, osztatlan képzés
Nappali tagozat
Georgikon Campus

Témavezető: Dr. Szeverényi Ildikó, szenior kutató,
Dr. Orbán László, tudományos tanácsadó
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem,
Georgikon Campus,
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet,
Alkalmazott Halbiológia Tanszék

Lehetséges OTDK szekció: Agrártudományi szekció

Készthely, 2024.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés és célkitűzés.....	5
2. Irodalmi áttekintés	8
2.1 A zebradánió általános bemutatása	8
2.2 Az ivarát kialakító mechanizmusok különböző fajok esetében	10
2.3 A zebradánió ivarát meghatározó folyamatok.....	11
2.3.1 A primordiális őscsírasejtek fontos szerepet töltenek be az ivarszervek kialakulása során.....	12
2.3.2. Az ivarszerv differenciálódása	13
2.4 Transzgénikus és mutáns zebradánió vonalak az ivarszerv tanulmányozására	15
3. Anyag és módszer.....	18
3.1 A halak származása.....	18
3.2 A halak tartása, szaporítása és nevelése.....	18
3.3 A transzgénikus egyedek mikroszkópos megfigyelése és szexálása	20
3.4 Nukleinsavak izolálása.....	20
3.5 A transzgén jelenlétéhez, kópiaszámának meghatározásához és a vonal fejlesztéséhez szükséges PCR reakciók	21
3.6 PGC-k vándorlásának megfigyelése	24
3.7 Ivarbillentés korai hőkezeléssel	25
3.8 Bioinformatikai analízis.....	26
4. Eredmények és megbeszélésük	27
4.1 A transzgén beépülési pozíciójának meghatározása	27
4.2 A <i>gáspár</i> vonal létrehozása.....	33
4.3 A PGC-k vándorlásának megfigyelése a <i>gáspár</i> vonalon	34
4.4 Korai hőkezelések hatásának vizsgálata a PGC-kre	36
4.5 A vonal továbbfejlesztése	37
4.6 Hozzájárulások.....	39
5. Limitációk.....	40
5.1 A haltartó rendszer nyújtotta lehetőségek.....	40
5.2 A zebradánió ivarmeghatározása egy rendkívül komplex folyamat.....	40
5.3 A mikroszkópos rendszerünk hátrányai	40

5.4 A <i>gáspár</i> vonal hátrányai	41
6. Következtetések és javaslatok	42
6.1 A <i>gáspár</i> vonalban a PGC-k megfigyelése könnyebbé vált	42
6.2 Az általunk kidolgozott szelekciós eljárás más vonalak létrehozása során is hasznos lehet.....	42
6.3 A vonal hasznos eszköz lehet egyéb területek számára is	42
7. Összefoglalás	43
Köszönetnyilvánítás	44
Irodalomjegyzet	45

Rövidítések jegyzéke

AB	Háziasított zebradánió vonal
ccnb3	cyclin B3 (része a cyclin-dependes kináz holoenzim komplexnek)
CSD	Chromosomal Sex Determination (Kromoszóma általi ivar meghatározás)
dazl	deleted in azoospermia-like (RNS kötő fehérjét kódoló gén)
dpf	days post-fertilization (a megtermékenyítéstől eltelt időn apokban mérve)
dmrt	doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (DNS kötő fehérjét kódoló gén)
Cxcr4b	C-X-C chemokine receptor type 4 (A PGC-k vándorlásában résztvevő receptor)
Egfp	Enhanced Green Fluorescent Protein (Zöld fluoreszcens fehérje)
ESD	Environmental Sex Determination (Környezeti ivarmeghatározás)
GSD	Genetic Sex Determination (Genetikai ivarmeghatározás)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeráz láncreakció)
PGC	Primordial Germ Cells (Primordiális őscsírsejt)
PSD	Polygenic Sex Determination (Több gén általi ivarmeghatározás)
SD	Sex Determination (Ivarmeghatározás)
SRY	SRY-Box transcription factor 9 (Transzkripció faktor fehérjét kódoló gén)
sycp2	synaptonemal complex protein 2 (Meiotikus rekombinációban résztvevő fehérjét kódoló gén)
sycp3	synaptonemal complex protein 3 (Meiotikus rekombinációban résztvevő fehérjét kódoló gén)
TSD	Temperature-based Sex Determination (Környezeti ivarmeghatározás)
wpf	week post-fertilization (a megtermékenyítéstől eltelt idő hetekben mérve)
zbtb16a	zinc finger and BTB domain containing 16a (DNS kötő fehérjét kódoló gén)

1. Bevezetés és célkitűzés

Napjaink kutatásának egyik legnépszerűbb gerinces modell organizmusa a zebradánió. A zebradánió egy kistestű édesvízi halfaj, ami Ázsiából származik. Kutatásaiban először a magyar származású George Streisinger kezdett el dolgozni rajta, az 1970-es években. A fajnak számos előnyös tulajdonsága van, amelyek hozzájárultak ahhoz, hogy ennyire széles körben elterjedjen, így például: (i) külső megtermékenyítés; (ii) rendkívül rövid generációs idő; (iii) képes létrehozni egyszerre több száz utódot; (iv) korai ivarérettség más gerinces modellekhez képest; és (v) konzervált genom (számos olyan gén megtalálható a zebradánió genomjában, ami az emberben örökletes genetikai megbetegedéseket okoz). Az utóbbinak köszönhetően a lehetővé vált több öröklődő emberi betegség modellezése és hatékonyabb tanulmányozása.

Mivel a zebradániót számos fontos életfolyamat kutatására használják, ezért a biológiájának túlnyomó részét mára jól megismertük. Van azonban még olyan fontos biológiai folyamat, melynek részleteit a zebradánióban még nem teljesen értjük, ilyen például a két ivart kialakító mechanizmusok működése és kölcsönhatásai. A házasítás során több laboratóriumi zebradánió vonalban (köztük az általunk használt AB vonalban is) az ivari kromoszómák elvesztették azon képességüket, mellyel az ivart közvetlenül és hatékonyan képesek voltak meghatározni ('Chromosomal Sex Determination, röviden CSD'). Ezekben a vonalakban a CSD szerepét minden valószínűség szerint egy poligén rendszer ('Polygenic Sex Determination', röviden PSD) vette át, melyben az ivari kromoszómák helyett vagy mellett a genomban elszórt ismeretlen számú gén vagy kaskád együtt határozza meg az ivart (Liew és mtsai., 2012; Wilson és mtsai., 2014). A hímekben a korai egyedfejlődés során lezajlik egy ún. 'ivarszerv átfordulás', ennek során a tejesekben először kialakul egy kezdetleges petefészek (angolul 'juvenile ovary'), ami a fejlődés valamely pontján apoptózis révén elhal és ennek a helyén alakul majd ki a here (Liew és mtsai, 2012).

A faj ivarmeghatározásának és ivari fejlődésének komplexitását az is jól mutatja, hogy a genetikai faktorokat környezeti és szociális ingerek képesek másodlagosan felülbírtani. A magas hővel történő korai kezelés például képes ivararány eltolást okozni, ami a hímek számának növekedésével jár (Ribas és mtsai., 2017). Ezek a folyamatoknak az együttese és ezáltal komplexitása nagyban megnehezíti, hogy megértsük az ivart kialakító és fenntartó mechanizmusokat és azok kölcsönhatását.

A keszthelyi Élvtal Halgenomikai Kutatócsolortban az ivarokat kialakító mechanizmusok minél részletesebb megértésén dolgozunk, ehhez pedig több módszerrel is végzünk kísérleteket. Egyike ezeknek az egyedekben történő ivarszerv megjelenésének és fejlődésének *in vivo* vizsgálata. Erre a célra eddig kizárólag csak a *tg[ddx4::egfp]* (korábban *tg[vasa::egfp]*) transzgénikus vonalat használtuk fel (Krøvel & Olsen, 2002). A *ddx4* egy ivarspecifikus marker, melynek vezérlő régióihoz és első exonjához hozzáfuzionálták az ún. zöld fluoreszcens fehérjét ('enhanced green fluorescent protein', röviden *Egfp*). Ha ezt a fúziós fehérjét kék fényel világítjuk meg, akkor képes magából egy zöld fluoreszcens jelet kibocsátani. Ez a jel detektálható az ivarszervben, azonban mivel a petefészekben és a herében eltérő mértékben nyilvánul meg, ezért csakis az előbbiben figyelhetjük meg a jelet. Ez a vonal jelentősen megkönnyíti az ivarszerv fejlődésének vizsgálatát. A vonal hátránya azonban, hogy a fajra jellemző, a korai fejlődés folyamán megjelenő pigmentáltság nagyban torzíti a fluoreszcens jel detektálhatóságát és vizualizálásának lehetőségét. A zebradánió szervezetében három pigment típus termelődik, a fekete melanofórák, a sárga xantofórák és a reflektív iridofórák (Patterson & Parichy, 2019). A fekete és reflektív sejtek azok, amik jelentősen megtalálhatóak az zebradánió hasüregét és testét határoló kültakaróban, ezáltal zavarhatják a fluoreszcens jel detektálását. Több olyan zebradánió vonal is létezik, amiben egy mutáció következtében hiányoznak bizonyos festékanyagok (Haffter és mtsai., 1996; Maderspacher & Nüsslein-Volhard, 2003). Ezekre egy példa a *casper* mutáns is, amelyből a fekete és reflektív pigmentek hiányoznak (White és mtsai, 2008). Annak érdekében, hogy javítsuk az ivarszerv kezdemények megjelenésének és fejlődésének megfigyelését, kidolgoztunk egy szelekciós eljárását, amivel képesek voltunk a transzgént bejuttatni a *casper* mutánsba. Az új vonalunk a *gáspár* nevet kapta, amiben a petefészek fejlődésének megfigyelhetősége jelentősen javult, a pigmentált transzgénikus vonalunkhoz hasonlítva (Szabó, 2022). Jelenleg a *gáspár* vonal felhasználhatóságának meghatározásán dolgozunk, az egyes kísérletekben. Emellett pedig a vonal továbbfejlesztésének lehetőségét is elkezdtük vizsgálni.

Célkitűzés

Munkám során a céljaim a következők voltak:

1. A szelekció további felgyorsítása
2. A *gáspár* tenyészállomány és vonal kialakítása
3. A zebradánió ivarfejlődésének mélyebb megértése
 - i. A primordiális össejtek korai vándorlásának megfigyelése

- ii. Az ivarszerv megfigyelése hőkezeléssel indukált ivarváltás során
4. A *gáspár* vonal továbbfejlesztése

2. Irodalmi áttekintés

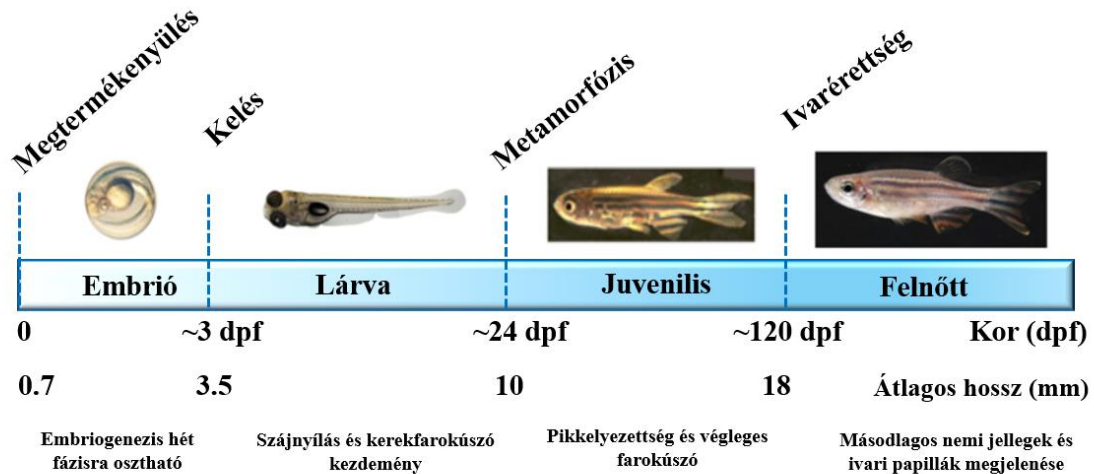
2.1 A zebradánió általános bemutatása

A zebradánió [*Danio rerio*, Hamilton ,1822] korunk egyik legnépszerűbb gerinces modell állata. Kistestű édesvízi pontyféle, amely Ázsiából, pontosabban a Dél-Ázsiai Himalája környéki régiókból származik. Nagyrészt férgekkel, apróbb rákokkal és rovarlárvákkal táplálkozik. Testhossza a kifejlett egyedek esetében 5-6 cm lehet (**1. ábra**). Laboratóriumi körülmények között eltérő az élethosszuk, de maximum két-három évig képesek élni. A fajra jellemző csíkos megjelenést a pigmentek alakítják ki.



1. ábra: A zebradánió hímek és nőstények közti ivari dimorfizmus. A nőstények (íkrások) hasi oldala kerekded, színük egyes vonalak esetében élénkebb. A hímeknek hosszú, megnyúlt torpedó alakú testük van, a mozgásuk jelentősen gyorsabb, mint a nőstényeké. (Forrás: Animal Network, <https://animals.net/zebrafish/>)

A zebradánió egyedfejlődése viszonylag gyors, fejlődése során több átalakuláson is átmegy. A folyamata következő szakaszokra osztható: (i) embrió, (ii) lárva, (iii) ivadék, és (iv) kifejlett felnőtt egyed (**2. ábra**).



2. Ábra: A zebradánió egyedfejlődése négy nagyobb szakaszra osztható. Az egyedek kora dpf-ben (days post fertilization), hosszuk mm-ben van jelölve az ábra közepén. Az egyes fejlődési stádiumban zajló eseményeket az ábra alján tüntettük fel. (Forrás: Levraud és mtsai, módosítva)

Az **embrionális stádium** a megtermékenyüléstől az ikrák kikeléséig tart (kb. 2-3 nap). Erre a korra az intenzív sejtosztódások és azok vándorlása a jellemző. Ebben a szakaszban hét további szakaszt különböztetünk meg, amelyekben mind sajátos változások zajlanak le, ezek közül az egyik legjelentősebb az ún. 'Blastula period', amiben megtörténik a szervezet saját genomjának aktiválódása (angolul 'Midblastula transition') (Kimmel és mtsai, 1995).

A **lárva stádium** a kikeléstől kezdődik (változó az egyedek esetében), tehát legkésőbb a második egyedfejlődési naptól. Az egyedek mozgása fokozatosan aktiválódik, kezdetben kevésbé aktív, majd a 4-5 napon a mozgás már az egyedek többségének esetében megfigyelhető. Az 5 dpf-es (a megtermékenyítéstől számított napok száma, angolul: 'days post-fertilization, röviden dpf') korban megjelenik a szájnyílás és megindul a táplálkozás. Ekkor még nem alakul ki a végleges farokúszó, egy kezdetleges szerv, az ún. 'fin fold' segítségével tudnak úszni. Ekkor még nem jelennek meg a pikkelyek sem a testen.

Az **ivadék és növendék** korban alakul ki a teljes pikkelyezettség, valamint a végleges farokúszó. A két ivar elkülönítése fenotípusos jelek alapján ebben a korban még nem lehetséges. Ez a szakasz általában egy hónapos kortól 3-4 hónapos korig tart.

A **felnőt**t kort elérve az egyedek szaporodásra készek. Az ivarszervek teljesen kialakultak és már látszanak a másodlagos nemi jelek, illetve az ivari dimorfizmus. Utóbbi a következőképpen nyilvánul meg: a fajra jellemző testforma megjelenése, a hímek megnyúlt,

torpedó alakú teste és az egyes vonalakban megjelenő jellegzetes sötétebb színük, szemben a nőtények sok esetben világosabb színével és a kerekded hasi oldallal. Továbbá a genitális papilla is láthatóvá válik, ami a kloáka előtt helyezkedik el (Yossa és mtsai., 2013). A hímekre jellemző, hogy mozgásuk rendkívül gyors lehet, ez alapján ki lehet választani a legjobb egyedeket a szaporodásra.

2.2 Az ivarát kialakító mechanizmusok különböző fajok esetében

Az ivarmeghatározás és az ivarszervek kialakulása rendkívül változatos és komplex folyamat, amely az egyes fajok között jelentősen eltérhet. Ezekre a folyamatokra az evolúció során változatos stratégiák alakultak ki (McELREAVEY és mtsai., 1993). Az ivarok kialakulása éppen ezért számos kutatót sarkallt arra, hogy foglalkozzanak ezek megértésével. Az emlősök esetében ezeket a folyamatok konzerváltak, így jól ismertek (McLaren, 1998). A halak esetében azonban jelentős változékonyságot tapasztaltak, így az információ fajközzötti átvitele gyakran problémás. Az ivarok fejlődése és a szaporodás egy kulcsfontosságú folyamat, a fajfenntartás és fejlődés szempontjából, de kutatása nem csak ezért fontos. Egyrészt számos olyan betegséget megfigyelhetünk, ami az ivarfejlődéshez köthető és emberben is előfordul. A másik fontos indok pedig a gazdasági megközelítés. Számos hazai haszonhalfajunk esetében fontos, hogy ismerjük azokat a folyamatokat, amik kialakítják és fenntartják az ivarokat, hiszen a tejeselek és ikrások között eltérő a növekedési erély mértéke és az esetleges betegségekre adott válaszuk (Baroiller & D'Cotta, 2001).

Az állatvilágban változatos az a rendszer, aminek alapján eldől az egyedek neme. Az eseményt, ami ezt vezérli, ivari determinációnak nevezzük (angolul 'Sex Determination', röviden SD). Az ember és az emlősök legnagyobb részében ez genetikai faktorokon alapul, vagyis attól függ, hogy milyen ivari kromoszómát öröklünk az apától. Az emberben csak a hímek rendelkeznek heterogametikus ivari kromoszómával (Y), az utódok abban az esetben lesznek szintén hímek, ha az apjuktól az Y kromoszómát öröklük. Ebben az XY ivari kromoszómás rendszerben az Y kromoszóma határozza meg a hím ivar kialakulását, mert azon található a hímivart meghatározó gén, az Sry (Hawkins, 1993). Más esetekben azonban eltérő rendszereket is megfigyelhetünk.

A madarak esetében az ivart ZW/ZZ ivari kromoszómás rendszer alakítja ki, ahol a hím a homogametikus ivar (ZZ). Különbség továbbá, hogy a madarak esetében nem tapasztaljuk a Sry gén jelenlétét. Korábbi kutatások vizsgálták, mely gének lehetnek felelősek az ivarok

kialakulására és melyek azok, amik specifikusan hatnak az egyik vagy a másik ivarra. Ezek bizonyították, hogy a madarak esetében a *dmrt1* fokozott megnyilvánulása a hím ivarnak kedvez. Ennek a génnek a célzott kiütése azt eredményezte, hogy az ivararány drasztikusan eltolódott a női ivar irányába (Wilson és mtsai., 2014; Raymond és mtsai, 2000). Ezzel bizonyosodott be az a feltételezés, miszerint ez a gén a fő faktorra a madarakban a hím ivar kialakulásának.

Bizonyos hüllők esetében eltérő mechanizmust figyelhetünk meg, ami mind az emberektől, illetve a madaraktól is különbözik. Ezekben a példákban az ivarra nem a genetikai faktorok, hanem a hőmérsékleti hatás a legjelentősebb befolyásoló tényező. Ezt az ivarmeghatározási rendszert, hőmérséklet indukált ivar meghatározásnak nevezzük ('Temperature-based Sex Determination', röviden TSD). A TSD megfigyelhető többek között a krokodilokban, teknősökben és egyes gyíkokban is (Janzen & Paukstis, 1991).

A halak esetében egy jóval összetettebb rendszert láthatunk. Fajtól függően lehet mindkét ivar heterogametikus, de arra is van példa, hogy az ivar meghatározást több kromoszóma vezérli. Vannak esetek azonban amikor az ivari kromoszómák megléte nem szükségszerűen indokolt, illetve megfigyelhetünk hermafroditizmust is, mégpedig annak nagyon változatos fajtáit (Avisé & Mank, 2009). Az eddig kutatott halfajok közül jónéhányban a genetikai faktorokat képesek másodlagosan környezeti és szociális ingerek másodlagosan felülírni, ezáltal meghatározni az ivart. Leírták azt is, hogy az ivarokat kialakító tényezők részaránya rendkívül eltérő lehet az egyes halfajok esetében. Ez a komplexitás arra sarkalta a kutatókat, hogy több halfajon is kezdjenek ezzel kapcsolatos kutatásokba. Egyike ezeknek a fajoknak a zebradánió, melyben egy rendkívül érdekes ivar meghatározási és fejlődési rendszer alakult ki.

2.3 A zebradánió ivarát meghatározó folyamatok

A zebradánió egy diploid faj, mely esetében 25 pár kromoszómát figyelhetünk meg ($2n$). Az eddigi kutatások alapján tudjuk, hogy a házasítás következtében, az ivarmeghatározási rendszer eltérő a vadon élő és a laboratóriumi vonalak között. A vadon élő egyedekben valószínűsíthetően ZW/ZZ típusú ivari kromoszómák vannak, ebben az esetben a hím a homogametikus, a nőstény pedig a heterogametikus ivar (Wilson és mtsai, 2014). A jelek viszont arra mutatnak, hogy a házasítás során egyes vonalakban az ivari kromoszómák részlegesen elvesztették a funkciójukat az ivar meghatározásban, és egy úgynevezett

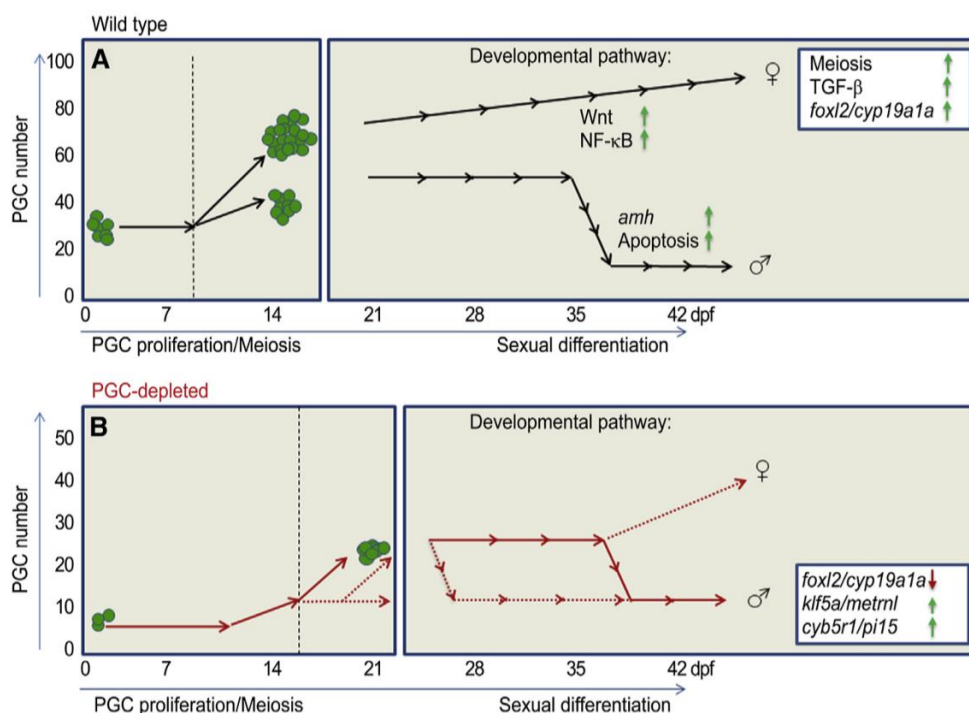
poligénes ('Polygenic Sex Determination', röviden PSD) rendszer alakult ki. Ennek sajátossága, hogy már nem egy-egy kromoszómán csoportosulnak az egyes gének, amik meghatározzák az ivar kialakulást, hanem elszórva helyezkednek el a genomban és együttesen alakítják ki ezt a fontos tulajdonságot (Liew és mtsai, 2012; Liew & Orbán, 2014).

2.3.1 A primordiális őscsírasejtek fontos szerepet töltenek be az ivarszervek kialakulása során

A primordiális őscsírasejtek (angolul 'primordial germ cells', röviden PGC-k) azok az őssejtek, amik a prekursorai az ivarokat kialakító sejteknek. A PGC-k vándorlása és fejlődése kulcsfontosságú az ivarok normál fejlődéséhez, ezeknek a folyamatoknak a hibája gyakran sterilitást is képes előidézni (Raz, 2003). A kialakulásuk és vándorlásuk ugyan hasonló módon zajlik az egyes fajok esetében, azonban egyes esetekben láthatunk különbségeket, leginkább a vándorlásukban. A madarak esetében például a véráramon keresztül jutnak el az ivarszervek kialakulásának helyére, vagyis a bipotenciális gonádhhoz (Nakamura és mtsai, 2007). Zebradánióban ez a folyamat eltérő, ebben az esetben a PGC-k a sejtek közötti térben, a szöveteken keresztül jutnak el az előbb említett helyre, egy Cxcr4b nevű receptor és SDF-1a nevű kemokin segítségével (Dumstrei és mtsai, 2004).

A PGC-kre jellemző még továbbá, hogy ez a legkorábban differenciálódó sejtvonal, amely folyamat már a korai embriónális fejlődés során lejátsszódik. A differenciálódásukat követően rövid időn belül bekövetkezik a felszaporodásuk, ezt követően indul meg a vándorlásuk. Ennek a folyamat együttesnek az ideje és a sejtek mennyisége is eltérő fajonként (Yamaha és mtsai, 2010).

A PGC-k vándorlása és mennyisége egyaránt rendkívül fontos lehet az ivar szempontjából. Léteznek olyan marker gének, amelyek ivarsejt-specifikus expressziót mutatnak. Erre példa a *ziwi* gén, aminek mutációja az ivarsejtek számának csökkenését eredményezi, ezáltal pedig a hím ivar determinációját (Houwing és mtsai, 2008). Egy korábbi kutatás bizonyította, hogy a PGC-k korai ritkítása zebradánióban azt eredményezte, hogy a hímek aránya megnőtt az állományban (Tzung és mtsai, 2015) **(3. ábra)**. Ez alapján feltételezhetjük azt, hogy a PGC-k számának a bipotenciális gonádban nagy szerepe lehet abban, hogy a hím vagy a női ivar determinálódik.



3. Ábra: A PGC célzott eliminálása a hímek számának növekedésével jár. A PGC-k vándorlása és számuk nagyon jelentős faktor az ivarszerv kialakulásában. Ezek számának csökkentése jelentősen megnöveli a hímek arányát a populációban, összehasonlítva a kontroll csoporttal (wild type). Csökkentett PGC állományú csoport: PGC-depleted. (Forrás: Tzung és mtsai, 2015)

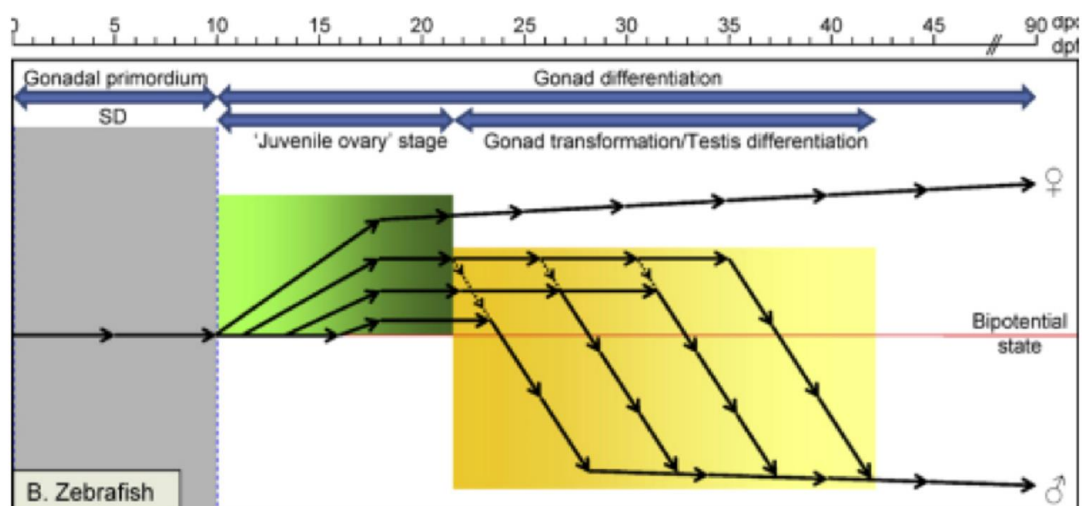
2.3.2. Az ivarszerv differenciálódása

A zebradánió hímek többségében az ivarszerv fejlődése során megfigyelhető egy szekvenciális hermafroditizmusra hasonlító jelenség, amikor először az egyik, utána a másik ivarszerv jelenik meg ugyanabban az egyedben. A zebradánió egyedfejlődésének egy korai szakaszában, a lárva stádiumban, az egyedek egy jelentős részében megjelenik egy kezdetleges petefészek. (ún. 'juvenile ovary') (Takahashi, 1977; Orbán és mtsai, 2009). Ezen a ponton ez a korai ivarszerv még éretlen. A nőstények esetében ez a szerv az egyedfejlődés során aztán funkcionális petefészekké fejlődik. A hímek esetében azonban ebből a kezdetleges petefészekből egy apoptotikus hullám kitisztítja a petesejteket, és a korai petefészek fokozatosan herévé alakul. A programozott sejthalál tehát nem csak a szervezet normál működésének fenntartásában játszik szerepet, de a zebradánió az ivarok differenciálódásában is fontos szerepe van. Az apoptózist követő fázisban nem tudjuk pontosan mi történik az ivarszervben, feltételezéseink alapján a következő folyamatok játszódhatnak le: az elhaló petesejtek helyére differenciátlan őssejtek nyomulnak be. Ezt

követően a korábbi petesejtet körbevevő szomatikus ún. granulosa sejtek – melyek környezete a petesejtek eltűnésével drasztikusan megváltozott - transzdifferentiálódással átalakulnak Sertoli sejtekké. Ezek a sejtek kémiai kapcsolatuk révén a hím ivarirányába vezérlik az őssejtek differenciálódását, ezzel létrehozva a herét, mely fokozatosan érett, funkcionális ivarszervé alakul (**4. ábra**).

Az ivarváltás folyamata, néhány hét alatt történik meg a hímekben, hasonlóan, ahogy azt a protogyn szekvenciális hermafroditák esetében is láthatjuk. Nyilvánvaló, hogy ez a folyamat kellően komplex, ezért is lehet, hogy számos részlete, többek között az intervalluma sem ismert pontosan az átalakulásnak. Az egyedek nagy többségében a korai petefészek megjelenése a megtermékenyítést követő 14-20. napon már látható. Az viszont, hogy mikor alakul ki a két ivar esetében egy funkcionális szerv, nagyban változó lehet.

A folyamatot, amely során az ivar kialakul és fejlődik nagyon körülményes lenne nyomon követni transzgénikus riporter vonalak nélkül. A laboratóriumunkban mi a *tg[ddx4::egfp]* vonalat (korábban *tg[vas::egfp]* néven nevezték) használjuk (Krøvel & Olsen, 2002). A *ddx4* egy ivarsejt specifikusan megnyilvánuló gén, amelynek terméke rendkívül fontos az ivarszervek normál fejlődéshez. Ennek a fúziós riportergénnek a terméke fluoreszcens jelet ad ki magából, ha kék fénnel megvilágítjuk. Ez a vonal csakis a petefészeket teszi láthatóvá, mert ebben az ivari őssejtek száma többszöröse a heréhez képest, azonban ennek segítségével már képesek vagyunk detektálni a korai ivarszerv megjelenését (**5. ábra**).



4. ábra: A zebradánio ivarszerv fejlődési sémája és a hímekben lejátszódó ivar differenciálódás. A hímekben ezután apoptózis révén elhall ez az éretlen ivarszerv (sárga téglalap) és ennek a helyén jön létre a here, amely szintén egyedenként változó időben játszódik le. (Forrás: Orbán és mtsai, 2009)

2.4 Transzgénikus és mutáns zebradánió vonalak az ivarszerv tanulmányozására

Egy transzgén beültetése az élő szervezetek genomjába nagyban segíthet abban, hogy megértsük a különböző folyamatokat és lényegesen egyszerűbben tudjuk azokat vizualizálni. Számos modell organizmus esetében létrehoztak már ilyen vonalakat. A zebradánió esetében is régóta használják ezeket, hogy *in vivo* tudjuk megfigyelni az élő szervezetben megtörténő változásokat. Ahogy már említettem ilyen vonal az általunk is használt *tg[ddx4::egfp]* (Krøvel és Olsen, 2002). Ez a transzgén nem csak az ivarszervet képes láthatóvá tenni, de a PGC-ket is, ezzel pedig jelentősen hozzájárulva ezen sejtek vándorlásának és szerepének jobb megértésében. A transzgén terméke egy olyan rekombináns fúziós fehérje, amely egyre nagyobb mennyiségben jelenik meg a fokozott expresszió miatt a petefészekben, míg a herében a szintje viszonylag alacsony marad. Így a két ivar 6-8 hetes kortól elkülöníthetővé válik mikroszkóp segítségével (5. ábra).



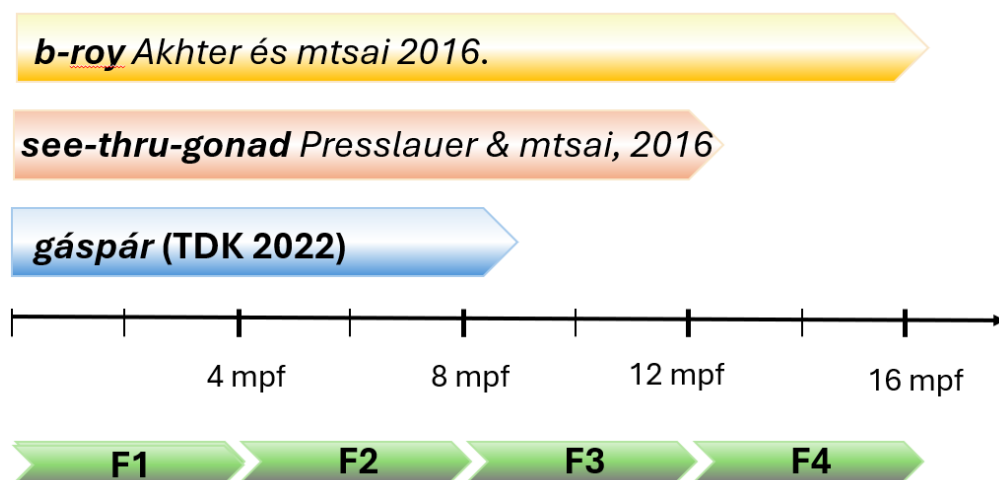
5. ábra: A *tg[ddx4::egfp]* vonalban az ivarszerv fejlődés jól megfigyelhető. Az ivarszerv kezdemény megjelenése már lárva kortól nyomon követhető a fluoreszcens fehérje alapján. Azonban az egyre növekvő számú pigmentsejtek csökkentik a petefészek jó megfigyelhetőségét. A nyilak a fluoreszcens jelet jelzik. (Fotók: saját)

Olyan vonalak is léteznek a zebradánióban, amik valamilyen mutáció miatt elveszíthetik bizonyos egyes tulajdonságaikat. Ilyen például a korábban említett *casper*, ami egy olyan kettős mutáns vonal, melyben a háromból két pigment nem termelődik meg (White és mtsai, 2008). Ennek a vonalnak a sajátossága, hogy két már ismert mutáns vonalnak, a *roy orbison*-nak (reflektív pigment mutáns) (D'Agatti és mtsai, 2017) és a *nacre*-nak (fekete pigment mutáns) (Lister és mtsai, 1999) a keresztezésével hozták létre, így hiányzik belőle mind a reflektív, mind a fekete pigment. A tavalyi TDK kutatásomban már bemutattam több olyan

vonalat, amelyek ehhez hasonló pigment mutáns háttérbe juttattak be egy ivarsejteteket jelölő transzgénikus konstrukciót (Szabó, 2022).

A *see-thru-gonad* vonal esetében a *transparent (tra)* nevű mutánsba juttatták be az általunk is használt *tg[vasa-vasa::egfp] (tg[ddx4-ddx4::egfp])* konstrukciót (Presslauer és mtsai, 2016). Egy másik ilyen vonal a *b-roy*, amelyhez szintén közel átlátszó mutáns vonalat használtak fel, viszont esetükben egy másik transzgénikus konstrukciót használtak, a *tg[b-actin::egfp]*-t (Akhter és mtsai, 2016). Ennek az utóbbi vonalnak a hátránya, hogy a transzgénikus konstrukció nem megfelelő ahhoz, hogy a korai ivarszervben is nyomon tudjuk követni a fejlődést, mert a fluoreszcens fehérje felszaporodása csak felnőtt korban teszi láthatóvá a petefészket. Ezen felül mindkét vonalnak a hátránya, hogy a vonal megalkotásához alkalmazott szelekciós eljárás előbbi esetben három, míg azutóbbi esetében négy generációt igényeltek.

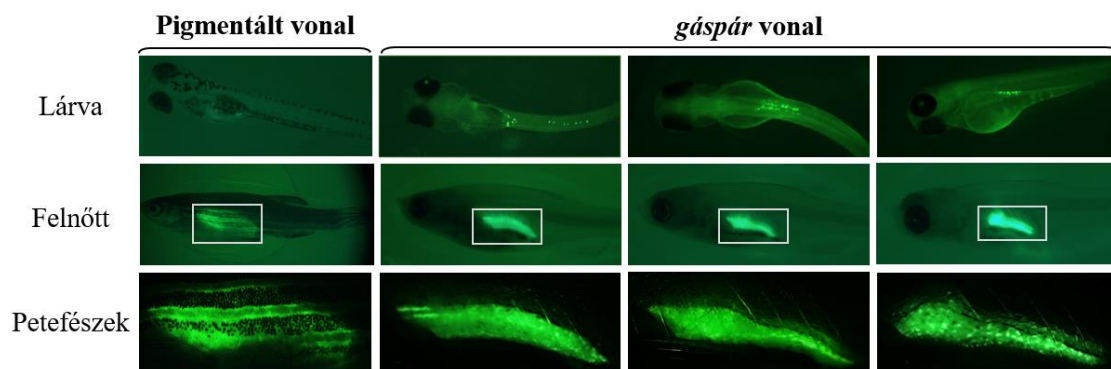
A korábbi kutatásunkban létrehoztunk egy olyan pigment hiányos transzgénikus vonalat, amely a *gáspár* nevet kapta (Szabó, 2022). A szelekciós eljárás, amivel létrehoztuk ezt a vonalat jelentősen gyorsabb és hatékonyabb az előbbiekhöz képest. A mi vonalunk megalkotása másfél generációt vett igénybe, ezzel jelentősen csökkentettük az időtartamot és az erőforrás szükségletét is a létrehozásának (6. ábra).



6. ábra: A létrehozott átlátszó transzgénikus zebradánió vonalak szelekciós időtartamának összehasonlítása. A *gáspár* vonal esetében alkalmazott szelekciós eljárás két generációra rövidítette le a vonal létrehozásának időtartamát összehasonlítva a *see-thru-gonad* és *b-roy* vonaláknál alkalmazott szelekciókkal.

A *gáspár* vonalban, az ivarszerv megjelenésének és fejlődésének megfigyelése jelentősen javult, a pigmentált transzgénikus vonalunkkal szemben. Továbbá a már említett PGC-k

vándorlását is könnyebben tudjuk követni ebben a vonalban (**7. ábra**). Ennek a munkának több lehetséges haszna is van. Egyrészt sikerült létrehozni egy olyan pigmenthiányos, transzgénikus riporter vonalat, amely alkalmas lehet arra, hogy leváltsuk a korábban használt pigmentált vonalunkat számos kísérlet esetében. Ezzel egy olyan eszközt alkottunk meg, amelyet az ivarkutatással foglalkozó kutatók szintén felhasználhatnak. Másik nyereség pedig maga a gyors és hatékony szelekciós eljárásunk, ami segíthet hasonló pigmentszegény transzgénikus zebradánió vonalak megalkotásában.



7. ábra: A pigmentált transzgénikus és *gáspár* vonalak összehasonlítása lárva és felnőtt korban. A *gáspár* vonalban a lárvákban (felső sor) megjelenő fluoreszcens jel detektálása jelentősen javult a pigmentált halakhoz képest. A felnőtt egyedek petefészkeinek képeit (középső és alsó sor) összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy az ivarszerv formája és a jel erőssége is sokkal jobban látható. (Forrás: saját ábra)

3. Anyag és módszer

3.1 A halak származása

A zebradánió vonalainkat két forrásból tudtuk beszerezni. Jelenleg két AB (vad típusú házasított nem transzgénikus zebradánió) vonalat tartunk a laboratóriumunkban, az egyiket az ELTE a másikat a MATE laborjaiból kaptuk, Dr. Varga Máté és Dr. Csenki-Bakos Zsolt segítségével. A *tg[ddx4::egfp]* vonalunkat és a pigment hiányos, dupla mutáns *casper* vonalakat szintén Dr. Csenki-Bakos Zsolt segítségével tudtuk beszerezni, a MATE AKI gödöllői laboratóriumából.

3.2 A halak tartása, szaporítása és nevelése

Ahogy már a tavalyelőtti dolgozatomban részleteztem, hogy milyen standard protokoll alapján történik a halak tartása, szaporítása és nevelése (Szabó, 2022). A szobában 28 Celsius fokos hőmérsékleten, 70%-os páratartalom mellett tartottuk a halakat, 14 órás világos és 10 óra sötét fényciklusban. Az Aquaneering Aquatic Housing (Sand Diego, Kalifornia, USA) zárt, re-cirkulációs rendszerét használjuk (**8. ábra**), a testméretek alapján erre a rendszerre kerültek fel a halak, 1.4, 2.8, 6 és 9 literes tankokba. A fiatalabb és idősebb állományokat eltérő egyedsűrűségben tartottuk, a nemzetközi szakirodalomnak megfelelően, előbbieket 7-11 egyed/liter, utóbbiakat 5-6 egyed/liter sűrűségben.



8. ábra: A recirkulációs haltartó rendszer. Ebben a moduláris haltartó rendszerben tartjuk a halakat, a különböző sorokon. A rendszer recirkulációs elven működik, a víz folyamatosan kering, miközben több szűrésen és tisztításon megy át mielőtt visszajut a tartályokba. (Fotók: saját)

A halakat kétféle takarmánnyal etettük: táppal és élő sőrakkal (*Artemia salina*). Ezeknek mennyiségét, illetve a tápok szemcseméretét testméretenként változtattuk. A növekedéssel párhuzamosan növeltük a takarmány mennyiségét. A lárvákat még táppal, az idősebb egyedeket már élő táppal is etettük. Ezek pontos beállításával tudtuk elérni, hogy az állományaink megfelelően növekedjenek.

A halakat kétféleképpen szaporítottuk: párok, illetve csoportos ivatások létrehozásával. Az ivásukat többféle környezetgazdagítás révén indukáltuk. Ezeknek célja az volt, hogy másoljuk a természetben is előforduló állapotokat, amik az egyedeket szaporodás közben körül veszik. A következő eljárásokat alkalmaztuk: kavicsmintájú aljzat a szaporító kádak alá, műnövény a kádakba és rendszerente hideg víz folyamatos adagolása, ami a trópusi esőt imitálja. Továbbá fontos szerepe van a fénynek is és a fokozatos erősödésének, így a szobában a lámpák meghatározott időközönként kapcsolak fel. A szaporodásból nyert embriókat ezután összegyűjtöttük és a Petri csészékben 28 Celsius fokos inkubátorokba helyeztük. Amint elérték az öt napos kort, ismét lekerültek a halas szobába, ahol fokozatosan

megkezdjük az etetésüket, ahogyan már említettem a növekedésükkel párhuzamosan változtatva.

3.3 A transzgénikus egyedek mikroszkópos megfigyelése és szexálása

A zebradánióra jellemző ivari dimorfizmus alapján az ivarok elkülöníthetők (**1. ábra**), azonban ez biztonságosan csak felnőtt korban lehetséges. Fontos számunkra, hogy az ivarfejlődés korai szakaszában is nyomon tudjuk követni az eseményeket, ez a korábban említett transzgénikus vonal hiányában nem lenne lehetséges. Azért, hogy a fúziós fehérje fluoreszcens jelét vizualizáljuk, kialakítottunk egy mikroszkópos munkaállomást, amely segítségével láthatjuk a fiatal egyedek estében is a petefészek megjelenését és fejlődését, a hímek esetében pedig ennek a jelnek a fokozatos csökkenését. Az egyedeket egy Olympus SZF61 típusú mikroszkóppal és az erre szerelt BLS Kft. Által forgalmazott fluoreszcens adapterrel tudtuk megfigyelni. Ennek a rendszernek az a nagy előnye, hogy bizonyos keretek között hasonló teljesítményt tesz lehetővé, mint egy lényegesen drágább, fluoreszcens mikroszkóp. Az egyedek altatása és a képek készítése a korábbi munkámhoz hasonlóan zajlott (Szabó, 2022).

3.4 Nukleinsavak izolálása

A genomszekvenálásra küldött minták esetében, fenolkloroform-izomalil-alkohol- alapú eljárással izoláltuk a mintákat, mivel ez tette lehetővé a megfelelő mennyiségű és minőségű DNS kinyerését. Ehhez először három *gáspár* egyed farokússzójából vettem mintát, az egyedek feláldozása nélkül. Majd a mintákat konzerváló oldatba helyeztem. Az izolálást a már korábbiakban megalkotott protokoll (Yue & Orban, 2001) alapján végeztem el.

A vonal fejlesztéséhez az általunk talált marker gén jelöltek expresszióját vizsgáltam, ehhez RNS izoláltam a heréből és petefészekből egyaránt. A mintákat a Qiagen RNA mini plus KIT-tel izoláltam. Ennél az eljárásnál a RNS nem lenne megfelelő önmagában az expresszió megállapítására, ezért a mintákat át kellett írnom cDNS formába, amit a 'Maxima H minus First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase' KIT-tel végeztünk el (Thermo Fisher Scientific, USA).

A nukleinsavak koncentrációját minden esetben ellenőriztem, a rendelkezésünkre álló Qubit 4-es fluorometer eszközünkkel (Thermo Fisher Scientific, USA). A szekvenálásra küldött minták esetében izolátumok minőségére is ellenőriztem, ezeket 0.6%-os agaróz gélben és TBE pufferben végeztem gélelektroforézis által.

3.5 A transzgén jelenlétéhez, kópiaszámának meghatározásához és a vonal fejlesztéséhez szükséges PCR reakciók

A polimeráz láncreakció során DNS szakaszokat lehet célzottan felszorzozni, ezzel lehetővé válik, akár bizonyos gének kimutatása, illetve expressziójának meghatározására. A PCR reakciók klasszikusan a következő komponensei tartalmazzák: PCR puffer, víz, nukleotidok (dNTP), magnézium, primerek és polimeráz enzim (Szabó, 2022).

A vonal továbbfejlesztéséhez használt szekvenálásból származó adatokkal lehetőségünk lett arra, hogy a transzgén beépülésének helyére célzott PCR reakciókat tervezzünk. Ezekben a reakciókban két különböző PCR primer párt használtunk, a transzgén szekvenciájára feltapadó primer pár (EGFP2-F1 5' ACC ACA TGA AGC AGC ACG ACT 3' T_M 61 °C; EGFP2-R1 5' CTT CTC GTT GGG GTC TTT GC 3' T_M 58 °C), ez egy 415 bázispár hosszú terméket amplifikál, illetve a transzgén helyének beépülése során kiesett régióra tapadó primer (chr3del-F2 5' ACA GCA GCG TCC TTG TCC CAG C 3' T_M 70 C; chr3del-R2 5' CGC GGA GTC CCC TGG CTC TC 3' T_M 69.3 C), ez egy 845 bázispár hosszúságú szakaszt sokszorozít. Ezt a két primert külön reakciókban használtuk a homozigóta egyedek szelektálására.

A fenti primer párok tesztelését két tapadási hőmérsékleten ('annealing temperature') (60 °C és 64 °C) és két magnézium koncentrációval (1.5 mM és 3 mM) végeztem el. Ezekhez a tesztekhez első körben összesen nyolc mintát izoláltam Chelex alapú gyors DNS izolálási eljárással és 72 reakcióban teszteltem ezeket. A tesztekhez két egyed mintáját használtam két vad típusú (transzgén-mentes) egyed mintáját használtam negatív belső kontrollként, két casper egyedből származó (transzgén-mentes) mintát szintén negatív belső kontrollként, két pigmentált transzgénikus vonalunkból (homozigóta) pozitív belső kontrollként, egy homozigóta, illetve egy hemizigóta gáspár egyed mintáját. A mintákat farokúszókból gyűjtöttem az egyedek feláldozása nélkül.

A transzgént kimutatni képes primerekhez (EGFP2-F1, EGFP2-R1) a PCR reakciót a következő komponensekkel, a leírt térfogatban és koncentrációban állítottuk össze: 2 uL 10x Taq DNA Polymerase puffer, 2 uL MgCl₂ (15 mM), 0.2 uL 'forward' primer (0.2 uM), 0.2 uL 'reverse' primer (0.2 uM), 0.4 uL dNTP (10 mM), 0.2 uL Taq polymerase, 10 uL víz, 5 uL gDNS templát (mintánként).

A transzgén beépülése következtében kieső régióra tapadó primerek esetében (chr3del-F1/R1 és chr3del-F2/R2) a következő reakciót állítottuk össze: 10 uL 2x High Fidelity Phusion PCR Master Mix (tartalmaz 1.5 uM koncentrációjú MgCl₂-t), a minták egy részében hozzáadott 1.25 uL MgCl₂ (3 mM), 0.2 uL 'forward' primer (10 uM), 0.2 uL 'reverse' primer, 4 uL gDNS templát (mintánként).

A PCR felszoroást az Analytik Jena GmbH cég TAdvance készülékével végeztük, a következő hőmérsékleti profilok mellett, az EGFP2-F1 és EGFP2-R1 primerek esetében: kezdeti denaturáció ('denaturation') 95 °C 5 percig; 30 cikluson ismétlődve - denaturáció ('denaturation') 95 °C 1 percig; primerek kötődése ('annealing') 52 °C 20 másodpercig; lánc hosszabbítás ('extension') 68 °C 20 másodpercig; végső lánc hosszabbítás ('extension') 68 °C 5 percig. A chr3del-F1/R1 és chr3del-F2/R2 primerek esetében a két tesztelt tapadási hőmérséklettel: kezdeti denaturáció ('denaturation') 95 °C 5 percig; 30 cikluson ismétlődve - denaturáció ('denaturation') 95 °C 1 percig; primerek kötődése ('annealing') 60 °C és 64 °C 20 másodpercig; lánc hosszabbítás ('extension') 68 °C 20 másodpercig; végső lánc hosszabbítás ('extension') 68 °C 5 percig.

A második transzgénikus konstrukció lehetséges elemeinek kiválasztásához először primereket terveztünk a kiválasztott génekre. Ehhez meg kellett határozni az mRNS szekvenciájukat, a gének exon-intron határát, illetve ezekre a régiókra megterveztük a megfelelő exon határokat átívelő primer párokat.

A primerek tervezését követően, először felnőtt egyedekből izoláltam mRNS-t, a petefészekből és a heréből egyaránt. A marker gén jelöltek közül hatot azonosítottunk: *dazl*, *sycp2*, *rbm46*, *sycp3*, *zbtb16a*, *ccnb3* (**1. táblázat**).

1. táblázat: A kiválasztott marker gén jelöltek.

Gén jel	Gén név	Expresszió helye	Hivatkozás
dazl	deleted in azoospermia-like	Spermatogónia 1/2	Marlow és mtsai, 2021
			Kosaka és mtsai, 2007
sycp2	synaptonemal complex protein 2	Spermatocita	Takemoto és mtsai, 2020
rbm46	RNA binding motif protein 46	Spermatogenezis	Dai és mtsai, 2021
sycp3	synaptonemal complex protein 3	Spermatocita	Ozaki és mtsai, 2011
zbtb16a	zinc finger and BTB domain containing 16a	Spermatogónia 1/2	Ozaki és mtsai, 2011
ccnb3	cyclin B3	Spermatogónia 1/2	Ozaki és mtsai, 2011

Ezekre a génekre két-két primer párt terveztünk, amelyeknek egy részét a reakciók során leteszteltünk, hogy valóban felszorzósítják-e a keresett géneket (**2. táblázat**).

2. táblázat: A PCR primerek és azok szekvenciája

Gén jele	Gén neve	Primer ID	'forward' primer szekvencia (5' --> 3')	'reverse' primer szekvencia (5' --> 3')
dazl	deleted in azoospermia-like	F1/R1	GTCGATTATGTGCATCTGTCAGG	ATCTCGTTCTCATCCACCTTC
		F2/R2	CCAGACTATCGTTGATCAGC	CACTGAATACGGGTGATGGT
sycp2	synaptonemal complex protein 2	F1/R1	GTTGCAGGCATGTCACTGTG	TCCCCGATTCTTGATCTTGC
		F2/R2	ACACCAGTACAGTTCTCAGAGG	AAGGCCGAGGTCTGCTTTTC
rbm46	RNA binding motif protein 46	F1/R1	ATGAAATCCGCCCTGGGAAG	ATGACCCCTTCAGTCACCTTC
		F2/R2	CTGGTCTCTGCCGAGTATC	GGAGCCAGAGGAGCAATCTAAG
sycp3	synaptonemal complex protein 3	F1/R1	CTGGAAAGATTTGGTGC GGAC	GCTCCTCGGATTCAGGACG
		F2/R2	AAAGATAACGTGAGGTGGGCG	AACGGTGAAGTCAAACGCC
zbtb16a	zinc finger and BTB domain containing 16a	F1/R1	TCCGTTCGCATACAGCAGG	CTTCTTGCCGCAGCCATTAC
		F2/R2	CAGATCCACACAGGATCAG	CGCAAAACTCGCACTCGAAC
ccnb3	cyclin B3	F1/R1	CAGCGTGTCTGTTGAAAGGG	CTTCTGCAGCTTCTTGGCAG
		F2/R2	CTAGGCAGCGGTTTATTGTG	TCTGGGGTCCATCCTGGTTC
hsf5	Heat shock factor 5	F1/R1	AACTTCAGACGAGGCCAACCC	AGCTGGGCAGAACCTCTATTTC
		F2/R2	GACTTTACTCTCCAGTTTGCCAG	ATCCACCATCCGAAACGCTC

Ezeknek a primereknek a tesztelésénél a PCR komponenseket a következő térfogatban és mennyiségben használtuk: 10 uL 2x High Fidelity Phusion PCR Master Mix, 2 uL 'forward' primer (1 uM), 2 uL 'reverse' primer (1 uM), 4.5 uL víz, 1.5 uL cDNS. A PCR felsokszorozást a következő hőmérsékleti profillal végeztük: kezdeti denaturáció ('denaturation') 95 °C 5 percig; 30 cikluson ismétlődve - denaturáció ('denaturation') 95 °C 1 percig; primerek kötődése ('annealing') 62 °C 15 másodpercig; lánc hosszabbítás ('extension') 68 °C 20 másodpercig; végső lánc hosszabbítás ('extension') 68 °C 5 percig.

A PCR termékeket minden esetben 2%-os agaróz TBE gélen választottam el.

3.6 PGC-k vándorlásának megfigyelése

A PGC-k vándorlásának megfigyelése során több technológiai eljárását is alkalmaztunk. Az Élvonal Halgenomikai Laboratóriumban kezdtük a kezdeti megfigyeléseinket, azonban a korábban bemutatott mikroszkóp nem rendelkezett elég nagy nagyítással ahhoz, hogy ezeket a sejteket meg tudjuk velük figyelni kellően nagy felbontásban. Ezért Dr. Csenki-Bakos

Zsolt (AKI, MATE) és Prof. Gócza Elen (GBI, MATE) voltak segítségünkre, akik rendelkezésünkre bocsátották a mikroszkópos rendszerüket. A kamerával felszerelt Leica M205 FA, DFC 7000T sztereomikroszkópot és a felvételek készítéséhez szükséges Leica Application Suite X programot Dr. Csenki-Bakos Zsolt bocsátotta rendelkezésünkre. Prof. Gócza Elen a Leica TCS SP8 típusú konfokális mikroszkóphoz segítette a hozzáférésünket. Dr. Csenki-Bakos Zsolt és PhD hallgatója Bock Illés segített az egyedek rögzítésében és a felvételek készítésében. A time-lapse felvétel elkészítéséhez a lárvákat 100 mg/L Tricaine (MS-222) oldatban altattuk. Egy Petri-csésze aljába egy csepp 1,2% alacsony olvadáspontú agarózt cseppentettünk, és elhelyeztük benne az egyedeket laterális nézetben. Miután az agaróz megszilárdult, a Petri-csészét feltöltöttük 80 mg/L MS-222 oldattal, lezártuk Parafilm-mel, majd a sztereomikroszkóp alá helyeztük őket. A fényképeket a Leica Application Suite X programmal készítettük el 50X nagyításban. A beágyazott halakról öt órán keresztül felvételeket készítettünk. A felvételeket az ImageJ szofver segítségével elemeztem és készítettem el a time-lapse videót. A felvételek után az egyedeket visszahelyeztük a tartályukba.

3.7 Ivarbillentés korai hőkezeléssel

Korábbi kutatások megmutatták azt, hogy lehetséges a magas hővel való ivarbillentés és ezáltal az ivararány eltolása a hímek irányába (Ribas és mtsai, 2017; Hossaini és mtsai, 2019). Korábban kollégám, Hirth Mirella adaptált a laborunk körülményeire egy olyan hőkezelési eljárást, ami lehetővé teszi az ivararány eltolását a hímek felé a nagyon korai embriók rövid hőkezelésével (Hossaini, 2019). A *gáspár* vonalon történő alkalmazása során az általa megadott körülményeket vettem figyelembe. A halakat először csoportosan szaporítottam, majd az embriókat begyűjtöttem, a korábbi munkámhoz hasonlóan (Szabó, 2022). Az embriókat Petri-csészébe helyeztem, majd ki alakítottam egy kezelt és egy kontroll csoportot. A kezelt csoportot ötórás korban (5 hpf) az inkubátorba helyeztem, amiben a víz hőmérséklete 35 °C volt. A kezelt csoportokat 24 óra után kivettem az inkubátorból. Öt napos korig minden nap ellenőriztem és feljegyeztem az elhullást, mind a kontroll, mind pedig a kezelt csoport esetében. Az egyedeket ettől a ponttól kezdve normál protokoll szerint tartottam.

3.8 Bioinformatikai analízis

A genomi szekvenciák bioinformatikai analízisét együttműködőnk, Dr. Szabó Gyula (AKI, MATE) végezte. Az Illumina pair-end technológiával kapott szekvenciákat egy vad típusú referencia genomra (GRCz11) kellett rátérképeznie, mely az általunk keresett transzgént ugyan nem tartalmazta, viszont az endogén *vasa* lókuszt, melynek szekvenciája részlegesen átfedett a fúziós transzgénével igen. A nem szokványos, és esetlegesen a transzgénből származó kimérikus szekvencia szakaszokat a Samtools (Verzió: 1.13) és GNU Awk (Verzió: 5.1.0) szoftverekkel azonosította. Az így kapott térképezési adatok értékelését és az transzgén beépülési pozíciójának meghatározását szakvezetőimel és Hirth Mirella kolléganőmmel együtt végeztük.

A vonal továbbfejlesztése során az egyes marker gén jelöltek expressziós sajátosságait vizsgáltuk, ehhez ezekre génekre terveztünk primereket. Az analízis során a következő szofvereket használtuk: 'ZFIN' (<https://zfin.org/action/marker/search>), 'Zebrafish Blat Search' (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>), 'NCBI Nucleotide BLAST', NCBI Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Az adatok összegzésére az Excel (Microsoft) programot használtuk.

4. Eredmények és megbeszélésük

4.1 A transzgén beépülési pozíciójának meghatározása

A *gáspár* vonal egyedeiből izolált genomi DNS mintákat Illumina pair-end eljárással szekvenáltattuk meg. Ennek a munkának a célja az volt, hogy meghatározzuk a *tg[ddx4::egfp]* transzgén beépülésének helyét a genomban. A szekvenáláshoz először megfelelő minőségű és koncentrációjú genomi DNS mintát izoláltam. Mivel a transzgén genomi pozíciójának megtalálásához elég volt az is, ha az adott egyed egy kópiában hordozza a transzgént, így a hemizigóta *gáspár* csoportból izoláltam a DNS mintát. Ezáltal nem kellett az értékes homozigóta állományunkból egyedet feláldozni.

Az Illumina pair-end eljárás alapján kapott szekvenciák lefedték a genom 81.73%-át legalább ötször. Ez azt jelentette, hogy ezekből a régiókból kellően pontos információt kaphattunk. Az analízis során azt vártuk, hogy olyan úgynevezett 'read'-eket vagyis azonosított genomi szekvenciákat kapunk, amik megmutatják nekünk a transzgén integrálódásának helyét. A kapott szekvenciákat egy vad típusú referencia genomra (GRCz11) kellett térképeznünk, melynek a 10-es kromoszómáján ott volt az endogén *vasa* lokusz, melynek szekvenciája részlegesen átfedett a fúziós transzgénével, magát a transzgént ugyanakkor nem tartalmazta. Célzottan kerestük azokat a kimérikus szekvenciákat, melyek egyik fele az endogén *vasa* gén megfelelő régiójára tapadt fel, a másik fele viszont egy teljesen eltérő kromoszómán elhelyezkedő régióval mutatott azonosságot. (A kimérikon más genomi vizsgálatokban többnyire a könyvtárak készítése során létrehozott műtermékeket értik, melyekben két, egymással semmilyen módon nem kapcsolódó szekvencia tapad össze, és zavarja a bioinformatikai analízist. Esetünkben azonban olyan, valódi szekvenciákról van szó, melyek a transzgénikus konstrukcióban levő *vasa* szekvenciát és az integrálódott transzgént határoló genomi szekvenciákat egyaránt tartalmazzák **(10. ábra)**) A szekvenált genomban az analízisünk során egy bizonyos genomi régióban több, mint 225-szörös átlagos lefedettséget láttunk, azaz a lefedettség mértéke 17x volt magasabb, mint az a genom átlagos lefedettsége. Ez a feldúsulás az integrálódás helyére utalhat, a kiugróan magas lefedettség viszont arra, hogy a transzgén esetlegesen több kópiában épült be a genomba. A kimérikus szekvenciák közül számos 'read' egy része mutatott a referencia genom 10-es kromoszómájára (Chr3; NC_007121.7), egy másik részük pedig a hármas kromoszómára (Chr10; NC_007114.7). Az, hogy ezek a kimérikus

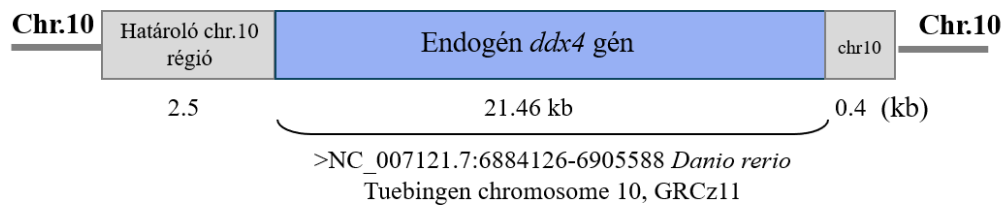
szekvenciák mindkét kromoszómára feltapadtak, azt mutatta nekünk, hogy valóban megtaláltuk az integrálódás helyét (**10. ábra**).



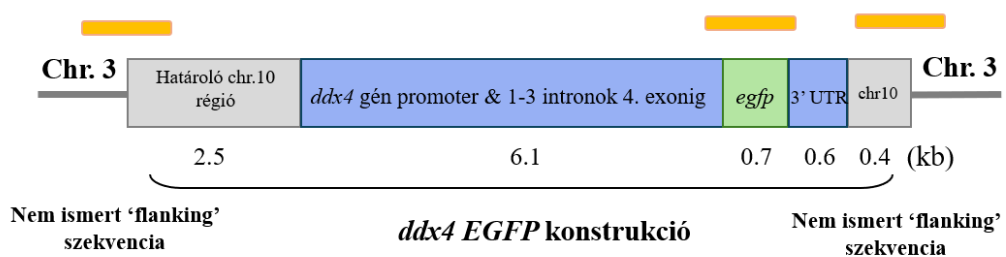
10. ábra: A szekvenálás során a kiméra 'read'-ek a hármas kromoszómára mutattak. Az analízis során számottevően sok lefedettséget tapasztaltunk a genom egy bizonyos régiójában. A 'read' egy része a referencia szekvencia 10-es kromoszómájáról, egy másik részük a 3-as kromoszómára mutatott. Mivel ezek a kiméra szekvenciák egyaránt mutattak két kromoszómára, tudhattuk, hogy valóban a hármas kromoszómába integrálódott a transzgén, ennek során egy 4 kilobázisos régió kiesett a genomból. (Forrás: saját ábra)

A *ddx4-egfp* konstrukció megalkotása során ugyanis a Chr10 kromoszómán elhelyezkedő endogén *vasa* gén 5' közeli vezérlő régióját, a kódoló szekvenciák elejét és a 3' vezérlő régiót beleépítették a transzgénikus konstrukcióba, és Chr3 kromoszómára csak azért tudtak feltapadni, mert a transzgén oda integrálódott (**11. ábra**).

A. Endogén *ddx4* (*vasa*) gén a 10-es kromoszómán



B. A transzgén integrálódásának helye

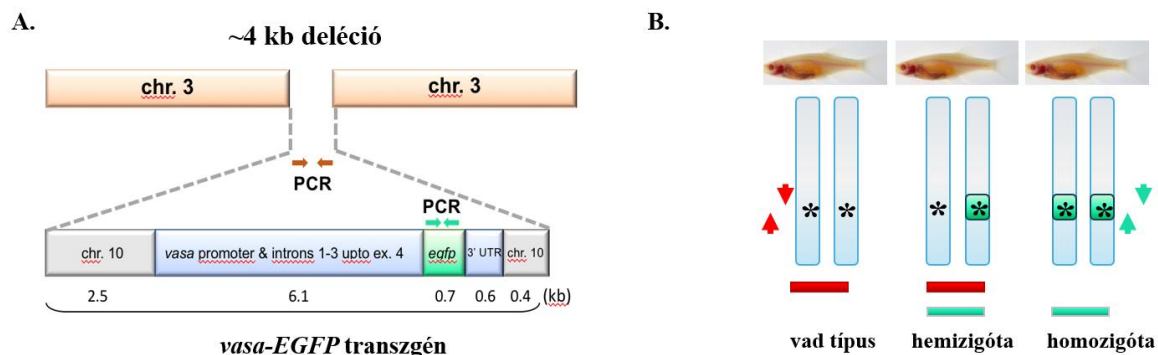


11. ábra: A transzgén felépítése összehasonlítva az endogén *vasa* génnel. A) Az endogén *ddx4* gén felépítése, az azt határoló 10-es kromoszóma bizonyos szakaszaival **B)** A tg[*ddx4::egfp*] transzgén létrehozása során az endogén *ddx4*-et határoló régiókból (Chr10) is átemeltek a konstrukció megalkotásához. (Forrás: saját ábra)

A Chr3 kromoszóma ezen régióján egy 4 kilobázisos deléciót találtunk a referencia szekvenciában (12. ábra). A szekvenciák feldúsulása azt valószínűsíti, hogy a transzgén több kópiában és több orientációban (fej-fej, fej-farok és farok-farok) összekapcsolódott egységek sorozataként épülhetett be ezen a ponton a genomba. Ennek részletes analizisét és bizonyítását azonban még nem végeztük el.

Az adatokat felhasználva a PCR reakció tervezése során célunk az volt, hogy már a második generációban megtaláljuk azokat a *gáspár* egyedeket, amelyek a transzgént homozigóta formában hordozzák. Ehhez a Chr3 kromoszómából kiesett genomi szakaszra terveztünk primereket. A régió felsokszorozítása során PCR terméket csak azokból az egyedekből kaptunk, amelyek a transzgént egyáltalán nem (*casper*), vagy csak egy kópiában (hemizigóta) hordozták (12. ábra). Először ezt a primert teszteltük, hogy valóban felsokszorozítja-e a kívánt genomi szakaszt, amely kiesett a transzgén integrálódása során.

Ezt követte a tavalyi munkámban is alkalmazott *gfp* transzgén jelenlétét kimutató primer pár alkalmazása.



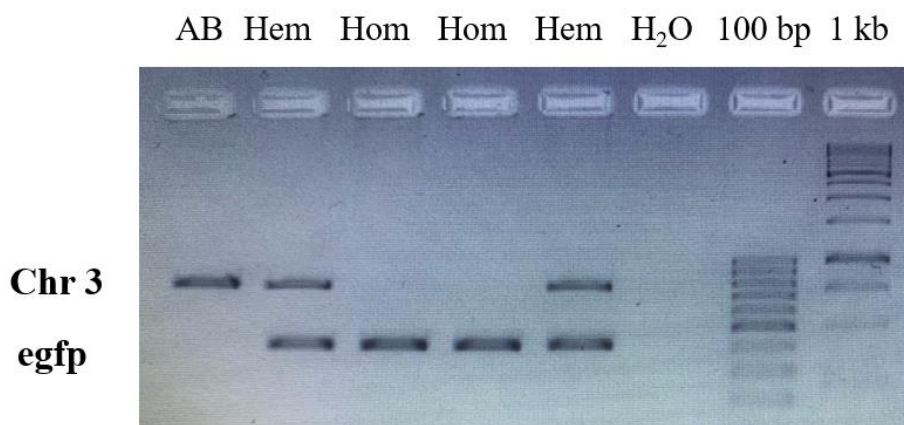
12. ábra: A transzgén jelenlétének kimutatása és kópiaszámának meghatározása célzott PCR reakciókkal. A) A genom szekvenálás egy 4 kb hosszúságú régiót fedett fel a hármaskromoszómán, amely kiesett a transzgén integrálódása során. Erre a kiesett szakaszra tervezett PCR primereket piros nyilak jelzik, míg a transzgént zöld nyilak jelölik. **B)** A vad típusú egyedekben PCR terméket csak a 3-as kromoszómára tervezett primerekkel (piros) kaptunk a transzgén hiánya miatt. A hemizigótákban (a transzgént egy kópiában hordozzák) a kiesett genomi régióból és a transzgénről is kaptunk terméket. A homozigótákban (két kópiában hordozzák a transzgént) csak a transzgén jelenlétét tudtuk kimutatni (zöld), mivel ezen egyedek genomjában a kiesett régió nem található meg. (Forrás: Szabó, 2022)

A delécióra két primer párt terveztünk (chr3del F1/R1 – 745 bp; chr3del F2/R2 – 886 bp). A PCR körülmények optimalizálásának eredményei azt mutatták, hogy mindkét primer pár működött a két különböző magnézium koncentrációval (1,5 és 3 mM) és felpadási hőmérsékletek (60 °C és 64 °C) kombinációkkal (**13. ábra**).



13. ábra: A deletált genomi régióra tervezett primer párok tesztelése. A primer párok tesztelése során a következő mintákat használtam: 1,2 – AB; 3,4 – *casper*; 4, 5 – transzgénikus pigmentált vonal; 7 – homozigóta *gáspár*; 8- hemizigóta *gáspár*. A) F1 primer tesztelése 1.5 mM magnézium koncentráció és 64 Celsius fok primer tapadási hőmérséklet mellett. B) F2 primer tesztelése 1.5 mM magnézium koncentráció és 64 Celsius fok primer tapadási hőmérséklet mellett. A gélre 100 bp-os és 1kb-os markereket vittünk fel. A két primer közül, az F2 primer adott erősebb csíkot a gélen, ezért ezt használtuk fel a továbbiakban a PCR reakciókban.

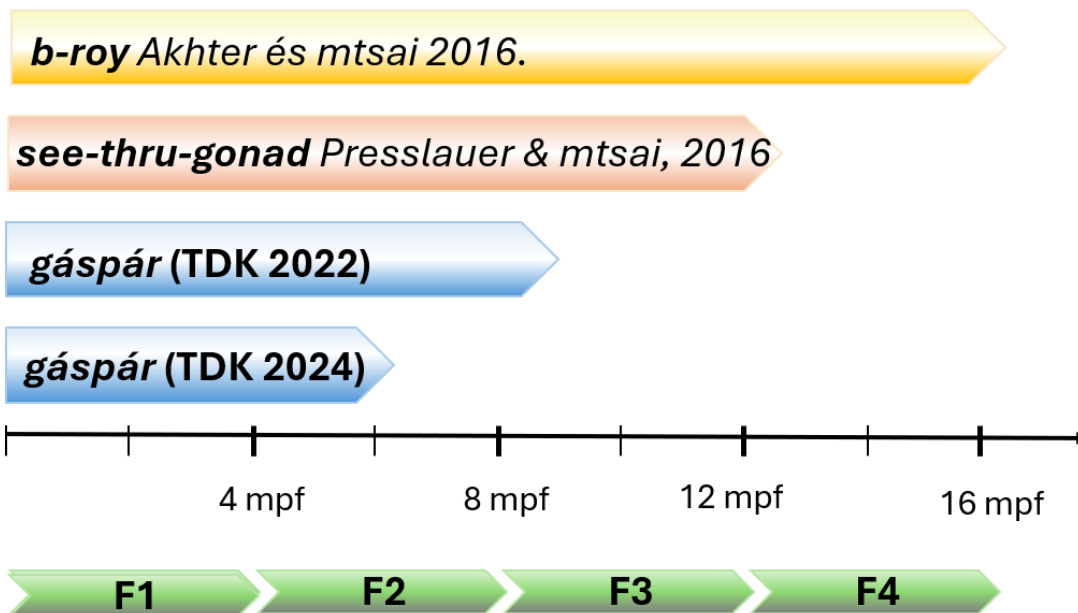
A két primer párból (EGFP-F2 és chr3del-F2) ezután két PCR reakciót állítottam össze, a mintákat kettéválasztottam, az egyik felükbe az EGFP primer párt használtam, a másik részükbe a chr3del primer párt. A két minta csoporton ezután elvégeztem a PCR-t, 64 °C feltapadási hőmérséklettel és 1.5 mM magnézium koncentrációval. A PCR termékeket a gélre való felvitel előtt összekevertem és a kétféle reakció terméket együtt futattam meg az agaróz gélen, ezzel egy kettős PCR reakciót alkotva (**14. ábra**).



14. ábra: A transzgén kópia számának meghatározására kettős PCR reakcióval. A kópia szám meghatározásához a két primert, a transzgén jelenlétét mutató *egfp*-t (alsó csík, 415 bp) és a kiesett régiót célzó primert (felső csík, 815 bp) külön sokszorozítottuk fel PCR reakciókban majd a gélre való felvitel előtt összekevertük azokat. A reakciókban AB, hemizigóta *gáspár* és homozigóta *gáspárokat* teszteltünk. Negatív kontrollként vizet, markerekként 100 bp-os és 1 kb-os létrákat használtam. (Fotó: saját fotó)

A két PCR reakció termékeinek agaróz gélen történő szétválasztása alapján a következő lehetőségek szerint tudtuk szelektálni a homozigóta egyedeket: i) ha a mintában csak a deletált régióra feltapadó primerek adtak terméket, ekkor tudtuk, hogy ez az egyed nem hordozott transzgént; ii) ha a mintában egyaránt látható volt a deletált régióból és a transzgént sokszorozni képes primerekből a csík, ez azt jelentette, hogy az adott egyed hemizigóta, vagyis egy kópiában hordozta a transzgént; és iii) ha csakis a transzgénről kapott terméket láttuk a gélen, azon egyedeket homozigóta *gáspár*-ként azonosítottunk.

Ezzel az eljárással még az általunk korábban használt szelekciós eljárásnál is gyorsabban és hatékonyabban tudtuk megtalálni a megfelelő halakat, mivel nem kellett egy F3-as generációt létrehoznunk, ahhoz, hogy az utódokban ellenőrizzük a transzgén jelenlétét, ezáltal visszakövetkeztetve a szülők által hordozott kópia számra. (15. ábra). Ezek már alkalmasak voltak arra, hogy megalapozzuk belőlük az állományunkat.



15. ábra: A létrehozott átlátszó transzgénikus zebradánió vonalak szelekciós időtartamának összehasonlítása. A *gáspár* vonal esetében alkalmazott szelekciós eljárás másfél generációra rövidítette le a vonal létrehozásának időtartamát összehasonlítva a *see-thru-gonad* és *b-roy* vonaláknál alkalmazott szelekciókkal. A kettős PCR alapú eljárást alkalmazva pedig az előző szelekciós eljárásnál is gyorsabban találhattuk meg a *gáspár* egyedeket. (Forrás: Szabó, 2022, módosítva)

A közeljövőben megkezdjük a két PCR reakcióból egy ún. duplex PCR kialakítását, melyben a két primer párt egy oldatban alkalmazva a két célszekvenciát (egfp transzgén és a Chr3-as kromoszómából kiesett szakasz) egymás mellett, párhuzamosan tudjuk fekszkoszorozni. Amennyiben sikerül ezt a reakciót beállítani, úgy a tesztelés költségeit tovább tudjuk majd csökkenteni.

4.2 A *gáspár* vonal létrehozása

A kettős PCR reakcióval ellenőriztük az egyedeket a második generációban. A homozigóta *gáspár* halakból ezután elkezdjük kialakítani az állományunkat. A folyamat során csoportos és páros ivatásokat egyaránt végeztünk. A csoportos ivatásból származó halakat az állomány bővítésére használtuk. A szülőpárok keresztezéséből származó F3-as generációt már fel tudtam használni a tervezett kísérleteimhez.

Az F2-es generációba tartozó egyedek szelektálását a 4.1. alfejezetben ismertetett kettős PCR eljárásunkkal végeztük, ennek során 20 *gáspár* egyedet azonosítottunk

homozigótaként. Ez az egész szelektált F2-es állomány 0.47 %-át jelentette. Ez jóval kisebb szám, mint amit előzetesen meghatároztunk (1.56 %), azonban az elhullások száma elég magas volt ahhoz az embrió és lárva stádiumokban, hogy ezt a számot ennyire lecsökkentse.

A vonal létrehozását és az állomány bővítést elkezdtük, azonban eddig csak 60 egyed tudtuk létrehozni. Az F2-es gáspárokból két csoportos tartály alkottunk, tankonként 10-10 egyeddel, az ivararány megközelítőleg 50%-os volt. Ezeket eddig négy alkalommal szaporítottuk, amivel létrehoztunk egy F3-as generációt, ezáltal 40 *gáspár* egyed létrehozva, ezzel az állományt háromszorosára bővítettük. Ezt a generációt elkülönítettük két részre, a nagyobb része az egyedeknek a vonal bővítése miatt kezdtük el nevelni, egy kisebb részükből a korai hőkezelés körülményeinek optimalizálását végeztük el.

4.3 A PGC-k vándorlásának megfigyelése a *gáspár* vonalon

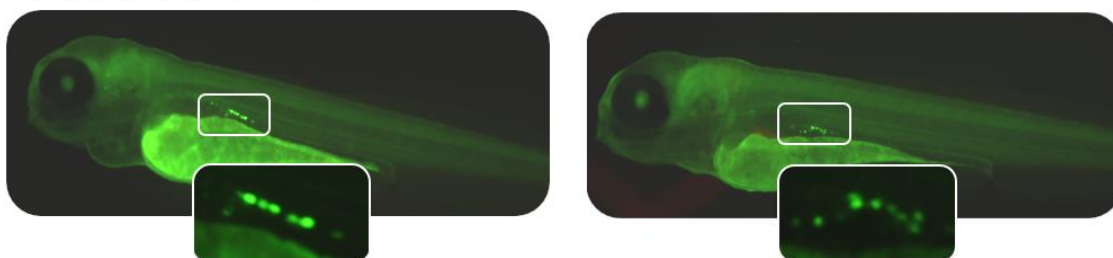
A *gáspár* vonalon történt megfigyeléseim során azt tapasztaltuk, hogy egyes PGC-k eltévednek a vándorlásuk során, és nem az ivarszervek kialakulásának helyén, hanem fejben vagy a farok bizonyos pozícióiban kötnek ki. Jelenleg nem tudjuk azt, hogy ezeknek a sejteknek a természetes eltévedése hogyan hat az ivari folyamatokra.

Hogy ezt kiderítsük többféle eljárást alkalmaztunk:

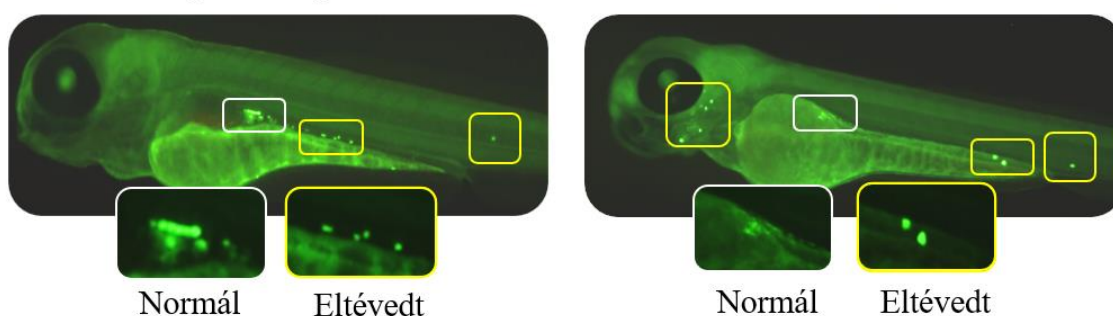
- a) A *gáspár* egyedeket csoportosan leszáporítottuk és az egy napos fejlődési stádiumtól indulva, mindennap naponta három óránként ellenőriztem az eltévedés mértékét egészen öt napos korig. A kísérlet elején azt tapasztaltam, hogy az egyes napokon óránként nem történt megfigyelhető változás a sejtek számát és eltévedését érintően, ezért a második és harmadik napon már csak napi egyszer végeztem el ezeket. A kezdeti megfigyeléseket és a kísérlet körülményeinek beállítását az Élvonal Halgenomikai Kutatócsoport laboratóriumában végeztem. Az egyedeket egyesével vizsgáltam, hogy így figyeljem meg a PGC-k vándorlását és a változásokat. Tapasztalataim alapján, az első egyedfejlődési napon a mikroszkópunk sajnos nem teszi lehetővé a PGC-k pontos megfigyelését. A második, harmadik és negyedik napon megfelelően detektálhatóak voltak az eltévedt sejtek. A mozgásuk során ezeken a napokon összesen 10% elhullást tapasztaltunk. Az ötödik napon nem volt változás az eltévedés mértékében a negyedik naphoz képest. Mivel ekkor még láthatóak a sejtek és az egyedek mérete is megfelelő ahhoz, hogy a megfigyelésük során történő mozgásuk ne okozzon elhullást, ezért ezt

a napot határoztuk meg a megfigyelések kezdetére (**16. ábra**). Ehhez a kísérlethez összesen 60 egyedet figyeltem meg, ennek során azt tapasztaltam, hogy a lárvák 45%-ban voltak észlelhetőek az eltévedt sejtek. Az egyedeket ezután két csoportra osztottam, amikben tapasztaltam az eltévedést, az 'eltévedt' csoportba helyeztem, amelyekben nem láttam ezt, a kontroll csoportba. Ezeket az egyedeket jelenleg neveljük, az ivarérikük után pedig megfogjuk határozni az egyes csoportokban tapasztalható ivararány alakulását.

Kontroll csoport – 5 dpf



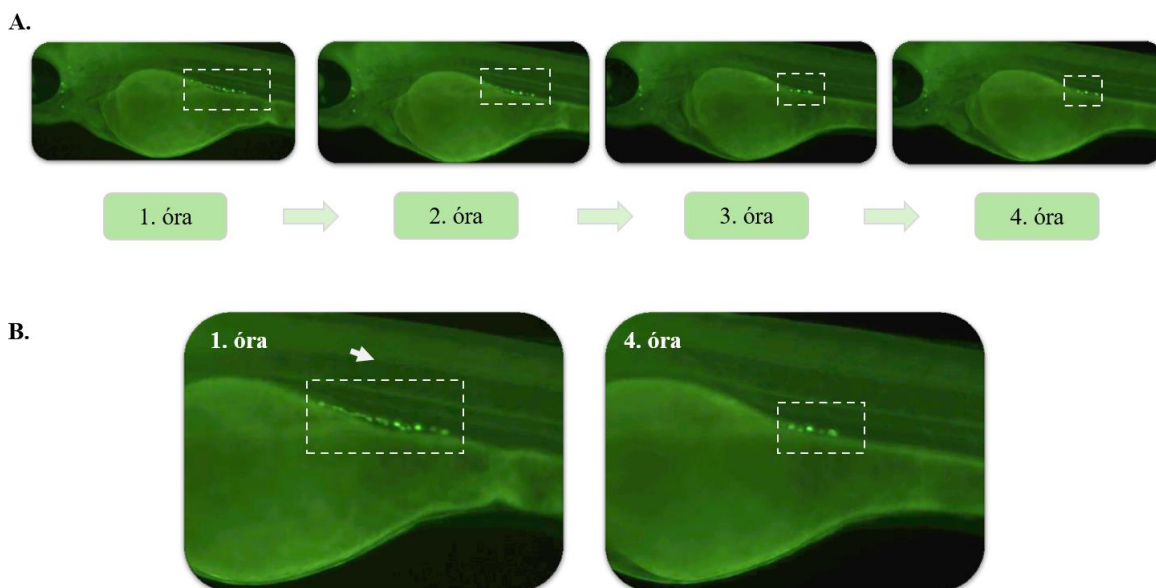
Eltévedt csoport – 5 dpf



16. ábra: A PGC eltévedésének megfigyelése öt napos egyedfejlődési stádiumban. A PGC eltévedésének mértéke alapján két csoportba rendeztük az egyedeket. A 'kontroll' csoportban nem tapasztalható eltévedés (fehér téglalap). A 'eltévedt' csoportban a sejtek a test különböző pontjaiban találhatók, például a fejben és a farokússzó kezdeményben (sárga téglalap). (Forrás: saját ábra)

- b) Elkezdtünk továbbá dolgozni egy olyan eljárás, amivel a sejtek vándorlásának folyamatát pontosabban tudnánk megfigyelni *in vivo*. Az öt napos egyedeket rögzítés után vizsgáltuk és állítottuk be a körülményeket, ezeket az Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet Gödöllői Campusán csináltuk. Az itt készült felvételeknek köszönhetően nagyon részletesen tudtuk megfigyelni az ivarszerv kezdemény helyére történő sejtek vándorlását, valamint az eltévedt sejtek mozgását is (**17. ábra**). Ezzel az eljárással be tudtuk bizonyítani, hogy a *gáspár* vonalban ezek a folyamatok sokkal

részletesebben megfigyelhetők, és teljesebb képet kaptunk arról, hogyan zajlik le a PGC vándorlása. Jelenleg a rögzítéses eljárás tovább fejlesztésén is dolgozunk.



17. ábra: A lárvák rögzítésével készített PGC vándorlási felvételek. **A.** A lárvák beágyazását követően a PGC vándorlását egy automatizált rendszerrel figyeltük meg és ebből készítettük time-lapse felvételeket. Az egyedeket öt napos korban figyeltük és négy órán keresztül rögzítettük a sejtek vándorlását. A negyedik órában jelentősen közelebb kerültek a sejtek az ivarszerv kialakulásának helyére. **B.** Az 1. és 4. órában készített time-lapse képek felnagyítva. Fehér nyíl jelzi a PGC-k vándorlási irányát. (Forrás: saját ábra)

4.4 Korai hőkezelések hatásának vizsgálata a PGC-kre

Magas hővel való kezelésekkel el tudjuk tolni az ivararányt a hímek irányába. Ezt a jelenséget vizsgálta a korábbiakban kollégáim Hirth Mirella és Pethő Cintia. Az általuk kidolgozott hőkezelési körülményekkel jelentős ivararány eltolást tudtak előidézni egyes kezelt csoportokban (Pethő, 2022). A *gáspár* vonalon történő kezelések azonban részletesebb képet adhatnak nekünk arról, hogyan is tolódik el az ivararány.

Ezekből a kísérletekből korai eredményeink vannak a *gáspár* vonalon. Kezdetben egy Petri csészében 30-30 egyedet kezeltünk. Mivel ez a szám jelentős elhullást okozott, ezért a későbbiekben csökkentettük ezt a sűrűséget 15-re. A lárvákat később portáp helyett napi többszöri élő táp takarmányozással és az egyedszám jelentős csökkentésével neveltük. Ezáltal olyan kísérleti körülményeket sikerült beállítanunk, amelyek alkalmasak voltak arra, hogy nagy léptékben végezzünk el kísérleteket az egyedeken.

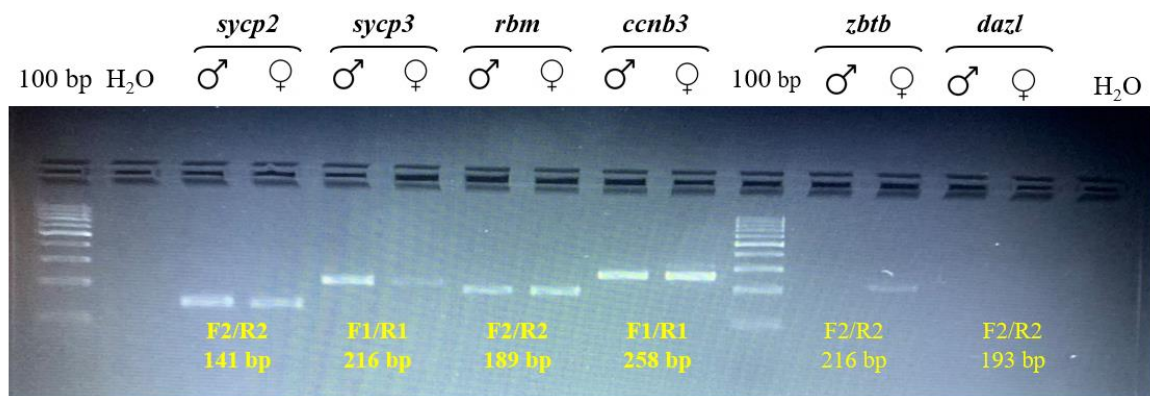
Eddig összesen három hőkezelési kísérletünk bizonyult sikeresnek. Jelenleg ezeket hőkezelt és kontroll állományokat neveljük. Ez hat csoportot jelent. Ezeknek a kísérleteknek az eredményét az az ivarszerv differenciálódásának stabilizációját követően, azaz két hónapos kor után fogjuk ellenőrizni az ivararány meghatározásával. Továbbá folyamatosan indítunk új kezelési csoportokat, hogy megtaláljuk azokat, amelyekben a legnagyobb az ivareltolódás a hímek irányába. A kísérlet beállítását ugyan még csoportos ivatásokból származó utódokon végeztük, az ivararány esetleges eltolódását vizsgáló kísérletekhez már szülőpárokat alakítottunk ki, amelyeknek az utódait fogjuk analizálni.

4.5 A vonal továbbfejlesztése

A *tg[ddx4::egfp]* transzgén hátrányairól a korábbi dolgozatomban tettem említést (Szabó, 2022). A transzgén fluoreszcens jele csakis a petefészekben nyomonkövethető, a nőstények detektálásában és az ivarfejlődés követésében esetében ez egy valóban rendkívül hasznos eszköz. Azonban az ivarváltás megfigyelésére nem ideális, ugyanis ezt a jelenséget a hímekben csak az erős Egfp jel csökkenésével lehet észrevenni, és ezt az ivarszerv átalakulásának korai szakaszában nehéz észlelni. Ennek megoldására elkezdtünk dolgozni a vonal tovább fejlesztése érdekében. Ennek során be kívánunk jutatni egy második, herét jelölő transzgenikus konstrukciót a *gáspár* vonalba, hogy a here megjelenését és fejlődését tanulmányozhassuk. A kezdeti lépésekben járó kutatás során először a megfelelő here marker kiválasztásával és a gének expresszójának karakterizálásával foglalkoztunk. A géneket egy olyan publikációból gyűjtöttük, amiben a herében tártak fel erősen megnyilvánuló géneket egy sejtes transzkriptóma szekvenálás által ('Single Cell Transcriptome Sequencing', röviden scRNAseq, Qian és mtsai, 2022). Több kritériumot is figyelembe vettünk a megfelelő marker gén kiválasztásához: i) a here fejlődésének korai szakaszában nyilvánuljon meg; ii) mutasson differenciál expressziót a két ivar között; és iii) legyen könnyen detektálható az Egfp jelenlétében. Ezek alapján eddig hat marker gén jelöltet azonosítottunk.

Olyan sejtekben kerestünk lehetséges marker gén jelölteket, amelyek az ivarváltás során korán megjelennek, ezzel lehetővé téve a here megjelenésének és fejlődésének folyamatos megfigyelhetőségét. A kezdetleges herében legkorábban megjelenő sejtek a spermatociták, illetve a korai (I. és II. típusú) spermatogóniumok. Ezért olyan géneket választottunk ki, amelyek ezen sejtek valamelyikében erősen nyilvánulnak meg.

Az eddig megtervezett primer párok mindegyike felsokszorozta a kívánt gént (**18. ábra**). A két ivarból kapott PCR termékek intenzitásának összehasonlítása azonban azt mutatta, hogy sajnos csak az *sycp3* gén lehet megfelelő arra, hogy a továbbiakban, fiatal egyedekben is figyeljem az expressziójuk szintjét. Jelenleg azon dolgozunk, hogy olyan qPCR reakciót állítsunk be, mellyel ezt a kezdeti eredményt validálni lehet majd. A marker gén jelöltek esetében tudjuk azt, hogy ezek biztosan erősebben nyilvánulnak meg a herében, mint a petefészekben (Qian és mtsai., 2022). Azonban a mostani eredményeink mégis azt mutatják, hogy hatból öt gén erősebb jelet adott a nőstények, mint a hímek esetében. Ennek egy lehetséges oka az lehet, hogy ez a PCR reakció nem elég érzékeny ahhoz, hogy az expressziós különbségeket megfelelően láthassuk vele. Valószínű, hogy a legnagyobb differenciál expressziót a *sycp3* gén mutatja, azonban lehetséges, hogy a többi gén esetében is láthatnánk ezt, ha ezeket qPCR reakcióban tesztelnénk.



18. ábra: A hím ivar-specifikus gének expressziójának tesztelése felnőtt egyedek ivarszervében. Felnőtt egyedek heréjéből és petefészkéből izoláltunk RNS-t, majd cDNS-é írtuk át oligonukleotid dT primer felhasználásával. Az ivar-specifikus gén jelöltekre tervezett primerek közül csak a *sycp3* gén eredményezett differenciál expressziót: a hímből felsokszorozott PCR termék jóval erősebb volt a nőivarú egyedénél. A géltre 100 bp-os molekulasúly markereket vittünk fel. (Fotó: saját fotó)

Azonban tovább fogunk dolgozni más marker gén jelöltek azonosításán is, melyeket a már biztosan differenciál expressziót mutató *sycp3* mellett használni tudunk majd.

4.6 Hozzájárulások

A bemutatott munkák legnagyobb részét magam végeztem el, témavezetőim segítségével. A 4.1 alfejezetben a transzgén szekvenálásának bioinformatikai analízisét Dr. Szabó Gyula segítségével végeztük el. A 4.2 alfejezetben a zebradániós rendszert fenntartó kollégáim, Márton Csaba és Horváth Kornél segítettek. A 4.3 alfejezetben a PGC vándorlásának megfigyelésében és az egyedek rögzítésében Dr. Csenki-Bakos Zsolt és PhD hallgatója Bock Illés segítettek, mind a rögzítési módszer kidolgozásában, mind pedig a mikroszkópos rendszerük használatában. A 4.4 alfejezetben Hirth Mirella PhD hallgató kollégám segített a munkák elvégzésében és a korábbi kezelésekből származó tapasztalatai és gyakorlata által. Végezetül a 4.5 alfejezet esetében témavezetőim segítettek a primerek tervezésében és a PCR reakció felállításában.

5. Limitációk

5.1 A haltartó rendszer nyújtotta lehetőségek

A zebradánió tartására szolgáló rendszerünk időről időre telítődik halakkal. A rendszer nyújtotta helyek, új tartályok létrehozására erősen befolyásolnak minket abban, hogy milyen vonalakat tarthatunk, illetve hozhatunk létre. A generációk létrehozása során ezért nem tudtam az összes utódot megtartani, folyamatosan felülkellett bírálnom azt, hogy melyek a legfontosabb állományok, amelyeket mindeképp meg szerettem volna tartani a rendszeren. Ennek eredményeképpen nem tudtam olyan gyorsan haladni a *gáspár* vonal egyedszám bővítésével, ez már a korábbi munkám során is nehézségeket okozott.

5.2 A zebradánió ivarmeghatározása egy rendkívül komplex folyamat

A zebradánió előnyei leginkább az embrionális korban és a korai lárva korban kihasználhatóak, a legtöbb kutatás ezekben a stádiumokban foglalkozik a különböző folyamatok jobb megértésével. A modell előnyös tulajdonságainak jelentős részét azonban mi nem tudjuk kihasználni, ugyanis az ivarok kialakulása az egyedfejlődés második hetétől kezdődően a nyolcadik hétig tart. A fajnak ezen felül egy sajátos ivarmeghatározási és kialakulási rendszere van, a tény, hogy az egyedekben eltérő időben alakulnak ki az ivarszervek jelentősen megnehezítik ezen folyamatok megfigyelését.

5.3 A mikroszkópos rendszerünk hátrányai

Az általunk használt mikroszkóp és fluoreszcens adapter egy olyan eszköz, amivel lehetőségünk már lárva korban megfigyelni a korai petefészek megjelenését és fejlődését, hímek esetében a jel csökkenését. Kiválóan alkalmazható a felnőttek ivarának meghatározására is, ebben a két esetben valóban kivált egy jelentősen drágább fluoreszcens mikroszkópot. Azonban a PGC-k vándorlásának megfigyelése során azt tapasztaltuk, hogy a mikroszkóp nagyítása nem teszi lehetővé a pontos nyomkövetését a sejteknek. Ezért kellett más mikroszkópos rendszert igénybe vennünk, eltérő laboratóriumokból.

5.4 A *gáspár* vonal hátrányai

Habár a vonal jelentősen javítja az ivarszervfejlődés megfigyelhetőségét, a hátrányai a kísérletek során nem elhanyagolhatóak. A kísérletekben való használata során vettük észre azt, hogy a vonal egyedei érzékenyebben reagálnak a környezeti stresszre, valamint a növekedésük is lassabb ütemű. Azáltal, hogy kikereszteltük az egyedeket a vonal létrehozása során, növelni tudtuk az ellenálóságukat. Mindazonáltal összehasonlítva a pigmentált transzgénikus vonallal, a *gáspár* egyedek túlélése és a növekedési erélye egyaránt csökkent. Ez annak tudható be, hogy a pigmentek számos immunfolyamatokhoz hozzájárulnak (Qian és mtsai., 2022; Agius & Roberts, 2003), ezek hiánya okozhatja a fokozottabb stressz érzékenységet.

6. Következtetések és javaslatok

6.1 A *gáspár* vonalban a PGC-k megfigyelése könnyebbé vált

A *gáspár* vonalban történő PGC vándorlásának megfigyelése lehetővé tette, hogy eddig nem látott részleteket láthassunk meg. A sejtek vándorlása az ivarszerv kezdemény helyére és az eltévedt sejtek egyaránt nagyobb részletességgel nyomomonkövetkezőek (7. ábra). Ezáltal lényegesen könnyebben tudjuk kideríteni azt, hogy az eltévedt sejtek milyen mértékben hatnak az ivarok kialakulására és az ivararány alakulására.

6.2 Az általunk kidolgozott szelekciós eljárás más vonalak létrehozása során is hasznos lehet

A protokollunk számos ponton előrelépés a korábbi munkáknál használtakhoz képest (Presslauer és mtsai, 2016; Akhter és mtsai, 2016). Azonban az eljárás fejlesztésével még hatékonyabb eszközt alkottunk, amely lehetőséget ad arra más kutatásokban is kihasználniuk ennek előnyeit. Hasonló transzgénikus vonalak létrehozása esetében a mi szelekciós eljárásunk egy sémát adhat, amivel jelentősen lerövidíthető a szelekció időtartama, ezáltal egy ilyen fajta kutatás hatékonyabb tudna lenni.

6.3 A vonal hasznos eszköz lehet egyéb területek számára is

Véleményem szerint a *gáspár* vonal hasznos eszköze lehet más kutatási területeknek is. A vonal létrehozását és az állomány kialakítását követően kaptunk megkeresést Dr. Csenki-Bakos Zsolttól, aki a toxikológiával kapcsolatos kísérleteiben szeretne felhasználni a *gáspár* vonalat. Ennek során lehetősége lesz arra, hogy az ivarifolyamatokat befolyásoló mesterséges hormon hatású szerek (xenoösztrogén) negatív következményeit és befolyásolásukat vizsgálja a *gáspár* vonalon. Dr. Müller Ferencről, a Birmingham-i Egyetem professzorától szintén kaptunk megkeresést, hogy a vonalat az összejtbiológiával foglalkozó kísérleteiben felhasználja, mivel ezekben fontos az ivarszerv fejlődésének minél pontosabb nyomomonkövethetősége.

7. Összefoglalás

A kutatásom során továbbfejlesztettük meglévő szelekciós eljárásunkat. Ahhoz, hogy a szelekció időtartamát lerövidítem és egy még hatékonyabb és gyorsabb eljárást dolgozzunk ki, a *gáspár* vonal genomjának újra szekvenálásával meghatároztuk a transzgén integrációjának helyét. Az ebből származó adatokkal egy olyan PCR reakciót tudtunk megalkotni, amely során a kiesett régió felsokszorozásával a második generációban detektálni tudtuk a homozigóta gáspárokat.

Ezt követően már lehetőségem nyílt arra, hogy létrehozzak egy nagyobb egyedszámú *gáspár* állományt. Ezek során az egyedek számát megháromszoroztuk, olyan tartályok kialakításával, amelyekben csoportokat és szülőpárokat hozhattam létre.

Ezen állomány már lehetőséget jelentett arra, hogy a *gáspár* vonal használatával több kísérletet is elvégezzek. A PGC-k vándorlásának nyomonkövetése során 60 egyedben figyeltem meg ezeknek a sejteknek a vándorlását. Többek között meghatároztuk azt, hogy melyik egyedfejlődési nap a legalkalmasabb a kísérlet kezdetére, illetve megtudtuk azt, hogy a teljes megfigyelt kísérleti csoport 45%-ban megjelennek az eltévedt sejtek. A megfigyelés fejlesztésén is dolgoztunk, ennek során öt órán követtük nyomon az egyedekben történő PGC vándrolást és ezekből time-lapse felvételeket készítettünk. Ezzel még részletesebben tudtam megfigyelni ezeket a sejteket. Ezek által az eredmények által megmutattuk azt, hogy a *gáspár* vonalban ezeknek a sejteknek a megfigyelése is jóval hatékonyabb lehet.

A korai hőkezeléseink során, sikerrel adaptáltuk a korábban megalkotott protokollt a *gáspár* vonalra, meghatározva azt a kezelési egyedszámot, amivel nagyobb elhullás nélkül tudjuk indukálni a hő általi ivareltolást. A későbbiekben további kezeléseket fogunk indítani, hogy megtudjuk azt, a vonal pontosan hogyan reagál ezekre és ezzel milyen mértékű ivareltolást tudunk előidézni.

A vonal továbbfejlesztése során, a transzgén hátrányosságai miatt, elkezdtünk dolgozni egy második, hímvart jelölő transzgénikus konstrukció megalkotásán. Ennek során hat marker gén jelöltet vizsgáltunk, az ezekre tervezett primer párok által. Az eredményeink alapján, csak a *sycp3* gén mutatott differenciál expressziót a hím ivar irányába. A továbbiakban új jelölteket fogunk azonosítani, illetve ezeket és a már tesztelt *sycp3* gént qPCR reakciókban is tesztelni fogjuk.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek Dr. Szeverényi Ildikónak és Dr. Orbán Lászlónak számos területen nyújtott segítségükért. Továbbá mindazoknak, akik a kutatásom során tapasztalataikkal és segítségükkel hozzájárultak a munkámhoz.

Külön köszönöm Hirth Mirella kolléganőmnek, aki számos kísérletben segített, illetve nagy mértékben hozzájárult ahhoz, hogy a hőkezeléseket sikerrel tudjuk a gáspár vonalhoz igazítani.

Köszönöm Dr. Szabó Gyulának, aki a bioinformatikai analízisekkel járult hozzá ahhoz, hogy ezáltal a szelekciót még hatékonyabbá tegyük.

Köszönöm Dr. Csenki-Bakos Zsoltnak és Bock Illésnek, hogy hozzáférést adtak a mikroszkopos rendszerükhöz, továbbá segítettek annak használatának elsajátításában. Kiemelkedően sok segítséget kaptam tőlük a lárvák rögzítésének kidolgozásában is.

Köszönöm Prof. Elen Góczának és Ecker Andrásnak a konfokális mikroszkóp rendszerük hozzáféréseért, illetve, hogy segítettek abban, hogy új technológiákat ismerhessek meg.

Köszönet illeti továbbá az Alkalmazott Halbiológiai tanszék valamennyi dolgozóját, akik munkájukkal hozzájárultak a kutatásom elvégzéséhez. Külön köszönöm Márton Csabának és Horváth Kornélnak.

Végezetül szeretném megköszönni családomnak és barátnőmnek a rendkívüli támogatásukért. Nélkülük ez a munka nem készülhetett el volna.

Irodalomjegyzet

- A. Akhter, R. Kumagai, S. R. Roy, S. Li, M. Tokumoto, B. Hossain, J. Wang, W. Klanggnurak, T. Miyazaki, T. Tokumoto, Generation of transparent zebrafish with fluorescent ovaries: A living visible model for reproduction biology. *Zebrafish* 13 (3): 155-160 (2016.) <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1116>
- A. V. Krøvel, L. C. Olsen, Expression of vas::EGFP transgene in primordial germ cells of the zebrafish, *Mechanism of Development* 116 (1-2): 141-150 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00154-5](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00154-5)
- C. Agius, R. J. Roberts. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology, *Journal of Fish Diseases* 26 (9): 499-509 (2003). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x>
- C. A. Wilson, S. K. High, B. M. McCluskey, A. Amores, Y. Yan, T. A. Titus, J. L. Anderson, P. Batzel, M. J. Carvan, M. Scharl, J. H. Postlethwait, Wild Sex in Zebrafish: Loss of the Natural Sex Determination in Domesticated Strains, *Genetics* 198 (3): 1291-1308 (2014). <https://doi.org/10.1534/genetics.114.169284>
- C. B. Kimmel, W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann, C. Nüsslein-Volhard. Stages of embryonic development of the zebrafish, *Developmental Dynamics*, 203 (3): 253-310 (1995). <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- C. Pethő, Hőmérséklet okozta ivararány változás vizsgálata zebradánió modellen, TDK dolgozat 2022.
- C. Presslauer, T. Bizuayehu, K. Razmi, J. Fernandes, I. Babiak. *See-Thru-Gonad* Zebrafish line: Developmental and functional validation, *Reproduction* 157: 507-517 (2016). <https://doi.org/10.1530/REP-16-0328>
- E. Raz. Primordial germ-cell development: The zebrafish perspective. *Nature Reviews Genetics*, 4 (9), Art. 9 (2003). <https://doi.org/10.1038/nrg1154>
- E. Yamaha, R. Goto-Kazeto, T. Saito, Y. Kawakami, T. Fujimoto, S. Adachi, K. Arai. Primordial germ cell in teleost fish with special references to its specification and migration, *Journal of Applied Ichthyology* 26 (5): 816-822 (2010). <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01548.x>
- F. J. Janzen, G. L. Pauktis. Environmental Sex Determination in Reptiles: Ecology, Evolution, and Experimental Design, *The Quarterly Review of Biology* 66 (2) (1991).
- G. D'Agatti, R. Beltre, A. Sessa, A. Burger, Y. Zhou, C. Mosimann, R. M. White. defect in the mitochondrial protein Mpv17 underlies the transparent *casper* zebrafish, *Developmental Biology* 430 (1), 11–17 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.07.017>
- G. H. Yue, L. Orbán. Rapid Isolation of DNA from Fresh and Preserved Fish Scales for Polymerase Chain Reaction. *Marine Biotechnology* 3(3): 199-204 (2001). <https://doi.org/10.1007/s10126-001-0010-9>

- J. C. Avise, J. E. Mank. Evolutionary Perspectives on Hermaphroditism in Fishes, *Sexual Development* 3 (2-3): 152-163 (2009). <https://doi.org/10.1159/000223079>
- J. A. Lister, C. P. Robertson, T. Lepage, S. L. Johnson, D. W. Raible. *Nacre* encodes a zebrafish microphthalmia-related protein that regulates neural-crest-derived pigment cell fate, *Development* 126 (17): 3757-3767 (1999). <https://doi.org/10.1242/dev.126.17.3757>
- Haffter, P., Odenthal, J., Mullins, M. C., Lin, S., Farrell, M. J., Vogelsang, E., Haas, F., Brand, M., van Eeden, F. J. M., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C.-P., Jiang, Y.-J., Kane, D. A., Kelsh, R. N., Hopkins, N., & Nüsslein-Volhard, C. Mutations affecting pigmentation and shape of the adult zebrafish, *Development Genes and Evolution* 206(4): 260–276 (1996). <https://doi.org/10.1007/s004270050051>
- J. F. Baroiller, H. D’Cotta. Environment and sex determination in farmed fish, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 130 (4): 399-409 (2001). [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00267-8](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00267-8)
- J. R. Hawkins. The SRY gene. *Trends in endocrinology and metabolism*, 4 (10): 328-332 (1993). [https://doi.org/10.1016/1043-2760\(93\)90075-P](https://doi.org/10.1016/1043-2760(93)90075-P)
- K. Dumstrei, R. Mennecke, E. Raz. Signaling pathways controlling primordial germ cell migration in zebrafish, *Journal of Cell Science* 117 (20): 4787-4795 (2004)
- K. McElreavey, E. Vilain, C. Continot, E. Payen, M. Fellous. Control of sex determination in animals, *European Journal of Biochemistry* 218 (3): 769–783 (1993). <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18432.x>
- K. W. Tzung, R. Goto, J. M. Saju, R. Sreenivasan, T. Saito, K. Arai, E. Yamaha, M. S. Hossain, M. E.K. Calvert, L. Orbán. Early Depletion of Primordial Germ Cells in Zebrafish Promotes Testis Formation, *Stem Cell Reports* 4 (1): 61-73 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.10.011>
- L. B. Patterson, D. M. Parichy, Zebrafish pigment pattern formation: Insight onto the development and evolution of adult form, *Annual Review of genetics* 53: 505-530 (2019). <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112618-043741>
- L. Orbán, R. Sreenivasan, P. E. Olsson. Long and winding roads: Testis differentiation in zebrafish, *Molecular and Cellular Endocrinology* 312 (1-2): 35-41 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.04.014>
- L. Ribas, W. C. Liew, N. Díaz, F. Pfiferrer, Heat-induced masculinization in domesticated zebrafish is family-specific and yields a set of different gonadal transcriptomes, *PNAS* 114 (6): E941-E950 (2017). <https://doi.org/10.1073/pnas.1609411114>
- F. Maderspacher, C. Nüsslein-Volhard. Formation of the adult pigment pattern in zebrafish requires leopard and obelix dependent cell interactions, *Development* 130 (15): 3447–3457 (2003). <https://doi.org/10.1242/dev.00519>
- P. Qian, J. Kang, D. Liu, G. Xie. Single Cell Transcriptome Sequencing of Zebrafish Testis Revealed Novel Spermatogenesis Marker Genes and Stronger Leydig-Germ Cell Paracrine Interactions. *Frontiers in Genetics* 13 (2022). <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.851719>

- R. M. White, A. Sessa. C. Burke, T. Bowman, J. LeBlanc, C. Ceol, C. Bourque, M. Dovey, W. Goessling, C. E. Burns, L. I. Zon. Transparent Adult Zebrafish as a Tool for In Vivo Transplantation Analysis. *Cell Stem Cell* 2 (2): 183-189 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.002>
- R. Yossa, P. K. Parker, E. Proulx, V. Saxena, M. Ekker, G. W. Vanderberg. A Practical Approach for Sexing Zebrafish, *Danio rerio*, *Journal of Applied Aquaculture* 25 (2): 148–153 (2013). <https://doi.org/10.1080/10454438.2013.79217>
- S. Hosseini, N., H. Simianer, C. Falker-Gieske, B. Brenig, A. Franke, G. Hörstgen-Schwark, J. Tetens, S. Herzog & A. R. Sharifi. Genetic mechanism underlying sexual plasticity and its association with colour patterning in zebrafish (*Danio rerio*), *BMC genomics* 20 (341) (2019).
- Szabó Olivér Máté, Ivar-specifikusan expresszálódnó transzgén bevitele átlátszó zebradánióba korai szelekciós eljárással, TDK dolgozat (2022)
- W. C. Liew, L. Orbán. Zebrafish sex: A complicated affair, *Briefings in Functional Genomics* 13 (2): 172-187 (2014). *Genomics*, 13(2), 172–187. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elt041>
- W. C. Liew, R. Bartfai, Z. Lim, R. Sreenivasan, K. R. Siegfried, L. Orbán. Polygenic Sex Determination System in Zebrafish, *PLoS ONE* 7(4): e34397 (2012).
- Y. Nakamura, Y. Yamamoto, T. Mushika, T. Ono, A. R. Setioko, K. Takeda, K. Nirasawa, H. Kagami. Migration and Proliferation of Primordial Germ Cells in the Early Chicken Embryo, *Poultry Science* 86 (10): 2182-2193 (2007). <https://doi.org/10.1093/ps/86.10.2182>