

A Bowen-Conradi szindróma zebradánió betegségmodelljének jellemezése

Készítette:

**Botyánszki-Farkas Helga
Hajnalka**

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Biológus MSc III. évfolyam

Témavezető

Dr. Varga Máté

egyetemi docens

Genetika tanszék



Tartalom

Rövidítés jegyzék	3
Összefoglaló	4
Bevezető	4
Célkitűzés.....	8
Anyag és módszer	8
<i>In situ</i> hibridizáció.....	8
Akridin narancs festés	9
Alciánkék festés	9
Eredmények.....	10
Az <i>emgl</i> homozigóta mutáns állatok fenotípusa.....	10
Diskusszió	14
Szerzői hozzájárulás.....	15
Irodalom.....	16

Rövidítés jegyzék

- BCS- Bowen-Conradi szindróma
- BrdU – Bromodeoxyuridine
- bp-bázispár
- DIG-digoxigenin
- DNS-dezoxiribonukleinsav
- dpf- Megtermékenyítés utáni napok
- E3- „Embryo medium”
- EtOH-ethanol
- gata1- GATA kötő fehérje 1
- LMP- „Low Melting Point” agaróz
- mRNS – hírvivő RNS
- NOP14 – nukleoláris fehérje 14 (Nucleolar Protein 14)
- OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man adatbázis
- PBST- foszfáttal pufferolt sóoldat + Tween20
- PFA-paraformaldehid
- PTU- 1-fenil-2-tioureát, tirozináz-inhibitor molekula
- rag1-„recombination activating gene”
- RNS – ribonukleinsav
- rRNS – riboszomális RNS
- snoRNS – kis sejtmagvacskai (small nucleolar) RNS
- Tp53 - tumor protein 53
- try-trypszin

Összefoglaló

Az *EMG1* (*Essential for Mitotic Growth 1*) gén kódolt metiltranszferáz enzim fontos szerepet tölt be a 18S rRNS 1248-as pozíciójában található uridin hipermodifikációjában és ezáltal a riboszómák kis alegységének összeszerelésében.

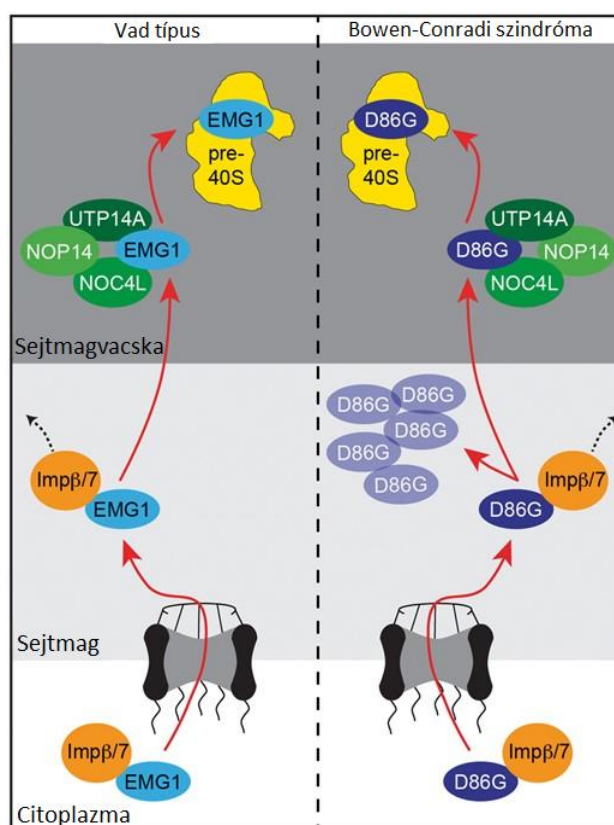
Az *EMG1* humán ortológjának c.257A>G pontmutációja a Bowen-Conradi szindrómát (BCS) eredményez, ami egy olyan autoszómális, recesszív betegség mely súlyos idegrendszeri rendellenességekkel jár. Jellemző még a betegségre a növekedési retardáció, ízületi fejlődési rendellenesség, mikrocefália és mikrognathia. A betegségben szenvedők átlag életkora 13 hónap, bár regisztráltak egy olyan esetet, ahol az érintett 10 évig élt. Ez a betegség az amerikai hutterita törzsben elterjedt, ahol minden 355. gyerek ezzel a betegséggel születik.

Az *EMG1*-nek megtalálható az ortológja az orvosbiológiai kutatások kedvelt modelljének, a zebradániának (*Danio rerio*) a genomjában is. Ezt kihasználva, az ELTE Genetikai Tanszékén folytatott TDK munkám keretén belül létrehoztam és jellemeztem a BCS zebradánió betegségmodelljét. Munkám során az *emg1* funkcióvesztés hatására bekövetkező fenotípusos és transzkriptom-szintű elváltozásokat összevettem a laborunk által már korábban létrehozott, a sejtek pszeudouridilációjához kiemelten fontos dyskerin enzimet nélkülöző *dkc1* mutánsokban tapasztaltakkal is.

Bevezető

Az *EMG1* (*Essential for Mitotic Growth 1*) gén kódolta metiltranszferáz fontos szerepet tölt be a 18S rRNS 1248-as pozíciójában lévő uridin hipermodifikációjában és a riboszómák kis alegységének összeszerelésében. A diszkerin-komplex előbb az említett pozícióban fellelhető uridint pszeudouridinné izomerizálja az sn35 H/ACA-box snoRNS irányításával, majd az így keletkező pszeudouridin a szubsztrátja lehet az *EMG1* fehérje által katalizált metilációs reakciónak. Az így keletkező N1-metilpszeudouridinből a *TSR3* (*Twenty S rRNA accumulation 3*) kódolta amino-karboxipropil transzferáz segítségével alakul ki a hipermodifikált N1-metil-N3-aminokarboxipropil-pszeudouridin-t (m1acp3Ψ). Az *EMG1* gén c.257A>G pontmutációja (referencia szekvencia NM_006331.7) a Bowen-Conradi szindrómát (BCS, OMIM 211180) eredményezi. A mutáció hatására az *EMG1* 86-os pozíciójában lévő aszparagin glicinre cserélődik (D86G), amely következtében nem tud kialakulni egy sóhíd a 84-es pozícióban levő argininnel. Ennek következtében a fehérje szerkezete kevésbé stabil, viszont ennek a destabilizációnak még nem ismertek a pontos hatásai.

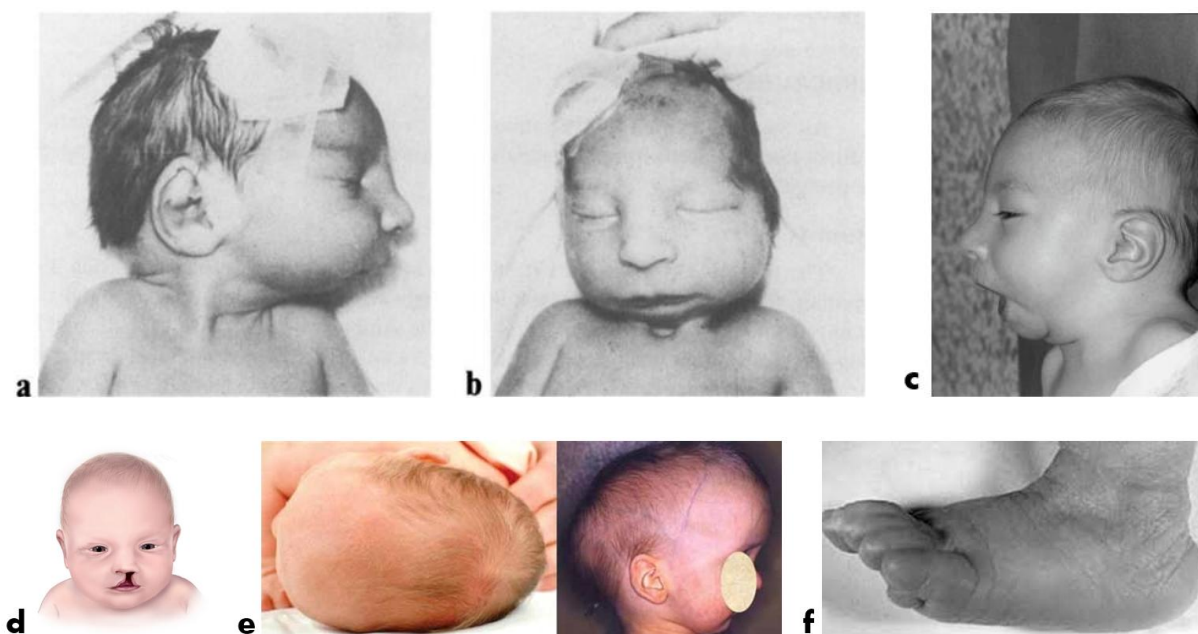
Normál esetben az EMG1 specifikusan importálódik a citoplazmából sejtmagba az Imp β /7 vagy Imp β /7 heterodimerek segítségével. Ezt követően a sejtmagvacskában az EMG1 kölcsönhatásba lép a NOP14, NOC4L és az UTP14A fehérjékkel és ez lehetővé teszi az RNS-metiltranszferáz számára, hogy betöltse szerepét a kis alegység biogenezisében is (Liu és Thiele 2001). Az EMG1^{D86G} mutáns fehérjék esetében az Imp β /7 heterodimer a kötődést követően megakadályozza a hibás fehérjék nem specifikus aggregációját, ugyanakkor a sejtmagban felhalmozódnak a hibás fehérjék és így kevesebb fehérje tud csak a sejtmagvacskába jutni. Ez pedig végső soron a riboszómák kis alegységének érési hibájához vezet (Warda és mtsai. 2016).



1.ábra. Az EMG1 és az EMG1^{D86G} nukleáris importja.

A Bowen-Conradi szindróma recesszív autoszomális rendellenesség, amely a riboszomopátiás betegségek családját bővíti. Mivel a betegség a riboszómák kis alegységének összeszerelésének hibáját eredményezi, így súlyos fenotipikus tünetekkel jár. Ilyenek például a növekedési retardáció, ízületi fejlődési rendellenesség, mikrokefália (kis fej) és mikrognathia (kis állkapocs), dongalábak (Armistead és mtsai. 2015). Általában alacsony súllyal jönnek a világra az ilyen csecsemők és a tünetek súlyossága miatt táplálkozási nehézségeik is vannak, ezáltal lassan növekednek. A kis fej ellenére szokatlanul hosszú (dolichocefália) fej jellemzi őket, kiemelkedő magas felhúzott orr. („Bowen-Conradi Syndrome: MedlinePlus Genetics”, é. n.)

A fenti tünetek mellett a BCS idegrendszeri rendellenességekkel is jár, többek között mentális retardáció és pszichomotoros retardáció is megjelenik az érintett gyerekekben. Mindezen tünetek súlyossága miatt a várható átlag életkor is igen alacsony, csupán 13 hónap (az eddigi detektált maximális életkor 10 év volt). A betegség az amerikai hutterita populációban a legelterjedtebb, ahol 1/355 a kapcsolódó születési arány (Armistead és mtsai. 2015).



2.Ábra. BCS beteg gyerekek. A-C: mikrokefália figyelhető meg (Hunter és mtsai. 1979). D: nyúlszáj. E: hosszúkö fej. F: Donga láb (Kép forrás: MedlinePlus)

BCS-esben elhunyt betegektől vettek mintát, összevetették korban hozzájuk illő betegek bonctani szövetmintájával, a mintákat a bordacsontvelőből, a farkosmagból (nucleus caudatus) és a kisagyból vették, ezeket a metszeteket Ki67 immunfestékekkel festették. A vizsgálat eredményeképpen azt figyelték meg hogy a BCS-es betegek mintáiban jelentősen kisebb mértékben volt megfigyelhető a Ki67 expressziója, ami a sejtproliferáció csökkenésére utal. (Armistead és mtsai. 2015).

A BCS tanulmányozására már korábban is készültek állatmodellek, például egérben (Armistead és mtsai. 2015). Az egér kísérletek során a heterozigóta egyedek normális fenotípust mutattak míg null mutáns társaik növekedése leállt E2,5-E3,5 embrionális napok között, így eltávolították a *Trp53*-mas ellenőrző pontot, ezáltal gátolva a p53 tumorfehérjét, de a BCS esetében ez nem mentette meg a homozigóta embriókat, viszont így bebizonyosodott, hogy nem a *Trp53*-mas útvonal közvetíti a BCS esetében a hibát (Armistead és mtsai. 2015). Így létre

hoztak egy D86G homozigóta mutáns vonalat ahol az utódok 33,8% vad és 66,2% heterozigóta volt, ami arra utal, hogy a mutáció homozigóta állapotban letális (Armistead és mtsai. 2015). Ezeken az egér modelleken, azt figyelték meg, hogy a homozigóta embriók a terhességi korhoz képest meglehetősen kicsik, neurális fejlődési rendellenességeik voltak és E8,5 és E12,5 között elpusztultak. Ezeknek az elpusztult egyedeknek a felboncolt agyszöveti és csontvelő mintájukban is kimutatható volt a nagymértékű csökkent sejtproliferáció, fibroblasztjaikban a binukleált sejtek nagy aránya volt észlelhető, amiből arra lehet következtetni hogy a növekedés leállása mögött a mitózis meghibásodása állhat, ami egy újabb bizonyíték annak az elméletnek az alátámasztására, hogy a riboszóma biogenezis, a mitotikus progresszió és az agyfejlődés között kapcsolat van (Armistead és mtsai. 2015).

A vizsgálatok során az *Emg1^{G/G}* mutáns embrióknál gyakran figyeltek meg két sejtmagot, amely mitotikus progressziós hibára utal, amely magyarázhatja a sejtproliferációs késedelmet. A boncolt egyedek agymintájában továbbá elváltozások voltak megfigyelhetőek a neuroepitéliumban, és ezek az anomáliák az agy teljes területét érintették. A homozigóta embrióknál 1 napos lemaradás volt megfigyelhető a növekedésükben, és idegrendszeri rendellenességeket mutattak. Mivel a riboszóma biogenezis rendellenességei gyakran társulnak vérképzési rendellenességekkel ezért a mutáns embriók szívét vizsgálták E9,5 és E12,5 napos kor között, az embriók szíve ebben az időszakban még dobogott, ebben az időszakban az elhalás hátterében a sárgatestben lévő vérkeringés beindulásának, fenntartásának zavara, vagy a placenta kialakulásának hibája állhat (Armistead és mtsai. 2015). Az embriók sárgatestjének vizsgálata során vérszigeteket figyeltek meg a sárgatestben. A placenta eleinte normálisnak tűnt viszont E11,5 és E12,5 között a placenta labirintusai kevésbé kiterjedtek voltak és kevesebb magzati vörösvértestet tartalmaztak, mint a kontrollok. Ezekben a mutáns embriókban a sejtproliferáció csökkenése mellett megfigyelhető volt a fokozott apoptózis is. Ennek vizsgálatára vemhes egerekbe Bromodeoxyuridine (BrdU) injektáltak E7,5 és E9,5 napos kor között, ennek eredményeképpen a kontroll embriók a sejtek többségében erős festődést mutattak viszont a mutáns embrióknál almon belül is eltérő jelerősség volt megfigyelhető: voltak egyedek, ahol szintén erős festődést tapasztaltak, mások esetében csak csökkent mértékben lehetett azt kimutatni, de voltak egyedek, amelyekből szinte teljesen hiányzott a BrdU jel. Az apoptózis vizsgálata során a BCS-es embriókban nem csak ott volt megfigyelhető apoptózis, ahol a fejlődés során egyébként is várható, hanem más területeken is és a normális szintnél lényegesen magasabb arányban (Armistead és mtsai. 2015).

Melanomából származó sejtvonalak esetén megfigyelték, hogy az *EMG1* expressiója szignifikánsan kisebb volt a normál sejtekhez képest, illetve különböző stádiumú rákos betegek *EMG1* expressziós szintjének vizsgálata során, megfigyelték, hogy az I + II. és a III + IV. stádiumú betegek csoportjai között nem volt szignifikáns különbség, viszont az expressziós szint jelentősen lecsökkent az áttétes betegek esetében. A vizsgálatok során kimutatták, hogy az *EMG1* a melanoma progresszójában negatívan szabályozódik, továbbá ektopikus kifejezése gátolja a proliferációt, a migrációt és az inváziót (Li és mtsai. 2020).

Az utóbbi időben egyre nagyobb népszerűségnek örvendő zebradánióban korábban még nem írták le a betegség modelljét. Mivel az *EMG1* génnek megtalálható az egyértelmű ortológia a zebradánió genomában is, ezért a betegség modellezésére ideális modellállatnak lehet ez a faj is.

Célkitűzés

Az ELTE Genetikai Tanszékén végzett kutatásaim célja volt, hogy létrehozzam a Bowen-Conradi szindróma betegség modelljét zebradániókban, illetve ennek az új vonalnak a jellemzése. Utóbbi keretében terveim közt szerepel a gén meghibásodásának következtében fellépő funkcióvesztés hatására bekövetkező fenotipikus, és a transzkriptom-szintű elváltozások karakterizálása. E mellett az eredményeimet össze tudom vetni a laborunkban már korábban létrehozott a sejtek pseudouridilációjában kiemelten fontos diszkerin enzimet nélkülöző *dkc1* mutánsok jellemzése során tapasztaltakkal is.

Anyag és módszer

In situ hibridizáció

Az *in situ* hibridizáció egy olyan módszer, amely segítségével átíródó géneket tudunk detektálni sejtekben vagy szövetekben. A módszer során egy kis méretű (~500-1500 bp hosszú), *in vitro* előállított, kémiai, vagy fizikailag megjelölt RNS molekulát használnak próbaként, amely komplementere a vizsgálni kívánt génről átíródó mRNS szekvenciájának. A munkám során mi digoxigeninnel (DIG) jelölt próbákat állítottunk elő és használtunk fel.

Az *in situ* hibridizációs próbák segítségével összehasonlítást végeztem a már meglévő *dkc1*-es mutációt hordozó törzs elemzéséből származó adatain és az *emg1*-es vonalakon. A kísérlethez 5 napos korban fixált embriókat használtam. Az embriók heterozigóta szülők

keresztezéséből származtak és kontrollnak az egészséges testvéreiket használtuk. A következő próbákat végeztem el: *trypsin* (*try*), *gata1* és *rag1*. A *trypsin* a hasnyálmirigyben mutat festődést (Biemar és mtsai. 2001), a *gata1* a vérképző rendszerben és érrendszerben expresszálódik (Stainier és mtsai. 1995) míg a *rag1* a tímuszban (Willett és mtsai. 1997).

Akridin narancs festés

Az akridin narancs festés egy viszonylag gyakori festési eljárás az apoptózis vizsgálatára. Ezt a festési eljárást használtuk mi is az apoptózis vizsgálatunkhoz (Hayashi, Sofuni, és Ishidate 1983). A vizsgálat során 36 órás embriókat használtunk, az embriók heterozigóta szülőktől származó mutáns és egészséges kontroll társaikon végeztük el. Az embriókat PTU(1-fenil-2-tiourea) 0,2 mM-os koncentrációjú E3 oldatba helyeztük. Ezzel a halak pigmentációját gátoltuk meg mivel a PTU egy tirozináz inhibitor. A festés előtt az embriókat dechorionáltuk, majd lemértük a petrik súlyát, hogy meghatározhassuk melyik petrihez mennyi akridin-narancsra van szükség. A petrikhez 5 µg/ml koncentrációban adtunk akridin-narancsot, ezt követően 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk őket alumínium fóliába csomagolva őket, hiszen az akridin-narancs egy fényérzékeny vegyület. Majd 3-szor át öblítettük őket E3-mal és végül 500-500 µl 40%-os Tricain-t adtunk a petrikhez, ezáltal elaltattuk az embriókat. Végül tárgylemezen beágyaztuk őket LMP agaróz segítségével. A beágyazott embriókat egy Zeiss SteREO Lumar.V12 mikroszkóppal fotóztuk 10x-es nagyítással.

Alciánkék festés

Az alciánkék egy kiváló festőanyag amely savas oldatban a zebrahalak porcait festi meg (Beler és mtsai. 2024), ezáltal lehetővé tette számunkra a halak állkapocs porcának vizsgálatát. A kísérlethez heterozigóta szülők keresztezéséből származó 5 dpf embriókat használtunk. Az embriókat 1 napos korban PTU-val kezeltem, hogy megakadályozzam a pigmentációjukat majd az embriókat 5 dpf korig neveltem. Amikor az embriók 5 naposak voltak eppendorf csövekbe válogattam őket és 4%-os PFA-be (paraformaldehid) helyeztem őket és 1 éjszakára 4 fokos hűtőszekrénybe tettem. Másnap az embriókról leszívtam a PFA-et és egy 5 perces PBST mosást követően 100%-os metanolba helyeztem az embriókat. Ezt követően az embriókat 1 éjszakára -20 fokos hűtőbe helyeztem.

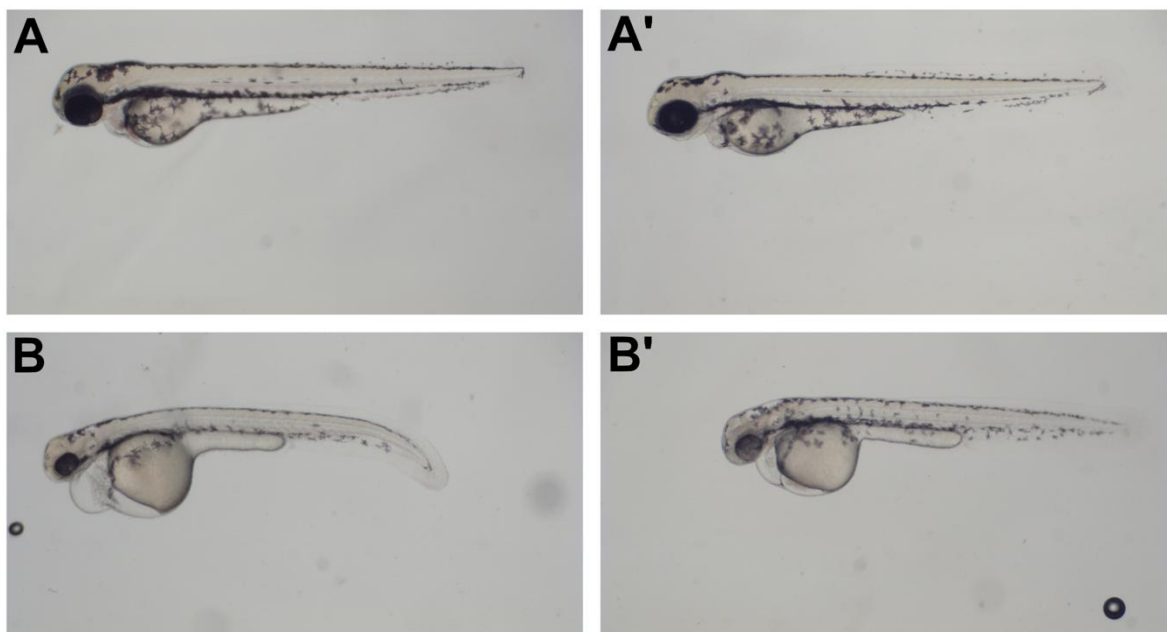
Az alciánkék festéshez először egy törzs oldatot készítettem 70% ethanol, 20% ecetsav és 10% H₂O felhasználásával, ahol 100%-os EtOH és 100%-os ecetsavat használtam. Az így létre jövő törzsoldatban 5x-ére hígítottam ki az alciánkéket majd az így kapott oldatba helyeztem az embriókat. 30 percre. Ezt követően a festés leállításához 70%-os EtOH-ba helyeztem az embriókat és 5 percig mostam benne őket, ezt a mosást egy 1%KOH+20% Tween20 mosás követte 10 percig ami azért szükséges hogy a szöveteket fellazítja és ezáltal segít átjárhatóvá tenni a szöveteket a glicerollnak. Majd az embriókat 50%, 75% és végül 90%-os glicerollba helyeztük.

Eredmények

Az *emg1* homozigóta mutáns állatok fenotípusa

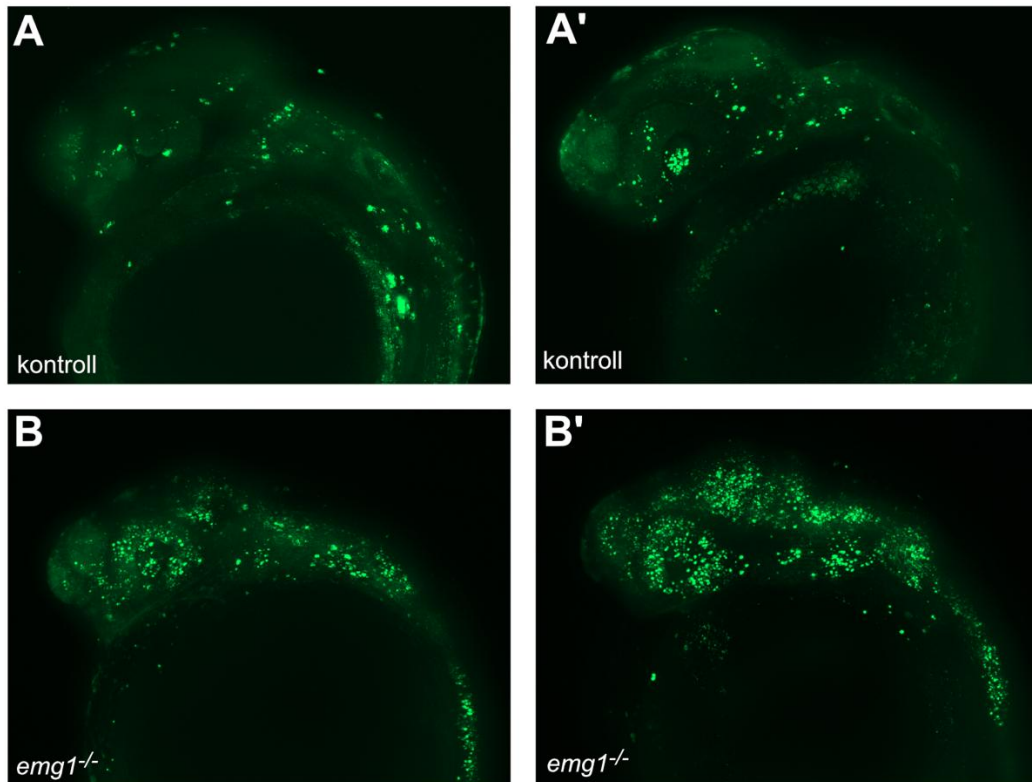
A munkámhoz használt *emg1^{elu23}* allélt még korábban létrehozták a csoportunkban és egy kereteltolódást okozó c.533delTACCinsAGA mutációt tartalmaz, ami korai stop kodon kialakulását eredményezi a gén harmadik exonjában.

Az *emg1* mutációt hordozó halak már 36 órás korban (dpf) elkülöníthetők egészséges társaiktól, viszont itt a fejlődési elmaradottság még csak kis mértékben látható szabad szemmel. A fenotípus fokozatosan egyre erősebb lesz és 3 napos korban (dpf) már kifejezetten erőteljes (3. ábra). Jól látható, hogy a mutációra homozigóta egyedeknek pigmentációja lényegesen elmarad heterozigóta egészséges társaiktól, ami a melanociták lassabb vándorlásának köszönhető. Továbbá azt is megfigyelhetjük, hogy a fej és szem mérete is lényegesen kisebb a mutánsokban, mint vad fenotípusú társaikban.



3.ábra: Az *emgl* funkcióvesztés hatására kialakuló fenotípus. A felső sorban *emgl* heterozigóták keresztezéséből származó vad fenotípusú halak láthatóak, az alsó sorban pedig *emgl* homozigóta mutánsok. (Kor 3 nap)

Mivel a fejlődés során számos esetben olyan jeleket (pl. egyes agyi területek sötét elszíneződése) véltünk felfedezni, amelyek aktív sejthalálra utalnak, hogy a mutánsokban, szerettem volna megvizsgálni, hogy valóban megnövekszik-e az apoptózis az *emgl* funkcióvesztés hatására. A programozott sejthalálon áteső sejteket akridin-narancs festéssel jelöltem. Jól megfigyelhető, hogy míg a 36 órás vad fenotípusú halak fejében csak alig fordul elő apoptózis (4. ábra A, A'), az *emgl* mutációra homozigóta embriók (4. ábra B, B') esetében a szemben és az agyban kifejezetten megemelkedik a programozott sejthalál.



4.Ábra. Apoptózis vizsgálata akridin-narancs festéssel 36 órás zebradánió embriókban. A kontroll egyedekben (A, A') viszonylag kis mennyiségű apoptotikus sejt fedezhető fel, a homozigóta mutánsokban (B, B') azonban megnő a számuk.

Mivel csoportunk korábbi munkája (Balogh és mtsai. 2020) azt mutatta, hogy a *dkc1* működésképtelensége esetében a legtöbb szerv differenciációja megakad, a továbbiakban azt is meg akartam vizsgálni, hogy az *emg1* hiányának van-e hasonló hatása.

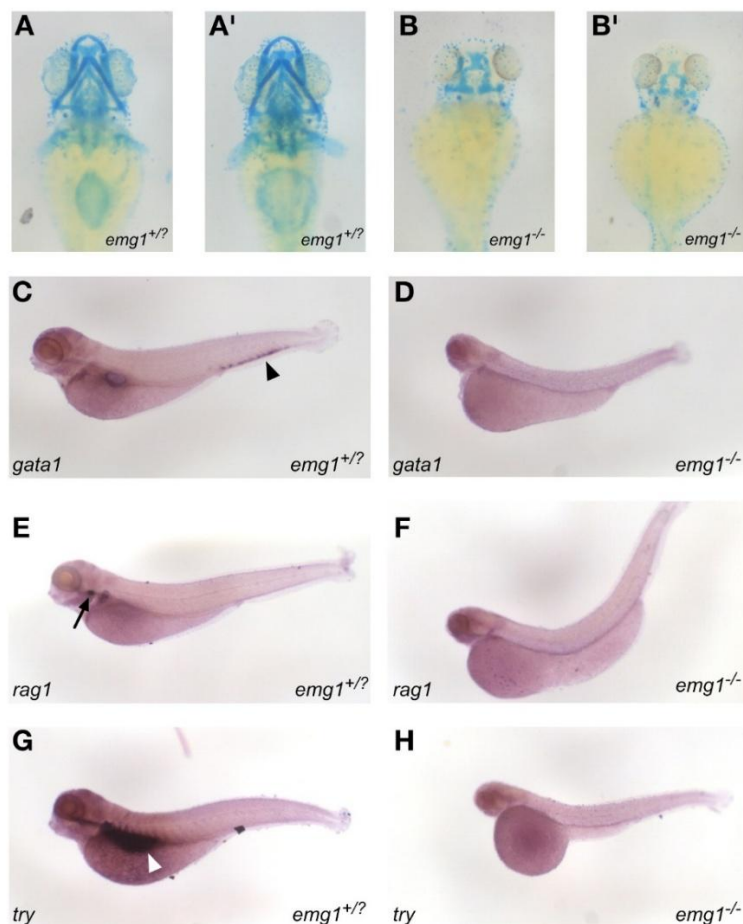
Az állkapocs fejlődésének jellemzésére alciánkék festést alkalmaztam, ami segítségével jól követhető a néhány napos állatok állkapcsának porcosodása. Az eredményeim azt mutatják, hogy a mutációra homozigóta *emg1* mutáns zebradánió embriók állkapcsa lényegesen elmarad fejlődésben a kontroll egyedekétől (5. ábra A-B').

Tovább boncolva a szöveti differenciáció kérdését, *in situ* hibridizációs festés segítségével vizsgáltam meg olyan gének expresszióját, amelyek terminálisan differenciálódott szöveteket jelölnek. Először is a vérképző szervekben expresszáldó *gata1*-re specifikus markerrel végeztem el ezeket a vizsgálatokat. Ennek eredményeként megfigyelhettem, hogy az *emg1* mutánsokban a vérképzés drámai mértékben elmarad a kontroll állatoktól: 22/26 esetben semmilyen jelet nem láttam a mutáns embriókban, a maradék négy esetben pedig nagyon enyhe volt a jel, míg a kontroll embrióknál 15/15 arányban erős festődést tapasztaltam (5. ábra C,D).

Az immunrendszer fejlődéséről is szerettem volna képet kapni, ezért készítettem a *recombination activating gene 1 (rag1)* génre specifikus *in situ* hibridizációs próbát, amely egészséges embriókba a tímuszban expresszálódik. A tímusz vizsgálata során is azt tapasztaltam, hogy amíg a kontroll embriókban erős festődés tapasztalható (15/15), addig az *emg1^{-/-}* embriók esetében semmilyen jelet nem tudtunk megfigyelni (12/12) (5. ábra E, F).

Végül a hasnyálmirigy differenciációjának vizsgálatára a *trypsin (try)* gént használtam, amely szintén hasonló eredményeiket mutatott (5. ábra G,H): a kontroll embrióknál a jel igen erős festődést mutatott (16/16 egyedben) míg az *emg1^{-/-}* embriók esetében vagy egyáltalán nem volt detektálható jel (2/12), vagy csak nagyon enyhe festődés volt látható (10/12).

Ezek a megfigyeléseim együttesen azt támasztják alá, hogy hasonlóan a korábban *dkc1* mutánsokban tapasztaltakkal (Balogh és mtsai. 2020) a szöveti differenciáció általános gátlása valósul meg a homozigóta *emg1* mutánsokban.



5.Ábra. A szöveti differenciáció általános hibája figyelhető meg az *emg1* mutánsokban A-A': vad típusú embriók alciánkék festés (5 dpf). B-B': homozigóta mutáns embriók alciánkék festés (5 dpf). C-D: A vérképzést jelölő *gata1*, kifejeződése kontroll (C) és homozigóta mutáns (D) egyedekben. E-F: Tímusz-specifikus *rag1* expressziója kontroll (E) és *emg1^{-/-}* (F) állatokban. G-H: Hasnyálmirigy jelölése *try* próbával - G: kontroll embrió. H: homozigóta mutáns embrió.

Diszkusszió

Eredményeim megerősítik azokat a korábbi irodalmi megfigyeléseket, amelyek alapján az EMG1 jelenléte elengedhetetlen a riboszómák biogeneziséhez és működéséhez. Hiányában nem csak a 18S rRNS 1248-as pozíciójában nem tud létrejönni a m¹acp3Ψ hipermodifikáció, de magának a 18S rRNS-nek az érése is elakad, ami súlyos riboszóma-diszfunkciót eredményez. Ezzel magyarázható, hogy az *emg1*^{-/-} embriók lényegesen lemaradnak a fejlődésben, ahogy azt az általam elvégzett alciánkék porcfestés eredménye is mutatja, amely alapján az állkapocs porcos elemeinek fejlődése súlyosan torzul. De ezt támasztják alá a kor előrehaladtával egyre hangsúlyosabb fenotípusban különbségek is, mint a kisebb fej méret, a szemek nem megfelelő fejlődése, a pigmentáció retardációja, és a görbült testtengely is.

Ezen fenotípusos jellegek egy része kísértetiesen emlékeztet a csoportunk által korábban jellemzett *dkc1* mutáns embriókban tapasztaltakra. Ugyanakkor a tüzetesebb összehasonlítás alapján azt is láthatjuk, hogy az *emg1*^{-/-} embriók szervi fejlődése néha akár erősebb is lehet: ez figyelhető meg például a hasnyálmirigy differenciálódásánál is, ahol a *dkc1*-es mutánsoknál minden esetben volt valamennyi *try* expresszió detektálható, míg az *emg1*-es mutánsok esetében ez teljesen eltűnt. A fenotípusos különbségek egyik lehetséges oka abban kereshető, hogy a *dkc1* expresszió esetében egy erős anyai komponens detektálható, míg az *emg1* transzkriptumok nincsenek jelen a petesejtekben.

Fontos azt is kiemelni, hogy az enzimatis funkcióján túl az EMG1 fontos alkotóeleme a riboszómák kis alegységét létrehozó processzómának. Így EMG1 hiányában a 18S rRNS-ek érése, illetve ezáltal a riboszóma összeszerelése is hibát szenved, ami hozzájárul a klasszikus riboszómopátiás tünetek megjelenéséhez (Dörner és mtsai. 2023).

Az EMG1 pontos funkciójának megértése, nemcsak a BCS miatt fontos, hanem mert a közelmúltban fontos kemoterápiás célpontként azonosították a vastagbélrák esetében. Számos betegnél a 18S rRNS-ben az 1248.U nukleotidnál specifikus egynukleotid-variációt azonosítottak, amely a vastagbélrákos betegek 45,9%-ában fordult elő. Sőt, későbbi elemzések azt is bizonyították, hogy ez a változat 22 további ráktípusban is azonosítható (Babaian és mtsai. 2020).

Szerzői hozzájárulás

- Beállítottam a mutáns emg1 allél detektálására alkalmas genotipizáló PCR paramétereit.
- Mutáns és kontroll embriókon elvégeztem a programozott sejthalál, azaz apoptózis detektálására alkalmas akridin narancs festést.
- Mutáns és kontroll embriókon alciánkék festést végeztem az állkapocs fejlődésének vizsgálatára.
- Elkészítettem a szöveti differenciációt vizsgáló kísérleteimhez szükséges antiszensz in situ hibridizációs próbákat és felhasználásukkal elvégeztem a *gatal*, *rag1* és *try* gének expressziójának vizsgálatát mutáns és kontroll embriókon.

Ezúton nyilatkozom, hogy TDK konferencián korábban nem értem el helyezést. Ha a jelen BTDK Konferencia előtt másik TDK konferencián helyezést érek el, arról a BTDK szervezőit még a konferencia előtt értesítem, a nyertes pályamunkát eljuttatom hozzájuk

Továbbá nyilatkozom, hogy a dolgozatom elkészítéséhez, nem használtam mesterséges intelligenciát.

Irodalom

Armistead, Joy, Nehal Patel, Xiaoli Wu, Richard Hemming, Biswajit Chowdhury, Gagandeep Singh Basra, Marc R. Del Bigio, Hao Ding, és Barbara Triggs-Raine. 2015. „Growth arrest in the ribosomopathy, Bowen–Conradi syndrome, is due to dramatically reduced cell proliferation and a defect in mitotic progression”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1852 (5): 1029–37. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.02.007>.

Babaian, Artem, Katharina Rothe, Dylan Girodat, Igor Minia, Sara Djondovic, Miha Milek, Sandra E. Spencer Miko, és mtsai. 2020. „Loss of m1acp3Ψ Ribosomal RNA Modification Is a Major Feature of Cancer”. *Cell Reports* 31 (5): 107611. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107611>.

Balogh, Eszter, Jennifer C. Chandler, Máté Varga, Mona Tahoun, Dóra K. Menyhárd, Gusztáv Schay, Tomas Goncalves, és mtsai. 2020. „Pseudouridylation defect due to DKC1 and NOP10 mutations causes nephrotic syndrome with cataracts, hearing impairment, and enterocolitis”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (26): 15137–47. <https://doi.org/10.1073/pnas.2002328117>.

Beler, Merih, İsmail Ünal, Derya Cansız, és Ebru Emekli-Alturfan. 2024. „Alcian Blue Staining for Chondrocranium Development in Zebrafish”. In *Teratogenicity Testing: Methods and Protocols*, szerkesztette Luís Félix, 447–57. New York, NY: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3625-1_27.

Biemar, F., F. Argenton, R. Schmidtke, S. Epperlein, B. Peers, és W. Driever. 2001. „Pancreas Development in Zebrafish: Early Dispersed Appearance of Endocrine Hormone Expressing Cells and Their Convergence to Form the Definitive Islet”. *Developmental Biology* 230 (2): 189–203. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.0103>.

„Bowen-Conradi Syndrome: MedlinePlus Genetics”. é. n. Elérés 2024. november 1. <https://medlineplus.gov/genetics/condition/bowen-conradi-syndrome/>.

Dörner, Kerstin, Chiara Ruggeri, Ivo Zemp, és Ulrike Kutay. 2023. „Ribosome Biogenesis Factors—from Names to Functions”. *The EMBO Journal* 42 (7): e112699. <https://doi.org/10.15252/emboj.2022112699>.

Hayashi, M., T. Sofuni, és M. Ishidate. 1983. „An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test”. *Mutation Research Letters* 120 (4): 241–47. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(83\)90096-9](https://doi.org/10.1016/0165-7992(83)90096-9).

Hunter, Alasdair G. W., Sarah J. Woerner, Lucy D. C. Montalvo-Hicks, S. Beatrice Fowlow, Robert H. A. Haslam, Peter J. Metcalf, R. Brian Lowry, és John M. Optiz. 1979. „The Bowen-Conradi Syndrome—a Highly Lethal Autosomal Recessive Syndrome of Microcephaly, Micrognathia, Low Birth Weight, and Joint Deformities”. *American Journal of Medical Genetics* 3 (3): 269–79. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320030305>.

Li, Jingrong, Rui Zhao, Yunlong Guo, és Ruihua Fang. 2020. „EMG1 Interacts with NOP14 to Regulate the Growth, Migration, and Invasion of Melanoma Cells via the Wnt/ β -Catenin Pathway”. *Translational Cancer Research* 9 (5). <https://doi.org/10.21037/tcr.2020.03.79>.

Liu, Phillip C. C., és Dennis J. Thiele. 2001. „Novel Stress-responsive Genes EMG1 and NOP14 Encode Conserved, Interacting Proteins Required for 40S Ribosome Biogenesis”. *Molecular Biology of the Cell* 12 (11): 3644–57. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.11.3644>.

Stainier, D. Y., B. M. Weinstein, H. W. Detrich, L. I. Zon, és M. C. Fishman. 1995. „Cloche, an Early Acting Zebrafish Gene, Is Required by Both the Endothelial and Hematopoietic Lineages”. *Development (Cambridge, England)* 121 (10): 3141–50. <https://doi.org/10.1242/dev.121.10.3141>.

Warda, Ahmed S., Bernard Freytag, Sara Haag, Katherine E. Sloan, Dirk Görlich, és Markus T. Bohnsack. 2016. „Effects of the Bowen-Conradi syndrome mutation in EMG1 on its nuclear import, stability and nucleolar recruitment”. *Human Molecular Genetics* 25 (24): 5353–64. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw351>.

Willett, C. E., A. G. Zapata, N. Hopkins, és L. A. Steiner. 1997. „Expression of Zebrafish Rag Genes during Early Development Identifies the Thymus”. *Developmental Biology* 182 (2): 331–41. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.8446>.