

Az uracil-DNS-glikoziláz (Unga) funkcionális szerepe és genetikai vizsgálata mutáns zebradánió vonalakban

37. OTDK Biológia Szekció

Írta:

Huba Flóra Anna

Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Biológia Alapszak, 3. évfolyam

Témavezetők:

Latifa Kazzazy, doktorandusz
Dr. Varga Máté, egyetemi docens
ELTE TTK Genetikai Tanszék



Budapest, 2024

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK	1
RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	2
ÖSSZEFOGLALÓ	3
BEVEZETÉS	4
CÉLKITŰZÉSEK	8
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	9
<i>Az új mutáns zebradánio törzsek létrehozása</i>	9
<i>Halak gondozása és ívatása</i>	9
<i>Fertilitás vizsgálat</i>	10
<i>Embriók fixálása</i>	10
<i>Kvantitatív PCR (qPCR) reakciók</i>	10
<i>Diepoxibután (DEB) kezelés</i>	11
<i>Mikroszkópos vizsgálatok</i>	11
<i>Nagy molekulású genomi DNS izolálása</i>	11
<i>Dot blot eljárás genomi uracil mennyiség vizsgálatára</i>	12
EREDMÉNYEK	13
<i>Mutánsok jellemzése</i>	13
<i>Fertilitási vizsgálat</i>	13
<i>In silico génexpressziós analízis zebradánio herékben</i>	14
<i>Genomi kompenzáció vizsgálata kvantitatív PCR segítségével</i>	15
<i>Diepoxibután kezelés hatásának vizsgálata</i>	17
<i>Dot blot analízis a DNS-ben található uracil mennyiségének vizsgálatára</i>	18
DISZKUSSZIÓ	20
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	22
IRODALOMJEGYZÉK	23

Rövidítésjegyzék

AID: aktiváció-indukált dezamináz

BER: bázis kivágásos javítás (base excision repair)

DEB: diepoxibután

DNS: dezoxiribonukleinsav

dpf: napos (days post fertilization)

dTTP: deoxitimidin-trifoszfát

dUTP: deoxiuracil-trifoszfát

hpf: órás (hours post fertilization)

LMP: alacsony olvadáspontú agaróz (low melting point agarose)

MTZ: anyai-zigotikus átmenet

PCR: polimerizációs láncreakció (polymerase chain reaction)

RNS: ribonukleinsav

SMUG1: egy-szál specifikus monofunkcionális uracil-DNS-glikoziláz (Single-strand-selective Monofunctional Uracil-DNA Glycosylase)

UDG: uracil-DNS-glikoziláz

UNG: uracil-DNS-N-glikoziláz

ZGA: zigotikus genom aktivációja

Összefoglaló

Az öröklődés szempontjából kulcsfontosságú DNS molekulák a hagyományos szemlélet szerint négy fő (kanonikus) bázist tartalmaznak: adenint, citozint, guanint és timint. Azonban az elmúlt évek kutatásai rávilágítottak arra, hogy a DNS-ben más, „nem-kanonikus” bázisok, például az uracil is megjelenhet. A gerincesek genomjában az uracil főként átmeneti hibaként jelentkezhet, amely kialakulását vagy (1) a DNS-polimerázok által történő hibás dUTP beépítés, vagy (2) a citozin dezaminációja okozhatja.

Mivel az uracil jelenléte potenciálisan mutagén hatású és ezáltal veszélyezteti a sejtek genetikai stabilitását, az uracil DNS-ből való eltávolítására hibajavító mechanizmusok evolválódtak. Az egyik legfontosabb ilyen mechanizmus a bázis kivágásos javítás (Base Excision Repair – BER), amely során az uracil-DNS-glikoziláz (UDG) enzimek eltávolítják az uracilt a DNS-ből. A gerincesek egyik fő UDG-je az UNG2 enzim, amelynek ortológja (*Unga*) megtalálható a csoportunk által modellként használt zebradánió (*Danio rerio*) genomjában is.

A kutatásom célja az *Unga* és *Smug1* enzimek működési zavaraiából eredő hosszú távú fejlődési és genomikai következményeinek feltárása mutáns zebradánió törzsek felhasználásával. Ehhez CRISPR/Cas9 technológiával létrehozott génkiütéses *unga*^{-/-} és *smug1*^{-/-} zebradánió vonalakat használtam, amelyek segítségével feltérképezem az uracil eltávolításának elmaradása által kiváltott hatásokat a genom stabilitására, valamint a termékenységre és a DNS-javítási folyamatokra.

Kutatásunk során először hoztunk létre és jellemeztünk életképes *unga*^{-/-} és *smug1*^{-/-} mutáns zebradániókat. Eredményeink azt mutatják, hogy az *Unga*-hiány jelentős mértékben csökkenti a hím egyedek termékenységét, és rontja a DNS-javítási folyamatok hatékonyságát bizonyos szövetekben. A genomi uracil dinamikájának vizsgálata során megállapítottuk, hogy míg a vad típusú egyedek DNS-ében az uracil szintje csökken a zigótikus genom aktivációt követően, az *unga*^{-/-} mutánsok DNS-ében az uracil a fejlődés későbbi szakaszaiban is jelen marad. Eredményeink új megvilágításba helyezik az *Unga* és *Smug1* enzimek szerepét a DNS stabilitásának fenntartásában és a normál fiziológiai folyamatokban.

Bevezetés

A DNS-t a hagyományos személet szerint 4 bázis alkotja: timin, adenin, citozin és guanin. Ugyanakkor ez a szemlélet leegyszerűsíti a valóságot, hiszen több olyan esetről tudunk az élővilágban, ahol nem ez a négy bázis alkotja kizárólag a DNS-t, például bizonyos bakteriofágokról kiderült, hogy a DNS-ük uracilt tartalmaz timin helyett (Kiljunen és mtsai., 2005; Takahashi és Marmur, 1963). Az ilyen felfedezések megkérdőjelezzik a kanonikus bázisok kizárólagosságát a DNS-ben.

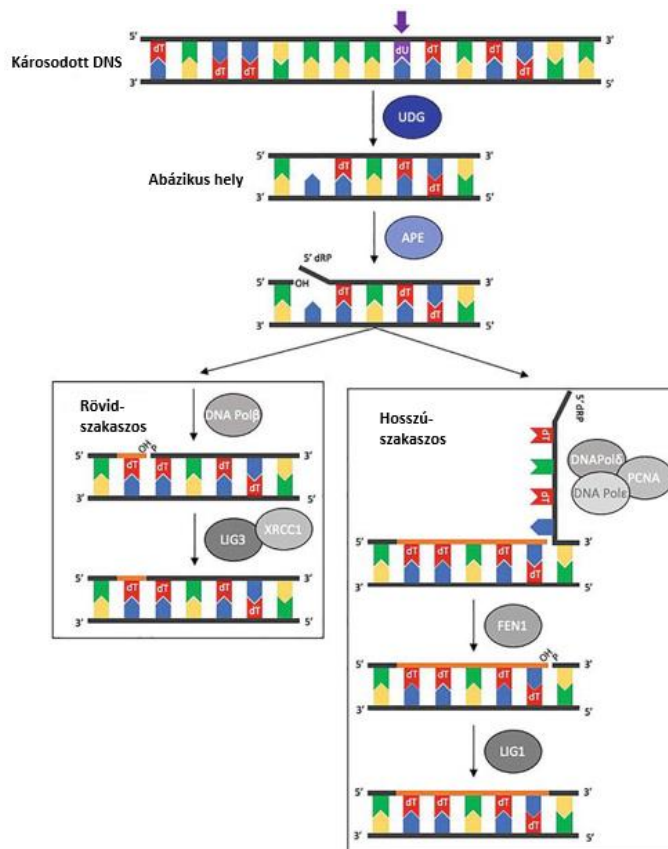
Az uracil az egyik olyan nem-kanonikus bázis, amely gyakoriságára a gerinces genomban az elmúlt évek kutatásai világítottak rá. Sokáig problémát okozott a kutatóknak a normál humán sejtek DNS-ében lévő uracil mennyiség pontos mérése, mivel erre alkalmas módszerek nem igazán léteztek. De egy megbízható módszert bemutató tanulmány szerint egy működő DNS javítási apparátussal rendelkező humán sejt genomjában 400-600 uracil található (Galashevskaya és mtsai., 2013).

Az uracil a DNS-be két ismert módon épülhet be. Az első lehetőség a citozin dezaminációjának folyamata, amely során a citozin spontán vagy kémiai behatások miatt elveszti az aminocsoportját, így uracillá alakul. Ennek a folyamatnak eredményeként U-G „mismatch”-ek jönnek létre a genomban, ami replikáció során mutációhoz vezethetnek, mivel az uracil adeninnel bázispárosodik, ahelyett hogy a guanninnal kötődne, ami eredetileg a citozin párja lenne. Így G → A tranzíciók jönnek létre, ha a dezaminált citozint nem javítja ki a sejt. Mivel a citozin dezamináció egy nagyon gyakran lejátszódó spontán folyamat a sejtekben, így evolúciósan az a védekezőmechanizmus fejlődött ki, hogy a DNS nem tartalmaz uracilt, így a citozin dezaminációjának eredményeként keletkező U-G mismatch-nél tudja a DNS javító mechanizmus, hogy az uracil a hibás, kivágandó bázis.

A másik lehetséges oka az uracil jelenlétének a DNS-ben, a DNS-polimeráz hibás dUTP beépítése dTTP helyett. A legtöbb DNS-polimeráz nem tudja megkülönböztetni a timint és az uracilt, így ezek beépülésének aránya csak attól függ melyik vesz részt nagyobb eséllyel a reakcióban (Vértessy és Tóth, 2009). A reakció végbemenetelét pedig a szubsztrátkoncentrációk befolyásolják, vagyis, hogy dTTP-ből vagy dUTP-ből van több a sejtben a DNS-polimeráz közelében. Így a legtöbb sejt magas dTTP:dUTP arányt tart fel három fő enzimátikus útvonal segítségével (1. ábra): (1) *de novo* dTMP szintézis, (2) „kimentő” (salvage) dTMP bioszintézis, (3) dUTPáz enzim által katalizált dUTP hidrolízis dUMP + PPi-vé (Békési és mtsai., 2021).

kötésének hidrolízise után egy apirimidines/apurinos (AP) hely jön létre, amelyet az AP-endonukleázok (APE1, APE2) dolgoznak fel. Ezek az enzimek a cukor-foszfát láncot az abázikus hely 5' végén hasítják, törést hozva létre a DNS-ben. (Roberts és LaBonte, 2023)

A DNS-javítás két irányban is folytatódhat: rövid- vagy hosszú-szakaszos BER útján. Rövid-szakaszos BER esetén a DNS-polimeráz β (Pol β) az abázikus helyre illeszti a megfelelő nukleotidot, majd eltávolítja a felesleges dezoxiribóz-foszfátot (dRP) lizáz aktivitásával, majd a DNS-ligáz III (Lig3) és az XRCC1 ko-faktor végzi el a lánc lezárását. (Krokan és mtsai., 2014). Hosszú-szakaszos BER-ben a Pol δ , Pol β vagy Pol ϵ és a PCNA hosszabb DNS-szakaszt szintetizálnak az AP helytől, elmozdítva az alatta lévő nukleotidokat (beleértve az 5' dRP-t is). Az így képződött flap-et a flap endonukleáz 1 (FEN1) távolítja el, majd a DNS-ligáz 1 (Lig1) zárja le a láncot. A megvalósuló útvonal a DNS-polimerázok elérhetőségétől és poszt-transzkripció módosulásaitól függ. (Békési és mtsai., 2021; Roberts és LaBonte, 2023).



2. ábra: A rövid-szakaszos és hosszú-szakaszos BER DNS javítási útvonalak schematikus vázlata. A képen jelölt UDG enzimek általában az UNG és SMUG1 enzimek. (Ábra forrása: Z. Roberts és J. LaBonte, 2023.)

A gerincesek genomjában az uracil eltávolításáért főként két enzimes család felelős: az uracil-DNS-N-glikozilázok (UNG) és a Single-strand-selective Monofunctional Uracil-DNA Glycosylase (SMUG1). Ezek közül az UNG enzimek játsszák a domináns szerepet: humán sejtekben végzett kísérletek szerint az UNG végzi a genomi uracil kivágás több mint 90%-át (Chon és mtsai., 2019).

Az UNG evolúciós jelentőségét mutatja nagyfokú konzerváltsága: homológjai megtalálhatók a baktériumoktól kezdve az élesztőgombákon át egészen a gerincesekig. A zebradánió genomban két paralóg is található, amelyek közül a domináns *unga* gén által kódolt fehérje 70%-os szekvencia-azonosságot mutat a humán UNG2-vel, ami arra utal, hogy funkciója is nagymértékben konzervált. (GeneCards. n.d)

A második fő uracil-DNS-glikoziláz típus, a SMUG1, szintén fontos szereplője a BER hibajavító rendszernek, bár aktivitása elmarad az UNG-étől. A két enzimes család együttes működése biztosítja a hatékony uracil-eltávolítást a DNS-ből.

A genom stabilitásának fenntartásához tehát két párhuzamos mechanizmus összehangolt működése szükséges:

1. A sejt dUTP szintek alacsonyan tartása, ami megelőzi az uracil beépülését.
2. A már beépült uracil hatékony eltávolítása az UNG és SMUG enzimek által.

Ez a kettős védelmi rendszer biztosítja a DNS uracilmentességét, és ezáltal a genetikai információ pontos megőrzését.

Egyelőre kevés kutatás vizsgálta, hogy a magas genomi uracilszint milyen problémákat okoz a magasabb rendű élőlényekben. Az *ecetmuslica* genomjából hiányoznak az UNG ortológ gének, ezért úgy tűnik, hogy ezek az élőlények tolerálják a magas uracilszintet (Muha és mtsai., 2012). Ugyanakkor egy zebradániókban végzett kutatás során embrió halálozást figyeltek meg az *unga* expressziójának szintetikus, antiszensz morpholino oligomerekkel történő csökkentésekor (Wu és mtsai., 2014). Emberekben a B-limfociták aktivációjakor egy AID (activation-induced deaminase) nevezetű enzim által indukált szándékos citozin dezamináció okozza az uracil feldúsulását a genomban, ami az immunoglobulin molekulák érése során bekövetkező szomatikus hipermutációt segíti elő (Chen és Wang, 2014). Ugyanakkor az AID enzim fokozott aktivitását több ráktípusban is kimutatták, ami arra utal, hogy az uracil „kétélű kardként” hathat a sejtek működésében (Çakan és Gunaydin, 2022; Krokan és mtsai., 2014).

A BER útvonal funkcióvesztéséről több kutatás áll rendelkezésre. Ez az útvonal elsősorban a sejtlegzés során keletkező reaktív oxigénfajok (ROS) által okozott oxidatív károsodások és a sejtmérgek, például alkiláló ágensek által előidézett DNS-károsodások javításáért felelős. (Gunes és mtsai., 2015) A BER javító mechanizmus különösen fontos a gyorsan osztódó sejtekben, például az embrionális fejlődés és az ivarsejtek képzése során.

Kutatócsoportunk eddig nem publikált eredményei szerint az uracil jelenléte és feldúsulása a genomban a korai embriogenezis során, a BER útvonal (feltételezett) bekapcsolásával elősegítheti a kromatin fellazulását és ezen keresztül a zigotikus transzkripció bekapcsolását zebradánió embriókban. Feltételezhető, hogy az időzítés ez esetben nagyon fontos és ha máskor, például a felnőtt őssejtek osztódása során történik, akkor a kromatin dekondenzációja káros mellékhatásokkal járhat. Emellett az uracil felhalmozódásának mutagén hatása is jelentős lehet, ami befolyásolhatja a sejtek normális működését. Az is elképzelhető, hogy az UDG enzimek hiánya nemcsak az uracil eltávolítását akadályozza meg, hanem az egész BER útvonal működését is kompromittálja, ami más típusú DNS-károsodások javítását is nehezítheti.

Összességében az uracil magas szintű beépülése mind sejtszinten, mind egyed szintjén jelentős problémákat okozhat. A genetikai kód mutációi és a kromatin szerkezet változásai kihatnak a sejtek működésére és osztódási képességére, ami az élőlény szintjén fejlődési rendellenességekhez, a sejtmérgekkel szembeni csökkent ellenállóképességhez vagy akár terméketlenséghez is vezethet.

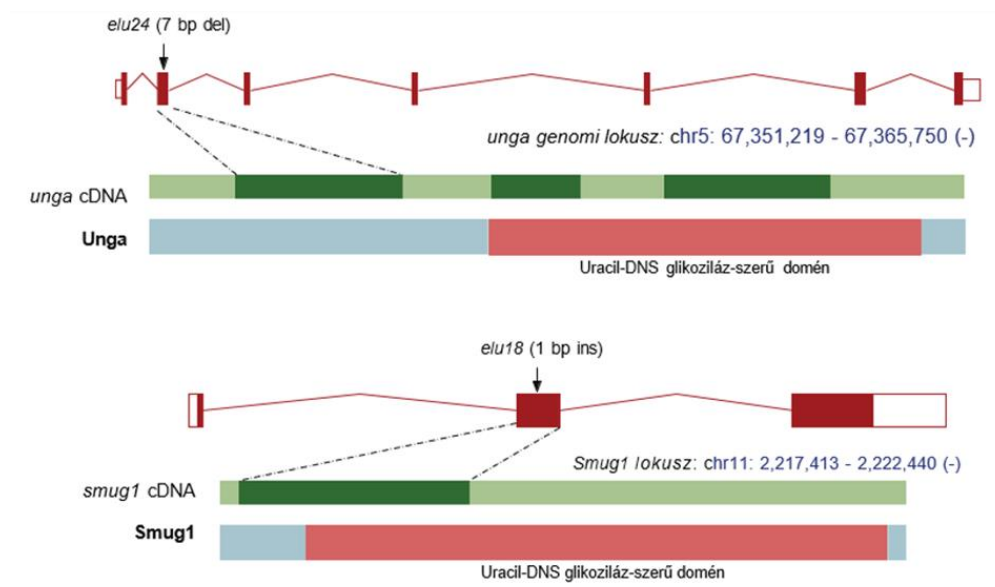
Célkitűzések

A kutatásom központi célja az uracil-DNS-glikozilázok (UDG) szerepének mélyebb megértése, különös tekintettel az *unga* és *smug1* gének DNS-javításban és biológiai funkciókban betöltött szerepére. Ezen célkitűzés érdekében CRISPR/Cas9 technológiával UDG-hiányos zebradániókat hoztunk létre, hogy a mutánsok és a vad típusú egyedek összehasonlításával tanulmányozhassuk a termékenységet, a DNS-hibajavítást és a genomi uracilszintek dinamikáját.

Anyagok és módszerek

Az új mutáns zebradánió törzsek létrehozása

A kutatásaim során két mutáns vonalat vizsgáltam: az *unga*^{elu24/elu24} (továbbiakban *unga*^{-/-}) és a *smug1*^{elu18/elu18} (továbbiakban *smug1*^{-/-}) mutánsokat (3. ábra). Az *unga* mutánsban a 24-es genomi helyen egy 7 bázispár hosszú delécia található, míg a *smug1* mutáns esetében a 18-as helyen egy bázispár beépülése (inzerció) történt. Ezek a változások kereteltolódási (ún. „frame-shift”) mutációkat okoznak, amelyek fontos fehérjedomének előtt helyezkednek el, ezáltal megakadályozzák a fehérje normális működését. A mutációk létrehozását a témavezetőm, Latifa Kazzazy, a CRISPR/Cas9 módszerrel (Kroll és mtsai., 2021) végezte. Az így létrejött P0 generációs mozaikos mutáns halakat vad típusú halakkal párosította, majd az F1 generációt genotipizálta, és a heterozigótákat egymással pároztatta. Az így keletkezett F2 generáció genotipizálása során munkámhoz a homozigóta egyedeket választottuk ki, akik a vizsgálataink alanyai lettek.



3. ábra: Az *unga* és *smug1* gének, valamint termékeik sematikus ábrázolása, illetve az egyes mutánsok létrehozásához targetált genomi régiók képe.

Halak gondozása és ívatása

Halvonalainkat az Eötvös Loránd Tudományegyetem Biológiai Intézetének állatházában tartjuk, szabványos körülmények között (Aleström és mtsai., 2020). Kísérleteink során vad típusú (AB), *unga* és *smug1* mutáns halakat használtunk. Minden kísérleti eljárást a Nemzeti

Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal hagyott jóvá (engedélyszámok: PE/EA/290-2/2018, PE/EA/2025-7/2017).

Az ívatáshoz a kísérletekhez felhasznált halakat hagyományos tenyésztő tartályokba helyeztük, és a sikeres párzás után az embriókat hálóval gyűjtöttük össze, majd E3 médiumot tartalmazó műanyag Petri-csészékben, 28,5 °C-on neveltük fel.

Fertilitás vizsgálat

Az általunk létrehozott *unga*^{-/-} és *unga*^{-/-}; *smug1*^{-/-} mutáns vonalak termékenységet keresztezési vizsgálatokkal teszteltük. A vizsgálatához egymással kereszteztünk *unga*^{-/-} egyedeket, valamint *unga*^{-/-}; *smug1*^{-/-} kettős mutánsokat, míg kontrollként vad típusú halakat ívattunk. Az embriókat a megtermékenyítés után 1 órával megszámoltuk, feljegyezve a megtermékenyített és megtermékenyítetlen embriók számát.

Embriók fixálása

A kívánt fejlődési stádiumú embriókat a Petri-csészéből Eppendorf-csövekbe pipettáztuk, majd leszívtuk róluk az embrió médiumot, majd a csöveket -80°C-os hűtőbe tettük (Nuairé) felhasználásig.

Kvantitatív PCR (qPCR) reakciók

a) RNS izolálás:

3 x 100 darab vad típusú és 3 x 100 darab *unga*^{-/-} genotípusú, 24 órás, fixált embrióból vontam ki teljes RNS-t TRIzol reagenssel (Zymo Research, 03312023) a gyártó előírása alapján.

b) cDNS szintézis:

A reverz transzkripciót a Maxima H Minus Reverse Transcriptase Kittel (ThermoFisher Scientific, 00903305) végeztem, 1 µg RNS-t használva és oligo(dT) primert alkalmazva, a gyártó protokollja szerint.

c) qPCR reakció:

A primerek tervezését a témavezetőm, Dr. Varga Máté, a Benchling weboldalon (<http://benchling.com>) végezte. Az anellációs hőmérsékletet a primerek olvadáspontja alapján, gradiens PCR-rel állítottam be (lásd 1. táblázat). A qPCR-t Maxima SYBR Green qPCR Master Mix-szel (ThermoFisher Scientific, 00903305) végeztem a gyártó protokollja szerint, és referencia génként az *ef1α*

gént használtam. A PCR programot a Roche LightCycler 96 szoftver segítségével terveztem meg, és a Roche LightCycler 96 gépben végeztem a reakciót.

Lépés	Hőmérséklet (°C)	Idő	Ciklusok száma
Kezdeti denaturáció	95	10 perc	1
Denaturáció	95	15 mp	40
Hibridizáció	58	30 mp	40
Elongáció	72	30 mp	40

1. táblázat: A kvantitatív PCR program paramétere

Diepoxibután (DEB) kezelés

Hat órával a megtermékenyítés után *unga*^{-/-} és vad típusú halakat 1,5 mg/ml koncentrációjú diepoxibutánnal (DEB) kezeltünk. 18 órával később PTU-t adtunk a halakhoz, hogy megakadályozzuk a pigmentációt (Chen és mtsai., 2021). 48 óránál az embriókat 5 µg/ml koncentrációjú akridin narancs-oldatban (Sigma, MKBS4724V) fél óráig festettük, háromszor embrió médiummal átmostuk őket, majd szemikonfokális mikroszkóppal készítettünk felvételeket.

Mikroszkópos vizsgálatok

A mikroszkópos vizsgálatokhoz a Tricainnel elaltatott, megfestett lárvákat 2%-os alacsony olvadáspontú agarózba (low melting point agarose – LMP) ágyaztam. Először szilikagéllel rögzítettem egy fedőlemezen egy erre a célra szolgáló műanyag gyűrűt, majd folyékony agarózt csepegtettem a körülzárt területre, és a vizsgálandó lárvákat sztereomikroszkóp segítségével pozicionáltam az agarózban. Miután az agaróz megszilárdult, a gyűrűt tárgylemezzel zártam le. Az elkészült preparátumokat Carl Zeiss szemi-konfokális mikroszkóppal vizsgáltam 488 nm-es fényhosszon.

Nagy molekulású genomi DNS izolálása

Teljes genomi DNS-t izoláltunk megtermékenyítés utáni 0, 2.5, 4.7, 11 és 24 órás *unga*^{-/-} halakból a High Salt protokoll alapján (Animal Genomics Laboratory, 2001). A mintákat RNáz A-val kezeltük (100 µg/ml végkoncentráció, ThermoFisher Scientific, 2903104) egy éjszakán át 37°C-on, hogy eltávolítsuk az RNS szennyeződést. Ezután fenol-kloroform-izoamilos (PanReac ApplicationChem, 3002412) tisztítást végeztünk a ThermoFisher Scientific javaslata alapján, majd a DNS-t etanollal csapattuk ki. A DNS minőségét gélelektroforézissel

ellenőriztük, majd a Qubit Fluorometric Quantification módszerrel mértük meg a minta DNS koncentrációját (Mardis és mtsai., 2017).

Dot blot eljárás genomi uracil mennyiség vizsgálatára

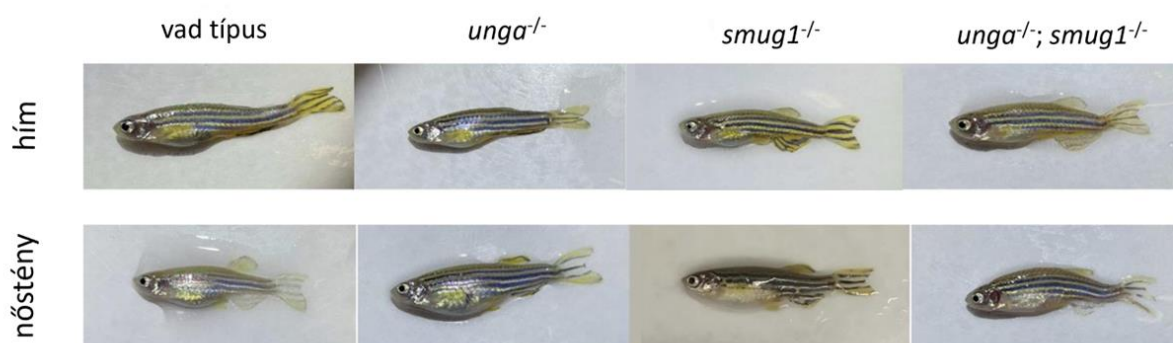
A dot blot eljárást a HUN-REN TTK Genom Metabolizmus munkatársával, Perey-Simon Viktóriával, Róna és munkatársai (2016) módszere szerint végeztük. A dolgozatban ismertetett, 2022-es kontroll mérésekhez egy új, még nem publikált uracil-szenzort, az UDG-X-et használtuk. A további adatokat a fent említett publikációban ismertetett 3x-FLAG- Δ UNG szenzorral mértük, ami a kutatócsoport kísérletei alapján specifikusabb a genomi uracilra, mint az UDG-X szenzor.

AI alkalmazása a dolgozat készítése közben

Ezúton nyilatkozom, hogy a felhasznált grafikonok kódjának hibakeresésében a ChatGPT segítségét kértem. Továbbá a bevezetés és az eredmények részben arra használtam, hogy ellenőrizsem a megfogalmazott szövegem stílusát és nyelvhelyességét. A ChatGPT ennek során nem módosította az általam írt szöveg tartalmát.

Eredmények

Mutánsok jellemzése



4. ábra: Vad típusú és mutáns zebradániók fenotípusa.

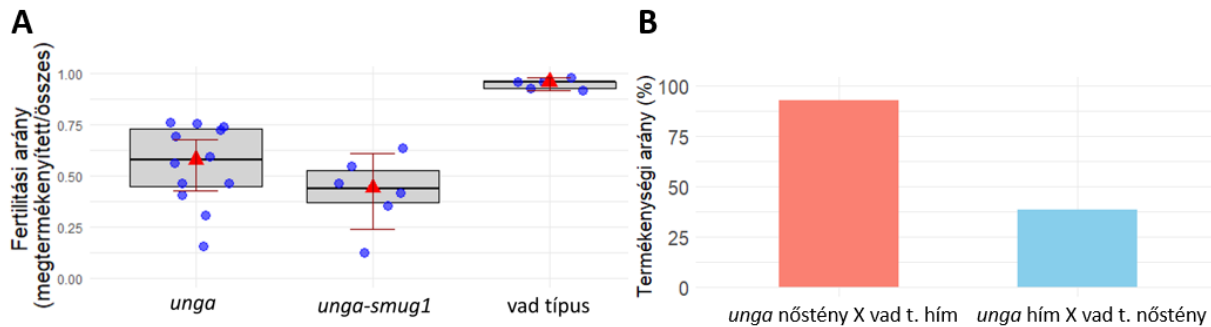
Az *unga*^{-/-}, *smug1*^{-/-} és *unga*^{-/-}; *smug1*^{-/-} kettős mutáns zebrahalak általános jellemzése során megállapítottuk, hogy ezek a vonalak nem mutatnak egyértelmű fenotípusos eltérést a vad típusú állatokhoz képest (4. ábra). Fejlődési ütemük normális, és mindhárom mutáns vonal egyedei képesek elérni a felnőtt kort, ami arra utal, hogy a mutációk nem befolyásolják jelentősen az életképességüket. Az *unga*^{-/-} mutánsok esetében a nemi arány normális, míg a *smug1*^{-/-} mutánsoknál a hímek aránya magasabb (12 hím, 4 nőstény). Továbbá, az *unga*^{-/-} és *unga*^{-/-}; *smug1*^{-/-} kettős mutáns vonalaknál a fertilitás csökkenése is megfigyelhető, vagyis alacsonyabb a megtermékenyített peték aránya, mint a vad típusú egyedeknél. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy bár a mutációk nem befolyásolják jelentősen a fejlődést vagy az életképességet, negatív hatással vannak a fertilitásra és bizonyos esetekben a nemi arányra is.

Fertilitási vizsgálat

Az *unga*^{-/-} és *unga*^{-/-}; *smug1*^{-/-} genotípusú halaknál megfigyelt egyik egyetlen fenotípusos különbség a vad zebradániókhoz képest az, hogy az ívatások során jelentősen kevesebb megtermékenyített pete keletkezik. Tucatnyi ívatás adatainak összesítése alapján az *unga*^{-/-} halaknál a megtermékenyített peték összesített százaléka 57,82%, míg vad típusú halaknál ez a szám 95,76%. A *unga*^{-/-}; *smug1*^{-/-} kettős mutáns halaknál a megtermékenyített peték százaléka alacsonyabb az *unga*^{-/-} egyszeres mutánsban tapasztaltaknál, és csak 43,22%-ot ért el (5A ábra).

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az uracil-DNS-glikozilázoknak szerepe lehet a termékenységben zebrahalak esetében. Annak vizsgálatához, hogy a termékenység csökkenése inkább a hím vagy a nőstény egyedeket érinti-e, külön ívattunk *unga*^{-/-} mutáns hímeket vad

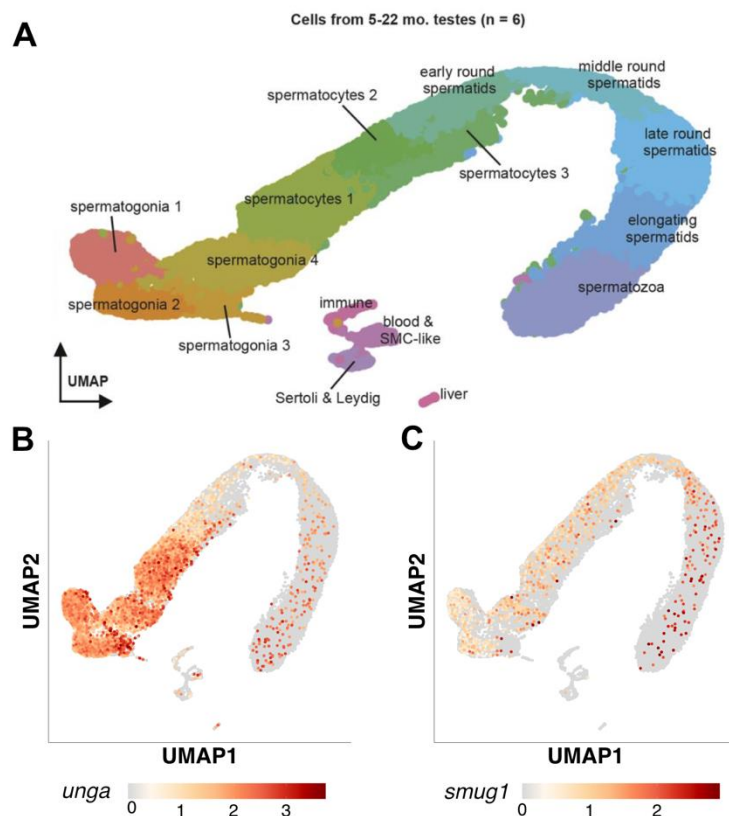
típusú nőtényekkel, valamint *unga*^{-/-} mutáns nőtényeket vad típusú hímekkel. Az eredmények azt mutatják, hogy a mutáns nőtények esetében a termékenységi arány hasonló a vad típusú halakéhoz, míg a mutáns hímek lényegesen kevesebb megtermékenyített embriót produkáltak (5B ábra). Így kijelenthetjük, hogy az Unga fehérje hiánya elsősorban a hímek termékenységét érinti.



5. ábra: Az *unga*^{-/-} egyszeres és *unga*^{-/-};*smug1*^{-/-} kettős mutáns egyedek termékenysége. (A) Kontroll vad típusú (AB), *unga*^{-/-} és *unga*^{-/-};*smug1*^{-/-} kettős mutánsok termékenységi aránya, az egyes pontok az ivatásokat jelölik. (B) Az *unga* homozigóta mutáns hímek és nőtények termékenységének összevetése.

In silico génexpressziós analízis zebradánió herékben

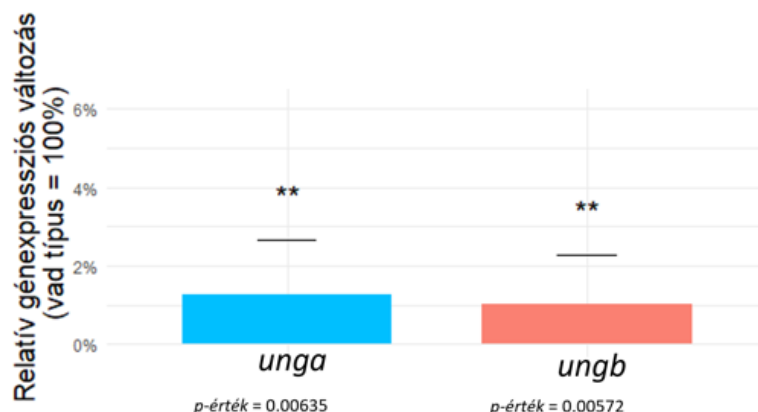
Mivel az *unga* mutáns és SU kettős mutáns hím halaknál fertilitás csökkenést tapasztaltunk, így felmerül a kérdés, hogy expresszálódnak-e az *unga* és *smug1* gének a spermiumok érése során. Egy frissen publikált, egy-sejt szekvenáláson alapuló adathalmaz (Sposato és mtsai., 2024) eredményei szerint mind az *unga*, mind a *smug1* gén kifejeződik a felnőtt zebradánió heréjében (6. ábra). Az *unga* gén különösen magas szinten fejeződik ki spermatogóniákban és a spermatocitákban, ami a spermatogoniális és meiózis szakaszban való jelentős jelenlétre utal. A *smug1* gén expressziója kisebb mértékben figyelhető meg a spermatogenezis korai szakaszában, azonban mindkét gén transzkriptuma nagy mennyiségben jelenik meg a differenciálódó spermatidák egy részében, valamint a spermatozoákban is. Eredményeink alapján további vizsgálatokat tervezünk végezni hisztológiai és elektronmikroszkópos módszerekkel az *unga* és a kettős mutáns hímek heréiben, hogy megállapítsuk, van-e rendellenesség az ivarsejtek érési folyamatában, és az esetleges probléma a spermatogenezis melyik sejtpopulációját érinti.



6. ábra: Felnőtt zebradánió heresejtjeinek génexpressziós adatai. (A) Felnőtt zebradániók heréjének egy-sejt szekvenáláson alapuló térképe. (Ábra forrása: Sposato és mtsai., 2024). (B,C) Az unga gén és smug1 gén expressziója zebradánió herében.

Genomi kompenzáció vizsgálata kvantitatív PCR segítségével

Mivel az *unga*^{-/-} mutánsok nem mutatnak egyértelmű mutáns fenotípust, felmerült a lehetőség, hogy az *unga* gén paralógja, az *ungb* kompenzálhatja az Unga fehérje működésének kiesését. Ennek tisztázására qPCR vizsgálatot végeztem az *unga* és *ungb* gének expressziójára, *unga*^{-/-} mutáns és vad típusú halakból származó cDNS-mintákat felhasználva. Az adatok feldolgozásához a dupla delta Ct analízist alkalmaztam (Livak, 2001), statisztikai tesztként pedig *t*-próbát végeztem.



7. ábra: Az unga és ungb gének relatív expressziója unga homozigóta mutánsokban, a vad típusú halakban mért expresszióhoz viszonyítva.

Az eredmények azt mutatják, hogy mind az *unga*, mind az *ungb* gének expressziója statisztikailag szignifikánsan alacsonyabb az *unga*^{-/-} egyedekben, mint a vad típusú halakban (7. ábra). Az *unga* mRNS alacsony szintje várható volt, mivel korábban egy olvasási keret eltolódással járó mutációt hoztunk létre a gén egyik korai exonjában, amely valószínűsíthetően a transzkriptum stop-kodon mediált lebontási (nonsense-mediated decay – NMD) útvonalon keresztüli gyors lebomlását eredményezi, így alacsony mRNS-szintet okoz.

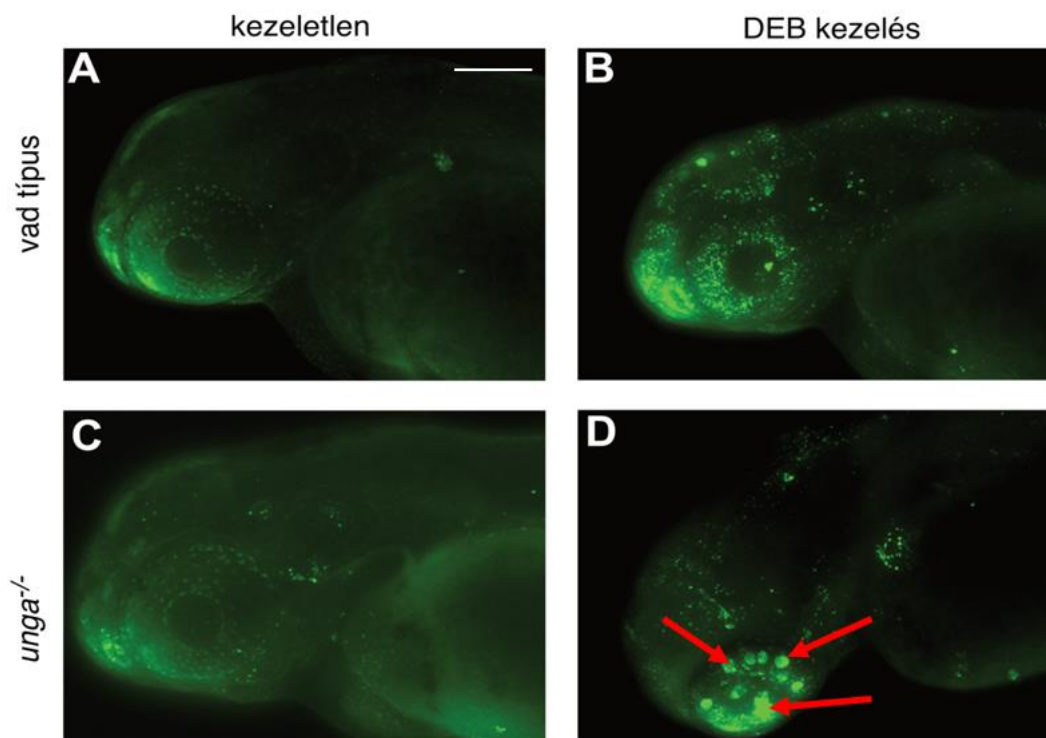
Érdekes módon az *ungb* mRNS szintje is alacsonyabb a mutáns zebradániókban (7. ábra). Ennek magyarázatára nem találtunk irodalmi adatot, de minthogy az *ungb* gén kifejeződése eleve a detektálási küszöb határán mozog már kísérletek alapján is (Daniocell, n.d.), elképzelhető, hogy valójában csak stochasztikus változásról van szó. A kísérletemből mindenesetre arra következtethetünk, hogy az *ungb* expressziója nem kompenzálhatja az *unga* expresszióját a homozigóta mutánsainkban. Összesítve megállapíthatjuk, hogy sikerült létrehoznunk egy olyan zebradánió vonalat, amely hitelesen modellezi az Unga fehérje hiányát.

Diepoxibután kezelés hatásának vizsgálata

A kísérlet során a diepoxibután (DEB), egy DNS-keresztalkotó ágens hatását vizsgáltuk *unga* mutáns és vad típusú zebradánió lárvákban. Feltételeztük, hogy az Unga-fehérje hiánya csökkenti a DNS-javító mechanizmusok hatékonyságát, így a kezeletlen DNS-károsodások nagyobb eséllyel vezetnek apoptózishoz. A DEB-kezelést követően akridin narancs festékkel festettük meg a lárvákat, hogy az apoptotikus sejteket vizualizáljuk, és összehasonlítsuk az apoptózis mértékét az *unga* mutáns és vad típusú egyedek között.

A DEB-kezelés hatására készült képek alapján egyértelműen látható, hogy mind a vad típusú, mind az *unga* mutáns lárvákban jelentősen több apoptotikus sejt található a kezeletlen

csoportokhoz képest (8. ábra). Ez az eredmény megfelel a várakozásainknak, hiszen a DEB DNS-keresztkötéseket hoz létre, amelyek apoptózist indukálnak. A kezletlen csoportban is megfigyelhető egy alapszintű festődés, amely valószínűleg a korai fejlődési szakaszban természetes módon bekövetkező apoptózisnak tulajdonítható.



8. ábra: Vad típusú halakban és unga homozigóta mutánsokban megfigyelhető apoptotikus sejtek kezeletlenül és DEB kezelés hatására. Az apoptotikus sejteket akridin-narancs kezeléssel mutattuk ki. A nyilak az apoptotikus sejtfoltokra mutatnak a retinában. Méretarány: 200 μ m

Mind a vad, mind az *unga* mutáns lárvák esetében fokozott apoptózis figyelhető meg a szaglógumó és a retina területén. Ennek oka valószínűleg az, hogy a DEB által okozott DNS-keresztkötések megakadályozzák a DNS replikációját, és különösen a gyorsan osztódó sejtek – mint a retina és a szaglógumó sejtjei – érzékenyek erre a károsodásra. Mivel ezek a sejtek osztódás közben érzékelik a DNS-károsodást, gyorsan apoptózisba lépnek, míg a lassabban osztódó sejtek csak később pusztulnak el. Az *unga* mutáns lárvákban kifejezetten nagy apoptotikus sejtfoltok is láthatók a retinában, amelyet 13 lárvában figyeltünk meg a 18-ból, amelyről viszont feltételezzük, hogy – egyelőre ismeretlen módon – az Unga-hiányhoz köthető.

Dot blot analízis a DNS-ben található uracil mennyiségének vizsgálatára

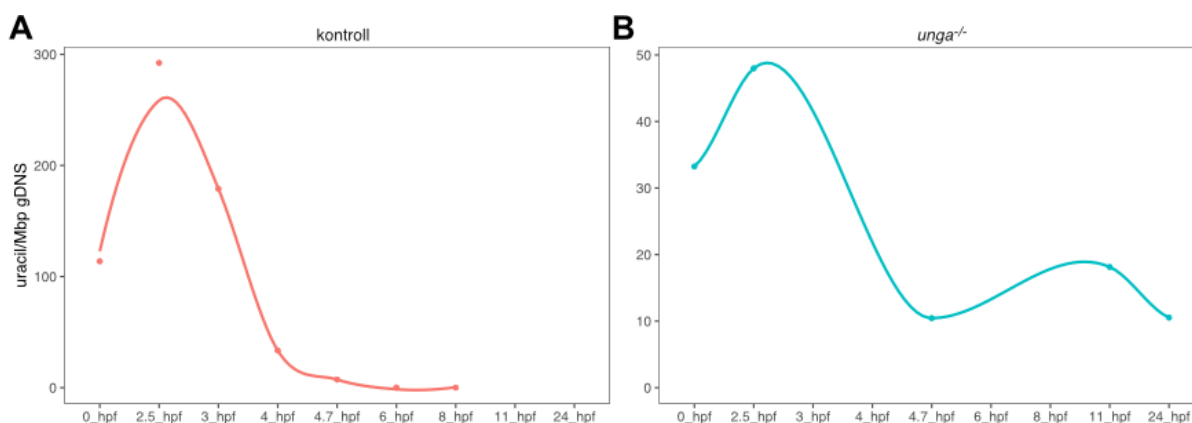
A témavezetőm, Latifa Kazzazy, korábban dot-blot-alapú félkvantitatív módszerrel (Róna és mtsai., 2016) vizsgálta, hogyan változik a DNS uracil szintje a vad típusú zebra-dániaiók

egyedfejlődésének korai szakaszaiban (petesejt stádiumtól 24 óráig, 24 hpf). Az eredmények azt mutatják, hogy a DNS uracil szintje emelkedik a 2,5 órás fejlődési szakaszig, majd ezt követően gyors ütemben csökken, és 6 órával a megtermékenyítés után már nem mutatható ki dot-blot módszerrel (9A ábra).

A 2,5 órás fejlődési fázis utáni uracil szint csökkenés felveti annak lehetőségét, hogy az uracil mennyiségének szabályozása szorosan kapcsolódik az anyai-zigotikus átmenethez (MZT) a korai egyedfejlődés során. A maternal-zygotic transition (MZT) -vagyis amikor a zigóta saját génjei aktiválódnak- a zebradániókban megközelítőleg 10 sejtosztódási ciklus után, 4 órával megtermékenyítés után következik be. (Lee Mt, 2014) Ezt megelőzően a blasztulációs szakasz zajlik, amely során a zigóta mérete nem változik, hanem gyors, növekedés nélküli sejtosztódások követik egymást, amelyek során csak M és S fázis történik.

Feltételezésünk szerint a blasztuláció szakaszának gyors osztódásai során a DNS-be véletlenszerűen beépülő uracilt a BER (bázis-exciziós javító) mechanizmus időhiány miatt nem képes eltávolítani, ami az uracil felhalmozódásához vezet. Amikor azonban az embrió eléri az MZT-t, lelassul a sejtosztódás, G1 és G2 fázisok is megjelennek, így van lehetősége a hibajavító mechanizmusoknak eltávolítani az uracilt a DNS-ből, ezáltal drasztikusan lecsökkenhet az uracil mennyiség a DNS-ben.

Ez az eredmény felvetette azt a kérdést, hogy az uracil tartalom hogyan változik az *unga*^{-/-} mutáns zebrahalak DNS-ében az egyedfejlődés különböző szakaszaiban. Ennek vizsgálatához különböző fejlődési stádiumú *unga* homozigóta mutáns embriókból izoláltunk genomi DNS-t, majd ennek az uracil tartalmát az említett dot blot módszerrel meghatároztuk.



9. ábra: Kontroll vad típusú és unga mutánsokban a fejlődés során mért uracil szintek összehasonlítása. (A) Vad típusú embriók genomi uracilszintjének változása UDG-X szenzorral mérve (Latifa Kazzazy és Perey-Simon Viktória eredményei). (B) Homozigóta unga mutáns embriók genomi uracilszintjének változása 3x-FLAG-ΔUNG szenzorral mérve.

A kontroll és az *unga* mutáns halakban kapott eredmények egyik különbsége a mért uracil szint nagyságrendje a genomban, amit úgy gondoljuk az okoz, hogy a 3x-FLAG- Δ UNG szenzor specifikusabb a genomi uracilra, mint az UDG-X szenzor, így az előbbivel mért eredmények alacsonyabbak lesznek. Az *unga* mutáns halakban is megfigyelhető, hogy 2,5 óránál éri el a maximumot az uracil mennyisége a DNS-ben, onnantól kezdve pedig csökkeni kezd. Ugyanakkor fontos eltérés, hogy az *unga*^{-/-} halakban még 11, és 24 órán is érzékelünk uracilt a DNS-ben, míg a vad típusú halaknál 6 órával megtermékenyítés után már nem tudtuk kimutatni az uracilt a DNS-ben. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az *unga* génben bekövetkező mutáció következtében a gén által kódolt Unga fehérje csökkent funkcionalitása eredményezi az uracil tartós jelenlétét a mutánsok DNS-ében. A normális esetben a zigotikus Unga fehérje kulcsszerepet játszik az uracil eltávolításában a DNS-ből, ezért a csökkent aktivitású Unga fehérje képtelen hatékonyan végrehajtani ezt a folyamatot. Ennek következményeként az uracil felhalmozódik a genomban, ami a mutánsok esetében tartós jelenlétet eredményez.

Diszkusszió

Habár az uracil jelenlétét hagyományosan az RNS-hez társítják, bizonyított, hogy jelen van a DNS-ben is. Bár a genomi uracil gyakran tranziens hibaként fordul elő, eltávolításáért felelős enzimek, az uracil-DNS-glikozilázok (UDG-k), szerepe túlmutathat a szokványos hibajavításon. Például az Unga fehérje szerepet játszik a DNS demetilációjában, így befolyásolja a sejtek transzkripciós aktivitását, míg a SMUG1-t újabban prosztatarák kialakulásával is összefüggésbe hozták. (Wu és mtsai. 2014; GeneCards, n.d.) Emellett az is ismert, hogy az uracil beépülés a DNS-be egy természetes folyamat a szerzett immunitás kialakulása során. (Kavli és mtsai., 2007)

Mindezek alapján belátható, hogy az uracil és az uracil-DNS-glikozilázokról szóló ismereteink egyelőre csak a felszínt kapargatják, így a kutatásom célkitűzése az volt, hogy UDG-deficiens zebrahalakon keresztül mélyebb megértést szerezzünk az Unga és Smug1 enzimek szerepéről, illetve hiányuk következményeiről. Ennek érdekében CRISPR/Cas9 technikával létrehoztunk UDG-hiányos zebrahál vonalakat. Mivel a zebradánió genomban két *UNG* paralóg is található, kimutattam, hogy az *unga* hiányát nem képes az alig expresszálódó *ungb* paralóg kompenzálni. További kísérletekkel több területet is azonosítottunk, ahol az UDG-mutásaink fenotípusos különbségeket mutatnak a vad típusú zebradániókkal összevetve.

Elsőként a termékenység csökkenését fedeztük fel az *unga* és az *unga; smug1* duplamutások esetében, amely valószínűleg összefüggésben áll a *smug1* és *unga* gének spermatogenezis során történő expressziójával. Emellett az *unga*-mutások DNS-hibajavítási kapacitását teszteltük DEB (DNS-keresztkötő ágens) alkalmazásával, amely mind vad típusú, mind mutáns egyedekben megnövelte az apoptotikus sejtek számát. Az *unga*-mutások esetében különösen a szemben láttunk apoptotikus sejtcsoportokat, ami összefüggésben lehet az *unga* gén széleskörű expressziójával ebben a szövetben. (DanioCell, n.d.) Végül, a genomi uracil szinteket dot blot technikával vizsgáltuk, amely kimutatta, hogy míg a vad típusú egyedekben az uracil szintje csökkent a ZGA (zigótikus genom aktiváció) után, addig az *unga*-mutásokban az uracil még 24 órával a megtermékenyítés után is jelen volt a DNS-ben.

Minden kísérletben jelentős különbségeket találtunk a vad típusú és az UDG-mutáns egyedek között, a termékenység, a DNS-hibajavítás és a genomi uracilszintek terén. Mivel ilyen jellegű kutatás zebradánióban még nem történt, kijelenthetjük, hogy elsőként térképeztük fel az Unga és Smug1 hiányának hatását ezekre a biológiai funkciókra ebben a fajban. Eredményeink

értékes betekintést nyújtanak az UDG enzimek működésébe, és fontos alapot szolgáltat jövőbeni kutatások számára.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek Dr. Varga Máténak, hogy másfél éve rögtön válaszolt az email-emre, amikor kutatócsoportot kerestem. Lehet, ha ő akkor nem válaszol, a mai napig nem próbáltam volna ki a kutatást. És persze köszönöm neki az elmúlt másfél év rengeteg türelmét és segítségét, amire remélem a jövőben is számíthatok. Továbbá köszönöm Dr. Annus Tamásnak, hogy minden kérdésemre válaszolt és soha nem hagyta, hogy rosszul érezzem magam a laborban elkövetett hibáim miatt. Hálás vagyok neki, hogy kutatópalántát nevelt belőlem. És köszönöm Latifa Kazzazynak a fáradhatatlanságát és a sok támogatását, és hogy estig velem maradt a laborban, ha kellettek az eredmények. További köszönet a Halgenetikai Kutatócsoport minden tagjának, amiért egy ilyen jó közösséget adtak nekem.

Irodalomjegyzék

- Aleström, P., D'Angelo, L., Midtlyng, P. J., Schorderet, D. F., Schulte-Merker, S., Sohm, F., & Warner, S. (2020). Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. *Laboratory Animals*, 54(3), 213–224. doi:10.1177/0023677219869037
- Békési, A., Holub, E., Pálkás, H. L., & Vértessy, B. G. (2021). Detection of genomic uracil patterns. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8).
<https://doi.org/10.3390/ijms22083902>
- Çakan, E., & Gunaydin, G. (2022). Activation induced cytidine deaminase: An old friend with new faces. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13).
- Chen, X. K., Kwan, J. S., Chang, R. C., & Ma, A. C. (2021). 1-phenyl 2-thiourea (PTU) activates autophagy in zebrafish embryos. *Autophagy*, 17(5), 1222–1231.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1755119>
- Chen, Z., & Wang, J. H. (2014). Generation and repair of AID-initiated DNA lesions in B lymphocytes. In *Frontiers of Medicine in China* (Vol. 8, Issue 2).
<https://doi.org/10.1007/s11684-014-0324-4>
- Chon, J., Field, M. S., & Stover, P. J. (2019). Deoxyuracil in DNA and disease: Genomic signal or managed situation? *DNA Repair*, 77. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.02.014>
- DanioCell. (n.d.). Unga gene: A summary of gene function and expression. Retrieved November 7, 2024, from https://daniocell.nichd.nih.gov/gene/U/unga/unga_eye.html
- Galashevskaya, A., Sarno, A., Vågbø, C. B., Aas, P. A., Hagen, L., Slupphaug, G., & Krokan, H. E. (2013). A robust, sensitive assay for genomic uracil determination by LC/MS/MS reveals lower levels than previously reported. *DNA Repair*, 12(9).
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.05.002>
- GeneCards. (n.d.). SMUG1 gene. GeneCards. Retrieved November 7, 2024, from <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SMUG1>
- GeneCards. (n.d.). UNG gene. GeneCards. Retrieved November 7, 2024, from <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=UNG&keywords=unga#paralogs>
- Gunes, S., Al-Sadaan, M., & Agarwal, A. (2015). Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. *Reproductive Biomedicine Online*, 31(3), 309–319. doi:10.1016/j.rbmo.2015.06.010
- Kavli, B., Otterlei, M., Slupphaug, G., & Krokan, H. E. (2007). Uracil in DNA—general mutagen, but normal intermediate in acquired immunity. *DNA Repair (Amst.)*, 6(4), 505–516.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.10.014>
- Kiljunen, S., Hakala, K., Pinta, E., Huttunen, S., Pluta, P., Gador, A., Lönnberg, H., & Skurnik, M. (2005). Yersiniophage φR1-37 is a tailed bacteriophage having a 270 kb DNA

genome with thymidine replaced by deoxyuridine. *Microbiology*, 151(12).
<https://doi.org/10.1099/mic.0.28265-0>

Krokan, H. E., Sætrom, P., Aas, P. A., Pettersen, H. S., Kavli, B., & Slupphaug, G. (2014). Error-free versus mutagenic processing of genomic uracil—Relevance to cancer. *DNA Repair*, 19. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.028>

Kroll, F., Powell, G. T., Ghosh, M., Gestri, G., Antinucci, P., Hearn, T. J., ... Rihel, J. (2021). A simple and effective F0 knockout method for rapid screening of behaviour and other complex phenotypes. *eLife*, 10. doi:10.7554/eLife.59683

Lee, M. T., Bonneau, A. R., & Giraldez, A. J. (2014). Zygotic genome activation during the maternal-to-zygotic transition. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 581–613. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013027>

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Mardis, E., & McCombie, W. R. (2017). Library Quantification: Fluorometric quantitation of double-stranded or single-stranded DNA samples using the Qubit system. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017(6), pdb.prot094730. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot094730>

Muha, V., Horváth, A., Békési, A., Pukáncsik, M., Hodoscsek, B., Merényi, G., Róna, G., Batki, J., Kiss, I., Jankovics, F., Vilmos, P., Erdélyi, M., & Vértessy, B. G. (2012). Uracil containing DNA in *Drosophila*: Stability, stage-specific accumulation, and developmental involvement. *PLoS Genetics*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002738>

Roberts, Z. J., & LaBonte, M. J. (2023). The importance of the fifth nucleotide in DNA: Uracil. In *Oligonucleotides - Overview and Applications*.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.110267>

Róna, G., Scheer, I., Nagy, K., Pálincás, H. L., Tihanyi, G., Borsos, M., Békési, A., Vértessy, B. G. (2016). Detection of uracil within DNA using a sensitive labeling method for in vitro and cellular applications. *Nucleic Acids Research*, 44(3), e28.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv977>

Sposato, A. L., Hollins, H. L., Llewellyn, D. R., Weber, J. M., Schrock, M. N., Farrell, J. A., & Gagnon, J. A. (2024). Germ cell progression through zebrafish spermatogenesis declines with age. *Development (Cambridge, England)*. <https://doi.org/10.1242/dev.204319>

Szabó, J. E., Takács, E., Merényi, G., Vértessy, B. G., & Tóth, J. (2016). Trading in cooperativity for specificity to maintain uracil-free DNA. *Scientific Reports*, 6(1), 24219. doi:10.1038/srep24219

Takahashi, I., & Marmur, J. (1963). Replacement of thymidylic acid by deoxyuridylic acid in the deoxyribonucleic acid of a transducing phage for *Bacillus subtilis*. *Nature*, 197(4869).
<https://doi.org/10.1038/197794a0>

ungb (all cells): Daniocell. (n.d.). Retrieved 14 January 2025, from
<https://daniocell.nichd.nih.gov/gene/U/ungb/ungb.html>

Vértessy, B. G., & Tóth, J. (2009). Keeping uracil out of DNA: Physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. *Accounts of Chemical Research*, 42(1), 97–106.

<https://doi.org/10.1021/ar800114w>

Wu, D., Chen, L., Sun, Q., Wu, X., Jia, S., & Meng, A. (2014). Uracil-DNA glycosylase is involved in DNA demethylation and required for embryonic development in the zebrafish embryo. *Journal of Biological Chemistry*, 289(22), 15463–15473.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.561019>