

Humanizált *ABCC6* mutáns zebrahalvonal létrehozása a pseudoxanthoma elasticum betegség modellezésére

37. OTDK Biológia Szekció

készítette:

Li Luca Kamilla

Biológus MSc II. évfolyam

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar

témavezetők:

Czimer Dávid

PhD hallgató

Varga Máté

egyetemi docens

ELTE TTK Genetikai tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR

BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2024

Tartalomjegyzék

Összefoglaló.....	5
Rövidítések jegyzéke.....	6
Bevezetés.....	7
Irodalmi háttér – PXE.....	7
<i>ABCC6</i> gén szerepe	8
PXE és GACI közötti összefüggés	10
Zebradánió, mint PXE modell	12
Célkitűzés.....	14
Anyagok és módszerek.....	15
Zebradánió vonalak fenntartása és szaporítása.....	15
CRISPR knock-in	15
Molekuláris klónozás	15
attP knock-in	15
Mikroinjektálás	15
Genomi DNS izolálás	15
Injektálási hatékonyság ellenőrzése PCR-rel.....	16
Sanger szekvenálás	16
<i>abcc6a</i> PhiC31 rekombináció.....	16
A hordozó állatok mikroszkópos ellenőrzése	17
Alizarin Vörös festés	17
Eredmények.....	18
Az <i>attP</i> szekvencia bevitele az <i>abcc6a</i> genomi lókuszba	18
PhiC31-alapú rekombináció az <i>abcc6a</i> lókuszban.....	20

Diszkusszió.....	23
Köszönetnyilvánítás	25
Irodalomjegyzék.....	26

Összefoglaló

A pseudoxanthoma elasticum (PXE) egy ritka, monogenikus betegség, melynek hátterében az *ABCC6* gén biallélikus mutációi állnak. Az *ABCC6* egy sejtmembrán transzporter fehérjét kódol, melynek fő funkciója az ATP sejten kívüli térbe való szállítása. Ez elengedhetetlen a megfelelő foszfát anyagcsere szempontjából, és a fehérje funkcióvesztése következtében a vérben felborul az inorganikus foszfát-pirofoszfát arány, mely az eredetileg nem-meszesedő szövetekben hidroxiapatit kristályok lerakódását okozza. A betegségre jellemző az elasztikus rostokat tartalmazó szövetek elmeszesedése, amely főként dermatológiai, szemészeti, kardiovaszkuláris területeket érintő elváltozásokhoz vezet. Az *ABCC6* gén egyes mutációi egy másik, súlyosabb elmeszesedéssel járó betegség, a kettes típusú újszülöttkori generalizált artériás kalcifikáció (GACI) kialakulásában is szerepet játszhatnak. Az *ABCC6* funkcióvesztése tehát egy spektrumbetegség, melynek két végpontja a PXE és a GACI. Laborunkban a betegség modellezésére zebradániót (*Danio rerio*) használunk. Az *abcc6a* mutáns állatok jól felismerhető meszesedési fenotípust mutatnak már az egyedfejlődés korai szakaszában is. A TDK keretében végzett munkám célja egy olyan humanizált transzgenikus platform létrehozása, melynek segítségével a patogén *ABCC6* variánsok szekvenciáját a halgenomba illeszthetjük és így vizsgálhatjuk az egyes polimorfizmusok hatását. Ez a rendszer a későbbiekben gyógyszer hatóanyagok célzott tesztelésére is lehetőséget nyújt.

Rövidítések jegyzéke

ABCC6 – ATP Binding Cassette Subfamily C Member 6

BrM – Bruch-membrán

CRISPR/Cas9 – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9

crRNS – CRISPR RNS

ENPP1 – EctoNucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1

dpf – napos (*day(s) post fertilization*)

gDNS – genomi DNS

gRNS – irányító RNS (*guide RNA*)

HDR – homológia-irányított javítás (*Homology Directed Repair*)

HotSHOT – *Hot Sodium Hydroxide and Tris*

NHEJ – nem-homológ vég összekapcsolás (*Non-Homologous End Joining*)

NPP1 – Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1

GACI – újszülöttkori generalizált artériás kalcifikáció (Generalized Arterial Calcification of Infancy)

ORF – *Open Reading Frame*

PCR – polimeráz-láncreakció (*Polymerase Chain Reaction*)

PPi – pirofoszfát

Pi – inorganikus foszfát

PXE – *Pseudoxanthoma Elasticum*

RNP - ribonukleoprotein

TALEN – Transcription Activator-Like Effector Nucleases

TNAP – Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase

tracrRNS – transzaktivált CRISPR RNS

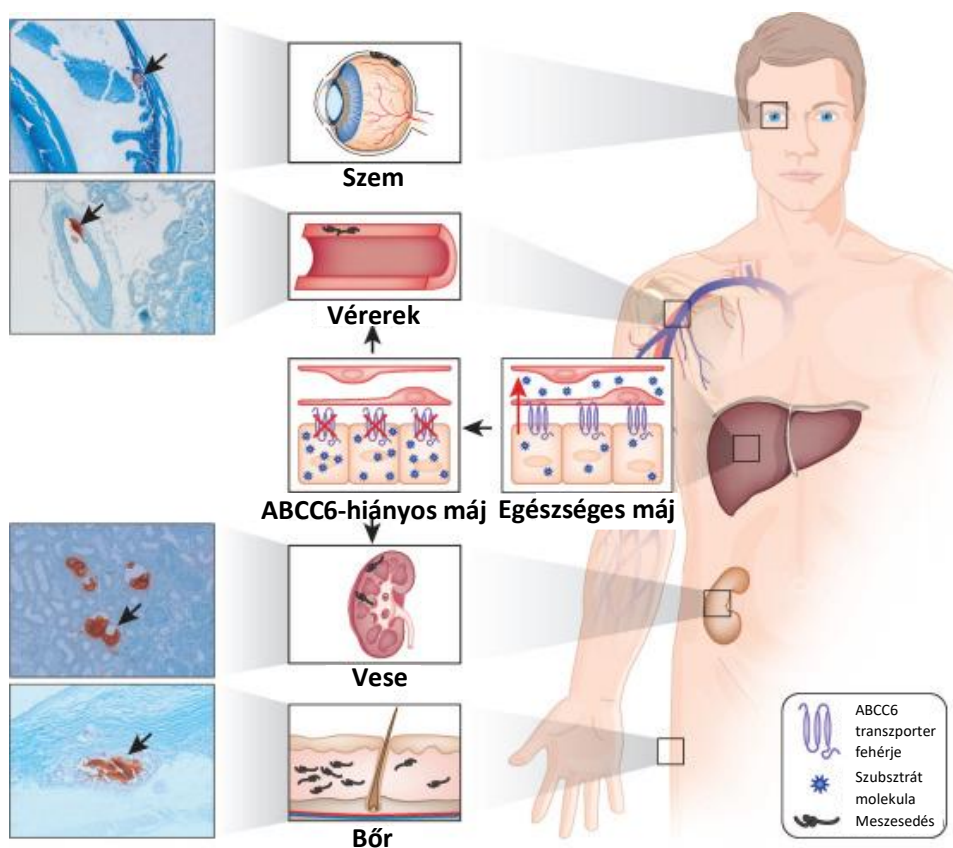
Bevezetés

Irodalmi háttér – PXE

A pseudoxanthoma elasticum (PXE) egy autoszomális recesszív módon öröklődő genetikai eredetű multisisztémás betegség, amely általában az *ABCC6* gén mutációja következtében alakul ki (Bergen és mtsai. 2000; Le Saux és mtsai. 2000). A gén által kódolt fehérje funkcióvesztése ektopikus mineralizációt eredményez, mely főként dermatológiai, kardiovaszkuláris és szemészeti problémákhoz vezet. (1. ábra) A betegség előfordulási gyakoriságát jelenleg 1:56000 becsülik (Kranenburg és mtsai. 2019). Szövettani vonatkozásban a PXE az elasztikus rostok mineralizációjával és fragmentációjával jár. Az ásványi anyag lerakódások nagyrészt kalcium-hidrogénfoszfátból és kalcium hidroxipatitból állnak. A betegek plazmájában jellemzően alacsony a pirofoszfát szint és a homeosztatikus pirofoszfát-inorganikus foszfát (PPi-Pi) arány felborul (Dedinszki és mtsai. 2017; Pomozi és mtsai. 2017). Patofiziológiáját tekintve általában a bőr az első szervrendszer, amelyet a betegség érint és leggyakrabban ez vezet a diagnózisához. Az első látható elváltozások az esetek nagy többségében korai felnőttkorban jelentkeznek, legtöbbször a 13. és 22. életév között (Hacker és mtsai. 1993).

A PXE korai jele a kis (1-5 mm átmérőjű), sárgás színű, puha papullák megjelenése, melyek retikuláris mintázatban jelentkeznek, általában a nyak és a hajlatokhoz közeli bőrfelszínen (Schneider és mtsai. 1984). Habár a bőr az elsődlegesen érintett szervrendszer, a szív- és érrendszeri-, illetve látószervrendszeri tüneteknek jelentősebb kockázatot jelentenek a betegek számára. A keringési rendszert érintő tünetek hátterében, korai ateroszklerózisra emlékeztető elváltozások állnak, amelyek nagy eséllyel okoznak csökkent vagy hiányzó perifériás pulzust, artériás hipertóniát, koszorúérgörcsöt és gasztrointesztinális vérzést (Finger és mtsai. 2009; Lebwohl, Halperin, és Phelps 1993; Pfau és mtsai. 2024). Emellett a PXE-s betegekben magas kockázattal alakulhat ki carotis hypoplázia és ischaemiás stroke 65 év alatt (vandenBerg és mtsai. 2000). A szemet érintő tünetek ugyancsak korán jelentkezhetnek. Ennek oka az elasztikus rostokat tartalmazó Bruch-membrán (BrM) elmeszesedése, melynek progressziója a centrális régiótól (fovea közeléből) a periféria felé tart. Az első tünet a peau d'orange, amely a szemfenéktükrözés során kis szürkés foltok megjelenésével járó pigment egyenletlenségként jelentkezik. Az erősen meszesedett területeken később erekre hasonlító ún. angioid csíkok jelennek meg, amelyek a BrM fragmentációja miatt alakulnak ki (összefoglalva: Finger és mtsai.

2009; Pfau és mtsai. 2024). Ezek aztán szubretinális bevérzéseket, illetve fibrózist eredményezhetnek, melyek végül a retina károsodásához és végső soron vaksághoz vezetnek.



1. ábra: A PXE-re jellemző szervérintettségek (Naouri és mtsai. 2009)

ABCC6 gén szerepe

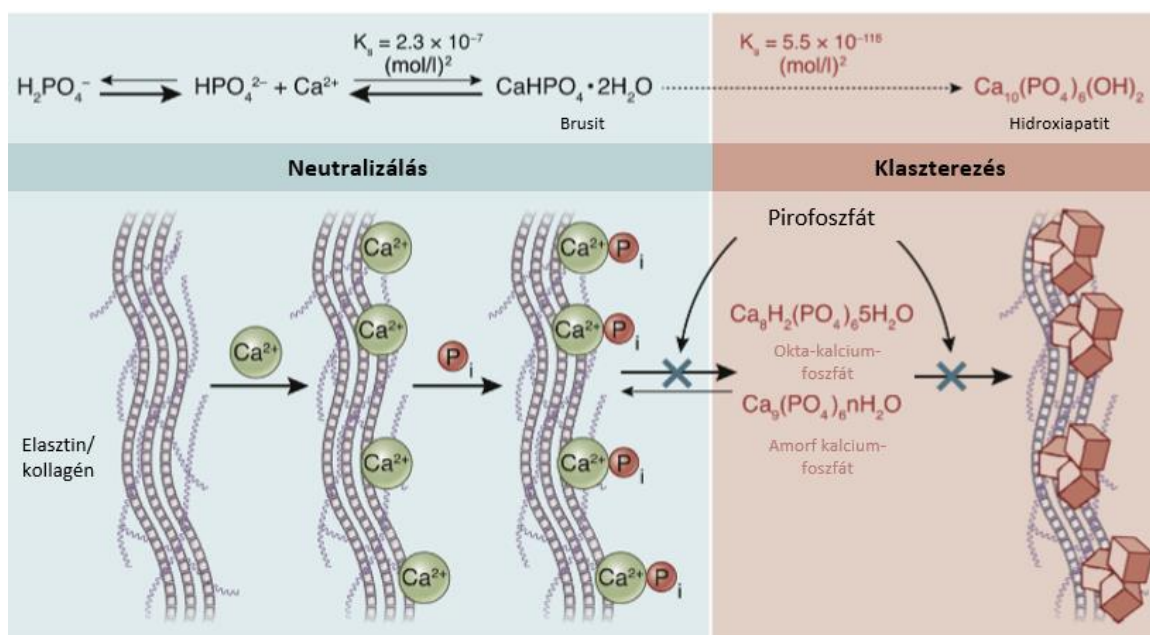
A humán *ABCC6* gén a 16. kromoszómán (16p13.1) található, amely 31 exonból áll és az ATP-transzporter gének C családjába tartozik. A róla átírt mRNS 6 kb, míg kódoló szekvenciája 4,7 kb hosszú. Az ebbe a családba tartozó gének aktív transzporter pumpa fehérjéket kódolnak. Az *ABCC6* gén által kódolt ABCC6 vagy más néven MRP6 (multidrug resistance-associated protein 6) egy 1503 aminosavakból álló, 165 kDa-os molekulásúlyú fehérjét kódol (Plomp és mtsai. 2008). Két nukleotidkötő doménből (NBD1 és NBD2), két transzmembrán doménből (TMD1 és TMD2), illetve egy további kiegészítő NH₂-terminális transzmembrán doménből (TMD0) áll (Bisaccia és mtsai. 2021). A multidrog rezisztens alcsaládba tartozó fehérjékre jellemző, hogy külső forrásból származó organikus ionokat exportálnak, azonban ennek a transzporternek a specifikus szubsztrátját még nem azonosították (Bergen és mtsai. 2000; Plomp és mtsai. 2008).

Korábban kimutatták, hogy az ABCC6 túltermeltetése humán embrionális vese 293 (HEK293) sejtekben *in vitro* nukleozid-trifoszfátok, elsősorban ATP felszabadulását indukálja (Jansen és mtsai. 2014). *In vivo* emlősökben ennek a génnek az expressziója főként a máj-, kisebb mértékben a vese (proximális tubulus) sejtekre jellemző (Matsuzaki és mtsai. 2005). A jelenlegi tudományos konszenzus alapján az ABCC6 fő funkciója, hogy a májsejtek bazolaterális membránján keresztül nagy mennyiségű ATP-t juttat a keringésbe, ahol a membránkötött ENPP1 (EctoNucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1) tovább hidrolizálja azt AMP-re és PPi-re (Jansen és mtsai. 2014).

Habár az ABCC6 elsősorban a májban expresszálódik, a PXE betegekben megfigyelhető elváltozások nem közvetlenül a májban láthatók. Erre a jelenségre a legelfogadottabb magyarázat egy szisztémás anyagcsere betegség lehet, mely szerint a májban termelődő/májból szállítódó egy vagy több keringő faktor hiánya vezet az ektopikus mineralizációhoz. Ezek a keringő faktorok szabályozzák a mineralizációt. A csontokban és az elmeszesedett szövetekben a fő kalcium-foszfát kristály a hidroxipatit, melynek a keletkezését az extracelluláris PPi-Pi arány határozza meg (Villa-Bellosta és O'Neill 2018). Az *Abcc6*^{-/-} homozigóta mutáns egerekben kimutatták, hogy a vérplazmában lévő alacsony PPi szint összefüggésbe hozható az ektopikus mineralizációval (Jansen és mtsai. 2014).

A hidroxipatit a meszes szövetekben található fő kalcium-foszfát kristályforma. Ennek kialakulása nem közvetlenül kalcium- és foszfát ionok reakciójával, hanem olyan intermediér kristályok aggregációjával történik, mint az okta-kalcium-foszfát és az amorf kalcium-foszfát (O'Neill 2007). Ahhoz, hogy ezek a köztes kristály formák ki tudjanak alakulni a szervezetben egy olyan molekuláris mátrixra van szükség, ami képes katalizálni a reakciót. A meszesedés töltés semlegesítési elmélete szerint bizonyos magas glicintartalmú (béta-redőkben gazdag) mátrixfehérjék képesek nagy hatékonysággal, nem ionikus módon kötni a kalcium ionokat (Urry 1971). Ez később lehetővé teszi a foszfát számára, hogy olyan konfigurációban kösse meg a kalciumot, amely fiziológiás körülmények között kedvez az apatit képződés prekurzorának számító dikalcium-foszfát-dihidrát (más néven brusit) keletkezésének. Az így képződött brusit kristályok később klasztereződnek, okta-kalcium-foszfát és amorf kalcium-foszfát intermediereket létrehozva. A további klaszterképződés végállomása pedig a hidroxipatit genezise (összefoglalva: Villa-Bellosta és O'Neill 2018; 2. ábra). Fiziológiás körülmények között erre a legjobb példa a csontszövet, ahol az egyes típusú kollagén biztosítja az alapot a meszesedési folyamatok elindulásához. Ez alapján az ektopikus kalcifikáció számára is szükség van egy olyan szöveti mátrixra, ami lehetővé teszi a fent vázolt kristályképződési

folyamat lezajlását. Az egyes típusú kollagénhez hasonlóan az elasztinnak is megvannak azok a molekuláris tulajdonságai, amelyek lehetővé teszik, hogy a bennük gazdag szövetekben végbe mehessen ez a folyamat (Urry 1971). Emiatt a szervezet azon pontjai lesznek a leginkább kitéve az ektopikus meszesedésnek, amelyek elasztikus rostokban gazdag kötőszöveteket tartalmaznak. Azt, hogy a szervezetben normál fiziológiás körülmények között hol mehet végbe mészlérakódás számos molekuláris faktor szabályozza. Jelen tudásunk szerint az ektopikus kalcifikáció egyik legfontosabb inhibítora a keringésben lévő szabad PPi. A PPi hasonlóképpen, mint az Pi részt tud venni a kristályosodás folyamatában. Erősen kötődik a képződő kalcium-foszfát kristályokhoz, azonban az így kötött kristályok további klasztereződése ezáltal gátolva lesz (Meyer 1984).



2. ábra: Az ektopikus kalcifikáció kémiai folyamatainak sematikus ábrázolása (Villa-Bellosta és O'Neill 2018).

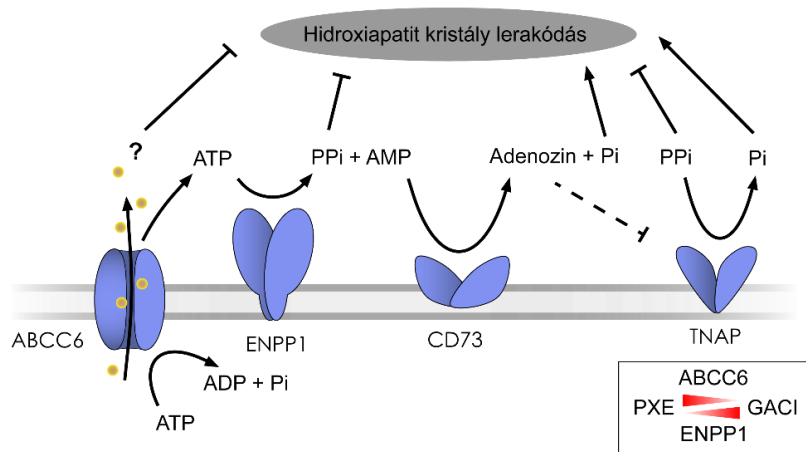
PXE és GACI közötti összefüggés

Az *ABCC6* gén egyes mutációi egy másik, súlyosabb kórlefolyással járó betegség, a kettes típusú újszülöttkori generalizált artériás kalcifikáció (GACI2, OMIM 614473) kialakulásában is szerepet játszhatnak (Nitschke és mtsai. 2012). A GACI, hasonlóan a PXE-hez, szintén egy autoszomális recesszíven öröklődő ritka genetikai betegség, melynek hátterében az esetek többségében az *ENPP1* gén mutációi állnak (Rutsch és mtsai. 2003). Az érintett betegekre jellemző, akár közvetlenül a születést követően, az artériák elmeszesedése, mely súlyos pangásos szívelégtelenséget, magas vérnyomást és ischaemiás szívbetegséget okozhat. Az *ENPP1* által kódolt NPP1 fehérje a PPi előállításában vesz részt ATP hidrolízise révén, mely

fontos szerepet játszik a meszesedés szabályozásában a hidroxipatit kristályok lerakódásának gátlásával (3. ábra). Egyes GACI-val rendelkező betegeknél idősebb korban megfigyeltek a PXE-hez hasonló tüneteket, mint például a bőr sárgás elváltozásai, vagy a szemfenéki angioid csíkok jelenléte. Az *ABCC6* funkcióvesztése a jelenlegi álláspont szerint egy spektrumbetegségnek tekinthető, melynek két végpontja a PXE és a GACI. Az *ABCC6* és az *ENPP1* mutációi ugyanannak a fiziológiás útvonalnak a módosulásához vezetnek (Kawai és mtsai. 2022; Rutsch és mtsai. 2003).

A PXE (és a GACI) gyógyítása egyelőre nem ismert (Kawai és mtsai. 2022; Pfau és mtsai. 2024). Jelenleg a klinikumban a különböző bőrgyógyászati, szemészeti, illetve kardiovaszkuláris elváltozások tüneti kezelésére irányuló terápiák alkalmazása jellemző (Pfau és mtsai. 2024). Prenatális diagnosztika a PXE esetében nem jellemző, mivel alapvetően nem letális a betegség. Ezenkívül már a különböző patogén *ABCC6* variánsokra irányuló farmakológiai chaperon kezelések is tesztelés alatt állnak (Pomozi és mtsai. 2014).

Az *ABCC6*-ot és *ENPP1*-et magában foglaló foszfát anyagcsere útvonalban további két fehérjét is ki kell emelnünk. Az első a TNAP (Tissue-nonspecific alkaline phosphatase), amely a pirofoszfátot képes inorganikus foszfáttá hidrolizálni. Korábban megfigyelték, hogy bizonyos PXE-betegek magasabb TNAP aktivitást mutattak, ami csökkent PPi-szinthez vezetett így súlyosbította a lágyszöveti meszesedés mértékét (Sánchez-Tévar és mtsai. 2019). A fehérje ebben a folyamatban betöltött funkcióját az is alátámasztja, hogy a TNAP aktivitás csökkentése *Abcc6*^{-/-} egerekben enyhíti a meszesedési fenotípust (Li és mtsai. 2019). A TNAP enzimfunkciójának finomhangolásáért az 5'-ektonukleotidáz gén (*NT5E*) által kódolt CD73 fehérje felel, amely az AMP-t képes inorganikus foszfátra és adenzinra bontani. A szabad formában lévő adenzin a TNAP specifikus gátlója. Ezt az is alátámasztja, hogy a *NT5E* gén biallélikus mutációja ugyancsak egy lágyszöveti meszesedéssel járó betegség - a CD73 elégtelenség által kiváltott artériás kalcifikáció (ACDC) - kialakulásához vezet (St. Hilaire és mtsai. 2011).



3. ábra: Az ectopikus mineralizáció szabályozásának molekuláris háttere.

Zebradánió, mint PXE modell

Manapság a zebradánió (*Danio rerio*) egyre népszerűbb modellállat a humán genetikai betegségek modellezésében. Különösen fontos szerepet tölt be a csontosodással kapcsolatos betegségek kutatásában, ugyanis ellentétben a többi modell élőlénnel, a halak csontvázát érintő kisebb terhelés lehetővé teszi a mutáns állatok hosszabb ideig (akár felnőtt korig) való életben maradását (Van Wynsberghe és Vanakker 2023).

Korábban az *Abcc6*^{-/-} egerekkel végzett kísérletek nagyban hozzájárultak a PXE patomechanizmusának mélyebb megismeréséhez (Jiang és mtsai. 2010; Li és mtsai. 2019). Ugyanakkor célzott hatóanyag tesztelésre alkalmasabb lehet egy kisebb méretű, gyorsabb fejlődésű és szaporább modellállat, nevezetesen a zebradánió. Említést érdemel az is, hogy a technikai fejlődéseknek köszönhetően ma már egyszerűen betekintést nyerhetünk az állat teljes csontvázára, például a röntgen mikrotomográfia (mikro-CT) segítségével, ezzel utánkövetési lehetőséget nyújtva a patológias meszesedési folyamatok változásának (Czimer és mtsai. 2021; Bearce és mtsai. 2023)

A zebradánió és a humán genom 71%-ban homológ. A humán *ABCC6* génnek két funkcionális zebradánió paralógja található, az *abcc6a* (mely 65%-ban hasonló és 45%-ban azonos az *ABCC6*-tal) és az *abcc6b.1* (mely 63%-ban hasonló és 47%-ban azonos a humán szekvenciával) (Czimer és mtsai. 2021). Az évek során számos zebrahal modellt hoztak létre a PXE tanulmányozására (4. ábra). A legelső modellek a morfolino-mediált *abcc6a*^{-/-} mutáns zebrahalak voltak, melyek jellemzően rövidebb és görbült testtel rendelkeztek. Az ezt követően

létrehozott ún. *gräte* mutáns *abcc6a*^{-/-} állatokról szintén hasonló fenotípust írtak le: 8 dpf követően hipermineralizációt figyeltek meg a gerincoszlopokban, mely görbült gerincet és rövidebb testhosszt eredményezett. Ezenkívül a *gräte* mutánsokban a csontok meszesedése gyorsabban ment végbe, mint a vad típusú állatoknál, amely a csigolyák összenövését eredményezte. 2018-ban hozták létre az első CRISPR/Cas9 génszerkesztett *abcc6a*^{-/-} mutáns zebradániókat, amelyek szintén hasonló fenotípust mutattak, ám a szemükben és a szívükben nem volt megfigyelhető elmeszesedés. Ezzel szemben a TALEN-nel létrehozott *abcc6a*^{-/-} génkiütött állatokban meszesedési elváltozások voltak megfigyelhetőek a szemben és a szívben is (Van Wynsberghe és Vanakker 2023).

A korábban létrehozott zebradánió modellekben nem volt egyértelműen kimutatható különkülön az *abcc6a* és az *abcc6b* gén szerepe a fenotípusos változásokban. A limitációk átugrása végett CRISPR/Cas9 mediált génszerkesztési technika segítségével létrehoztunk a laborunkban egy olyan mutáns vonalat, melyben mind az *abcc6a*, mind az *abcc6b.1* gén kiütésre került. Megállapítottuk, hogy az *abcc6b.1* génnek nincs vagy elhanyagolható a szerepe a zebradánió lárvák csigolyáinak meszesedésében. Ezzel szemben az *abcc6a*^{-/-} homozigóta mutáns állatokban szignifikánsan megnőtt az elmeszesedett csigolyák száma a vad típusú testvéreikhez képest, jól látható a fenotípusos különbség (Czimer és mtsai. 2021).

Gén	Génszerkesztési mód	Lárva	Felnőtt	Egyéb felnőtt fenotípusok
WT				
<i>abcc6a</i> ^{-/-} [Li, 2010]				
<i>abcc6a</i> ^{-/-} [Mackay, 2015]				
<i>abcc6a</i> ^{-/-} [Van Gils, 2018]				
<i>abcc6a</i> ^{-/-} [Sun, 2020]				
<i>abcc6a</i> ^{-/-} [Czimer, 2021]				

4. ábra: Különböző *abcc6a*^{-/-} zebradánió modellek összefoglaló táblázata (Van Wynsberghe és Vanakker 2023).

Célkitűzés

Tudományos diákköri munkám célkitűzése egy olyan transzgenikus recipiens zebrahalvonal létrehozása, melynek segítségével különböző patogén humán *ABCC6* variánsok szekvenciáját viszonylag egyszerű módon, célzottan a zebrahal genomjába illeszthetünk, és így vizsgálhatjuk az egyes polimorfizmusok fenotípusos hatását. Ezt úgy tervezzük véghez vinni, hogy közvetlenül az *ABCC6* génnel funkcionális ortológját mutató, *abcc6a* gén helyére illesztenénk be az új transzgénjeinket. Ehhez először a CRISPR indukált, homológia alapú javítási módszert (CRISPR-HDR) kihasználva létrehoztunk egy olyan knock-in (KI) vonalat, ahol a zebrahal *abcc6a* génjében célzottan elhelyeztünk egy helyspecifikus rekombinációhoz használt *attP* kazettát. Később a PhiC31 fág-eredetű rekombinációs rendszer révén könnyedén helyezhetünk el akár teljes gének kódoló szekvenciáját az adott genomi pozícióba. Reményeink szerint ezzel a rendszerrel a jövőben *in vivo* vizsgálhatjuk az *ABCC6* patogén mutációinak és az általuk okozott spektrumbetegségnek a diverz kórlefolyását, illetve az ezt befolyásoló különböző környezeti és genetikai faktorok összefüggéseit, kvázi személyre szabott módon. Hosszabb távon ez a rendszer lehetőséget nyújt különböző potenciális gyógyszer hatóanyagok célzott, gyors és költséghatékony tesztelésére is.

Anyagok és módszerek

Zebradánió vonalak fenntartása és szaporítása

A laborunkban alkalmazott vad típusú és mutáns zebrahalak tenyésztése és fenntartása az Eötvös Loránd Tudományegyetem állatházában, standard protokollok (Aleström és mtsai. 2020) alapján történik (NÉBIH engedélyszám: PE/EA/2026-7/2017).

CRISPR knock-in

Molekuláris klónozás

Sztenderd restriktációs emésztéssel és ligálással hoztuk létre a donor plazmidokat. Az első lépéshez a pBSKS plazmid vektorba beklónoztuk az *abcc6a-ex2-5'HA-attP-3'HA-Zhe:TagRFP-sv40(pA)* szekvencia részletet, míg a második lépéshez a pGEM-T easy vektorba a *crybb:eCFP-BGH(pA)-attB-hABCC6-rbG(pA)* szekvenciát juttattuk be.

attP knock-in

Az *abcc6a* második exonját megcélozva egy szintetikus gRNS-t használtunk. A gRNS-t crRNS és tracrRNS összeillesztésével állítottuk elő egy korábbi protokoll alapján (Kroll és mtsai. 2021). A gRNS/Cas9 ribonukleoprotein (RNP) komplexben a szekvencia specifikus crRNS -t a prediktált on- és off-targetek alapján választottunk ki. Az injektálási mixbe crRNS, tracrRNS, Cas9-es fehérje, illetve a donor templát került. A kettős szálú donor templátot PCR segítségével 5'AmC6 módosított primerekkel hoztuk létre az általunk tervezett plazmid templátról, hogy megelőzzük a donor lebomlását, multimerizálódását, illetve a véletlenszerű nem-homológ vég összekapcsolást (NHEJ-t) (Mi és Andersson 2022).

Mikroinjektálás

Az embriók begyűjtése után az őket tartalmazó Petri csészét jégre helyeztük, hogy lelassítsuk a fejlődésüket, így biztosítva, hogy egy-sejtes állapotban maradjanak a mikroinjektálás során. Megközelítőleg 1 nL injektálási mixet injektáltunk az embriókba, egy-sejtes állapotban. Ezt követően további 15-20 percig jégen inkubáltuk az állatokat, hogy minimalizáljuk a NHEJ gyakoriságát, illetve elősegítsük a homológia-irányított javítás (HDR) hatékonyságát (Aksoy és mtsai. 2019).

Genomi DNS izolálás

Az *attP* injektált lárvákból kétnapos korukban genomi DNS-t (gDNS-t) izoláltunk módosított HotSHOT (*Hot Sodium Hydroxide and Tris*) módszerrel. Öt-öt lárvát használtunk a gDNS készlet (*pool*) készítéshez. Először 50 mM-os NaOH-ban, 95 °C-on inkubáltuk a lárvákat, míg

kvázi feloldódtak, majd 4 °C-ra visszahűtve, 1 M; pH 8 Tris-HCl-ot hozzáadva neutralizáltuk az oldatot. Ezt követően lecentrifugáltuk a mintákat, és a felülúszót használtuk a genotipizáló PCR reakcióhoz. (Meeker és mtsai. 2007).

Injektálási hatékonyság ellenőrzése PCR-rel

Kétféle primer párt használtunk a genotipizáláshoz: egy ún. vad típusú (WT), nem inszerció specifikus (abcc6a_ex2-F_att_gt; abcc6a_ex3-R_att_gt), illetve egy mutáns (Mut), azaz inszerció specifikus (abcc6a-attP-F; abcc6a_ex3-R_att_gt) kombinációt (1. táblázat). A PCR reakciót a DreamTaq (Thermo Fisher Scientific) DNS polimeráz alkalmazásával, a gyártói protokoll alapján végeztük. A Mut pozitív mintákból újabb PCR reakciót állítottunk össze egy intronikus primer párral (in1-F1; in2-R1), hogy a teljes második exont amplifikáljuk. Ehhez Q5 (New England Biolabs) nagy pontosságú (*high-fidelity*) DNS polimerázt használtunk. A PCR termékeket ezután fenol-kloroformos módszerrel tisztítottuk, majd több lépésben PGEM-t easy vektor plazmidhoz ligáltuk, LB-Amp, IPTG, X-Gal lemezre oltottuk, végül kolónia PCR-rel szelektáltuk az *attP* inszerciót hordozó fehér telepeket.

Primer neve	Primer szekvenciája (5'-3' irányban)
abcc6a_ex2-F_att_gt	CAGTCCTTGTGTGGGCTCCGTG
abcc6a_ex3-R_att_gt	ACTGCGCATGATGGGACTGAGC
abcc6a-attP-F	GAGTTCTCTCAGTTGGGGGCCG

1. táblázat: A genotipizáló PCR-ben alkalmazott primerek szekvenciája.

Sanger szekvenálás

Az inszerciót tartalmazó mintákat fenol-kloroformos módszerrel tisztítottuk, majd a Eurofins cég Sanger szekvenálási szolgáltatását igénybevéve meghatároztuk a nukleotid-sorrendjét.

abcc6a PhiC31 rekombináció

Az integrálódott *attP* szekvenciát hordozó egyedeinek, az *abcc6a^{ex2Tg[attP-he:tagRFP]}* vonal F1 generációjának, az utódjaiban teszteltük a PhiC31 rekombinációs rendszerünket *attB* donor plazmid bejuttatásával, mely tartalmazta a humán *ABCC6* szekvencia cDNS-ét és egy *crybb:eCFP* markert, mely szintén a könnyebb szelektálást segítette elő. Jelenleg ezt a hibrid szekvenciás megközelítést használjuk, ugyanakkor olyan plazmid konstrukciókat is előállítottunk már, amelyekkel kifejezhető lesz önmagában a teljes *open reading frame* (ORF) a megfelelő pozícióban.

A hordozó állatok mikroszkópos ellenőrzése

A homológ rekombináció ritkasága miatt és annak érdekében, hogy hatékonyabban tudjuk a hordozó állatokat leszelektálni, mint a hagyományos genotipizáló PCR-es módszerrel, a templát plazmidhoz hozzáadtunk egy *TagRFP* markert, amit a zebraahal kikelési enzimjét (*hatching enzyme*) kódoló génnek a promótere hajtott meg. Ennek segítségével fluoreszcens mikroszkóppal (Zeiss Stereo Lumar.V12) is detektálni tudtuk az *attP* szekvencia beépülését a zebraahal genomba.

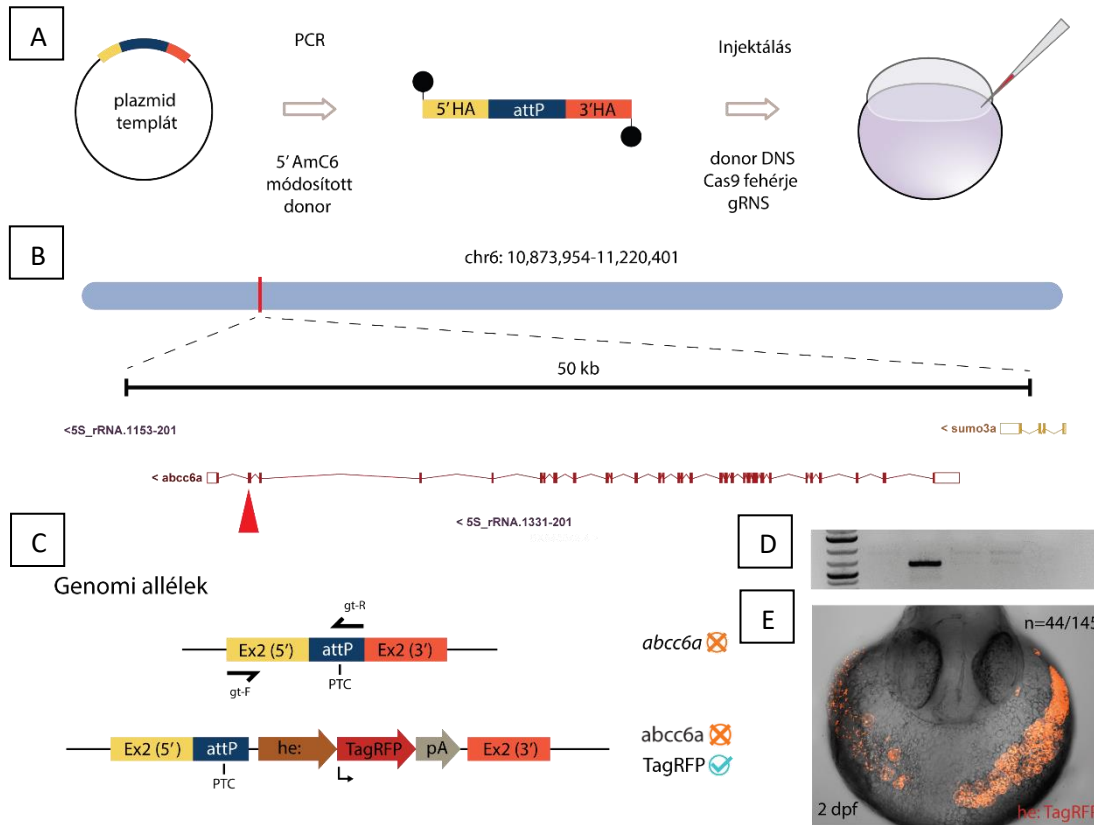
Hasonló elv alapján ellenőriztük a Φ C31 rekombináció sikerességét is. Az *attB* donor plazmidokban lévő szemlencse specifikus *crybb:eCFP* marker biztosította, hogy fluoreszcens mikroszkóppal detektálható legyen az integráció sikeressége a hordozó lárvák szemében kifejeződő zöldeskék jel alapján.

Alizarin Vörös festés

Alizarin Vörös (Alizarin Red S) festéket (0,5%-os) 1:10 arányban E3 médiummal (pH = 7) alkalmazva 20 percig festettük a humanizált *abcc6a*^{-/*hABCC6* elő} lárvákat. Ezt követően 75 mg/mL koncentrációjú tricane (MS-222) oldatban elaltattuk az állatokat, majd 2% alacsony olvadáspontú agaróz segítségével beágyaztuk őket, és fluoreszcens mikroszkóppal megvizsgáltuk a vázrendszeri fenotípusokat.

Eredmények

Az *attP* szekvencia bevitele az *abcc6a* genomi lókuszbba



5. ábra: **A.** Az *attP* szekvencia bejuttatásának lépései a zebrafishio embrióba. **B.** A célzott *abcc6a* gén genomi elhelyezkedése. **C.** Genomi allélek: *attP* szekvenciát hordozó donor, illetve a TagRFP markerrel kiegészített donor plazmid. **D.** Genotipizáló PCR gélképe az *attP* hordozó gDNS készletből lárvánként, a második mintában sikeres volt az integráció. **E.** Egy TagRFP markert hordozó lárvá fluoreszcens mikroszkópos képe.

Elsődleges célunk az volt, hogy *abcc6a* génbe célzottan bevigyük az *attP* szekvenciát. Ennek érdekében CRISPR alapú knock-in génszerkesztési eljárást alkalmaztunk. A homológ rekombinációhoz kétszálú DNS donor szekvenciát használtunk mely tartalmazta a Cas9 hasítási helyéhez közeli szekvenciákra specifikus rövid (48 bp hosszú) homológ karokat és a közöttük lévő transzgén konstrukciókat (5C ábra). Ezt az *abcc6a* második exonját targetáló CRISPR reagenssekkel együtt mikroinjektáltuk egy-sejtes állapotú halembriókba (5A,B ábra). Ezzel a módszerrel egyúttal *abcc6a* funkcióvesztéses mutánsokat hoztunk létre, ugyanis a transzgén integrációja kereteltolódással és korai terminációs kodon megjelenésével járt. Korábban az alapító (P0) állatokból genotipizáló PCR segítségével, izolált gDNS készletből azonosítottuk az *attP* szekvenciát hordozó lárvákat. Ezt két különböző, egy inszercióra nem specifikus (WT), illetve egy inszerció-specifikus (Mut) primer párral teszteltük (5C,D ábra). A gélkép alapján

legerősebb jelet mutató mintából újabb - lárvánként külön-külön elvégzett - allél-specifikus PCR segítségével azonosítottuk a tényleges hordozókat. A crispáns P0 vonalakra általánosan jellemző allélmozaikosság miatt ezt követően a PCR termékeket PGEM-t easy plazmidba ligáltuk. A baktérium telepek kék-fehér szelekciója után, kolónia PCR-rel ellenőriztük mely telepek tartalmaznak olyan plazmidokat melyek hordozzák az *attP* szekvenciát. Ezeket az allélokat Sanger szekvenálás segítségével validáltuk, melyből kiderült, hogy a legtöbb esetben az integráció hiba nélkül lezajlott (6. ábra). Néhány izolált allél esetében az integrálódott kazettától 3' irányban duplikációkat találtunk, melyek feltételezhetően a rekombináció melléktermékeként megjelent mutációk voltak.



6. ábra: Szekvenogram (Sanger szekvenálás). Sikeresen integrálódott a minimál *attP* hely.

Mivel eredeti módszerünkkel csak PCR felhasználásával lehetett genotipizálni az esetleges hordozó állatokat, egy olyan konstrukció létrehozását is elkezdtük, ami lehetővé tenné a gyorsabb, mikroszkópos beazonosítást a hordozó egyedeknek. Ehhez a donor DNS molekulánkat az *attP* szekvencia mellett egy piros *TagRFP* markerrel is elláttuk, melyet egy kikelési enzim promóter hajtott meg (5C ábra). Az mikroszkópos elemzések alapján kétnapos korukban 145 lárvából 44 lárvában láttuk a TagRFP fluoreszcens jelét, így ezekben az állatokban (feltételezhetően) integrálódott az *attP* szekvencia (5E ábra). Ezt az integrációt allél-specifikus PCR reakcióval is validáltuk, kimutatva a TagRFP-pozitív állatokban az *attP* szekvencia integrációját. Az eredmények alapján öt vizsgált egyedből négyben valóban integrálódott a transzgén kazettánk. Sanger szekvenálással igazoltuk, hogy valóban a várt módon, az *abcc6a* 2. exonjának kijelölt pozíciójában (5B ábra) történt az integráció, emellett nem várt mutáció (pl. duplikáció) már nem volt az inszerciós pont közelében. Végül a 12-ből összesen egy olyan állatot találtunk a felnőtt P0-ás generációban, aki csírvonalban is hordozta a helyes rekombináns allélt, ebből az állatból alapítottuk az *abcc6a^{ex2Tg[attP-he:tagRFP]}* vonalunkat,

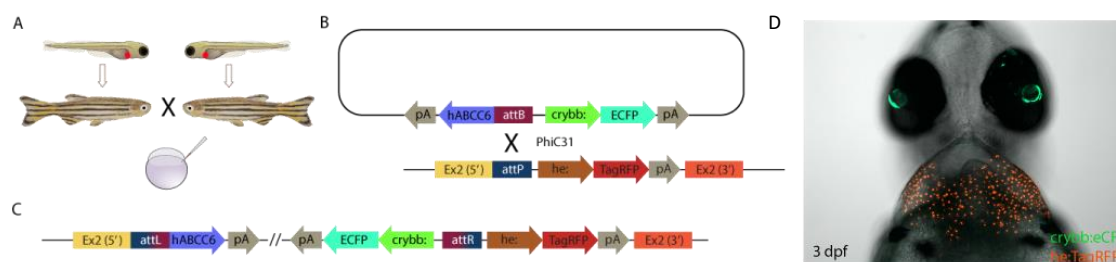
mely jelenleg az F2 generációnál tart. Az erre az allélra homozigóta állatok lárvális korban és felnőtt stádiumban is mutatták a funkcióvesztéses KO vonalra jellemző vázrendszeri fenotípust.

PhiC31-alapú rekombináció az *abcc6a* lókuszban

A PhiC31 rekombinációs rendszerre alapuló transzgenikus rendszer fejlesztése során ezidáig a zebradánió *abcc6a* funkcionális ortológjának vad típusú humán *ABCC6* szekvenciával való menekítésével próbálkoztunk. Fontos megjegyezni, hogy az irodalomban jelenleg nincsen adat a tekintetben, hogy az emberi *ABCC6* fehérje hal modellben expresszáltatva valóban funkcióképes lehet. Emiatt a kísérlet rizikós és menekítéses vizsgálattal kapcsolatos esetleges kudarc félrevezető lehet a transzgén konstrukciónk megbízhatóságára vonatkozóan. Emiatt laborunkban folyamatosan dolgozunk olyan új donor plazmidokon melyek megfelelő módszertani kontrollként szolgálhatnak a jövőben és segít ennek az újfajta metodológiai megközelítésnek az optimalizálást.

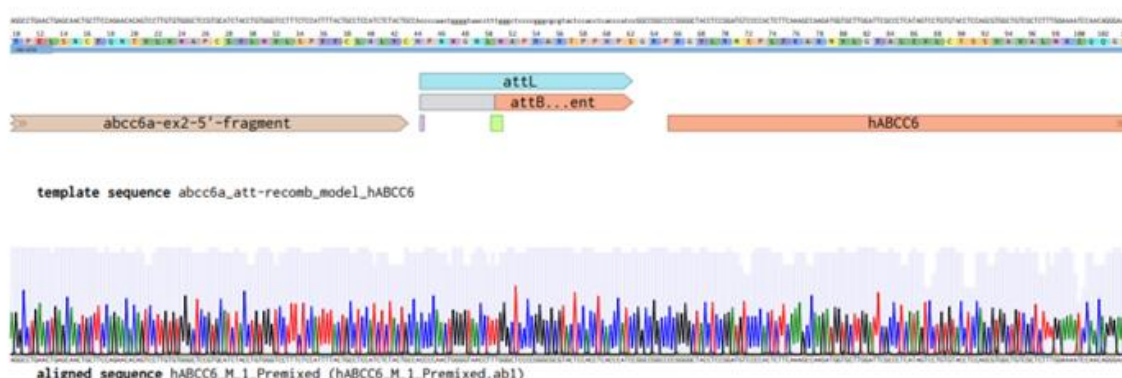
A humanizát halvonal létrehozásának következő lépéseként az *attB* szekvenciát is tartalmazó donor plazmid és a PhiC31 fehérje ko-injektálásával bejuttattuk a humán *ABCC6* gén cDNS-ét a korábban létrehozott *attP* szekvenciát hordozó (*abcc6a^{ex2Tg[attP-he:tagRFP]}*) vonal F1 generációjának az utódjaiba (7A ábra). A könnyebb szelekció érdekében donor plazmidjainkban egy szemlencse-specifikus *crybb:eCFP* markert is használtunk a *hABCC6* hordozó állatok azonosítására (7B,C ábra). Ennek a markernek köszönhetően a sikeres integrációt a lencsében megjelenő zöldeskék jel alapján fluoreszcens mikroszkóppal tudjuk azonosítani (7D ábra). Így tehát létrehoztunk egy hibrid szekvenciát, melynek az első részét a hal *abcc6a* másfél exonja, míg a második felét a bejuttatott humán *ABCC6* cDNS szekvencia megfelelő része képzik. A két fluoreszcens marker (eCFP, TagRFP) átíródása független a hibrid szekvenciától, számukra különálló promóterek biztosítják az aktivitást (7C ábra). Emellett említésre szorul, hogy a rekombinációval bekerül a donor plazmid gerince is. Emiatt mindent egybevetve egy közel 9.5 kb méretű inszerció keletkezik. Annak az esélye, hogy ezt követően a hal megmaradt *abcc6a* szekvenciája valamilyen alternatív iniciációs hely segítségével átíródik és a hal fehérje expressziója a natív állatokhoz hasonlóan nyilvánul meg, csekély. Ennek bizonyítására azonban további kísérletek szükségesek.

A célunk végső soron az lenne, hogy az integrálódott humán *ABCC6* gén expresszióját a vele funkcionális ortológiát mutató hal gén genomi környezete szabályozza.



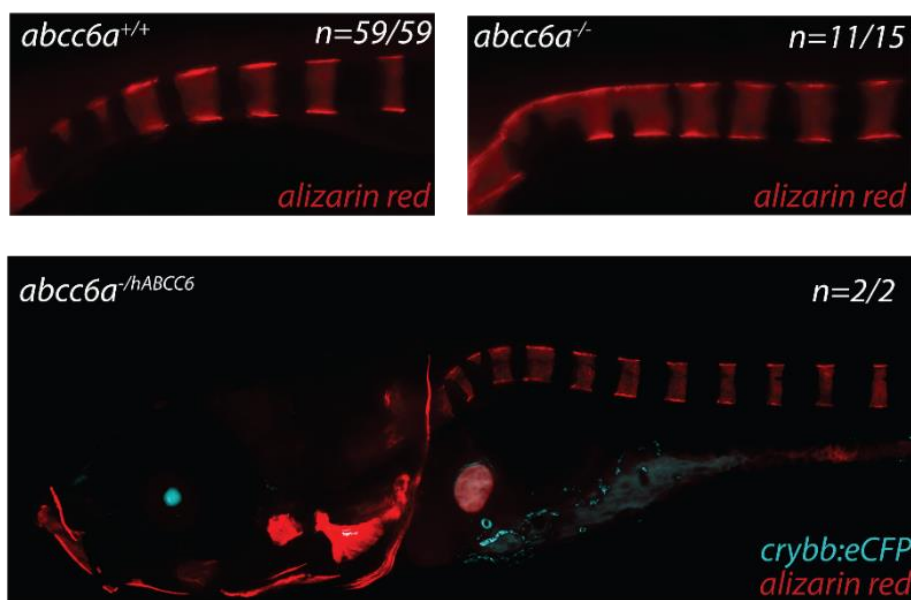
7. ábra: **A.** Az integrálódott attP szekvenciát hordozó, *abcc6a*^{ex2Tg[attP-he:tagRFP]} vonal F1 generációjának az utódjaiban teszteltük a PhiC31 rekombinációs rendszerünket. **B.** A humán ABCC6 szekvenciának a cDNS-ét beklónoztuk az attB donor szekvenciába, majd PhiC31 fehérje jelenlétében bejutattuk az attP szekvenciát hordozó embriókba. **C.** A könnyebb szelektálás érdekében egy crybb:eCFP markert is bejutattunk a hABCC6 szekvenciával. **D.** Egy attB donor plazmidot hordozó lárva mikroszkópos képe. A lárva szemében látható a crybb:eCFP marker miatti zöldeskék jel.

A PhiC31 helyspecifikus rekombinációs rendszerrel injektált, *hABCC6* szekvenciát mozaikosan hordozó egyedeket (*abcc6a*^{Tg[attL-hABCC6-crybb:eCFP-attR]}) felneveltük, majd az egyik csíravonalban is hordozó hal utódjaiban Sanger szekvenálással is igazoltuk a *hABCC6* szekvencia sikeres integrációját (8. ábra).



8. ábra: A *hABCC6* szekvencia bevitele a zebradánió genomba. A szekvenált adatok illesztése azt mutatja, hogy a *hABCC6* sikeresen integrálódott az attP kazetta pozíciójába.

Következő lépésben azt vizsgáltuk meg, hogy az emberi ABCC6 jelenléte képes-e kompenzálni az *Abcc6a* hiányát zebradánió lárvákban. Ehhez a humanizált transzgénikus kazettát hordozó egyedeket kereszteztük homozigóta *abcc6a* (KO) mutánsokkal és az *abcc6a*^{Tg[attL-hABCC6-crybb:eCFP-attR]} (továbbiakban *abcc6a*^{-hABCC6}) lárvákban vizsgáltuk a csontosodás mértékét.



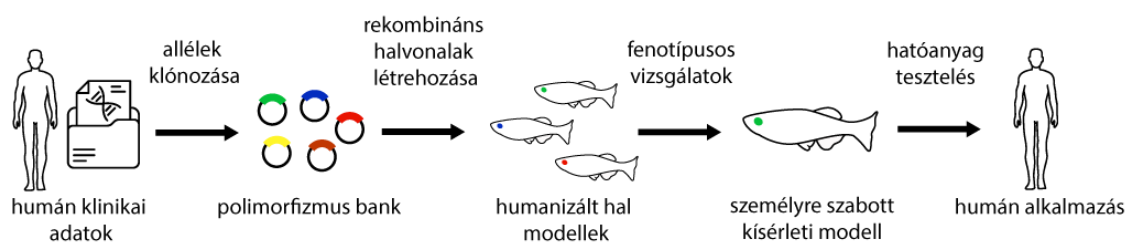
9. ábra: Alizarin Vörös festést követően készített fluoreszcens mikroszkópos képeken látszik, hogy a humanizált lárva csigolyáinak meszesedésének mértéke a vad típusú állatok fenotípusához hasonló, korai csigolya fúziós nem látható.

Alizarin Vörös festést követően a humanizált $abcc6a^{-/hABCC6}$ egyedekben fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. Megfigyeltük, hogy a heterozigóta állatok a homozigóta mutánsokra jellemző korai csigolya fúziós fenotípust nem mutatták, ami biztató jel arra, hogy a humán allél menekíteni tudja a fenotípust. Azonban az eddigi alacsony elemszám miatt, ennek igazolására további kísérletek szükségesek (9. ábra). Emellett az új transzgénünk transzkripció és transzláció hatékonyságával kapcsolatban sem állnak rendelkezésünkre jelenleg adatok. Ezeket a jövőben qPCR és Western Blot mérésekkel szeretnénk pótolni.

Diszkusszió

Az *ABCC6* patogén mutációi által okozott spektrumbetegség diverz kórlefolyására ható különböző környezeti (pl. kor, életmód) és genetikai (pl. hordozott polimorfizmus) faktorok ez idáig kevésbé ismertek. Különösen abban a tekintetben, hogy az ilyen faktorok kombinatorikus hatására hogyan változtat a betegség progresszióján és megjelenésén (pl. PXE vagy GACI jellegű). Előfordulhat, hogy a polimorfizmus jellegéből fakadóan az adott páciens egy teljesen eltérő klinikai megközelítést igényelhet. Erre jó példa, hogy bizonyos, az *ABCC6* fehérje szerkezetét érintő variánsoknál, ahol a mutáció miatt a fehérje nem megfelelően tekeredik fel, így nem tud kijutni a sejtmembránba, kezelhető lehet kémiai chaperon készítményekkel (Pomozi és mtsai. 2014).

Az általunk kifejlesztett PhiC31 rekombináció-alapú *in vivo* rendszerrel a zebradánió *abcc6a* funkcionális ortológ szekvenciáját részlegesen helyettesítettük a humán vad típusú *ABCC6* szekvenciával. Ezáltal a szekvencia nagy részét a humán gén kódolja, ám magát a génkifejezést, reményeink szerint továbbra is a zebradánió gén genomi környezete irányítja. A transzgén által kódolt fehérje funkcionális kiértékelése még jelenleg is zajlik. További előnye a módszernek, hogy helyspecifikus (az integráció nem random történik) és ellentétben a más génbeviteli módszerekkel gyakran előforduló kópiaszám eltérések kiküszöbölhetőek.



10. ábra: Transzgenikus recipiens zebrahárvonal létrehozásának és alkalmazásának sematikus folyamatábrája.

A létrehozott humanizált transzgenikus platform segítségével lehetőségünk nyílik a patogén *ABCC6* variánsok szekvenciájának a halgenomba történő, viszonylag gyors és rutinszerű bejuttatására (10. ábra). Ennek segítségével akár személyre szabottan is vizsgálhatóvá válnak az egyes polimorfizmusok kórlefolyásra gyakorolt hatásai. Ráadásul az így létrehozott *in vivo* modellek specifikus hatóanyagtesztelésnek vethetők alá. Jövőbeni terveink között szerepel egy olyan plazmid könyvtár létrehozása, mely tartalmazza a leggyakrabban előforduló *ABCC6* patogén variánsok szekvenciáit. Ez sokkal költséghatékonyabb és célzott *in vivo* gyógyszer hatóanyag tesztelésre ad lehetőséget (Gibert, Trengove, és Ward 2013). Reményeink szerint az

új rendszerünk, a más modell organizmusokban (például egereken) történő teszteléshez képest jóval gyorsabb és költséghatékonyabb megoldást biztosít majd a jövőben.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Varga Máté és Czimer Dávid témavezetőimnek, hogy lehetőséget adtak a kutatási projektjükben való részvételre. Nagyra értékelem, hogy időt és energiát nem sajnálva, végtelen türelemmel és hasznos tanácsokkal segítették a munkámat, hozzájárulva a szakmai fejlődésemhez. Hálás vagyok a támogatásukért és a bizalmukért, amelyek nélkül e dolgozat megírása nem valósulhatott volna meg. Nem utolsósorban szeretnék köszönetet mondani a labor többi tagjának is, akiknek a feltétel nélküli segítőkészsége sokat jelentett számomra a munka során.

Irodalomjegyzék

- Aksoy, Yagiz A., David T. Nguyen, Sharron Chow, Roger S. Chung, Gilles J. Guillemin, Nicholas J. Cole, és Daniel Hesselson. 2019. „Chemical Reprogramming Enhances Homology-Directed Genome Editing in Zebrafish Embryos”. *Communications Biology* 2(1): 198. doi:10.1038/s42003-019-0444-0.
- Aleström, Peter, Livia D’Angelo, Paul J Midtlyng, Daniel F Schorderet, Stefan Schulte-Merker, Frederic Sohm, és Susan Warner. 2020. „Zebrafish: Housing and Husbandry Recommendations”. *Laboratory Animals* 54(3): 213–24. doi:10.1177/0023677219869037.
- Bearce, E. A., Ricamona, B. T. B., Fisher, K. H., O’Hara-Smith, J. R., és Grimes, D. T. 2023. Visualization and quantitation of spine deformity in zebrafish models of scoliosis by micro-computed tomography. *STAR protocols* 4(4), 102739. doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102739
- Bergen, Arthur A.B., Astrid S. Plomp, Ellen J. Schuurman, Sharon Terry, Martijn Breuning, Hans Dauwerse, Jaap Swart, és mtsai. 2000. „Mutations in ABCC6 Cause Pseudoxanthoma Elasticum”. *Nature Genetics* 25(2): 228–31. doi:10.1038/76109.
- Bisaccia, Faustino, Prashant Koshal, Vittorio Abruzzese, Maria Antonietta Castiglione Morelli, és Angela Ostuni. 2021. „Structural and Functional Characterization of the ABCC6 Transporter in Hepatic Cells: Role on PXE, Cancer Therapy and Drug Resistance”. *International Journal of Molecular Sciences* 22(6): 2858. doi:10.3390/ijms22062858.
- Czimer, Dávid, Klaudia Porok, Dániel Csete, Zsolt Gyüre, Viktória Lavró, Krisztina Fülöp, Zelin Chen, és mtsai. 2021. „A New Zebrafish Model for Pseudoxanthoma Elasticum”. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9: 628699. doi:10.3389/fcell.2021.628699.
- Dedinszki, Dóra, Flóra Szeri, Eszter Kozák, Viola Pomozi, Natália Tőkési, Tamás Róbert Mezei, Kinga Merczel, és mtsai. 2017. „Oral Administration of Pyrophosphate Inhibits Connective Tissue Calcification”. *EMBO Molecular Medicine* 9(11): 1463–70. doi:10.15252/emmm.201707532.
- Finger, Robert P., Peter Charbel Issa, Markus S. Ladewig, Christian Götting, Christina Szliska, Hendrik P.N. Scholl, és Frank G. Holz. 2009. „Pseudoxanthoma Elasticum: Genetics, Clinical Manifestations and Therapeutic Approaches”. *Survey of Ophthalmology* 54(2): 272–85. doi:10.1016/j.survophthal.2008.12.006.
- Gibert, Y., M.C. Trengove, és A.C. Ward. 2013. „Zebrafish As a Genetic Model in Pre-Clinical Drug Testing and Screening”. *Current Medicinal Chemistry* 20(19): 2458–66. doi:10.2174/0929867311320190005.
- Hacker, Steven M., Francisco A. Ramos-Caro, Betsy B. Beers, és Franklin P. Flowers. 1993. „Juvenile Pseudoxanthoma Elasticum: Recognition and Management”. *Pediatric Dermatology* 10(1): 19–25. doi:10.1111/j.1525-1470.1993.tb00005.x.

- Jansen, Robert S., Suzanne Duijst, Sunny Mahakena, Daniela Sommer, Flóra Szeri, András Váradi, Astrid Plomp, és mtsai. 2014. „ABCC6–Mediated ATP Secretion by the Liver Is the Main Source of the Mineralization Inhibitor Inorganic Pyrophosphate in the Systemic Circulation—Brief Report”. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 34(9): 1985–89. doi:10.1161/ATVBAHA.114.304017.
- Jiang, Q., Oldenburg, R., Otsuru, S., Grand-Pierre, A. E., Horwitz, E. M., és Uitto, J. 2010. Parabiotic heterogenetic pairing of Abcc6-/-/Rag1-/- mice and their wild-type counterparts halts ectopic mineralization in a murine model of pseudoxanthoma elasticum. *The American journal of pathology* 176(4), 1855–1862. doi.org/10.2353/ajpath.2010.090983
- Kawai, Kenji, Yu Sato, Rika Kawakami, Atsushi Sakamoto, Anne Cornelissen, Masayuki Mori, Saikat Kumar Ghosh, és mtsai. 2022. „Generalized Arterial Calcification of Infancy (GACI): Optimizing Care with a Multidisciplinary Approach”. *Journal of Multidisciplinary Healthcare* Volume 15: 1261–76. doi:10.2147/JMDH.S251861.
- Kranenburg, Guido, Annette F. Baas, Pim A. De Jong, Folkert W. Asselbergs, Frank L.J. Visseren, és Wilko Spiering. 2019. „The Prevalence of Pseudoxanthoma Elasticum: Revised Estimations Based on Genotyping in a High Vascular Risk Cohort”. *European Journal of Medical Genetics* 62(2): 90–92. doi:10.1016/j.ejmg.2018.05.020.
- Kroll, François, Gareth T Powell, Marcus Ghosh, Gaia Gestri, Paride Antinucci, Timothy J Hearn, Hande Tunbak, és mtsai. 2021. „A Simple and Effective F0 Knockout Method for Rapid Screening of Behaviour and Other Complex Phenotypes”. *eLife* 10: e59683. doi:10.7554/eLife.59683.
- Le Saux, Olivier, Zsolt Urban, Cordula Tschuch, Katalin Csiszar, Barbara Bacchelli, Daniela Quaglino, Ivonne Pasquali-Ronchetti, és mtsai. 2000. „Mutations in a Gene Encoding an ABC Transporter Cause Pseudoxanthoma Elasticum”. *Nature Genetics* 25(2): 223–27. doi:10.1038/76102.
- Lebwohl, Mark, Jonathan Halperin, és Robert G. Phelps. 1993. „Occult Pseudoxanthoma Elasticum in Patients with Premature Cardiovascular Disease”. *New England Journal of Medicine* 329(17): 1237–39. doi:10.1056/NEJM199310213291705.
- Li, Qiaoli, Jianhe Huang, Anthony B. Pinkerton, Jose Luis Millan, Bertrand D. Van Zelst, Michael A. Levine, John P. Sundberg, és Jouni Uitto. 2019. „Inhibition of Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase Attenuates Ectopic Mineralization in the Abcc6 Mouse Model of PXE but Not in the Enpp1 Mutant Mouse Models of GACI”. *Journal of Investigative Dermatology* 139(2): 360–68. doi:10.1016/j.jid.2018.07.030.
- Matsuzaki, Yasushi, Aoi Nakano, Qiu-Jie Jiang, Leena Pulkkinen, és Jouni Uitto. 2005. „Tissue-Specific Expression of the ABCC6 Gene”. *Journal of Investigative Dermatology* 125(5): 900–905. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23897.x.
- Meeker, Nathan D., Sarah A. Hutchinson, Linh Ho, és Nikolaus S. Trede. 2007. „Method for Isolation of PCR-Ready Genomic DNA from Zebrafish Tissues”. *BioTechniques* 43(5): 610–14. doi:10.2144/000112619.

- Meyer, John L. 1984. „Can Biological Calcification Occur in the Presence of Pyrophosphate?” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 231(1): 1–8. doi:10.1016/0003-9861(84)90356-4.
- Mi, Jiarui, és Olov Andersson. 2022. *Efficient Knock-in Method Enabling Lineage Tracing in Zebrafish*. Genetics. preprint. doi:10.1101/2022.07.15.500272.
- Naouri, M., C. Boisseau, P. Bonicel, P. Daudon, D. Bonneau, N. Chassaing, és L. Martin. 2009. „Manifestations of Pseudoxanthoma Elasticum in Childhood”. *British Journal of Dermatology* 161(3): 635–39. doi:10.1111/j.1365-2133.2009.09298.x.
- Nitschke, Yvonne, Geneviève Baujat, Ulrike Botschen, Tanja Wittkamp, Marcel du Moulin, Jacqueline Stella, Martine Le Merrer, és mtsai. 2012. „Generalized Arterial Calcification of Infancy and Pseudoxanthoma Elasticum Can Be Caused by Mutations in Either ENPP1 or ABCC6”. *The American Journal of Human Genetics* 90(1): 25–39. doi:10.1016/j.ajhg.2011.11.020.
- O’Neill, W.C. 2007. „The Fallacy of the Calcium-Phosphorus Product”. *Kidney International* 72(7): 792–96. doi:10.1038/sj.ki.5002412.
- Pfau, Kristina, Imre Lengyel, Jeannette Ossewaarde-van Norel, Redmer Van Leeuwen, Sara Risseuw, Georges Leftheriotis, Hendrik P.N. Scholl, és mtsai. 2024. „Pseudoxanthoma Elasticum – Genetics, Pathophysiology, and Clinical Presentation”. *Progress in Retinal and Eye Research* 102: 101274. doi:10.1016/j.preteyeres.2024.101274.
- Plomp, Astrid S., Ralph J. Florijn, Jacoline Ten Brink, Bruce Castle, Helen Kingston, Ana Martín-Santiago, Theo G. M. F. Gorgels, Paulus T. V. M. de Jong, és Arthur A. B. Bergen. 2008. „ABCC6 Mutations in Pseudoxanthoma Elasticum: An Update Including Eight Novel Ones”. *Molecular Vision* 14: 118–24.
- Pomozi, Viola, Christopher Brampton, Krisztina Fülöp, Li-Hsieh Chen, Ailea Apana, Qiaoli Li, Jouni Uitto, Olivier Le Saux, és András Váradi. 2014. „Analysis of Pseudoxanthoma Elasticum-Causing Missense Mutants of ABCC6 in Vivo; Pharmacological Correction of the Mislocalized Proteins”. *The Journal of Investigative Dermatology* 134(4): 946–53. doi:10.1038/jid.2013.482.
- Pomozi, Viola, Christopher Brampton, Koen Van De Wetering, Janna Zoll, Bianca Calio, Kevin Pham, Jesse B. Owens, és mtsai. 2017. „Pyrophosphate Supplementation Prevents Chronic and Acute Calcification in ABCC6-Deficient Mice”. *The American Journal of Pathology* 187(6): 1258–72. doi:10.1016/j.ajpath.2017.02.009.
- Rutsch, Frank, Nico Ruf, Sucheta Vaingankar, Mohammad R. Toliat, Anita Suk, Wolfgang Höhne, Galen Schauer, és mtsai. 2003. „Mutations in ENPP1 Are Associated with »idiopathic« Infantile Arterial Calcification”. *Nature Genetics* 34(4): 379–81. doi:10.1038/ng1221.
- Sánchez-Tévar, Ana María, María García-Fernández, Belén Murcia-Casas, José Rioja-Villodres, Juan Luis Carrillo, Marta Camacho, Matthias Van Gils, és mtsai. 2019. „Plasma inorganic pyrophosphate and alkaline phosphatase in patients with pseudoxanthoma elasticum”. *Annals of Translational Medicine* 7(24): 798–798. doi:10.21037/atm.2019.12.73.

- Schneider, T., H. P. Apel, A. Kuhlwein, H. Mensing, és G. Schaeg. 1984. „[Groenblad-Strandberg syndrome]”. *Zeitschrift Fur Hautkrankheiten* 59(19): 1290–92, 1297–1300.
- St. Hilaire, Cynthia, Shira G. Ziegler, Thomas C. Markello, Alfredo Brusco, Catherine Groden, Fred Gill, Hannah Carlson-Donohoe, és mtsai. 2011. „*NT5E* Mutations and Arterial Calcifications”. *New England Journal of Medicine* 364(5): 432–42. doi:10.1056/NEJMoa0912923.
- Urry, D. W. 1971. „Neutral Sites for Calcium Ion Binding to Elastin and Collagen: A Charge Neutralization Theory for Calcification and Its Relationship to Atherosclerosis”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 68(4): 810–14. doi:10.1073/pnas.68.4.810.
- Van Wynsberghe, Judith, és Olivier Vanakker. 2023. „Significance of Premature Vertebral Mineralization in Zebrafish Models in Mechanistic and Pharmaceutical Research on Hereditary Multisystem Diseases”. *Biomolecules* 13(11): 1621. doi:10.3390/biom13111621.
- vandenBerg, JanS.P., Raoul C.M. Hennekam, Jan R.M. Cruysberg, Peter M. Steijlen, Jaap Swart, Nel Tijmes, és Martien Limburg. 2000. „Prevalence of Symptomatic Intracranial Aneurysm and Ischaemic Stroke in Pseudoxanthoma Elasticum”. *Cerebrovascular Diseases* 10(4): 315–19. doi:10.1159/000016076.
- Villa-Bellosta, Ricardo, és W. Charles O'Neill. 2018. „Pyrophosphate Deficiency in Vascular Calcification”. *Kidney International* 93(6): 1293–97. doi:10.1016/j.kint.2017.11.035.