



SZENT ISTVÁN EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR
Ökotoxikológus MSc
II. évf.

**Transzgenikus zebradánió /*Danio rerio*/ vonal létrehozása ösztrogén hatású
anyagok *in vivo* nyomonkövetésére**

Készítette:

Bencsik Dóra

Belső témavezető:

Dr. Csenki Zsolt Imre, tanszéki mérnök
Bakos Katalin, tanszéki mérnök
Dr. Kovács Balázs, tudományos főmunkatárs

Intézet és Tanszék neve

Szent István Egyetem,
Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet, Halgazdálkodási Tanszék

Gödöllő
2012

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	2
2. Bevezetés	3
3. Célkitűzés	4
4. Irodalmi áttekintés	5
4.1. A hormonrendszer működését zavaró anyagok.....	5
4.1.1. Ösztrogén hatású anyagok a vízi környezetben	7
4.2. A hormonálisan aktív anyagok csoportosítása Darvas et al. (2010) szerint:.....	8
4.3. Az állatmodellek szerepe a biológiai kutatásokban	9
4.4. A halon történő tesztelés előnyei	10
4.5. A leggyakoribb laboratóriumokban használt halfajok	10
4.6. A zebradanió	11
4.6.1. A zebradanió rendszertani besorolása:.....	11
4.6.2. A faj jellemzése	11
4.6.3. A zebradanió, mint a toxikológiai vizsgálatok modellállata.....	12
4.6.4. Zebradanió embrió modell a környezeti kockázatelemzésben.....	13
4.6.5. Bioszenzor zebradanió vonalak	14
4.7. A transzgenikus állatok előállításának története, szerepük az alapkutatásban	14
4.7.1. A transzgenikus halak előállításának története	15
4.7.1.1. Génbevitel halakba mikroinjektálással	16
4.7.1.2. Egyéb módszerek a transzgének halakba történő bejuttatására	16
4.8. Fluoreszcens fehérjék	17
4.9. A polimeráz láncreakció	18
4.10. Gateway klónozási technika.....	21
4.11. Tol2- transzpozon.....	22
4.12. A Tol2 transzpozont felhasználó Gateway klónozás menete	23
4.13. A vitellogenezis folyamata és a vitellogenin.....	24
4.14. Vitellogenin gének zebradanióban	25
5. Anyag és módszer.....	26
5.1. DNS-tisztítás	26
5.2. DNS koncentráció és tisztaság meghatározása	26
5.3. Primertervezés	27
5.4. PCR reakciók	28
5.4.1. A promóter régió felsokszorozása	28
5.4.2. Az ECFP-t kódoló szakasz felsokszorozása	29
5.5. Agaróz gélelektroforézis	30
5.6. Fragment tisztítás agaróz gélből.....	31
5.7. Klónozás.....	31
5.7.1. BP klónozás	31
5.7.2. LR klónozás	33
5.8. Transzformálás baktériumba	34
5.9. Plazmid tisztítás	34
5.10. Restrikciós emésztés	35
6. Eredmények	36
6.1. Primerek tervezése	36
6.2 A beépítendő szakaszok felsokszorozása	38
6.3 A fragmentek beépítése a konstrukcióba	39
7. Következtetések és javaslatok	43
8. Összefoglalás	44
9. Irodalomjegyzék	45
10. Köszönetnyilvánítás	51

2. Bevezetés

A kommunális szennyvizekkel, ipari és mezőgazdasági tevékenységgel egyre több ösztrogén hatású anyag kerül a környezetbe. Ezek az anyagok a természetes ösztrogének analógjaiként működve komoly veszélyt jelentenek az élő szervezetek hormonháztartására, ezért egyre nagyobb igény mutatkozik az ilyen anyagok kimutatására és hatásának vizsgálatára alkalmas modellrendszerek iránt. A kutatók figyelme részben a költségek csökkentése érdekében, részben az egyre szigorodó állatvédelmi előírások miatt az emlős modellek helyett egyre inkább az egyéb gerincesek felé irányul.

A zebradánió (*Danio rerio*) fejlődésbiológiai és genetikai szempontból is az egyik legjobban ismert halfaj. Széleskörűen alkalmazzák ilyen jellegű vizsgálatok alanyaként, de toxikológiai célú felhasználása is elterjedt. Receptorai és az egyes folyamatok élettani és molekuláris biológiai háttere nagymértékű hasonlóságot mutat az emlősökével és az emberével. Mivel a zebradánió embriók áttetszőek, a fluoreszcens fehérjéket expresszáló transzgenikus vonalak lárváiban a jelölt célszervek jól tanulmányozhatók.

3. Célkitűzés

Munkánk során célunk egy olyan génkonstrukció létrehozás volt, amelyben a fluoreszcens riporter fehérje (CFP-*Cyan Fluorescent Protein*) kifejeződése egy májspecifikus, ösztrogén hatású anyagokkal indukálható promóter irányítása alatt áll. A konstrukcióval a későbbiek során egy a májában ösztrogén hatású anyagok jelenlétében kék fluoreszcens jelet adó transzgénikus vonalat kívánunk létrehozni.

4. Irodalmi áttekintés

4.1. A hormonrendszer működését zavaró anyagok

A hormonrendszert zavaró anyag (*endocrine-disrupting chemical-EDC*) az Egyesült Államok Környezetvédelmi Ügynöksége (EPA) definíciója szerint olyan exogén ágens, amely beavatkozik a vérben szállított, a homeosztázisért, reprodukcióért és a fejlődési folyamatokért felelős hormonok szintézisébe, szekréciójába, transzportjába, metabolizmusába, kötődőképességébe és eliminációjába.

Ezek a vegyületek főként antropogén forrásokból kerülnek a szennyvízbe vagy a talajvízbe, majd onnan a természetes vizekbe. Ilyen anyagot tartalmaznak az iparban és a háztartásokban használt készítmények (például mosóporok, gyártási- és élelmiszeripari adalékok), a különböző gyógyszerek és hormonkészítmények (pl. fogamzásgátló tabletták, nem-szteroid gyulladásgátlók) növényvédő szerek (pl. DDT, atrazin), ipari melléktermékek (például PAH, dioxin) de ismert néhány természetes hormonhatású anyag is (pl. fitoösztrogének) (LYE ET AL., 1999; RUDEL ET AL., 1998). Ezen anyagok között vannak olyan szintetikus vegyületek, úgynevezett xenoösztrogének, melyek ösztrogén-receptor agonistaként viselkednek, olyan hatásokat kiváltva, mint a természetes eredetű szteroid hormonok. A természetes ösztrogének fő forrása az emberi szervezet, hiszen egy nő napi ösztrogén kibocsátása néhány tíz mikrogrammos nagyságrendtől akár 30 milligrammig is terjedhet, amennyiben egy várandós nőről van szó (ALDERCRUETZ ET AL. 1994). További forrás lehet a rák bizonyos fajtáinak, az osteoporózisnak, a változó kori panaszoknak és a hipogonadizmusnak a kezelésére alkalmazott konjugált ösztrogének természetbe kerülése. Ezen szerekből megközelítőleg 1700 kg kerül felhasználásra csak az Egyesült Államok területén évente (ARCAND-HOY ET AL. 1998). Európában a tisztított szennyvízzel kikerülő 17β -ösztradiol és ösztron koncentrációja néhány ng/l –től a több száz ng/l –ig változik (DESBROW ET AL. 1998, BARONTI ET AL. 2000), míg ez az adat az USA területén a kimutatási küszöb alatti mennyiségtől 3,7 ng/l-ig változik (SNYDER ET AL. 1999). Nagy –Britannia folyóiban nem ritka, hogy a vízhozam közel felét a beömlő tisztított szennyvizek teszik ki. Az elfolyó vizek gyakran 100 ng/l feletti ösztrogénkoncentrációval rendelkeznek, a felszíni vizekben kialakuló koncentráció függ a beömlés helyétől való távolságtól, a víz mikrobiális aktivitásától, valamint különféle fizikokémiai jellemzőktől. Főként az ösztradiol felelős az angliai tisztított szennyvizek ösztrogén-aktivitásáért (DESBROW ET AL. 1998).

Ez a csoport tehát meglehetősen változatos és elterjedt világszerte, a különböző országok között vannak viszont eltérések, attól függően, hogy bizonyos anyagokat mikor vontak ki a

forgalomból. Az iparosodott területeken megfigyelhető az iparhoz köthető vegyi anyagok széles körének felhalmozódása, melyek könnyűszerrel a talajba, majd a talajvízbe szivároghatnak, innen pedig a táplálékláncba kerülhetnek. A szervezetbe való bejutás történhet szennyezett ivóvízzel, szennyezett levegő belégzésével, ételen keresztül, valamint a szennyezett talajjal való érintkezéssel. Ennek köszönhetően a peszticidekkel és ipari vegyi anyagokkal dolgozó személyeknél megnő a szaporodásbiológiai és hormonális rendellenességek kialakulásának esélye.

Néhány iparilag fontos EDC anyagot úgy terveztek és állítottak elő, hogy perzisztensek legyenek, ám technológiai előnyük sajnos károsnak bizonyult a vadvilág és az emberek szempontjából is. Az efféle anyagoknál fennáll annak a veszélye, hogy nehezen bekövetkező bomlásuk során az anyamolekulánál toxikusabb metabolit keletkezik (CALAFAT & NEEDHAMT 2007).

Az EDC vegyületek eltörljék a hormonok természetes egyensúlyát az élő szervezetekben, hatással vannak a szaporodásra és az egyedfejlődésre, valamint a természetes hormonok analógjaiként működve számos káros biológiai hatást (például torzulások, fejlődési zavarok) eredményeznek (KAVLOCK ET AL., 1996).

Először úgy vélték, hogy az EDC anyagok elsődlegesen a sejtmagi hormonreceptorokon keresztül fejtik ki hatásukat, beleértve az ösztrogén, androgén, progeszteron, tiroid és retinoid receptorokat. A tudomány mai állása szerint ezek a mechanizmusok azonban bonyolultabbak, mint korábban gondolták: Az endokrin rendszert zavaró anyagok a sejtmagi receptorkon, a nem sejtmagi (sejtfelszíni) szteroid receptorkon, valamint a nonszteroid receptorokon, mint például a szerotonin, dopamin és norepinefrin receptorok, is képesek kifejteni hatásukat (KUIPER ET AL. 1998, DICKERSON ET AL. 2007). Aril- szénhidrogén receptorok működését is befolyásolhatják. Egyes dioxinok és poliklórozott bifenilek például aryl-hidrocarbon-receptor antagonisták. Az ezen receptoron keresztüli hatások rendkívül összetettek, számos szervrendszerre kiterjednek, közvetett módon számos hormon szintjét és működését befolyásolják (DARVAS ET AL. 2010).

Hatásukat nagyban befolyásolja, hogy a szervezet mely életszakaszban érintkezik az adott anyaggal. A felnőtt életszakaszban történő behatás következménye merőben más lehet, mint a magzati vagy fiatal korban történteké. BARKER (2003) megállapítása szerint a fejlődő szervezet környezete, mely magában foglalja a fejlődésnek teret adó méhet vagy tojást, valamint a külső környezetet, kapcsolatban áll az egyed génjeivel. Ez meghatározó lehet egy későbbi életszakaszban jelentkező betegség vagy diszfunkció kialakulásában. Ez a hatás generációkon is átívelhet, a hatás kifejlődhet olyan, a génexpressziót szabályozó folyamatokon keresztül, mint a DNS metiláció és a hiszton acetiláció.

A hormonrendszert zavaró anyagok különböző típusainak lehet additív és szinergista hatása is (CREWS ET AL. 2003). Vizsgálatuk során kiderült, hogy elenyészően kevés mennyiség is

reproduktív vagy hormonális rendellenességet okozhat, főként ha a kritikus fejlődési szakaszban érintkezik vele a szervezet (SHEEHAN ET AL. 1999).

Azon hormonrendszert zavaró anyagoknak, melyek perzistensek, közös tulajdonságuk, hogy vízben rosszul oldódnak, lipidekben viszont kitűnően, ezért könnyen akkumulálódnak magas zsírtartalmú szövetekben.

A perzisztens szerves szennyezőknek (POP) kitett tengeri kagylókban pszeudo-hermafroditizmust figyeltek meg, míg halakban hermafroditizmus kialakulását és az ikrásokban vitellogenin termelését írták le. Pumáknál rejtettheréjűséget, míg főkahímek esetében csökkent fertilitást figyeltek meg. Emberen is tapasztalták a rejtettheréjűség (*cryptorchismus*) jelenségét, valamint gyakoribbá vált a korai hererák, és a nyitott húgycső (*hypospadiasis*) kialakulása is. Laboratóriumi patkányok és egerek esetében a POP- vegyületeket említi és ivarszervi, valamint pajzsmirigy daganatokkal hozták összefüggésbe (DARVAS ET AL. 2010).

4.1.1. Ösztrogén hatású anyagok a vízi környezetben

Mint már korábban említésre került, a vegyi anyagok igen széles skálája tartozik az ösztrogén hatású vegyületek közé, beleértve a természetes eredetűeket és a mesterségeseket is. Sok esetben ezen vegyületekről csak véletlenül derült ki, hogy ösztrogén hatással rendelkeznek (SOTO ET AL. 1991, KRISHNAN ET AL. 1993). Már 1995-ben is több mint 60 000 mesterségesen előállított kemikália volt a mindennapos használatban, olyan területeken, mint a mezőgazdaság, petrokémia, műanyagipar, a szappan és detergens gyártás. Megbecsülni is nehéz, hogy ezeknek hány bomlásterméke alakult ki a felhasználásuk után, ezért valószínű, hogy a most ösztrogén hatásúként nyilvántartott vegyületek száma csak töredéke a lehetségesnek (SUMPTER&JOBILING 1995).

A fentebb említett tevékenységek egytől egyig rengeteg vegyianyaggal szennyezik a környezetünket. Megdöbbentő adat, hogy alkilfenol-poli-etoxilátokból megközelítőleg 300 000 tonnát használnak fel évente, melynek körülbelül 60%-a a vízi környezetbe kerül, ahol perzisztens, ösztrogén hatású bomlástermékeik keletkeznek (SUMPTER&JOBILING 1993).

Ha becsülni akarjuk az ösztrogén hatású anyagok által okozott szennyezés hatását a vízi környezetre, akkor két fő tényezőt kell figyelembe venni: az egyik a potenciális ösztrogénhatás mértéke, a másik pedig a környezeti koncentráció. Ez utóbbiról szinte lehetetlen reális becslést adni, hiszen sokféle vízből, sokféle technikával vett és vizsgált mintákból származnak az irodalomban fellelhető adatok.

A potenciális ösztrogén hatás vizsgálatát illetően megállapították, hogy az eddig felfedezett, a környezetben előforduló ösztrogén hatású vegyületek csak kis mértékben fejtik ki ezt a hatásukat.

A potenciáljuk nagyon változó, de a legtöbbnek három- négy nagyságrenddel kisebb, mint a 17 β -ösztradiol esetében.(WHITE ET AL. 1994).

4.2. A hormonálisan aktív anyagok csoportosítása Darvas et al. (2010) szerint:

a., Természetes eredetű hormonálisan aktív anyagok

Mikoösztrogének-fuzariotoxinok

Fitoösztrogének-flavonoidok

Állati eredetű szexuál-szteroidok

b., Szintetikus eredetű hormonálisan aktív anyagok

Gyógyszerek

Androgén hatású vegyületek

Ösztrogén hatású vegyületek

Progesztogén hatású vegyületek

Ipari eredetű környezetszennyezők

Policiklusos aromás szénhidrogének

Polihalogénezett aromás szénhidrogének

Alkil- és biszfenolok:

Alkil ftalátok

Sztirol oligomerek

Tributil-ón és származékai

Mezőgazdaságban használt, endokrin rendszert zavaró anyagok

Zoocidek-klórozott szénhidrogének

Fungicidek-EBDC-szárazékok

Herbicidek-triazinszármazékok

4.3. Az állatmodellek szerepe a biológiai kutatásokban

Az orvosi, orvos-biológiai, toxikológiai kutatásokban a modellek alkalmazása napjainkban már általánosnak mondható. A modellalkotás két alapvető formája az *in vitro* (mesterséges környezetben, szó szerint „üvegben” vagy lombikban) és az *in vivo* „élőben” (vagyis magában az élő szervezetben) kialakított modell. Ma az orvostudományban leggyakrabban alkalmazott *in vitro* modellek közé az alábbiakat soroljuk:

- Egész szerv perfúziója (pl. izolált, perfundált szív),
- Szövet szuperfúzió,
- Primer sejtenyészet vizsgálata,
- Immortalizált sejtvonalak,
- Szubcelluláris vizsgálatok,
- Molekuláris vizsgálatok, gén, protein expresszió meghatározások (BOROS, 2007; MÜLLER, 2005).

Az orvostudományban alkalmazott *in vitro* modellek többsége, *ex vivo* (azaz „élőből származó”) rendszer. A modellalkotásban új lehetőségeket kínálnak a számítógépes, adatbázisokra építő „*in silico*” módszerek. Ezek a modellek tökéletesen alkalmasak számos orvosi-biológia kérdés megválaszolására, és értékes adatokat szolgáltathatnak. Ugyanakkor jellegéből adódóan nem mindig lehetünk biztosak benne, hogy a modell pontosan írja le az élő, összetett természetet vagy biológiai jelenséget.

Az *in vivo* modellek közé humán és nem humán (pl. állati) vizsgálati elrendezések tartoznak (BOROS, 2007).

Az *in vivo* módszerek időbeli lefutásuk alapján lehetnek akut (rövid távú) és időben elhúzódó (krónikus) jellegűek (BOROS, 2007; MÜLLER, 2005).

Természetesen az állati modellalkotásnak számos korlátja van. Ezek közül talán a legfontosabb, hogy az állati modellben kapott adatok nem minden esetben, vagy csak közvetve extrapolálhatók emberre. Az adatok relevanciája sokszor bizonytalan és a fajok közötti összehasonlíthatóság mindig kérdéses lesz.

Napjainkban a kutatásban a „3 R” alapján vagyis a *refinement* (az állati fájdalom és szenvedés csökkentése); a *reduction* (a kísérletekben felhasznált állatok számának csökkentése a lehetőségek határáig), és a *replacement* (az állati modellek helyettesítése más modellekkel) elvei szerint kell megtalálni a legalkalmasabb megoldást, a legjobb modellt. A leghevesebb vita természetesen a helyettesítésről, annak mértékéről és feltételeiről szól (BOROS, 2007; BACHMANN, 2002).

4.4. A halon történő tesztelés előnyei

Sok tudományterület a gerinces állatok közül korábban kizárólag emlősöket használt fel a kutatásokhoz, ám elsősorban a magas költségek és a felmerülő tartási és egyéb nehézségek miatt a kutatók figyelme mind inkább a halak felé fordult.

Egyes vegyületek hatásvizsgálatát csak egy bizonyos rendszertani csoportba tartozó állatokon végzik el, mivel a fejlesztők csak a célcsoportra gyakorolt hatásra kíváncsiak (MUKHI ET AL., 2005).

A hal, mint rendszertani csoport az egyetlen, teljes életciklusát kizárólag a vízben töltő gerinces és ezért nélkülözhetetlen része az integrált toxikológiai vizsgálatoknak (BRAUNBECK ET AL., 2006). A többi vízi élőlényhez hasonlóan a halak is gyakori elszennvedői a véletlenül bekövetkezett szennyezéseknek. Végül, de nem utolsó sorban meg kell említeni, hogy a halak a vízminőséget jelző indikátor szervezetek és a továbbiakban is, bár más módon, de őrzői lehetnek ivóvíz bázisunknak (BRAUNBECK ET AL., 2006).

Az OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development - Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet) irányelveknek megfelelően a halakat használják tesztállatként az akut toxicitás vizsgálatoknál (OECD 203 GUIDELINE, INTERNET2), a korai életszakaszban történő mérgezéses (OECD 210 GUIDELINE, INTERNET3), az embrión végzett rövid hatásidejű (OECD 212 GUIDELINE, INTERNET4) valamint fiatal egyedek növekedésére irányuló toxikológiai vizsgálatokhoz.

4.5. A leggyakoribb laboratóriumokban használt halfajok

Földünkön több mint 25000 halfaj él. Számos fajra közülük jellemző, hogy laboratóriumi körülmények között is könnyen tarthatók, egy-egy szaporítás alkalmával sok ivartermék nyerhető tőlük, az embriók fejlődése könnyen nyomon követhető az átlátszó ikrahéjon keresztül, rövid generációs idővel rendelkeznek, a szervezetükben lejátszódó folyamatok szinte megegyeznek a fejlettebb gerincesek, köztük az ember, szervezetében lejátszódó folyamatokkal (MÜLLER, 2005).

A laboratóriumi kísérletekhez legáltalánosabban használt édesvízi halfajok:

- Zebradánió (*Danio rerio*)
- Medaka (*Orizias latipes*)
- Sziámi harcoshal (*Betta splendens*)
- Mexikói kardfarkúhal (*Xiphophorus helleri*)
- Édesvízi gömbhalak (*Tetraodon nigroviridis*, *Takifugu rubripes*)

- Platty (*Xiphophorus maculatus*)
- Paradicsomhal (*Macropodus opercularis*)
- Szivárványos guppi (*Poecilia reticulata*)
- Rózsás díszmárna (*Barbus conchoni*)
- Aranyhal (*Carassius auratus*)
- Ponty (*Cyprinus carpio*)
- Nílusi tilápia (*Oreochromis niloticus*)
- Háromtuskés pikó (*Gasterosteus aculeatus*)
- Szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*)
- Killihal (*Fundulus heteroclitus*)

4.6. A zebradánio

4.6.1. A zebradánio rendszertani besorolása:

<u>Ország:</u>	<u>Állatok</u>	(Animalia)
<u>Törzs:</u>	<u>Gerinchúrosok</u>	(Chordata)
<u>Altörzs:</u>	<u>Gerincesek</u>	(Vertebrata)
<u>Főosztály:</u>	<u>Csontshalak</u>	(Osteichthyes)
<u>Osztály:</u>	<u>Sugarasúszójúhalak</u>	(Actinopterygii)
<u>Rend:</u>	<u>Pontyalakúak</u>	(Cypriniformes)
<u>Család:</u>	<u>Pontyfélék</u>	(Cyprinidae)
<u>Alcsalád:</u>		<u>Danioninae</u>
<u>Nem:</u>		<u>Danio</u>
<u>Faj:</u>		<i>D. rerio</i> (Hamilton-Buchanan 1822)

4.6.2. A faj jellemzése

A zebradánio (*Danio rerio*) őshazája Elő-India. Elterjedési területe igen széles.

A hal háta olajbarna, az oldalak és a has alapszíne sárgásfehér. Törzsén a kopolyúfedőtől a farokúszó végéig több sötét acélkék sáv húzódik. A csíkozottság a farok alatti úszóra is kiterjed. A hátúszó alapszíne sárgásbarna, kék szegéllyel, mely kívül fehérén szegélyezett. A kopolyúfedő kék, fehér foltokkal tarkított. A nőstény sokkal teltebb, színei kevésbé élénkek. A hím karcsú, alapszíne aransárga, csíkjai sötétebbek. Testhossza átlagosan 4,5 cm. (HORN, 1983).

Laboratóriumi körülmények között is könnyen tartható, kis testű csapathalak, melyek a víz, illetve a táplálék minőségére kevésbé érzékenyek, helyigényük kicsi. A halak 3-4 hónap alatt válnak ivaréretté, a nőtényektől akár hetente lehet viszonylag nagy mennyiségű ikrát nyerni. Az embriók fejlődése könnyen nyomon követhető az átlátszó ikrahéjon keresztül. Az embrióknak 24 óras korukra az összes létfontosságú szervük kifejlődik, 72 órával a termékenyülés után kikelnek a lárvák, majd ezt követően 2-3 nap alatt elúsznak és megkezdik önálló táplálkozásukat.

A kutatás számára a magyar származású, az Egyesült Államokban élő Streisinger György fedezte fel ezt a fajt, mely ugyan nem rendelkezik olyan tulajdonságokkal, ami egyedülállóná tenné a több tízezer ismert halfaj között, mégis megkérdőjelezhetetlen érdemeket szerzett ezeknek a halaknak a tudományos életben.

Ma már nem csak a fejlődésbiológiával foglalkozó tudósok figyelme fordul e halfaj felé. A biotechnológiai kutatásoknak köszönhetően elkészült a zebradánió teljes genomjának térképe továbbá több ezer mutáns vonal létezik a különböző laborokban. A legtöbb emlősökön végezhető manipulációs eljárást is adaptálták rájuk, így megnyílt az út számos más tudományterület előtt is, hogy kísérleteinek alanyául ezt a halfajt válasszák. Az élő szervezetben lejátszódó folyamatok, az öregedés, a rák, a vérképzőrendszeri, illetve a különböző szervi rendellenességek és betegségek genetikai meghatározottságának értelmezése, vizsgálata, ma már részben a zebradánión végzett vizsgálatoknak köszönhető (CSENKI ET AL., 2006).

4.6.3. A zebradánió, mint a toxikológiai vizsgálatok modellállata

A zebradánió napjainkban az egyik legkedveltebb modellállat számos tudományterületen. A zebradánióval foglalkozó kutatók évente több konferenciát is tartanak, hetente jelennek meg cikkek neves szaklapokban, melyekben az elvégzett kutatások eredményeiről tájékoztatnak. Míg az 1990-es években évente kevesebb, mint 100 publikáció látott napvilágot ezen fajjal kapcsolatosan, az ezredforduló környékén körülbelül évente ezer, 2005-re ez a szám meghaladta a 3500-at (HILL ET AL. 2005). Egyre több zebradánióval foglalkozó laboratórium épül szerte a világon, és az ott zajló kutatásokra hatalmas összegeket fordítanak.

A fejlődésbiológiai vizsgálatokon kívül egyre nagyobb figyelmet kapnak a kémiai toxicitással, a gyógyszerfejlesztéssel és emberi betegségekkel kapcsolatos kutatások. Különböző genetikai technikákkal kiegészítve lehetőség nyílik hatékony, széles körben alkalmazható 'screening' eljárások kifejlesztésére. Ahhoz, hogy meg tudjuk becsülni egy vegyi anyag toxicitását, szükséges megállapítani a különféle toxikológiai végpontokat és a dózis- válasz összefüggéseket, megmagyarázni a toxicitás mechanizmusait, valamint leírni a vegyi anyag toxikodinamikáját.

A zebradánió morfológiai, biokémiai és fiziológiai jellemzői az állat minden fejlődési stádiumában, mindkét nemből jól leírtak, ezért jó alanyai a toxikológiai kutatásoknak. Mivel ismerjük, hogy a fent említett tulajdonságcsoporthoz mi számít normálisnak, ezért objektíven értékelhetőek a kemikáliáknak való kitettség hatására esetlegesen kialakuló elváltozások (HILL ET AL. 2005).

4.6.4. Zebradánió embrió modell a környezeti kockázatelemzésben

Az Európai Unió tagállamaiban, valamint más, iparilag fejlett országokban szükség van megfelelő mennyiségű adatra a kockázatbecsléssel kapcsolatban a különböző peszticidek, biocidok és gyógyszerek engedélyeztetéséhez. Az EU új, kemikáliákkal kapcsolatos politikájának fontos része a REACH (*registration*- regisztráció, *evaluation*- értékelés, *authorisation*- engedélyezés), ezen program keretein belül a kemikáliákat meg kell vizsgálni, hogy megfelelő mennyiségű adat álljon rendelkezésre. Ezen feladat végrehajtásához egyre több állatkísérlet szükséges. Etikai okokból egyre nagyobb a társadalmi igény ezen vizsgálatok helyettesítésére. Az ipar szintén érdeklődik az alternatív teszt módszerek iránt, melyekkel idő és költség takarítható meg.

Az európai törvényhozás nagy figyelmet fordít a vizsgálatokra és egyéb tudományos célokra használt állatok védelmére, ám az embrionális fejlődési stádiumok felhasználása nem szabályozott (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 1986). Ezért is lehetnek jó alternatívák az embriókon folytatott vizsgálatok. Továbbá azért, mert az embrió modellek komplex, multicelluláris rendszerek, melyekben a megfigyelhetők a különböző szervek közötti interakciók, valamint a differenciálódási folyamatok (SCHOLZ ET AL. 2008).

A zebradánió felhasználása több okból is előnyös. Ilyenek például a gyors egyedfejlődés, könnyű laboratóriumi tartás, nagy számú ivadék, átlátszó ikrahéj valamint a könnyű manipulálhatóság. A testalak a termékenyülés után 24 órával kialakul, az embriók pedig 2-3 nappal a termékenyülés után kikelnek. A lárvák 5 nappal a termékenyülés után, a szik felszívódását követően elkezdnek külső táplálékot felvenni. Ekkorra már befejeződik a főbb szervek kialakulása (RUBINSTEIN 2003). Az erre a fajra kifejlesztett technikák továbbá átvihetők más halfajokra is, mint például medakára (*Oryzias latipes*), vagy az amerikai népszerű, a Pontyfélék családjába tartozó modellhalra, a *fathead minnow*-ra (*Pimephales promelas*).

4.6.5. Bioszenzor zebradánió vonalak

A bioszenzor vonalakban a fluoreszcens riporter gének az érdeklődés középpontjában álló szövetben vagy szervben expresszálnak, ezáltal lehetővé teszik a szöveti elváltozások gyors, és egyes esetekben már automatizált detektálását, természetesen ha a megfelelő technológiai feltételek adottak. A toxikológiai vizsgálatokhoz is hasznosak, mert megfigyelhető rajtuk a szövetkárosodás, az oxidatív stressz, az apoptózis. Mivel rendelkezésünkre állnak olyan fluoreszcens fehérjék, melyek kibocsátási és elnyelődési spektruma nem fed át, ezért akár az is kivitelezhető, hogy egy egyedben több fluoreszcens fehérjével jelölt szövet is legyen (YANG ET AL., 2009)

Ilyen bioszenzor vonalak például a *gfp:ngn1* (BLADER ET AL. 1997, 2003) és a *gfp:inslet1* (HIGASHIJIMA ET AL. 2000), melyekben megfigyelhetőek a neuronok, ezeken keresztül pedig a neurotoxicitás. A *gfp:fli1* vonalon pedig a kardiovaszkuláris fejlődési zavarok vizsgálhatók (BELLO ET AL. 2004).

4.7. A transzgenikus állatok előállításának története, szerepük az alap kutatásban

A genetikai kutatások egyik látványosan fejlődő területe a klónozott gének bejuttatása különböző élő szervezetekbe. Érdekes kutatások folynak a transzgenikus állatok témakörében is. Transzgenikusnak nevezzük tágabb értelemben azokat az organizmusokat, melyekbe idegen eredetű gént juttattak. Szűkebb értelemben olyan egyedeket nevezhetünk transzgenikusnak, melyek a transzgént kromoszómaikba stabilan integrálódott formában hordozzák és azt át is örökölik (MULLER 2005).

Az első transzgenikus állatot MUNRO (1968) hozta létre, kísérletében a recipienstől eltérő tulajdonságokat hordozó egyed genomiális DNS-ét injektálta baromfi petefészkébe, s bár az integrálódást nem sikerült bizonyítani, az utódok tollszíneben megjelent a donor gén hatása. Egerekben első alkalommal 1974-ben sikerül transzgént bejuttatni, virális vektorokat alkalmazó módszerrel (JAENISCH& MINTZ 1974). A transzgének öröklődéséről két évvel később számoltak be (JAENICH 1976).

A leglátványosabb eredményt PALMITER ÉS MUNKATÁRSAI (1982) érték el. Kísérletükben rekombináns génkonstrukciót injektáltak egerek petesejtjeibe, mely beépült a genomba és kifejlett egyedekben kifejeződött. A bejuttatott plazmid az egér metallothionein génjének promóteréhez kapcsolva a patkány növekedési hormonjának génjét (GH) tartalmazta. A géntermék hatására az egerekben drámai növekedés volt megfigyelhető.

A transzgenikus szervezetteknek az alap kutatásban is kiemelkedő szerep jut. RUSCONI&SCHAFFNER (1981) karmosbékákon (*Xenopus sp.*) végzett kutatásai nyomán olyan

dolgokra derült fény, mint a bejuttatott DNS extrakromoszómális fennmaradás és konkatamerekké formálódása. BENDING ÉS WILLIAMS (1983) igazolták a bejuttatott DNS extrakromoszómális replikációját, expresszióját és véletlenszerű beépülését a gezdaszervezet genomjába.

Az egyre nagyobb számban elérhető transzgenikus egérvonalak is felhasználhatók modellként az alapkutatóban (LATHE& MULLINS 1993). Például onkogének expresszáltatásával vizsgálható a rák kialakulása és fiziológiája, míg az öröklődő betegségek génterápiás gyógyítása funkcionális allélbevitellel kivitelezhető, melyet szintén transzgenikus egerekben modelleznek (MAHON ET AL. 1987; ROSSANT ET AL. 1993).

4.7.1. A transzgenikus halak előállításának története

A halak sem maradtak ki a transzgenikus állatok létrehozásával foglalkozó kutatásokból. Két féle céllal kezdték el a halakkal kapcsolatos vizsgálatokat. Az egyik a gazdasági haszonnal kecsegtető gének gazdaságilag jelentős halfajokba történő bevitele volt, a másik pedig a génbevitelre alapozott kísérletek alapkutatóban betöltött jelentősége.

A halakon végzett transzgenikus és általában vett genetikai kutatások többnyire az emlősökre kidolgozott módszerek adaptációján alapulnak. Ennek köszönhető talán, hogy halakkal kapcsolatos publikációkban sorra jelent meg az egereknél bevált mikroinjektálással történő génbevétel alkalmazása. Sok fajnál nehéz kivitelezni ezt a technikát a vastag ikrahéj és a pronukleusz nehézkes láthatóvá tétele miatt (FLETCHER& DAVIS 1992). Ugyanakkor a biztonsággal és nagy számban nyerhető ivartermék, és a könnyen vizsgálható *ex utero* embriogenezis előnyt jelent a halakkal foglalkozó kutatók számára. Az ikrák továbbá jól ellenállnak a mechanikai hatásoknak, valamint a sok fajnál megfigyelhető ragadoósság megkönnyíti a mikromanipuláció kivitelezését. Ennél az állatcsoportnál számos olyan manipulációs lehetőség megvalósítható, mely másoknál nem. Ilyen például az androgenezissel és gynogenezissel történő homozigóta diploidok, valamint szexátfordítással a monoszex állományok és steril triploidok előállítása (HORVÁTH& ORBÁN 1995).

Az első transzgenikus hal létrehozása VIELKIND ÉS MUNKATÁRSAI (1982) nevéhez fűződik. Teljes genomiális DNS izolátumot injektáltak elevevyszülő fogasponty (*Xiphophorus sp.*) embrióiba. Zhu kínai kutatócsoportja 1985-ben elsőként számolt be arról, hogy termékenyített aranyhal (*Carassius auratus*) ikrákba humán növekedési hormon génjét juttatták mikroinjektálással. Vizsgálataik során kiderül, hogy a gén ugyan kifejeződött, de fennmaradása episzómális (tranzien) volt (ZHU ET AL. 1985), azaz nem integrálódott a kromoszómákban hanem önálló formában replikálódott és adódott tovább az osztódás során. Ugyanez a csoport hozott létre először ténylegesen transzgenikus halat. Egy csíkféle (*Misgurnus anguillicaudatus*) termékenyített ikráiba

növekedési hormon gént injektáltak. Vizsgálataik során azt figyelték meg, hogy az injektált egyedek jobban növekedtek társaiknál (ZHU ET AL. 1986).

4.7.1.1. Génbevitel halakba mikroinjektálással

Ezzel a módszerrel állították elő eddig a legtöbb transzgenikus állatot, így a transzgenikus halat is. Emlős petesejtek esetében a kivitelezéshez szükséges egy mikromanipulátorra, melynek egyik karjába 1-10 μm átmérőjű üvegapillárist, míg a másikba a petesejt megtámasztására használt holder kapillárist helyeznek. Így szűrik meg a zigóta egyesült sejtmagját vagy pronukleuszainak valamelyikét. A halaknál erre nincsen lehetőség, mivel a magok nem láthatók még fáziskontraszt vagy Nomarski differenciál optika segítségével sem. Ennek következtében a halas kutatócsoportok a megtermékenyített petesejt citoplazmájába injektálnak. Ez a módszer nem feltétlenül jelent hátrányt, mert FLETCHER & DAVIS (1992) tapasztalatai szerint a halak petéjének nukleáz aktivitása alacsonyabb az emlősökénél. Ezen eljárás esetében néhány nanoliternyi, vagy néhány száz pikoliternyi DNS oldatot (plazmid DNS) juttatnak be a mikropillárison keresztül.

Ha olyan transzgenikus vonal előállítása a cél, melynek minden egyede minden sejtjében hordozza a transzgént és tovább is örökíti azt, akkor az injektálást a termékenyüléstől az első osztódásig tartó időszakban kell elvégezni, különben a DNS nagy valószínűséggel mozaikosan fog eloszlani (WESTERFIELD 1993). Több faj esetében az ikrát elő kell készíteni az injektáláshoz. A lazacféléknél például a kemény, enzimatikusan nem oldható ikrahéjat meg kell sérteni például egy tű segítségével, az aranyhal esetében pedig tripszines emésztéssel kell eltávolítani azt. A mikropile nyílásán keresztül is kivitelezhető az injektálás, ennek olyan fajoknál van jelentősége, melyeknél a pronukleuszok a termékenyülés után a mikropile alatt helyezkednek el (BREM 1988). A különböző halfajokon alkalmazott stratégiák eredményessége nagyon változó, de mint a tudomány többi területe, ez is dinamikusan fejlődik.

4.7.1.2. Egyéb módszerek a transzgének halakba történő bejuttatására

A mikroinjektálással kapcsolatos kísérletekkel párhuzamosan megindultak a kutatások hatékonyabb génbeviteli módszerek kifejlesztésére, melyek segítségével egyszerre nagyobb számú ikrába is be lehet juttatni a transzgént egy kezeléssel.

A spermiumok DNS kötő képességét kihasználó módszer is ilyen, melynek lényege, hogy a spermiumokat a bevinni kívánt plazmid oldatában inkubálják, ezután termékenyítenek, s mivel a halaknál nem csak az örökítőanyag, hanem az egész hímivarsejt bejut a petesejtbe (GINZBURG 1972), ezért nagyobb az esély, hogy a hozzá kötődött transzgén is bejut.

Az ivarsejtek eletroporációja is egy lehetőség a transzgén bejuttatására. Az eletroporáció során a sejteket nagy feszültségű, rövid, szubletális elektromos impulzusnak tesszük ki, melynek következtében a sejtmembrán reverzibilisen átjárhatóvá válik a makromolekulák számára a 20-100 nm pórusokon keresztül (POWERS ET AL. 1992). A feltételezések szerint az eletropórusokon keresztül vándorolnak a makromolekulák a sejtbe. Ezzel az eljárással nem csak ivarsejteket, hanem ikrákat is kezelni lehet, ám az eljárás hatékonysága nem túl jó (INOUE ET AL. 1990).

Egy másik eljárás a liposzómával történő génbevitel. A plazmamembránon keresztüli anyagbevitel egyik alternatív módjaként kezdtek el foglalkozni a liposzómák előállításával. A liposzómák multi vagy unilamelláris mikroszkopikus vezikulumok, melyek vízzoldható anyagokat képesek magukba zárni, majd endocitózissal átjuttatni a membránon. A liposzómákba csomagolt DNS védett a nukleázoktól, viszonylag egyszerűen előállítható, nem toxikus a sejtek számára. Populációs génbeviteli módszerként is használható, hiszen egyszerre nagy számú sejtet lehet kezelni egy liposzóma szuszpenzióval (FRALEY & PAPAHAJOPOULOS 1981).

4.8. Fluoreszcens fehérjék

A zöld fluoreszcens proteint (GFP- *green fluorescent protein*) és változatait széles körben alkalmazzák, mint molekuláris eszközt biológiai rendszerek vizsgálatában. A GFP egy eredetileg 238 aminosavból álló protein, melyet az *Aequoria victoria* medúzafajból izoláltak, és zöld fényt emittál, ha sötétkéék fénnel gerjesztjük. Széles körben alkalmazzák a biokémiában, sejtbiológiában és a molekuláris biológia területén is (SHANER ET AL. 2007, STEPANENKO ET AL. 2008).

Miután ezt a fehérjét felfedezték, létrehozták néhány változatát, melyek színspektruma a kéktől a sárgáig terjed. Ilyenek például a sárga fluoreszcens protein (YFP- *yellow fluorescent protein*) és a cián fluoreszcens protein (CFP- *cyan fluorescent protein*) (STEPANENKO ET AL. 2008).

A GFP piros változatát is kifejlesztették, melyről kiderült, hogy homológ a *Discosoma sp.* anemónában található fluoreszcens proteinnel, mely a narancs-vörös régióban emittál. Néhány változatát megalkották ennek a fehérjének is, melyeknek fluoreszcens spektruma a sárga és a narancs, valamint a narancs és a vörös között van (DAVIDSON & CAMPBELL 2009).

A legfontosabb fluoreszcens fehérjék emissziós és excitációs jellemzőinek összefoglaló táblázata (1.sz. táblázat) PAKHOMOV ÉS MARTINOV (2008) munkája alapján:

Fluoreszeins fehérje	Gerjesztési maximum (nm)	Emissziós maximum (nm)	<i>in vivo</i> struktúra
BFP (kék)	383	445	monomer
CFP (cián)	439	476	monomer
GFP (zöld)	396	508	monomer
YFP (sárga)	514	527	monomer
DsRed (piros), DsRed variánsok (piros)	558 548-595	583 559-655	tetramer dimer vagy monomer

1. sz. táblázat: Néhány fluoreszcens fehérje jellemzői

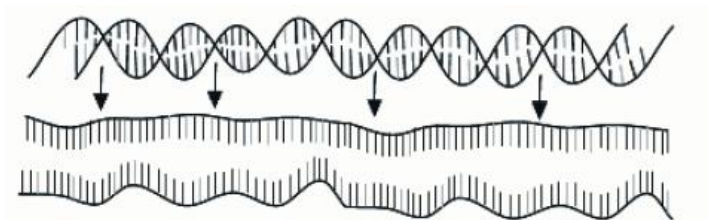
4.9. A polimeráz láncreakció

A tudománytörténet szerint a polimeráz láncreakció (PCR: *polymerease chain reaction*) elve 1983- ban született meg Kary Banks Mullis fejében. Ezt egy gyakorlati eredmény bemutatásán keresztül tették közzé 1985-ben a *Science* című tudományos folyóiratban (SAIKI ET AL. 1985). Ettől kezdve egy új, egyszerű elven alapuló, zseniális technikával gyarapodott a molekuláris biológia eszköztára. A módszer lehetőséget nyújt arra, hogy kimutatható mennyiségűre növeljék a vizsgálandó DNS fragment mennyiségét. A reakció egyik kulcsa, a *Taq*- polimeráz enzim, amely 1989-ben elnyerte a *Science* magazin „Év molekulája” címét, valamint a módszer jelentősége miatt Mullis 1993-ban kémiai Nobel-díjat kapott (DEZSŐ&NAGY, 2005).

A módszer tehát egészen egyszerű elven alapszik. Ezzel az *in vitro* technikával enzimatisz uton lehet DNS szakaszokat felszorzozni, két, az amplifikálandó szakaszt közrefogó, specifikus szekvenciájú oligonukleotid (*primer*) felhasználásával. Ezek segítségével a DNS függő DNS polimerázok képesek lemásolni az eredeti DNS-szálat, majd ismételt működésük következtében az adott szakasz hatványozottan felszorzozódik. A reakció lezajlásához szükség van az úgynevezett templátra, amely lehet biológiai mintából izolált DNS, vagy RNS-ről reverz transzkripcióval átírt cDNS, *primer* párra (12-30 nukleotid hosszú szakaszok), dNTP keverékre, amely egyenlő mennyiségben tartalmazza a DNS lánc építőköveit, *Taq*-polimerázra, pufferre, amely biztosítja a *Taq*-polimeráz működéséhez szükséges pH-t, ionerősséget és sókoncentrációt, szükséges továbbá $MgCl_2$, amely a *Taq*- polimeráz működéséhez elengedhetetlen kofaktor (SAIKI ET AL. 1985).

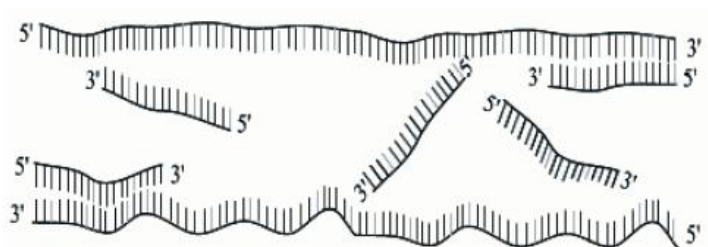
A PCR reakció egy ciklusa három lépésből áll (DEZSŐ&NAGY, 2005 alapján):

Hődenaturáció: a DNS szálainak szétválasztása 15-60 másodpercig tartó 94-97 °C-ra történő felmelegítéssel (1.sz. ábra)



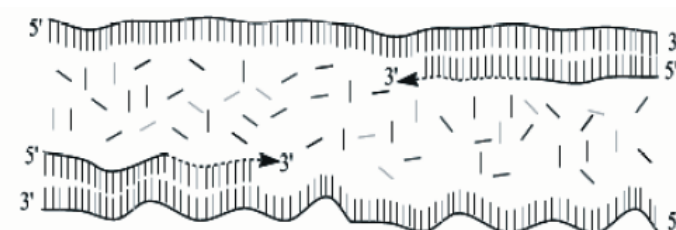
1.sz. ábra: A DNS hődenaturációja

Primer hibridizáció: a reakcióelegy 50-70 °C-ra való lehűtése, amely 30-60 másodpercig tart. Az annealálás hőmérséklete függ a primerek olvadási hőmérsékletétől, ezért minden esetben optimalizálni kell (2.sz. ábra).



2.sz. ábra: A primerek hibridizációja

A DNS-szál szintézise (extenzió): ez a lépés a Taq-polimeráz optimális működési hőmérsékletén, azaz 72 °C-on megy végbe. Ekkor történik az elegyben lévő dezoxiribonukleozid trifoszfátok (dNTP) polimerizációja. A primerek elongációja 5'-3' irányban folyik, a PCR termék méretétől függően 1-3 percig (3.sz. ábra).

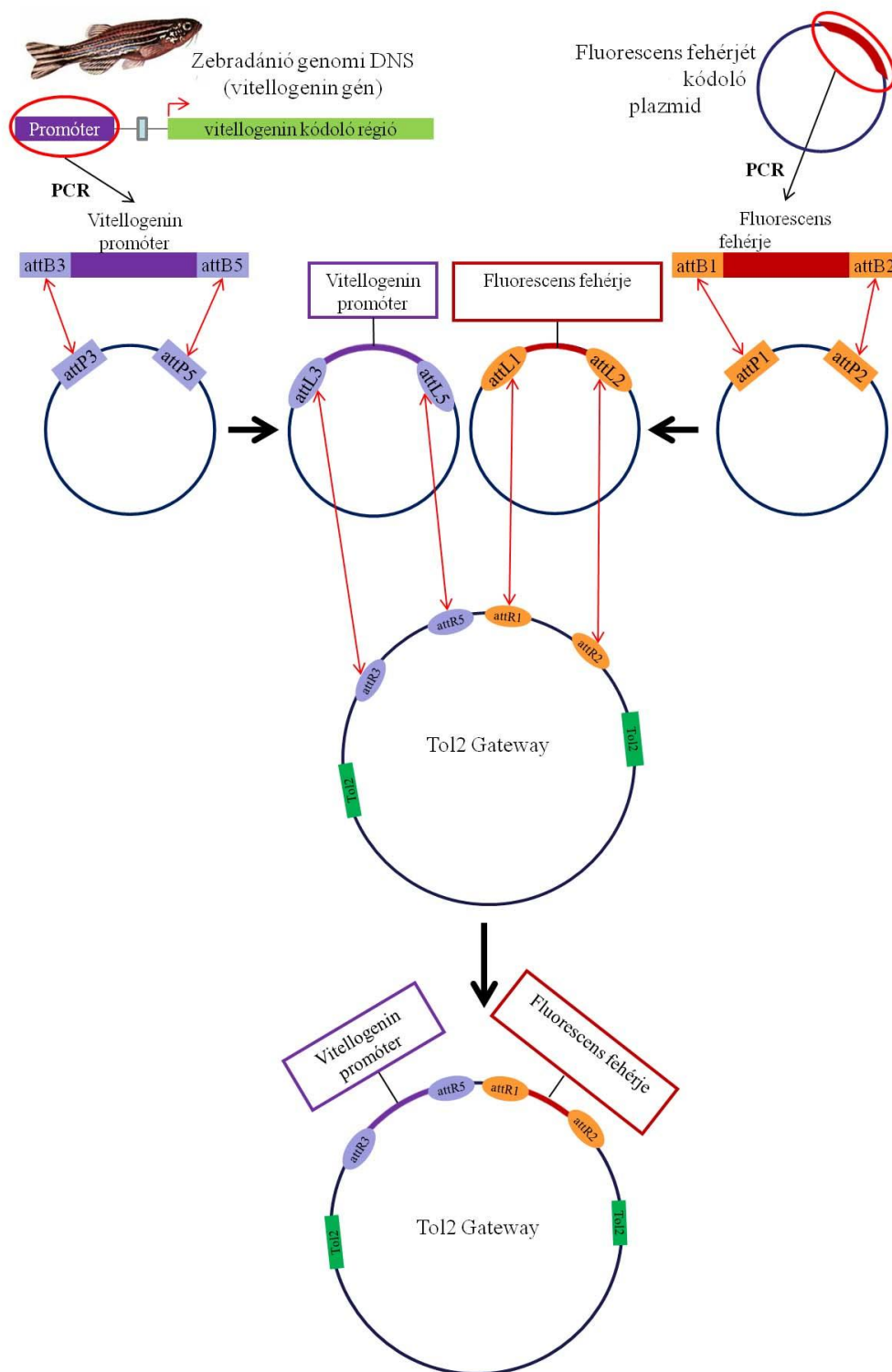


3.sz. ábra: A DNS- szál szintézise

A fent leírt lépések után kapott reakciótermék méretét ellenőrizni kell. Erre alkalmazható az agaróz vagy akrilamid gélelektroforézis. A fragmentumok gélben történő megfigyelésére

leggyakrabban alkalmazott vegyület az etídium- bromid, amely a molekulába interkalálódik és UV-fény hatására narancssárgán fluoreszkál. Az eredmény kiértékeléséhez elengedhetetlenül fontos a kereskedelembe kapható molekulásúly- markerek alkalmazása. Ezek a termékek ismert méretű fragmentumokat tartalmaznak, melyekhez viszonyítva meghatározható a reakciótermékben előforduló szakaszok mérete (DEZSŐ&NAGY, 2005).

4.10. Gateway klónozási technika



4. sz. ábra: A Gateway klónozás sematikus ábrája

A molekuláris biológiai technikák alkalmazása során számos esetben szükség van a DNS szakaszok vektorokba történő bejuttatására, klónozására. Az általános klónozási technikák sok lépésből állnak, kiváltképp a hagyományos restrikciós enzimek felhasználásával történő klónozás. Ezekkel a technikákkal limitált a klónozás sikeressége. Például néhány restrikciós enzim nem használható, mert belehasít a számunkra érdekes szekvenciába. A nagyobb fragmentek vektorba juttatása pedig csak kis hatékonysággal valósítható meg és rendkívül időigényes lehet. Sok esetben arra is szükség van, hogy az adott szakasz megfelelő irányban épüljön be a vektorba, amelynek megoldása a hagyományos technikákkal szintén egy nehezebb feladat.

Ezzel ellentétben a Gateway, rekombináción alapuló klónozási technológia kiküszöböli ezeket a korlátozó tényezőket. A technológia egy egyórás, 99%-os hatékonyságú reverzibilis rekombinációs reakciót használ.

A módszerhez egy jól leírt lamdba bakteriofág helyspecifikus rekombinációs módszert választottak. Az *E. coli* baktériumban található egy rövid DNS szakasz, amelyet *attB*-nek nevezünk (a „B” a baktérium szóból ered), a fágban pedig egy terjedelmesebb DNS szakasz van, amit *attP*-nek nevezünk (a „P” a fág angol megfelelőjéből *'phage'* ered). Az infekció után a fág DNS-e rekombinálódik a baktérium megfelelő DNS szakaszával. A rekombináció csak az egymásnak megfelelő *attB* és *attP* helyek között megy végbe, azaz helyspecifikus. Az integráció után a fág kromoszóma *attL* és *attR* szakaszokkal lesz szomszédos, melyek az *attB* és *attP* DNS szekvenciáiból jönnek létre. Az *attL* és *attR* között végbemenő reverz reakció eredményeként a fág DNS kivágódik, és visszakapjuk az eredeti *attB* és *attP* szekvenciákat (4. sz. ábra).

A Gateway klónozó rendszerben vektorként plazmidokat használnak, melyek olyan szekvenciákat tartalmaznak, amelyek helyspecifikus rekombinációt tesznek lehetővé, tehát tartalmazzák a rekombinációhoz szükséges *att* (*attachment site*) szakaszokat. A kívánt fragment bejuttatása két lépésben, *in vitro* rekombináció segítségével történik. Az első lépésben (BP reakció) a bejuttatandó szakasz végein található két különböző szekvenciájú *attB* szakasz rekombinálódik egy plazmidon található, megfelelő *attP* helyekkel. Ennek során a B és P helyekből L jön létre, amely segítségével második lépésben (LR klónozás) a fragment bejuttatható a végső plazmid vektorba, amely a megfelelő R szakaszokat hordozza. (INTERNET1).

4.11. Tol2- transzpozon

A *Tol2* elem egy autonóm transzpozon, amely tökéletesen funkcionáló transzpozáz kódot. A transzpozáz fehérje képes katalizálni egy transzpozon konstrukció átvitelét. A szekvenciák végén az áthelyeződéshez nélkülözhetetlen fordított ismétlődések (*inverted repeat*) és szubterminális szakaszok találhatók. Nagy méretű, akár 11 kilobázis nagyságú DNS inszertek is

klónozzák ezek között a szekvenciák között, az átvitel mértékének csökkenése nélkül. Úgy tűnik, hogy a *Tol2* transzpozon rendszer minden gerinces sejtben aktív, az eddig vizsgált fajokban (zebradánió, karmosbéka, tyúk, egér, ember) kapott eredmények alapján. (KAWAKAMI, 2007)

A *Tol2* elemet először egy kis méretű, édesvízi hal, a medaka (*Oryzias latipes*) genomjából azonosították japán kutatók. Megállapították továbbá, hogy a *Tol2* szekvenciája hasonló a *hAT* családba tartozó *hobo*, *Ac* és *Tam3* transzpozonokhoz (KOGA ET AL. 1996). A gerincesek genomjában találhatóak még olyan szekvenciák, melyek kapcsolatban vannak a DNS transzpozonokkal. Olyanok is vannak köztük, amik szintén hasonlóak a *hAT* család transzpozonjaihoz, ám ezek nem mutatkoztak aktívnak, míg a *Tol2* igen (KAWAKAMI ET AL. 1998).

Az önálló működésre képes *Tol2* elem körülbelül 4,7 kilobázis hosszúságú és tartalmaz egy transzpozáz fehérjét kódoló gént, amely három exonból áll. A transzpozáz fehérje tökéletesen funkcionál, és képes nem autonóm *Tol2* elemek transzpozícióját katalizálni. Az önállóan működni nem képes *Tol2* elemek úgy jönnek létre, hogy a transzpozázt kódoló szakasz valamilyen sérülést szenved. A *Tol2* egy kópiában épül be, egy egyszerű, hasítás és beillesztés mechanizmussal. Nem okoz átrendeződést vagy módosulást a beépülés helyén, kivéve egy nyolc bázispáros duplikációt. Ennek következtében nyolc bázispáros ismétlődések mindig megfigyelhetők a beépült *Tol2* elemek mellett (KAWAKAMI ET AL. 2000).

4.12. A Tol2 transzpozont felhasználó Gateway klónozás menete

A Gateway klónozás egy helyspecifikus rekombináción alapuló technika, melynek lényege, hogy DNS szakaszokat cserélünk ki egymással, hogy ezáltal hozzuk létre a kívánt génkonstrukciót.

Első lépésben a beépíteni kívánt szakaszt PCR reakcióval felszorzozzuk. Fontos, hogy a primereket úgy kell megtervezni, hogy *attachment site*-ok is kerüljenek a fragmet végére, amik lehetővé teszik a helyspecifikus rekombinációt. Az így felszorzozott szakasz végére kerülnek tehát az attB1 és attB2 szekvenciák, míg a plazmidban az ezeknek megfelelő attP1 és attP2 szekvenciák találhatóak. BP klonáz ezim segítségével ez a két szakasz rekombinálódik. Ennek következtében az attP1 és attP2 közötti szakasz kicserélődik a korábban felszorzozott, beépíteni kívánt attB1 és attB2 közötti szakaszra. Ennek a reakciónak az eredményeképpen az attB és attP végek rekombinációjával attL végek jönnek létre a fragment két végén. Ezeknek az L végeknek megfelelő szakaszok pedig a *Tol2* végeket is tartalmazó plazmidon vannak, melyben az egész konstrukciót létre kívánjuk hozni. Ezeket a szakaszokat attR-nek nevezzük. Az attL szakaszok ezekkel rekombinálódnak, s így juttatható be a *Tol2* karokat tartalmazó plazmidba a konstrukció adott eleme. A reakciót az LR klonáz enzim katalizálja.

A módszerrel létrehozott konstrukciók segítségével nagy hatékonysággal (50-70%) hozhatók létre transzgenikus vonalak.

4.13. A vitellogenezis folyamata és a vitellogenin

A ovipar gerincesek esetében a szik kritikus eleme az embriófejlődésnek, mivel a tápanyagokban rendkívül gazdag, mint például aminosavakban, foszfátokban, szénhidrátokban, lipidekben, és vitaminokban. Korábbi kutatások megállapították, hogy a szik felépítésében főként két fehérjecsoport vesz részt, a foszfovitin és a lipovitellin. Mindkét fehérje csoport általános prekursor fehérjéktől származik, melyeket vitellogenineknek neveznek. Ezeket egy multigén család kódolja az összes eddig vizsgált ovipar gerincesben. A közönséges karmosbékában *Xenopus laevis*/ négy, még a *Caenorhabditis elegans* fonalféregben hat vitellogenin gént fedeztek fel. A halak esetében a leírt vitellogenin gének száma fajokként igen változatos képet mutat, a szivárványos pisztránban *Oncorhynchus mykiss*/ például több mint huszat írtak le. (WANG ET AL. 2005)

A vitellogenezis az a folyamat, melynek során vitellogenin szintetizálódik a májban, majd felveszik a növekedő oocyták, ahol a későbbiekben fejlődő embriók tartalékául szolgál. A folyamat a vitellogenin gének expressziójával kezdődik, melyek felelősek a vitellogenin szintéziséért. Ezen gének működését, sok más génhez hasonlóan több hormon befolyásolja. Legfőképp az ösztrogének, azok közül is a 17β -ösztradiol játszik fontos szerepet, mely gonadotrop hormonok hatására a petefészek sejtjeiben termelődik (WALLACE, 1985). A plazma vitellogenin koncentrációja egyenletesen növekszik az ikrás halak szexuális érése során, melyet a 17β -ösztradiol szintjének növekedése is kísér. A vérben mért koncentrációja elérheti a több tíz mg/ml –t is. Erre szükség van ahhoz, hogy az ikrásokban kifejlődjön a nagy méretű, szikkel telt oocytákat tartalmazó petefészek, amely akár testtömegük 25%-át is kiteheti. A plazmában lévő vitellogenin mennyisége akár a milliószerosára is emelkedhet az ívási időszakra a lazacfélék ikrás egyedeinek esetében. Nagyon tág tehát az a tartomány, amiben a nőivarú halak vérének vitellogenin tartalma változhat (SUMPTER&JOBING 1995). Ezzel szemben a tejesekből nem mutatható ki, mert a vérükben lévő minimális ösztrogén mennyiség túl alacsony ahhoz, hogy a májban vitellogenin termelődjön (COPELAND ET AL. 1986). A vitellogenin gének tehát normál esetben csendesek, ám indukálhatóak, a hím ivarú halak ösztrogénnel történő kezelésével. Mind a természetes, mind pedig a szintetikus ösztrogének hatására nagyon kifejezett dózis –válasz görbék figyelhetők meg (BROMAGE ET AL. 1988). A 17β -ösztradiol 0,1 ng/l-es koncentrációban is szignifikánsan növeli a plazma vitellogenin koncentrációját (PURDOM ET AL. 1994). Ez is azt mutatja, hogy a halak rendkívül érzékenyek a vízben jelenlévő ösztrogénekre. Az emelkedett, normálistól eltérő plazma-vitellogenin szint ösztrogén hatású anyag jelenlétére utalhat (HUTCHINSON & PICKFORD, 2002).

4.14. Vitellogenin gének zebradánióban

A zebradánióban hét vitellogenin gén található (*vtg 1-7*), melyek elsősorban a nőivarú egyedek májában expresszálnak. Gyenge kifejeződés tapasztalható a *vtg1* és *vtg2* esetében a petefészekben. Érdekes tehát, hogy ezek a gének nem csak a májban, hanem különböző extrahepatikus szervekben is expresszálnak, például, mint már említettük ikrás egyedek esetében a petefészekben, valamint a belső szervekben is. Tejesek esetében indukció hatására a májon kívül a belső szervekben, a herékben és az izomszövetben. Adipocitákból is kimutathatók a *vtg* gének mRNS-e, amiből arra lehet következtetni, hogy van vitellogenin termelő funkciója a zsírszövetnek az ovipar gerincesek esetében. A zebradánió hét vitellogenin génjének vizsgálata után megállapították, hogy a legerősebben a *vtg-1* expresszál (WANG ET AL., 2005). A *vtg1* gén ezen tulajdonsága miatt választottuk ezt a konstrukció kialakításához.

5. Anyag és módszer

5.1. DNS-tisztítás

5 vad típusú (AB) vonalból származó egyedtől farokúszó mintát vettünk, majd fenol-kloroformos módszerrel izoláltuk a genomi DNS-t.

1. A farokúszó mintákat Proteináz K enzimmal (Macherey- Nagel) , 500 µl SET (100 mMol TRIS pH 7,5 , 50mM EDTA pH 8,0 , 200mM NaCl, 0,5 % SDS) pufferben 55 °C-on, overnight emésztettük.
2. Az emésztett mintákhoz 500-500 µl fenolt mértünk. Alaposan összeráztuk, majd szobahőmérsékleten 2 percig állni hagytuk.
3. A csöveket 4 °C-on, maximális fordulatszámon (15000 rpm), 15 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót új csőbe átpipettáztuk.
4. A felülúszóhoz 500-500 µl kloroformot mértünk. Összeráztuk, majd 2 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk.
5. A mintákat 4 °C-on, maximális fordulatszámon (15000 rpm), 15 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót új csőbe átpipettáztuk.
6. A felülúszóhoz 700 µl jéghideg, tömény izopropanolt mértünk. Alapos összerázás után a DNS-t -20 °C-on történő overnight inkubálás során kicsaptuk.
7. A mintákat 4 °C-on, maximális fordulatszámon (15000 rpm), 15 percig centrifugáltuk, majd az izopropanolt leöntöttük.
8. A DNS-t 1ml 70%-os etanollal mostuk.
9. A mintákat 4 °C-on, maximális fordulatszámon (15000 rpm), 15 percig centrifugáltuk, majd az alkoholt leszívtuk.
10. A DNS-ről az alkoholt lámpa alatt elpárologtattuk, majd 40 µl DNáz mentes vízben feloldottuk.

A fluoreszcens fehérjét kódoló plazmidot plazmid izoláló kittel (Geneaid) tisztítottuk.

5.2. DNS koncentráció és tisztaság meghatározása

A kinyert DNS-ek koncentrációját (ng/µl) és tisztaságát (a 260 és 280 nm-en mért abszorbancia hányadosa) nano-fotométerrel (Implen) határoztuk meg.

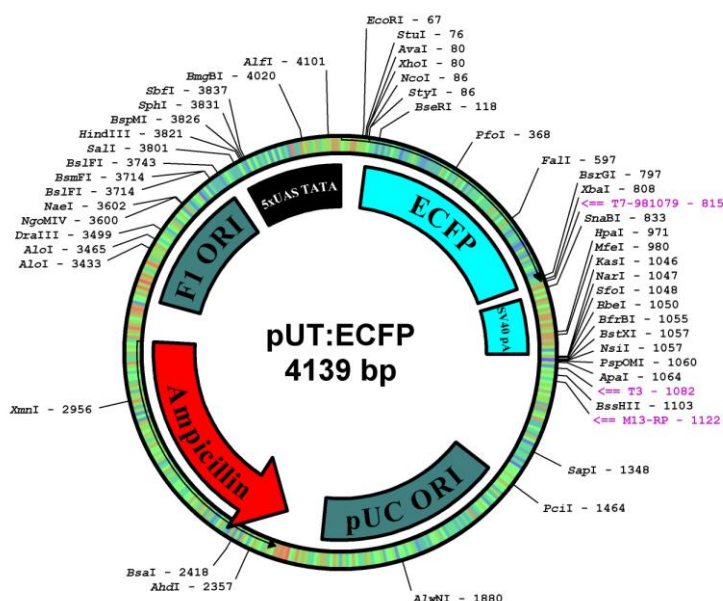
5.3. Primertervezés

Első lépésben a szabadon hozzáférhető Oligo Explorer szoftver segítségével megterveztük a vitellogenin promótert és a fluoreszcens fehérjét (ECFP) kódoló génszakaszt felszokszorozó primerpárokat úgy, hogy azok 5' végei hordozzák a rekombinációs lépésekhez szükséges szekvenciákat (2.sz. táblázat).

primer neve	primer szekvenciája
Vtg 1-attB3 F1	5' GGGGACAAGTTTGTATAATAAAGTAGGCT CACTGCCCCAAATAAAATTCAACG 3'
vtg 1-attB3 F2	5' GGGGACAAGTTTGTATAATAAAGTAGGCTTTTATCTTTCCCATGATGACAGCA 3'
vtg 1 attB5 R	5' GGGGACCACTTTGTATACAAAAGTTGGGTGGCTGGTGGTTTGTGAAGAAC 3'
pUT ECFP attB1 F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT CGAGCCATGGTGAGCAAG 3'
pUT ECFP attB2 R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCAATTAACCCCTCACTAAAGGG 3'

2.sz. táblázat: Az általunk tervezett primerek szekvenciája (vastaggal jelölve a rekombinációhoz szükséges att szakaszok)

A vitellogenin-1 gén promóter régiójához az Ensembl adatbázisból kikerestük a zebradánio vitellogenin-1 gént kódoló szakaszt, majd a primerpárt először a transzkripció start helyet megelőző 4082 bp hosszúságú, majd egy 3357 bp hosszúságú, a feltételezett promóter régiót magába foglaló szakaszra terveztük. A fluoreszcens fehérjét a kódoló pUT ECFP plazmidról (5.sz. ábra) terveztük felszokszorozni. Fontos kritérium volt, hogy a felszokszorozandó szakasz *poliA* régiót is tartalmazzon, hogy a konstrukcióról érett mRNS, majd fehérje tudjon képződni.



5.sz.. ábra: A pUT-ECFP plazmid térképe

5.4. PCR reakciók

5.4.1. A promóter régió felsokszorozása

A kitisztított zebradánió genomi DNS-ből az alábbi összetétel és PCR-profil alkalmazásával felsokszoroztuk a promóter régiót. Mivel a felsokszorozandó szakasz hosszú és a PCR reakció során kapott fragmentben nem lehet báziseltérés, *proofreading* aktivitással rendelkező *Pfu* enzimet (Fermentas) használtunk. A 10x puffer összetétele: 500 mM KCl, 100 mM TrisHCl, 1% Triton x 100. A PCR reakciók optimalizálása során négy féle összetételű PCR reakciót vizsgáltunk, termékként a 4082 bp hosszúságú promóter régiót vártuk. Ezen reakciók összetételeit mutatja 3., 4., 5. és 6. sz. táblázat.

Mivel a hosszabb fragment túl nagynak bizonyult a plazmidba való beépítéshez, ezért egy rövidebb 3357 bp hosszúságú szakaszra is összeraktunk egy PCR reakciót, ennek az összetételét írja le a 7. sz. táblázat.

A reakciókat Swift Max Pro (ESCO) PCR gépben hajtottuk végre (94 °C 2 min; 3X 94 °C 1 min, 53 °C 2 min, 70 °C 9 min; 35X 94 °C 2 min, 56 °C 30 sec, 70 °C 9 min; 70 °C 5 min).

Reakció 1.	
10x puffer MgSO ₄	2,50 µl
F primer	5, 295 pM
R primer	5, 295 pM
dNTP	62,50 mM
DNS	1,00 µg
Taq (Fermentas)	1,00 µl
Végtérfog	25,00 µl

3.sz. táblázat: Első PCR variáció

Reakció 2.	
10x puffer MgSO ₄	2,50 µl
F primer	5, 295 pM
R primer	5, 295 pM
dNTP	62,5 mM
DNS	2,00 µg
Taq (Fermentas)	1,00 µl
Végtérfog	25,00 µl

4.sz. táblázat: Második PCR variáció

Reakció 3.	
10x puffer	2,50 µl
F primer	5, 295 pM
R primer	5, 295 pM
dNTP	125 nM
MgSO ₄	100 nM
DNS	1,00 µg
Pfu (Fermentas)	0,50 µl
Végtérfogat	25,00 µl

5.sz. táblázat: Harmadik PCR variáció

Reakció 4.	
10x puffer	2,50 µl
F primer	5, 295 pM
R primer	5, 295 pM
dNTP	125 nM
MgSO ₄	100 nM
DNS	1,00 µg
Pfu (Fermentas)	0,50 µl
Végtérfogat	25,00 µl

6.sz. táblázat: Negyedik PCR variáció

Reakció a 3357 bp hosszúságú szakaszra	
10x puffer	2,50 µl
F primer	5, 295 pM
R primer	5, 295 pM
dNTP	125 mM
MgSO ₄	2 mM
DNS	1,00 µg
Pfu (Fermentas)	0,50 µl
Végtérfogat	25,00 µl

7.sz. táblázat: PCR összetétel a 3357 bp hosszúságú fragmentre

5.4.2. Az ECFP-t kódoló szakasz felszorzozása

A felhasznált pUT ECFP plazmid szekvenciája alapján megterveztük a szükséges primereket, úgy, hogy a felszorzozandó szakasz *poliA* régiót is tartalmazzon, azért, hogy így a konstrukcióról érett mRNS, majd fehérje tudjon képződni. A felszorzozást az alábbi összetétellel (8.sz. táblázat) és PCR profillal végeztük:

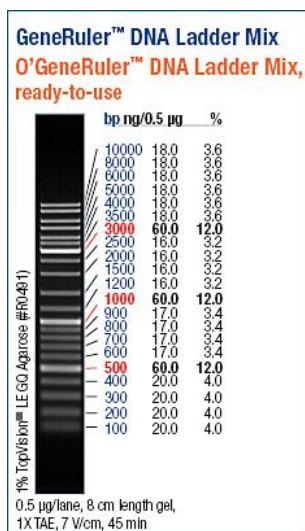
Reakció	
10x puffer	2,50 µl
Forward primer	5, 295 pM
Reverse primer	5, 295 pM
dNTP (Fermentas)	50 nM
MgCl ₂ 25mM	50 nM
DNS	0,5 µg
Taq (Fermentas)	1,00 µl
Végtérfogat	25,00 µl

8.sz. táblázat: PCR összetétel az ECFP-t kódoló szakasz felszorzására

A reakciókat Swift Max Pro (ESCO) PCR gépben hajtottuk végre (95 °C 1 min; 40X 95 °C 15 sec, 56 °C 20 sec, 72 °C 2 min).

5.5. Agaróz gélelektroforézis

A PCR termékeket, valamint a konstrukció létrehozása során kitisztított plazmidokat és a restrikciós emésztések eredményét 1,5 %-os agaróz gélben ellenőriztük. Molekulasúly markerként Fermentas GeneRuler Ladder Mix-et használtunk (6.sz. ábra).



6.sz. ábra: A GeneRuler DNS referencia létra képe

A mintákat etídium-bromid segítségével tettük láthatóvá UV- fényben. A gélképeket GeneSnap program segítségével rögzítettük.

5.6. Fragment tisztítás agaróz gélből

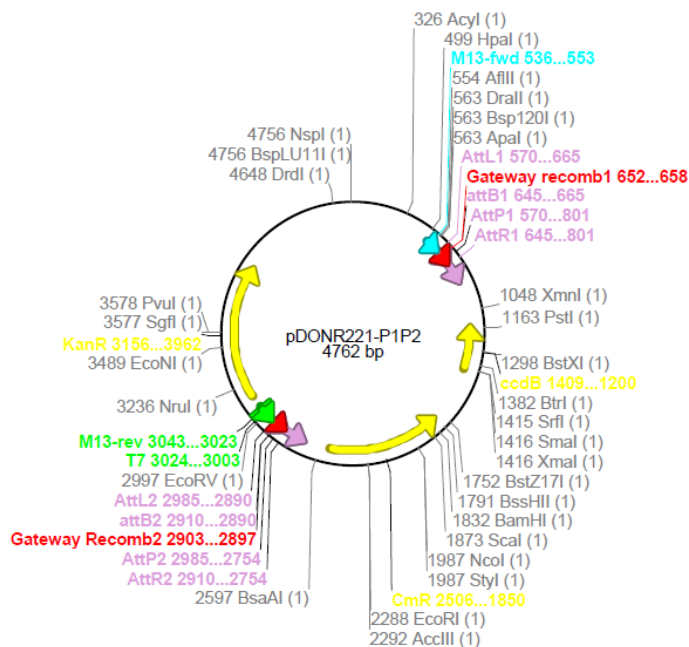
A PCR reakciók során kapott termékeket a klónozás előtt fragmenttisztító kit (NucleoSpin, Macherey-Nagel) segítségével visszanyertük az agaróz gélből. A DNS koncentrációját és tisztaságát a fent leírt módon ellenőriztük.

5.7. Klónozás

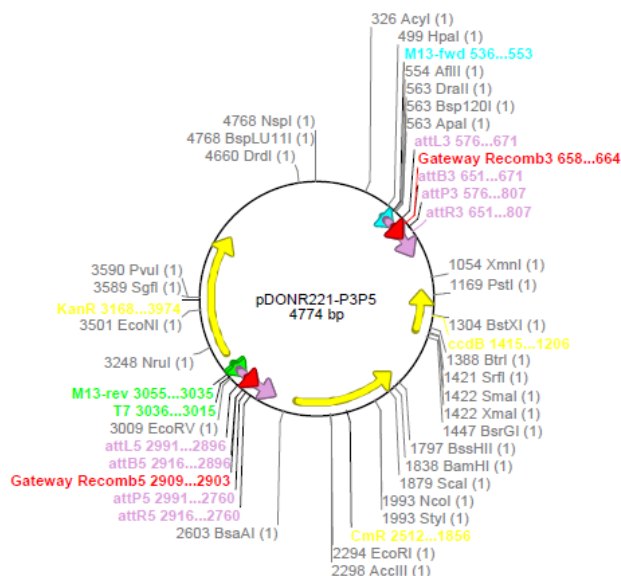
A klónozások során a PCR reakciók rekombinációs helyeket is hordozó termékeit juttattuk helyspecifikus rekombinációval a megfelelő plazmidokba (BP klónozás), majd ezeket a plazmidokat egy *Tol2* karokat tartalmazó plazmiddal rekombináltatva hoztuk létre a konstrukciót (LR klónozás) (4.sz. ábra).

5.7.1. BP klónozás

A BP klónozás során a különböző attB rekombinációs szekvenciákkal rendelkező PCR termékeket (vitellogenin-1 gén promóter régiója –attB3, attB5) és az ECFP-t kódoló szakasz-attB1, attB2) helyspecifikus rekombináció segítségével két külön plazmidba építettük (7. és 8. ábra).



7.sz. ábra Az ECFP-t kódoló szakasz befogadására alkalmas attP1 és attP2 rekombinációs helyeket hordozó plazmid térképe



8.sz. ábra A vitellogenin promóter régió befogadására alkalmas attP3 és attP5 rekombinációs helyeket hordozó plazmid térképe

A helyspecifikus rekombinációt a BP klonáz enzim katalizálja. A klónozáshoz 20 fmol plazmidra és 10 fmol PCR termékre van szükség. A DNS-ek méretei alapján az alábbi képlet segítségével kiszámítható a bemérendő fragmentek és plazmidok mennyisége (9. sz. táblázat):

$$ng = (X \text{ fmol}) * (bp) * 660 \text{ fg/fmol} * (1 \text{ ng} / 10^6 \text{ fg})$$

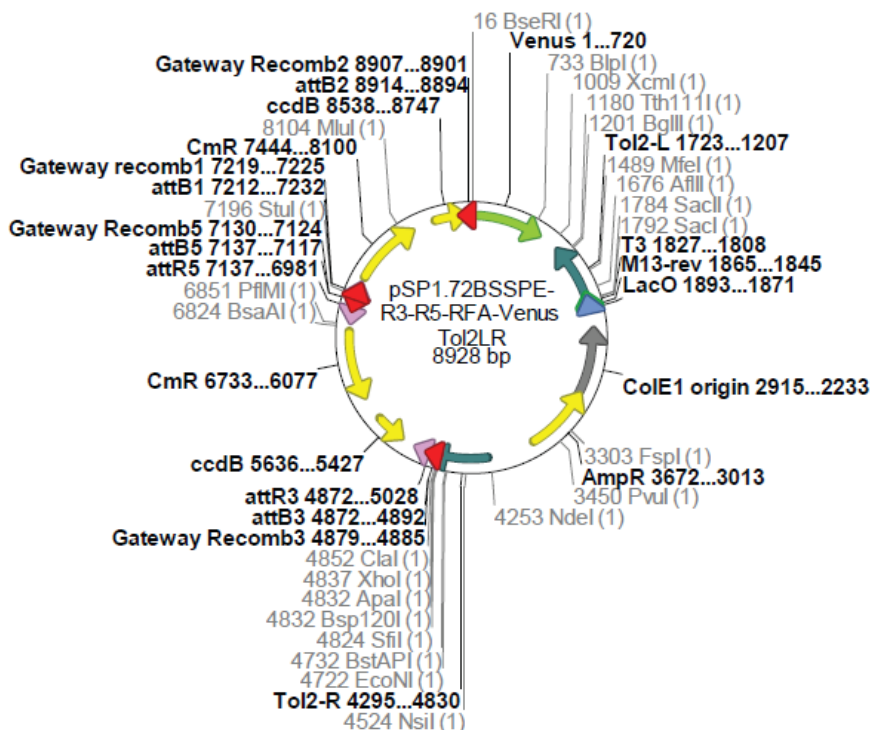
fragment/ plazmid neve	mérete (bp)	koncentrációja (ng/μl)	bemérendő mennyiség		reakció
			(ng)	(μl)	
vtg-1 promóter-B3B5 (nagyobb)	4082	28,5	26,94	0,94	A
vtg-1 promóter-B3B5 (kisebb)	3357	45	22,16	2,03	
pDONR221-P3P5	4774	109	63	0,57	
ECFP-B1B2	1086	66	37	0,56	B
pDONR221-P1P2	4762	45,5	150	3,30	

9.sz. táblázat: A BP klónozás során felhasznált vektorok mérete és mennyisége

Mindkét reakció esetén az elegyhez 2 μl BP Clonase (Invitrogen) enzimet adtunk és TE pufferrel (10 mM TRIS HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) 10 μl-re egészítettük ki. A reakciókat 25 °C-on inkubáltuk egy éjszakán át.

5.7.2. LR klónozás

Az LR klónozás során a BP klónozás eredményeként kapott plazmidokat, a Tol2 karokat tartalmazó plazmiddal rekombináztattuk (9.sz. ábra), így hozva létre a konstrukciót.



9.sz. ábra A Tol2 karokat hordozó vektor térképe

A rekombinációt az LR klonáz enzim hajtja végre, 20 fmol Tol2 karokat hordozó vektorhoz 10 fmol, a kívánt fragmenteket hordozó plazmidok között (10.sz. táblázat). A bemérendő mennyiség kiszámítását az alábbi képlet segítségével végeztük:

$$\text{ng} = (\text{X fmol}) \cdot (\text{bp}) \cdot 660 \text{ fg/fmol} \cdot (1 \text{ ng} / 10^6 \text{ fg})$$

plazmid neve	mérete (bp)	koncentrációja (ng/μl)	bemérendő mennyiség	
			(ng)	(μl)
Tol2 LR	8928	114	117,84	0,97
pDONR221-vtg1-L3L5	5947	41,5	39,25	0,94
pDONR221-ECFP-L1L2	3659	155	21,954	0,14

10.sz. táblázat: Az LR klónozás során felhasznált vektorok mérete és mennyisége

Mivel a pDONR221-ECFP-L1L2 plazmidból bemérendő mennyiség igen kicsi, ezért az a plazmidot tízszeresére hígítottuk, majd a reakcióba 0,7 μl-t mértünk.

Az elegyhez még hozzáadunk 1 μl LR Clonase II. enzim mixet (Invitrogen), valamint TE Pufferrel (pH= 8) 5 μl-re egészítettük ki. A reakciót 25 °C-on, 16 órán át inkubáltuk.

5.8. Transzformálás baktériumba

A klónozás után az előállított plazmidokat hősokk transzformációval XL10 GOLD *Escherichia coli* kompetens sejtekbe jutattuk.

1. A -80 °C- on tárolt kompetens sejteket jégen felolvasztottuk.
2. 1,5 ml-es Eppendorf csőbe 250 µl kompetens sejtet mértünk, majd 2 µl plazmidot mértünk hozzá.
3. Az elegyet 30 percig jégen inkubáltuk, majd pontosan 45 másodpercre 42 °C-ra helyeztük, majd 2 percre újra jégre.
4. A keverékhez 500 µl folyékony LB tápoldatot (10 g/l tripton, 5 g/l élesztőkivonat, 10g/l NaCl) mértünk, majd a csöveket 90 percre 37 °C-on működő rázótermosztátba tettük.
5. Az inkubációs idő leteltével a baktérium szuszpenziót a plazmidnak megfelelő antibiotikumot tartalmazó agaros (1%) LB táptalajra szélesztettük (11.sz. táblázat).

plazmid neve	antibiotikum
Tol2-vtg1-ECFP	Ampicillin
pDONR221-vtg1-L3L5	Kanamycin
pDONR221-ECFP-L1L2	Kanamycin

11.sz. táblázat: A felhasznált plazmidok antibiotikum rezisztenciája

6. A Petri-csészéket 37 °C-on inkubáltuk egy éjszakán át.

5.9. Plazmid tisztítás

A klónozási lépéseket követően a plazmidokat plazmidtisztító kit segítségével izoláltuk (Geneaid) a gyártó előírásai szerint.

5.10. Restriktációs emésztés

A BP klónozás után a plazmidok szekvenciáját, azaz a kívánt fragmentek beépülését restriktációs emésztéssel ellenőriztük.

A vitellogenin promótert hordozó plazmid esetén PstI és XbaI enzimet (Fermentas), az ECFP-t hordozó plazmid esetén RsaI enzimet (Fermentas) használtunk. A reakciókat 10 µl végtérfogatban az alábbiak szerint állítottuk össze (12, 13. és 14.sz. táblázat):

Összetevő neve	Bemérendő mennyiség (µl)
Puffer	2
PstI enzim	1,5
XbaI enzim	1,5
plazmid	5

12.sz. táblázat: A PstI és XbaI emésztési reakció összetétele

Összetevő neve	Bemérendő mennyiség (µl)
Puffer	2
PstI enzim	1,5
plazmid	5

13.sz. táblázat: A PstI emésztési reakció összetétele

Összetevő neve	Bemérendő mennyiség (µl)
10x Yellow Tango puffer	1,4
RsaI enzim	0,6
plazmid	12

14.sz. táblázat: Az RsaI emésztési reakció összetétele

A reakciókat 37 °C-n, 1 órán át inkubáltuk, majd agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

6. Eredmények

A dolgozatban az Anyag és módszer valamint az Eredmények című fejezet szorosan összetartozik és átfed, mivel az elsődleges cél a konstrukció létrehozása volt.

Munkánk során célunk egy olyan génkonstrukció létrehozása volt, amelyben a fluoreszcens riporter fehérje kifejeződése egy ösztrogén hatású anyagokkal indukálható molekuláris kapcsoló irányítása alatt áll. A konstrukció mikroinjektálásával így olyan transzgenikus zebradánió vonal kialakítására nyílik lehetőség, amely -megfelelő érzékenység esetén- képes lesz ösztrogén hatású anyagok jelenlétét kimutatni a környezetben.

A konstrukció létrehozásához a májban ösztrogén hatására kifejeződő vitellogenin-1 gén promóter régióját, valamint riporterként egy kék színű fluoreszcens fehérjét, az ECFP-t (*Enhanced Cyan Fluorescent Protein*) választottuk. Ezért a létrehozandó transzgenikus vonal mellett, hogy bioszenzor vonalként működhet, alkalmas lehet a szennyezőanyagok májra kifejtett káros hatásainak kimutatására is *in vivo*, az állatok feláldozása nélkül. Mivel az ivarérett nőstényekben normál körülmények között az endogén ösztrogén hatására is működésbe lép a fluoreszcens jel, a nőivarú egyedeken olyan anyagok májkárosító hatásai is jól felmérhetőek, amelyek ösztrogén hatással nem rendelkeznek.

A konstrukció létrehozásához a Gateway klónozási technikát hívtuk segítségül, és a hagyományos plazmid alapú génkonstrukciók helyett a transzgenikus vonalak létrehozása szempontjából jóval nagyobb hatékonyságú Tol2 transzpozont használtuk.

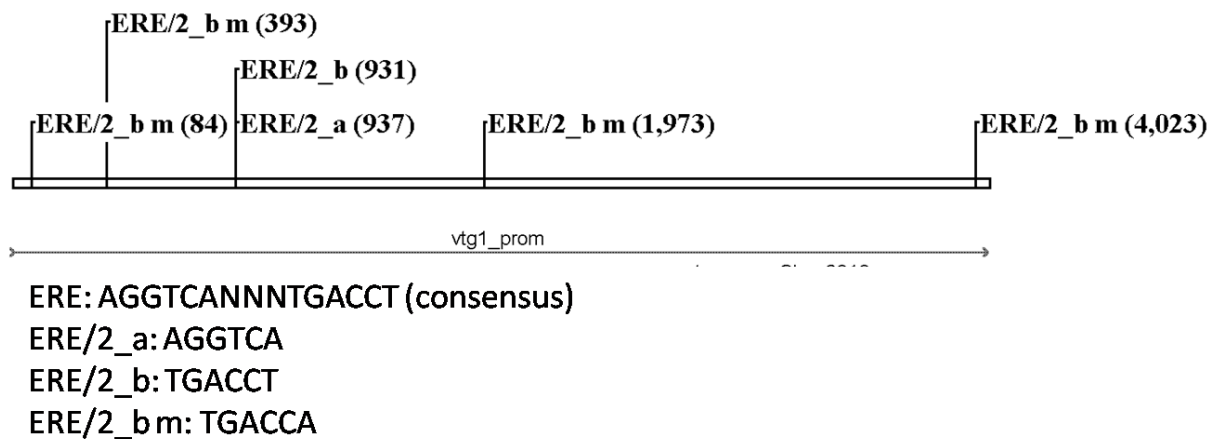
6.1. Primerek tervezése

Az első feladat a konstrukcióba beépítendő szakaszok felszorzozásához szükséges primerek megtervezése volt.

Az élő szervezetekben zajló bonyolult molekuláris folyamatok és szabályozási lehetőségek miatt igazán hatékony, promóter azonosításra szolgáló szoftver jelenleg nem ismeretes. Ezért a szabadon elérhető Ensembl adatbázisból kikerestük a vitellogenin-1 gént kódoló szakaszt, és a transzkripció start helyet megelőző néhány ezer bázispárnyi szakaszt vettük alapul. Ez a szakasz feltételezhetően magában foglalja a promóter régiót és a gént megelőző *upstream* szabályozó régiók nagyrészét.

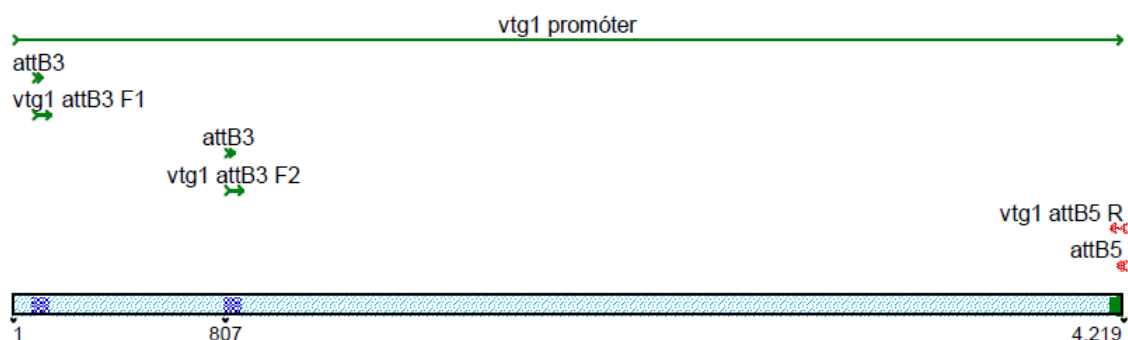
Az első primer párt egy 4082 bp hosszúságú szakaszra terveztük (vtg 1- attB3 F1, vtg 1- attB5 R) azonban a fragment hosszúsága miatt azt nem sikerült plazmidba klónozni. A kutatócsoport előzetes eredményei alapján megfelelő számú ERE (*Estrogen Responsive Element*)

helyet tartalmazott egy rövidebb, 3357 bp hosszúságú szakasz is (10. sz. ábra). A primer pár *forward* tagját újra terveztük, hogy ezt a szakaszt tudjuk felsokszorozni (vtg 1-attB3 F2).



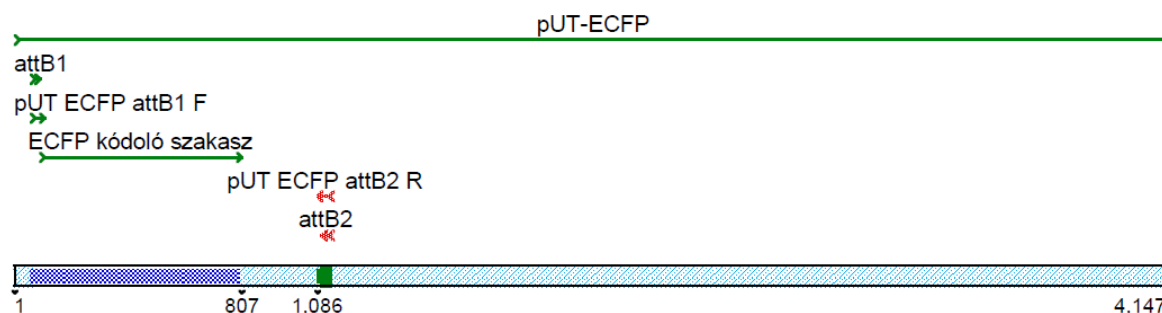
10.sz. ábra: A ERE helyeket tartalmazó vtg-1 promóter szakasz sematikus ábrája

A Gateway klónozási technika lehetővé teszi a fragmentek irányított, helyspecifikus klónozását, amelyhez speciális, egymástól kismértékben eltérő rekombinációs szekvenciák szükségesek. Ezért a primereket úgy terveztük meg, hogy azok 5' végei hordozzák a megfelelő helyre és irányban történő beépüléshez szükséges attB3 és attB5 szekvenciákat (11.sz. ábra).



11.sz. ábra: Az attB és attR szakaszokat tartalmazó primerek sematikus ábrája

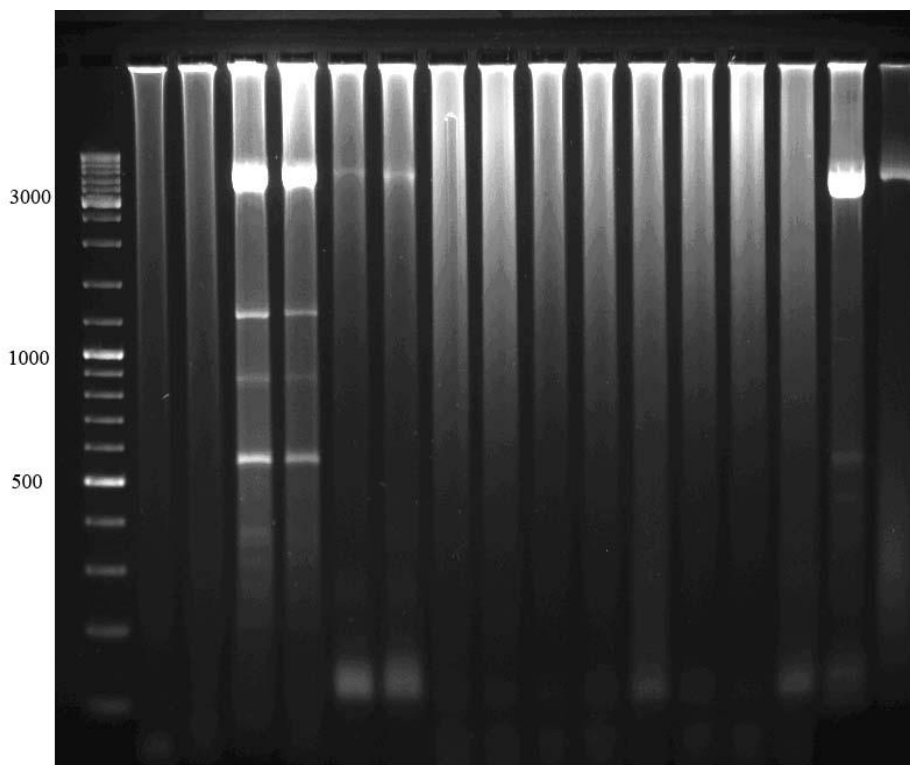
A fluoreszcens fehérjét kódoló szakaszt a hordozó pUT ECFP plazmidról terveztük felsokszorozni. A primertervezés során a rekombinációhoz szükséges szekvenciák (attB1 és attB2) mellett fontos szempont volt, hogy a létrehozott fragment az mRNA éréséhez nélkülözhetetlen poliA szigált is tartalmazza. Ennek hiányában a konstrukcióról nem képes érett mRNA, majd fehérje, így fluoreszcens jel képződni. A tervezett primerpár egy 1086 bp hosszúságú szakaszt fog közre (12.sz. ábra).



12.sz. ábra: A pUT ECFP plazmidra tervezett primerek sematikus ábrája

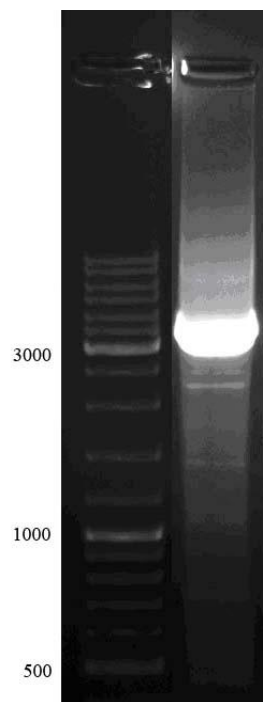
6.2 A beépítendő szakaszok felsokszorozása

A vitellogenin promótert annak érdekében, hogy teljesen pontos másolatok képződjenek a genomban található promóterről, proofreading aktivitással rendelkező enzimmel (*Pfu*) sokszoroztuk fel. Itt egyetlen bázisnyi eltérés is károsan befolyásolhatja a későbbiekben a konstrukció működését és érzékenységét. A felsokszorozandó szakasz viszonylag nagy mérete miatt a PCR reakció optimalizálására volt szükség. Kezdetben, mivel a PCR reakciókban a kisebb méretű fragmentek előnyt élveznek a nagyobbakhoz képest, számos áterméket kaptunk (13.sz. ábra). Ezek később a klónozás során (szintén kis méretükből adódó előnyük miatt) a konstrukcióba beépülhetnek, rontva a kívánt vektor létrehozásának hatékonyságát.



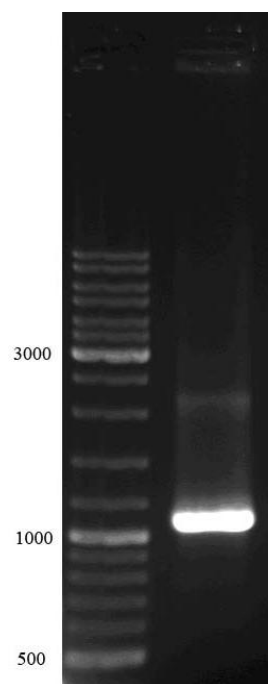
13. sz. ábra: A PCR reakció optimalizálásának gélképe

A hosszabb promóter szakaszt nem sikerült a BP klónozás során plazmidba juttatni. Ezért egy rövidebb szakaszt is felsokszoroztunk (14.sz. ábra).



14. sz. ábra: A rövidebb vitellogenin promóter régió PCR eredményének gélképe

A cián fluoreszcens fehérjét kódoló szakaszt szintén felszorzottuk PCR reakció segítségével (15.sz. ábra).



15. sz. ábra: Az ECFP-t kódoló szakasz PCR reakciójának gélképe

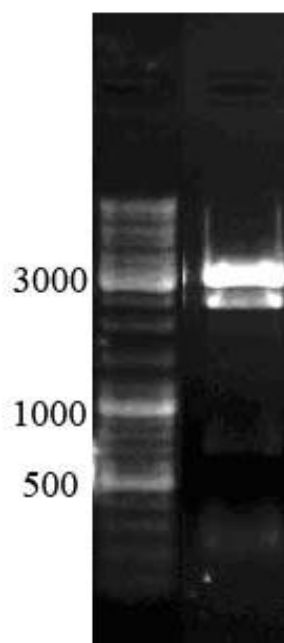
6.3 A fragmentek beépítése a konstrukcióba

A megfelelő méretű PCR termékek létrehozása után a fragmenteket két lépésben, az ún. Gateway technika alkalmazásával a konstrukcióba építettük.

A módszer során első lépésként a konstrukció két fő elemét, a vitellogenin promóter régiót és a fluoreszcens fehérjét kódoló szakaszt külön-külön plazmidokba kell klónozni. A folyamatot a rekombinációban részt vevő szakaszok neve (attB és attP) alapján a BP klonáz enzim katalizálja. Ennek során mind a vitellogenin promóter, mind pedig a fluoreszcens fehérjét tartalmazó szakaszok végein található úgynevezett attB szekvenciák rekombinálódnak a „befogadó” plazmidban található attP szekvenciákkal. A beépíteni kívánt szakaszok helyet cserélnek a plazmidok attachment site-ok közötti részével. A B és P végek rekombinációjával attL szakaszok jönnek létre.

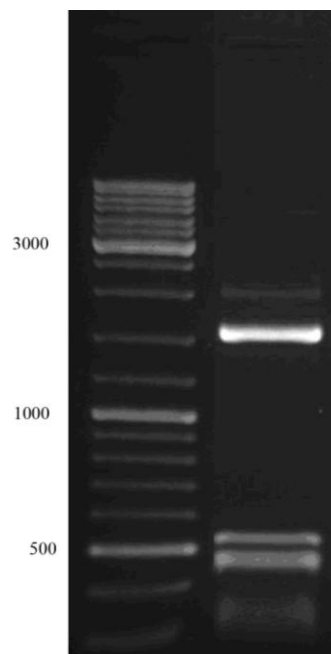
A klónozást követően a plazmidokat kitisztítottuk és a szakaszok beépülését restrikciós emésztéssel ellenőriztük.

A vitellogenin promóter beépülését PstI és XbaI enzimekkel történő restrikciós emésztéssel ellenőriztük. A várt fragmentek beépülés esetén: 3285 bp, 2342bp, 401bp, 114 bp. A beépülést az alábbi gélképpel sikerült igazolni (16. sz. ábra)



16.sz. ábra: A vitellogenin promóter beépülését igazoló gélkép

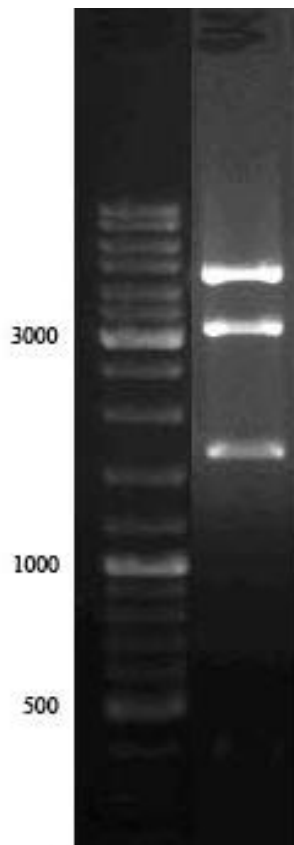
Az RsaI-el végzett emésztéssel az ECFP-t kódoló szakasz beépülését ellenőriztük. A szekvenciák alapján beépülés esetén a következő fragmenteket vártuk: 1581 bp, 436 bp, 431 bp, 371 bp, 282 bp, 269 bp. A 17. ábra jól illusztrálja, hogy a várt fragmenteket meg is kaptuk. Hiszen ha nem épült volna be a promóter, akkor az enzim linearizálta volna a plazmidot.



17.sz. ábra: Az RsaI-gyel végzett emésztés gélképe

A következő lépés a vitellogenin promótert és a fluoreszcens fehérjét kódoló szakaszok beépítése a Tol2 végeket tartalmazó plazmidba. Ez a lépés a BP klónozáshoz hasonlóan szintén helyspecifikus rekombináció elvén alapul, amelynek során LR klonáz enzim jelenlétében rekombinálódnak az előbbi reakció során létrejött attL végek a Tol2 Gateway plazmidon lévő attR végekkel, így az attR rekombinációs szakaszok között található fragmentek helyet cserélnek a „befogadó” plazmidokban található promóterrel és ECFP génnel.

A két fragment beépítése egy lépésben történt, emiatt előfordulhat, hogy a vektorba vagy csak a promóter régió vagy csak a fehérjét kódoló rész épült be. Az ilyen plazmidokat hordozó telepek antibiotikum rezisztencia vagy más biokémiai sajátság alapján nem különíthetők el, Mindkét konstrukció azonban jól használható a későbbiekben. A 18. számú ábrán a vitellogenin promóter Gateway plazmidba történt beépülését láthatjuk, PstI- emésztése követően. A várt fragment méretek: 5500 bp, 3092 bp, 735 bp voltak, tehát a beépülést sikerült igazolnunk.



18. ábra: Vitellogenin promótert hordozó Gateway vektor PstI emésztést követően

Az előzővel létrehozhatunk más riportert kifejező, ösztrogénre érzékeny konstrukciót. Az utóbbiba bármilyen promótert beépíthetünk, így a kék fehérjét a zebradánió más szerveiben, sejtjeiben is kifejeztethetjük a létrehozás céljától függően (bioszenzor vonal, fejlődésbiológiai vizsgálatok, stb.).

Az LR reakció eredményeként kapott plazmidok szekvenciaellenőrzése folyamatban van. A megfelelő konstrukciókat ezt követően linearizáljuk, majd transzpozáz mRNS-sel együtt 1-2 sejt, vad típusú zebradánió embriókba mikroinjektáljuk. Az injektálás után vizsgáljuk a konstrukció kifejeződését és a kifejeződés helyét ösztrogén jelenlétében. Amennyiben a konstrukció a várt eredményt hozza és a fluoreszcens jel ösztrogén indukció hatására megjelenik a fejlődő lárvák májában, az injektált lárvákat felneveljük és a későbbiek során alapítóként használjuk egy stabil, homozigóta, májban indukálhatóan kék fluoreszcens fehérjét kifejező transzgenikus zebradánió vonal létrehozása során.

A létrehozandó vonal segítségével lehetőség nyílt ösztrogén hatású anyagok kimutatására és vizsgálatára már lárvakorban is. A zebradánió embriókat és lárvákat a táplálkozó kor eléréséig az Európai Unióban hatályos állatvédelmi szabályok nem tekintik élő állatnak, így egy olyan modell hozható létre, amellyel élő állatkísérletek is kiválthatók.

7. Következtetések és javaslatok

Munkánk folytatásaként a későbbiekben az elkészített konstrukciót 2-4 sejtés stádiumban lévő zebradánió embrióba injektáljuk, majd az így előállított P₀ nemzedékből egy új transzgenikus zebradánió vonalat kívánunk létrehozni.

A jövőben javasoljuk a létrehozni kívánt vonal fenntartását, valamint az ösztrogénre való érzékenység mértékének megállapítását. Távlati terveink között szerepel egy ösztrogén hatású szennyező anyagok kimutatására alkalmas zebradánió alapú teszrendszer létrehozása. Továbbá más transzgenikus vonalak felhasználásával létrehozhatók olyan vonalak, melyeknek több szervükben különböző színű fluoreszcens fehérje expresszálódik, így egy vizsgálatban több célszerv is tanulmányozható. Az így létrehozni kívánt vonalak továbbá megfelelnek az Európai Unió állatvédelmi irányelveinek is, hiszen kevesebb vonalat kell fenntartani, ezáltal a laboratóriumban kísérleti céllal tartott állatok száma is csökkenthető.

8. Összefoglalás

A kommunális szennyvizekkel, ipari és mezőgazdasági tevékenységgel a környezetünkbe jutó ösztrogén hatású anyagok a természetes ösztrogének analógjaiként működve komoly veszélyt jelentenek az élő szervezetek hormonháztartására. Ennek okán egyre nagyobb igény mutatkozik az ilyen anyagok kimutatására és hatásának vizsgálatára alkalmas modellrendszerek iránt. A kutatók figyelme részben a költségek csökkentése érdekében, részben az egyre szigorodó állatvédelmi előírások miatt az emlős modellek helyett egyre inkább az egyéb gerincesek felé irányul.

A zebradánió /*Danio rerio*/ fejlődésbiológiai és genetikai szempontból is az egyik legjobban ismert halfaj. Széleskörűen alkalmazzák ilyen jellegű vizsgálatok alanyaként, de toxikológiai célú felhasználása is elterjedt. Mivel a zebradánió embriók áttetszőek, a fluoreszcens fehérjét expresszáló transzgenikus vonalak lárváiban a jelölt célszervek jól tanulmányozhatók.

A halakban, az emlősökhöz hasonlóan az egyik fő toxikológiai célszerv a máj. A transzgenikus vonal létrehozásához a májspecifikus expressziót mutató gének közül a vitellogenin-1 gént választottuk. Ennek promótere ösztrogén hatású anyagokkal indukálható, így a máj fejlődésére ható szennyezőanyagok hatásainak vizsgálatán kívül az ösztrogén hatású anyagok kimutatására is alkalmas transzgenikus vonal hozható létre a segítségével.

A gén működését szabályozó régiót az Ensembl adatbázisban lévő genomi, illetve cDNS szekvenciák segítségével elemeztük. A feltételezett transzkripció start helyet megelőző promóter régiót és *upstream* szabályozó szekvenciákat tartalmazó fragmentet, valamint a cián fluoreszcens fehérjét /CFP/ kódoló génszakaszt egy kétlépéses, helyspecifikus rekombináció elvén működő, Tol2 transzpozon alapú *Gateway* klónozó rendszerbe építettük. Az így előállított konstrukciót 1-2 sejtes zebradániókba injektáljuk. Az injektált embriókat 100 ng/l 17- β -ösztradiollal kezeljük, negatív kontrollként a zebradániós rendszer haltartó vizét használjuk. A termékenyítéstől számított 5. napon mikroszkóp alatt a cián fluoreszcens fehérjének megfelelő szűrőn keresztül vizsgáljuk a konstrukció működését, azaz a fluoreszcens jel megjelenését és annak helyét

A májban fluoreszcens fehérjét kifejező egyedek felnevelésével a későbbiekben egy ösztrogén hatású anyagok vizsgálatára alkalmas transzgenikus vonal alakítható ki, amelyben bizonyos ösztrogénkoncentráció fölött fluoreszcens jel detektálható a májban. Ha a vonal megfelelően érzékenynek bizonyul, alkalmas lehet környezeti minták szűrésére is.

9. Irodalomjegyzék

- ALDERCRUETZ H., GORBACH S.L., GOLDIN B.R., WOODS M.N., DWYER J.T., HAMALAIMEN E. (1994): Estrogen metabolism and excretion in oriental and Caucasian women. – J. Natl. Cancer Inst. 86:1076–1082.
- ARCAND-HOY L.D., NIMROD A.C., BENSON W.H. (1998): Endocrinemodulating substances in the environment: estrogenic effects of pharmaceutical products. - Int. J. Toxicol. 17:139–158.
- BACHMANN J. (2002): Entwicklung eines Teratogenitäts - Screening - Tests mit Embryonen des Zebraäbrblings *Danio rerio*. - Doctoral thesis, TU Dresden, Germany.
- BARKER D.J.P. (2003): The developmental origins of adults disease. – Eur J Epidemiol 18:733-736.
- BARONTI C., CURINI C., D'ASCENZO G., DI CORCIA A., GENTILI A., SAMPERI R. (2000): Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in receiving river water. – Environ Sci. Technol. 24:5059-5066.
- BELLO S. M., HEIDEMAN W., PETERSON R. E. (2004). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- p-dioxin inhibits regression of the common cardinal vein in developing zebrafish. - Toxicol. Sci. 78:258–266.
- BENDIG M.M. & WILLIAMS J.G. (1984): Differential expression of the *Xenopus laevis* tadpole and adult B-globin genes when injected into fertilized *Xenopus laevis* eggs. - Mol. Celi. Biol. 4(3):567-570
- BLADER, P., FISCHER N., GRADWOHL G., GUILLEMOT G., AND STRÄHLE U. (1997). The activity of Neurogenin 1 is controlled by local cues in the zebrafish embryo. - Development 124:4557–4569.
- BLADER P., PLESSY C., STRÄHLE U. (2003). Multiple regulatory elements with spatially and temporally distinct activities control neurogenin1 expression in primary neurons of the zebrafish embryo. - Mech. Develop. 120:211–218.
- BOROS M. (2007): Állatkísérletek az orvostudományban. - Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Sebészeti Műtéttan Egyetemi jegyzet, pp 2-108.
- BRAUNBECK T & LAMMER E. (2006): Background Paper on fish embryo toxicity assays, , UBA Contract Number 203 85 422, pp 3-40.
- BREHM G. B., BREINIG G., HORSTEN-SCHWARK, WINNACKER E. L. (1988): Gene transfer in *Tilapia (Oreochromis niloticus)*. - Aquaculture 68:209-219
- BROMAGE N.R, CUMARANATUNGA P.R.C. (1988): Egg production in the rainbow trout. - In: Recent Advances in Aquaculture, Vol (Roberts RJ, Muir JF, eds). London:Croom Helm, pp. 63-138.
- CALAFAT A.M. & NEEDHAM L.L. (2007): Human exposures and body burdesns of endocrine-disrupting chemicals - In: Gore A.C.: Endocrine disrupting chemicals: from basic research to clinical practice. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 253-268

- COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (1986) Council Directive 86/ 609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. Official Journal L 358 , 18/12/1986 P. 0001–0028.
- COPELAND P.A., SUMPTER J.P., WALKER J.P., CROFT M. (1986): Vitellogeni levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdner* Richardson) at various stages of the reproductive cycle. - *Comp Biochem Physiol* 83(B):487-493.
- CREWS D., PUTZ O., THOMAS P., HAYES T., HOWDESHELL K. (2003): Animal models for the study of the effects of mixtures, low doses, and the embryonic environment on the action of endocrine disrupting chemicals – Pure and Applied Chemistry, SCOPE/IUPAC Project Implications of Endocrine Active Substances for Humans and Wildlife 75:2305-2320.
- CSENKI ZS., MÜLLER F., MAGYARY I., HORVÁTH Á., URBÁNYI B. (2006): A zebrafish (Danio rerio), mint a modern biotechnológia modellállata: jelenlegi helyzet jövőbeli lehetőségek. - Állatbiotechnológiai Kutatások Magyarországon Konferencia, MTA Budapest
- DARVAS B. & SZÉKÁCS A. (SZERK) (2006): Mezőgazdasági ökotoxikológia, L'Harmattan Kiadó, Budapest, pp 232-238.
- DAVIDSON M.W. & CAMPBELL R.E. (2009): Engineered fluorescent proteins: innovations and applications. - *Nat. Methods* 6:713-717.
- DESBROW C., ROUTLEDGE E.J., BRIGHTY G.C., SUMPTER J.P., WALDOCK M. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. - *Environ. Sci. Technol.* 32:1549–1558.
- DEZSŐ P. & NAGY J. (2005): A polimeráz láncreakció (PCR) és gyógyszerkutatói alkalmazásai. - Magyar Kémiai Folyóirat Összefoglaló közlemények 111(4):153-158
- DICKERSON S.M. & GORE A.C. (2007): Estrogenic environmental endocrine- disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle. – *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 8:223-234.
- FLETCHER L.G. & DAVIES P.L. (1992): Transgenic fish for aquaculture - in *Genetic Engineering*, Vol. 13 (Ed. Setlow, J. K.) pp. 331-370, Plenum Press, New York, USA
- FRALEY R. & PAPAHAJOPOULOS D. (1981): New generation liposomes: the engineering of an efficient vehicle for intracellular delivery of nucleic acids. - *TIBS*, pp. 77-80
- GINZBURG A.S. (1972): Fertilization in fishes and the problem of polyspermy. - (Translated from Russian by Blake, Z. ; Ed.: Golek, B.) Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem
- HILL A.J., TERAOKA H., HEIDEMAN W., PETERSON R.E. (2005): Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences*, 86(1), 6-19

- HIGASHIJIMA S., HOTTA Y., OKAMOTO H. (2000): Visualization of cranial motor neuron in live transgenic zebrafish expressing green fluorescent protein under the control of the islet -1 promoter/enhancer. – J. Neurosci. 20:206-218
- HORN P. & ZSILINSZKY S. (1983): Akvarisztika, Natura Kiadó, Budapest, pp 188-191.
- HORVÁTH L. & ORBÁN L. (1995): Genome and gene manipulation in the common carp. – Aquaculture 129(1-4):157-182
- HUTCHINSON T.H., PICKFORD D.B. (2002) Ecological risk assessment and testing for endocrine disruption in the aquatic environment. – Toxicology, 181–182:383– 387.
- INOUE K., AKITA N., SHIBA T., SATAKE M., YAMASHITA S. (1992): Metal-inducible activities of metallothionein promoters in fish cells and fry. – Biochem. Biophys. Res. Com., 185:1108-1114.
- JAENISCH R. & MINTZ B. (1974): Simian virus 40 sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. – Proc. Natl. Acad. Sci USA, 71:1250-12545
- JAENISCH R. (1976): Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. – Proc. Natl. Acad. Sci USA, 73:1260-1264
- KAVLOCK R.J., DASTON G.P., DEROSA C., FENNER-CRISP P., GRAY L.E., KAATTARI S. (1996): Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the US EPA-sponsored workshop. – Environ Health Perspect; 104(4):715–740.
- KAWAKAMI K., KOGA A., HORI H., SHIMA A. (1998): Excision of the Tol2 transposable element of the medaka fish, *Oryza latipes*, in zebrafish, *Danio rerio*. – Gene, 225:17-22.
- KAWAKAMI K., SHIMA A., KAWAKAMI N. (2000): Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition into the zebrafish germ lineage. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:11403-11408.
- KOGA A., SUZUKI M., INAKAGI H., BESSHO Y., HORI H. (1996): Transposable element in fish. – Nature, 383:30
- KRISHNAN A.V., STARHIS P., PERMUTH S.F., TOKES L., FELDMAN D. (1993): Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. – Endocrinology, 132:2279-2286.
- KRUIPER G.G., LEMMEN J.G., CARLSSON B., CORTON J.C., SAFE S.H., VAN DER SAAG P.T., VAN DER BURG B., GUSTAFSSON J.A. (1998): Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . – Endocrinology 139:4252-4263.
- LATHE R. & MULLINS J. (1993): Transgenic animals as models for human disease - report of an EC study group. – Transgenic Res., 2:286-299

- LYE C.M, FRID C.L.J, GILL M.E., COOPER D.W., JONES D.M. (1999): Estrogenic alkylphenols in fish tissues, sediments, and waters from the UK Tyne and Tees estuaries. – Environ. Sci. Technol., 33:1009– 1014.
- MAHON K.A., CHEPELINSKY A.B., KHILLAN J.S., OVERBEEK P.A., PIATIGORSKY J., WESTPHAL H. (1987): Oncogenesis of the lens in transgenic mice. - Science 235:1622.
- MUKHI S., PAN X., COBB G.P., PATIÑO R. (2005): Toxicity of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine to larval zebrafish (*Danio rerio*), Chemosphere 61:178–185.
- MÜLLER F. (2005): Comparative Aspects of Alternative Laboratory Fish Models, - Zebrafish, 2(1):47-54.
- MUNRO S.(1968): Transformation of Leghorn chicken with bantam DNA injection in gonadal tissue. - In: Monograph, Basic Research Laboratory. Johnston, Iowa, USA; Hy-Line Poultry Farms
- PAKHOMOV A.A. & MARTINOV V.I. (2008): GFP family: structural insights into spectral tuning – Chemistry & Biology 15:755-764.
- PALMITER R.D, BRINSTER R.L., HAMMER R.E., TRUMBANER M.E., RASENTELD M.G., BINNBERG N.C. & EVANS R.M. (1982): Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with methallothionein-growth hormone fusion genes. - Nature 300:611-615.
- POWERS D.A., HEREFORD L., COLE T., CREECH K., CHEN T.T., LIN C.M, KIGHT K., DUNHAM R. (1992): Electroporation: a method for transferring genes into the gametes of zebrafish (*BrachyDanio rerio*), channel catfish (*Ictalurus Punctatus*), and common carp (*Cyprinus carpio*). - Mol. Mar. Biol. Biotech., 1(4-5):301-309.
- PURDOM C.E., HARDIMAN P.A., BYE V.J., ENO N.C., TYLER C.R., SUMPTER J.P. (1994): Estrogenic effects of effluent from sewage treatment works. – Chem. Ecol. 8:275-285.
- ROSSANT J., MOENS C.B., NAGY A. (1993): Genome manipulation in embryonic stem cells. - Phil. Trans. R. Soc. Lond., 339:207-215.
- RUBINSTEIN A.L. (2003): Zebrafish: from disease modeling to drug discovery. – Curr. Opin. Drug Discov. Dev., 6:218–223.
- RUDEL R.A., MELLY S.J., GENO P.W., SUN G., BRODY J.G. (1998): Identification of alkylphenols and other estrogenic phenolic compounds in wastewater, septage, and groundwater on Cape Cod, Massachusetts. - Environ Sci Technol, 32:861– 869.
- RUSCONI S. & SCHAFFNER W. (1981): Transformation of frog embryos with a rabbit B-globin gene. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78(5):5051-5055.
- SAIKI R.K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERLICH H.A., ARNHEIM N. (1985): Enzymatic amplification of beta globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. – Science, 230(4732):1350-1354.

- SCHOLZ S., FISCHER S., GÜNDEL U., KÜSTER E., LUCKENBACH T., VOELKER D. (2008): The zebrafish embryo model in environmental risk assessment – applications beyond acute toxicity testing, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 15:394-404.
- SHANNER N.C., PATTERSON G.H., DAVIDSON M.V. (2007): Advances in fluorescent protein technology – *J. Cell Sci.* 120:4247-4260.
- SHEEHAN D.M., WILLINGHAM E.J., BERGERON J.M., OSBORN C.T., CREWS D. (1999): No threshold dose for estradiol- induced sex reversal of turtle embryos: how little is too much? – *Environ Health Perspect* 107:155-159.
- SNYDER S.A., KEITH T.L., VERBRUGGE D.A., SNYDER E.M., GROSS T.S., KANNAN K., GIESY J.P. (1999): Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. - *Environ. Sci. Technol.*, 33:2814–2820.
- SOTO A.M., JUSTICA H., WRAY J.W., SONNENSCHN C. P. (1991): Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from 'modified' polystyrene. – *Environ. Health Perspect.* 92:167-173.
- STEPANENKO O.V., VERKHUSHA V.V., KUZNETSOVA I.M., UVERSKY V.N., TUROVEROV K.K. (2008): Fluorescent protein as biomarkers and biosensors: Throwing color lights on molecular and cellular processes, - *Curr. Protein. Pept. Sci.* 9(4):338-369.
- SUMPTER J.P. & JOBLING S. (1993): Detergent components in sewage effluent are weakly estrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.*, 27:661-672.
- SUMPTER J.P. & JOBLING S. (1995): Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment, *Environ. Health Perspect.*, 103:173-178.
- VIELKIND J., HAAS H.-ANDELA, VIELKIND U., ANDERS F. (1982): The induction of a specific pigment cell type by total genomic DNA injected into the neural crest region of bsh embryos of the genus *Xiphophorus*. - *Mol. Gen. Genet.*, 185:379-389.
- WALLACE R.A. (1985): Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates, - In: Browder, L.W. (Ed.), *Developmental Biology*, vol. 1. Plenum, New York, pp. 127-177.
- WANG H., TAN J.T.T., EMELYAKOV A., KORZH V., GONG Z. (2005): Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio*, *Gene* 356: 91-100.
- WESTERFIELD M., WEGNER J., JEGALIAN B.G., DEROBERTIS E.M., PÜSCHEL A.W. (1993): Specific activation of mammalian Hox promoters in mosaic transgenic zebrafish. - *Genes and Development*, 6:591-598.
- WHITE R., JOBLING S., HOARE S.A., SUMPTER J.P., PARKER M.G. (1994): Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. – *Endocrinology*, 135:175-182.

- YANG L., HO N.Y., ALSHUT R., LEGRADI J., WEISS C., REISCHL M., MIKUT R., LIEBEL U., MÜLLER F., STRÄLE U. (2009): Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals - - Rep. Tox. 28:245-253
- ZHU Z., LI G., HE L., CHEN S. (1985): Novel gene transfer into the fertilized eggs of gold fish (*Carassius auratus* L. 1758). - Z. angew. Ichthyol., 1:31-34.
- ZHU Z., XU K., LI G., XIE Y., HE L. (1986): Biological effects of human growth hormone gene microinjected into the fertilized eggs of loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Cantor). - Kexue Tongbao, 31:988-990.
- INTERNET1: <http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/pdf/Brochures.Par.38170.File.dat/B-074573-Gateway.pdf> (utolsó letöltés: 2011.10.02., 14:00)
- INTERNET2: <http://www.oecd.org/dataoecd/17/20/1948241.pdf> (utolsó letöltés: 2011.11.02., 17:00)
- INTERNET3: <http://www.oecd.org/dataoecd/17/62/1948269.pdf> (utolsó letöltés: 2011.11.02., 17:00)
- INTERNET4: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-212-fish-short-term-toxicity-test-on-embryo-and-sac-fry-stages_9789264070141-en (utolsó letöltés: 2011.11.02., 17:00)

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani konzulenseimnek Dr. Csenki Zsolt Imrének, Dr. Kovács Balázsnak és kivált képpen Bakos Katalinnak, akik szakmailag és emberileg is támogattak és hozzájárultak szakmai ismereteim bővítéséhez, valamint segítséget nyújtottak a dolgozat elkészítésében.

Velük együtt köszönettel tartozom Dr. Müller Ferencnek és Dr. Yavor Hadzhievnek (University of Birmingham), akik a Gateway klónozási technikát és a szükséges alapvektorokat a rendelkezésünkre bocsátották.

A dolgozat a TÁMOP-4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003 „Az oktatás és kutatás színvonalának emelése a Szent István Egyetemen”, a norvég finanszírozású OTKA pályázat (NNF 78834), valamint az NKTH Baross Gábor Program HALEDC09-REG-KM-09-2-2009-0066 c. pályázat támogatásával valósult meg.