

XXXI. OTDK BIOLÓGIA SZEKCIÓ

Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi kar
Genetikai Tanszék

Biológus Msc

II. Évfolyam

OTDK Dolgozat

Zebradánió Tectum Opticum mutánsok térképezése és jellemzése

Készítette: Csályi Kitti Dóra

Témavezető: Dr. Varga Máté tanársegéd

ELTE TTK Genetikai Tanszék

Tartalom

Tartalom	2
Rövidítések jegyzéke	3
Bevezetés	4
A TO mutáns halak létrehozása	6
A sejtciklus szabályozása a Wnt/ β -catenin és a Notch szignalizációs útvonalakon keresztül	7
Anyagok és Módszerek	11
A hal vonalak tartása és a minták fixálása	11
Genomi DNS izolálása	11
Géntérképezés	11
PCR	12
In situ hibridizáció	12
Viselkedésvizsgálat	12
Eredmények	13
Az A25-ös mutáns vonal géntérképezése	13
Az A6-os mutáns vonal térképezése	15
A sejtciklusban és sejtproliferációban szerepet játszó gének expressziós mintázatának vizsgálata A25-ös és A4-es mutáns és vad fenotípusú egyedekben	16
Az A25-ös és A4-es mutáns és vad fenotípusú halak viselkedésvizsgálata	18
Konklúzió	20
Tervezett kísérletek	20
Összefoglalás	21
Abstract	22
Szerzői hozzájárulás	23
Irodalomjegyzék	24
Köszönetnyilvánítás	25

Rövidítések jegyzéke

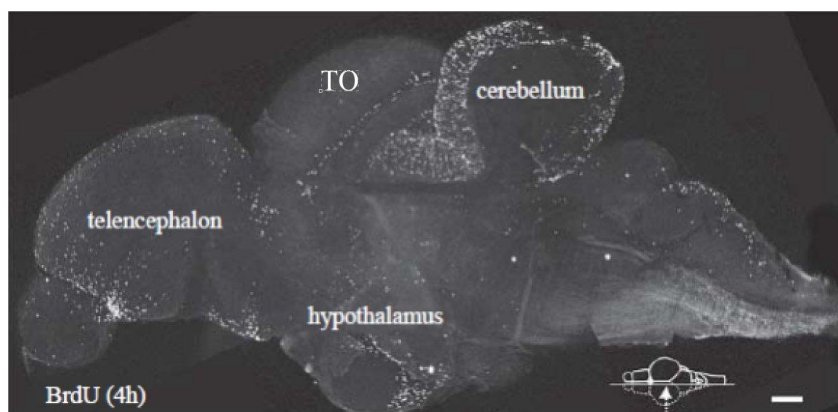
BrdU	-Bróm-dezoxi-uridin
<i>ccnD</i>	- <i>cyclinD</i>
<i>ccnE</i>	- <i>cyclinE</i>
CDK	- ciklin függő kináz
cM	- centimorgan
dpf	- days post fertilization (nappal a megtermékenyítés után)
EKW	- Ekwill
ENU	- N-etil-N-nitrozourea
Fzd	- frizzled
GSK3	- glikogén szintáz kináz 3
LG	- kapcsoltsági csoport (linkage group)
Mb	- Megabázis
Mut	-mutáns
OT	-optic tectum
OX	- out-cross (kikeresztezés)
PBS	- phosphate buffered saline (puffer oldat)
PBST	- PBS + 20% Tween
PCR	- polimeráz láncreakció
PFA	- paraformaldehid
Rb	- retinoblasztóma
Sib	-sibling (vad fenotípusú egyed)
TBE	- Tris/Borate/EDTA
TL	- Tuebingen Long fin
TO	- tectum opticum

Bevezetés

A csontos halak legfőbb látóközpontja, a TO (Tectum Opticum), az agy dorzális részén található az előagy (telencephalon) és a kisagy (cerebellum) között. Prominens elhelyezkedése és kiemelt szerepe miatt már hosszú ideje előszeretettel használják az idegrendszer fejlődésével és működésével kapcsolatos vizsgálatokban, és az elmúlt években fokozatosan az idegi őssejtek tanulmányozásának kedvelt alanyává is vált.

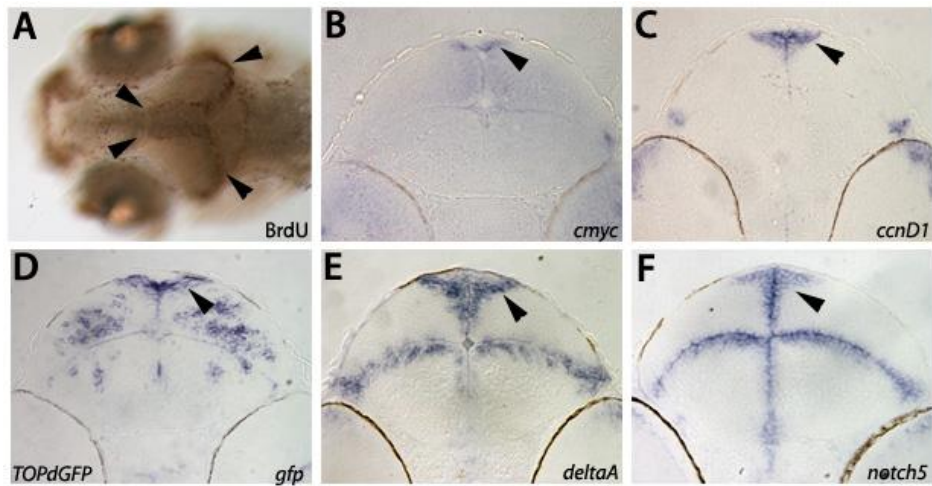
A zebradánióval (*Danio rerio*) végzett kísérletek alátámasztják a korábbi megfigyelést, hogy a kifejlett halak agyában folyamatos, aktív neurogenesis zajlik, ellentétben az emlősök idegrendszerével, ahol új neuronok egy bizonyos kor után már csak kis számú agyi területen képződhetnek. (Ez a folyamatos neurogenesis feltételezhetően ok-okozati kapcsolatban van a halaknál leírt kiemelkedően magas regenerációs kapacitással is.)

A hal idegrendszerének szisztematikus vizsgálata az utóbbi évek során 16 különböző proliferatív zónát különített el az agyban (1. ábra). Ezek a proliferatív centrumok olyan idegi őssejteket tartalmaznak, amelyek lassan osztódva és differenciálódva alakítják ki a neuronokat (Kaslin, Ganz et al. 2008). Ebből adódóan a zebradánió megfelelő modellként szolgál a neurális őssejtek kutatásához, amely napjaink legfontosabb kutatási területei közé sorolható.



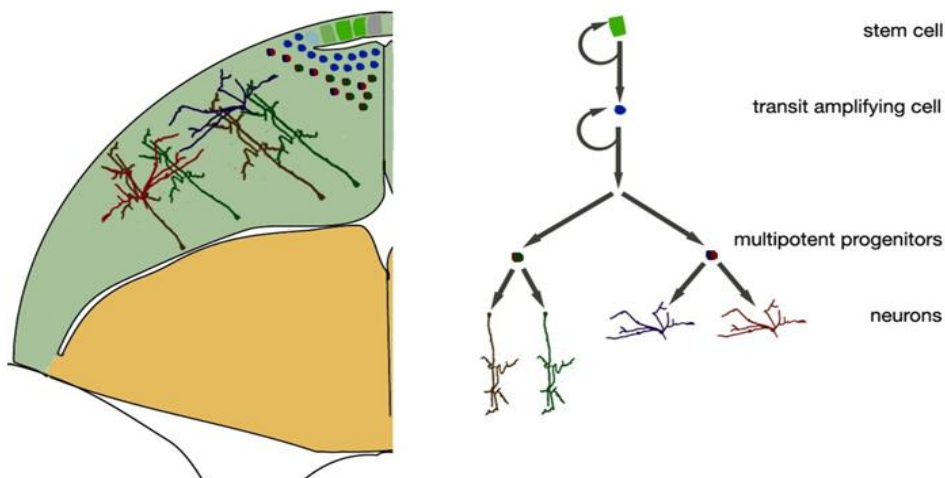
1. ábra: Proliferatív régiók a felnőtt zebradánió agyában. A képen a felnőtt zebrafish agyának parasagittális metszete látható. A proliferatív régiók fehér kis pontonként látszanak. Az osztódó sejtek azonosítására BrdU (Bróm-dezoxi-uridin) jelölést használtak. (Kaslin, Ganz et al., 2008 nyomán)

Az általunk vizsgált TO új sejtjei az a középagyban (mesencephalon) helyet foglaló, diszkrét proliferatív zónából származnak (Grandel, Kaslin et al. 2006). A lárvális TO osztódó sejtjei a TO mediposzterior szélein helyezkednek el és az osztódó sejtek környékén számos fontos jelátviteli útvonal komponenst kódoló gén fejeződik ki (2. ábra, (Cervený, Varga et al. 2012)).



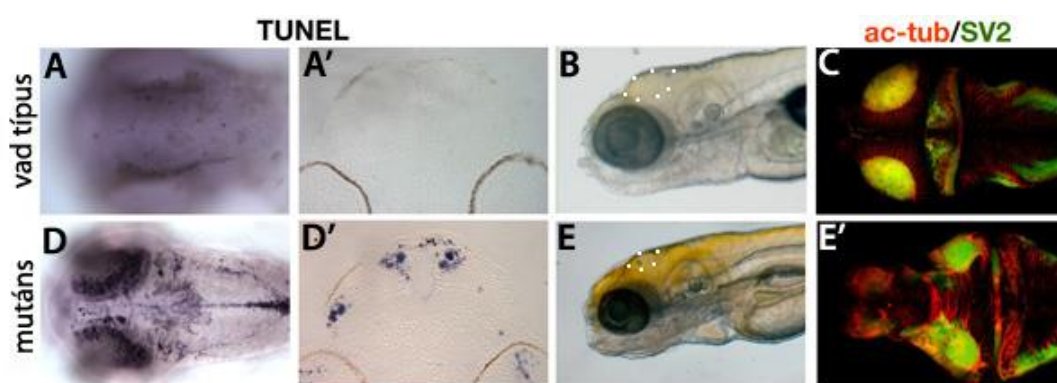
2. ábra: Proliferáció és Wnt-/Notch-jelátvitel kétnapos zebradániók TO-ában. Az osztódó sejtek BrdU jelölése világosan kirajzolja a TO féltekék medio-poszterior szélein elhelyezkedő proliferatív niche-t (A). A niche-ben levő sejtek olyan tipikus proliferatív markereket expresszáznak, mint a *cmc* (B) és a *ccnD1* (C). A niche közelében aktív Wnt jelátvitel figyelhető meg, mint azt egy riportervonal (D) tanúsítja, és a Notch jelátviteli út komponensei, pl. *deltaA* (E) és *notch5* (F) is kifejeződnek. (A: dorzális nézet, B-F: transzverz metszeti kép; a niche nyílhegyek jelölik.)

A laboratóriumunk olyan mutáns zebradánió vonalak vizsgálatával foglalkozik, ahol valamilyen okból kifolyólag a kétnapos (2 days post fertilization – 2 dpf) hallárvak TO-ának proliferatív régiójában nagymértékű sejthalál (apoptózis) figyelhető meg. A sejtpusztulás az őssejtekből származó, úgynevezett „transit amplifying” sejteket érinti, melyek gyors egymást követő osztódások sorozataként alakítják ki a multipotens progenitor sejteket. Ezek aztán tovább differenciálódva hozzák létre az idegrendszer neuronjait (3. ábra). Az ilyen homozigóta mutáns egyedek életképtelenek, legkésőbb 6-7 napos korukban elpusztulnak. A mutáció könnyen észrevehető, homályos szürke foltként jelentkezik a TO területén, mivel két napos korban a proliferatív régió dorzálisan, közvetlenül az epidermisz alatt található.



3. ábra: A TO neuronjainak kialakulása. Kétnapos zebradánió TO-ának transzverzális metszete. Az őssejtek zöld, a belőlük létrejövő „transit amplifying” sejtek kék és a multipotens progenitor sejtek piros színnel vannak jelölve.

Már a korai vizsgálatok során fény derült arra, hogy több, különböző kromoszómán elhelyezkedő mutáció okozhat nagyon hasonló fenotípust. A laboratóriumunkban fenntartott vonalak közül az A25-ös a mutációt az 5. kapcsoltsági csoportban, kromoszómán (LG5) hordozzák, míg az A6-os vonal esetében a mutáció a 18. kromoszómán (LG18) található. (Fontos megemlíteni, hogy komplementációs analízis alapján két további alléllal rendelkezünk az A25 fenotípusát okozó mutáció esetében, ezek az A4 és a G38). Munkám során az A25-ös (4. ábra) és A6-os mutánsok térképezésével, az A25-ös, A6-os és A4-es vonalak génexpressziós mintázatainak jellemzésével, valamint viselkedésének vizsgálatával foglalkoztam.

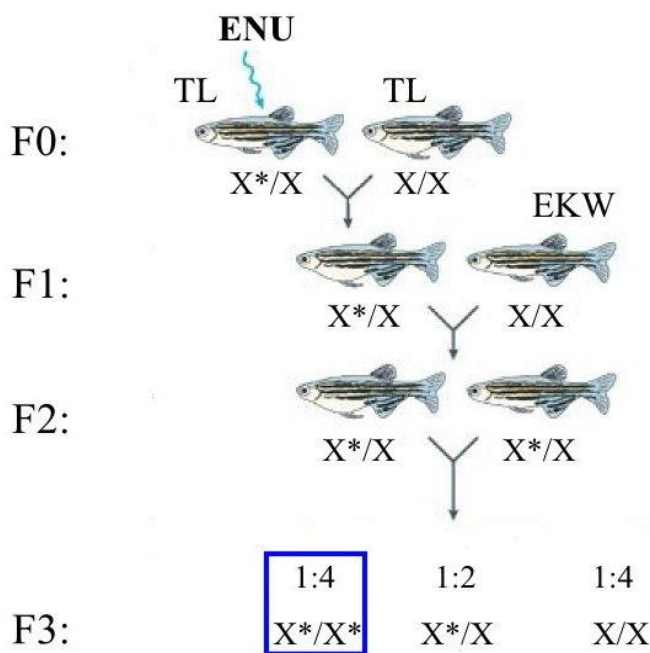


4. ábra: Az A25-ös mutáns vonal. Az (A, A') és (D, D') panelket összevetve jól látható, hogy a két napos mutáns lárvák esetében a TO-ban erőteljes apoptózis jelentkezik. A masszív sejthalál eredményeként öt napos mutánsokban (E) a TO mérete kisebb, mint nem-mutáns társaikban (B) (körbeponthozott terület) és a szerveződése is aberráns (C, F). (Az acetilált-tubulin (ac-tub) ellenanyag az axonokat jelöli, míg az SV2 a szinapszisokat. A,D,C,F: dorzális nézet, B,E: laterális nézet, A',D': transzverz metszeti kép.)

A TO mutáns halak létrehozása

A mutagenézishoz N-etil-N-nitrozoureat (ENU-t) használtak fel, amely napjainkban a forward genetika egyik leggyakrabban alkalmazott módszere. Az ENU előidézi az etil csoportjának transzlokációját egy, a nukleinsavban található nukleobázisra (általában timidinre) és ezzel pontmutációt indukál. Legfőbb célpontja a spermatogoniális őssejtek, amelyekből a spermasejtek származtathatóak. A kezelés során a Tuebingen Long fin (TL) hím állatok csíravonalában a mutáció következett be, aminek a hatására ezekben az állatokban mutáns spermasejtek keletkeztek. Az így létrejött egyedeket TL homozigóta vad típusú nőstényekkel keresztezték össze, aminek eredményeként a mutációt hordozó, heterozigóta egyedek jöttek létre. Ezeket a hordozókat Ekwil (EKW) homozigóta vad típusú halakkal keresztezték. Az így létrejövő heterozigóta, hordozó halakat pedig egymás között

szaporították tovább (4. ábra). Azért fontos, hogy nagyon különböző genetikai háttérű haltörzseket keresztezzünk össze, mert így a mutáns egyedek polimorfizmust fognak mutatni a mutáció közelében lévő markerekre és ezáltal meghatározható lesz a mutáció előfordulásának intervalluma. Ezt követően azonosították a mutációt hordozó halak keresztezéséből származó mutánsokat. Mivel az elváltozás szabad szemmel is észrevehető egy homályos, szürke foltként a 2 dpf korú lárvák TO-nak területén, ezért a mutáns embriók viszonylag könnyen azonosíthatóak.



5. ábra: Az ENU mutagenézis. Az N-etil-N-nitrozourea a csírávonalban mutációt indukál, amely mutáns spermasejtek képződéséhez vezet. A kezelt TL hím egyedeket TL, homozigóta vad fentotípusú nőstényekkel vannak összekeresztezve. Az így létrejövő F1 nemzedék, hordozó TL halait EKW, homozigóta vad fentotípusú halakkal keresztezték, majd az F2 generáció, hordozó egyedeit egymás között szaporították tovább. A 3. nemzedék $\frac{1}{4}$ -e mutáns, $\frac{1}{4}$ -e homozigóta vad, $\frac{1}{2}$ -e pedig heterozigóta vad fentotípusú lesz. ENU- N-etil-N-nitrozourea, TL- Tuebingen Long fin, EKW- Ekwil, F- nemzedék, X- vizsgált gén vad típusú allélja, X^* - vizsgált gén mutáns allélja. ((David & Leonard et al., 2005) nyomán.)

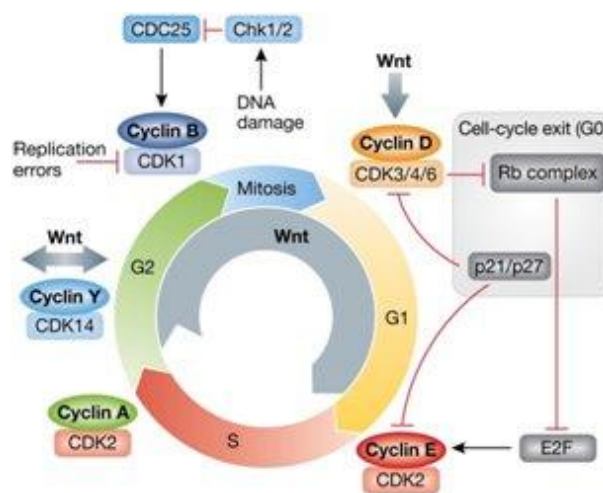
A sejtciklus szabályozása a Wnt/ β -catenin és a Notch szignalizációs útvonalakon keresztül

Az utóbbi évek kutatási eredményei alapján jobban megismerhettük a Wnt/ β -catenin illetve a Notch szignalizációs útvonalak szerepét a sejtosztódás és sejtnövekedés folyamatában. A neurogenesis során az őssejtek utódjai osztódnak, majd kilépnek a sejtciklusból és neuronná vagy glia-sejtté differenciálódnak. A felnőtt állatokban is folyamatosan zajló neurogenesis szabályozásában számos jelátviteli útvonal szerepe

tisztázódott az utóbbi években. Ezek közül az egyik legfontosabb a kanonikus Wnt/ β -catenin jelátviteli útvonala, ami többek között a sejtciklusban kulcsszerepet betöltő *cyclinD-1* (*ccnD1*) gén és *cmyc* proliferációs marker expressziós aktivitásán keresztül szabályozza a sejtciklust (Ohnuma, Harris et al. 2003). Hasonlóan említést érdemel a Notch-Delta jelátvitel is, amely sejtek közötti kommunikációban, a sejtsorok meghatározásában játszik szerepet (Lai 2004). Munkám számára fontos, hogy mindkét útvonala komponensei kifejeződnek azon területein a TO-nak, ahol az idegi őssejtek, illetve osztódó és differenciálódó utódsejtjeik találhatóak (2. ábra), felvetve annak lehetőségét, hogy ezen két szignalizációs kaskád kulcsszerepet játszik a TO növekedésének szabályozásában is.

A sejtciklus során a sejt nem egyformán fogékony azokra a jelekre, amelyek a sorsát meghatározzák, így a progenitor sejtek neuronná való differenciálódása során kulcsszerepet játszó események a sejtciklus bizonyos fázisaiban mennek végbe. Például, ha fiatal egér kortikális progenitor sejtjét transzplantálták idősebb állatba, a sejtek az idősebb környezetben csak akkor tudták megváltoztatni a sejtsorukat és más sejté differenciálódni, amikor a növekedési G1 vagy a DNS szintéziséért felelős S fázisban kerültek átültetésre. Mitotikus M fázisban a külső determinációs faktorokra már nem voltak fogékonyak a sejtek. Hasonló megfigyelés tehető a belső determinációs faktoroknál is, amelyekre szintén csak a sejtciklus egy bizonyos fázisában mutat érzékenységet a sejt (Ohnuma, Harris et al. 2003).

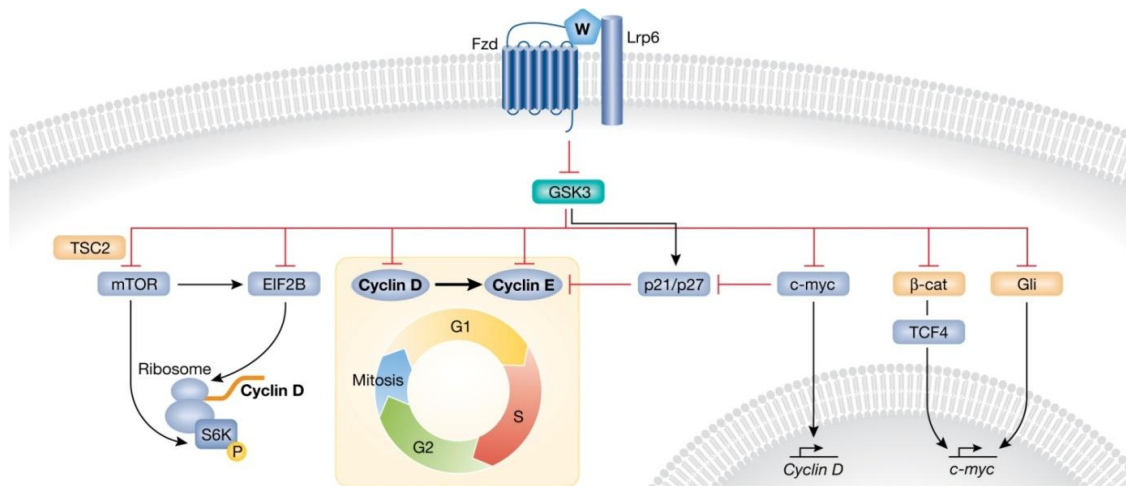
Ma már tudjuk, hogy a kanonikus Wnt/ β -catenin jelátvitel és a sejtciklus között egy komplex szabályozási kapcsolat áll fent (6. ábra). Akárcsak a legtöbb jelátviteli útvonala, amelynek szerepe van a sejtosztódásban, a Wnt/ β -catenin jelátvitel is a G1 fázisban fejti ki hatását. Ez az útvonala több szinten keresztül szabályozza a G1 fázist, nem csak a korábban említett *CcnD1*-en keresztül, továbbá fontos szerepet játszik a mitózisban is. A sejt a G1 és G2 fázisban növekszik és gyarapodik, illetve felkészül az S és M fázisra. Az S fázisban replikálódik a DNS, majd az M fázisban a kromoszómák szegregációja figyelhető meg a mitózis során. A különböző fázisok között ellenőrzési pontok (check-point) vannak, melyeket ciklinek és ciklin függő kinázok (CDK) modulálnak. A G1 és S fázisnak két fontos ellenőrzési pontja van, amelyek a CyclinD (*CcnD*), a CyclinE (*CcnE*), illetve ezek specifikus CDK-ja által szabályozottak. A G1 fázisban *CcnD* hatására az retinoblasztóma (Rb) komplex foszforilálódik és gátlódik, amelynek a következményeként az E2F kikerül a gátlás alól és a *ccnE* transzkripcióját indukálja. Éhezés hatására a sejt kiléphet egy úgynevezett nyugvó G0 fázisba. Ebben az esetben a *CcnD* és *CcnE* a p21/27 által gátolt. Ha kellő mennyiségben jelen van a *CcnE* végbemegy a DNS szintézis és a további ellenőrzési pontokon szabályozódik a folyamat, míg be nem fejeződik a mitózis (Niehrs, Acebron et al. 2012).



6. ábra: A sejtciklus és a kanonikus Wnt/ β -catenin szignalizációs útvonal kapcsolata. A képen a sejtciklus szabályozásának sematikus rajza látható. A Wnt-jelátvitel a CcnD indukcióján keresztül katalizálja a G1/S átmentet. (Niehrs, Acebron et al., 2012 nyomán)

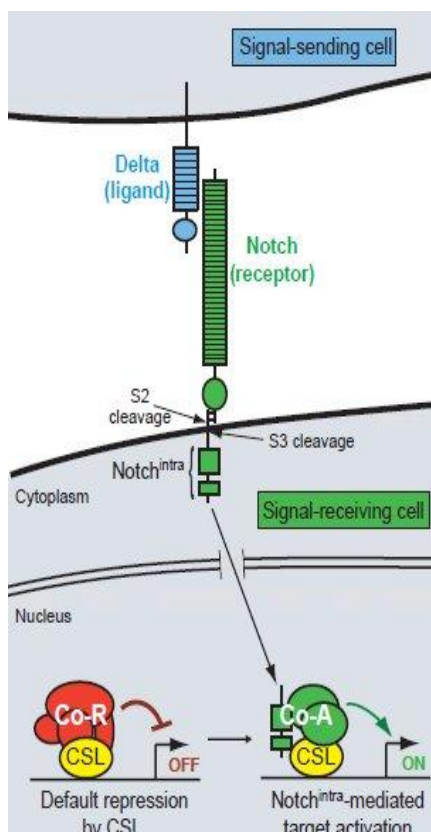
A Wnt, mint extracelluláris szignálmolekula a Frizzled (Fzd) transzmembrán receptorhoz, és annak LRP6 koreceptorához kötődik (7. ábra). Ennek hatására a GSK3 (glikogén szintáz kináz 3) gátlódik, amely nem tudja foszforilálni a β -catenint. Mivel a foszforiláció a β -catenin proteozomális lebontásának előfeltétele, hiányában a citoplazmatikus β -catenin koncentráció megnő és a sejtmagba jutva a molekula transzkripcionális koefektorként számos célgén átíródását szabályozza majd. A célgének közé tartozó *cmyc* olyan transzkripció faktor kódol, amely egyrészt erősíti a G1 fázisban szerepet játszó *ccnD* expresszióját, másrészt gátolja a p21/27-et. Abban az esetben, ha a β -catenin hiperaktivált az említett gének a sejtek abberáns proliferációját idézik elő és gyakran rákos megbetegedéseket okoznak (Niehrs, Acebron et al. 2012).

A Lef/Tcf osztályba tartozó transzkripció faktorok, így a Lef1 is, a kanonikus Wnt/ β -catenin útvonal terminális effektorai, amelyek β -cateninhez kötődve aktívátor transzkripció komplexet képeznek. (β -catenin hiányában a Tcf fehérjék Groucho represszorokhoz kapcsolódva, gátolják a génexpressziót.) A Lef1 szükséges ahhoz, hogy a progenitor sejtek fenn tudják tartani az osztódási képességüket és ezen keresztül szerepet játszik a szövetek homeosztázisában, megújulásában (Valdivia, Young et al. 2011).



7. ábra: A Wnt/ β -catenin által megvalósuló többszintű szabályozás. A Wnt nem csak a *cmyc*-en és *CcnD*-n keresztül gyakorol hatást a sejtciklusra és a sejtnövekedésre. A képen látható, hogy a GSK3 gátlásán keresztül, egyrészt aktiválódik az mTOR is, amely szintén a sejtosztódás fenntartásában játszik szerepet, másrészt a p21/27 kiesik az aktiválás alól. (Niehrs és Aceborn, 2012 nyomán)

A Notch jelátviteli útvonal fontos szerepet játszik a sejt-sejt közötti kommunikációban és a sejtsorsok meghatározásában. A Notch olyan transzmembrán receptor, amely ugyancsak transzmembrán szignálmolekulák (Delta, Jagged) kötése esetén szabályozza a génexpressziós aktivitást (8. ábra).



8. ábra: A Notch- Delta szignalizációs útvonal. A ligand receptor kapcsolat létrejöttékor a Notch extra- és intracellulárisan is hasítódik, aminek következtében a Notch intracelluláris doménje (Notch^{ICD}) képes lesz bejutni a sejtmagba. Itt a CSL transzkripciós faktorokhoz kapcsolódva olyan gének átíródását indukálja, amelyek a sejt differenciálódásra készítik. Notch hiányában az átírás elmarad, mert a Co-R- korepresszor és CSL között olyan kapcsolat alakul ki, ami represszálja a géneket. (Lai, 2004 nyomán)

A Notch-útvonal által aktivált CBF1/Su(H)/LAG1 transzkripciós faktorok a CSL családba tartoznak. A Notch jelátvitel hatására, idegi szövetekben, olyan gének íródnak át, amelyek represszálják a proneurális géneket és ezáltal csökkentik a progenitor sejtek számát illetve indukálják a sejtek differenciációját (Lai 2004).

Kutatásaim során arra kerestem választ, hogy van-e valamiféle különbség az említett faktorok expressziós mintázatában a homozigóta TO mutáns zebradánió lárvák és vad fenotípusú társaik között. Arra is kíváncsi voltam, hogy a látóközpontban tapasztalt nagyfokú apoptózis a hatással van-e az állatok látására és ezáltal viselkedésére.

Anyagok és Módszerek

A hal vonalak tartása és a minták fixálása

A zebrahalak tartása és ívatása standard laboratóriumi körülmények között zajlik 28,5 °C-on. Az embriók fenotípusos osztályozása a Standard Fejlődési táblázat (Standard Developmental Chart) alapján történik (Kimmel et al., 1995). Az embriókat egy napos (dpf) korukban a pigmentáció hátráltatása céljából feniltioureával (PTU) kezeljük, 2 dpf korukban eltávolítjuk a chorion burkot és fixáljuk. A fixáláshoz foszfát-pufferelt sóoldatban (Phosphate Buffered Saline, PBS) oldott 4%-os paraformaldehidben (PFA) tároljuk minimum 2 órán keresztül. 4X5 perces PBS-20% Tween (PBST) oldatban történő mosást követően PBST és felszálló metilalkoholsor keverékében 5-5 percig mossuk. Majd 100%-os metanolban -20 °C-on tároljuk.

Genomi DNS izolálása

Az embriókat külön-külön PCR csövekbe tesszük és a metanolt teljesen leszívjuk, majd 30 percig 37 °C-on szárítjuk. Hozzáadunk 50 µl, 1x-es lízis puffert (50x-es lízis puffer összetétele: 14,03 g KOH kristály, 4 ml 0,5 M EDTA, kiegészítve 200 ml-re H₂O-val) mindegyik csőhöz, majd 30 percig 90 °C-on tartjuk. Megvárjuk, míg visszahűl szobahőmérsékletűre és hozzáadunk 50 µl, 1x-es neutralizáló oldatot (50x-es neutralizáló oldat összetétele: 63,04 g TRIS HCl, kiegészítve 200 ml-re H₂O-val).

Géntérképezés

A mutációkat hordozó halak megkeresése keresztezésekkel történik. A hordozó halak homozigóta mutáns embrióinak PCR-es vizsgálatához különböző genomi markereket

használunk (ezek felsorolását lásd később). Meghatározzuk azokat a halpárokat, amelyek polimorfak a markerekre és a rekombinációs eseményeket 100%-ban mutatják. A DNS termékek futtatása 3%-os TBE-t tartalmazó agaróz gélen történik. (1l 5x-ös TBE puffer összetétele: 54 g Tris base; 27.5 g boric acid; 20 ml, 0.5 M, pH 8.0 EDTA.)

PCR

A reakció elegy: 19,55 µl MQ H₂O, 2,5 µl 10x-es PCR Puffer, 0,75 µl MgCl₂, 0,5 µl primer, 0,5 µl 10 mM dNTP, 1,0 µl genomi DNS és 0,2 µl Taq polimeráz (Invitrogen).

In situ hibridizáció

Az eljárás során a vizsgálni kívánt génünk expressziós mintázata válik láthatóvá. A folyamat során a DNS-ről átíródó mRNS-hez olyan antiszensz RNS-t hibridizáltatunk, amelynek az uraciljeihez egy digoxigenin csoport van kötve. Ezt követően alkalikus foszfátot tartalmazó anti-digoxigenin ellenanyagot adunk hozzá, majd különböző kromogénekkel színreakciót váltunk ki. Ilyen kromogén a BM Purple vagy a NBT- BCIP, amelyet az embriók korától függően alkalmazunk. A festődést követően az embriókat PBST-ben mossuk, majd posztfixáljuk 4%-os PFA-ban, végül 85%-os glicerinben 4 °C-on tároljuk. A három napos folyamat első két napján Shingo Maegawa protokollja alapján, a harmadik naptól pedig a Thisse laboratórium protokollja alapján járunk el (Thisse és Thisse, 2008).

Viselkedésvizsgálat

A hallárvákat 6 dpf-os korukban külön-külön egy 4x6 lyukú tálcára helyezzük, amely embrió-médiumot tartalmaz. Ezt követően a tálcákat egy izolált dobozba helyezzük és egy rögzített kamera segítségével regisztráljuk a mozgásukat. A mozgás-mintázat kiértékelése számítógépen történik. A megfigyelés során az hallárvák 60 másodpercig (mp) világosságban vannak, majd 30 mp-ig sötétben, ezt követően pedig ismét világosban.

Eredmények

Az A25-ös mutáns vonal géntérképezése

Előkísérleteink során már megállapítottuk, hogy a mutáció az 5-ös kapcsoltsági csoportban (linkage group – LG) található, ami az 5. kromoszómának felel meg. A VEGA genomi adatbázis alapján (7. ábra) 50.52 Mb (Megabázis) és 54.74 Mb közé tehető a mutáció előfordulása, ugyanis az ezen pozíciókban található markerek (z3516, illetve z3804) mutatnak közös öröklődést a jelleggel, de az esetleges rekombinációs események mindig csak az egyik marker esetében észlelhetők.

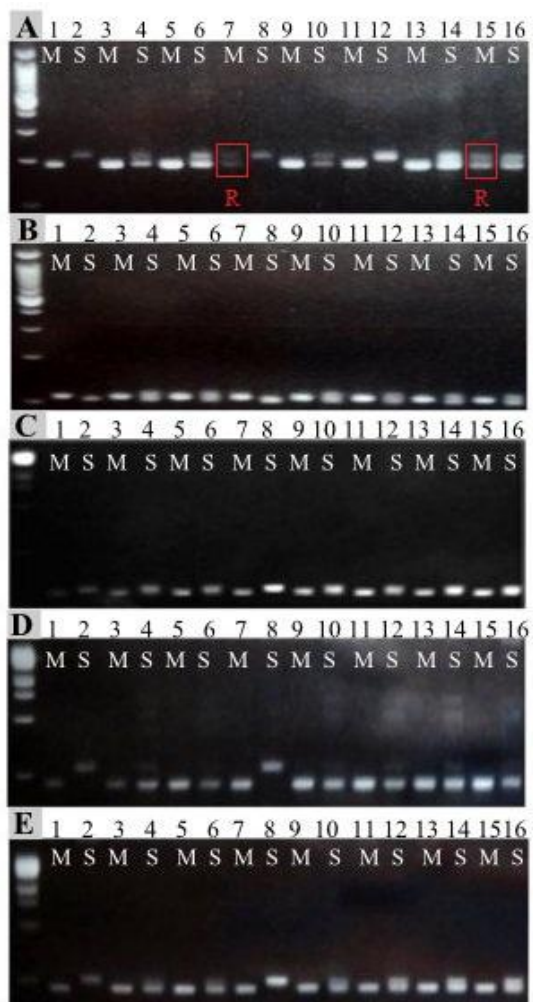
A térképezés során olyan primer párokat kerestem, amelyek a korábbi két vizsgált marker a z3516 és a z3804 között fordulnak elő és polimorfizmust mutatnak. A kísérletek során a z5538, z15211 és a z36189 bizonyult megfelelőnek (9. ábra). Ezen markerekre specifikus primerekkel elvégzett PCR reakciók eredménye a 10. ábrán látható. A képen látható, hogy a mutáns (M) fenotípusú egyedek PCR terméke mindig egyetlen „alsó” sávként jelenik meg a gélképen, (10. ábra – A/1). Velük ellentétben a vad fenotípusú testvéreik (siblings – S) PCR terméke vagy két vonalként jelenik meg (egy „alsó” és egy „felső”), a heterozigóták esetében (10. ábra – A/6), vagy egyetlen „felső” vonalként, homozigóta vad típusóaknál (10. ábra – A/8). Azokat a hordozó halakat, amelyek utódjait megvizsgálva, ilyen a mutáns és a nem-mutáns embrió-gélképeket kapunk, adott markerre nézve „kikeresztezett” (out-cross – OX) halaknak nevezzük. Azért fontos ezeknek a halpároknak az azonosítása, mert csak ebben az esetben azonosítható egyértelműen az összes rekombináns esemény és ennél fogva térképezéshez csak ezek használhatóak.



VEGA

9. ábra: Az 5. kromoszóma (LG5) vizsgált szakaszának vázlatos rajza, a vizsgált markerekkel, illetve azok helyzetével. A Vega adatbázisban a markerek kromoszómán elfoglalt fizikai helyzete található, az MGH adatbázis pedig a genetikai távolságokat mutatja meg. A z36189 esetében 142 vizsgált meiotikus eseményből háromban találtam rekombinációt, míg a z3804-nél 306 meiózis során 16 rekombináció következett be (zölddel jelölve). A mutáció feltételezett helye a kromoszómán pirossal van jelölve.

Polimorf markerek azonosítása után genetikai térképezésbe kezdtem, olyan mutáns egyedeket keresve, ahol a mutáció és a vizsgált markerek közt rekombináció figyelhető meg (vagyis „alsó” és „felső” sáv egyaránt megfigyelhető a mutáns embrió PCR termékében).



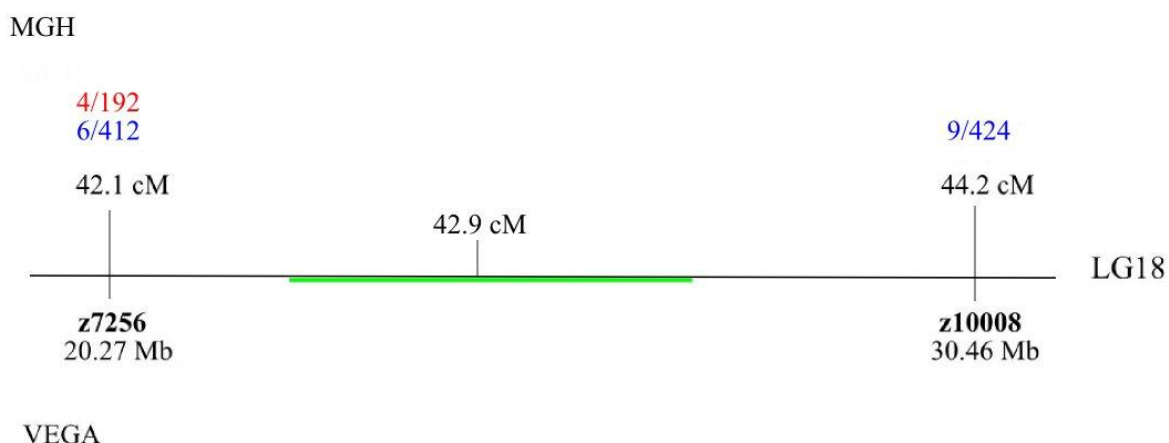
10. ábra: Különböző térképezési markerek felhasználásával készült PCR reakciók eredménye
A) z3804, a képen jól látható, hogy a 7-es és 15-ös mutáns rekombináns volt erre a markerre nézve. (R-Rekombináns pirossal bekeretezve) B) z3516, ebben az esetben is jól látható a polimorfizmus csak úgy mint a C) z36189 D) z5538 és az E) z15211 esetében. (M-Mutáns, S- Nem-mutáns (Sibling))

Összeségében 71 embriót, azaz 142 meiózist vizsgálva, a z36189 esetében három rekombinánszt találtam, míg a z3804-nél 306 meiózisra 16 rekombináns esemény jutott (9. ábra). Mivel az így számolt genetikai távolság (5.23 cM) nagyobb, mint a két marker közti össztávolság (3.5 cM) további embriók vizsgálata szükséges a mutáció pontos helyzetének megállapításához. Annyi azonban kijelenthető, hogy a mutációnk lényegesen közelebb található a z36189-hez. E két marker közötti távolság 3.03 Mb, ami a teljes genom (1412.47 Mb) méretéhez viszonyítva, annak

nagyjából a 0.212%-át teszi ki. A leszűkített régió tartománya körülbelül 60 darab gént foglal magába. Megvizsgálva a régióban található géneket a <http://www.ensembl.org/> illetve a <http://zfin.org/> adatbázisok segítségével azt találtam, hogy néhány közülük expressziót mutat a szemben illetve a tectumban (például a *zgc:19480*, *rad51d*, *slc01f*). Ezért elképzelhető, hogy a mutáció ezen gének valamelyikét érintette. Sajnos a legtöbb génről adatok nem állnak rendelkezésre, ezért a terület további szűkítése mindenképpen célszerű.

Az A6-os mutáns vonal térképezése

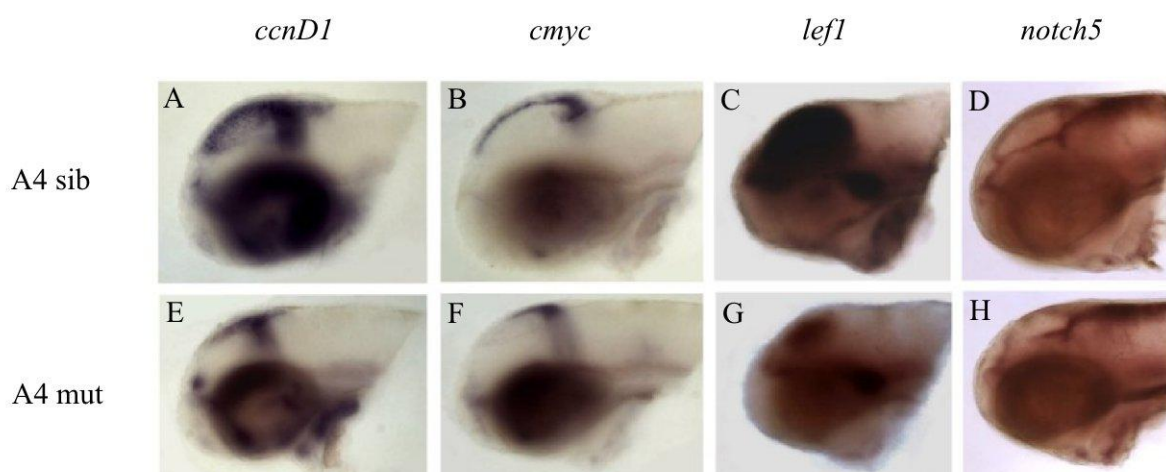
Az A6-os vonal a mutációt a 18-as kapcsoltsági csoportban hordozza. A korábbi kísérletek eredményei alapján a mutáció valószínűsíthető helye a z7256-as és z10008-as markerek között található. Kutatásaim során elsősorban itt is olyan markereket kerestem, amelyek ezen két marker között illetve a környezetükben fordulnak elő és polimorfizmust mutatnak. Sajnos a megvizsgált számos marker (fe26b05, fc26b06, fc12d04.x1, fj34d08.x1, fi47b03.x1, fc19g05.x1, fd59e05, z24232, fl13d12, fj87f12, fb54g02) közül egy sem bizonyult megfelelőnek, illetve az általam vizsgált halpár a z10008-as markerre is monomorfnak bizonyult. A térképezés során 96 mutáns egyedet vizsgáltam meg és a 192 meiotikus eseményből a z7256-os marker esetében 4 esetben történt rekombináció (z7256: 4/192). Ezt a korábbi eredményekkel összegezve (z7256: 6/412; z10008: 9/424), arra a megállapításra jutottam, hogy a mutáció előfordulása nagyjából a két marker által közrefogott terület középpontjába esik (11. ábra). A z7256-os marker 42.1 cM-nél található. A rekombinánsok és a meiotikus események arányából számolt térképtávolság 1,65 cM-nek adódott, így a mutáció valószínűsíthető helye ez alapján 43.75 cM. A z10008-as marker esetében a számolt térképtávolság 2.12 cM, tehát a mutáció becsült helye 42.08 cM. Tehát ezen eredményeket átlagolva a mutáció előfordulásának valószínűsíthető intervalluma 42.9 cM környékére tehető. A két vizsgált marker közötti intervallum a <http://www.ensembl.org/> adatok alapján 11,26 Mb, ami a teljes genomnak a 0,797%-át teszi ki. Mivel ez a régió igen nagy és körülbelül 110 gént tartalmaz, ezért a mutáció pontosabb helyének meghatározása csak további markerek felhasználásával lehetséges.



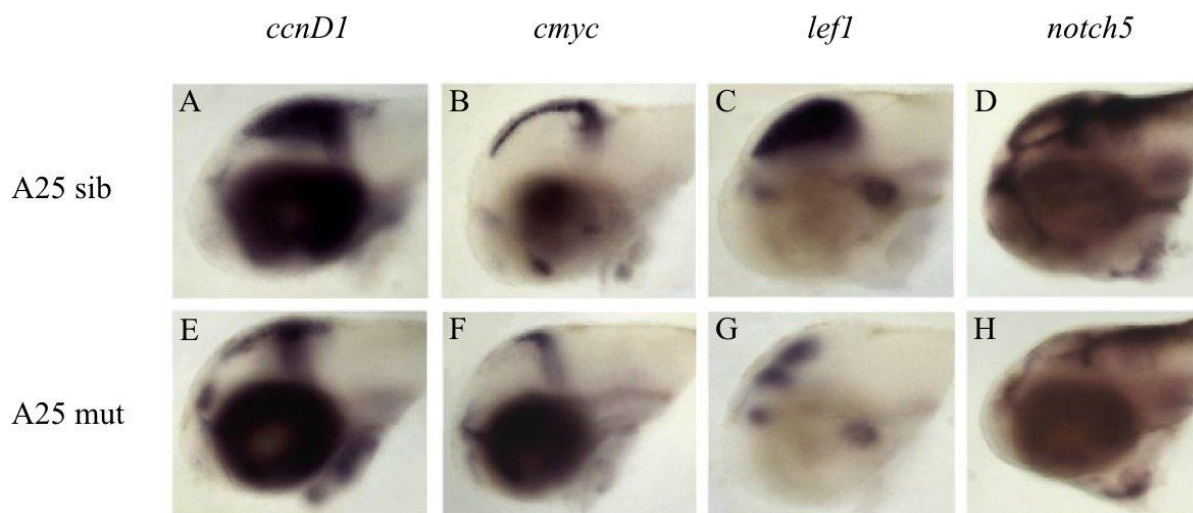
11. ábra: Az 18. kromoszóma (LG18) vizsgált szakaszának vázlatos rajza, a vizsgált markerekkel, illetve azok helyzetével. MGH- a markerek genetikai távolságát mutatja meg a kromoszómán. VEGA- a markerek fizikai helyzetét mutatja meg a kromoszómán. Piros színnel az általam gyűjtött eredmény, kék színnel a korábbi eredmények vannak jelölve. A zölddel jelölt sáv a mutáció előfordulásának intervallumát jelzi.

A sejtciklusban és sejtproliferációban szerepet játszó gének expressziós mintázatának vizsgálata A25-ös és A4-es mutáns és vad fenotípusú egyedekben

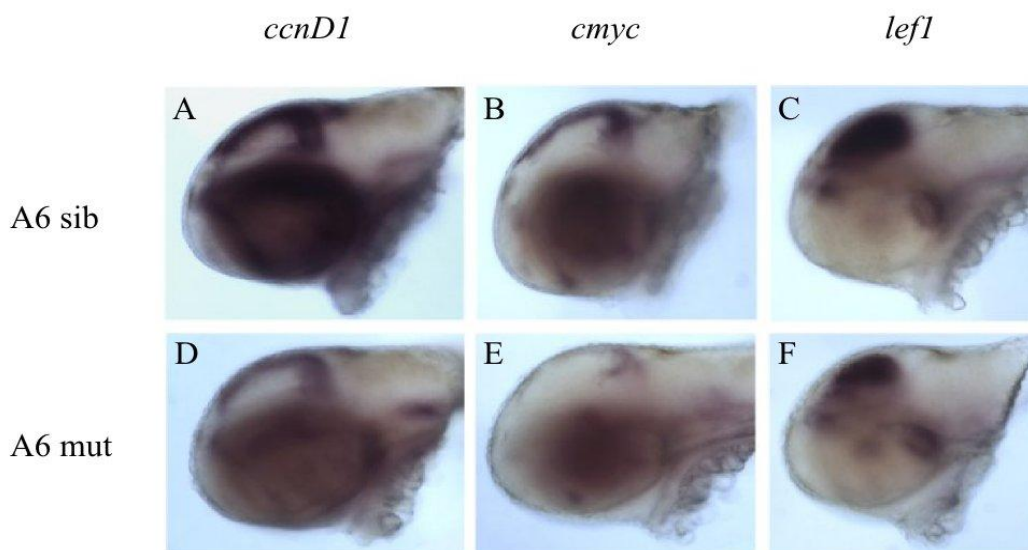
Az *in situ* hibridizáció során a *cmyc*, a *ccnD1*, a *lef1* és a *notch5* expresszióját vizsgáltuk két napos mutáns és nem-mutáns embriókban. A *cmyc* és a *ccnD1* gének a sejtciklus normális működésének a fenntartásában, a sejtproliferációban és a növekedésben fontos szerepet játszanak, ennek megfelelően a TO proliferatív régiójában erőteljes expressziót mutatnak. Megfigyelhető ugyanakkor, hogy vad fenotípusú egyedekben ezen gének nagyobb mértékben fejeződtek ki, mint a mutánsokban. A 12. ábra A-E, 13. ábra A-E illetve a 14. ábra A-D képét összehasonlítva látható, hogy mind az A4-es, az A25-ös és az A6-os vonalak esetében lecsökkent a *ccnD1* expressziója a mutáns egyedekben, esetenként az expressziós domének egyes részei hiányoznak. Hasonlóan szembetűnő a különbség a mutáns és nem-mutáns embriók közt a *cmyc* esetében is (12. ábra B-F, 13. ábra B-F, 14. ábra B-E).



12.ábra: A *cmyc*, a *ccnD1*, a *lef1* és a *notch5* expressziós mintázata 2dpf A4-es mutáns és vad fenotípusú egyedekben. Az A-D képeken a nem-mutáns (sib) egyedek láthatóak, míg az E-H képeken a mutáns egyedek vannak. Mindegyik mutáns esetében jól megfigyelhető az adott gén expressziós szintjének csökkenése a nem mutáns egyedekéhez képest.



13. ábra: A *cmyc*, a *ccnD1*, a *lef1* és a *notch5* expressziós mintázata 2dpf A25-ös mutáns és vad fenotípusú egyedekben. Az A-D képeken a nem-mutáns (sib) egyedek láthatóak, míg az E-H képeken a mutáns egyedek vannak. Mindegyik mutáns esetében jól megfigyelhető az adott gén expressziós szintjének csökkenése a nem mutáns egyedekéhez képest.



14. ábra: A *cmyc*, a *ccnD1* és a *lef1* expressziós mintázata 2dpf A6-os mutáns és vad fenotípusú egyedekben. Az A-C képeken a nem-mutáns (sib) egyedek láthatóak, míg az D-F képeken a mutáns egyedek vannak. Mindegyik mutáns esetében jól megfigyelhető az adott gén expressziós szintjének szignifikáns csökkenése.

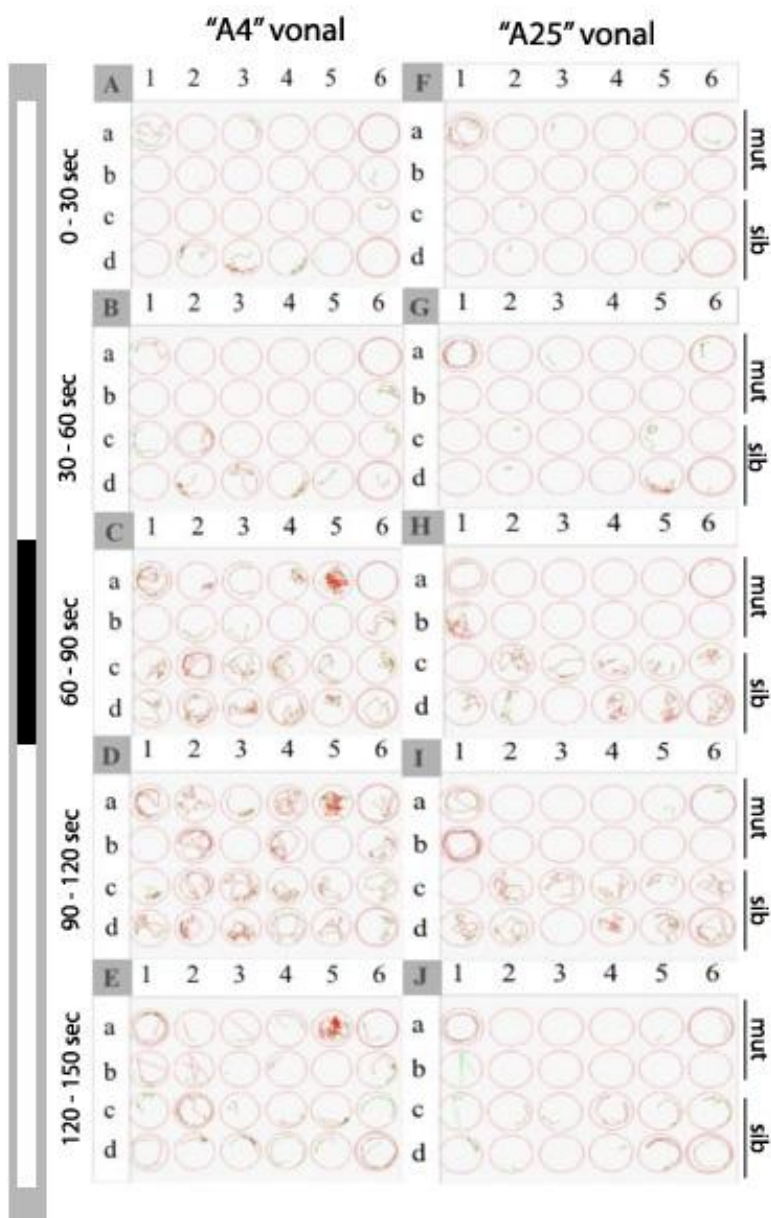
Az *in situ* hibridizációs kísérletek során a *lef1* és *notch5* génnek is megvizsgáltam a kifejeződését. A *lef1* fontos effektora a Wnt-jelátvitelnek, így szerepe van a sejtprolifерáció fenntartásában is. A vad fenotípusú egyedekben a *lef1* expressziója szinte a teljes TO-t lefedi (12. ábra C, 13. ábra C, 14. ábra C), a mutánsoknál (12. ábra G, 13. ábra G, 14. ábra F) a *lef1*

megnyílvánulása inkább csak egy kisebb területre korlátozódik. Azt is megfigyeltem, hogy a Notch-receptort kódoló *notch5* nem-mutáns embriókkal ellentétben, a mutáns embriók a TO-ban szinte egyáltalán nem expresszálódik (12. ábra H, 13. ábra H), előfordulása inkább csak a cerebellum és TO találkozási helyére szorítkozik.

Az A25-ös és A4-es mutáns és vad fenotípusú halak viselkedésvizsgálata

A vizsgálatok során arra voltunk kíváncsiak, hogy ezek a mutáns halak a TO-ban végbemenő apoptózis ellenére képesek-e érzékelni a környezet fényintenzitásának változásait. A kísérlethez hat napos (6 dpf) hallárvákat használtunk fel, melyeket egyenként helyeztünk el egy 24 lyukú lemezen (15. ábra). Az automatizált viselkedési teszt során a halak mozgását vizsgáltuk megvilágítás és elsötétítés hatására. A lemezek felső két sorában („a” és „b”) minden esetben mutáns embriók vannak, míg az alsó két sorban („c” és „d”) mindig vad típusú embriók találhatóak. A megfigyelés során az embriókat 60 mp-ig világosságban hagytuk (15. ábra A,B és F,G). Ebben az állapotban a hallárvák többsége nyugodt, mozgás csak néhány esetben detektálható főleg a nem-mutánsok esetében. (Ez alól kivétel az A kép a/1 és F kép a/1, ahol két mutáns hal erőteljes mozgást mutat. Ha tovább nézzük, a képeket észrevehetjük, hogy ezek az egyedek minden képen mozognak, tehát a mozgást nem a fény intenzitásának változása idézte elő.)

Egy perc után elsötétítettük a teret 30 mp-re, az ekkor végbemenő változásokat figyelhetjük meg a C és H paneleken. Láthatjuk, hogy az A25-ös halak esetében szinte kizárólag a vad fenotípusúak kezdtek el úszkálni, és az A4-es halaknál is lényeges különbség fedezhető fel a mutánsok és nem-mutánsok helyváltoztatása között. A kísérlet 90. másodpercénél újból felkapcsoltuk a fényt, aminek hatására a mozgások megmaradtak, s csak az idő előre haladásával kezdtek a lárvák megnyugodni és csökkenni kezdett az aktivitásuk. A kísérlet eredményeiből nem lehet egyértelműen kijelenteni, hogy ezek a mutáns halak teljes mértékben képtelenek érzékelni a környezet fényintenzitás változásait, de azt mindenképpen elmondhatjuk, hogy vad társaikhoz képest kevésbé képesek rá.



15. ábra: „A4“-es és „A25“-ös mutáns és vad fenotípusú hallárvák mozgásának monitorozása fényintenzitás változtatása mellett. Az első oszlopban az „A4“-es, a második oszlopban az „A25“-ös hallárvák láthatóak, a lemezeken mindegyik piros körben egy-egy egyeddel. Az „a” és „b” sorokban minden esetben mutáns (mut), míg a „c” és „d” sorokban nem-mutáns, vad fenotípusú (sib) egyedek vannak. A táblázat mellett az eltelt idő látható másodpercben (sec), illetve az oldalsó oszlop jelöli, hogy adott időperiódusban a halak világosban (fehér vonal), vagy sötétben (fekete vonal) voltak.

Konklúzió

A kísérleteink során megállapítható, hogy a vizsgált mutációnk valószínűsíthető helyzete az A25-ös vonal esetében az LG5 51.71 és 54.74 Mb közé esik, míg az A6-os mutáns vonal esetében az LG18 42.9 Mb közelében található. Továbbá elmondhatjuk, hogy a TO mutáns halakban a sejtciklus szabályozásában és a sejtek proliferációjában kulcsfontosságú gének expressziója lecsökkent. Az nem egyértelmű, hogy a csökkenés a proliferatív régiót érintő intenzív apoptózisból ered, vagy a mutáció esetleg a Wnt/ β -catenin útvonalat érinti és az ebből adódó defektus az, amely ezt az expressziós mintázatot alakítja ki, ezt későbbi kísérletek dönthetik csak el. Végül megfigyeltük, hogy a mutáns egyedek vizuális képességei lényegesen gyengébbek, mint a nem-mutáns társaiké.

Tervezett kísérletek

További markerek felhasználásával megpróbálom még jobban szűkíteni a mutáció előfordulásának az intervallumát mind az A25-ös és az A6-os mutáns vonalak esetében. Megvizsgálom a lehetséges gének expressziós mintázatát a Zebrafish Information Network (ZFIN) adatbázis segítségével (<http://zfin.org>). Abban az esetben, ha az egyik gén expresszálódik a TO-ban, akkor klónozom a cDNS-ét és megszekvenálva ellenőrzöm, hogy a mutánsokban nem hordoz-e missense mutációkat. Ilyen mutációk azonosítása esetén, a génemre antiszensz morfolino oligonukleotidot terveznék, amely beinjektálva meggátolja a transzlációt a génemről. Ha az így kezelt embriók hasonló fenotípust mutatnak, megállapítható, hogy valóban a vizsgált gén mutáns allélja felelős a fenotípusért. A továbbiakban ezek a funkcionális knockout mutánsok segíthetnek feltárni a TO mutáció hátterét.

Mindezek mellett tervezem további sejtciklust és sejtproliferációt szabályozó gének, például a *her4*, *deltaA*, *axin2* expressziós mintázatának vizsgálatát.

Összefoglalás

A kifejlett szervezet szöveteinek növekedése, a bennük elpusztult sejtek pótlása az őssejtbiológia központi kérdései közé tartozik. Ennek megfelelően felfedezésük óta kitüntetett figyelem övezi az említett folyamatokban fontos szerepet játszó felnőtt őssejteket. A zebradánió (*Danio rerio*) tectum opticum (TO-a) a hal élete során folyamatosan növekszik a medioposzterior szélein fellelhető őssejteknek köszönhetően. Mivel a fejlődő lárvákban ezek a sejtek közvetlenül az epidermisz alatt helyezkednek el, ideális idegi őssejtmodellként használhatjuk őket. A csoportunkban folyó munka célja a TO őssejt-niche normális működésében fontos gének jellemzése.

Kutatásaim során olyan mutáns vonalakkal foglalkoztam, amelyeknél két napos korban apoptózis figyelhető meg a TO proliferatív régiójában. Munkánk során előbb komplementációs analízissel bebizonyítottuk, hogy a mutációk ugyanazon génnek a különböző alléljai az A25-ös, A4-es és G38-as mutánsok esetében. Így a későbbiekben csak az A25-ös illetve az A6-os család térképezését végeztem el, meghatározva a mutációt magába foglaló kromoszóma intervallumot.

Ezzel párhuzamosan *in situ* hibridizációs festésekkel kimutattam, hogy a sejtciklusban, a proliferációban és a sejtsors meghatározásában kulcsfontosságú gének expressziója a mutánsokban lecsökkent.

Végül fényérzékelést vizsgáló viselkedési tesztekkel végeztem, bebizonyítva, hogy a mutánsok nem képesek érzékelni a környezetükben végbemenő fényintenzitás változásokat.

Abstract

Research into tissue development and renewal is a key area of interest for developmental biologists today. In zebrafish (*Danio rerio*), as in other Teleosts that grow continuously throughout their life, the main organs, including the brain, generate and incorporate new cells continuously. The growth of the main processing center of visual information in fish, the Optic Tectum (OT) is the result of continuous divisions of neural stem cells. In 2 days old zebrafish larvae these stem cells can be found in the epithelial layer of medioposterior tectum, close to the dorsal surface, making them ideal for *in vivo* observations.

The goal of my research project is the identification and characterization of factors that regulate the survival and proliferation of neural stem cells in the optic tectum (OT). In our laboratory we have a collection of mutants that show pronounced apoptosis in the proliferative zone of the OT at 2 days post fertilization (dpf). In order to understand the genetic causes behind this phenotype I performed genetic fine mapping for two of the genes. One of them maps to linkage group (LG) 5 (we have three alleles (A25, A4, G38) of this gene as shown by complementation analysis); whereas the other gene to LG 18 (a single allele is available in this case). With the help of specific genetic markers I was able to narrow down the genomic regions where the mutations likely occur.

I've also performed a series of *in situ* hybridization experiments, to characterize the expression of key patterning genes in homozygous mutant embryos. My results show that the expression level of key cell cycle regulators is reduced, and the components of the canonical Wnt- and Notch-signaling pathways also show impaired expression.

As the OT is the centre of processing for visual information in zebrafish, we wanted to test how much the mutant larvae can perceive from the surrounding world. Therefore we carried out a behavioral essay, to test the visual capabilities of the mutant lines. These experiments demonstrated that homozygous mutant embryos are less capable in perceiving sudden changes in light intensity than their siblings.

Szerzői hozzájárulás

1. Az A25-ös mutáns vonal géntérképezése során különböző, polimorfnak bizonyult markerek segítségével leszűkítettem a mutáció előfordulásának lehetséges helyét LG5 50.52 Mb és 54.74 Mb közé. Az A6-os mutáns vonal géntérképezése során, a korábbi adatokat felhasználva a mutáció előfordulásának helyét LG18 42.9 Mb magába foglaló 2 Mb nagyságú intervallumra becsültem.

2. *In situ* hibridizációval megvizsgáltam a *cmyc*, *ccnD1*, *lef1* és *notch5* gének expressziós mintázatát az A25-ös, az A6-os és az A4-es mutáns és nem- mutáns embriókban és általánosan azt tapasztaltam, hogy a mutáns embrókban az említett gének megnyilvánulása alacsonyabb, mint a nem-mutáns embriókban.

3. Az A25-ös és az A4-es mutáns és nem-mutáns egyedekkel viselkedés vizsgálatot végeztem el, aminek során láthatóvá vált, hogy mindkét vonal esetében a mutáns egyedek kevésbé érzékenyek a környezet fényintenzitásának változására.

Irodalomjegyzék

Cervený, K. L., M. Varga, et al. (2012). "Continued growth and circuit building in the anamniote visual system." Developmental Neurobiology **72**(3): 328-345.

Christof Niehrs and Sergio P Acebron, (2012). " Mitotic and mitogenic Wnt signalling." The EMBO Journal **31**: 2705 - 2713

Grandel, H., J. Kaslin, et al. (2006). "Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: Origin, proliferation dynamics, migration and cell fate." Developmental Biology **295**(1): 263-277.

Kaslin, J., J. Ganz, et al. (2008). "Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **363**(1489): 101-122.

Kimmel et al. (2005). „Stages of Embryonic Development of the Zebrafish.“ Developmental Dynamics **203**:253-310

Lai, E. C. (2004). "Notch signaling: control of cell communication and cell fate." Development **131**(5): 965-973.

Shin-ichi Ohnuma and William A. Harris² (2003) „Neurogenesis and the Cell Cycle.“ Cell Press

Thisse, C. and Thisse, B. (2008) High resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. Nature Protocols **3**(1): 56-69.

Valdivia, L. E., R. M. Young, et al. (2011). "Lef1-dependent Wnt/ -catenin signalling drives the proliferative engine that maintains tissue homeostasis during lateral line development." Development **138**(18): 3931-3941.

David M. Langenau & Leonard I. Zon, et al. (2005) „The zebrafish: a new model of T-cell and thymic development“ Nature Reviews Immunology 5, 307-317 (April 2005) | doi:10.1038/nri1590

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet nyilvánítani témavezetőmnek Dr. Varga Máténak, aki szaktudásával és tapasztalatával segítette munkámat. Továbbá szeretnék köszönetet mondani Dr. Stephen Wilsonnak a University College London Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék csoportvezetőjének és a csoportjában dolgozó Hannah Rouse-nak, Rodrigo Young-nak és Anukampa Barth-nak, segítségükért. Köszönettel tartozom a tudományos kooperációt elősegítő COST szervezetnek (<http://www.cost.eu/>), hogy támogatásával lehetővé tette, hogy Londonban fejleszthessem tovább szakmai képességeimet. Nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani a Genetikai Tanszék vezetőjének Dr. Vellai Tibornak és kollegáimnak, Fodor Erikának és Zsigmond Áronnak a támogatásukért.