



ORSZÁGOS TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

Ivar-specifikusan expresszáldó transzgén bevitele átlátszó zebradánióba korai szelekciós eljárással

**Introducing a reporter gene with sex-specific expression pattern into
transparent zebrafish by an early selection method**

Készítette: Szabó Olivér Máté
HY53VC
Osztatlan Agrármérnök, osztatlan képzés
Nappali tagozat
Georgikon Campus

Témavezetők: Dr. Szeverényi Ildikó, szenior kutató
Dr. Orbán László, tudományos tanácsadó
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem,
Georgikon Campus,
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet,
Alkalmazott Halbiológia Tanszék

**Lehetséges OTDK szekció: Agrártudományi szekció
Kaposvár**

2023.április 4-6.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés és célkitűzés.....	5
2. Irodalmi áttekintés.....	7
2.1. A zebradánió bemutatása.....	7
2.1.1. A faj általános bemutatása	7
2.1.2. A zebradánió egyedfejlődése.....	7
2.2. A gerincesek ivarát kialakító mechanizmusok.....	9
2.3. A zebradánió ivarát meghatározó folyamatok	11
2.3.1. A primordiális őscsírasejtek fontos szerepet töltenek be az ivarszervek kialakulása során	12
2.3.2. Az ivarszerv differenciálódása	12
2.3.3. Az apoptózis szerepe az ivar differenciálódásában	14
2.4. A <i>tg[vas::egfp]</i> zebradánió vonal.....	14
2.5. A pigmentek termelődés a zebradánióban.....	15
2.6. A mutáns zebradánió vonalak bemutatása	17
2.6.1. A nacre vonal bemutatása	17
2.6.2. A roy orbison vonal bemutatása.....	18
2.6.3. A casper vonal bemutatása.....	18
2.6.4. Korábban megalkotott ivarmegfigyelésre létrehozott vonalak	19
3. Anyag és módszer	21
3.1. A halak származása	21
3.2. A halak tartási körülményei	21
3.3. A halak szaporítása és az ivadékok gondozása	23
3.4. A transzgénikus egyedek mikroszkópos szexálása	24
3.5. Genomi DNS izolálása	25
3.6. A transzgén jelenlétének, illetve kópiaszámának kimutatása PCR-alapú tesztekkel.....	26
4. Eredmények és megbeszélésük	28
4.1. A szelektálandó egyedek létrehozása többlépcsős keresztezésekkel	28
4.2. A fenotípusos szelekció lépéseinek optimalizálása az eltérő pigmentáltságú egyedek korai kiválasztása céljából.....	29
4.2.1. Fekete pigmentációra történő szelekció.....	31
4.2.2. A reflektív pigmentációra történő szelekció	33

4.3.	A pigmenthiányos, transzgénikus egyedek azonosítása mikroszkópos szexálást követő PCR teszttel	34
4.4.	A transzgén kópiaszámának meghatározása az átlátszó transzgénikus F2-es egyedek utódaiban.....	36
4.5.	A gáspár vonal genomi DNS-ének izolálása és szekvenálása	37
4.6.	Hozzájárulások	38
5.	Limitációk	39
5.2.	A recirkulációs rendszer nyújtotta lehetőségek	39
5.3.	A zebradánio ivarmeghatározása késői és komplex folyamat.....	39
5.4.	A hím egyedek detektálásának nehézsége	39
6.	Következtetések és javaslatok	40
6.1.	A gáspár vonalban a petefészek fejlődés megfigyelésének hatékonysága jelentősen javult..	40
6.2.	A gáspár vonal létrehozásánál alkalmazott szelekciós eljárás hatékonyabb az eddigi módszereknél.....	41
6.3.	A <i>gáspár</i> vonal a petefészek két lebenyének összehasonlítására is hasznos lehet	42
6.4.	A <i>gáspár</i> vonal hasznos eszköze lehet más kutatásoknak is	43
6.5.	Egy hímvarszerv-specifikus transzgén bevitele a <i>gáspár</i> vonalba tovább javíthatná detektálás pontosságát az ivarszerv fejlődése során	44
	Összefoglalás.....	45
	Köszönetnyilvánítás	46
	Irodalomjegyzék.....	47

Rövidítések jegyzéke

AB	Háziasított zebradánió vonal
CSD	Chromosomal Sex Determination (Kromoszóma általi ivar meghatározás)
Cyp19	Ivarszervi aromatáz enzim
dpf	days post-fertilization (a megtermékenyítéstől eltelt idő napokban mérve)
Egfp	Enhanced Green Fluorescent Protein (Zöld fluoreszcens fehérje)
EL	Early Larval (korai lárvakori)
ESD	Environmental Sex Determination (Környezeti ivarmeghatározás)
GSD	Genetic Sex Determination (Genetikai ivarmeghatározás)
ML	Mid Larval (közép lárvakori)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeráz láncreakció)
PGC	Primordial Germ Cell (Primordiális őscsíra sejt)
PSD	Polygenic Sex Determination (Több gén általi ivarmeghatározás)
SD	Sex Determination (Ivarmeghatározás)
Sox9	SRX-Box Transcription Factor 9 (Transzkripció faktor fehérjét kódoló gén)
SRY	Sex Determining Region Y (az ivart meghatározó gén emlősekben)
TSD	Temperature-based Sex Determination (Hőmérséklet általi ivarmeghatározás)
UV	Ultraviolet (ibolyántúli)
Vasa	DEAD box polypeptide 4 (az ivarok kialakulásában résztvevő RNS kötő és RNS helikáz aktivitással rendelkező fehérje)
wpf	weeks post-fertilization (a megtermékenyítéstől eltelt idő hetekben mérve)
Ziwi	piwi-like RNA-mediated gene silencing 1 (az ivarsejtek képzésében résztvevő fehérje)

1. Bevezetés és célkitűzés

A zebradánió korunk egyik legnépszerűbb modell organizmusa (Wixon, 2000). Ezt az Ázsiából származó kisméretű, édesvízi díszhalat - melyet a magyar származású George Streisinger választott ki kísérleti célokra - napjainkban laboratóriumok százaiban használják. A zebradánió számos olyan kedvező tulajdonsággal rendelkezik, amelyek kiemelkedő gerinces modellé teszik. Ilyen tulajdonságai: (i) rövid generációs időtartam (átlagosan négy hónap); (ii) külső megtermékenyítés; (iii) szaporaság: egyszerre több száz utódot hoz létre; (iv) viszonylag korai ivarérettség és (v) a genom konzervált volta (az emberben meglévő örökletes genetikai megbetegedéseket okozó gének nagy része a zebradánió genomjában is megtalálható (Dooley & Zon, 2000). Mivel az embriók átlátszó ikraburokban fejlődnek és könnyen manipulálhatók, ezért lehetővé válik számos öröklődő emberi betegség modellezése és tanulmányozása (Lu és mtsai., 2020; Wang és mtsai., 2021).

A faj biológiájának számos aspektusa ismeretes, azonban nem minden részlete tisztázott. Ezen nem teljesen megértett folyamatok közé tartoznak a két ivart kialakító mechanizmusok is. A házasítás során több zebradánió vonal elvesztette azon tulajdonságát, miszerint a nemüket ivari kromoszómák határozzák meg ('Chromosomal Sex Determination', röviden CSD). Ezekben a vonalakban az ivart feltehetően egy poligénes rendszer határozza meg ('Polygenic Sex Determination', röviden PSD) (Liew & Orbán, 2014; Wilson és mtsai., 2014). A hím ivar kialakulása során lezajlik egy ún. 'ivarszerv átfordulás', melynek során a későbbi hímekben először kialakul egy fejletlen petefészek kezdemény (angolul: 'juvenile ovary'), mely később herévé fordul át (Liew és mtsai., 2012). Ma már azt is tudjuk, hogy több környezeti tényező is képes befolyásolni az ivarok kialakulását. Az ivarszerv kialakulása során alkalmazott hőkezelés például képes drasztikusan eltolni az ivararányt a hímek irányába (Ribas és mtsai., 2017). Ezen folyamatok komplexitása megnehezíti, hogy többet feltárjunk a folyamatokból, amik kialakítják az ivarszerveket.

A keszthelyi Élvtal Halgenomikai Kutatócsoportban, a zebradánió ivarát kialakító mechanizmusok minél részletesebb megértése érdekében, több módszerrel is végzünk kutatásokat. Egyike ezeknek az élő egyedekben történő ivarszervek fejlődésének vizsgálata mikroszkóp használatával. Az eszköz, aminek segítségével detektálhatjuk az ivarszervek kialakulását, a *tg[vasa::egfp]* zebradánió vonal (Krøvel & Olsen, 2002). Ennek sajátossága, hogy az ivarszervekben (főként a petefészekben) expresszáldó ivar-specifikus markert, a

vasa gént fuzionálták az ún. zöld fluoreszcens fehérjével ('enhanced green fluorescent protein', Egfp), amely kék fény hatására jelet bocsát ki. Ez jelentősen megkönnyíti ugyan az ivarszerv fejlődésének vizsgálatát, azonban a jel erősséget és annak érzékelését nagyban lecsökkenti a fajra jellemző pigmentáltság. A zebradánió szervezetében három jelentős pigment típus található meg (Rawls és mtsai., 2001). Ezek közül a fekete és reflektív pigmentek azok, amelyek a jellel interferálva lényegesen csökkentik annak erősségét. Annak érdekében, hogy ezt a zavaró hatást csökkentsük és a jelet erősítsük, kidolgoztunk egy korai szelekciós eljárást az ivar-specifikusan kifejeződő transzgén átvitelére egy átlátszó fenotípusú, kettős pigment mutáns vonalba. Ennek a *casper* vonalnak a sajátossága, hogy a dupla mutáció miatt az egyedek szervezetében nem termelődnek a fenti pigmentek (White és mtsai., 2008). A transzgénnek a vonalba történő introgressziója feltehetően jelentősen növeli a petefészekből érkező jel intenzitását. Így részletesebb megfigyeléseket tehetünk majd, és ezáltal jobban megértjük az ivarszervek kialakulásának részleteit.

Célkitűzések

Munkám során a céljaim a következők voltak:

- Ivar-specifikusan megnyilvánuló marker bevitele egy átlátszó vonalba, annak érdekében, hogy a pigmentáció ne zavarja az ivarszervből érkező fluoreszcens jelet;
- Pigmentáltság és transzgén jelenléte alapján történő korai szelekciós eljárás kidolgozása;
- Az így kialakított átlátszó, homozigóta transzgénikus zebradánió vonal alapszintű jellemzése;
- Az újonnan létrehozott vonal genomjának szekvenálása, a transzgént határoló genomi régiók meghatározására.

Hosszabb távon:

- Olyan PCR reakció beállítása, mellyel a potenciális szülőkben a transzgén kópiaszáma ivarérés előtt tesztelhető
- A zebradánió ivarát kialakító tényezők mélyebb és részletesebb megismerése, esetlegesen az érintett gének közül néhány ortológjának alapszintű analízise egyes haszonhalak genomjában

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A zebradánió bemutatása

2.1.1. A faj általános bemutatása

A zebradánió [*Danio rerio*, Hamilton 1822] korunk egyik legnépszerűbb modell organizmusa. A pontyfélék családjába tartozó édesvízi faj, a Dél-Ázsiai Himalája környéki régióból származik, elsősorban Banglades, Pakisztán és India lassú vízfolyásaiban található meg. Főleg rovarlárvával, féreggel és apró rákokkal táplálkozik. A kifejlett egyedek testhossza 5-6 cm (**1. ábra**), élettartamuk laboratóriumi körülmények között maximum két-három év. A jellegzetes csíkos megjelenésüket, amiről a nevüket is kapták a szervezetükben megtalálható pigmentsejtek adják (Wixon, 2000).



1.ábra: A zebradánió esetében markáns ivari dimorfizmus figyelhető meg. A hímek teste torpedó alakú, elnyúlt és arany barnás színezetűek. A nőstények inkább ezüstösek, has tájukuk kerekded és egy ivari (anális) papillát is megfigyelhetünk úszás közben a kloáka tájékán. (Fotó: Sarah M. Zala, University of Veterinary Medicine, Vienna)

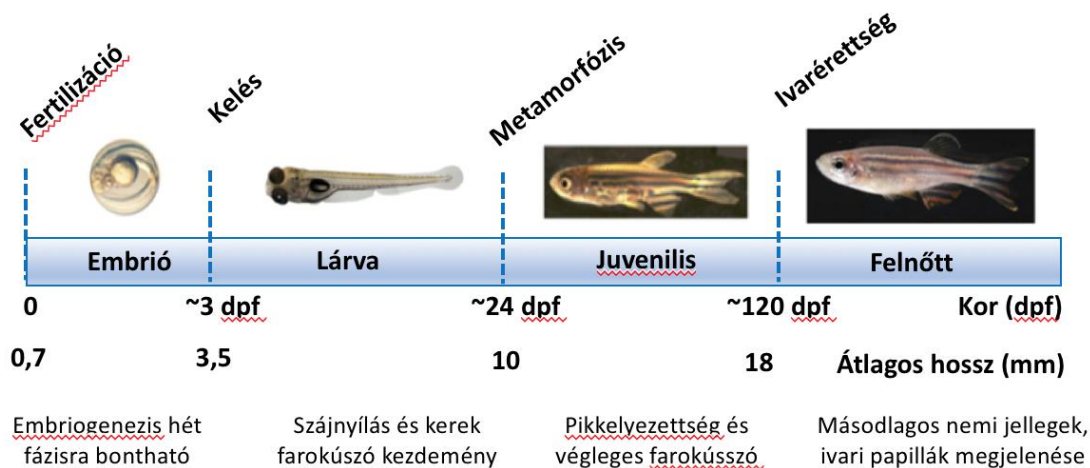
2.1.2. A zebradánió egyedfejlődése

A zebradánió egyedfejlődése során számos átalaku láson megy keresztül az első sejtosztódástól az ivarérettségig, amely négy életszakaszra osztható: (i) embrió; (ii) lárva; (iii) juvenilis; és (iv) kifejlett felnőtt állat (**2. ábra**).

- Embrió

Ez a szakasz a megtermékenyítéstől a kikelésig tart (kb. 2-3 nap), amelyre a sejtosztódások és sejtváándorlások sorozata jellemző. Hét különböző stádiumot különböztetünk meg, melyek mindegyikében jellegzetes változások történnek (Kimmel és mtsai., 1995). Ezek a

következők: 'zygote period', 'cleavage period', 'blastula period', 'gastrula period', 'segmentation period', 'pharyngula period', és végül 'hatching period' (kelés).



2.ábra: A zebradánió egyedfejlődése négy fő életszakaszra osztható.

Az egyes stádiumok főbb jellemzői az ábra alján vannak feltüntetve. A zebradánió ivarát kialakító folyamatok zöme a második szakasz végén és a harmadikban játszódnak le. (Forrás: (Levraud és mtsai., 2014) módosítva)

- Lárva

Ez a stádium körülbelül a második naptól kezdődik (a keléstől függően) és 24 nappal a megtermékenyülést követően ('days post-fertilization', azaz dpf) tart. A kikelést követően az egyedek mozgása beindul. Az 5 dpf-es korban a szájnyílás is megjelenik és a lárvák táplálkozni kezdenek. A lárvák nem rendelkeznek a végleges farokúszóval csak egy úgynevezett 'fin fold' segíti az úszásukat és nincsenek pikkelyek sem a testükön (2.ábra).

- Ivadék és növendék ('juvenile') kor

Erre a korra jellemző a teljes pikkelyezettség kialakulása, valamint a végleges farokúszó megjelenése, azonban a két ivar még nem választható szét fenotípusos jelek alapján. Általában egy hónapos kortól 3-4 hónapos korig sorolhatók ebbe a kategóriába a fiatal halak.

- Felnőtt kor

A felnőtt kort (4 month post-fertilization, azaz mpf) elérve az egyedek szaporodásra készek. Az ivarszervek is teljes mértékben kialakultak és a halakon látszódnak azok a másodlagos testi jelek, amiknek köszönhetően felismerhető a két ivar (1. ábra). A hímek ebben a

korban már megnyúlt testűek, torpedóra hasonlítanak és egyes vonalakban sárgás vagy fémes árnyalatúak. Jellemző rájuk, hogy rendkívül gyorsan képesek úszni, az úszási mintázat alapján ki lehet választani a legjobb hímeket. A nőtények szervezete nem ennyire elnyújtott. A hasuk tájékán kerekded, ami minden irányból jól megfigyelhető. A nőtények kloákája előtt helyezkedik el az ún. anális papilla, mely sajnos csak a vízben és csak nyugalomban levő egyedeken látható. Az ivari dimorfizmus mértéke vonalanként eltérő, egyes esetekben kifejező és könnyen felismerhető, másutt csak nehezen észrevehető. Mivel a dimorfizmus vizuálisan is látható jegyei csak kifejlett egyedeken észlelhetők, ezért fiatalabb egyedek esetében sokszor nem tudjuk biztonsággal megkülönböztetni a két ivart.

2.2. A gerincesek ivarát kialakító mechanizmusok

Az élő szervezetekben az ivar meghatározása és kialakulása egy rendkívül összetett folyamat, melyre a fajokban változatos stratégiák alakultak ki az evolúció során (Morrish & Sinclair, 2002). A folyamat, amely során egy egyednek kifejlődik a neme egy olyan komplex és eseteként gyönyörű folyamat, ami évtizedek óta foglalkoztatja a kutatókat. Számos kutatás irányult már arra, hogy feltárják ezeket a folyamatokat, azonban bizonyos fajokban továbbra se tudunk válaszokat adni. Az ivarok fejlődése és a szaporodás egy olyan folyamat, ami kulcsfontosságú egy faj fejlődése szempontjából. Számos olyan ehhez köthető betegség van, ami előfordul az emberekben. Ezért is fontos, hogy vizsgáljuk az ivar kialakulását. Illetve a kutatás másik fontos szerepe a gazdasági jelentősége. Gazdasági halfajaink egy részének esetében szintén fontos, hogy ivart kialakító és fenntartó mechanizmusok ismerete, mert a nemek között növekedési erélyükben vagy a fertőző betegségekre adott válasz tekintetében komoly eltérések lehetnek (Campbell és mtsai., 2021)

Azt az eseményt, amikor egy egyed neme eldől, ivari determinációnak (angolul 'Sex Determination', azaz SD) nevezzük. Az esetünkben ez attól függ, hogy milyen kromoszómát öröklünk az apától. Az emberi fajban a hím a heterogametikus, azaz két különböző ivari kromoszómát (X/Y) tartalmazó, ivar. Az utódok akkor lesznek hímek, ha az apától az Y kromoszómát örököljük. Az ok, amiért az Y kromoszóma jelenléte a hím ivarhoz vezet az, hogy ezen a kromoszómán helyezkedik el a hím ivart meghatározó gén, a Sry (Hawkins, 1993). A madarak esetében az ivart ZW/ZZ ivari kromoszomális rendszer alakítja ki (Smith & Smith, 2010). Itt a hím ivar (ZZ) a homogametikus nem. Az emlősökkel ellentétben a madaraknál, ahol a tojó a heterogametikus ivar (Z/W) nem tapasztalhatjuk az Sry gén

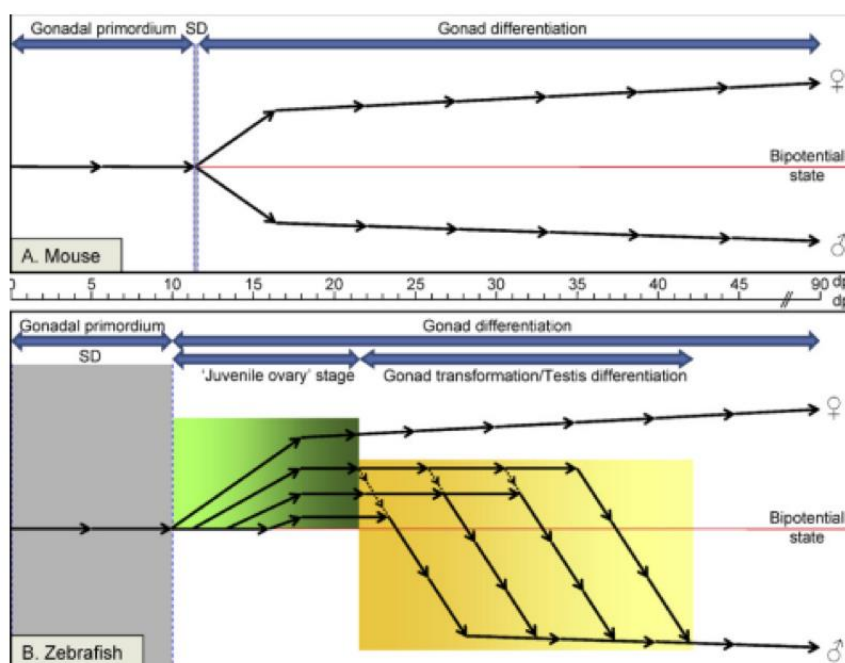
jelenlétét. A madarak esetében is több gént vizsgáltak, keresve azokat a géneket, melyek kialakítják az ivarokat és specifikusan hatnak egy ivarra. A kutatások azt bizonyították, hogy a *dmrt1* gén megemelkedett expressziós szintje a hím ivarnak kedvez. Jelenleg, ezt a gént tartják a fő ivar kialakító génnek. A *dmrt1* célzott kiütése a női ivar irányába történő eltolódást eredményezett, igazolva a felvetést, miszerint ez a gén a fő faktor, ami a hím ivart kialakítja.

Az emlősökkel és madarakkal ellentétben bizonyos hüllők esetében az ivarra a legnagyobb hatást a hőmérséklet gyakorolja. A hőmérséklet indukálta ivar meghatározás ('Temperature-based Sex Determination', azaz TSD) megfigyelhető teknősökben, gyíkokban és krokodilokban egyaránt (Warner & Shine, 2008). A hőmérséklet mellett a hüllőkben fontos faktor az ivarmeghatározásban a szteroid hormonok jelenléte, különösen az ösztrogéné, mely képes felülmúlni a hőmérséklet hatását. Korábbi injektáláson alapuló kísérletek azt igazolták, hogy az aromatáz enzim kulcs szerepet játszik a hőmérséklet általi ivar meghatározásban. A magyarázat erre az, hogy az enzim képes a tesztoszteront átalakítani ösztrogéné. Az ilyen ivar meghatározási rendszerben két hőmérsékleti szélsőséget lehet elkülöníteni, olyan hőmérséklet, ami a női ivarnak, és olyan, ami a hím ivar kialakulásának kedvez. Magas hőmérsékleten az ösztrogén szint emelkedik, aminek következménye a női ivar kifejlődése, ekkor a here-specifikus gének expressziója gátolt. Ha a hőmérsékleti érték a hím ivar kialakulásának kedvez, akkor az ösztrogén termelés gátlódik, a már korábban említett faktorok expressziója pedig megemelkedik.

A halak esetében fajtól függően mindkét nem lehet heterogametikus, sőt találunk fajokat is, amelyekben az ivart több kromoszóma határozza meg. Ugyanakkor nem minden fajban szükséges az ivari kromoszómapár létezése, sőt léteznek fajok különböző formájú hermafroditizmussal is, ahol nincs klasszikus értelemben vett ivar meghatározás. A fentiek miatt az ivart kialakító tényezők kutatása komplex feladat, mely több tucat halfajon, közöttük halas ivari modelleken zajlik párhuzamosan, ezek egyike a zebradánio is. A halakban is ismerünk olyan konzervált funkciójú géneket, amelyek terméke szükséges az ivarszervek kialakulásához. A zebradánio esetében a petefészek kialakulásának egyik ilyen fontos faktora a Vasa fehérje.

2.3. A zebradánió ivarát meghatározó folyamatok

A zebradánió egy diploid faj, melynek kariotípusa 25 pár kromoszómát tartalmaz ($2n$). Az eddigi kutatások során alapján valószínűsíthető, hogy a vadon élő zebradánióban ZW/ZZ típusú ivari kromoszómák vannak, azaz az ikrások alkotják heterogametikus ivart (Wilson és mtsai., 2014). A jelek arra mutatnak, hogy a házasítás során az egyik ivari kromoszóma elveszhetett, és annak hiányában kialakult egy úgynevezett poligénis ivarmeghatározási rendszer ('Polygenic Sex Determination', azaz PSD). A PSD azt jelenti, hogy több (sok?), a genomban elszórva elhelyezkedő gén határozza meg a tulajdonságot, jelen esetben az ivar kialakulását (3. ábra) (Liew és mtsai., 2012; Liew & Orbán, 2014)



3. ábra: Az egér és a zebradánió ivarmeghatározása és ivarszerveiknek kialakulása jelentősen különbözik egymástól.

Az egér (A) esetében ez a folyamat a 11,5 napon lezáródik és a két ivar külön fejlődik tovább. Zebradánió (B) ivara nem egy adott időpontban, hanem egy szélesebb időtartomány alatt dől el. A későbbi nőstényekben a 'juvenile ovary' állapot után kialakul a petefészkek. A későbbi hímekben a 'juvenile ovary' egy adott ponton elhal és helyén kialakul a here. Forrás: (Orbán és mtsai., 2009)

A zebradánió ivarának kialakulását a genetikai folyamatok mellett különböző környezeti faktorok (pl. a hőmérséklet és az egyedsűrűség) is befolyásolhatják. A fentiek alapján érthető, hogy – noha komoly erőfeszítéseket tettek ezen a téren – ennek a komplex folyamatnak részleteit nem értjük teljesen.

2.3.1. A primordiális őscsírasejtek fontos szerepet töltenek be az ivarszervek kialakulása során

A primordiális őscsírasejtek ('primordial germ cells', azaz PGC-k) olyan sejtek, melyek jelenléte szükséges a gonádok kialakulásához, és differenciálódásuk vezet a női, illetve férfi ivarsejtek kialakulásához. A PGC-k migrációja és fejlődése olyan fontos az ivarok kialakulása szempontjából, hogy ezeknek a folyamatoknak a hibája gyakran steril egyedeket eredményez. A tulajdonsága, miszerint a születésének helyéről a jövőbeli ivarszervek helyéig közvetlenül vándorol, számos fajban közös. A PGC-k fontossága, azonban fajonként eltérő lehet. Az emlősökben például nem minden aspektusa ismeretes a szerepüknek. Számos sejtkutatás bizonyította, hogy sok esetben szerepük van a petefészek kifejlődésében.

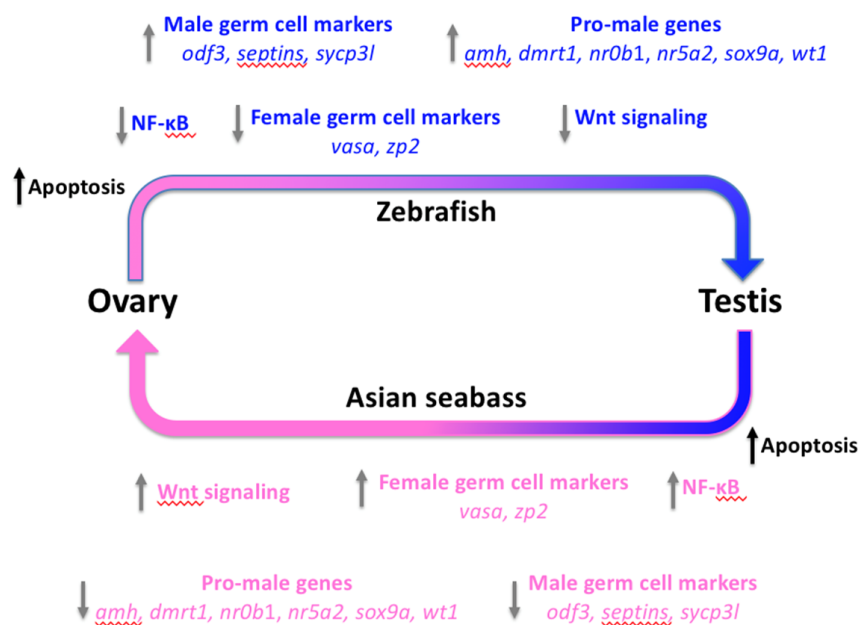
A PGC-k specifikációja már az embriók fejlődése során megtörténik, egy rövid idő alatt bekövetkező felszaporodás során a sejtek a gonádok kialakulásának helyére vándorolnak. Az, hogy ez mikor és mennyi idő alatt játszódik le fajonként eltérő (Raz, 2003). Egy másik népszerű modell organizmus, a medaka esetében (szintén trópusi, kis méretű díszhal), a gonádok kialakulásának helyére, vagyis a bipotenciális gonád helyére azonos számú sejt érkezik, azonban a kelést követően a genetikailag determinált nőtények esetében több PGC-t találhatunk, mint a hímek esetében (Nishimura és mtsai., 2018)

A zebradánió esetében nem ismerjük részletesen az ivar kialakuláshoz vezető folyamatokat. Nem tudjuk, hogy korábban említett fajokhoz hasonlóan zajlik, esetleg egy eddig nem ismert mechanizmusok játszódnak le. Léteznek ivarsejt specifikus markerek, amiknek expressziója valamelyik ivarszerv sejtjeiben történik meg nagy volumenben. Ilyenek például a *ziwi* és a korábban említett *vasa* gén. A *ziwi* génben bekövetkező mutáció az ivarsejtek számának csökkenéséhez vezet, illetve a hím ivar determinációjához. Ezenkívül tudjuk, ha a PGC-k számát csökkentjük, az a hím ivar kialakulását eredményezheti. Ezek az információk azt jelenthetik, hogy a PGC-k száma szintén fontos faktor lehet az ivarok kialakulásában.

2.3.2. Az ivarszerv differenciálódása

Az eddigi megfigyelések azt mutatják, hogy a zebradánió hímek ivarszervének korai fejlődése során megfigyelhető egy a hermafroditizmushoz hasonló jelenség. Az egyedfejlődés egy viszonylag korai szakaszában minden egyed szervezetében egy

kezdetleges petefészek fejlődik ki (angolul ‘juvenile ovary’) (Wang és mtsai., 2007). Ez a petefészek még éretlen, ezen ponton nem következik be az ivarérés. Ez a kezdetleges petefészek fejlődik ki később egy funkcionális petefészekké vagy herévé (4. ábra). Így hát a hímekben a korai petefészek hetek alatt herévé alakul, hasonlóan ahhoz a folyamathoz, mely a ‘protogyn’ (azaz női ivarral indító) szekvenciális hermafroditák ivarszervében zajlik le. Ennek a rendkívül érdekes és kevésbé ismert folyamatnak az intervalluma változó. Az első jelei körülbelül a megtermékenyítést követő 14.-20. napban látszódnak annak, hogy kialakul egy korai petefészek. Azonban az, hogy pontosan mikor alakul ki ebből a kifejlett ivarszerv, egyedenként változik.



4. ábra: Az ázsiai tengeri sügér ivarváltása és a zebradánió hímek heréjének kialakulásának sémája.

Noha a két folyamat ellentétes irányban zajlik, ugyanazon gének és kaszkádok vesznek benne részt, csak ellenkező irányba hatva. Az egyetlen kivétel az apoptózis, mely mindkét esetben erőteljes aktivitást mutat, hiszen ez bontja le a nem kívánt sejteket. (Forrás: Ravi és mtsai., 2014)

Azokat a folyamatokat, amelyek során megtörténik a funkcionális ivar kialakulása nagyon nehéz lenne nyomon követni a transzgenikus riporter vonalak nélkül. A laboratóriumunkban használt vonalba egy *tg[vasa::egfp]* transzgént ültettek be (Krøvel & Olsen, 2002, 2004). Ennek a transzgénnek a terméke kék fénnel megvilágítva fluoreszcens jelet ad ki magából. Ezzel a vonallal nyomon tudjuk követni a petefészek fejlődését. Az éretlen petefészek megjelenését már detektálhatjuk a vonal segítségével.

A hím ivar esetében a here kialakulása a petesejtek számának drasztikus csökkenésével kezdődik (Wang és mtsai., 2007). A környező sejtek számának növekedése, a spermatogenezis megindulásához vezet. A petesejtek számának csökkenését programozott sejthalál, azaz apoptózis vezényli. Az eddigi eredmények azt jelenthetik, hogy a petesejtek számának csökkenése jelenti a fő okot a here kialakulásában. A korábban említett kutatás azt is megmutatta, hogy a petefészek differenciálódása herévé szintén széles időintervallumban játszódik le. Ezzel a folyamattal ellentétben, ha a petesejtek száma tovább növekszik kialakul egy funkcionális petefészek. A folyamat, amely során az egyedek ivara egy irányba tolódik nem egyedi a zebradánió esetében. Vannak más fajok is, amelyek szervezetében hasonló folyamatok játszódnak le.

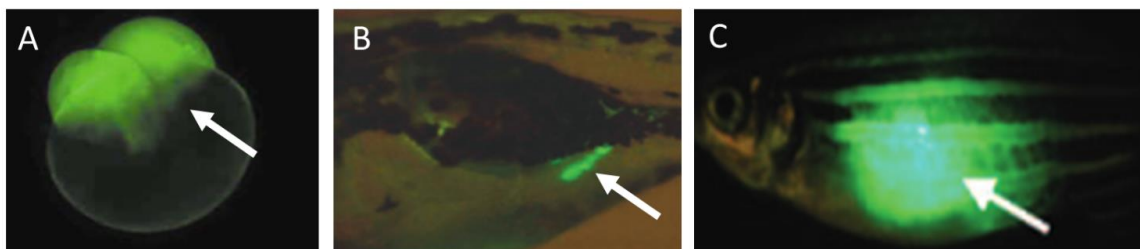
2.3.3. Az apoptózis szerepe az ivar differenciálódásában

Az apoptotikus folyamatoknak, azaz a programozott sejthalálnak alapvető szerepe, hogy fenntartsák a szervezet normál működését, azaz homeosztázisát. Ez a zebradánióban sincs másképp, azonban emellett fontos szerepük van az ivar differenciálódásában is (Yamashita, 2003). Jelenlegi ismereteink szerint a zebradánióban az elhaló petesejtek apoptózis által történő kitisztítása egy hím-specifikus folyamat, mely feltételezhetően a következőképpen játszódik le: Az elhaló petesejteket programozott sejthalál (apoptózis) távolítja el, majd a környezetében található differenciálatlan őssejtek betörnek a volt petesejt területére. Az eredetileg a petesejtet támogató ‘granulosa sejtek’ transzdifferentiálódással Sertoli sejtekké alakulnak, és a hím irányba vezérlik az őssejtek differenciálódását, végül kifejlődik a here (Wang és Orbán, 2007). A here kialakulásának részletei egyelőre nem teljesen tisztázódtak, kutatásom is ezen folyamatok jobb megértésére irányul.

2.4. A *tg[vas::egfp]* zebradánió vonal

Transzgénikus zebradánió vonalakat a kutatások régóta használnak arra, hogy a szervezetben lejátszódó folyamatokat élő egyedekben - *in vivo* - tudják vizsgálni. Ilyen transzgénikus vonal az általunk használt *tg[vas::egfp]* más néven *tg[ddx4::egfp]*, amelynek a PGC-it az Egfp riporter fehérje által kibocsátott zöld fény jelöli (Krøvel & Olsen, 2002) (5. ábra). Az ősvarsejt-specifikusan megnyilvánuló *vasa* (*vas*) gén szabályozó régiója által vezérelt *vas::egfp* mRNS, illetve a róla átíródó fehérje csak a PGC-ben stabilak, a szomatikus

sejtekben gyorsan lebomlanak. A női ivarszerv kialakulása során ez a rekombináns fehérje egyre nagyobb mennyiségben van jelen a petefészekben, ezáltal a hím és női egyedek ivarszerve azok fejlődése során egy viszonylag korai állapottól mikroszkóppal elkülöníthető.



5. ábra: Egfp jel különböző korcsoportú transzgénikus egyedekben

Az (A) embrionális fejlődés során a sejtekből érkező jel detektálása, (B) lárva és (C) felnőtt egyed esetében a petefészekből érkező jelről készült felvétel. A nyilak a jel helyét mutatják.

2.5. A pigmentek termelődés a zebradánióban

A pigmentek olyan színanyagok az élő szervezetben, amiknek nem csak az adott fajra jellemző fenotípus kialakítása a feladatuk, hanem fontos szerepük van a rejtőzködésben, párválasztásban, a szexuális és egyéb viselkedési mintákban, valamint a káros sugárzások elleni védekezésben (Patterson & Parichy, 2019). Az emlősök és madarak szervezetében a melanociták az egyetlen pigmentsejt típus, amelyek a madarakban pl. többfajta melanin pigmentet termelnek. A halak szervezetében többféle pigmentsejt típus található, amelyek változó számban fordulnak elő a különböző fajokban. A zebradánió szervezetében háromféle pigmentsejt típus termelődik: a fekete melanofórák, a reflektív iridofórák és a sárga xantofórák (Rawls és mtsai., 2001). Ezeknek a kromatofóráknak a fejlődése számos ponton kapcsolatos, míg végül a megfelelő helyükre vándorolva ki nem alakul a zebradánió jellegzetes világos-sötét csíkozottsága, amely alapján a faj nevét kapta.

Az embriogenezis során a pigment sejtek prekursorai a már korábban említett ‘neural crest’-ből származnak, innen vándorolnak az előre meghatározott helyükre (Kelsh és mtsai., 1996). Az így kialakított pigmentálódás három nagyobb stádiumba sorolható (6. ábra).



6. ábra: A zebradánió pigmentáltsága változik az ontogenezis során

Ugyan mindhárom pigment típus jelen van a korai lárva állapotban (A) az egyedek pigmentáltsága drámai változáson megy át az egyedfejlődés során egészen a felnőtt stádiumig (B, C). (Forrás: Patterson and Parichy, Annu. Rev. Genet. 2019)

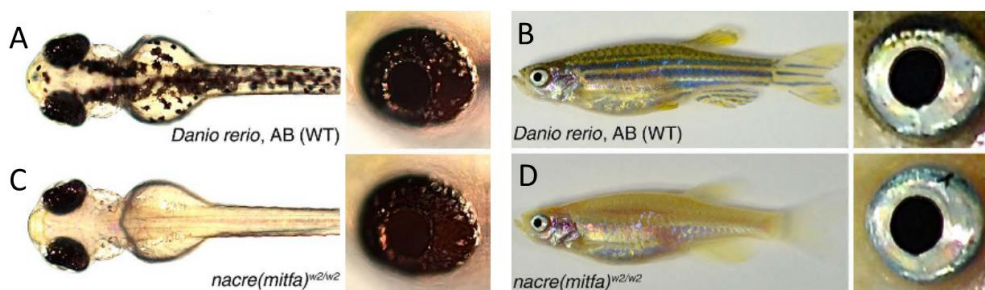
A legkorábbi állapot a korai lárva korban megjelenő ‘early larval’, azaz EL mintázat. Az első sejtek a melanofórák, az egyedfejlődés második napjánál jelennek meg. Ebben a stádiumban már jól elkülöníthetők azon vonalak, amelyek a fekete pigmentsejteket termelik (például AB vonal) és azok, amelyekben ez a sejt valamiért nincs jelen (például *casper*). A fekete sejteket az egyedfejlődés harmadik napján a reflektív pigmentek (iridofórák) követik. Ezen sejtekre is jellemző a melanofóránál jellemző vonalak elkülönítésre alkalmas effektus. A reflektív iridofórákkal közel azonos időben jelennek meg a sárga xanthofórák. A 4-5. napon a pigmentsejtek, gyűjtőnéven kromatofórák már jellegzetes mintázatot alakítanak ki az egyedek szervezetében. A leginkább látható jelleg a testük oldalán megjelenő fekete csík. A következő stádium (midlarval – ML) a lárva és felnőtt kor között található. Ebben a korban megjelenik az úszók pigmentáltsága, valamint erősödik a test mintázata is. A harmadik stádium a felnőtt kor, ebben a korban az egyed pigment mintázata teljes, a sejtek helyzete, intenzitása és területi kiterjedése már nem változik. A felnőtt stádiumba történő átalakulás során az egyedek szervezetének pigmentáltsága jelentős változáson megy át, annak ellenére, hogy a korai korban már megjelent mindhárom pigmentsejt csoport.

2.6. A mutáns zebradánio vonalak bemutatása

A 'neural crest'-ben található sejtek pluripotens volta lehetővé teszi, hogy többféle sejt típussá differenciálódjanak az embrionális fejlődés során. Ezeket a folyamatokat transzkripciós faktorok irányítják (Kelsh és mtsai., 2000), melyek mutációi változatos pigment mutánsok kialakulásához vezet.

2.6.1. A *nacre* vonal bemutatása

A recesszív *nacre* (*nac*) zebradánio mutánsban a fekete melanofórák hiányoznak a bőrből (7. ábra), az iridofórák száma viszont megemelkedett. Ezt a vonalat az AB vonal N-etil-N-nitrozourea (ENU) mutagenézisével hozták létre (Lister és mtsai., 1999). A jellegzetes fenotípust létrehozó mutáns gént a melanofórák megjelenése alapján azonosították, mivel a *nacre* fenotípus nagyon hasonlít az egér *mikroftalmia* (*mitf*) lókuszt mutánsaihoz.



7. ábra: A fekete pigment mutáns *nacre* lárva és felnőtt egyed bőréből hiányoznak a melanofórák.

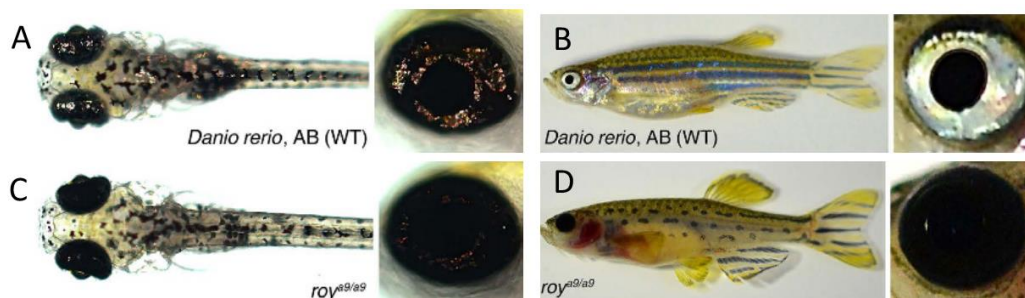
A három napos vad típusú (A) és *nacre* (C) lárvák, valamint a felnőtt vad (B) és *nacre* (D) egyedek szemében nincs különbség a pigmentáltságot tekintve. (Forrás: Antinucci & Hindges, 2016)

A mutagenézis következtében egy bázispáros nonszensz mutáció (C > T) jött létre a *mitf* mRNS szekvenciában, aminek a következménye egy korai stop kodon (CAA > TAA) és ez által egy csonka, nem funkcionális fehérjetermék.

A Nacre/Mitf nevű transzkripciós faktor ugyan nem szükséges a melanofórák termeléséhez és differenciálódásához, viszont a melanocyták életben maradásához nélkülözhetetlen (Dorsky és mtsai., 2000)

2.6.2. A *roy orbison* vonal bemutatása

A spontán létrejött *roy orbison* (*roy*) pigment mutánsban nem termelődnek reflektív pigmentek. Mivel a lárvák és a kifejlett egyedek szeméből is hiányoznak az iridofórák, nem csak a bőrukából ezért ez a recesszíven öröklődő fenotípus nagyon könnyen felismerhető (8. ábra).



8. Ábra: A reflektív pigment-hiányos *roy orbison* lárva és felnőtt egyede könnyen felismerhetők a szemük alapján.

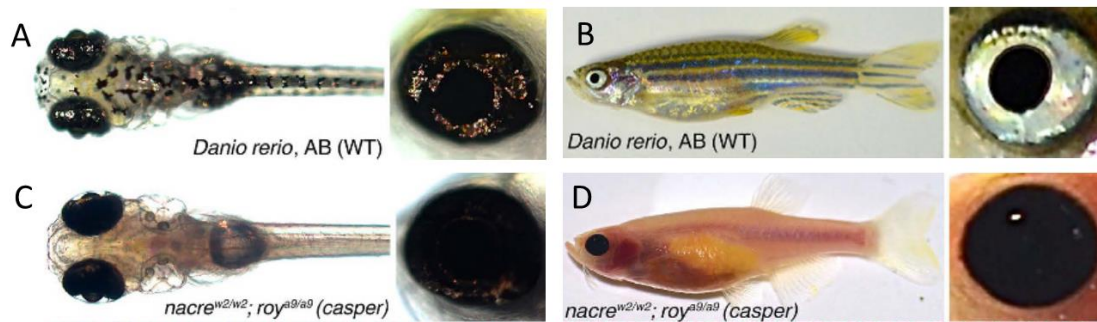
A *roy orbison* (C, D) vonal sajátossága, hogy a szervezetében nem termelődnek a reflektív pigmentek. A vad típusú (A, B) vonallal összehasonlítva, a szemben tapasztalható a legjelentősebb különbség, lárvák és felnőtt egyedek esetében is. (Forrás: Antinucci & Hindges, 2016)

A *roy orbison* mutáció molekuláris hátterét a közelmúltban fejtették meg (D'Agati és mtsai., 2017). A mutáns gén feltárásában segítséget jelentett egy hasonló fenotípust – *transparent*, *tra* - eredményező *mitochondrial inner membrane protein*, *mpv17* gén mutációjának korábbi leírása (Krauss és mtsai., 2013). Az iridofórák hiányát a *roy orbison* mutánsban egy 19 bázispáros deléción okozza a 2 és 3 exon közötti intronban, aminek a következménye egy rendellenes splicing és egy korai STOP kodon az *mpv17* mRNS-ben.

2.6.3. A *casper* vonal bemutatása

A *casper* egy dupla mutáns, pigmenthiányos zebradánio vonal, amelynek a szervezetében sem a melanofórák, sem pedig az iridofórák nem jelennek meg (White és mtsai., 2008) (9. ábra). Ez az átlátszó vonal a *nacre* és a *roy* homozigóta egyedeinek keresztezésével jött létre. Tehát a *casper* fenotípus csak úgy jelenik meg, ha mindkét gén mindkét allélja hordozza a mutációt (*nacre*^{-/-}, *roy*^{-/-}).

A *casper* létrehozása óta eltelt időben több ehhez hasonló vonalat hoztak létre, közöttük olyanokat is, amelyek szervezetében a három pigment sejt csoport közül egyik se termelődött, ilyen például a *ruby* vonal (White és mtsai., 2008). Azonban a teljes pigment hiányos vonal megalkotása időigényesebb és több forrást igényelne, és a kutatások többségét nem zavarja a sárga pigmentek jelenléte.



9. ábra: A vad típusú és *casper* mutáns egyedek összehasonlítása jól mutatja a pigmenthiányos fenotípus előnyeit.

(A) Vad típusú AB lárva (7 dpf); (B) Vad típusú felnőtt egyed; (C) *casper* mutáns lárva (7 dpf); (D) *casper* mutáns felnőtt egyed. A panelek jobb oldalán az adott egyedek szemei látszanak kinagyítva. A dupla mutáció miatt *casper* egyedek bőréből hiányoznak a fekete és reflektív pigment sejtek (C&D), de a szemből csak a reflektív iridofórák. Ezen tulajdonságukat már lárva korban detektálhatjuk. A *casper* vonal egyedeiben jól láthatóan egyesülnek a *nacre* és *roy orbison* mutánsok előnyei. (Forrás: Antinucci & Hindges, 2016)

A *casper* vonalat mi is azért választottuk, transzgén introgresszióknak alanyává, mivel a sárga pigmentek jelenléte az ivarszerv kutatásában szerintünk sem zavaró. A testtáj kültakarójában, amin keresztül az élő állatok ivarszerveit megfigyeljük, túlnyomó többségben fekete és reflektív pigment sejtek találhatók. Ezeknek a pigmenteknek a szerepe sokkal inkább jelentős. A fekete pigmentek miatt nem láthattuk bizonyos részeit a petefészeknek, a reflektív pigmentek pedig akadályozzák a fény átjutását a bőrön keresztül. A visszavert fény pedig a korábbiakban gondolt volumennél is nagyobb mértékben befolyásolja az általunk készített képek minőségét.

2.6.4. Korábban megalkotott ivarmegfigyelésre létrehozott vonalak

A zebradánió ivarszervének kutatására több vonal is rendelkezésre áll. Ezek közül léteznek olyanok is, amik pigment hiányos vonalba vittek be valamilyen transzgént, annak érdekében,

hogy az ivarszervekből érkező jelet vizsgálhassák (Presslauer és mtsai., 2016). Ők létrehoztak egy pigmenthiányos és transzgénikus vonalat, a *transparent (tra)* vonal és *tg[vasa-vasa:egfp]* konstrukció használatával, ami a See-Thru-Gonad nevet kapta. Mások szintén átlátszó vonalat alkalmaztak, viszont eltérő transzgént konstrukciót (a *tg[b-actin:egfp]*) juttattak be (Akhter és mtsai., 2016). Ennek hátránya, hogy a transzgén a *vasa-egfp*-t tartalmazó vonalaktól eltérően máshogy nyilvánul meg. A vonal a *b-roy* nevet kapta. Ennek a két vonalnak a létrehozása meglehetősen hosszadalmas folyamat volt, a szelekciós eljárás, amit alkalmaztak nem volt elég korai és hatékony.

A fentiek alapján a célkitűzésem egy olyan transzgénikus átlátszó vonal megalkotása volt, amiben a transzgén jelenléte már az egyedfejlődés korai szakaszától nyomon követhetővé válik. Ehhez ki kellett dolgoznom egy olyan szelekciós eljárást, amivel a fenti vonalat az eddigieknél gyorsabban és hatékonyabban hozhattam létre. Ezzel az eljárással a mi újonnan létrehozott vonalunkon kívül, más hasonló zebradánió vonalat is hatékonyan ki lehet majd alakítani.

3. Anyag és módszer

3.1. A halak származása

Az AB (vad típusú házasított, nem transzgénikus zebradánió) vonalunkat két helyről szereztük be, az ELTE és a MATE (volt SzIE) laborjaiból. Előbbiben Varga Máté, utóbbiban Csenki-Bakos Zsolt segített minket hozzá, ahhoz, hogy megkapjuk a halakat. A *tg[vasa::egfp]* vonalat szintén Csenki-Bakos Zsolt bocsátotta a rendelkezésünkre, gödöllői zebradánió laboratóriumából.

3.2. A halak tartási körülményei

A halakat a nemzetközi laboratóriumokban érvényben lévő sztenderd protokollok (Aleström és mtsai., 2020) alapján neveltük 28 Celsius fokos hőmérsékleten, 70%-os páratartalomnál és 14 óra világos - 10 óra sötét fényciklussal. Az Aquaneering Aquatic Housing (San Diego, Kalifornia, USA) zárt, re-cirkulációs rendszerünk a legkorszerűbb, moduláris rendszerek közé tartozik, 1.4, 2.8, 6 és 9 literes tartályokkal (**10. ábra**). Ezen a rendszeren az elhasznált víz mechanikai, kémiai és biológiai szűrőkön tisztult meg, UV-kezelésen esik át, és úgy kerül vissza a halakhoz. A párolgás okozta szintcsökkenést reverz ozmózissal szűrt (RO) vízzel pótoljuk, majd naponta 10%-os vízcserét végzünk.

Az egyedeket a nemzetközi szakirodalom alapján tartottuk, 5-6 egyed/liter sűrűségben. Az ilyen sűrűségben tartott egyedek már a nagyobb korosztályhoz tartoztak. A fiatalabb állományt 7-11 egyed/liter sűrűségben tartottuk (1.5-4 hónapos).



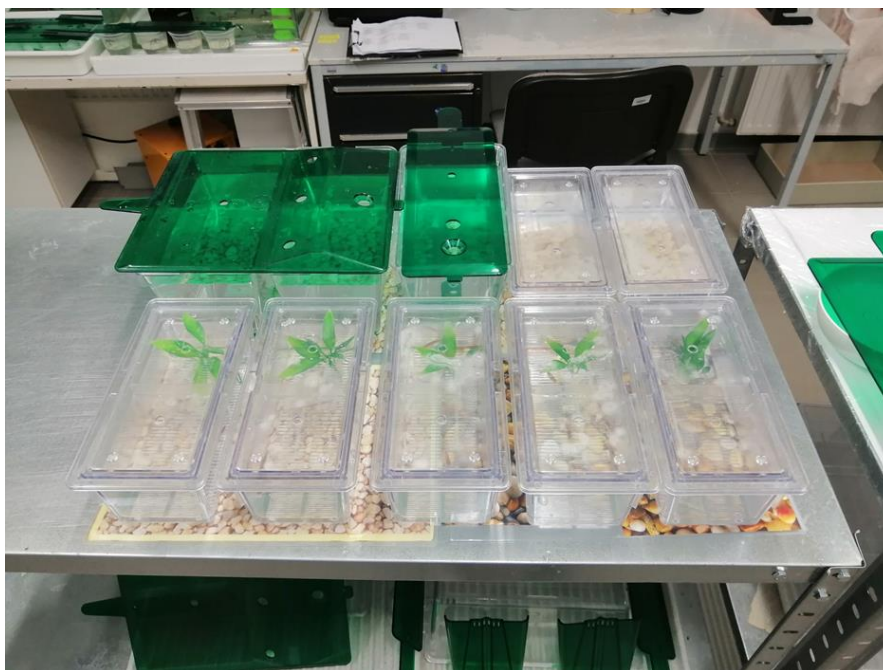
10. ábra: A haltartó rendszer. A moduláris haltartó rendszer polcain különböző térfogatú tartályokat tudtunk elhelyezni. A recirkulációs elven működő rendszer a saját vizét keringette, a víz eközben több tisztítási lépésen átesett, mire visszajutott a tankokba.

A halak takarmányozása során az elsődleges szempont a testméretük és koruk meghatározása. Ez alapján állítottuk össze az egyes korcsoport számára az ideális táplálékot, amely különböző szemcsenagyságú és összetételű tápból és élő sósókból (*Artemia salina*) áll. A lárvákat a korai életszakaszukban még porral takarmányoztuk. Ekkor az élő tápot még nem képesek felvenni. A mennyiséget az egyes edényekben lévő egyedek száma alapján

változtatjuk. A növekedésükkel párhuzamosan növeljük a tápok méretét, illetve az egy egyedre számított takarmány mennyiségét.

3.3. A halak szaporítása és az ivadékok gondozása

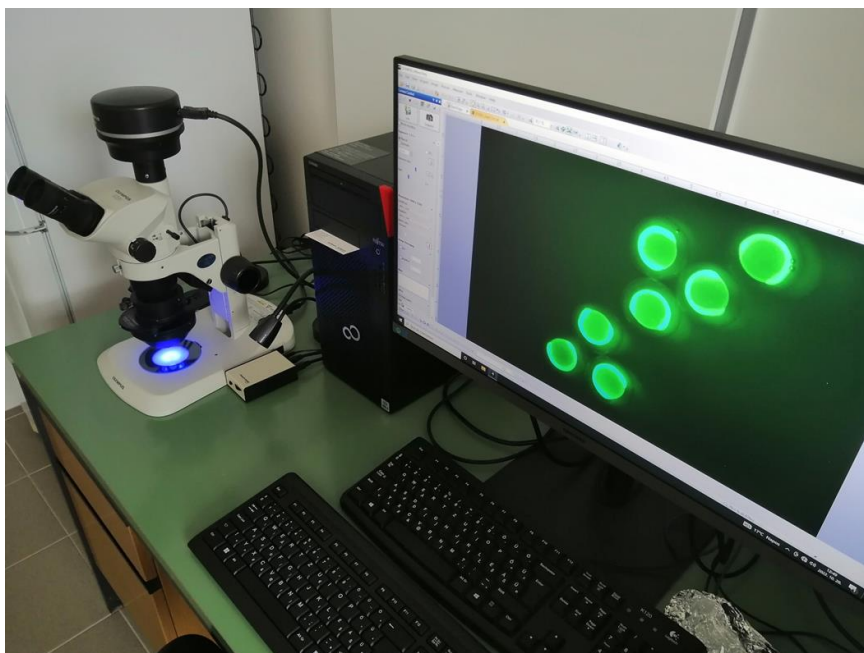
A tenyész állományt csoportosan vagy párokban szaporítottuk az erre a célra kialakított edényekben. Annak érdekében, hogy indukáljuk az ivást többféle környezetgazdagítási módszert alkalmaztunk: kavicsmintájú aljzatot helyeztünk az ivatókádak alá, műnövényt szúrtunk a belső elemre. Magukat a tartályokat is úgy alakították ki, hogy az egyik oldala sekélyebb. Ezekkel mind a természetes életterének modellezését érhetjük el, növelve a megtermékenyítés sikerét (**11.ábra**). A zebradánió írásában nagy szerepe van továbbá a reggel fokozatosan erősödő fénynek. Éppen ezért a szobában lévő lámpák fokozatosan kapcsolnak fel. Reggelente - amennyiben szükséges volt, azaz nem adtak ikrát a csoportok vagy párok - az ivatókádakba hideg hipo-ozmotikus vizet öntöttünk ezzel imitálva a trópusi esőt. A megtermékenyült ikrákat begyűjtöttük és Petri csészében tartottuk, 28 °C-os inkubátorban. A vizükhöz literenként 1 csepp 25 mg/mL koncentrációjú metilénkékét adagolva gátoltuk a gombák korai felszaporodását. Naponta eltávolítottuk az életképtelen embriókat és a kelést követően az ikraburkokat is. Az első öt nap során az embriók a szikzacskóban lévő tápláló anyaggal képesek túlélni, a benne lévő táplálék megfelelő összetételű a számukra. Amint az egyedek elérték az öt napos kort (dpf, azaz 'days post-fertilization'), nagyobb edényekbe kerültek és megkezdtek a takarmányozásukat. Az etetést <100 µm szemcseméretű táppal kezdtük. A táp szemcseméretét az egyedek növekedésével változtattuk. A rendszerre az egyedek 10 dpf-es korban kerültek, attól függően, hogy mekkora volt az egyedszám, 1.4 és 2.8 literes tartályba. Az élő táppal történő etetést a második héten kezdtük el. Az etetésre sórák (mikroartémia) frissen kikelt és lefejtett lárváit használtuk. A halak naponta testsúlyuk 3-5%-ának megfelelő súlyú táplálékot kaptak, ez volt az a mennyiség, ami a növekedésüknek megfelelő.



11. ábra: Keresztezéshez előkészített zebradánio szülőpárok.
A kavicságyat imitáló aljzat és a műnövények a környezetgazdagítást szolgálták.

3.4. A transzgénikus egyedek mikroszkópos szexálása

A zebradánio kifejlett egyedeinél az ivari dimorfizmus jól látható (**1. ábra**), azonban az egymásfél hónapos ivadékoknál még nincsenek ilyen vizuálisan detektálható különbségek a két nem képviselői között. Szerencsére mi a kísérleteinket egy olyan transzgénikus vonallal (*tg[vasa::egfp]*; 2.4. szekció) végeztük, melyben a riporter gén a hím és női ivarszervben viszonylag korán eltérő mennyiségben termelődött. Az egyedeket egy Olympus SZF61 típusú sztereomikroszkóppal szexáltuk, melyre a BLS Kft. fluoreszcens adapterét és egy hűtött digitális kamerát (DP74, Olympus) szereltünk fel. Ezt a munkaállomást egy PC és az arra feltöltött Stream Start szoftver segítségével vezéreltük. Így egy drága fluoreszcens mikroszkóppal ekvivalens olcsóbb eszközt raktunk össze, melynek segítségével a megfelelő hullámhosszú kék fénnel megvilágított egyedek ivarszervéből detektálható Egfp jelet egy monitoron, élőben tanulmányozhattuk és arról nagy felbontású képeket készíthettünk (**12. ábra**).



12. ábra: A mikroszkópos szexálás munkaállomása.

Bal oldalt a fluoreszcens feltétell és hűtött digitális kamerával felszerelt sztereomikroszkóp, középen a számítógépes vezérlő állomás, míg jobb oldalt a monitoron transzgenikus ikrák képei láthatók.

A szexáláshoz az egyedeket a vizükbe cseppentett szegfűszeg olajjal (2-3 csepp/L) bódítottuk el. Az ehhez szükséges olaj mennyisége és bódítás időtartama korcsoportonként és testtömegenként eltérő volt, tipikusan 1-2 percig tartott. A bódítást akkor tekintettük megfelelőnek, amikor az egyedek elfordultak az oldalukra, már egyáltalán nem mozogtak. Ekkor átkerültek egy Petri csészébe, mely egy hígabb szegfűszeg olajos oldatot tartalmazott. Erre azért volt szükség, mivel az egyedeket csoportosan emeltük ugyan ki a tartályukból, de a mikroszkóp alá kevés halat tudtunk betenni. Ez idő alatt viszont fenntartottuk a bódított állapotot azoknál az egyedeknél, akiket a későbbiekben szexáltunk. A kísérlet céljától, illetve halak méretétől függően egyszerre egy vagy több egyedet vizsgáltam, róluk képeket készítve. Az egyedek a mikroszkóp alól kikerült, szexált egyedek egy ún. 'ébresztő oldatba' kerültek, amely már nem tartalmazott szegfűszeg olajat.

3.5. Genomi DNS izolálása

A transzgén jelenlétét, illetve annak kópiaszámát a kérdéses egyedek genomi DNS-én végzett polimeráz láncreakción (PCR) alapuló tesztekkel vizsgáltuk. A genomi DNS izolálásához a felnőtt hímek esetében bódítást követően a farokúszóból vágtunk le ollóval

egy 3-4 mm²-es darabot, melyet 70 ml Chelex oldatba helyeztem. A genomi DNS-t gyors kezeléssel szabadítottam fel (Yue és Orbán, 2001), majd közvetlenül ebből az oldatból végeztem a PCR-es tesztet. A megmintázott egyedeket a PCR tesztek időtartama alatt egyedileg tartottam, és a teszt eredményének ismeretében tartottam meg (pozitív minták) vagy altattam el (negatív minták).

A transzgén kópiaszámának meghatározásához a kérdéses tenyészegyedeket vad típusú partnerrel kereszteztem. Az így létrehozott embriókból, illetve lárvákból 5-10 dpf-es korban túlaltatást követően 8-20 teljes egyedeket gyűjtöttünk. A PCR-es tesztekhez a genomi DNS templátot a farokúszóknál leírt módszerrel izoláltuk.

A nagyhatékonyságú szekvenáláshoz a genomi DNS izolálását klasszikus fenol-kloroformos eljárással izoláltuk (Yue & Orban, 2001). A minták minőségét 0,6%-os agarózban és TBE pufferben végzett gélelektroforézissel ellenőriztem, majd felhasználásig 4 °C-on tároltam őket.

3.6. A transzgén jelenlétének, illetve kópiaszámának kimutatása PCR-alapú tesztekkel

A polimeráz láncreakció (PCR) egy olyan eljárás, amellyel DNS szakaszokat lehet felsokszorozni. A PCR reakciót a következő komponensekből állítjuk össze: 10X PCR puffer, víz, nukleotidok (dNTP), magnézium, primerek és Taq polimeráz enzim. Ebben a PCR reakcióban olyan primereket használtunk, melyek a transzgén szekvenciájára tapadtak fel (EGFP3-F1 5' ACC ACA TGA AGC AGC ACG ACT 3' T_M 61 °C ; EGFP2-R1 5' CTT CTC GTT GGG GTC TTT GC 3' T_M 58 °C) és arról 415 bázispár hosszúságú terméket amplifikáltak (a transzgén hiányában a vad típusú zebradánió genomról nem keletkezett termék). Az úgynevezett 'Master Mix' a fenti komponenseket a következő térfogatban és koncentrációban tartalmazta: 2 uL 10X PCR puffer (Thermo Fisher Scientific), 2 uL MgCl₂ (25 mM), 0,2 uL 'forward' primer (10 uM), 0,2 uL 'reverse' primer (10 uM), 0,4 uL dNTP mix (10-10 mM), 0,2 uL Taq polimeráz (5U/uL, Thermo Fisher Scientific) és 10 uL víz. Ebből az oldatból a PCR csövekbe pipettáztam 15-15 uL-t, majd egyenként hozzájuk adtam 5-5 uL DNS templátot. A PCR-es felsokszorozást az Analytik Jena GmbH cég Biometra TAdvanced típusú készülékén végeztük a következő hőmérsékleti profillal: kezdeti denaturáció ('denaturation') 95 °C 5 percig; 30 cikluson ismétlődve - denaturáció 95 °C 1

percig; primerek kötődése ('annealing') 52 °C 20 másodpercig; lánchosszabbítás ('extension') 68 °C 20 másodpercig; végső lánchosszabbítás 68 °C 5 percig.

A teljes PCR termékeket (20 uL) 2%-os agarózban és TBE pufferben végzett gélelektroforézissel választottam el, a New England Biolabs 100 bp-os markerét használva molekulasúly sztenderdként. A gélekről Uvitec Cambridge Essential típusú készülékkel készítettem digitális képeket.

4. Eredmények és megbeszélésük

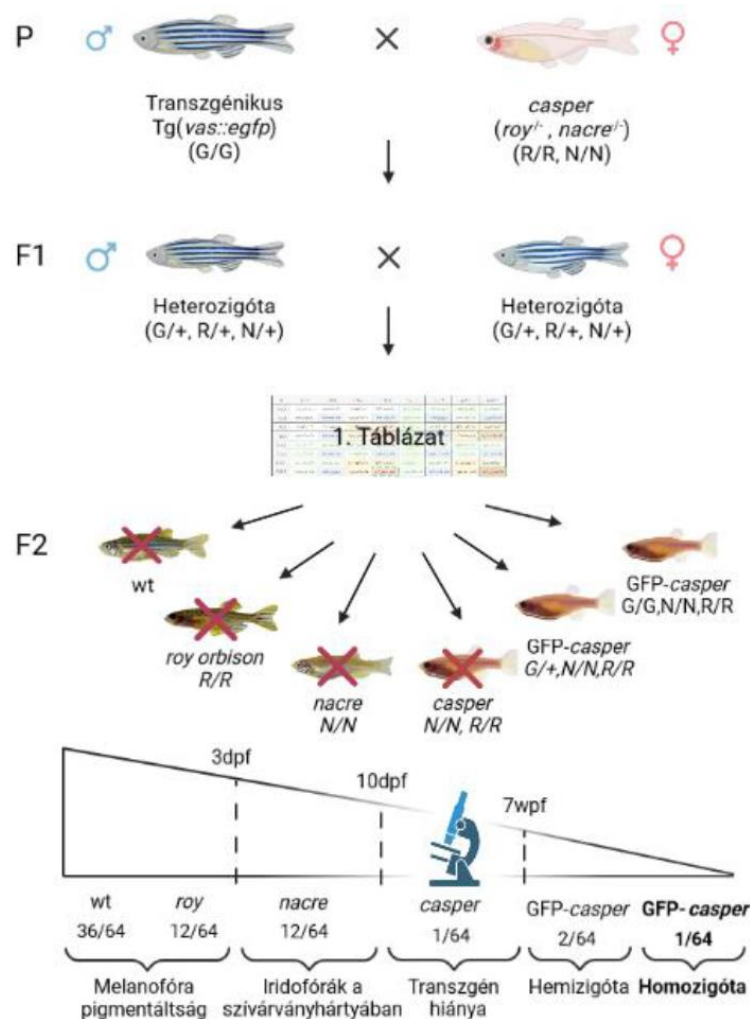
4.1. A szelektálandó egyedek létrehozása többlépcsős keresztezésekkel

A vonal előállításának első lépéseként kiválasztottam azokat az egyedeket, amelyek keresztezésével kívántam létrehozni az új, átlátszó transzgenikus zebradánió vonalat. Az alapító keresztezéseket több alkalommal is elvégeztem.

A transzgént a *casper* fenotípusba kívántuk bejuttatni, ezért a P generációban *casper* tenyészegyedeket kereszteztem homozigóta transzgenikus *tg[vasa::egfp]* vonalból származó halakkal (**13. ábra**). Az ivatások során mindkét oldalról használtam hímeket és nőstényeket is. Az ivarokat mikroszkópos szexálással különítettem el, jelen és későbbi generációk szaporításánál egyaránt.

Az F1-es generációban az állomány genotípusára nézve egységes volt (**13. ábra**), hiszen minden egyedben mindkét pigment gén heterozigóta formában, míg a transzgenikus konstrukció hemizigóta formában - azaz sejtenként egy kópiában - volt jelen. Ez eredményezte azt, hogy az egyedek fenotípusukra nézve is egységesek voltak: vad típusú volt a színük és csíkozatuk, és a transzgén minden egyedben egyetlen kópiában volt jelen. Ezeket az egyedeket ivarérésüktől kezdve szaporítottam. Az ivatásukat kezdetben páronként végeztem, mivel ekkor még nem állt a rendelkezésemre annyi egyed, hogy csoportosan is szaporíthassam őket. Amint az egyedek nagy részénél tapasztaltam az ivarérés jeleit, csoportos ivatásokat is végeztem. Az F1-es generáció egyedeinek szaporításából több mint 4000 ikrát állítottam elő. Ezeket az utódokat szelektáltam egyedenként a későbbiekben.

Az F2-es generációban a fenotípus és a transzgén kópia száma is szegregált. A fenotípusos szelekciót követően a transzgén kópia számának meghatározása érdekében olyan szaporításokat is végeztem, ahol a szelektált *casper* fenotípussal rendelkező egyedeket AB partnerekkel kereszteztem.



13. ábra: A keresztezés és szelekció tervezett folyamatábrája.

A homozigóta transzgénikus és homozigóta *casper* szülők keresztezésével egyöntetű F1-es állományt alakítottam ki. Ezen F1-es hibridek összekeresztezésével hoztam létre az F2 generációt, ahol a transzgén, a mutáns ill. vad allélek 64 különböző genotípusba szegregáltak (lásd 1. táblázat). Az utódok közül a kívánt végcél, azaz a homozigóta transzgénikus *casper* fenotípusú egyedeket több lépcsős, fenotípuson és genotipizáláson alapuló szelekcióval választottam ki. Jelölések: Allélek: plusz (+) - vad típusú; G – *vas::egfp* transzgén; N – *nacre* ; R – *roy orbison*.

4.2. A fenotípusos szelekció lépéseinek optimalizálása az eltérő pigmentáltságú egyedek korai kiválasztása céljából

Az F2-es generációban a genotípusok szegregáltak, 64 különböző variációt és négyféle fenotípust hozva létre (1. táblázat). Ha a *roy* illetve *nacre* mutációt okozó allélek homozigóta formában voltak jelen, ezek a fenotípusok jelentek meg. Azokban az esetekben, ahol mindkét mutáció homozigóta recesszív formában jelen meg, felbukkant a *casper*

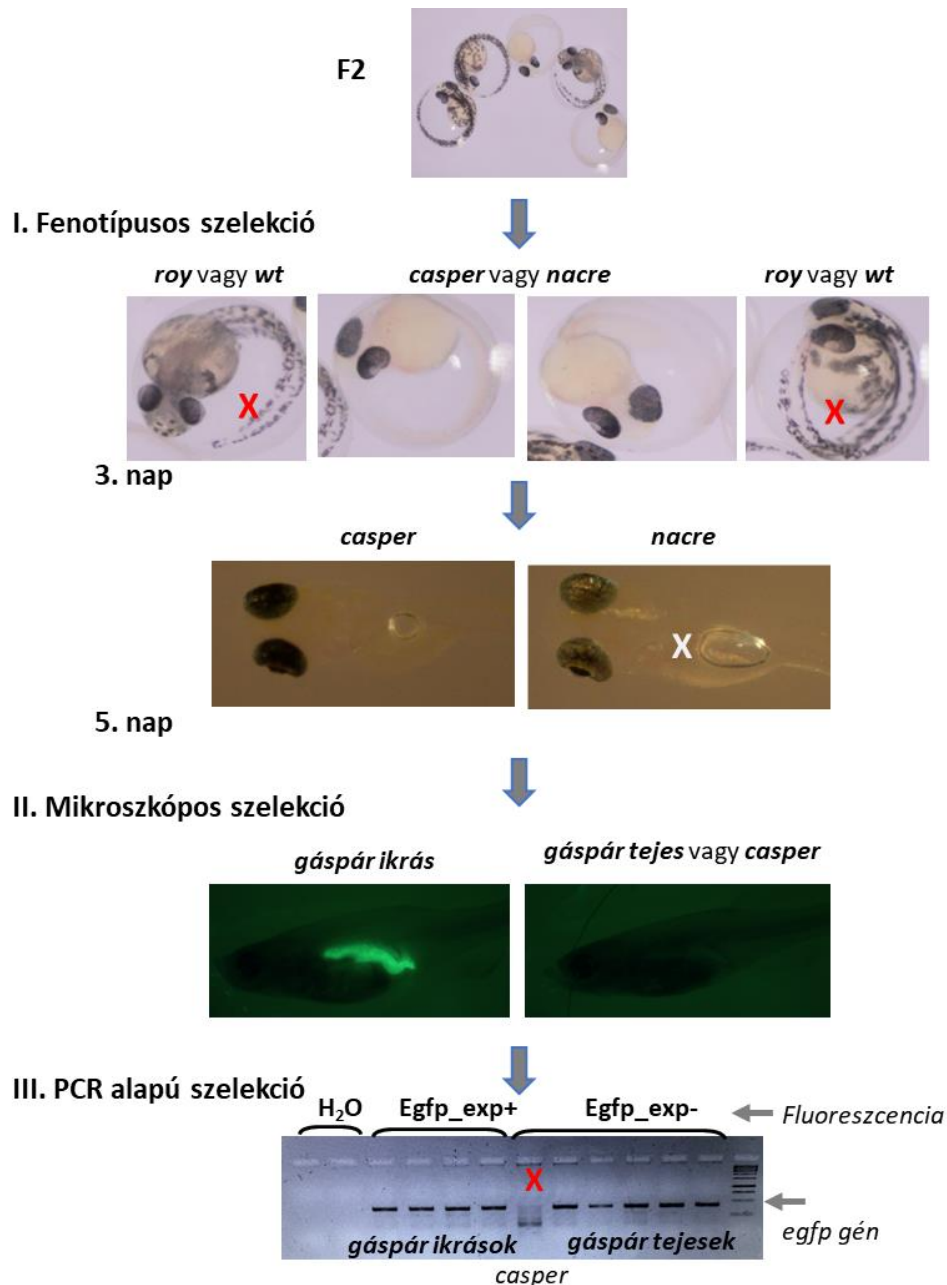
fenotípus. Minden más esetben a halaknak vad fenotípusuk alakult ki, ezen egyedek aránya volt a legnagyobb az F2-es generációban (**1. táblázat**).

1. táblázat: Az F2-es egyedek szelekciós sémája a geno- és fenotípusok alapján

F1	+,+,+	+,+,R	+,N,+	+,N,R	G,+,+	G,+,R	G,N,+	G,N,R
+,+,+	+/+,+/+,+/+	+/+,+/+,+/R	+/+,N/+,+/+	+/+,N/+,R/+	G/+,+/+,+/+	G/+,+/+,R/+	G/+,N/+,+/+	G/+,N/+,R/+
+,+,R	+/+,+/+,R/+	+/+,+/+,R/R	+/+,N/+,R/+	+/+,N/+,R/R	G/+,+/+,R/+	G/+,+/+,R/R	G/+,N/+,R/+	G/+,N/+,R/R
+,N,+	+/+,N/+,+/+	+/+,N/+,R/+	+/+,N/N,+/+	+/+,N/N,R/+	G/+,N/+,+/+	G/+,N/+,R/+	G/+,N/N,+/+	G/+,N/N,R/+
+,N,R	+/+,N/+,R/+	+/+,N/+,R/R	+/+,N/N,R/+	+/+,N/N,R/R	G/+,N/+,R/+	G/+,N/+,R/R	G/+,N/N,R/+	G/+,N/N,R/R
G,+,+	G/+,+/+,+/+	G/+,+/+,R/+	G/+,N/+,+/+	G/+,+/+,N/+	G/G,+/+,+/+	G/G,+/+,R/+	G/G,N/+,+/+	G/G,N/+,R/+
G,+,R	G/+,+/+,R/+	G/+,+/+,R/R	G/+,N/+,R/+	G/+,N/+,R/R	G/G,+/+,R/+	G/G,+/+,R/R	G/G,N/+,R/+	G/G,N/+,R/R
G,N,+	G/+,N/+,+/+	G/+,N/+,R/+	G/+,N/N,+/+	G/+,N/N,R/+	G/G,N/+,+/+	G/G,N/+,R/+	G/G,N/N,+/+	G/G,N/N,R/+
G,N,R	G/+,N/+,R/+	G/+,N/+,R/R	G/+,N/N,R/+	G/+,N/N,R/R	G/G,N/+,R/+	G/G,N/+,R/R	G/G,N/N,R/+	G/G,N/N,R/R

Jelölések - Allélek: plusz (+) - vad típusú; G – *vas::egfp* transzgén; N – *nacre* ; R – *roy orbison*. Színkódok: kék - homozigóta *roy*; sárga - homozigóta *nacre*; barna - homozigóta *casper*; barna szaggatott zöld vonal - GFP-*casper* hemizigóta; barna folytonos zöld vonal – GFP-*casper* homozigóta. (Az alléleket a könnyebb láthatóság miatt jelöltem nagybetűvel.)

A fenotípusos szelekció alapját a pigmentek fokozatos termelődése és megjelenése jelentette a különböző vonalakban. A fekete pigmentek megjelenése után szelektáltam a *roy* és vad fenotípusú egyedeket, mivel ezekben a vonalakban a melanofórák megtermelődnek, és ez akár szabad szemmel is jól látható. Ezután a reflektív pigmentet nem tartalmazó *casper* fenotípusos egyedek szelekcióját végeztem el (**14. ábra**).



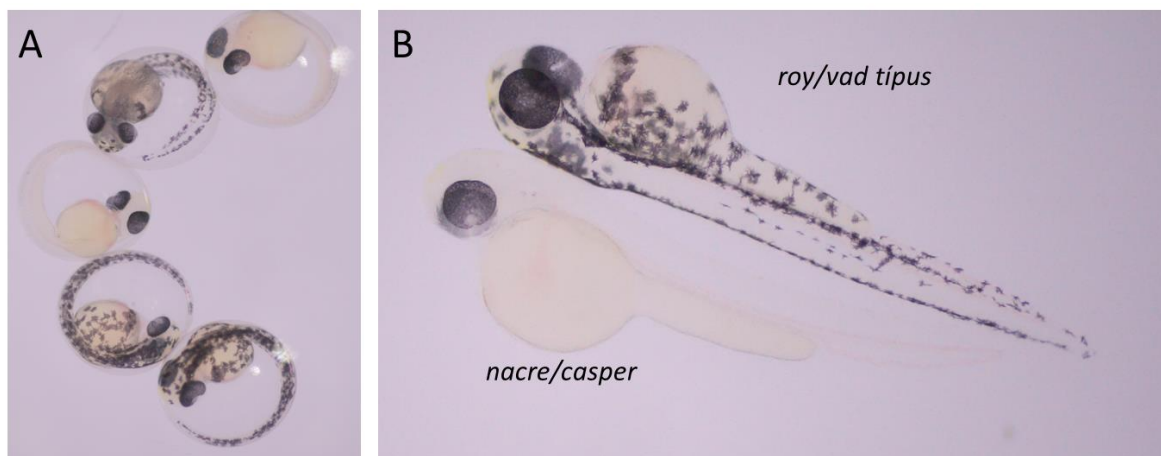
14. ábra: A szelekció menetét ábrázoló folyamatábra.

A nagyon korai (3 és 5 dpf) fenotípusos szelekció lehetővé tette a vizsgált F2-es egyedek számának drasztikus csökkenését, ezáltal hatékonyá téve a folyamatot. A transzgén jelenlétének detektálására szolgáló mikroszkópos és PCR-es teszteket ezáltal sokkal kevesebb egyeden kellett végrehajtani.

4.2.1. Fekete pigmentációra történő szelekció

A fekete pigmentek jelentek meg az egyedekben a legkorábban, 2 dpf-es korban. A vonalakban már a kelést megelőzően megfigyelhető a fekete pigmentek jelenléte, a test egész felületén. A kelést megelőzően a *roy* és vad vonalak kiválasztását és elkülönítését kezdetben mikroszkóp segítségével végeztem. A későbbiekben tökéletesített, és jelenleg használt

protokoll alapján azonban a vonalak kiválasztása szabad szemmel történt, mikroszkópos megfigyelést csak ellenőrzésként használtam, ugyanis nem mindegyik egyed esetében volt egyértelmű a pigmentek jelenléte. Az egyedek egy része ebben a korban már kikelt (**15. ábra**). Ekkor még a mozgásuk nem aktív igazán, így ezeknek az lárváknak a szelekciója nem időigényesebb, mint az embriók esetében. Későbbi időpontban történő szelekcióval is próbálkoztam, ebben az esetben a mozgás jelentős lassító tényező volt, ezért döntöttem a korábbi szelekció mellett.



15. ábra: A fekete pigmentet nem termelő fenotípusok már 2 dpf-es korban jól láthatóak.

Ebben a korban az egyedek egy része még az ikraburokban van (A), egy kisebb részük kikelt (B). Az (A) képen a fekete pigmentet termelő (*wt*, *roy*) és nem termelő (*nacre*, *casper*) vonalak látszódnak. A (B) képen a felső egyed a *roy/wt* vonalba tartozik, az alsó a *nacre/casper* vonalba. A további egyedek megkülönböztetése a reflektív pigmentáltság alapján ekkor még nem lehetséges.

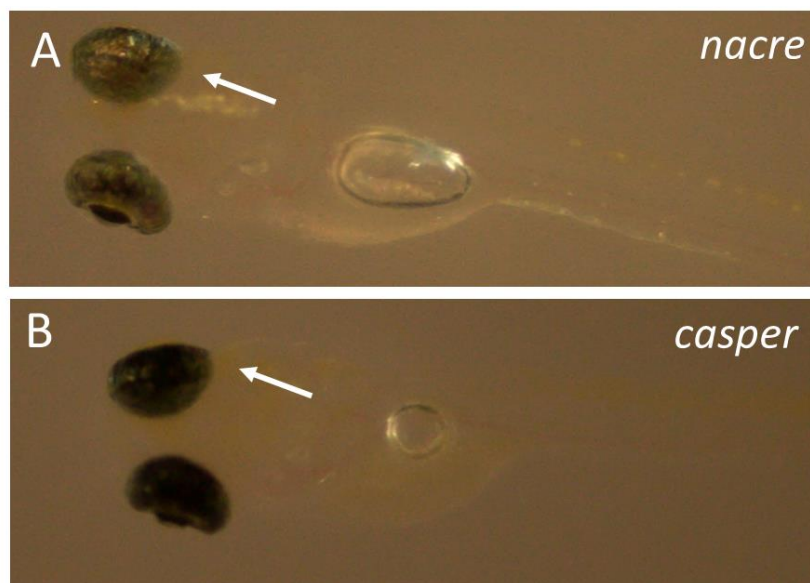
Az F2-es generációban több, mint 2700 *roy* és *vad* fenotípusú egyedet szelektáltam (**2. táblázat**). Ezeket az halakat fényképezés céljából a reflektív pigmentek megjelenéséig tartottam. Ezután szegfűszeg olajat tartozó oldatban túlaltattam őket. A korai szelekció egyik előnye az, hogy azok az egyedek, amelyekre nem volt szükség nem kerülnek fel a rendszerre, ugyanis a limitált kapacitás miatt ilyen számú egyed jelentősen leterhelné azt.

2. táblázat: Az F2-es generáció szelekciója adatainak összegzése

Ivatás időpont	Ikraszám	roy és vad típus egyedszám	A szelekció 1. lépése		2. lépése
			nacre és casper egyedszám	nacre egyedszám	casper egyedszám
05/04	64	47	17	15	2
05/05	30	19	11	10	1
05/10	429	321	108	77	31
05/17	360	269	91	74	17
05/24	500	300	200	172	28
05/25					
05/31	150	327	43	30	13
06/01	220				
06/16	200	155	45	30	15
06/17					
07/04	500	240	195	155	40
07/05					
07/13	200	169	31	20	11
07/21	400	300	100	75	25
08/10	200	300	100	80	20
08/11	200				
08/19	200	160	40	30	10
08/22	200	150	50	30	20
09/05	300	180	120	90	30
10/03	200	140	60	40	20
Összesen	4353	3077	1211	928	283

4.2.2. A reflektív pigmentációra történő szelekció

A melanofórákat nem tartalmazó vonalak további szelekcióját a reflektív pigmentek termelődés után végeztem el. Az előző szelekció során megmaradt lárvák fenotípusukat tekintve, a *nacre* és *casper* vonalba tartoznak. A *nacre* vonalban a reflektív pigmentek a harmadik napon kezdenek el termelődni. A fekete pigment alapú szelekciós lépéssel ellentétben az egyedek szervezetében a reflektív pigmentek ebben a korban még csak a szemben detektálhatóak jelentős mennyiségben (**16. ábra**). Az halak szemének megkülönböztetésére kidolgozott szelekció során sikerült elkülönítenem a *casper* fenotípusú egyedeket, a *nacre* mutánsoktól. Az egyedek ezen szövetében megjelenő reflektív pigmentek szabad szemmel való detektálása nem volt lehetséges. Ekkor a lárvák testmérete még olyan kicsi volt, hogy a szemükben megcsillanó fényt - a reflektív pigmentek fényvisszaverése miatt – csak mikroszkópos megfigyelésekkel tudtam detektálni.



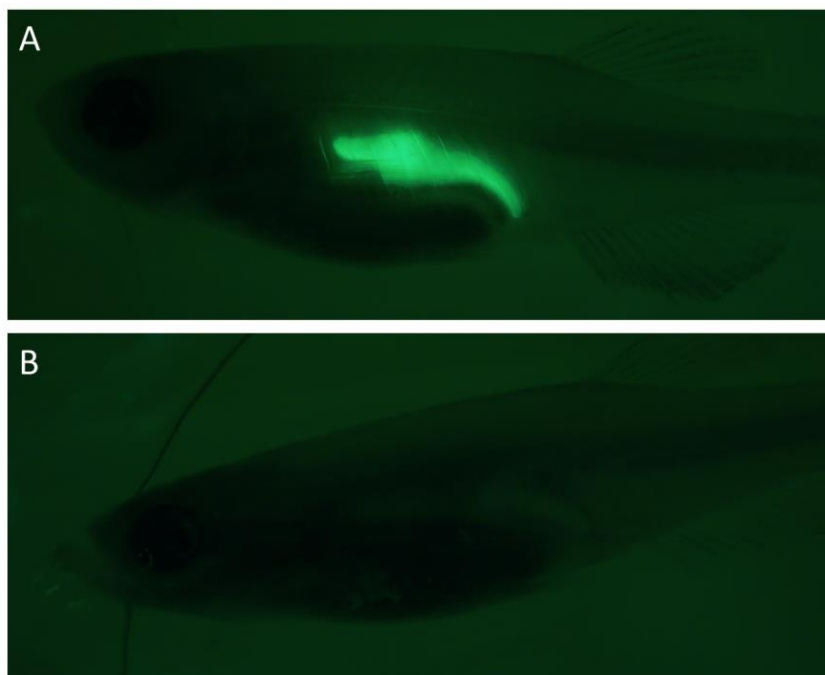
16. ábra: A reflektív pigmentet nem termelő, *casper* fenotípusú egyedek megkülönböztetése a *nacre* mutáns egyedektől.

A reflektív pigmentre történő szelekció az egyedfejlődés harmadik napján történt. A *nacre* (A) egyedek szemében a reflektív pigmentek termelődni kezdenek, a *casper* (B) egyedek szemében ezeket a sejteket nem fedezhetjük fel, ez jelenti a szelekció alapját.

A *casper* vonal szelekciója során fokozatosan alakítottam az eljárást, amit jelenleg is használok. Az egyedek szelektálására egy sztereómikroszkópot használtam. A szelekció során az egyedeket egy Petri csészében vizsgáltam meg, a reflektív pigmentek jelenlétére. A folyamat során alacsony vízszintben tartottam a lárvákat. A vízszintet azért állítottam be így, mivel ezzel csökkenthettem az egyedek mozgásterét. Ebben a korban egyes lárvák mozgása ugyanis rendkívül gyors és cikázó. Az egyedek nem egyenlő aktivitást mutatnak, azonban jelentős részük már mozog. Az halakat a mikroszkóp alatt legtöbbször felülről láttam, így a *nacre* vonal szemében megjelenő sejteket ebből a szögéből kellett felismernem. Az egyedeket egyesével vizsgáltam meg a szelekció során. Az első szelekciós lépés után megmaradó 1200 fekete pigmentmentes egyedből, a *casper* fenotípusú halak száma több, mint 250 volt (2. táblázat).

4.3. A pigmenthiányos, transzgénikus egyedek azonosítása mikroszkópos szexálást követő PCR teszttel

A *casper* egyedeket már korai fejlődési állapotban a pigmentáción alapuló szelekció után teszteltem fényképezéssel, hogy a Egfp jel meglétét vagy hiányát detektálhassam. Ezzel nyomon tudtam követni az ivarszervek fejlődését, és a különböző vonalakba tartozó egyedek Egfp jelének intenzitását is meg tudtam állapítani (17. ábra).

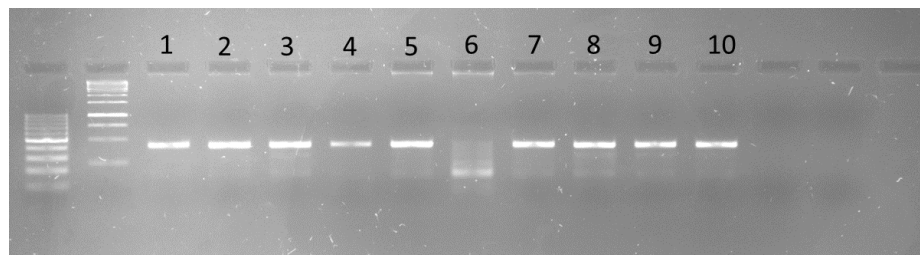


17. ábra: Az Egfp jelre nézve pozitív (A) és negatív (B) egyedek megkülönböztetése mikroszkópos szexálással. A pozitívok kiszűrése révén kevesebb egyedet kellett PCR-rel tesztelni.

Azokat az egyedeket, amelyekben detektálni tudtam az Egfp fehérje fényét, kiválasztottam. Ezzel a módszerrel a transzgént expresszáló nőstényeket tudtam azonosítani. A transzgenikus *casper* egyedek lárva korban megjelenő Egfp jele, jelentősen intenzívebb volt, mint a vad vagy *roy* vonalakban, mert a pigmentáció már ebben a fejlődési stádiumban is negatívan befolyásolta a képződő ivarszervek megfigyelését. A *casper* és *nacre* fenotípusú egyedek Egfp jelének intenzitása ebben a korban még nem különbözött. A reflektív pigmentek megjelenése az ivarszerv környékén még nem annyira jelentős, hogy zavaró tényezőként legyen jelen.

Mivel a transzgenikus egyedek közül az ivaruk és fejlődési állapotuk miatt egyesek nem expresszálták az Egfp transzgént, ezért a következő lépésben ezeket az egyedeket kellett azonosítanom, amelyekben a transzgén nem nyilvánult meg. Erre egy olyan PCR tesztet használtam, mely a transzgén jelenlétét mutatta ki a genomból. A transzgén eltérő kópia számban lehetett jelen az egyes egyedekben: a transzgén nem volt jelen (1/4), egy (2/4), vagy két (1/4) kópiában volt jelen. A PCR teszt az utóbbi két csoportot egyaránt pozitívnak mutatta.

Az eddigi munkám során ezzel a módszerrel eddig ~30 egyedet vizsgáltam meg. Ezek közül ~20 egyed volt pozitív (**18. ábra**). A mikroszkópos és PCR tesztelések jelenleg is zajlanak. Ezeket a vizsgálatokat a két wpf korú egyedeken kezdtem, mert ebben korban már sok egyedben megmutatkoztak az ivarok közötti különbségek. Ezzel vizsgálattal sajnos csak azt tudtam megállapítani, hogy a transzgén jelen van-e a szervezetben, annak kópia számát nem tudtam azonosítani.



18. ábra: A transzgén kimutatása casper egyedekben PCR tesztel.

Ez a PCR a transzgén jelenlétét tudta kimutatni, de a kópiaszámot nem. Minták a gélen balról: 100 bp-os molekulásúly marker, 1 kb-os molekulásúly marker, majd a minták 1-10-ig számozva, valamint két negatív control. A 6. egyed kivételével az összes többi transzgénikus pozitívnak bizonyult.

4.4. A transzgén kópiaszámának meghatározása az átlátszó transzgénikus F2-es egyedek utódaiban

A transzgénikus *casper*-ek azonosítását követően az egyedekben lévő transzgén kópia számát határoztam meg. A kópia szám meghatározásához, ezeket a halakat páronként vad típusú, transzgén-mentes partnerekkel kereszteztem és az utódokat vizsgáltam meg a transzgén jelenlétére. A transzgént két kópiában tartalmazó, homozigóta transzgénikus *casper* egyedek minden utódjukba, míg az egy kópiás, hemizigóta *casper*-ek csak utódjaik felébe örökítették át a transzgént.

Eddig már három egyed utódait sikerült PCR-rel tesztelnem. Két egyedet hemizigótaként azonosítottam a transzgénre, majd a harmadik teszt során megtaláltam az első nőtényt, akinek genomjában a transzgén két kópiába van jelen. A transzgénikus *casper* egyedek további vizsgálata jelenleg is folyik.

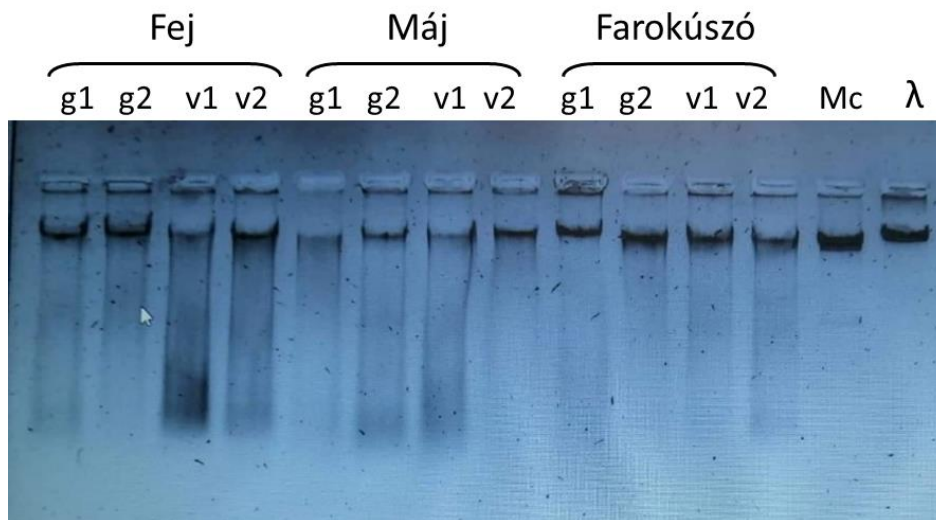
A transzgént két kópiában hordozó – ún. homozigóta transzgénikus – egyedek közül azok, amelyek a *casper* fenotípust mutatták, és a transzgént homozigóta formában hordozzák

alkotják az új pigmenthiányos, transzgénikus vonalat, melyet *gáspár*-nak (*gpr*) neveztünk el. A *gáspár* vonal egyedeinek azonosítása közben, ezeket az egyedeket egymással szaporítva, ki fogok alakítani egy állományt, amivel a későbbiekben a kísérleteinket végezhetjük.

4.5. A *gáspár* vonal genom DNS-ének izolálása és szekvenálása

A *gáspár* vonal genomjának szekvenálására azért van szükség, hogy megtaláljuk azt helyet a genomban, ahová a transzgén beépült, ezzel meghatározva a határoló régiókat. Ezen régiók szekvenciájának azonosítása után, az egyedeket egy lépcsőben – azaz az ivarérés előtt és további keresztezések nélkül - lehet majd tesztelni a transzgén jelenlétére és annak kópia számára egyaránt.

A *gáspár* vonal első egyedének azonosítását követően, az egyedet mintázásra begyűjtöttem. A túlaltatást követően az egyed több szövetéből is mintáztam. Az agyat, törzs izomzatot és farokúszót konzerváló oldatba helyeztem, majd a mintákat izoláltuk fenol-kloroformmal (19. ábra). A mintákat ezután nagy hatékonyságú szekvenálásra küldjük majd el.



19. ábra: Genomi DNS-ek minőségellenőrzése 0,6 %-os agaróz gélen.

Minták balról: 3x4 genomi DNS; MC – 'monocut mix' (48 kb; New England Biolabs); Lambda – lineáris lambda DNS (48 kb). A genomi DNS fragmentek átlagmérete 40 kb felettire becsülhető.

4.6. Hozzájárulások

A fenti munkák 90%-át útmutatások alapján önállóan végeztem. A vonalam előállítása során a halak tartási körülményeinek optimális szinten tartásában Márton Csaba és Horváth Kornél voltak a segítségemre. A 4.3 alfejezetben a mikroszkópos munkák elvégzésénél a megfelelő beállítások megtalálásában Bognár András segített. A 4.3, 4.4 és 4.5 alfejezetekben részletezett izolálási és PCR munkáknál témavezetőim segítettek megbirkózni a nehézségekkel.

5. Limitációk

5.1. A recirkulációs rendszer nyújtotta lehetőségek

A zebradánio tartására szolgáló rendszerünkön az egyedeket csak limitált egyedszámban tudtam elhelyezni. Emiatt az általam előállított szaporulatot a különböző generációkból nem tudtam megfelelő számban a rendszeren tartani, emiatt csak a kívántnál kevesebb egyeddel tudtam egyszerre dolgozni, így lassabban tudtam haladni, mint szerettem volna.

5.2. A zebradánio ivarmeghatározása késői és komplex folyamat

A zebradánio modell előnyei leginkább az embrionális és lárva kori fejlődés során mutatkoznak meg, így a legtöbb kutatócsoport az ebben a fázisban lezajló folyamatokat vizsgálja. Az általunk vizsgált események viszont jóval később a 2-8 wpf-es periódusban játszódnak le, így sajnos a modell által kínált előnyök tekintélyes hányadát nem tudjuk igénybe venni munkánk során. Továbbá, a faj ivarának sajátos kialakulása egy meglehetősen komplex folyamat, mely ugyan lenyűgöző és rendkívül érdekes, de ez a komplexitás a kutatások során komoly nehézségeket okoz. Az a tény, hogy az egyedekben eltérő időben alakulnak ki az ivarszervek jelentősen megnehezíti a megfigyelésüket. A munkám során a transzgenikus *casper* egyedek detektálása rövidebb idő intervallum alatt is megtörténhetett volna. Amennyiben az egyedekben természetes módon egy meghatározott időben zajlana le a folyamat, vagy kezelésekkel harmonizálni lehetne azt, akkor nem lenne szükséges várni az ivarok meghatározásával, az Egfp jel alapján, az egyedfejlődés 7-8. hetéig.

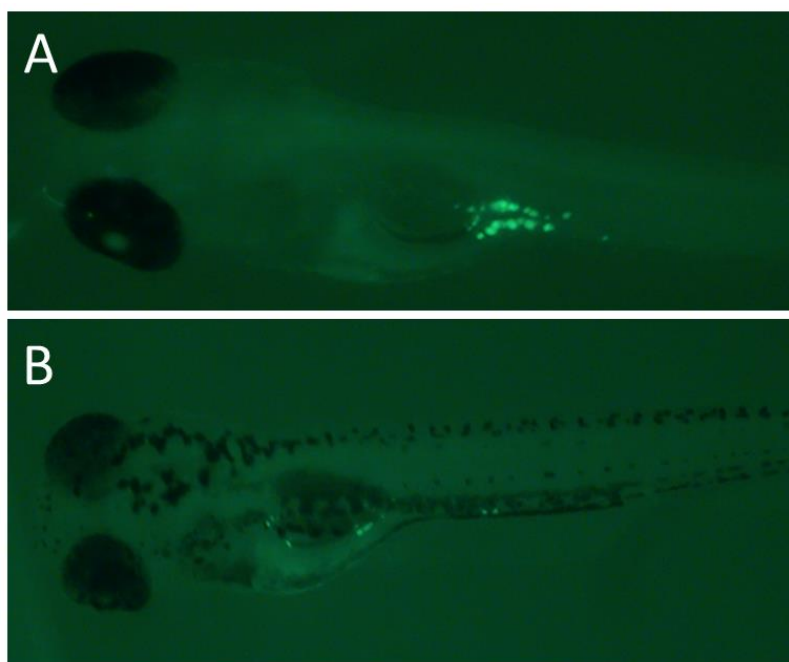
5.3. A hím egyedek detektálásának nehézsége

Az eredeti *tg[vas::egfp]* vonal és általunk kialakított *gáspár* vonalunk elsősorban arra alkalmasak, hogy a fejlődő petefészket figyelemmel kísérjük és vizsgáljuk, mikroszkópos vizsgálatokkal. A hímek detektálása ezekkel a vonalakkal azonban sajnos jóval nehezebb, mert az ő esetükben egy csökkenő mértékű Egfp jelet kell követnünk. A hímeket egy here-specifikus expressziót mutató konstrukcióval jóval korábban detektálhattam volna, ezzel lényegesen lerövidítve a *gáspár* vonal előállításának idejét

6. Következtetések és javaslatok

6.1. A gáspár vonalban a petefészek fejlődés megfigyelésének hatékonysága jelentősen javult

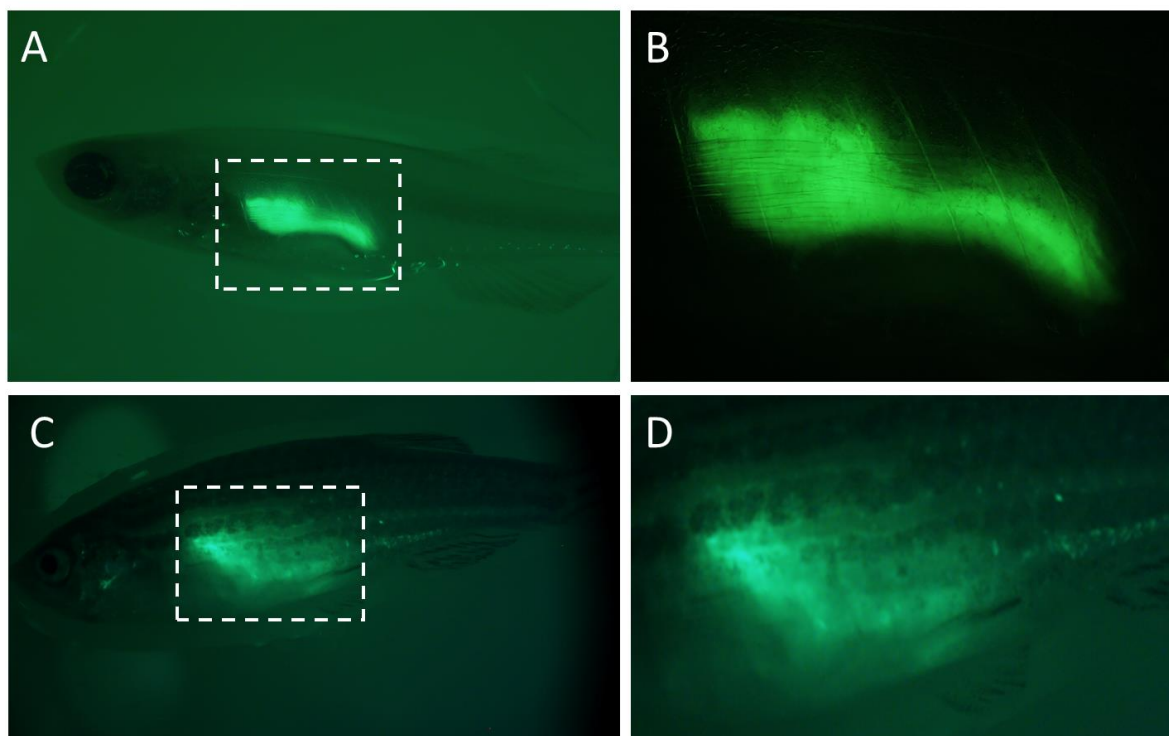
A szelekciós eljárás során számos alkalommal fényképeztem az egyedeket Egfp jel detektálása céljából. A vonalak közötti különbség már a korai egyedfejlődés során megfigyelhető (20. ábra). A korai eredmények azt mutatják, hogy a *gáspár* vonal hasznos eszköze lehet az ivarszerv fejlődésének nyomon követésére. A fiatal lárvákban és az idősebb egyedek esetében megfigyelhető jel erőssége és kiterjedése a pigmentáció hiányában jelentősen javult (21. ábra).



20. ábra: A transzgenikus *gáspár* egyedben az ivarszerv kezdeményéből eredő Egfp jel a pigmentek hiányában sokkal intenzívebb, mint azonos korú vad típusú társában. A) *gáspár* lárva (6 dpf); B) vad típusú lárva (6 dpf).

6.2. A gáspár vonal létrehozásánál alkalmazott szelekciós eljárás hatékonyabb az eddigi módszereknél

A korábbiakban említettek alapján Akhter és kollégái az átlátszó transzgenikus vonaluk megalkotása során szintén kidolgoztak egy hasonló szelekciós és keresztezési eljárást az eltérő fenotípusú egyedek szelektálására (Akhter és mtsai., 2016).



21. ábra: A két hónapos transzgenikus *gáspár* egyedben az ivarszervből eredő Egfp jel a pigmentek hiányában sokkal intenzívebb, mint jóval idősebb vad típusú pigmentált nőivarú társában. A) *gáspár* mutáns (8 wpf); C) vad típusú egyed (16 wpf). A B) és D) paneleken a kinagyított ivarszervek láthatók.

A második generációban hasonlóan az én kutatásomhoz, szegregálnak a genotípusok, eltérő fenotípusokat kialakítva (3. táblázat). Azonban azért, hogy meghatározzák, mely egyedek homozigóták a *tg[b-actin:egfp]* transzgénre, eggyel több generációt kellett létrehozniuk, mire az F4-es egyedek között megjelentek a keresett egyedek. Az eljárásuk során nem szelektáltak a pigmentek megjelenésével párhuzamosan, azokban a generációkban, ahol már eltérő pigmentáltságú egyedek jöttek létre. Ezért esetükben a kívánt vonal megalkotása, több lépcsőn keresztül zajlott, és több időbe telt. A *gáspár* vonal megalkotása során alkalmazott fenotípusos és PCR alapú tesztek alkalmazásával a szelekció lényegesen rövidebb idő alatt

lezajlott. A fiatal ivadékokban az ivarszervek nyomon követésére, a *tg[b-actin:egfp]* konstrukció nem volt ideális, mivel megfigyelésük alapján, a jel csak az egyedfejlődés 45 napján kezdett el a petefészek környékén feldúsulni. Eddig a pontig nem lehettek benne biztosak, hogy a jel a petefészekből érkezik-e, és nem valamely környező sejtcsoportból.

Presslauer és kollégái egy olyan vonalat alkottak meg ami a *transparent* mutánst használta fel (Presslauer és mtsai., 2016). Esetükben a korai szelekció részben megtörtént, ugyanis, a fekete pigmentet nem tartalmazó vonalakat szelektálták (*tra*, *nacre*), azonban a reflektív pigmentekre történő szelekció csak a 6. héten zajlott le. Ennek eredményeképpen csakúgy, mint a fenti esetben a korai szelekció nem történt meg teljesen, ami azt jelenti, hogy az újonnan létrehozott vonaluk vizsgálatát csak jóval később tudták elkezdni.

3. táblázat: A három szelekciós eljárás gyorsaságának és hatékonyságának összehasonlítása

Zebadánió vonal neve	Generációk száma	A pigmentáció alapú szelekció vége	A transzgén alapú szelekció vége	Transzgén konstrukciója	Referencia
<i>b-roy</i>	F4	4 mpf	4mpf	<i>tg[b-actin::egfp]</i>	<i>Akhter és mtsai</i>
<i>see-thru-gonad</i>	F3	6 wpf	2-3 dpf – GFP jel	<i>tg[vasa-vasa::egfp]</i>	<i>Presslauer és mtsai</i>
<i>gáspár</i>	F3	5 dpf	1 dpf - PCR	<i>tg[vasa::egfp]</i>	Ezen tanulmány

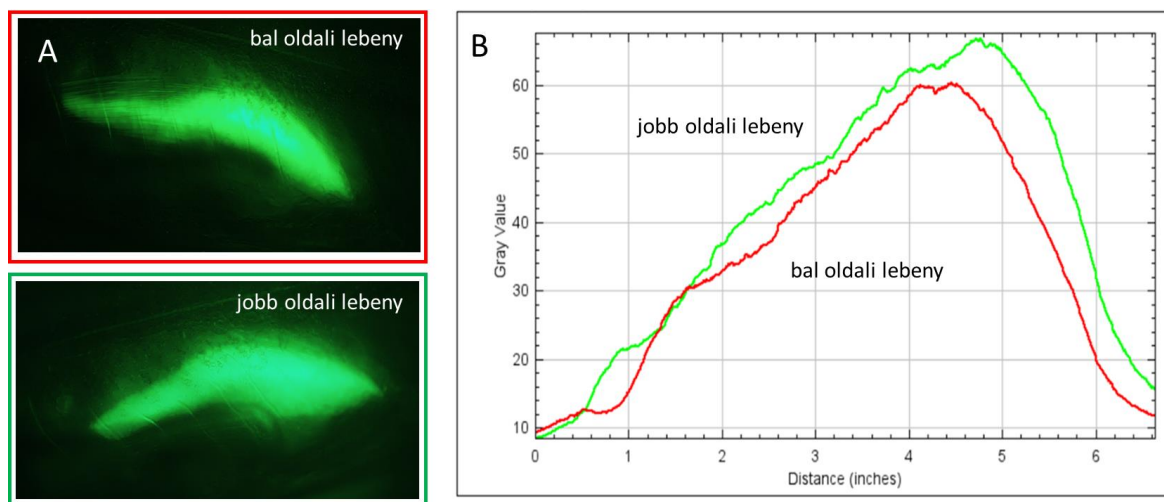
A zöld szín minden oszlopban a leghatékonyabb eljárást jelöli.

Összességében az általam megalkotott szelekciós eljárás gyorsabb és hatékonyabb volt, mint a korábban publikált eljárások.

6.3. A *gáspár* vonal a petefészek két lebenyében zajló folyamatok összehasonlítására is hasznos lehet

A szelekciót követően, a transzgenikus *casper* egyedek detektálása során, a petefészekből érkező jelet vizsgáltam a, mindkét oldalt fényképezve. A felvételek készítése során a petefészek két oldalát kétszeres nagyítással vizsgáltam. A *gáspár* vonal használatával a petefészek két lebenyének megfigyelése a pigment hiányából fakadóan sokkal részletesebb volt. Ezek alapján el tudtam végezni, olyan analíziseket is, amelyeket korábban a pigmentált vonal esetében nem sikerült megvalósítanunk. Ilyen volt például a petefészek két lebenye méretének és az azokból detektálható Egfp jel intenzitásának összehasonlítása (**22. ábra**). A

két lebeny közötti eltérések feltételezésünk szerint a korai ivarszerv ('juvenile ovary') hím irányba történő átfordulásának lehetnek a potenciális jelei.



22. ábra: A petefészek két lebenyéből eredő Egfp jel összehasonlító, mikroszkópos analízise. A pigmentek hiánya olyan részleteket tesz láthatóvá, melyek a vad típusú pigmentált egyedekben eddig rejtve maradtak. A) A két lebeny képe; B) Az fényintenzitások konvertálást követő szürke értéke. Az analíziseket, az ImageJ nevű szoftverrel végeztem.

6.4. A gáspár vonal hasznos eszköze lehet más kutatásoknak is

A *casper* vonalba tartozó egyedeket számos kutatás hasznosítja, mivel a testfal átlátszósága lehetővé teszi a szervek megfigyelését (White és mtsai., 2008). Ezzel egy olyan eszköze sok munkának, amely során nem kell feláldozni az egyedeket, mivel a folyamatok, amelyeket megfigyelnek szabad szemmel is láthatóvá válnak, például transzplantáció vagy tumor kutatás során (Stoletov & Klemke, 2008; White és mtsai., 2013). A korábbi kutatásokból kiderült, hogy bizonyos rákos megbetegedések során a sejtek termelik a Vasa fehérjét. Mivel a *casper* fenotípussal rendelkező vonalat már hasznosítják ehhez kapcsolódó kutatásokban, valószínűsíthető, hogy a *gáspár* vonal ezeknek a munkáknak is hasznos eszköze lehet.

6.5. Egy hímvivarszerv-specifikusan megnyilvánuló transzgén bevitele a *gáspár* vonalba tovább javíthatná detektálás pontosságát az ivarszerv fejlődése során

A *gáspár* vonal korábban már kifejtett hiányossága (5.3. alfejezet), miszerint a here első kezdeményének felbukkanását nehezen, csak némi késéssel lehet megállapítani. A továbbiakban a *gáspár* vonalba tervezünk bevinni egy olyan transzgenikus konstrukciót, ami kizárólag a herében található sejtek egyikében nyilvánul meg. Az új konstrukcióba egy olyan riporter gént választanánk, aminek a terméke az Egfp jelétől jól elkülöníthető színben fluoreszkál. Erre több alternatíva is a rendelkezésünkre áll, például az *mCherry*, amely egy bizonyos hullámhosszú fény hatására pirosan világít. Ezzel a két transzgént hordozó átlátszó vonallal, az ivarszervek fejlődésének megfigyelése sokkal pontosabb és hatékonyabb lenne.

Összefoglalás

A kutatásom során kidolgoztam egy olyan korai szelekciós eljárást, aminek segítségével, egy, a hím és női ivarszervekben eltérő módon megnyilvánuló riporter gént be tudtam juttatni egy átlátszó zebradánió vonalba. Ahhoz, hogy a *gáspár* vonalat létrehozzam, szükség volt arra, hogy kidolgozzak egy új, a fenotípuson és transzgén jelenlétén alapuló, többlépcsős szelekciós eljárást. A fenotípusos szelekció során számos egyedet egyedileg válogattam, a fekete és reflektív pigmentek termelődése alapján. A szelekciós eljárás ezen szakaszában több mint 4000 egyedet állítottam elő keresztezések tucatjaival annak érdekében, hogy azokból kb. 250 *casper* fenotípussal rendelkező egyedet kisselektálhassak.

A transzgén jelenlétére történő szelekció során számos keresztezést, mikroszkópos és PCR tesztet is elvégeztem azért, hogy a *gáspár* vonalba tartozó egyedeket megtaláljam. A munkám során rendszeres mikroszkópos megfigyeléseket végeztem. Az ezekből származó adatokkal szemléltettem, hogy az átlátszó transzgenikus vonal mennyivel hatékonyabb eszköze a kialakuló ivarszerv megfigyelésének, akár a lárvális fejlődési stádium során is.

A kutatásom során megismerkedtem azokkal az eszközökkel és eljárásokkal, amivel egy ilyen vonalat elő lehet állítani (például haltartás és szaporítás, nukleinsav izolálási módszerek, PCR és gélelektroforézis). A munkám célja nem csak egy olyan vonal és eljárás kidolgozása volt, amivel ezt az eszközt elő lehet állítani, hanem az is, hogy egy olyan eljárást alkossak meg, amivel más hasonló vonalakat is hatékonyan lehet létrehozni. A *gáspár* vonal nem csak az ivar kutatására, hanem más kutatási célokra is jól alkalmazható.

A munka nagy részét útmutatások alapján önállóan végeztem. Az eszközök beállításában, a halak tartásában és a molekuláris analízis során felmerült nehézségek megoldásában kaptam segítséget a kollégáimtól. A fenti kutatási projekt eredményeit egy jegyzett nemzetközi lapban fogjuk publikálni.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Szeverényi Ildikónak és Dr. Orbán Lászlónak, akik a kutatásom során rengeteg segítséget nyújtottak.

Külön köszönöm Bognár Andrásnak, aki hasznos tanácsokkal és információkkal látott el a munkám során, illetve azért is, mivel az ő segítségével sajátíthattam el a mikroszkóppal történő munkákat.

Köszönet illeti továbbá az Alkalmazott Halbiológia tanszék dolgozóinak segítségét, akik valamilyen formában hozzájárultak a dolgozatom létrejöttéhez. Külön köszönettel tartozom Marton Csabának és Horváth Kornélnak, a kísérleti halaim tartásához és neveléséhez nyújtott segítségükért.

Köszönöm családom folyamatos támogatását, mellyel biztosították a helyes haladási irányt. Nélkülük ez a munka nem készülhetett volna el.

Irodalomjegyzék

- Akhter, A., Kumagai, R., Roy, S. R., Ii, S., Tokumoto, M., Hossain, B., Wang, J., Klangnarak, W., Miyazaki, T., & Tokumoto, T. (2016). Generation of Transparent Zebrafish with Fluorescent Ovaries: A Living Visible Model for Reproductive Biology. *Zebrafish*, 13(3), 155–160. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1116>
- Aleström, P., D'Angelo, L., Midtlyng, P. J., Schorderet, D. F., Schulte-Merker, S., Sohm, F., & Warner, S. (2020). Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. *Laboratory Animals*, 54(3), 213–224. <https://doi.org/10.1177/0023677219869037>
- Campbell, J. H., Dixon, B., & Whitehouse, L. M. (2021). The intersection of stress, sex and immunity in fishes. *Immunogenetics*, 73(1), 111–129. <https://doi.org/10.1007/s00251-020-01194-2>
- D'Agati, G., Beltre, R., Sessa, A., Burger, A., Zhou, Y., Mosimann, C., & White, R. M. (2017). A defect in the mitochondrial protein Mpv17 underlies the transparent casper zebrafish. *Developmental Biology*, 430(1), 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.07.017>
- Dooley, K., & Zon, L. I. (2000). Zebrafish: A model system for the study of human disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10(3), 252–256. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(00\)00074-5](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00074-5)
- Dorsky, R. I., Raible, D. W., & Moon, R. T. (2000). Direct regulation of nacre, a zebrafish MITF homolog required for pigment cell formation, by the Wnt pathway. *Genes & Development*, 14(2), 158–162. <https://doi.org/10.1101/gad.14.2.158>
- Hawkins, J. R. (1993). The SRY gene. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 4(10), 328–332. [https://doi.org/10.1016/1043-2760\(93\)90075-P](https://doi.org/10.1016/1043-2760(93)90075-P)
- Kelsh, R. N., Brand, M., Jiang, Y. J., Heisenberg, C. P., Lin, S., Haffter, P., Odenthal, J., Mullins, M. C., van Eeden, F. J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Warga, R. M., Beuchle, D., Vogelsang, L., & Nusslein-Volhard, C. (1996). Zebrafish pigmentation mutations and the processes of neural crest development. *Development*, 123(1), 369–389. <https://doi.org/10.1242/dev.123.1.369>
- Kelsh, R. N., Schmid, B., & Eisen, J. S. (2000). Genetic Analysis of Melanophore Development in Zebrafish Embryos. *Developmental Biology*, 225(2), 277–293. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9840>
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Krauss, J., Astrinides, P., Frohnhöfer, H. G., Walderich, B., & Nüsslein-Volhard, C. (2013). Transparent, a gene affecting stripe formation in Zebrafish, encodes the mitochondrial protein Mpv17 that is required for iridophore survival. *Biology Open*, 2(7), 703–710. <https://doi.org/10.1242/bio.20135132>
- Krøvel, A. V., & Olsen, L. C. (2002). Expression of a vas::EGFP transgene in primordial germ cells of the zebrafish. *Mechanisms of Development*, 116(1–2), 141–150. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00154-5](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00154-5)
- Krøvel, A. V., & Olsen, L. C. (2004). Sexual dimorphic expression pattern of a splice variant of zebrafish vasa during gonadal development. *Developmental Biology*, 271(1), 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.04.004>

- Levraud, J.-P., Palha, N., Langevin, C., & Boudinot, P. (2014). Through the looking glass: Witnessing host–virus interplay in zebrafish. *Trends in Microbiology*, 22(9), 490–497. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.014>
- Liew, W. C., Bartfai, R., Lim, Z., Sreenivasan, R., Siegfried, K. R., & Orban, L. (2012). Polygenic Sex Determination System in Zebrafish. *PLoS ONE*, 7(4), e34397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034397>
- Liew, W. C., & Orbán, L. (2014). Zebrafish sex: A complicated affair. *Briefings in Functional Genomics*, 13(2), 172–187. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elt041>
- Lister, J. A., Robertson, C. P., Lepage, T., Johnson, S. L., & Raible, D. W. (1999). *Nacre* encodes a zebrafish microphthalmia-related protein that regulates neural-crest-derived pigment cell fate. *Development*, 126(17), 3757–3767. <https://doi.org/10.1242/dev.126.17.3757>
- Lu, S., Hu, M., Wang, Z., Liu, H., Kou, Y., Lyu, Z., & Tian, J. (2020). Generation and Application of the Zebrafish *heg1* Mutant as a Cardiovascular Disease Model. *Biomolecules*, 10(11), 1542. <https://doi.org/10.3390/biom10111542>
- Morrish, B. C., & Sinclair, A. H. (2002). Vertebrate sex determination: Many means to an end. *Reproduction* 124, 447-457
- Nishimura, T., Yamada, K., Fujimori, C., Kikuchi, M., Kawasaki, T., Siegfried, K. R., Sakai, N., & Tanaka, M. (2018). Germ cells in the teleost fish medaka have an inherent feminizing effect. *PLOS Genetics*, 14(3), e1007259. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007259>
- Orban, L., Sreenivasan, R., & Olsson, P.-E. (2009). Long and winding roads: Testis differentiation in zebrafish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 312(1–2), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.04.014>
- Patterson, L. B., & Parichy, D. M. (2019). Zebrafish Pigment Pattern Formation: Insights into the Development and Evolution of Adult Form. *Annual Review of Genetics*, 53(1), 505–530. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112618-043741>
- Presslauer, C., Bizuayehu, T., Razmi, K., Fernandes, J., & Babiak, I. (2016). *See-Thru-Gonad* Zebrafish line: Developmental and functional validation. *Reproduction*, 152, 507–517. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0328>
- Ravi, P., Jiang, J., Liew, W. C., & Orbán, L. (2014). Small-scale transcriptomics reveals differences among gonadal stages in Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-5>
- Rawls, J. F., Mellgren, E. M., & Johnson, S. L. (2001). How the Zebrafish Gets Its Stripes. *Developmental Biology*, 240(2), 301–314. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0418>
- Raz, E. (2003). Primordial germ-cell development: The zebrafish perspective. *Nature Reviews Genetics*, 4(9), Art. 9. <https://doi.org/10.1038/nrg1154>
- Ribas, L., Liew, W. C., Díaz, N., Sreenivasan, R., Orbán, L., & Piferrer, F. (2017). Heat-induced masculinization in domesticated zebrafish is family-specific and yields a set of different gonadal transcriptomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(6), E941–E950. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609411114>
- Smith, C. A., & Smith, C. A. (2010). ROWLEY REVIEW. Sex determination in birds: A review. *Emu*, 110(4), 364–377. <https://doi.org/10.1071/MU10030>
- Stoletov, K., & Klemke, R. (2008). Catch of the day: Zebrafish as a human cancer model. *Oncogene*, 27(33), Art. 33. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.95>

- Wang, X., Copmans, D., & de Witte, P. A. M. (2021). Using Zebrafish as a Disease Model to Study Fibrotic Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), Art. 12. <https://doi.org/10.3390/ijms22126404>
- Wang, X. G., Bartfai, R., Sleptsova-Freidrich, I., & Orban, L. (2007). The timing and extent of ‘juvenile ovary’ phase are highly variable during zebrafish testis differentiation. *Journal of Fish Biology*, 70(sa), 33–44. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01363.x>
- Warner, D. A., & Shine, R. (2008). The adaptive significance of temperature-dependent sex determination in a reptile. *Nature*, 451(7178), Art. 7178. <https://doi.org/10.1038/nature06519>
- White, R. M., Sessa, A., Burke, C., Bowman, T., LeBlanc, J., Ceol, C., Bourque, C., Dovey, M., Goessling, W., Burns, C. E., & Zon, L. I. (2008). Transparent Adult Zebrafish as a Tool for In Vivo Transplantation Analysis. *Cell Stem Cell*, 2(2), 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.002>
- White, R., Rose, K., & Zon, L. (2013). Zebrafish cancer: The state of the art and the path forward. *Nature Reviews Cancer*, 13(9), Art. 9. <https://doi.org/10.1038/nrc3589>
- Wilson, C. A., High, S. K., McCluskey, B. M., Amores, A., Yan, Y., Titus, T. A., Anderson, J. L., Batzel, P., Carvan, M. J., III, Scharl, M., & Postlethwait, J. H. (2014). Wild Sex in Zebrafish: Loss of the Natural Sex Determinant in Domesticated Strains. *Genetics*, 198(3), 1291–1308. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.169284>
- Wixon, J. (2000). Featured organism: Danio rerio, the zebrafish. *Yeast*, 17(3), 225–231. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000930\)17:3<225::AID-YEA34>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000930)17:3<225::AID-YEA34>3.0.CO;2-5)
- Yamashita, M. (2003). Apoptosis in zebrafish development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 136(4), 731–742. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2003.08.013>
- Yue, G. H., & Orban, L. (2001). Rapid Isolation of DNA from Fresh and Preserved Fish Scales for Polymerase Chain Reaction. *Marine Biotechnology*, 3(3), 199–204. <https://doi.org/10.1007/s10126-001-0010-9>