

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Tanszék



Toxicitás és expresszió mértékének vizsgálata zebradánió
transzgenezis során QF2 és Tol2 rendszerekben

TDK dolgozat

Készítette:

Mihályi Vivien

állatorvostan-hallgató

Témavezetők:

Dr. Korsós Gabriella

tudományos segédmunkatárs

Állatorvostudományi Egyetem, Állattenyésztési, Takarmányozástani
és Laborállat-tudományi Tanszék,

Dr. Enyedi Balázs

egyetemi docens

Semmelweis Egyetem, Élettani Intézet

Budapest

2023

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. Bevezetés.....	4
2. Célkitűzések	5
3. Irodalmi áttekintés.....	6
3.1. A zebradánió, mint modellállat	6
3.2. Zebradánió transzgenezis	7
3.3. Fluoreszcens fehérjék.....	8
3.4. Tol2 rendszer.....	8
3.4.1. A kísérlet során alkalmazott plazmidok Tol2 rendszerben	9
3.5. QUAS - QF2 rendszer	10
3.5.1. A kísérlet során használt plazmidok QF2 rendszerben	12
4. Anyag és módszerek.....	13
4.1. A toxicitás vizsgálata	13
4.1.1. Plazmidok előkészítése	13
4.1.2. Ívatás és az ikrák begyűjtése	13
4.1.3. Injektálás	14
4.1.4. Inkubáció és marker vizsgálat	15
4.1.5. Monitorozás.....	16
4.1.6. Statisztikai elemzés	16
4.2. Az expresszió vizsgálata spinning-disk konfokális mikroszkóppal	17
5. Eredmények és értékelésük	19
5.1. A toxicitás vizsgálata során kapott eredmények	19
5.1.1. Kontroll csoportok eredményei.....	19
5.1.2. A toxicitás vizsgálatának eredményei QF2 rendszerben.....	21
5.1.3. A toxicitás vizsgálatának eredménye Tol2 rendszerben	25
5.2. Az expresszió mértékének vizsgálata során kapott eredmények F0 generációban..	26
5.2.1. ITGA11-cfos promóterrel rendelkező plazmid expressziós felvételei QF2 rendszerben.....	26
5.2.2. ITGA11-cfos promóterrel rendelkező plazmidok expressziós felvételei Tol2 rendszerben.....	27
5.2.3. Krt4 promóterrel rendelkező plazmid expressziója QF2 rendszerben	28
5.2.4. Krt4 promóterrel rendelkező plazmid kódolta gén expressziója Tol 2 rendszerben	29
5.2.5. Ubiquitin promóterrel rendelkező plazmid esetén mért expresszió QF2 rendszerben.....	30
5.2.6. Ubiquitin promóterrel rendelkező plazmid esetén mért expresszió Tol2 rendszerben.....	32
5.3. Expresszió mértékének bemutatása az F1 generációban.....	32
5.4. Következtetések	33
6. Összefoglalás.....	35
7. Irodalomjegyzék.....	36
8. Köszönetnyilvánítás	39

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Krt4	Keratin 4 fehérje
ITGA11	Integrin alfa-11 fehérje
GFP	Green Fluorescent Protein
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
LR	L (left) és R (right) utal arra, hogy két fragment jobb és bal vége kapcsolódik össze
Q rendszer	<i>Neurospora crassa</i> qa géncsoportjának nevéből származik
QUAS	Upstream Activation Sequence (Q system)

1. BEVEZETÉS

A géntechnológia egy rendkívül gyors léptékben fejlődő tudományterület, mely kivételes lehetőséget biztosít a kutatólaborok számára többek között a különböző biológiai folyamatok megismerésére, génfunkciók feltérképezésére, betegségek modellezésére vagy új kezelési módszerek kidolgozására. Mindezek megvalósulásában igen fontos szerepet játszanak a transzgenikus állatok, közülük is kiemelve a zebradániót, melyet kivételes tulajdonságai szinte valamennyi kutatási terület számára alkalmassá tesznek modellállatnak.

Kutatásokban már az 1980-as évek óta széleskörűen használnak transzgenikus állatokat [1], például génmódosított egereket a rákkutatásban [2], zebrahalakat a gyulladásos és szövetsérüléssel kapcsolatos folyamatok felderítésében [3], a toxikológiában [4], patkányokat az Alzheimer kór modellezésében [5], vagy nyulakat szívritmuszavarok vizsgálatában [6].

A transzgén általában három alap génszakaszból tevődik össze: az expresszió helyét és így a szövet- vagy szervspecifitást szabályozó promóter régióból, a fehérjét kódoló génszakaszból, illetve a terminális génszakaszból [1]. A transzgén célgenomba történő bejuttatásához, a gének manipulációjához ma már számtalan eszköz és módszer ismert, mint például a bináris expressziós rendszerek (pl: QUAS-QF2, GAL4-UAS, LexA-LexAop) [7] vagy a transzpozonok (pl: SleepingBeauty, Tol2, PiggyBac) [8], melyeknek a hatékonyságát, a specificitását, illetve az állati szervezetre kifejtett, esetleges toxikus hatását is számos tényező befolyásolja. Ezen paraméterek felmérése és ismerete létfontosságú mind állatjóléti kérdések, mind pedig az adott kutatás eredményessége szempontjából.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Jelen kísérlet célja a QUAS-QF2, valamint a Tol2 rendszerek toxicitásának és expressziós tulajdonságainak a felmérése, valamint összevetése. Ennek érdekében olyan transzgenikus halvonalakat hoztunk létre, melyek esetében az eltérő szöveti specificitással rendelkező promótereknek köszönhetően, összehasonlíthatjuk a különböző szövetekben létrehozott génexpresszió mértékét, specificitását, mozaikosságát.

Továbbá célunk, a halvonalak túlélésének rendszeres monitorozásával az eltérő szöveti expresszió figyelembevételével meghatározni a QUAS-QF2, valamint a Tol2 rendszerek toxicitását.

A génkifejeződés, illetve a toxicitás mértékének vizsgálatával pedig szeretnénk felmérni a QF2, illetve a Tol2 rendszerek alkalmazásának előnyeit, valamint korlátait.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A zebradánió, mint modellállat

A zebradánió (*Danio rerio*) napjaink legnépszerűbb modellállatai közé tartozik. Eredetileg Kelet-Indiában őshonos, trópusi, édesvízi hal, melynek tudományos felhasználása a számtalan előnyös, biológiai tulajdonsága révén rendkívül széleskörű. Egy alkalommal több száz ikrát is leívhathat, melyek gyorsan, az anyaállaton kívül fejlődnek. Az embriók és a lárvák áttetszőek, így a teljes embriogenezis, organogenezis jól nyomonkövethető, valamint az utódok manipulációja invazív beavatkozások nélkül is elvégezhető. Továbbá, mivel a humán gének legalább 70%-nak megtalálható az ortológ génpárja zebradánióban, kiválóan alkalmas különböző humán betegségek modellezésére [9, 10]. Kivételes a szöveti regenerációs képessége, többek között a farokúszó, a szív, a központi idegrendszer, a vese, a hasnyálmirigy, valamint a máj szöveti struktúráinak regenerációjára is képes [11].

A teljes genomja ismert, ami a többi, központi idegrendszerrel rendelkező állathoz képest könnyen manipulálható. Emiatt számos génmódosított zebrahal vonalat alkalmaznak különböző kutatási területeken. Kísérletünkben az AB (vad típus) mellett használt átlátszó Casper (**1. ábra**) halak is olyan mutáció révén jöttek létre, melynek következtében a felnőtt halak pigmentációs mintázatát meghatározó háromféle pigmentsejt közül a melanophor és az iridophor sejtek hiányoznak. Ennek köszönhetően a teljes szív (sőt a kamrai kontrakciók is), a bélrendszer, a máj, az epehólyag, bizonyos mértékben az agy, illetve nőstény állatokban az ikrák is egyszerűen vizsgálhatók sztereomikroszkóppal. Ez a fenotípus csak homozigóta formában fordul elő, így AB és Casper halak keresztezéséből származó utódok AB fenotípussal rendelkeznek [12].



1. ábra Melanophor és iridophor pigmentsejtekkel nem rendelkező Casper halak a Semmelweis Egyetem állatházában (saját fotó).

Mindezekon felül kis mérete, viszonylag egyszerű tartástechnológiája, szaporasága is hozzájárul ahhoz, hogy számos tudományterület, többek között a fejlődésbiológia, a toxikológia, a farmakológia, a tumorbiológia, a genetika, vagy a viselkedésbiológia is nagy számban alkalmazza laborállatként [13].

3.2. Zebradánió transzgenezis

A laboratóriumi kutatásokhoz előszeretettel alkalmaznak különböző transzgenikus halvonalakat. Zebradánió transzgenezis során a cél a halak genomjának a manipulációja, oly módon, hogy a transzgén a csíravonalba integrálódjon, tehát az utódgenerációban is tovább öröklődjön, ne csendesedjen el a nemzedékek előrehaladtával. Mindemellett fontos tényező, hogy a plazmidok expressziója erős legyen, de minél kevésbé mutasson mozaikosságot, valamint a lehető legkisebb mértékben legyen toxikus a halakra [14].

A kísérlet során kétféle háttérrel rendelkező plazmidot injektáltunk egysejtes állapotú ikrákba. A plazmidok extrakromoszómális elhelyezkedésű, kettős szálú, cirkuláris DNS-molekulák, melyek a transzgenezis során leggyakrabban alkalmazott vektorok. Baktériumokban önálló replikációra képesek, melyhez a replikáció kezdőpontját meghatározó replikációs origóval rendelkeznek. Általában tartalmaznak egy vagy több antibiotikum rezisztencia gént, melyeknek szerepe az átírandó plazmidot tartalmazó baktériumok szelektív felszaporításában van antibiotikum tartalmú táptalajon [15, 16].

A transzgén genomba történő beépüléséhez transzpozonokat használunk. A transzpozonok olyan DNS szekvenciák, melyek képesek a genomon belüli helyváltoztatásra, ezt kihasználva tudjuk az idegen DNS beugratását biztosítani a célgenomba. Míg a retrotranszpozonok önmaguk másolatával, addig a DNS transzpozonok (mint például a Tol2, Sleeping Beauty, piggyBac) önmaguk kivágásával és beillesztésével kerülnek át a genomba [8, 17].

A DNS transzpozonok transzpozáz enzimet kódolnak, mely, mint egy restrikciós enzim kivágja, majd egy ligáz enzimhez hasonlóan beilleszti a transzpozont a genomba [18]. A kódoló génszakasz előtt található promóter régió szabályozza az adott génszakasz transzkripcióját. Ebben a tanulmányban szövetspecifikusan expresszáldó, Krt4, ITGA11-cfos, illetve ubiquitin promóterrel rendelkező plazmidokat injektáltunk [19]. A keratin 4 fehérje átírását szabályozó Krt4 promóter (**2., 6. ábra**) a felületes epithelialis sejtrétegben eredményez expressziót [20]. Az ITGA11 promóter (**3., 7. ábra**) az alfa és béta láncból álló integrin alfa-11 fehérje kifejeződését befolyásolja, mely mesenchymalis sejtekben fordul elő, elsősorban fibroblastokban, a simaizomszövet, a harántcsíkolt izomszövet, valamint a szívizomszövet

sejtjeiben [21]. Ubiquitin promóterrel (**4., 8. ábra**) egy általános, minden szövetben jelen levő expressziót érhetünk el köszönhetően annak, hogy az ubiquitin fehérje valamennyi sejtben megtalálható. Azonban, ahogy Mosimann és mtsai [22] is kimutatták, az ubiquitin promóter általános, de nem homogén expressziót eredményez. Különbséget igazoltak a különböző szövetek, mint például az agy, vese, retina, vér sejtjeiben mért expressziós szintekben.

3.3. Fluoreszcens fehérjék

Tol2 rendszerben EGFP (enhanced green fluorescent protein), míg QF2 rendszerben citoplazmában expresszálandó zöld mNeonGreent, illetve sejtmagi, vörös mKate fluoreszcens fehérjét kódoló génszakaszt kapcsolunk a promóter régióhoz. Ezáltal fluoreszcens mikroszkóppal tudjuk vizsgálni a promóterek kifejeződését [23, 24].

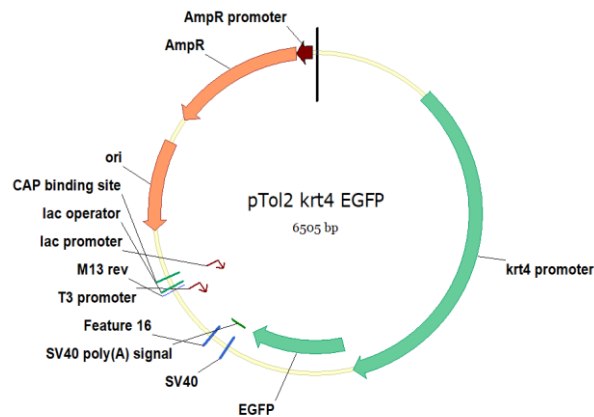
A fluoreszcens fehérjék nagy szerepet játszanak transzgenézis során a gének, illetve azok expressziójának a vizsgálatában. Heppert és mtsai [25] *in vivo* kísérletben hasonlították össze fluoreszcens fehérjék, többek között az mNeonGreen, mKate, és GFP fehérjék tulajdonságait. A fényintenzitás és fotostabilitás szempontjából a GFP-t és mNeonGreen-t hasonlóknak találták, míg a vörös fluoreszcens fehérjék közül az mKate bizonyult a legjobbnak a vizsgált paraméterek alapján.

3.4. Tol2 rendszer

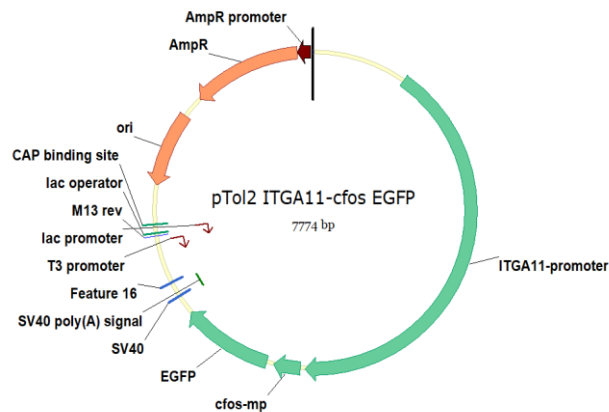
A Tol2 transzpozon elemeit a japán medaka hal (*Oryzias latipes*) genomjából azonosították. A kísérletben bemutatott konstruktok összeállításának alapjául a multisite Gateway technológia szolgált, mely könnyű és hatékony módon teszi lehetővé egyszerre több DNS fragment beépítését [26]. A konstruktok a transzkripció helyét meghatározó szövetspecifikus promóter régióval és zöld, citoplazmában kifejeződő EGFP fluoreszcens fehérjét kódoló génszakasszal rendelkeznek. Vektorjuk Tol2 transzpozont tartalmazó plazmidtörzs, melyhez a mikroinjekció során exogén transzpozáz mRNS került hozzáadásra [27].

Az egysejtes stádiumban levő embrió injektálását követően a transzpozáz mRNS-ről transláció során transzpozáz enzim képződik, mely katalizálja a Tol2 transzpozon konstruktt kivágását a plazmid DNS-ből, valamint a beillesztését a célgenomba. A későbbiekben a transzpozáz fokozatos lebomlásával megszűnik az aktivitásuk [28].

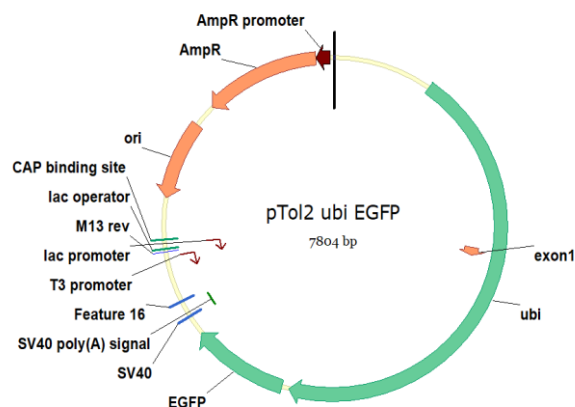
3.4.1. A kísérlet során alkalmazott plazmidok Tol2 rendszerben



2. ábra Keratin 4 fehérje átírását szabályozó promóterrel rendelkező plazmid térképe, melyen látható a promóter régió által szabályozott EGFP fluoreszcens fehérjét kódoló génszakasz, a replikációs origó (ori), valamint az Ampicillin rezisztencia gén helye is (saját illusztráció).



3. ábra Integrin alfa-11 fehérje kifejeződését szabályozó promótert tartalmazó Tol2 transzpozon alapú plazmid térképe, ábrázolva rajta a replikációs origót (ori), az Ampicillin rezisztencia gén, valamint az EGFP fehérje helyét (saját illusztráció).



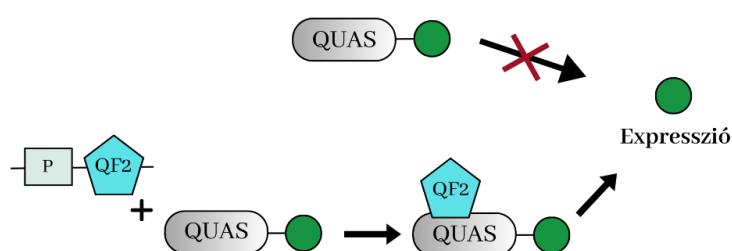
4. ábra Általános, valamennyi szövetben expresszálódó ubiquitin promóterrel rendelkező plazmid térképe Tol2 rendszerben (saját illusztráció).

3.5. QUAS - QF2 rendszer

A QF rendszer egy bináris expressziós rendszer, mely hatékonyan képes irányítani a transzgén expressziót. Két fő komponense a QF, transzkripcionális aktivátor fehérje, illetve a QUAS promóter.

Funkciója a *Neurospora crassa* gomba qa géncsoportjának működési elvén alapszik. A qa csoportba 7 gén tartozik, melyekből 2 a szabályozó gén: QA-1F a transzkripcionális aktivátor és a QA-1S a represszor gén. Magas kininsavsavszint esetén a kininsav kötődik a QA-1S-hez, így a QA-1F aktiválhatja a qa géneket, melyek így alternatív szénforrást biztosíthatnak alacsony glükóz szint mellett a gombának. Kevés kininsav jelenléte esetén a QA-1F nem tudja aktiválni a qa géneket. A QA-1S, QA-1F, valamint a QA-1F kötőhely, kinyerve a *Neurospora Crassából*, felel meg a QS, QF, illetve a QUAS-nek a QF rendszerben [29].

A QF2 rendszer (5. ábra) a QF rendszer egyik változata, mely nem tartalmazza annak középső géntartományát. A qa gének működése alapján az általunk vizsgált halaknál a következőképpen működött a QF2 rendszer. Az expresszió létrejöttéhez a szövetspecifikus promóter mögött elhelyezkedő QF2 transzkripcionális aktivátort és szívspecifikus GFP markerfehérjét tartalmazó Tol2 transzpozon alapú LR plazmidot transzpozáz enzim mRNS jelenléte mellett injektáltuk a QUAS promótert, valamint a vizsgálandó fehérjét kódoló génszakaszt (esetünkben mNeonGreen-t és mKate fluoreszcens fehérjéket kódoló gének) tartalmazó halvonal egyedének ikrájába. Ennek következtében a megfelelő szövetekben kifejeződő QF2 kötődni tudott a QUAS promóter QF2 specifikus kötőhelyeihez aktiválva ezzel a transzkripciót, és a kódolt gének kifejeződését [30].



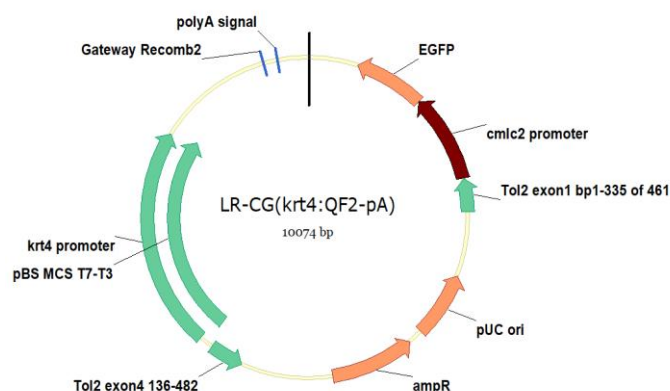
5. ábra A QUAS-QF2 rendszer működése. A QUAS promóterhez kötött transzgén, csak aktív promóterrel rendelkező QF2 transzkripcionális aktivátor jelenlétében tud expresszálni.

A QUAS - QF2 rendszert és annak működését elsőnek J. Potter és mtsai [31] írták le *Drosophila* fajokban.

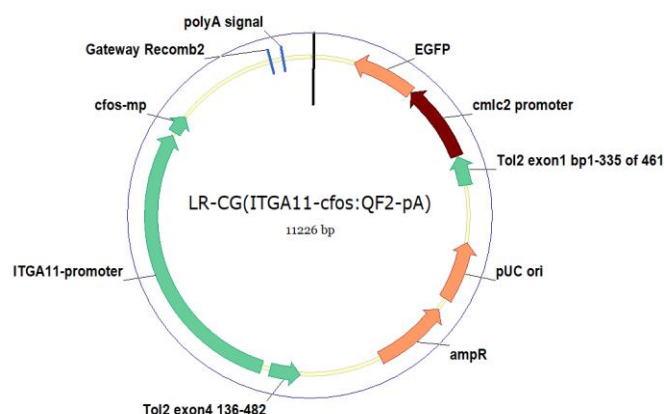
A QF rendszer egyik nagy előnye a magas szintű expresszió és az erős transzkripció aktiváció mellett, hogy a QF fehérjéből hiányoznak azok a CpG nukleotidok, amelyek a CpG-mediált metilációért felelősek, és ezáltal a gének elcsendesítéséért. Bár a QUAS kötőhelyenként tartalmaz 2 CpG nukleotidot, ezek nem létfontosságú helyeken találhatók, ezért a QF rendszerre a generációk előrehaladtával a gének elcsendesedése nem jellemző. Burgess és mtsai [32] kísérletet végeztek a QF rendszerrel, illetve azok variánsaival: QF2-vel, mely már nem tartalmazza a QF középső génszakaszát, a gyengített QF2-vel, mely annyiban különbözik a QF2-től, hogy a C-terminuson az utolsó két aminosavat négy lizinre cserélték. Továbbá, létrehozták a QFGal4 transzkripcionális aktivátort, a QF és egy másik bináris expressziós rendszerből (UAS/Gal4 rendszer) származó transzkripcionális aktivátor fúziójával, illetve lecsökkentették a QUAS CpG nukleotid tartalmát a rendszer optimalizálása céljából. A QFGal4 esetén nem találtak szignifikáns különbséget toxicitás tekintetében a nem injektált zebrahalakhoz képest, viszont szignifikáns különbséget mutattak ki, mind a QF, mind a QF2 rendszer kapcsán. Azt is megállapították, hogy a toxicitás mértéke korrelált a transzkripcionális aktivitás erősségével [32].

Az erős toxicitás okának felderítésére Riabinina és mtsai [7] synaptobrevin promóter mellett hasonlítottak össze olyan rendszereket, amelyekből teljesen vagy részlegesen kivonták a QF fehérje középső géntartományát. Kísérlete során csak a teljes középső génszakaszt tartalmazó, QF rendszer bizonyult rendkívül toxikusnak.

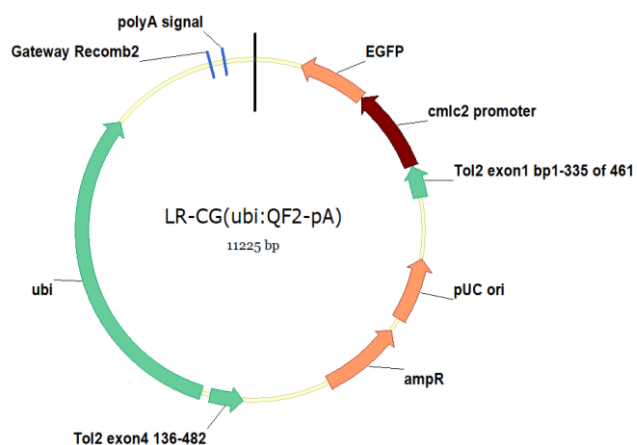
3.5.1. A kísérlet során használt plazmidok QF2 rendszerben



6. ábra Epithelialis sejtekben expresszálódó plazmid térképe QF2 rendszerben, feltüntetve a replikációs origót (ori), az Ampicillin rezisztencia gént kódoló szakaszt és a cm1c2 promóter által szabályozott EGFP markerfehérjét kódoló génszakaszt (saját illusztráció).



7. ábra Elsősorban fibroblastokban, illetve az izomszövet sejtjeiben expresszálódó, integrin alfa-11 fehérjét kódoló promóterrel rendelkező plazmid térképe (saját illusztráció).



8. ábra Általánosan expresszálódó Tol2 transzpozon alapú LR plazmid térképe QF2 rendszerben (saját illusztráció).

4. ANYAG ÉS MÓDSZEREK

4.1. A toxicitás vizsgálata

A kísérlet során 1-2 éves AB és Casper halak keresztezéséből származó, egysejtes stádiumban levő ikrák injektálásával hoztunk létre transzgenikus halvonalakat.

QF2 rendszerben kettő, a Krt4, valamint az ITGA11 promóterek segítségével szövetspecifikusan, az epithelialis, illetve a mesenchymalis sejtekben expresszálandó plazmid, illetve egy, ubiquitin promótert tartalmazó, valamennyi szövetben kifejeződő plazmid hatása kerül bemutatásra.

Tol2 rendszerben alacsonyabb szintű toxicitást vártunk, mint a QF2 rendszerben. Mivel a QF2 rendszer toxicitása csak az ubiquitin promótert tartalmazó plazmidok injektálása esetén mutatott szignifikáns eltérést, így csak ezt vizsgáltuk meg a Tol2 rendszer vonatkozásában is. Az injektáláshoz használt plazmidokat Gibson klónozással a gyártó protokollja (New England Biolabs-Kvalitex-E2621S-NeBuilder HIFI DNA Assembly Master Mix) szerint készítettük el.

A kísérlet során kétféle kontroll csoport készült. A Kontroll-1 csoportba nem injektált, de ugyanazon körülmények között felnevelt halak kerültek. Szerepük elsősorban az injektálás során okozott mechanikai sérülés túlélésre gyakorolt hatásának a vizsgálata volt. A Kontroll-2 csoport halait 100mM-os KCl-dal (Reanal Laborvegyszer:18050-0-01-38-Kálium-klorid 1000g) és transzpozáz enzimet kódoló mRNS-sel injektáltuk. Utóbbi csoport kifejezetten a plazmidok toxikusságának mértékét jelző kontrollként szolgált.

4.1.1. Plazmidok előkészítése

Az injektáláshoz 10,85ng/μl koncentrációjú plazmid DNS-t valamint transzpozáz RNS-t tartalmazó injektáló mixet készítettünk. Annak érdekében, hogy az injektáláskor a halikrák izotóniás sókoncentrációja ne tolódjon el, az injektálómixet 100mM koncentrációjú KCl (Reanal Laborvegyszer:18050-0-01-38-Kálium-klorid 1000g) oldatba mértük össze. Az injektáló folyadékokat az injektálás előtt készítettük el, és injektálásig jégen tároltuk.

4.1.2. Ívatás és az ikrák begyűjtése

Az ívatáshoz az injektálást megelőző nap minden ívatókádba (**9. ábra**) 2 nőstény és 2 hím halat helyeztünk, elszeparálva egymástól az ellentétes neműeket. Mivel az ikrák mennyiségét és minőségét rendkívül sok tényező befolyásolja, ezért ügyeltünk arra, hogy a legéletképesebb, egy héten belül nem ívott halakat válogassuk össze, figyelmet fordítva az életkorok heterogenitására is. A felnőtt egyedek ikrafalók, ezért az ívatókádak ki voltak

egészítve egy belső, rácsos falú, műanyag tartállyal is, ami meggátolta, hogy a halak hozzáférjenek az ikrákhoz [33, 34].



9. ábra AB (vad típusú) nőstények (bal oldalon) és Casper (pigmenthiányos mutáció) hímek (jobb oldalon) az ivatás előtti napon ivatókádban a Semmelweis Egyetem állatházában.

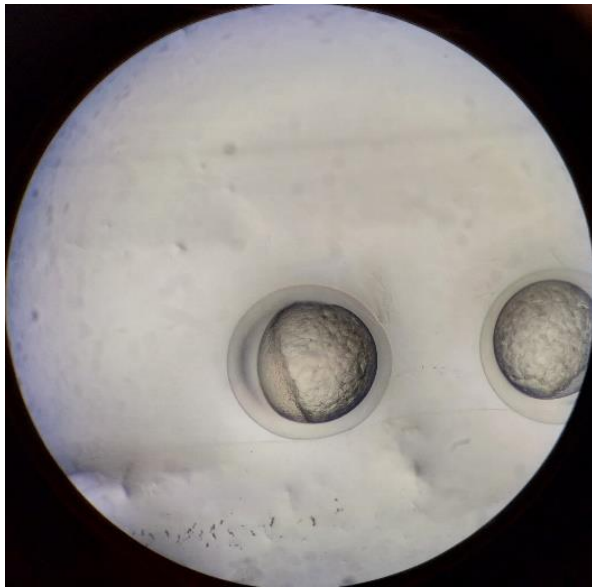
Másnap reggel az egy tankba válogatott nőstényeket és hímeket összeengedtük, majd átlagosan 10-20 perccel az ívást követően egy szűrő segítségével az ikrákat metilénkéket tartalmazó E3 mediummal (KCl - Reanal Laborvegyszer:18050-0-01-38-Kálium-klorid 1000g, NaCl – Reanal Laborvegyszer:24640-0-01-38-Nátrium-klorid 1000g, MgSO₄ - 20342-0-27-38-Magnézium-szulfát, vízmentes 1000g, CaCl₂ x 2H₂O – Sigma Aldrich:C7902-1kg-calcium chloride dihydrate, 1 kg) feltöltött Petri-csészékbe gyűjtöttük.

4.1.3. Injektálás

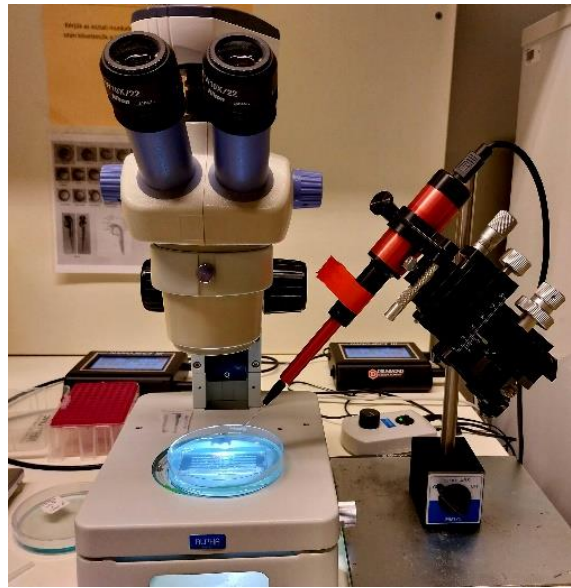
A frissen begyűjtött ikrákat, egysejtes stádiumban (**10. ábra**) mikroinjektor (Nanoject III, Drummond) (**11. ábra**) segítségével injektáltuk a plazmida és transzpozáz enzimet kódoló mRNS-sel. Az injektáláshoz a szűrési csatornát és az injektáló folyadék sejtbe való bejuttatását a mikroinjektorhoz csatlakoztatott üvegkapillárisal végeztük, melyet az előkészítés során olajjal (Bondex Szilikontechnika: Rubosil 0-100 Metil Szilikonolaj, 100ml), illetve az előkészített injektáló folyadékkal töltöttünk fel levegőmentesen.

Az ikrákat agarózt tartalmazó injektáló lemezre (Biocenter/Lonza:50004 – SeaKem LE Agarose 500g) helyeztük, és műanyag pipetta segítségével szabályos sorokba rendeztük. Az injektálás során 2,3 nl injektáló folyadékot juttattunk a chorionon, valamint a szikanyagon keresztül a sejtbe 70 nL/sec sebességgel, ügyelve arra, hogy minden embriót csak egyszer szűrjünk meg, illetve minél kisebb mértékű mechanikai sérülést okozunk [35].

Miután minden ikrát injektáltunk, a lemezről Petri-csészébe mostuk le őket.



10. ábra Egysejtes állapotban levő zebrahal ikrá, ahol látható a chorion, a szikhólyag és az injektálendő sejt (saját fotó).



11. ábra Az injektáláshoz előkészített Nanoject III mikroinjektor az agaróz tartalmú lemezen elhelyezett zebrahal ikrákkal (saját fotó).

4.1.4. Inkubáció és marker vizsgálat

A terméketlen, illetve az injektálást követően közvetlenül elpusztult ikrákat eltávolítottuk. A többit felcímkézett Petri-csészékben 5 napra 28 °C-os inkubátorba helyeztük. Az injektálást követő nap a Petri-csészékből az elpusztult egyedeket leválogattuk. A 3. napon a lárvákat Olympus MVX10 Macro Zoom fluoreszcens mikroszkóp alatt, zöld fényben vizsgáltuk. 5 napos korukban azok az egyedek kerültek le az állatházba további monitorozásra, amelyeknél megfigyelhető volt a plazmidtörzsben kódolt marker. QF2 rendszerben egy szívspecifikus GFP, míg Tol2 rendszer esetén az adott promóter által meghatározott, szövetspecifikus EGFP fehérje jelenlétét kerestük (12-13. ábra).



12. ábra Marker jelenlétének vizsgálata Olympus MVX10 fluoreszcens mikroszkóp alatt (saját fotó).



13. ábra Szívspecifikus GFP markert hordozó 4 napos lárvák 488nm hullámhosszú fényben fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgálva (saját fotó).

4.1.5. Monitorozás

Az állatházban halvonalaknak, valamint életkoruknak megfelelően elkülönített, 1,8 literes tartályokba kerültek. Környezetük, a világos (14 óra) és sötét órák (10 óra) száma, a hőmérséklet (26,5-28 °C), a víz oldott ion tartalma (konduktancia: 500-550 mS), a víz pH-ja (6,8-7,5) szabályozott és állandó volt a kísérlet folyamán. A keringtető rendszer folyamatosan szűrte és oxigenizálta a tartályok vizét.

A tankokat átlagosan 3-5 naponta ellenőriztük, feljegyeztük az elhullott egyedek, illetve az életben levők számát. A túlélés monitorozását az állatházba leválogatott 5 napos zebrahalakon kezdtük meg. Ennek oka az volt, hogy kiszűrjük a kísérletből azokat, az ikrák kezdeti fejlődési szakaszát befolyásoló tényezőket (pl: rossz minőségű vagy terméketlen ikrák), amelyek eltorzították volna az injektálás statisztikai eredményeit. A túlélési adatok gyűjtését az állatok 45 napos koráig végeztük. Ekkorra már jelentősebb elhullás nem volt tapasztalható.

4.1.6. Statisztikai elemzés

A halak 40 napos monitorozása során nyert adatok alapján végeztük el a kumulatív hazard valószínűségek számítását a kontroll csoportokra, illetve minden transzgenikus halvonalra vonatkozóan. Az adataink a 3-5 napos megfigyelési időszakoknak megfelelően, időintervallumonként tartalmazzák az elpusztult egyedek számát.

A zebrahalak túlélését a halandósági tábla módszerével elemeztük, mely során meghatároztuk az adott időintervallumban elpusztult halak arányát (q), az adott időintervallumban a kockázatnak kitett halak közül a túlélő egyedek arányát (p), valamint a túlélési valószínűséget (S = az intervallumokban túlélő egyedek arányának szorzata)[36].

Továbbá, minden csoporthoz túlélési görbét rendeltünk, ahol az idő függvényében ábrázoltuk a túlélés valószínűségét. A statisztikai szignifikancia kimutatására Peto-Wilcoxon tesztet alkalmaztunk.

4.2. Az expresszió vizsgálata spinning-disk konfokális mikroszkóppal

Az expresszió mértékének vizsgálata során a promóterek által meghatározott sejtek citoplazmájában expresszálandó, zöld mNeonGreen, EGFP, valamint a megfelelő sejtek sejtmagjában kifejeződő, vörös mKate fehérjék jelenlétét vizsgáltuk 3 napos, injektált lárvákban [25].

Az injektálás folyamata és az inkubáció a toxicitás mértékét meghatározó vizsgálatoknál leírt módon zajlottak.

A QF2 rendszerben az ubiquitin, Krt4 és ITGA11 promótereket tartalmazó plazmidokat AB, valamint olyan transzgenikus hal keresztezéséből származó ikrákba injektáltuk, amely hordozza a QUAS promóterrel rendelkező mNeonGreen, illetve mKate fehérjéket.

A Tol2 rendszer esetében AB és Casper egyedeket keresztezve begyűjtött ikrákba történt az injektálás szintén az ubiquitin, Krt4, továbbá ITGA11 promóterekkel és Tol2 transzpozonnal rendelkező plazmidokkal.

Az injektálást és a 3 napos inkubációt követően az expressziót mutató lárvák közül kiválasztottunk 2-3 egyedet. A felvételek elkészítése előtt a lárvákat 0,2 mg/ml Tricaine-t (Sigma – Aldrich: E10521–50G-Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate, 50g) tartalmazó E3 hal embriómédiumba altattuk el. Ezt követően üvegfenekű kamrába, E3 medium (KCl - Reanal Laborvegyszer:18050-0-01-38-Kálium-klorid 1000g, NaCl – Reanal Laborvegyszer:24640-0-01-38-Nátrium-klorid 1000g, MgSO₄ - 20342-0-27-38-Magnézium-szulfát, vízmentes 1000g, CaCl₂ x 2H₂O – Sigma Aldrich:C7902-1kg-calcium chloride dihydrate, 1 kg) alapú 1%-os alacsony olvadáspontú agarózba (Zellbio: A-204-100 – Low Melt Agarose) ágyaztuk a halakat **(14.ábra)**.



14. ábra 1%-os agarózba ágyazott 3 napos zebrahal lárvák (saját fotó).

A felvételeket egy Nikon Eclipse Ti2 inverz mikroszkóp segítségével készítettük, mely motoros piezo-állvánnyal, Yokogawa CSU-W1 forgólemezes pásztázófejjel, valamint 2 hátulról megvilágított Photometrics Prime BSI scientific CMOS-kamerával rendelkezik. A felvételekhez 40x ApoLambda/NA1.15 és 10x ApoLambda/NA0.95 objektíveket használtunk, azok rögzítését pedig NIS Elements AR 5.4 szoftverrel végeztük [37].

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1. A toxicitás vizsgálata során kapott eredmények

A toxicitás vizsgálata során a QF2 rendszerben injektált plazmidok hatását az alábbi halandósági táblák, illetve túlélési görbék mutatják. A statisztikai szignifikancia, valamint a túlélési görbék meghatározása során is a Kontroll-2 csoporthoz viszonyítottuk a plazmiddal injektált transzgenikus vonalak és a Kontroll-1 csoport túlélését is.

A halandósági tábla alkalmazása során a teljes, 40 napos megfigyelési időszakot kisebb időintervallumokra osztottuk, melyek során feljegyeztük az élő (N) és az elpusztult (D) egyedek számát. Ezekből az adatokból számítottuk ki az adott időintervallumra vonatkozó elhullások (q), valamint túlélések arányát (p). Az intervallumok túlélési arányainak szorzata, pedig megmutatja, hogy a kockázatnak kitett egyedek az injektálástól/ívástól számított 45 napos korukig, mekkora valószínűséggel maradtak életben [36].

Továbbá, megadtuk minden vizsgált csoportnál a standard hibát (SE), illetve a 95%-os konfidencia-intervallumot (95% KI_a, 95% KI_f) is.

5.1.1. Kontroll csoportok eredményei

Az injektálás okozta mechanikai sérülés hatásának felmérése céljából hasonlítottuk össze a kontroll csoportokat. A Kontroll-2 csoport egyedei **27,3 %-os** valószínűséggel élték meg a megfigyelési időszak végét (**1. táblázat**). Kiugróan magas elhullással járó időszak nem volt tapasztalható a 40 nap során. Továbbá, a táblázat adatai szerint közvetlenül az injektálást követő első hét végén is több, mint 86%-os volt a túlélési valószínűség.

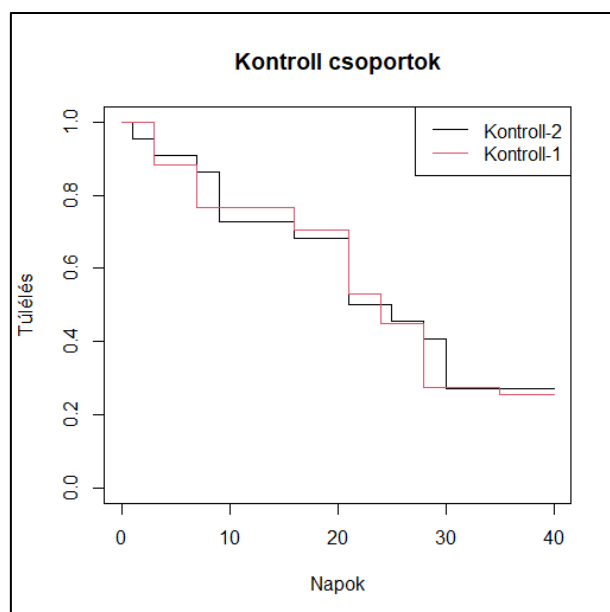
A nem injektált Kontroll-1 (K-1) csoport esetén 4-5 naposan az állatházba lekerült 51 zebrahalból 13, azaz **25,5%-uk** élte meg a másfél hónapos kort, mely közel azonos a másik kontroll csoport eredményeivel (**2. táblázat**).

1. táblázat A Kontroll-2 csoport halandósági táblázata, ahol t = idő (napok), N = az életben levő halak száma, D = az elpusztult egyedek száma, q = az adott időintervallumban elpusztult egyedek aránya, p = az adott időintervallumban a túlélő egyedek aránya, $S(t)$ = túlélési valószínűség, SE = standard hiba, $95\% KI_a$ = 95% Konfidencia-intervallum alsó határa, $95\% KI_f$ = 95% Konfidencia-intervallum felső határa [36].

K-2	t	N	D	q= d/n	p=(1-q)	S (t)	SE	95% KI _a	95% KI _f
	0-2.	22	1	0,045	0,955	0,955	0,044	0,871	1,000
	3-6.	21	1	0,048	0,952	0,909	0,061	0,797	1,000
	7-8.	20	1	0,050	0,950	0,864	0,073	0,732	1,000
	9-14.	19	3	0,158	0,842	0,727	0,095	0,563	0,939
	15-20.	16	1	0,063	0,938	0,682	0,107	0,513	0,907
	21-24.	15	4	0,267	0,733	0,500	0,106	0,329	0,759
	25-27.	11	1	0,091	0,909	0,455	0,105	0,288	0,718
	28-29.	10	1	0,100	0,900	0,409	0,095	0,248	0,676
	30-34.	9	3	0,333	0,667	0,273	0,044	0,138	0,540
	35-40.	6	0	0,000	1,000	0,273	0,061	-	-

2. táblázat A Kontroll-1 csoport halandósági táblázata, ahol t = idő (napok), N = az életben levő halak száma, D = az elpusztult egyedek száma, q = az adott időintervallumban elpusztult egyedek aránya, p = az adott időintervallumban a túlélő egyedek aránya, $S(t)$ = túlélési valószínűség, SE = standard hiba, $95\% KI_a$ = 95% Konfidencia-intervallum alsó határa, $95\% KI_f$ = 95% Konfidencia-intervallum felső határa [36].

K-1	t	N	D	q= d/n	p=(1-q)	S (t)	SE	95% KI _a	95% KI _f
	0-3.	51	6	0,118	0,882	0,882	0,045	0,798	0,975
	4-7.	45	6	0,133	0,867	0,765	0,059	0,657	0,890
	8-16.	39	3	0,077	0,923	0,706	0,064	0,591	0,843
	17-21.	36	9	0,250	0,750	0,529	0,070	0,409	0,686
	22-24.	27	4	0,148	0,852	0,451	0,070	0,333	0,610
	25-28.	23	9	0,391	0,609	0,275	0,063	0,176	0,429
	29-35.	14	1	0,071	0,929	0,255	0,061	0,159	0,408
	36-40.	13	0	0,000	1,000	0,255	-	-	-



15. ábra A Kontroll-1 és a Kontroll-2 csoport túlélési görbéje a túlélési valószínűség és az idő függvényében.

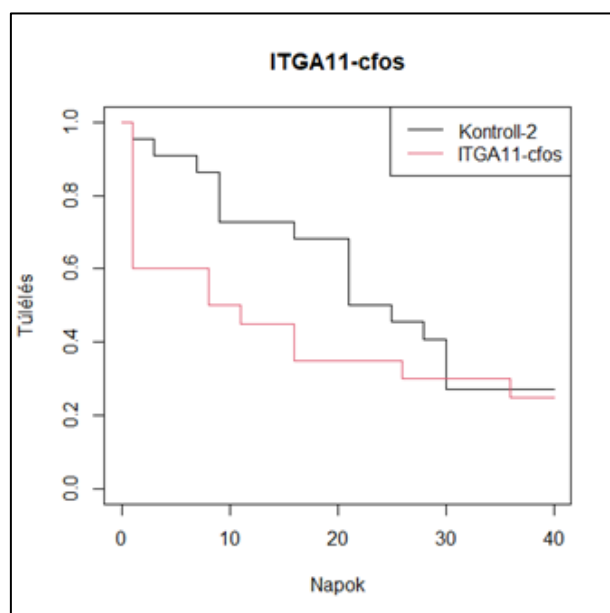
Összehasonlítva a kontroll csoportok túlélési görbéit jelentős különbség nem igazolható közöttük (**15. ábra**). Ennek statisztikai analizálására Peto-Wilcoxon tesztet használtunk, mely kimutatta, hogy a két csoport közt valóban nincs szignifikáns eltérés ($p=0,8$).

5.1.2. A toxicitás vizsgálatának eredményei QF2 rendszerben

Az ITGA11 promóter esetében összesen 20 GFP szívspecifikus markerfehérjét expresszáló 4-5 napos egyedeket tudtunk leválogatni monitorozásra (**3. táblázat**). Az injektált állatok az első hetet az állatházban közel 60%-os valószínűséggel élték túl, mely a 10. nap környékén 50%-ra csökkent. Ezt követően viszont hirtelen jelentkező, egy-két egyednél többet érintő elhullás már nem volt tapasztalható. A számítások alapján annak a valószínűsége, hogy ezzel a plazmiddal injektált halak az injektálást követően 45 napot túléljenek 25%. Bár szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni a Kontroll-2 csoport túlélésével összevetve ($p=0,08$), a görbék között egészen a 30. napig láthatunk nagyobb eltérést (**16. ábra**).

3. táblázat ITGA11-cfos promóterrel rendelkező plazmiddal injektált halakra vonatkozó túlélési adatok (t = idő (napok), N = az életben levő halak száma, D = az elpusztult egyedek száma, q = az adott időintervallumban elpusztult egyedek aránya, p = az adott időintervallumban a túlélő egyedek aránya, $S(t)$ = túlélési valószínűség, SE = standard hiba, $95\% KI_a$ = 95% Konfidencia-intervallum alsó határa, $95\% KI_f$ = 95% Konfidencia-intervallum felső határa [36])

ITGA11 -cfos	t	N	D	q=D/N	p=1-q	S(t)	SE	95% KI _a	95% KI _f
	0-7.	20	8	0,400	0,600	0,600	0,110	0,420	0,858
	8-10.	12	2	0,167	0,833	0,500	0,112	0,323	0,775
	11-13.	10	1	0,100	0,900	0,450	0,111	0,277	0,731
	14-20.	9	2	0,222	0,778	0,350	0,107	0,193	0,636
	21-28.	7	1	0,143	0,857	0,300	0,103	0,154	0,586
	29-39.	6	1	0,167	0,833	0,250	0,097	0,117	0,534
	40.-	5	0	0,000	1,000	0,250	-	-	-



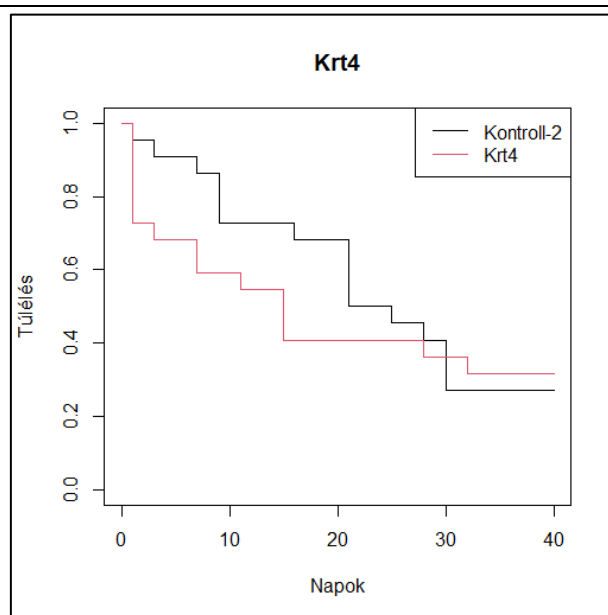
16. ábra ITGA11-cfos promótert tartalmazó plazmiddal injektált halak és a Kontroll-2 csoport túlélési görbéje a túlélési valószínűség és az idő függvényében.

Az epithelialis sejtekben kifejeződő plazmid hatásának vizsgálata során az első két napban tapasztaltunk nagyobb arányú elhullást (6 egyed) (**4. táblázat**). A monitorozás 7-10. napján az állatok közel 60%-a volt még életben. A túlélési görbén megfigyelhető, hogy

hózzávetőlegesen a 30. nap környékéig mutattak alacsonyabb túlélési valószínűséget a plazmával injektált halak a kontroll csoportnál **(17. ábra)**. A számított értékek alapján 31,8%-os valószínűséggel élték meg a másfél hónapos kort ezek a halak. A Kontroll-2 csoporthoz viszonyítva szignifikáns különbséget nem találtunk ($p=0,3$).

4. táblázat A táblázat a *Krt4* promótert tartalmazó plazmával injektált halak túlélési adatait tartalmazza. (t = idő (napok), N = az életben levő halak száma, D = az elpusztult egyedek száma, q = az adott időintervallumban elpusztult egyedek aránya, p = az adott időintervallumban a túlélő egyedek aránya, $S(t)$ = túlélési valószínűség, SE = standard hiba, 95% KI_a = 95% Konfidencia-intervallum alsó határa, 95% KI_f = 95% Konfidencia-intervallum felső határa [36])

Krt4	t	N	D	$q=D/N$	$p=1-q$	$S(t)$	SE	95% KI_a	95% KI_f
	0-2.	22	6	0,273	0,727	0,727	0,095	0,563	0,939
	3-6.	16	1	0,063	0,938	0,682	0,099	0,513	0,907
	7-10.	15	2	0,133	0,867	0,591	0,105	0,417	0,837
	11-14.	13	1	0,077	0,923	0,545	0,106	0,372	0,799
	15-20.	12	3	0,250	0,750	0,409	0,105	0,248	0,676
	21-31.	9	1	0,111	0,889	0,364	0,103	0,209	0,632
	32-34.	8	1	0,125	0,875	0,318	0,099	0,173	0,587
	35-40.	7	0	0,000	1,000	0,318	-	-	-

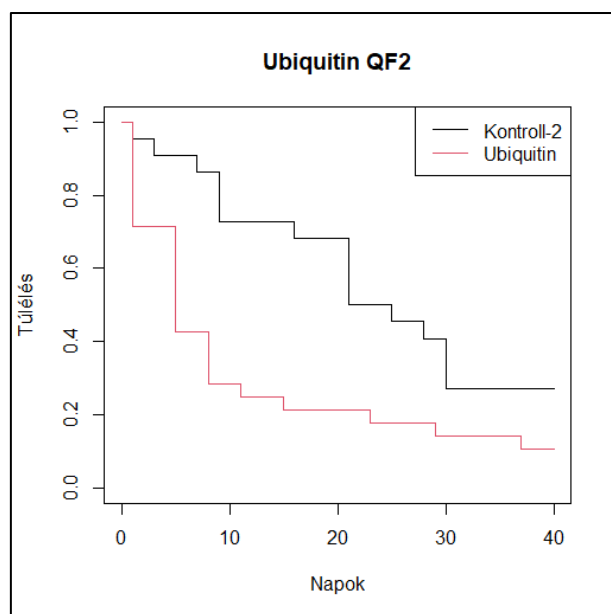


17. ábra A *Krt4* promótert tartalmazó plazmával injektált halak és a Kontroll-2 csoport túlélési görbéje.

A QF2 rendszerben ubiquitin promóterrel rendelkező plazmával injektált halaknál már az első héten jelentősebb elhullás volt megfigyelhető, mint a többi transzgenikus vonalnál (**5. táblázat**). Az első hét során a halak közel 60%-a elpusztult, mely a 10. nap környékére már 70% fölötti értéket ért el. A Kontroll-2 csoporthoz viszonyított jelentős különbség a túlélési görbén is megfigyelhető (**18. ábra**). Továbbá, Peto-Wilcoxon teszttel szignifikáns különbséget is kimutattunk ($p=0,0009$).

5. táblázat QF2 rendszerben általános expressziót kiváltó, ubiquitin (Ubi_{QF2}) promóter tartalmú plazmával injektált halak túlélési adatai. (t = idő (napok), N = az életben levő halak száma, D = az elpusztult egyedek száma, q = az adott időintervallumban elpusztult egyedek aránya, p = az adott időintervallumban a túlélő egyedek aránya, $S(t)$ = túlélési valószínűség, SE = standard hiba, $95\% KI_a$ = 95% Konfidencia-intervallum alsó határa, $95\% KI_f$ = 95% Konfidencia-intervallum felső határa [36])

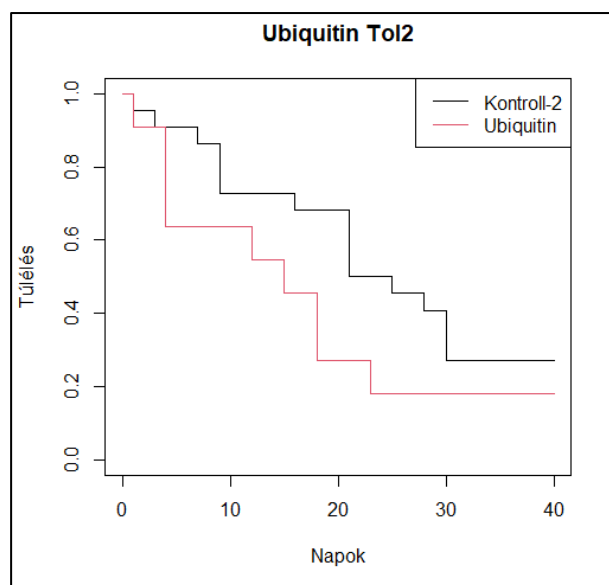
Ubi_{QF2}	t	N	D	$q=D/N$	$p=1-q$	$S(t)$	SE	95% KI_a	95% KI_f
	0-4.	28	8	0,286	0,714	0,714	0,085	0,565	0,903
	5-7.	20	8	0,400	0,600	0,429	0,094	0,279	0,657
	8-10.	12	4	0,333	0,667	0,286	0,085	0,159	0,513
	11-14.	8	1	0,125	0,875	0,250	0,082	0,132	0,475
	15-19.	7	1	0,143	0,857	0,214	0,078	0,105	0,436
	20-25.	6	1	0,167	0,833	0,179	0,072	0,081	0,395
	26-32.	5	1	0,200	0,800	0,143	0,066	0,058	0,354
	33-39.	4	1	0,250	0,750	0,107	0,059	0,039	0,312
	40.-	3	0	0,000	1,000	0,107	-	-	-



18. ábra Ubiquitin promóterrel rendelkező halak túlélési görbéje QF2 rendszerben.

5.1.3. A toxicitás vizsgálatának eredménye Tol2 rendszerben

A Tol2 rendszerben alkalmazott ubiquitin promóteres plazmidok kisebb arányú elhullást okoztak, mint a QF2 rendszerben bemutatott párja. A Tol2 esetében az első héten az állatok több, mint 60%-a túlélte **(6. táblázat)**. Annak a valószínűsége, hogy ezek a halak túlélnek a 40 napos monitorozási időszakot 18,2%. Ez ugyan alacsonyabb százalék, mint amit a többi csoportnál tapasztaltunk, de még mindig magasabb, mint QF2 rendszerben, illetve a Kontroll-2 csoporthoz viszonyítva sem találtunk szignifikáns különbséget ($p=0,1$) **(19. ábra)**.



19. ábra Ubiquitin promóterrel rendelkező plazmiddal injektált halak túlélési görbéje viszonyítva a Kontroll-2 csoporthoz.

6. Táblázat Ubiquitin promótert tartalmazó plazmid hatása zebrahalak túlélésére Tol2 rendszerben. (t = idő (napok), N = az életben levő halak száma, D = az elpusztult egyedek száma, q = az adott időintervallumban elpusztult egyedek aránya, p = az adott időintervallumban a túlélő egyedek aránya, $S(t)$ = túlélési valószínűség, SE = standard hiba, 95% KI_a = 95% Konfidencia-intervallum alsó határa, 95% KI_f = 95% Konfidencia-intervallum felső határa [36])

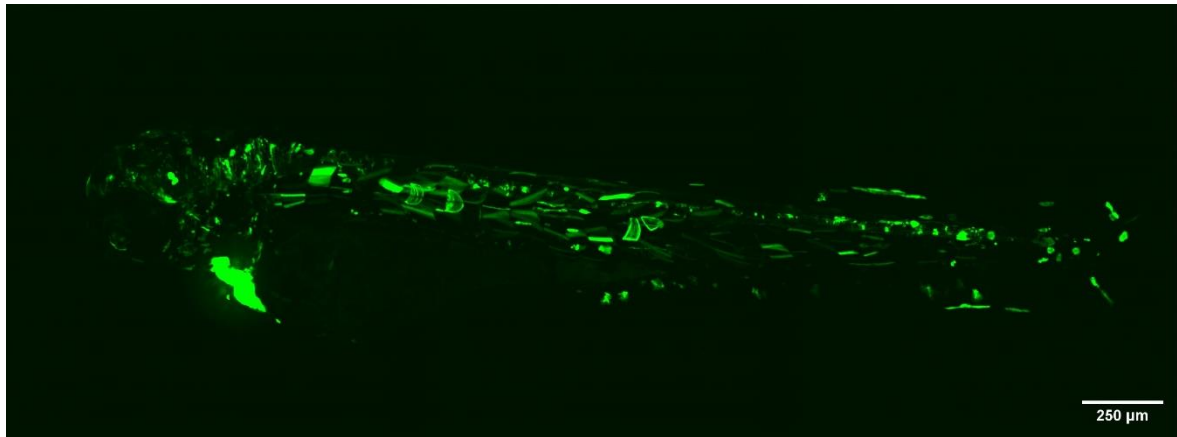
Ubi_{TOL2}	t	N	D	$q=D/N$	$p=1-q$	$S(t)$	SE	95% KI_a	95% KI_f
	0-3.	11	1	0,091	0,909	0,909	0,087	0,754	1,000
	4-7.	10	3	0,300	0,700	0,636	0,145	0,407	0,995
	8-14.	7	1	0,143	0,857	0,545	0,150	0,318	0,936
	15-17.	6	1	0,167	0,833	0,455	0,150	0,238	0,868
	18-19.	5	2	0,400	0,600	0,273	0,134	0,104	0,716
	20-29.	3	1	0,333	0,667	0,182	0,116	0,052	0,637
	30-40.	2	0	0,000	1,000	0,182	0,087	0,754	1,000

5.2. Az expresszió mértékének vizsgálata során kapott eredmények F0 generációban

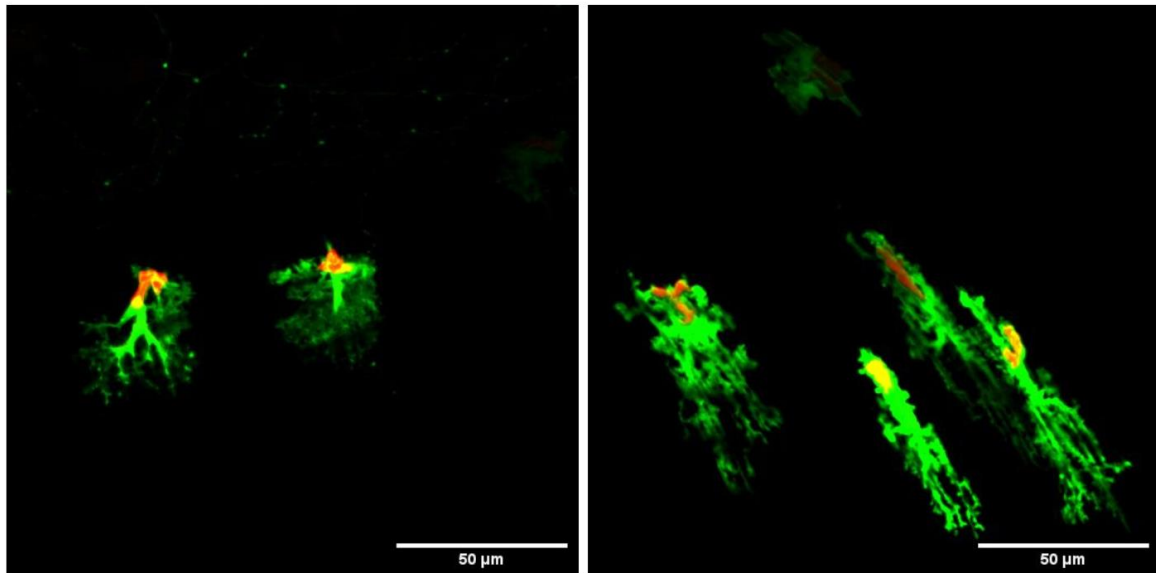
A spinning-disk konfokális mikroszkóppal készült felvételek során megfigyelhetjük, hogy a QF2 rendszerben használt mNeonGreen, valamint mKate fluoreszcens fehérjék, illetve a Tol2 rendszerben alkalmazott EGFP, mely szövetekben, milyen expressziós szinteket ér el, mennyire okoz mozaikos expressziót, illetve tesztelhetjük a promóterek szövetspecifikusságát is.

5.2.1. ITGA11-cfos promóterrel rendelkező plazmid expressziós felvételei QF2 rendszerben

A felvételeken megfigyelhető az erős, bár mozaikos expresszió elsősorban a fibroblast sejtekben (**21. ábra**), azonban látható, hogy az izomsejtekben, és az idegsejtekben is (**20. ábra**) megjelenik az expresszió. Mivel ezek injektált, F0 nemzedékbe tartozó halak, így az injektálás velejárója némi fokú aspecifitás, mely azonban az F1 hordozó nemzedékben már nem lesz jelen. Az mKate fluoreszcens fehérje a sejtmagvakban, míg az mNeonGreen a citoplazmában expresszáldott a fehérjékhez kapcsolt targetszekvenciáknak köszönhetően.



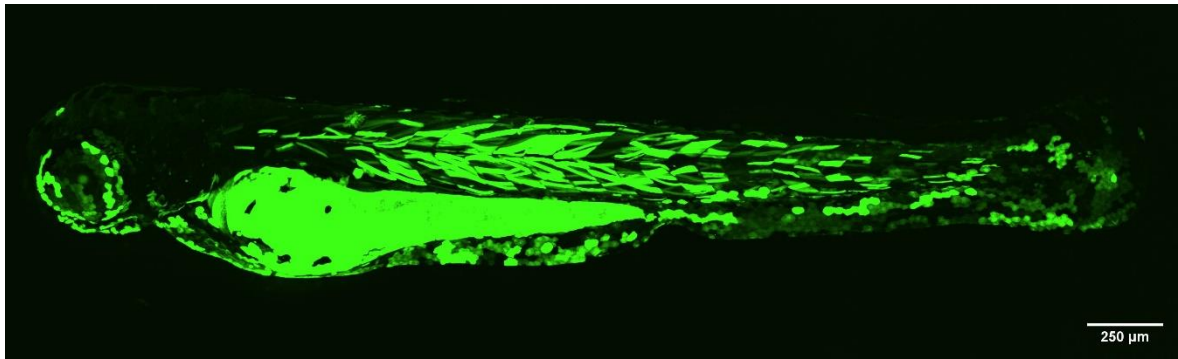
20. ábra ITGA11-cfos promóterrel és QF2 transzkripcionális aktivátort tartalmazó plazmiddal injektált, és QUAS promótert, valamint mNeonGreen-t és mKate-t kódoló génszakaszt hordozó 3 napos lárva (balról jobbra haladva: fej, törzs, farokúszó).



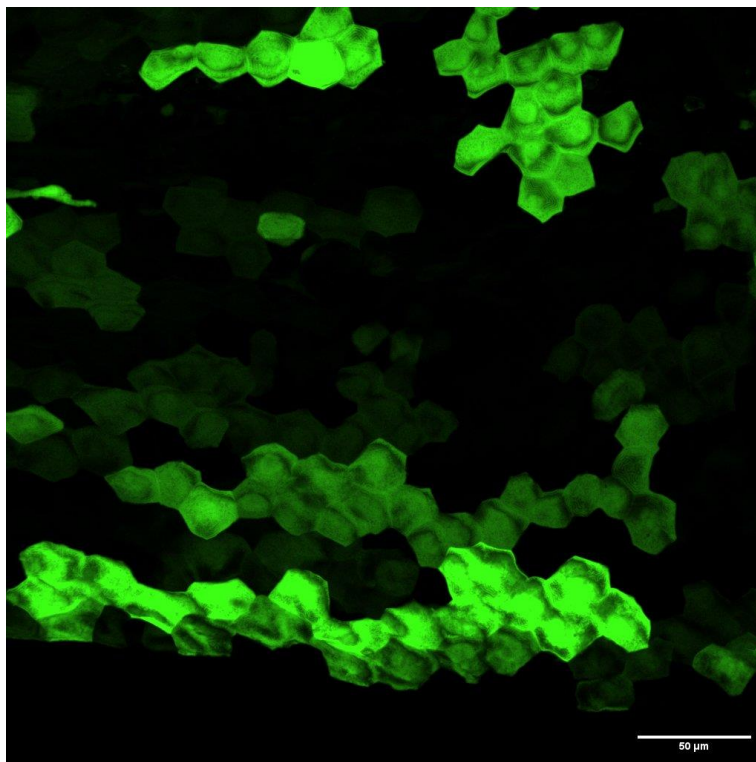
21. ábra 3 napos lárváról spinning-disk konfokális mikroszkóppal készült felvételek, melyeken a zöld mNeonGreen (citoplazmában), illetve a vörös mKate (sejtmagban) expresszióját láthatjuk fibroblast sejtekben.

5.2.2. ITGA11-cfos promóterrel rendelkező plazmidok expressziós felvételei Tol2 rendszerben

Bár az ITGA11-cfos promóter szabályozó funkciója miatt elsősorban fibroblastokban és izomsejtekben kellene az EGFP zöld fluoreszcens fehérjének megjelenni, itt epithelialis sejtekben is látunk expressziót (**22. ábra**). A farokúszó esetében is az epithelialis sejtekben történő, mozaikos expresszió volt a jellemző (**23. ábra**).



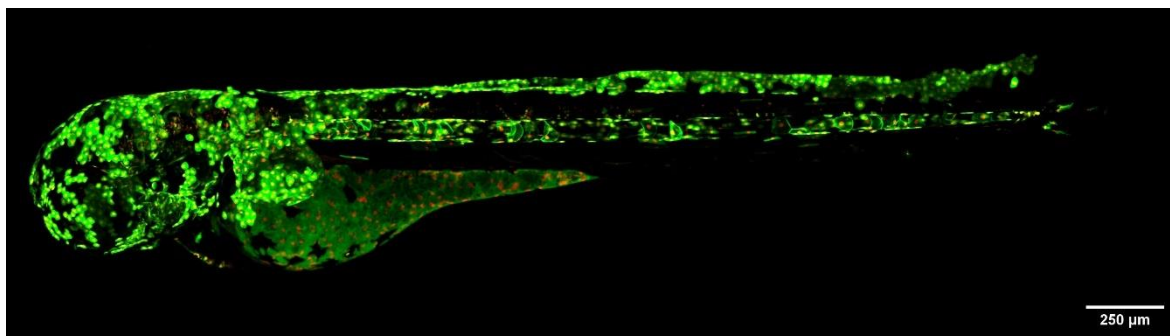
22. ábra ITGA11-cfos promótert tartalmazó plazmiddal injektált háromnapos lárváról készült spinning-disk konfokális mikroszkópos felvétel (balról jobbra: fej, törzs, farokúszó).



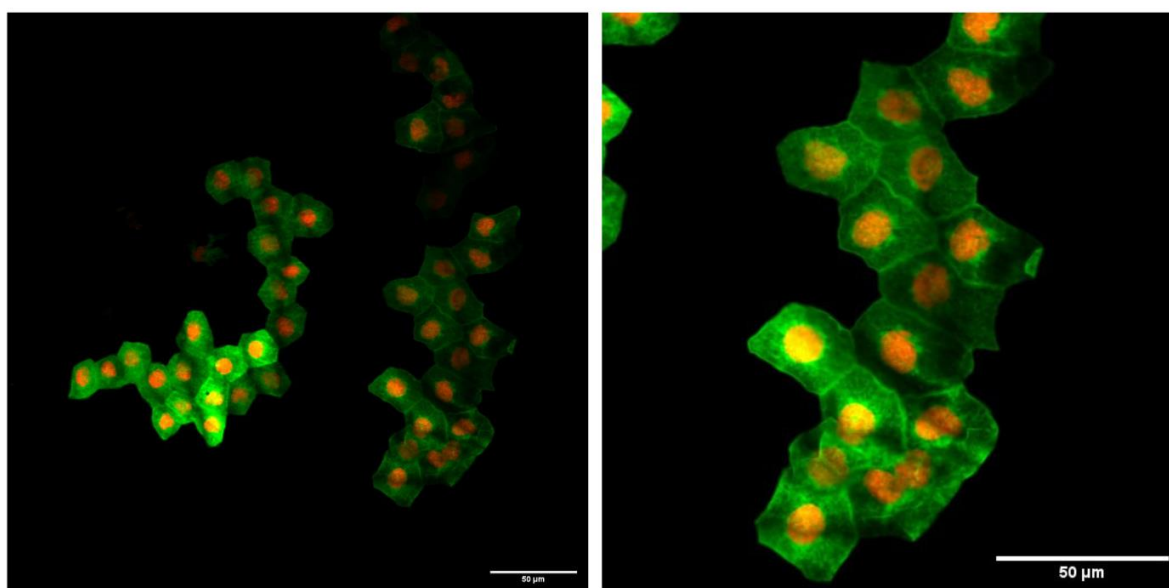
23. ábra IITGA11-cfos promóter mellett epithelialis sejtekben expresszáldó EGFP fluoreszcens fehérje zebradánió lárvában.

5.2.3. Krt4 promóterrel rendelkező plazmid expressziója QF2 rendszerben

Mindhárom felvételen egy erős expressziót detektálhatunk az epithelialis sejtekben (**24-25.ábra**). Bár a Keratin 4 fehérje elsősorban a felületes epithelialis sejtrétegben fordul elő, ebben az esetben látunk expressziót néhány fibroblast-, izom- és idegsejtben is.



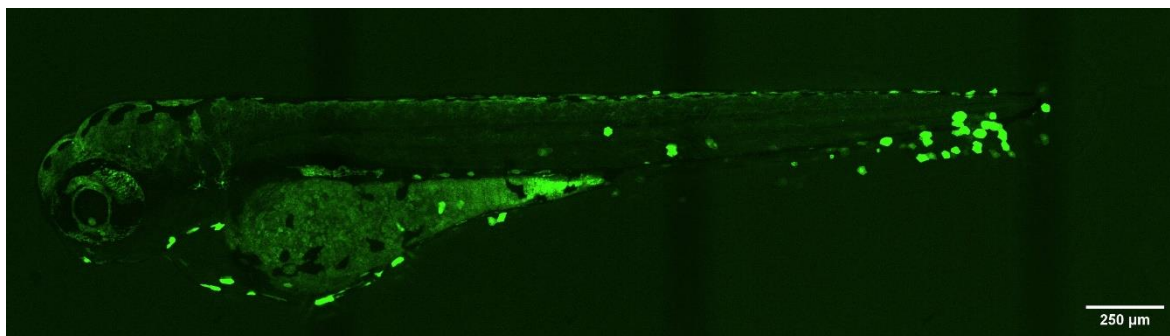
24. ábra Szövetspecifikusan elsősorban epithelialis sejtekben expresszáldó mNeonGreen, valamint mKate fluoreszcens fehérjék 3 napos lárvában.



25. ábra 3 napos lárvá farokúszójáról készült spinning-disk konfokális mikroszkópos felvételek, melyeken vörös, sejtmagi mKate-t, valamint citoplazmában kifejeződő mNeonGreen-t láthatunk epithelialis sejtekben.

5.2.4. Krt4 promóterrel rendelkező plazmid kódolta gén expressziója Tol 2 rendszerben

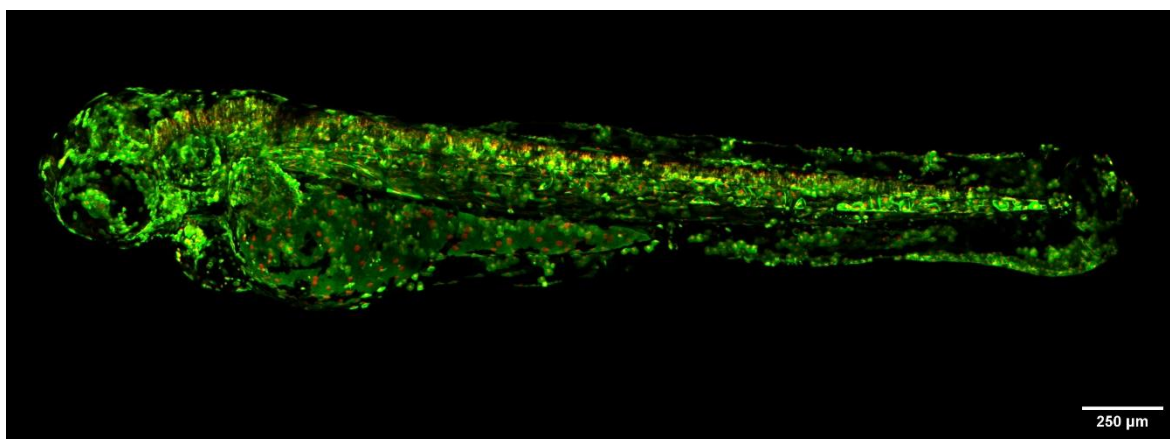
Ezen a felvételen egy viszonylag gyenge, mozaikos expressziót láthatunk elsősorban epithelialis sejtekben. Összehasonlítva a QF2 rendszerben mért expresszióval, előbbi jóval nagyobb mértékű volt (**26. ábra**).



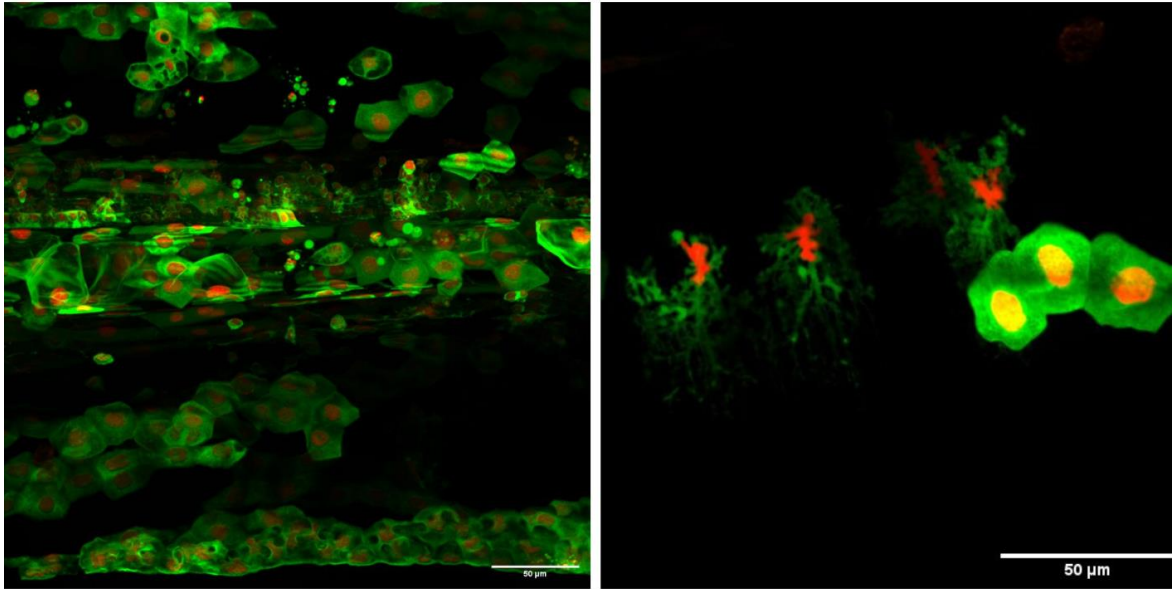
26. ábra Epithelialis sejtekben látható expresszió Tol 2 rendszerben 3 napja injektált lárva esetében.

5.2.5. Ubiquitin promóterrel rendelkező plazmid esetén mért expresszió QF2 rendszerben

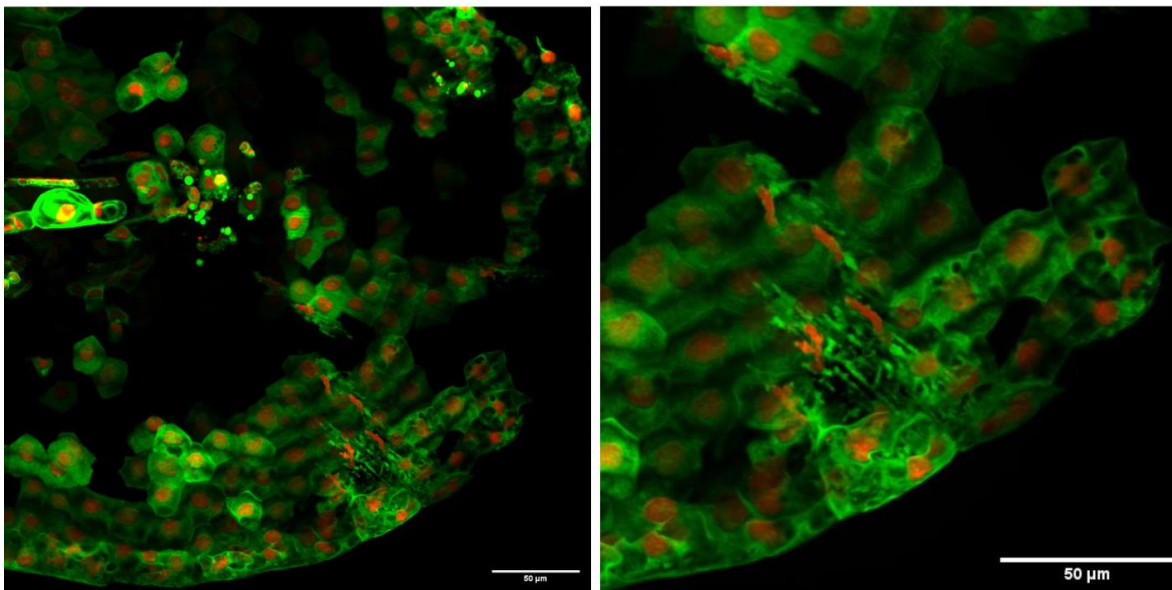
QF2 rendszerben az ubiquitin promóterrel a felvételeken is látható erős és általános, valamennyi sejtben jelen levő expressziót mértünk (**27. ábra**). Az idegsejtek, azok axonjai, a fibroblastok, az izomsejtek, illetve az epithelialis sejtek esetén is erőteljes expressziót figyeltünk meg (**28-29. ábra**).



27. ábra 3 napos lárvában látható általános mKate és mNeonGreen expresszió az ubiquitin promóternek köszönhetően (balról jobbra: fej, törzs, farokúszó).



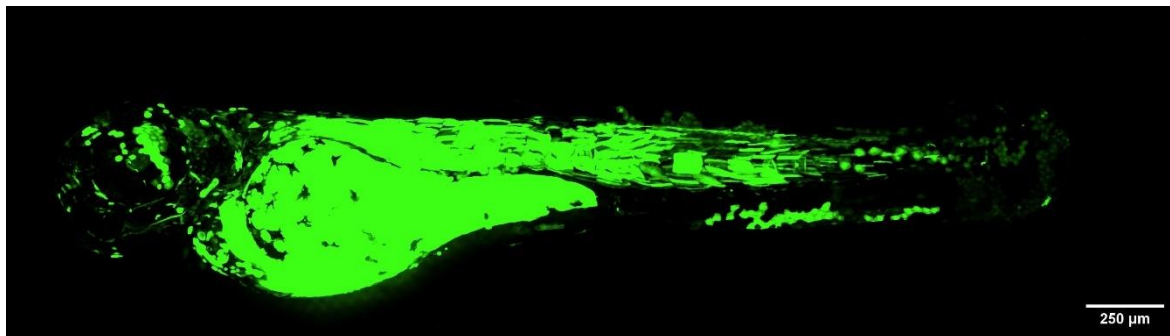
28. ábra Ubiquitin promóter alkalmazásával elért általános expresszió különböző sejtípusokban. Bal oldali képen idegsejtekben, izomsejtekben, epithelialis sejtekben és néhány fibroblastban is, míg a jobb oldali képen fibroblastokban és epithelialis sejtekben látható expresszió.



29. ábra Farokúszó különböző sejtjeiben mérhető sejtmagi mKate és citoplazmában kifejeződő mNeonGreen expresszió ubiquitin promóter alkalmazása mellett.

5.2.6. Ubiquitin promóterrel rendelkező plazmid esetén mért expresszió Tol2 rendszerben

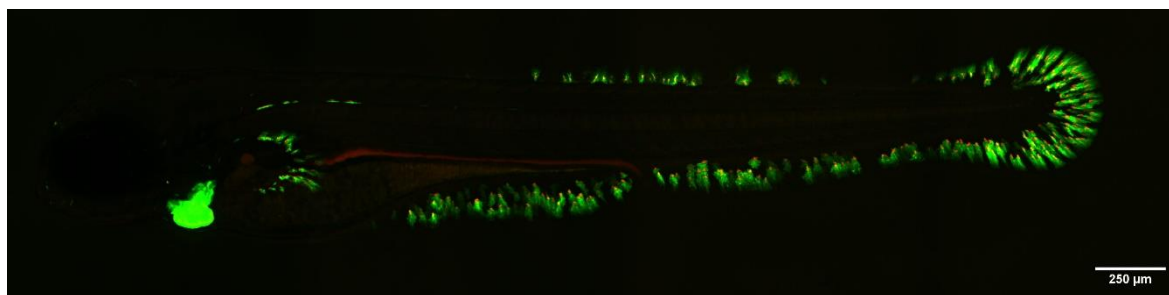
Erős, de mozaikos expressziót eredményezett a Tol2 rendszer az ubiquitin promóter használata mellett (30. ábra). Összehasonlítva a QF2 rendszerben láthatóakkal, Tol2 rendszerben a farokúszó sejtjeiben alig látni az EGFP expresszióját.



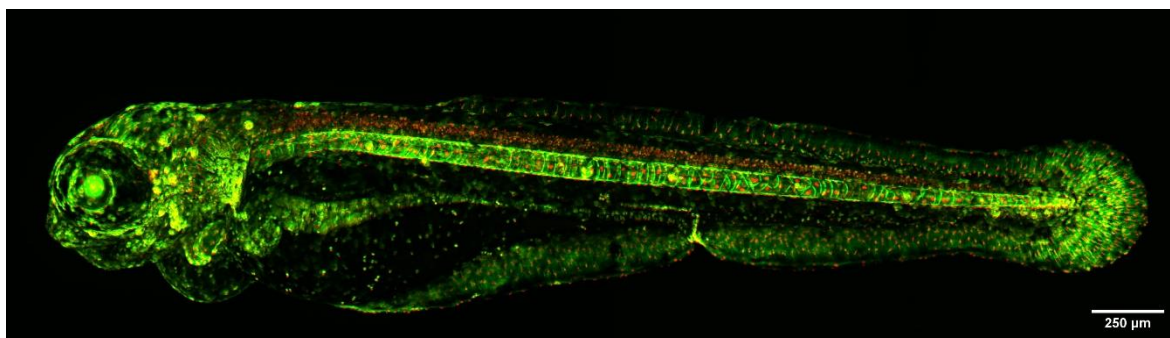
30. ábra Ubiquitin promóter alkalmazása melletti általános EGFP expresszió Tol2 rendszerben 3 napos, injektált lárvában.

5.3. Expresszió mértékének bemutatása az F1 generációban

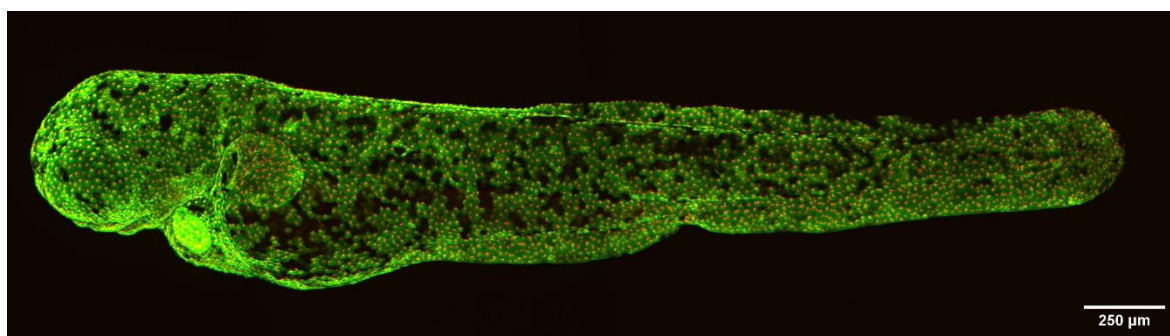
Az alábbi felvételek igazoltan hordozó F1 generációs halakról készültek QF2 rendszerben, melyek bemutatják, hogy az F0 nemzedékben tapasztalt kisfokú aspecifitás, az F1 nemzedékben már nem jellemző (31-33. ábra).



31. ábra ITGA11-es promóter alkalmazása mellett mért expresszió F1 nemzedékben. Az mKate és mNeonGreen fluoreszcens fehérjék expressziója elsősorban a fibroblast sejtekben. Az F0 generációban tapasztalt kisfokú aspecifitás itt már nem mutatható ki.



32. ábra Ubiquitin promóter alkalmazása mellett látható általános expresszió F1 generációban spinning-disk konfokális mikroszkópos felvételen. Aspecifitás és mozaikosság nem figyelhető meg.



33. ábra Krt4 promóter által az epithelialis sejtekben látható szövetspecifikus génkifejeződés. A sejtek citoplazmájában az mNeonGreen, míg a sejtmagban az mKate fluoreszcens fehérjék expressziója látható spinning-disk konfokális mikroszkópos felvételeken F1 generációs halban.

5.4. Következtetések

A zebradániók kutatásban betöltött szerepét sokoldalú, eredményes tudományos felhasználásuk, valamint az ehhez szükséges számos biotechnológiai eszköz és módszer folyamatos fejlődése is alátámasztja.

A QUAS-QF2 rendszer számos kutatási terület számára jelent hatékony módszert, lehetőséget a zebrahal transzgenezis során. A teljes középső géntartományával rendelkező QF rendszer toxikusságát többen is bizonyították már [7, 32]. Burgess és mtsai [32] általános expresszió mellett a QUAS-QF2 rendszer esetén is szignifikáns különbséget mutattak ki a túlélés, illetve a halak fejlődési rendellenessége kapcsán a nem injektált kontroll csoporttal szemben. Riabinina és mtsai [7] kutatása synaptobrevin promóter mellett csak a QF rendszer erős toxikusságát igazolták.

Kísérletünkben a QF2 és a Tol2 rendszerek hatékonyságát és toxicitását mértük össze, melyekből az alábbi következtetéseket tudtuk levonni. Bár a túlélési görbék egyértelműen mutatják az alacsonyabb túlélési valószínűséget a QF2 rendszerben használt plazmidok injektálása esetén, szignifikáns különbséget csak a valamennyi szövetben expresszálandó,

ubiquitin promóter alkalmazása esetén tudtunk kimutatni ($p=0,0009$). Az a tény viszont, hogy a túlélési görbék között ilyen szintű eltérések vannak, felveti annak a lehetőségnek a gondolatát, hogy egy nagyobb elemszámmal megismételt és hosszabb ideig történő megfigyelés esetén több plazmidnál is kimutatható lenne szignifikáns különbség, megerősítve ezzel azok toxikus hatását is. A Krt4 promóter esetén a kontroll csoporthoz képest kimutatott magasabb túlélési valószínűség pedig felhívja a figyelmet a halak túlélését befolyásoló egyéb tényezőkre is, melyek kis mértékben torzíthatják a kutatások eredményeit.

Az expresszió mértékének összehasonlításakor összességében a QF2 rendszer bizonyult erősebb és szövetspecifikusabb expressziót kiváltó rendszernek. A mozaikosság, illetve az aspecifikus génkifejeződés itt is előfordult, ami annak tulajdonítható, hogy nem tiszta vonalakból származó F1 nemzedékű halakat, hanem F0 nemzedékből származó, injektált lárvákat vizsgáltunk. Ahogy Burgess és mtsai [32] is megállapították a transzkripcionális aktivitás erőssége valóban korrelált a toxicitás mértékével.

Eredményeink fényében, mivel mind az expressziót meghatározó tényezők (pl: a szövetspecifikusság, az expresszió erőssége, a mozaikosság) mind a halak egészségét és túlélését befolyásoló tényezők fontosak a sikeres transzgenezishez, érdemes mérlegelni, hogy az adott kutatás igényli-e az erősebb expressziót nyújtó, de toxikusabb QUAS-QF2 rendszert, vagy a kevésbé toxikus Tol2 rendszer is tud-e megfelelő expressziót biztosítani az adott kísérlet elvégzéséhez. Ennek figyelembevétele nemcsak állatjóléti szempontok miatt fontos, de a kutatás kimenetelét is befolyásolhatja.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A zebradánió (*Danio rerio*) laborállatként való tudományos felhasználása rendkívül széleskörű. Jelen tanulmányban vizsgált, transzgenikus vonalakat többek között gyulladásos folyamatok modellezésére alkalmazzák.

A kísérlet azzal a céllal készült, hogy bemutassuk a transzgenezis során használt QF2, valamint Tol2 rendszerek esetében a halakra gyakorolt toxicitás, illetve expresszió mértékét.

Munkám során AB (vad típusú) és Casper (pigmenthiányos mutáció) halak keresztezéséből származó, egysejtes stádiumban levő ikrák injektálásával hoztam létre a transzgenikus halvonalakat. Dolgozatomban három QF2 és három Tol2 rendszerben injektált plazmid hatása kerül bemutatásra. Ezek közül kettő a Krt4 és ITGA11 promóterek használatával szövetspecifikusan, epithelialis, valamint mesenchymalis sejtekben fejeződik ki, míg a harmadik rendszer egy ubiquitin promóter segítségével általánosan, valamennyi szövetben expresszálódik.

A toxicitás vizsgálata során a halak túlélését monitoroztuk, és túlélési görbén ábrázoltuk. Az ubiquitin promótert kódoló plazmidok sikeres injektálását követően valamennyi szövetben történik expresszió, így elsősorban ezeknél volt várható toxikusságot jelző szignifikáns különbség, mely a QF2 rendszer esetén igazolódott is ($p=0,0009$). A többi esetben nem tért el jelentősen a transzgenikus állatok túlélése a Kontroll csoportokhoz viszonyítva.

Az expresszivitás mértéke spinning-disc konfokális mikroszkóp segítségével készített felvételeken kerül bemutatásra. A felvételeken kimutatható, hogy a QF2 rendszer expressziója jelentősebb a Tol2 rendszeréhez képest.

Összességében az a következtetés vonható le, hogy amíg a QF2 rendszer erősebb expressziót, de jelentősebb toxicitást is eredményezett, addig a Tol2 rendszer alacsonyabb szintű expresszió mellett, kevésbé bizonyult toxikusnak. Az eredmények fényében érdemes mérlegelni, hogy egy adott kutatásban várunk-e olyan prominens változást, vagy dolgozunk-e olyan erős expressziójú szenzorral, amely kimutatható Tol2 rendszer alkalmazása mellett is, vagy szükségessé válik-e a jóval toxikusabb QF2 rendszer használata.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Silva Brito R, Canedo A, Farias D, Rocha TL (2022) Transgenic zebrafish (*Danio rerio*) as an emerging model system in ecotoxicology and toxicology: Historical review, recent advances, and trends. *Science of The Total Environment* 848:157665. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157665>
2. Lamprecht Tratar U, Horvat S, Cemazar M (2018) Transgenic Mouse Models in Cancer Research. *Front Oncol* 8:268. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00268>
3. Stoddard M, Huang C, Enyedi B, Niethammer P (2019) Live imaging of leukocyte recruitment in a zebrafish model of chemical liver injury. *Sci Rep* 9:28. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36771-9>
4. Blechinger SR, Warren JT, Kuwada JY, Krone PH (2002) Developmental toxicology of cadmium in living embryos of a stable transgenic zebrafish line. *Environ Health Perspect* 110:1041–1046. <https://doi.org/10.1289/ehp.021101041>
5. Do Carmo S, Cuello A (2013) Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Mol Neurodegeneration* 8:37. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-37>
6. Brunner M, Peng X, Liu GX, Ren X-Q, Ziv O, Choi B-R, Mathur R, Hajjiri M, Odening KE, Steinberg E, Folco EJ, Pringa E, Centracchio J, Macharzina RR, Donahay T, Schofield L, Rana N, Kirk M, Mitchell GF, Poppas A, Zehender M, Koren G (2008) Mechanisms of cardiac arrhythmias and sudden death in transgenic rabbits with long QT syndrome. *J Clin Invest* JCI33578. <https://doi.org/10.1172/JCI33578>
7. Riabinina O, Luginbuhl D, Marr E, Liu S, Wu MN, Luo L, Potter CJ (2015) Improved and expanded Q-system reagents for genetic manipulations. *Nat Methods* 12:219–222. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3250>
8. Ivics Z, Li MA, Mátés L, Boeke JD, Nagy A, Bradley A, Izsvák Z (2009) Transposon-mediated genome manipulation in vertebrates. *Nat Methods* 6:415–422. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1332>
9. Teame T, Zhang Z, Ran C, Zhang H, Yang Y, Ding Q, Xie M, Gao C, Ye Y, Duan M, Zhou Z (2019) The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. *Animal Frontiers* 9:68–77. <https://doi.org/10.1093/af/vfz020>
10. Lieschke GJ, Currie PD (2007) Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 8:353–367. <https://doi.org/10.1038/nrg2091>
11. Gemberling M, Bailey TJ, Hyde DR, Poss KD (2013) The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends in Genetics* 29:611–620. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.07.003>
12. White RM, Sessa A, Burke C, Bowman T, LeBlanc J, Ceol C, Bourque C, Dovey M, Goessling W, Burns CE, Zon LI (2008) Transparent Adult Zebrafish as a Tool for In Vivo Transplantation Analysis. *Cell Stem Cell* 2:183–189. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.002>
13. Tsang B, Zahid H, Ansari R, Lee RC-Y, Partap A, Gerlai R (2017) Breeding Zebrafish: A Review of Different Methods and a Discussion on Standardization. *Zebrafish* 14:561–573. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1477>
14. Figueiredo MDA, Lanes CFC, Almeida DV, Marins LF (2007) Improving the production of transgenic fish germlines: in vivo evaluation of mosaicism in zebrafish (*Danio rerio*) using a green

- fluorescent protein (GFP) and growth hormone cDNA transgene co-injection strategy. *Genet Mol Biol* 30:31–36. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572007000100008>
15. Park F (2007) Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? *Physiological Genomics* 31:159–173. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00069.2007>
 16. Bihon Asfaw A, Assefa A (2019) Animal transgenesis technology: A review. *Cogent Food & Agriculture* 5:1686802. <https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1686802>
 17. Munoz-Lopez M, Garcia-Perez J (2010) DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. *CG* 11:115–128. <https://doi.org/10.2174/138920210790886871>
 18. Clark KJ, Urban MD, Skuster KJ, Ekker SC (2011) Transgenic Zebrafish Using Transposable Elements. In: *Methods in Cell Biology*. Elsevier, pp 137–149
 19. Schug J, Schuller W-P, Kappen C, Salbaum JM, Bucan M, Stoeckert CJ (2005) Promoter features related to tissue specificity as measured by Shannon entropy. *Genome Biol* 6:R33. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-4-r33>
 20. Chen C-F, Chu C-Y, Chen T-H, Lee S-J, Shen C-N, Hsiao C-D (2011) Establishment of a Transgenic Zebrafish Line for Superficial Skin Ablation and Functional Validation of Apoptosis Modulators In Vivo. *PLoS ONE* 6:e20654. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020654>
 21. Zhang W-M, Popova SN, Bergman C, Velling T, Gullberg MK, Gullberg D (2002) Analysis of the human integrin α 11 gene (ITGA11) and its promoter. *Matrix Biology* 21:513–523. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(02\)00054-9](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(02)00054-9)
 22. Mosimann C, Kaufman CK, Li P, Pugach EK, Tamplin OJ, Zon LI (2011) Ubiquitous transgene expression and Cre-based recombination driven by the *ubiquitin* promoter in zebrafish. *Development* 138:169–177. <https://doi.org/10.1242/dev.059345>
 23. Shaner NC, Lambert GG, Chammas A, Ni Y, Cranfill PJ, Baird MA, Sell BR, Allen JR, Day RN, Israelsson M, Davidson MW, Wang J (2013) A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nat Methods* 10:407–409. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2413>
 24. Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173:33–38. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00685-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00685-0)
 25. Heppert JK, Dickinson DJ, Pani AM, Higgins CD, Steward A, Ahringer J, Kuhn JR, Goldstein B (2016) Comparative assessment of fluorescent proteins for in vivo imaging in an animal model system. *MBoC* 27:3385–3394. <https://doi.org/10.1091/mbc.e16-01-0063>
 26. Cheo DL, Titus SA, Byrd DRN, Hartley JL, Temple GF, Brasch MA (2004) Concerted Assembly and Cloning of Multiple DNA Segments Using In Vitro Site-Specific Recombination: Functional Analysis of Multi-Segment Expression Clones. *Genome Res* 14:2111–2120. <https://doi.org/10.1101/gr.2512204>
 27. Kwan KM, Fujimoto E, Grabher C, Mangum BD, Hardy ME, Campbell DS, Parant JM, Yost HJ, Kanki JP, Chien C-B (2007) The Tol2kit: A multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. *Dev Dyn* 236:3088–3099. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21343>
 28. Kawakami K (2007) Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biol* 8:S7. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-s1-s7>

29. Riabinina O, Potter CJ (2016) The Q-System: A Versatile Expression System for *Drosophila*. In: Dahmann C (ed) *Drosophila*. Springer New York, New York, NY, pp 53–78
30. Subedi A, Macurak M, Gee ST, Monge E, Goll MG, Potter CJ, Parsons MJ, Halpern ME (2014) Adoption of the Q transcriptional regulatory system for zebrafish transgenesis. *Methods* 66:433–440. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.06.012>
31. Potter CJ, Tasic B, Russler EV, Liang L, Luo L (2010) The Q System: A Repressible Binary System for Transgene Expression, Lineage Tracing, and Mosaic Analysis. *Cell* 141:536–548. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.025>
32. Burgess J, Burrows JT, Sadhak R, Chiang S, Weiss A, D’Amata C, Molinaro AM, Zhu S, Long M, Hu C, Krause HM, Pearson BJ (2020) An optimized QF-binary expression system for use in zebrafish. *Developmental Biology* 465:144–156. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2020.07.007>
33. Nasiadka A, Clark MD (2012) Zebrafish Breeding in the Laboratory Environment. *ILAR Journal* 53:161–168. <https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.161>
34. Stevens CH, Reed BT, Hawkins P (2021) Enrichment for Laboratory Zebrafish—A Review of the Evidence and the Challenges. *Animals* 11:698. <https://doi.org/10.3390/ani11030698>
35. Chen X, Gays D, Santoro MM (2016) Transgenic Zebrafish. In: Ribatti D (ed) *Tumor Angiogenesis Assays*. Springer New York, New York, NY, pp 107–114
36. Turkson AJ (2021) A Closer Look at the Kaplan-Meier and Life Table Models in Survival Analysis. *OALib* 08:1–19. <https://doi.org/10.4236/oalib.1108104>
37. Tamás SX, Roux BT, Vámosi B, Dehne FG, Török A, Fazekas L, Enyedi B (2023) A genetically encoded sensor for visualizing leukotriene B4 gradients in vivo. *Nat Commun* 14:4610. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40326-6>

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Korsós Gabriellának a TDK munkám során nyújtott odaadó segítségéért és folyamatos támogatásáért.

Külön köszönettel tartozom Dr. Enyedi Balázsnak a megtisztelő lehetőségért, hogy TDK munkámat a Semmelweis Egyetem Élettani Intézetében végezhettem, valamint támogatásáért és értékes szakmai tanácsaiért, amivel munkámat végig követte.

Köszönettel tartozom Kaszás Diánának a laboratóriumban végzett munkák és a dolgozatom írása során nyújtott pótolhatatlan segítségéért és támogatásáért, illetve Kiss Klaudiának, Borbély Csillának, Fazekas Lászlónak és Tamás Szimonettának a munkám során nyújtott segítségükért.

Továbbá, szeretném megköszönni Abonyi-Tóth Zsoltnak a statisztikai számításokban nyújtott segítségét.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a családomnak és a barátaimnak a türelmet és a támogatást, mely nélkül ez a dolgozat nem születhetett volna meg.