

Szent István Egyetem
Állatorvos Tudományi Kar
Biológia Intézet

Hipofízis-adenómára jellemző gének feltérképezése és expressziós vizsgálata zebradánióban (*Danio rerio*)

Készítette: Balogh Réka

Témavezető: Dr. Patócs Attila, egyetemi docens, MD, PhD Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Kar, II. Belgyógyászati Klinika, MTA-SE „Lendület” Örökletes Endokrin Daganatok Kutatócsoport

Társtémavezető: Reining Márta, tanszéki mérnök, Szent István Egyetem, Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar, Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet, Halgazdálkodási Tanszék

Belső konzulens: Szabó Krisztián, tudományos segédmunkatárs, Szent István Egyetem, Állatorvos Tudományi Kar, Biológia Intézet, Ökológiai Tanszék

Gödöllő

2016

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Célkitűzések	6
3. Irodalmi áttekintés	7
3.1. Humán hipotalamo-hipofizeális rendszer	7
3.2. Hipofizis-adenomák	10
3.3. A humán DLK1-MEG3 lókuszt	12
3.4. Zebradánió, mint modellállat	14
3.5. Zebradánió (<i>Danio rerio</i>) hipotalamo-hipofizeális rendszere	16
3.6. A dlk1-dio3 gének zebradánióban	17
3.7. Génexpresszió	18
3.8. In situ hibridizációs technika	20
4. Anyag és módszertan	22
4.1. Kísérleti helyszín és állatok	22
4.2. In silico módszerek	23
4.3. Próba gyártása	25
4.3.1. RNS izolálás	25
4.3.2. DNáz kezelés	25
4.3.3. cDNS írás	25
4.3.4. PCR optimalizálás	26
4.3.5. Kivágás gélből, tisztítás	27
4.3.6. Vektorba ligálás	27
4.3.7. Transzformálás kompetens sejtbe, táptalaj készítése	29
4.3.8. Kék-fehér szelekció, kolónia PCR	29
4.3.9. Az irányultság ellenőrzése, plazmid linearizálás	31
4.3.10. A próba jelölése	32
4.4. In situ hibridizáció	33
4.4.1. Az embriók fixálása	33
4.4.2. Az embriók permeabilissá tétele és hibridizáció	33
4.4.3. Az embriók mosása és alkalikus foszfáttal konjugált digoxigenin antitest hozzáadása	33
4.4.4. Mosás és festés	34
4.4.5. Mikroszkópos detektálás	34
5. Eredmények	35
5.1. In silico analízis	35
5.2. A próba gyártása	36
5.2.1. PCR optimalizálás	36
5.2.2. Kolónia PCR	37
5.2.3. Az irányultság ellenőrzése	38
5.2.4. Plazmid linearizálás	39
5.3. In situ hibridizáció	40
6. Következtetések	43
7. Köszönetnyilvánítás	44
8. Irodalomjegyzék	45

1. Bevezetés

A hipofízis-adenomák az agyalapi mirigy első lebenyének daganatos megbetegedései. Az intracranális daganatok 10-25 %-át teszik ki (Butz, 2011; Cooper és Melmed, 2012; Mustafa és McGregor, 2013). Többségében jóindulatúak, azonban a hormonrendszerre hatva súlyos elváltozásokat okozhatnak (Donangelo és Melmed, 2012). Csoportosításuk történhet a hormontermelésük alapján, ilyenkor beszélünk prolaktin, növekedési hormon, adrenokortikotróp hormon, pajzsmirigy-serkentő, illetve gonadotróphormont (folliculus-stimuláló vagy luteinizáló hormont) termelő adenomákról (Palma és Larizza, 2014).

Az előbbieken túl egy külön csoportot jelentenek a klinikailag hormonálisan inaktív daganatok (csendes tumorok vagy NFPA-k), melyek előfordulása az összes adenoma mintegy 30 %-a (Cooper és Melmed, 2012; Palma és Larizza, 2014). Bár az NFPA-k jóindulatú, hormonális tüneteket nem okozó tumorok, elhelyezkedésük miatt, az agy különböző területeire nyomást gyakorolva, súlyos tünetekkel járhatnak. A leggyakoribb klinikai tünetek fejfájás, látászavar, szédülés (Levy, 2004; Mustafa és McGregor, 2013). Mivel hormonális elváltozásokat nem okoznak, felismerésük nehéz.

A klinikai kutatások során kiemelt jelentőségű a modellállatok használata. Segítségükkel a szervezet komplex folyamatai megfigyelhetőek, a bonyolult mechanizmusok könnyebben megérthetőek. A zebraadánió (*Danio rerio*), mint gerinces szervezet, humán betegségek modellezésére kitűnően alkalmas. Teljes genomja ismert, közel negyven éve aktívan kutatott organizmus. Laboratóriumi tartása olcsó és egyszerű, rendkívül szapora, igénytelen. A lárvák az áttetsző ikrahéjon keresztül könnyen megfigyelhetőek, ezért vált kedvelt fejlődésbiológiai modullé. Az utóbbi időben egyre gyakrabban használják toxikológiai és gyógyszerkísérleti vizsgálatokhoz is. Genetikai modellként is jól alkalmazható, az általánosan használt modellállatok közül az egér után a zebraadánió áll a legközelebb az emberhez. A humán gének 70 %-ában fellelhető zebraadánióban ortológ (Howe és mtsai., 2013).

*Mapping and expression analysis of zebrafish (Danio rerio)
genes related to the development of pituitary adenoma*

Abstract

Pituitary adenomas are the neoplasms of the former lobe of the hypophysis gland (adenohypophysis). They comprise approximately 10-25 % of all intracranial neoplasms (Butz, 2011; Cooper és Melmed, 2012; Mustafa és McGregor, 2013). They are mostly benign tumors, but can have a severe effect on the endocrine system (Donangelo és Melmed, 2012). They can be classified by their hormone hypersecretion as the following: prolactinoma, somatotropinoma, corticotropinoma, thyrotropinoma and gonadotropinoma (FSH or LH secreting adenomas) (Palma és Larizza, 2014)

Furthermore we can classify another group, the clinically nonfunctioning adenomas (silent tumors or NFPAs) accounting for approximately 30 % of all adenomas (Cooper és Melmed, 2012; Palma és Larizza, 2014). Although NFPAs are nonfunctioning, benign tumors, they can cause serious problems by compression on different brain parts. The clinical features are headache, visual disturbances and dizziness (Levy, 2004; Mustafa és McGregor, 2013). Due to the lack of hormone secretion, it is difficult to diagnose them.

The use of model organisms has a great importance during clinical investigations. They allow us to understand the complexity of physiology. Zebrafish (*Danio rerio*) is an excellent species for modeling human diseases. The whole zebrafish genome has already been sequenced and it has been used for research for over 40 years. It is easy and cheap to house and care them, they have an extremely fast reproduction rate. It is a beloved model organism for developmental biology for decades, but in the recent years it developed into an important model in toxicology and tumor biology as well. It can be used for genetics research with succes, 70 % of the human genes can be found in the zebrafish genome (Howe és mtsai., 2013).

Our aim is to investigate, wheather the zebrafish is a suitable model organism for studying adenohypophysis tumors. We searched for the most important tumor supressor genes related to the human clinically nonfunctioning pituitary adenomas in scientific literature. In silico genome and sequence analysis was made and we chose dlk1 and dio3

for further study. The expression pattern of these genes was detected with in situ hybridization technic on five-day-old zebrafish larvae. Our future plan is to create a transgenic zebrafish line possessing clinically nonfunctioning pituitary adenoma by the help of gene silencing with CRISP method (Wilkinson és Wiedenheft, 2014). The expression analysis is needed for this goal, it helps us to choose the potential target gene for silencing. This transgenic zebrafish line would be helpful in understanding the mechanisms of this disease. In addition it woud enable us to test different medicines and treatments.

2. Célkitűzések

Vizsgálataink elsődleges célja annak megismerése, hogy a zebradánió alkalmas-e modellállatnak az adenohipofízis daganatos elváltozásainak tanulmányozására. Irodalmi adatok alapján információt gyűjtöttünk a klinikailag hormonálisan inaktív, humán hipofízis-adenoma kialakulásában szerepet játszó kulcsfontosságú génekről. Ezeket tanulmányoztuk és feltérképeztük zebradánióban. In silico módszerekkel összehasonlításokat végeztünk genom és szekvencia szinten. Vizsgálatainkhoz tumor-szupresszor gént kerestünk és az in silico módszerek elvégzése után a dlk1-et és a dio3-at választottuk. Ezek expressziós profilját in situ hibridizációval detektáltuk 5 napos zebradánió lárvákon.

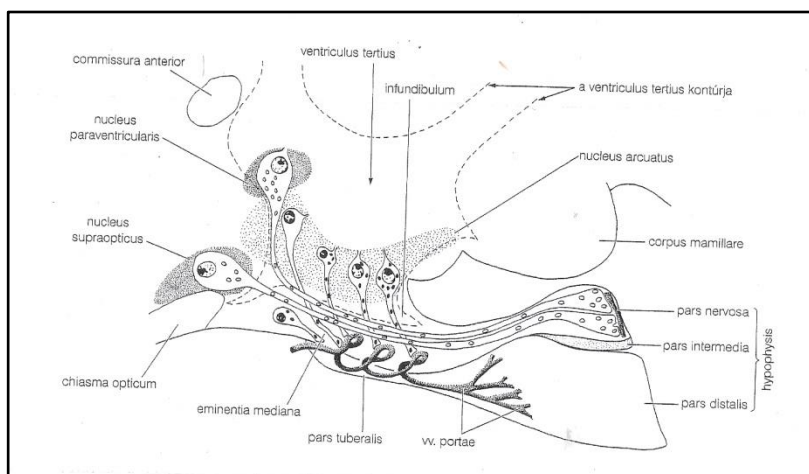
A későbbiekben tervezzük a dlk1 és a dio3 gének in situ hibridizációs vizsgálatát felnőtt halak agymetszetein, mellyel információt nyerhetünk a génexpresszióról a halak fejlődésének későbbi stádiumaiban.

A hosszú távú tervek között szerepel egy nem funkcionáló adenomára jellemző tumor-szupresszor gén csendesítése CRISPR módszerrel (Wilkinson és Wiedenheft, 2014) és ezzel modellállat létrehozása. Az expressziós vizsgálat a géncsendesítést előzi meg, a célgén kiválasztásához szükséges. Egy transzgenikus, hipofízis-adenomás zebradánió vonal nagyban hozzájárulna a betegséggel kapcsolatos ismereteinkhez. A daganat okozta elváltozások tanulmányozhatóak, különböző szerek és kezelések pedig tesztelhetőek lennének.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Humán hipotalamo-hipofizeális rendszer

A hipotalamusz a köztiagy (*diencephalon*) része, fontos vegetatív szabályozó központ (fűtő- és hűtő központok, éhség- és jóllakottság központ, szexuális funkciók, alvás-ébrenléti állapotok szabályozása, stb.), valamint a neuroendokrin szabályozó rendszer központi eleme. A harmadik agykamrától dorzális irányban helyezkedik el. A koponyalap irányában találjuk a hipotalamusz tölcsérszerű szűkületét, az *infundibulumot*, mely a hipofízisnyélen keresztül kapcsolódik az agyalapi mirigyhez. A hipotalamusz endokrin rendszerrel kapcsolatban álló magvait két részre: kis- és nagysejtű neuroszekrécios magvakra oszthatjuk (Dr. Obál, 1982; Dr. Zboray, 2010).



1. ábra: hipotalamo-hipofizeális rendszer (Dr. Zboray, 2010)

A hipotalamusz nagysejtű neuroszekrécios magvai polipeptid hormonokat termelnek, melyek az *infundibulumon*, majd a hipofízis nyélen keresztül, axonális transzporttal a neurohipofízis *pars nervosájába* juttatják szekrétumaikat. A hormonok itt tárolódnak, majd ürülnek a vérbe. A vazopresszin, mely főként a *nucleus supraopticusban* termelődik, a vese vízviasszívását serkenti, ezáltal a vizelet mennyiségét csökkenti. Funkciója miatt antidiuretikus hormonnak is nevezzük (*diuresis*=vizeletürítés). A fiziológiás adagnál nagyobb mennyiségben vérnyomásemelő és simaizom-kontrakciót előidéző hatással rendelkezik. Az oxitocin, melyet elsősorban a *nucleus paraventricularis* sejtei termelnek, az emlőmirigyek tej ürítését, valamint a méh simaizmainak kontrakcióját serkenti (Bálint, 1986).

A hipotalamusz kissejtes neuroszekrécións magvainak (*nucleus arcuatus*) sejtjei releasing és inhibiting hormonokat termelnek. A hormonok a hipofízis portális keringési rendszerébe kerülnek, így nem közvetlen axonális kapcsolattal, hanem a véráram útján jutnak el a hipofízis elülső lebenyébe, az adenohipofízisbe (Dr. Zboray, 2010).

Az agyalapi mirigy (hipofízis) a hipotalamusztól laterálisan elhelyezkedő, cseresznye nagyságú képlet. (Szentágothai, 1975) Hátulsó lebenye, a neurohipofízis idegszövet jellegű. Három részből áll: a hipofízisnyélből (*infundibulum*), az *eminentia medianából* és *pars nervosából*. A mirigy elülső lebenye, az adenohipofízis az *eminentia medianához* hozzáfekvé tölcsérlebenyből (*pars tuberalis*), a terjedelmes elülső lebenyből (*pars distalis*) és a középső lebenyből (*pars intermedia*) áll (Vigh és Kondics, 1997; Dr. Zboray, 2010).

Az embrionális fejlődés során a neurohipofízis kitűrődéssel keletkezik a *diencephalon* fenéklemezéből, így közvetlenül neuronális eredetű (Csokonya és Hoffmann, 2000). Az elülső lebeny, az adenohipofízis a garathámból fejlődik. Amikor a humán embrió körülbelül 3 hetes (Sadler, 2000) az embrionális ősszáj (*stomodeum*) dorzális része kitűrődik, majd lefűződik, ezzel létre hozva az ún. Rathke tasakot. A Rathke tasak a neurohipofízishez vándorol és hozzá nő, ezzel kettős eredetű, összetett szervet hozva létre. Ugyanakkor megjegyzendő, hogy a Rathke-tasak a *stomadeumba* ékelődő neuroektodermális szövetből fejlődik, így közvetetten ez is idegi eredetű (Dr. Zboray, 2010).

A hátulsó lebeny szöveti képén velőtlen idegrostok, idegsejt végződés, kötőszövetek, erek, valamint neurogliasejtek (ún. pituicyták) figyelhetők meg (Kühnel, 1997). Ezen sejtek hormontermelésre nem, csak hormontárolásra képesek. Az elülső lebeny szövettani szerkezete nagyobb változatosságot mutat, hematoxin-eozin festéssel kromofób és kromofil (acidofil vagy bazofil) sejtípusokat figyelhetünk meg. A *pars tuberalis* az infundibulum mellett található, egyenletesen bazofil festődésű sejteket tartalmaz. A *pars intermedia* sejtjei szintén basofil, de egynemű, szabálytalan anyaggal telt lument tartalmaznak. A *pars distalis*-ban mind kromofób, mind kromofil sejtípusokat találunk (Szentágothai, 1975).

Modern immuncitokémiai és elektron mikroszkópos technikákkal a sejteket az általuk szekretált hormonok alapján is elkülöníthetjük, így az adenohipofízis területén

megfigyelhetünk szomatotróp, laktotróp, tirotróp, kortikotróp és gonadotróp sejteket. A kromofób, nem festődő sejteket null sejteknek is nevezzük. Az adenohipofízis hormonok kémiai szerkezetük alapján három nagy csoportba sorolhatóak: glikoproteinek (LH, FSH, TSH), kisméretű peptidhormonok (ACTH, LPH, MSH, endorfínok) és hosszú polipeptidek (GH, PRL) (Butt, 1975). A hormonok összefoglaló táblázatát a 3-as számú ábrán láthatjuk.

Termelődési hely	Sejttípus	Adenohipofízis hormon
Pars distalis	szomatotróp	GH- növekedési hormon
	gonadotróp	FSH- folliculusz-stimuláló hormon
		LH- luteinizáló hormon
	laktotróp	PRL- prolaktin vagy laktotróp hormon
	tirotróp	TSH- thiroidea-stimuláló hormon
kortikotróp	ACTH- adrenokortikotróp hormon	
Pars intermedia		α -MSH- melanocita stimuláló hormon

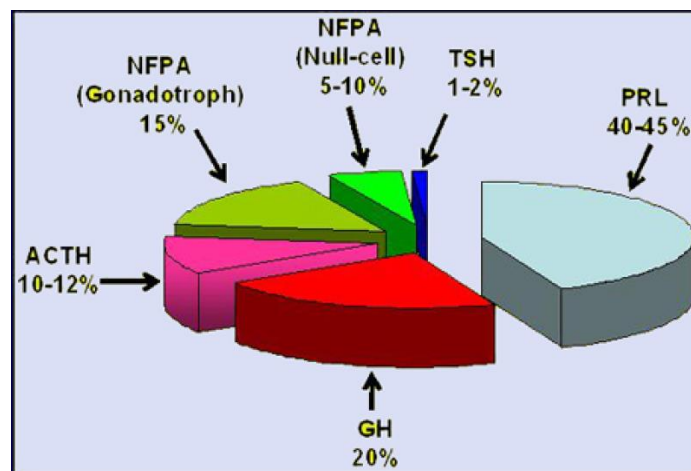
2. ábra: Adenohipofízis hormonok termelődési hely és sejttípusok szerint (Greenspan és Gardner, 2001)

Az elülső lebeny hormonjai különböző perifériás endokrin szervekre hatva azok aktivitását szabályozzák. Perifériás endokrin szervek: a tobozmirigy (*epipysis* vagy *corpus pinneale*), a pajzsmirigy (*glandula thyreoidea*), a mellékpajzsmirigy (*glandula parathyreoidea*), a mellékvese (*glandula suprarenalis*) és az ivarszervek (Bálint, 1986; Dr. Zboray, 2010). A célszervek és az agyalapi mirigy között visszacsatolás, negatív és pozitív feedback-mechanizmus valósul meg.

3.2. Hipofízis-adenómák

A hipofízis-adenómák az agyalapi mirigy elülső lebenyének daganatos megbetegedései. Az intracranális daganatok 10-25 %-át teszik ki (Butz, 2011; Cooper és Melmed, 2012; Mustafa és McGregor, 2013). Többségükben nem metasztatikusak, azaz nem képeznek áttéteket, de a túlzott sejtosztódás következtében szerven kívülé (ektrópikussá) válhatnak (Donangelo és Melmed, 2012). Mivel a hipofízist kaudálisan a töröknyereg (*sella turcica*), egy csontos képlet határolja, agresszív növekedés (*hypopituitarismus*) esetén a lebeny növekedése rostrális irányban a látóideg (*chiasma opticum*), laterálisan a barlangos vénás öblök (*sinus cavernosus*), dorzálisan pedig az agy parenchimája felé történhet. A daganat az agy különböző területeire nyomást fejthet ki, a kompressziós tünetek látászavar, szédülés, fejfájás lehetnek. (Levy, 2004)

Agresszív tumorok estén hormonális elváltozások is megfigyelhetőek, mely az adenómák csoportosításának alapját képezheti. Így beszélhetünk prolaktin, növekedési hormon, adrenokortikotróp hormon, pajzsmirigy-serkentő hormon, illetve folliculus-stimuláló vagy luteinizáló hormontermelő adenomákról. A növekedési hormon túltermelése akromegáliát vagy gigantizmust okoz, adrenokortikotróp adenoma estén Cushing kór vagy Nelson szindróma jelentkezik. A prolaktinoma tipikus tünetei az ún. *galaktorrhoeo-amenorrhoea* (a tejelválasztás és menstruációs ciklus hiánya), libidó hiány, fogamzásképtelenség és erekciós problémák (Levy, 2004). A gonadotropinómák és a



3. ábra: Hipofízis adenómák százalékos megoszlása (Palma & Larizza, 2014)

pajzsmirigy-serkentő hormont termelő tirotropinómák előfordulása viszonylag ritka, elhanyagolható klinikai tünetekkel. Előbbiekén túl a megbetegedések viszonylag nagy részében (25-30%) fordul elő klinikailag nem funkcionáló, csöndes adenoma (non-

functioning pituitary adenomas=Nfpa), amely a null sejtek rendellenes osztódását jelenti. A hipofízis-adenomák százalékos megoszlását a 3-as számú ábrán láthatjuk (Palma és Larizza, 2014).

Méret alapján mikro- és makroadenomákat különíthetünk el. A mikroadenomák 1 cm-es átmérőnél kisebbek, a töröknyereg által határolt területen belül találhatóak. A makroadenomák 1 cm átmérőnél nagyobbak és túl is nőhetnek a töröknyereg területén. Ez utóbbiak gyógyítása problémásabb és általában kombinált kezelést igényel (Greenspan és Gardner, 2001).

A betegség kialakulása ritkán hipotalamuszból származó releasing-hormonokra vezethető vissza (mint GHRH, majd GH túltermelés esetén akromegália), azonban az esetek többségében maga a hipofízis, nem pedig a hipotalamusz abnormális működése okozza (Mustafa és McGregor, 2013).

Az adenomák általában sporadikus megjelenésűek, csak ritkán fordulnak elő familiáris, örökletes tumorszindróma részeként (Tichomirowa és mtsai., 2009; Butz, 2011; Donangelo és Melmed, 2012). Ez utóbbira példa a MEN1 (1-es típusú multiplex endokrin neoplázia), a Carney-komplex és a FIPA (familiáris izolált hipofízis adenoma).

A nem-funkcionáló hipofízis-adenomák a makroadenomák 50 %-át teszik ki (Cámara Gómez, 2014). Bizonyos esetekben, bár hormonális klinikai tüneteket nem okoznak, immunhisztokémiai vizsgálatokkal mégis kimutatható hormontermelés. Ilyenkor funkcionáló, csöndes adenomáról beszélünk. Leggyakrabban csöndes gonadotrop, csöndes kortikotrop vagy csöndes szomatotrop adenoma fordul elő, csöndes prolaktinoma és tirotropinoma ritkán figyelhető meg. A Golgi apparátus nem megfelelő működése miatt a csöndes adenomák esetében szekretált granulumok kisebbek, mint ami a klinikailag aktív adenomákra jellemző. Ez a hormonális klinikai tünetek hiányának egyik oka lehet (Cooper és Melmed, 2012).

Jelenleg nem áll rendelkezésre hatékony gyógyszeres kezelés az NFPA-k gyógyítására (Miao és mtsai., 2012). Agresszív makroadenoma esetén, ha kompressziós tünetek jelentkeznek, a műtéti beavatkozás a legjobb megoldás. Amennyiben erre nincs mód, rádióterápiás kezelés (RT) javasolt (Cámara Gómez, 2014). Természetesen a megfelelő eljárást a tumor mérete, növekedése, a beteg kora, esetleges látászavarok jelentkezése és az endokrin funkciók figyelembevételével határozzák meg.

3.3. A humán DLK1-MEG3 lókuszt

A DLK1-MEG3 lókuszt a humán 14-es kromoszómán (14q32.2) található. Összesen több, mint 80 apai ágon imprintálódó, proteinkódoló gént és anyai ágon imprintálódó, proteint nem kódoló gént tartalmaz. Az apai ágon imprintálódó, proteinkódoló gének többek között: a DLK1 (delta-like homolog 1), az RTL1 (retrotransposon-like 1) és a DIO3 (iodothyronine deiodinase type III). Az anyai ágon imprintálódó gének a szabályozásban játszanak szerepet. Nagy méretű, RNS-t kódoló gének tartoznak ide, mint a MEG3, MEG8 vagy az antiszensz RTL1 (RTL1as), illetve kis RNS-ek, például snoRNS-ek, piRNS-ek és miRNS-ek (Cheunsuchon és mtsai., 2011; Lehner és mtsai., 2014).

Kimutatták, hogy a DLK1-MEG3 lókuszt szignifikánsan alulexpresszált kettős típusú cukorbetegség hasnyálmirigyének szigetsejtjeiben (Kameswaran és mtsai., 2014), illetve NFA-s betegekénél (Cheunsuchon és mtsai., 2011). Előbbiek alapján feltételezhető, hogy tumor-szupresszor hatású.

A **DLK1** (Delta-like 1 homolog) egy transzmembrán proteint kódol. A protein egy rövid intracelluláris szakaszból, transzmembrán domain-ből és egy extracelluláris szakaszból áll, amelyen hat epidermális növekedési faktor és egy tumor nekrozis faktor α -konvertáló enzim (TACE, Tumor Necrosis Factor α -Converting Enzyme) proteáz-szenzitív target szekvenciája található. Klinikai adatok alapján, illetve modellállatokkal végzett kísérletek szerint a DLK1 fehérje szerepet játszik a zsírsejtek érésében (*adipogenezisben*) (Oczkowicz és mtsai., 2010) és a harántcsíkolt izomszövet fejlődésében, regenerációjában (Andersen és mtsai., 2009; Waddell és mtsai., 2010). Előbbiekén túl humán esetben és egereknél megfigyelték, hogy a neuronális őssejtek differenciációját támogatja (Surmacz és mtsai., 2012).

A DLK1 protein a Notch jelátviteli út ligandja (Sánchez-solana és mtsai., 2011; Falix és mtsai., 2012). A Notch szignáltranszdukciós jelátviteli út szerepet játszik a sejtek differenciálódási irányának meghatározásában, a végső differenciáltság kialakításában és a sejtburjánzásban (*proliferáció*) (Falix és mtsai., 2012). Nem megfelelő működése különböző fejlődési rendellenességeket, felnőttkorban megjelenő betegségeket, illetve rákot okoz (Kopan és Ilagan, 2009). A Notch receptorok transzmembrán proteinek, melyeknek emlősök esetében négy különböző variánsa ismert (Kopan és Ilagan, 2009). A ligand receptorhoz való kötődésekor különböző proteolitikus folyamatok játszódnak le, melyek következtében a receptor intracelluláris régiója (NICD, Notch intracellular domain)

leválik a sejtmembránról és a sejtmagba jut. A sejtmagban transzkripció komplexet képez egy DNS kötő fehérjével (SU(H), Supressor of Hairless) és egy nukleáris effektorral (MAM, Mastermind). A komplex aktiválja a célszekvenciák átírását, melyek differenciációs, proliferációs és apoptotikus (programozott sejthalállal kapcsolatos) eseményeket szabályoznak. Ezt a mechanizmust nevezzük a Notch kanonikus jelátviteli útjának (Guruharsha és mtsai., 2015).

A **DIO3** (deiodinase, iodothyronine, type III) gén egy enzimet kódol, mely a tiroid hormonok inaktivációjában játszik szerepet (Croteau és mtsai., 1995; Hernandez és mtsai., 2002; Dong és mtsai., 2013; Heijlen és mtsai., 2014). A gerincesek körében háromféle deiodináz enzimet írtak le. Mind a tiroid rendszer, mind a deiodináz enzimek aminosav szekvenciája erősen konzervált (Croteau és mtsai., 1995; Heijlen és mtsai., 2013). A pajzsmirigy hormonok közé tartozik a tiroxin (T4) és a trijód-thyronin (T3). A tiroxin a tirocitákban termelődik, míg az aktívabb forma, a trijód-thyronin megtalálható szinte az összes perifériás szövetben. Termelését a DIOII enzim végzi, mely a T4 hormon külső gyűrűjéről egy jódatom eltávolításával aktívabb, T3 formát hoz létre. A DIOIII enzim képes mind a tiroxin, mind a trijód-thyronin belső gyűrűjéről egy jódatomot eltávolítani, ezzel biológiailag inaktív hormont létrehozni. A DIOI enzim kettős funkciójú, mind aktivációra, mind inaktivációra képes. Mindhárom deiodináz enzim membránprotein, a thioredoxin szupercsaládba tartoznak, melyek egy ritka aminosavat, szelenociszteint tartalmaznak az aktív centrumukban (Heijlen és mtsai., 2014; Guo és mtsai., 2015).

Emlősöknél DIO3 expresszió figyelhető meg a placentában és egyéb embrionális szövetekben, mely a tiroid hormonok növekedésben betöltött szerepét tükrözi (Huang és mtsai., 2016). Ezen kívül felnőtt korban a pajzsmirigy hormonok a sejtek energia felhasználását, szív funkciókat, osmoregulációs folyamatokat szabályoznak (Guo és mtsai., 2015). DIO3 expresszió figyelhető meg az egész központi idegrendszer területén (Helen és mtsai., 1999; Verloop és mtsai., 2014).

3.4. Zebradánió, mint modellállat



4. ábra: Zebradánió (*Danio rerio*) embrió, lárva és kifejlett állat

A humán betegségekkel kapcsolatos kutatások során a modellállatok használata kiemelt jelentőségű. Bár bizonyos vizsgálatokra sejt- vagy szövettenyészetek is jól használhatóak, mégsem alkalmasak komplex folyamatok modellezésére. A leggyakrabban alkalmazott többsejtű gerinctelen modellállatok a fonálférgék (*Caenorhabditis elegans*, *Xiphinema vuittenezi*), az ugróvillások (*Folsomia candida*), az ágascsapú rákok (*Daphnia magna*, *Daphnia pulex*) és az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*), míg a gerincesek közül házi egeret (*Mus musculus*), a vándorpatkányt (*Rattus norvegicus*), valamint a tengerimalacot (*Cavia porcellus*) említhetjük.

A megfelelő modellállat kiválasztásánál fontos figyelembe venni, hogy az állat könnyen és gyorsan szaporítható, egyszerűen tartható legyen. Legjobb az olyan organizmusok használata, amelyekről már sok ismerettel rendelkezünk, így gyorsabbá válik a tervezés és összehasonlító elemzésekre is lehetőségünk nyílik.

Napjainkban egyre elterjedtebb a zebradánió (*Danio rerio*), mint laborállat használata. A pontyfélék (*Cyprinidae*) családjába tartozó faj eredeti hazája Ázsia, de mára az egész világon elterjedt és kedvelt díszhal. Az oldalán öt horizontális, sötét pigmentált csík fut végig. Édesvízi, a 18-24 °C-os, növényzettel dús, lassú folyású vagy állóvizeket kedveli. 5-20 egyedből álló rajokban él, élettartama 3,5-5,5 év. Táplálékigényét tekintve igénytelen, mindenevő. Egész évben párosodik, az ikrákat az aljzatra rakja,

utódgondozás nincs (Spence és mtsai., 2006; Lawrence, 2007). Könnyen tartható, kisméretű csapathal, rövid (körülbelül 3 hónapos) generációs idővel. A megtermékenyítés testen kívüli, a nőtények által lerakott ikrákat a vízben termékenyítik meg a hímek. A megtermékenyítés (zigóta állapot) után az embriók nagyjából 72 óra alatt alakulnak át korai lárvává, mely során kialakulnak a legfontosabb szervek. A 72 órás embriók már az összes létfontosságú szervvel rendelkeznek, képesek lebegőképességüket az úszóhólyaggal szabályozni, valamint teljesen kiegyenesedtek (Kimmel és mtsai., 1995).

Laborállatként való széleskörű alkalmazása már az 1980-as években elkezdődött. Azóta rengeteg irodalmi adat született, mely bárki számára elérhető egy internetes adatbázisban (ZFIN, The Zebrafish Model Organism Database). A teljes genomi szekvenciája ismert, mely nagymértékű hasonlóságot mutat a humán genommal. A humán gének 70 %-ára fellelhető zebradánióban ortológ (Howe és mtsai., 2013). Az embriók áttetsző ikrahéjban fejlődnek, így fejlődésbiológiai vizsgálatokra kitűnően alkalmas. Az utóbbi időben egyre gyakrabban alkalmazzák toxikológiai és gyógyszerkísérleti vizsgálatokhoz, valamint daganatbiológiai kutatásokhoz (Berghmans és mtsai., 2005; Stoletov és Klemke, 2008; Yen és mtsai., 2014). 2000 óta körülbelül 50 olyan cikk született, amelyben zebradániót alkalmaztak daganatos modellként, mivel tünetei a humán daganatokhoz hasonlóak és a szignáltranszdukciós útvonalak is nagyrészt egyezők (Feitsma és Cuppen, 2008).

3.5. Zebradánió (*Danio rerio*) hipotalamo-hipofizeális rendszere

A neuroendokrin szabályzás központi eleme zebradánióban, a többi gerinces állathoz hasonlóan, a hipotalamo-hipofizeális rendszer. A hipotalamusz nagysejtes állományában, a *nucleus praeopticusban* termelődő hormonok közvetlen axonális transzport útján jutnak el a neurohipofízis *pars nervosájába*. Itt tárolóznak és szükség esetén bekerülnek a keringési rendszerbe. Csontos halak esetén oxitocin-szerű isotocin, valamint arginin vazotocin termelődik, mely antidiuretikus hatása mellett halakban a vérnyomást is szabályozza (Oliveira és Gonçalves, 2008; Dr. Perry és mtsai., 2010; Dr. Zboray, 2010).

A hipotalamusz kissejtes neuroszekrécións magvában (*nucleus lateralis tuberis*) releasing és inhibiting hormonok termelődnek. Ezen sejtek nyúlványai halak estében különleges módon, közvetlenül érik el az adenohipofízis sejtjeit. (Más gerincesekben a hipofízis portális keringési rendszerén keresztül jutnak el a célsejtekhez.) Az adenohipofízist elülső és hátulsó lebenyre oszthatjuk, melyekben peptid jellegű hormonok termelődnek. Az elülső lebeny hormonjai a humán hormonokhoz hasonlóan a növekedési hormon (GH), az adrenokortikotróp hormon (ACTH), a gonadotróp hormonok (GthI és GthII) és a halprolaktin vagy paralaktin (Helfman és mtsai., 2009; Farrel, 2011).

Megjegyzendő, hogy csontos halaknál a perifériás endokrin szervek általában nem tömörülnek önálló szervekbe (Pollák, 2011). Nem figyelhető meg mellékvese, mint kompakt szerv, így az ACTH a hasonló funkciójú, de szétszórta elhelyezkedő interrenális sejtek hormontermelését szabályozza. A gonadotróp hormonok közül csontos halakban (más gerinces csoportoktól eltérően) az FSH a tüszőérésen kívül az ovulációt is kiváltja. A paralaktin, az emlős tejelválasztást serkentő prolaktin hormonnal kémiai megegyező molekula, azonban halaknál a víz- és ionháztartás szabályzásában, az ivadékgondozási ösztön serkentésében játszik szerepet (Dr. Zboray, 2010). A paralaktin jelentőségét mutatja, hogy az embrionális fejlődés során az adenohipofízis hormonok közül elsőként, már 24 órával a fertilizáció után termelődik (Herzog és mtsai., 2003). Ennek feltételezett oka, hogy a zebradánió édesvízi hal lévén hipoozmotikus közegben él, így a víz- és ionháztartás szabályzása már korai embrió stádiumtól létfontosságú számára.

A hátulsó lebenyben melanocita serkentő hormon (MSH) termelődik, melynek funkciója a pigmentsejtek stimulálása. Hatására a melaninszemcsék diszpergálódnak, így az állat színe sötétebb lesz (Dr. Zboray, 2010)

3.6. A *dlk1-dio3* gének zebradánióban

A *dlk1* gén (NC_007128.6) zebradánióban is megtalálható, azonban itt a 17-es kromoszómán. öt exont tartalmaz és egyetlen transzkripttel rendelkezik, azaz az alternatív szplájszing során egyetlen variáns keletkezik róla. Pontos szekvenciája ismert, azonban funkciójára vonatkozóan kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. Bizonyos szerzők szerint a vérerek fejlődését gátolja a NOTCH jelátviteli úton keresztül (Rodríguez és mtsai., 2012).

Zebradánióban megtalálható mindhárom deiodináz enzimet kódoló gén. A *dio3* két változata ismert, *dio3a* (NC_007128.6) és *dio3b* (NC_007131.6) paralóg gének, melyek a sugarasúszójú halak (*Actinopterygii*) korai evolúciója során bekövetkezett genom duplikáció miatt alakulhattak ki (Howe és mtsai., 2013; Heijlen és mtsai., 2014). Mind a kettő egy aktív szeleno-enzimet kódol, mely a tiroid hormonok inaktivációjában játszik szerepet, azonban felépítésük eltérő (Heijlen és mtsai., 2013, 2014; Guo és mtsai., 2015). A zebradánióban található *dio3b* génben gerincesekben egyedülálló módon egy nagy méretű intron ékelődik be az enzim aktív centrumát kódoló rész és a nyitott leolvasási keret közé (Guo és mtsai., 2015). Mindkét gén egyetlen transzkripttel rendelkezik.

Az elsőként leírt *dio3a* génre vonatkozóan több információval rendelkezünk, *dio3a* mRNS figyelhető meg a zebradánió embriók előveséjében (pronephros) 12, 24 és 48 órával fertilizáció után, valamint kis mértékben a középagyban 24 órás embrióknál (Dong és mtsai., 2013). Ezen kívül megemelkedett expressziót tapasztaltak sérülések után és feltételezik, hogy a *dio3* gén a regenerációban is szerepet játszhat, emlősökhöz hasonlóan (Kester és mtsai., 2009; Bouzaffoura és mtsai., 2010).

A *dio3a* a 17-es kromoszómán, míg a *dio3b* a 20-as kromoszómán helyezkedik el. A kódolt aminosav szekvenciákat vizsgálva a humán DIO3 génnel 60 %-os, míg a két paralóg között 77 %-os egyezést találtak (Heijlen és mtsai., 2014).

3.7. Génexpresszió

Génnek azt a DNS szakaszt nevezzük, mely egy géntermék (polipeptid vagy RNS) szintéziséhez szükséges információt hordozza. A génekről átíródhatnak mRNS-ek (messenger RNS) vagy egyéb funkcionális RNS-ek, mint rRNS (riboszomális RNS), tRNS (transzfer RNS), illetve a szabályozásban szerepet játszó kis RNS-ek (snRNS, snoRNS, miRNS, siRNS). Szűkebb értelemben a gén csak a struktúrgént jelenti, tágabb értelemben azonban ide tartoznak a szabályozó szekvenciák, illetve az átíródó, de le nem fordítódó szakaszok is (Brown, 2010).

Az élő szervezetek minden egyes sejtje tartalmazza azt a DNS állományt, ami a szükséges fehérje- és RNS molekulákat kódolja. A differenciált sejtekkel, szövetekkel rendelkező állatok esetében azonban különböző génkifejeződési mintázatokat találunk (Csokonya és Hoffmann, 2000). A génkifejeződés szabályozása több szinten is megvalósulhat a DNS, mRNS, fehérje útvonal bármely lépésénél. Egyik fajtája a transzkripciós szabályzás, mely során szabályozó szekvenciák segítségével az RNS átírás regulációja történik.

Az átírás iránya az egész élővilágban 5'-3' irányú. A struktúrgéntől általában upstream (5' irányban) találjuk a DNS-en a promóter régiót. A promóteren a fő konszenzus szekvenciák a TATA-box és a GC-box. A szabályozó szekvenciák bárhol, akár a struktúrgéntől távolabb is elhelyezkedhetnek. Szabályozó transzkripciós faktorok kötődhetnek hozzájuk, melyek a génkifejeződést befolyásolják. A serkentő szekvenciákat enhanszereknek, a gátló szekvenciákat pedig silencereknek nevezzük. A promóter régió szintén szabályozó szerepet tölt be, úgynevezett általános transzkripciós faktorok kötődhetnek hozzá (Szeberényi, 2011).

A transzkripció az RNS szintézist jelenti, melynek során eukariótákban soha nem érett mRNS, hanem egy primer transzkriptum, pre-mRNS képződik. A pre-mRNS ezután egy érési folyamaton esik át. 7-metil-GTP-sapka és poli-A-farok szintetizálódik rá, mely az mRNS védelmét szolgálja és a sejtmagból való kijutását segíti. Ezen kívül az érés során intronkihasítás (szplájszing) történik, így az érett RNS intronokat nem, csak exonokat tartalmaz.

A génexpresszió szabályzásának másik szintje, amikor az RNS érése szelektíven történik (alternatív szplájszing). Az alternatív érési folyamat következtében egy génről

többféle, alternatív fehérjeforma alakulhat ki, melyek különböző sejttípusokban más-más funkciót láthatnak el. Ugyanakkor az alternatív szplájszing nem csak a differenciálódott sejtek fehérje termelésére van hatással, hanem a sejtek sorsának determinálására is (Csokonya és Hoffmann, 2000).

A transzkripció minden esetben a DNS szensz száláról történik, így a képződő mRNS annak komplementere, megfelel az intronmentes antiszensz szálnak. Reverz transzkripció során, az univerzális kód ellenében, RNS-ről DNS írás történik. Ilyenkor egyszálú cDNS-t kapunk, mely eukariótákban a szplájszing miatt intronokat nem tartalmaz, így megegyezik a DNS intronmentes szensz szálával.

A génkifejeződés egy speciális esete a genetikai bevésődés (imprintálódás). Az epigenetikus szabályzás egy formája ez, amely során az utódban csak anyai vagy apai allél fejeződik ki, míg a másik szülőttől származó allél csendes marad. A jelenség háttérben feltételezhetően metilációs mintázatok állnak. A legtöbb imprintálódó humán és egér gén valamilyen összefüggésben áll a növekedés szabályzásával (Moore és Haig, 1991; Tilghman, 1999; Preece és Moore, 2000) és körülbelül 80 %-uk nem önállóan, hanem egyéb imprintálódó génekkel kapcsolatosan fordul elő (Reik és Walter, 2001). Becslések szerint ezidáig 100-200 imprintálódó gént írtak le (Barlow és Bartolomei, 2014). Imprintálódó gének estében megfigyelték antiszensz RNS transzkriptek képződését, melyek az antiszensz szálról íródnak át. Feltételezik, hogy a metilációs mintázatok mellett, ezeknek is az imprintálódás kialakításában lehet szerepük (Preece és Moore, 2000). Érdekességként megemlíthetjük, hogy az antiszensz transzkriptek jelenlegi tudásunk szerint minden esetben imprintálódva, mégpedig az apai allélről képződnek (Reik és Walter, 2001).

A daganatbiológia molekuláris vonatkozásában beszélhetünk onkogénekről és tumor-szupresszor génekről. Az onkogének a daganatok kialakulását serkentik, a tumor-szupresszor gének pedig gátolják. Az onkogének tekintetében megkülönböztetünk vírus onkogéneket és celluláris onkogéneket. Az első esetben a vírus transzformáló génje integrálódik a sejt genomjába és daganatos sejtburjánzást idéz elő. A második esetben a betegség kialakulását valamilyen mutáció okozza, mely során olyan, módosult gén keletkezik, melynek terméke állandósult sejtproliferációt okoz (Szeberényi, 2011).

3.8. In situ hibridizációs technika

A hibridizációs technikák a Watson és Crick-féle bázispárosodási elven alapulnak. A komplementer szakaszok kötődése lehetővé teszi különböző nukleinsav szekvenciák detektálását. Általánosan használt hibridizációs technika a southern blot, a northern blot, a DNS microarray és az in situ hibridizáció.

A southern blot és a northern blot során a DNS-t vagy RNS-t gélelektroforézissel elválasztják, majd nitrocellulóz membránra helyezik, ahol a nukleinsavak megtartják az elektroforézis során felvett mintázatukat. Ezután egyszálú DNS próbával inkubálják, amely radioaktivitás vagy enzim reakció révén teszi láthatóvá a hibrideket (Brown, 2010).

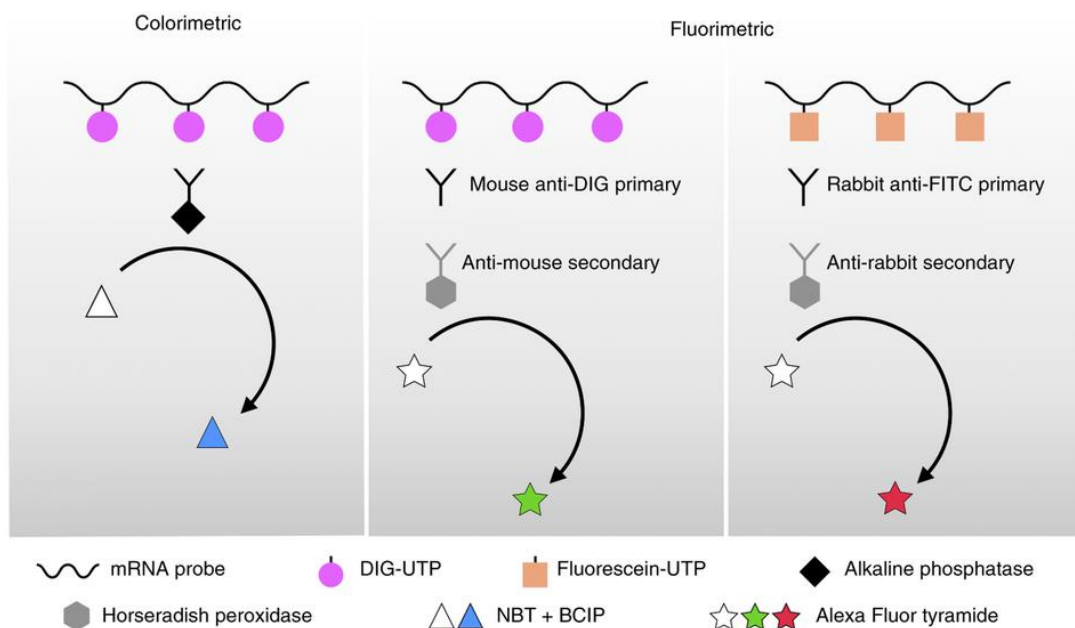
Az in situ hibridizáció specifikus nukleotid szekvenciák lokalizációját és detektálását jelenti különböző szövet vagy sejt preparátumokban. Nagy előnye, hogy szövetek, metszetek, de akár teljes embriók vizsgálatát is lehetővé teszi, így a génextpresszió térbeli és időbeli változása, a szövetek, sejtek egymáshoz való viszonya is elemezhető, a sejtek roncsolása nélkül.

Beszélhetünk DNS próbáról vagy RNS próbáról. Antiszensz RNS próbával láthatóvá tehető az mRNS vagy más, nem kódoló RNS szakaszok jelenléte, ez esetben figyelni kell arra, hogy a próbát exonokra tervezzük. Megkülönböztetünk fluoreszcens (FISH) és kromogén (CISH) in situ hibridizációt, mindkettőre nagy érzékenységgű protokollt dolgoztak ki napjainkra.

Mind fluoreszcens, mind kromogén próba gyártása során az első feladat egy specifikus DNS vagy RNS szakasz kiválasztása a rendelkezésre álló irodalmi adatok és adatbázisok felhasználásával (pl. National Center for Biotechnology Information). Ezután kijelölnek egy megfelelő hosszúságú szakaszt, amire primert terveznek. A primerek olyan rövid oligonukleotid szekvenciák, amelyek kijelölik a DNS-en az átírás kezdetét. Ezt követi a próba gyártása, amelynek során a kiválasztott szakaszra a bázispárosodás szabályai szerint illeszkedő, komplementer szakaszt gyártanak. Megfelelő fixálás és a szövetek, sejtek permeabilissá tétele után a mintát a próbával hibridizáltatják. A hibridek jelenlétében fluoreszcens vagy színreakció történik, ami láthatóvá teszi a kívánt nukleotid szekvenciát.

Fluoreszcens próba esetén, hibridizációkor a próbához fluorofórral konjugált antitest kötődik, ami fluoreszcens mikroszkóp alatt megfigyelhető. A technika lehetővé teszi akár DNS, RNS és fehérje szimultán megfigyelését sejt szinten (Celis, 2006). Különböző FISH típusokat különböztetünk meg: a QuantiGene ViewRNA próba mRNS, incRns és microRNS kimutatására szolgál formalinban fixált és paraffinba ágyazott szövetek, friss vagy fagyasztott minták esetén. A Stellaris RNS próba mRNS vagy más hosszú RNS szakaszok detektálására alkalmas vékony metszeteken. A Fiber FISH egy alternatív technika, mely során az interfázisos kromoszómák egy egyenes vonalban jelennek meg (Levsky és Singer, 2003).

A kromofór ISH a fluoreszcens ISH egy alternatív módja. Előnyt jelent, hogy az eredmény fénymikroszkóp alatt is megfigyelhető, szemben a rendkívül drága fluoreszcens mikroszkóppal. A próbához kötött antitesthez riporter enzim kapcsolódik. Ha a célszekvencia és a próba hibridizál, a megfelelő szubsztrát jelenlétében a riporter enzim színreakcióval járó átalakulást katalizál. Az enzim biotin vagy digoxigenin lehet, melyek a próbához kötve, dUTP konjugátumként vannak jelen (Roulston és Bartlett, 2004).



5. ábra: a CISH és FISH sematikus rajza (Rozier és mtsai., 2014)

4. Anyag és módszertan

4.1. Kísérleti helyszín és állatok

Vizsgálatainkat a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Karának Halgazdálkodási Tanszékén végeztük el zebraadániókon (*Danio rerio*, laboratóriumi AB vonal). Kísérleteink során szem előtt tartottuk az OECD (The Organisation for Economic Co-operation and Development) 3R (Replacement, Reduction, Refinement) stratégiáját, mely az állatkísérletek kiváltására, a felhasznált állatok számának csökkentésére és az állati szenvedés minimalizálására irányul.

A kísérleti állatokat Techniplast ZebTech típusú recirkulációs zebrahal tartó rendszerben tartják, ivaronként és méret szerint szétválasztva. A berendezés állandó kémhatást (pH 7 ± 2), vezetőképességet (300-1000 μS), nyomást (0,1-0,3 bar) és hőmérsékletet (25 ± 2 °C) tart fenn, napi 14 órás megvilágítással. A kifejlett egyedek három literes polikarbonát medencékben kerülnek elhelyezésre, harminc-negyvenesével. Az állatokat naponta kétszer etetik teljes értékű haltáppal (zebrafish basic food, Special Diet Services), valamint hetente kétszer élő sórák lárvákkal (*Artemia nauplii*).

A tejes és ikrás egyedeket az ivást megelőző napon egy műanyag ráccsal elválasztott szaporító edénybe helyeztük ivaronként külön-külön. A tejesek és ikrások aránya az edényekben 2:1 volt. Másnap, a rács eltávolítása után megtörtént az ivás. Ezután az embriókat 100 mm átmérőjű Petri csészékbe helyeztük és rögzítettük a megtermékenyítés dátumát, pontos időpontját. A lárvákat az RNS mintákhoz 5 napos korig neveltük, majd 20-25 lárvát helyeztünk csövekbe és 100 μl Trizol reagensben -80 °C-on tároltuk a további munkákig. Az in situ hibridizációhoz pedig szintén 5 napos lárvákat használtunk, de fixálásuk 4%-os PFA (paraformaldehid) oldatban történt.

4.2. In silico módszerek

Vizsgálatainkhoz olyan tumor szupresszor géneket kerestünk, ami hormonálisan inaktív adenoma kialakulásában szerepet játszanak. Az irodalmi adatok alapján a humán DLK1-MEG3 lókuszt választottuk. Zebradánióban megvizsgáltuk az ezen a lókuszon található legfontosabb 14 human miRNS-t és 6 gént, továbbá a 5-ös kromoszómán található onkogén PTTG1-et (pituitary tumortransforming gene 1). Az in silico vizsgálatokhoz több software-t és online programot is használtunk. Első lépésként az ensembl.org oldalon található humán szekvenciákat hasonlítottuk össze zebradánió szekvenciákkal. Ezután a blasztolást kiterjesztettük a zfin.org oldalon található zebradánió génekre, valamint a miRNAMiner és miRBase mikroRNS adatbankokra.

A keresést és összehasonlítást fordított útvonalon is elvégeztük és lefuttattuk a MAFFT (Kato és mtsai., 2002) és Jalview (Waterhouse és mtsai., 2009) programokon, majd kiterjesztettük ortológ keresésre is (<http://cegg.unige.ch/mirortho>; <http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/MapMi>; <http://www.ensembl.org>; <http://zfin.org>).

A pttg, a dio3 a és b, valamint a dlk1 megtalálható zebradánióban is. A további munkákat a dlk1 és a dio3 génekkel végeztük.

A **dlk1** gén zebradánióban a 17-es kromoszómán helyezkedik el, egy transzkripttel rendelkezik, tehát az alternatív szplájszing során egy variáns keletkezik és öt exont tartalmaz. Az exonok hossza:

- 1-es exon: 64 bp
- 2-es exon: 64 bp
- 3-as exon: 131 bp
- 4-es exon: 133 bp
- 5-ös exon: 577 bp

A pontos szekvenciát letöltöttük a Sequencher programba (Campbell és mtsai., 2014), majd primert terveztünk a Primer Premier program 5-ös verziójával (Lalitha, 2004). A primer tervezésnél 18-25 bp hosszúságú primert és körülbelül 500 bp hosszúságú terméket szeretnénk volna kapni. Két exon között átfedő primert kerestünk, hogy ezzel is csökkentsük annak esélyét, hogy a primer rossz helyre kötődjön be (false priming). Mivel eukariótákban az mRNS érése során az intronok kivágódnak, így két exon közötti átfedő primer a genomi DNS-re nem tud bekötődni. Az előbbieket figyelembe vételével a primer

tervezéshez a négyes és az ötös exont választottuk, melyekre két primert is terveztünk. A primerek pontos szekvenciája:

	Primer neve	Szekvencia
dlk1	F	5'-TCC GTG TTC ATC GCA GCC-3'
	R	5'-CAT CGC CCG CCA TTC AC-3'
dlk1	F	5'-GCC GCA CGG AGG AGA CAC-3'
	R	5'-ATC GCC CGC CAT TCA CAC-3'

6. ábra: dlk1 primerek szekvenciája

Az első primer pár 17 és 18 bázispár hosszúságú és róluk 324 bázispár hosszúságú termék keletkezik. Cross dimer, azaz két egymáshoz kötődő forward és reverz primer keletkezésének energiája 4,3 kcal/mol. A második primer pár 18-18 bázispár hosszúságú forward és reverz primerekből áll és róluk 231 bázispár hosszúságú termék keletkezik. Itt hiba lehetőségként a primer rossz helyre kötődését (false priming) említhetjük, de ehhez 8,8 kcal/mol energia szükséges, így ez nem valószínű.

A **dio3b** gén két exonnal rendelkezik, melyek a gén két végén, egy intronnal elválasztva helyezkednek el. Az exonok hossza:

- 1-es exon: 2208 bp
- 2-es exon: 512 bp

A dio3 génre tervezett primerek pontos szekvenciái:

	Primer neve	Szekvencia
dio3b	F	5'-CCG-CTG-CCT-GGA-GGA-CC-3'
	R	5'-TCT-CGA-CGC-ACC-ATT-GAA-ACT-T-3'

7. ábra: dio3b génre tervezett primerek szekvenciája

A primerek hossza 17 és 22 bázispár, melyekről 431 bázispár hosszúságú termék keletkezik. Cross dimer keletkezhet, de ehhez 6,8 kcal/mol energia szükséges.

4.3. Próba gyártása

4.3.1. RNS izolálás

A próba gyártása során először RNS-t izoláltunk vad típusú, AB vonalú zebradániókból. A mintákat 100 µl Trizol reagensben tároltuk homogenizálás után (VWR international – Pellet mixer) -80 °C-on az izolálás megkezdéséig. A homogenizátumhoz további 300 µl Trizolt és 100 µl kloroformot adtunk, majd 5 percig inkubáltuk, összeráztuk és 10 percig centrifugáltuk 4 °C-on, 12500 rpm fordulatszámon. Új Eppendorf csőbe 100 µl kloroformot mértünk és erre pipettáztuk a mintánk felülúszóját. Újból centrifugáltuk 10 percig 4 °C-on és 12500 rpm fordulatszámon. A felülúszót ezután 500 µl fagyos izopropanolra pipettáztuk és -20 °C-on tartottuk egy éjszakán keresztül, hogy az RNS kicsapódjon. Másnap 15 percig centrifugáltuk 4 °C-on, 12500 rpm fordulatszámon. A csapadékot óvatosan eltávolítottuk és a mintát 500 µl 75 %-os etanollal átmostuk, hogy eltávolítsuk a mintában maradt folyékony reagenseket. Újból centrifugáltuk 10 percig 4 °C-on és 12500 rpm fordulatszámon. A felülúszó eltávolítása után a mintákat lámpa alatt szárítottuk, majd amikor teljesen szárazak voltak 20 µl MQ vízzel szuszpendáltuk és -80 °C-on tároltuk.

4.3.2. DNáz kezelés

A DNáz kezelés során az esetlegesen a mintában maradt genomi DNS fragmenteket távolítottuk el. 10 µl RNS-hez 0,5 µl DNáz enzimet (Fermentas 2U/ µl) és 2 µl DNáz puffert mértünk, majd MQ vízzel 20 µl végtérfogatra egészítettük ki. Ezután 30 percig inkubáltuk 37 °C-on, hogy az enzim aktivitásához szükséges hőmérsékletet biztosítsuk. Végül koncentrációt mértünk Implen típusú nanofotométerrel a további számításokhoz. Az eredményeket ng/µl-ben kaptuk és úgy számítottunk, hogy minden mintában 100 ng RNS legyen. A mintákat MQ vízzel hígítottuk 10 µl végtérfogatra.

4.3.3. cDNS írás

Reverz transzkripció során a célunk az mRNS kiegészítése komplementer cDNS molekulává. Molekuláris munkákhoz alkalmas, mert kevésbé sérülékeny, mint az RNS.

Az RNS-t tartalmazó 10 µl-es oldathoz 0,2 µl (200 U/ µl) reverz transzkriptáz enzimet (Thermo maxima), 4 µl 5x RT puffer oldatot, 1 µl dNTP-t (0,5 mM final), 1 µl

(100 pmol) random primert mértünk, majd MQ vízzel 20 µl végtérfogatra hígítottuk. A PCR reakcióhoz ESCO Swift PCR-készüléket használtunk az alábbi program szerint:

- 10 perc 25 °C-on
- 30 perc 50 °C-on
- 5 perc 85 °C-on

4.3.4. PCR optimalizálás

A cDNS-ekkel PCR reakciót végeztünk az általunk tervezett primerekkel és ef1a háztartási génnel. Az optimalizálás során az enzimműködés számára legmegfelelőbb hőmérséklet és a megfelelő mennyiségek beállítása volt a cél. Az ef1a génnel a cDNS-ek minőségét ellenőriztük. Az ef1a primer szekvenciáit a 8-as táblázat tartalmazza.

Primer neve	Szekvencia
ef1a	F 5'-TGT GGA GAG CTT CTC TAC-3'
	R 5'- TGA GGA AAT CCA CTT GG-3'

8. ábra: ef1a primer szekvenciája

Az optimális protokoll 12,5 µl-es végtérfogatra a következő volt:

Összetevő	Mennyiség (µl)
Taq puffer (10x)	1,25
MgCl ₂ (25 mM)	0,5
dNTP (2,5 mM)	1
Forward primer (6,6 mM)	0,5
Reverz primer (6,6 mM)	0,5
Taq polimeráz enzim (40x)	1
MQ	6,75

9. ábra: PCR optimalizálás protokollja

A master mix-hez 1-1 µl cDNS-t adtunk, majd PCR reakciót végeztünk Applied Biosystems ProFlex System-Life típusú, 3 kamrás PCR-géppel az alábbi program szerint:

Ciklusszám	Időtartam	Hőmérséklet
1 x	10 perc	95 °C
	15 másodperc	95 °C
45 x	20 másodperc	60 °C
	20 másodperc	72 °C
1 x	5 perc	72 °C

10. ábra: PCR optimalizálás programja

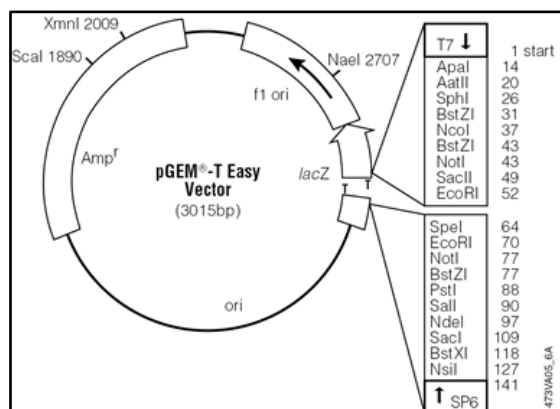
Végül a mintákat 1,5 %-os agaróz gélen futtattuk.

4.3.5. Kivágás gélből, tisztítás

A PCR optimalizálás során megfelelőnek talált primert az optimális arányokkal, de nagyobb (25 µl-es) végtérfogattal, három különböző cDNS-el felsokszoroztuk az előbbi program szerint. Ezután 1,5 %-os agaróz gélen futtattuk az egész mintát egy nagyobb zsebben (poolozás). Gélelektroforézis után a mintát a gélből kivágtuk UV lámpa alatt és NucleoSpin Clean-up kittel megtisztítottuk a NucleoSpin protokoll szerint. Ezután koncentrációt mértünk Implen nanofotométerrel a további számításokhoz.

4.3.6. Vektorba ligálás

Vektorként a pGEM-T Easy mesterséges plazmidot használtuk. Ez egy linearizált plazmid, melyet Promega EcoR V restriktív enzimmel hasítanak. Mindkét végen ragadós véget hoznak létre egy 3' timidin hozzáadásával. A túlnyúló 3'-T végek segítik az inzert beépülését és megakadályozzák a plazmid recirkularizációját. A vektor T7 és SP6 RNS polimeráz promotert tartalmaz, az inzert kivágására többek között EcoR I, BstZ I és Not I restriktív enzim használható.



11. ábra: pGEM-T Easy vektor

A gélből tisztított PCR termékünket az alábbi protokoll szerint ligáltuk a pGEM-T Easy vektorba:

Összetevő	Mennyiség (μl)
rapid ligáló puffer (2x)	5
pGEM-t Easy vektor	1
PCR termék	0,2
T4 DNS ligáz	1
MQ	2,8

12. ábra: vektorba ligálás

A mixet egy órán keresztül szobahőmérsékleten, majd egy éjszakán át -4 °-on inkubáltuk. A számításhoz használt képlet, melyet a megfelelő vektor-inzert aránnyal kell szorozni:

$$(50 \text{ ng vektor} \times 0,5 \text{ kb inzert}) / 3 \text{ kb vektor} = \text{inzert (ng)}$$

A képlet alapján a dlk1 gén esetében a mix-hez 0,10 μl PCR terméket adunk. A későbbiekben a jobb eredmények érdekében megdupláztuk az inzert mennyiségét.

A dio3b gén esetében 431 bp hosszúságú termék és 31,5 ng/ μl-es koncentráció mellett 0,7 μl PCR terméket adtunk a mixhez.

4.3.7. Transzformálás kompetens sejtbe, táptalaj készítése

A további munkákhoz folyékony és szilárd amplicilines, illetve szilárd IPTG, XGal amplicilines táptalajt készítettünk.

Kompetens sejtként One Shot TOP 10 *Escherichia coli*-t használtunk, amelybe hősokkal juttattuk be a vektorunkat. 50 µl TOP 10-hez 10 µl ligált terméket mértünk, majd 30 percig jégen tartottuk. Ezután 45 másodpercre 42 °C-os vízfürdőbe, majd 2 percre ismét jégre helyeztük őket. Végül 300 µl folyékony táptalajban, 37 °C-on rázattuk őket egy órán át.

4.3.8. Kék-fehér szelekció, kolónia PCR

A vektort tartalmazó kompetens sejtünket IPTG, XGal táptalajra szélesztettük. A módszer célja, hogy az inzertet tartalmazó vektorokat kimutassuk.

Az *E.coli*-ban található lac operon egyik strukturális génje a LacZ. Csak laktóz jelenlétében aktív, ilyenkor β-galaktozidáz enzim íródik át róla, mely a laktózt glükózra és galaktózra bontja. A molekuláris technika lényege, hogy IPTG (izopropil-β-D-tiogalactopiranozid), mint mesterséges indukálószer jelenlétében a LacZ gén aktív lesz, laktóz hiányában is. A táptalajhoz XGal-t (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galakto –piranozid), a β-galaktozidáz enzim kromogén szubsztrátját adjuk, így aktív enzim jelenlétében kék színreakció jelenik meg. Ha az inzert beépült a plazmidba, akkor elrontja annak LacZ génjét, így enzimaktivitás nem figyelhető meg, a telepek fehér színűek maradnak.

A szelektív táptalajra szélesztett sejtjeinket egy éjszakán keresztül 37 °C-on inkubáltuk, másnap a fehér színű telepekkel folytattuk a munkát. Ezeket folyékony, illetve szilárd amplicilines táptalajra szélesztettük, valamint kolónia PCR-t végeztünk az alábbi protokoll szerint:

Összetevő	Mennyiség (µl)
Taq puffer (10x)	2,5
MgCl ₂ (25mM)	2
dNTP 2,5 (mM)	2

Forward primer (6,6 mM)	0,6
Reverz primer (6,6 mM)	0,6
Taq polimeráz enzim (40x)	1
MQ	16,3

13. ábra: kolónia PCR

A PCR-hez használt program:

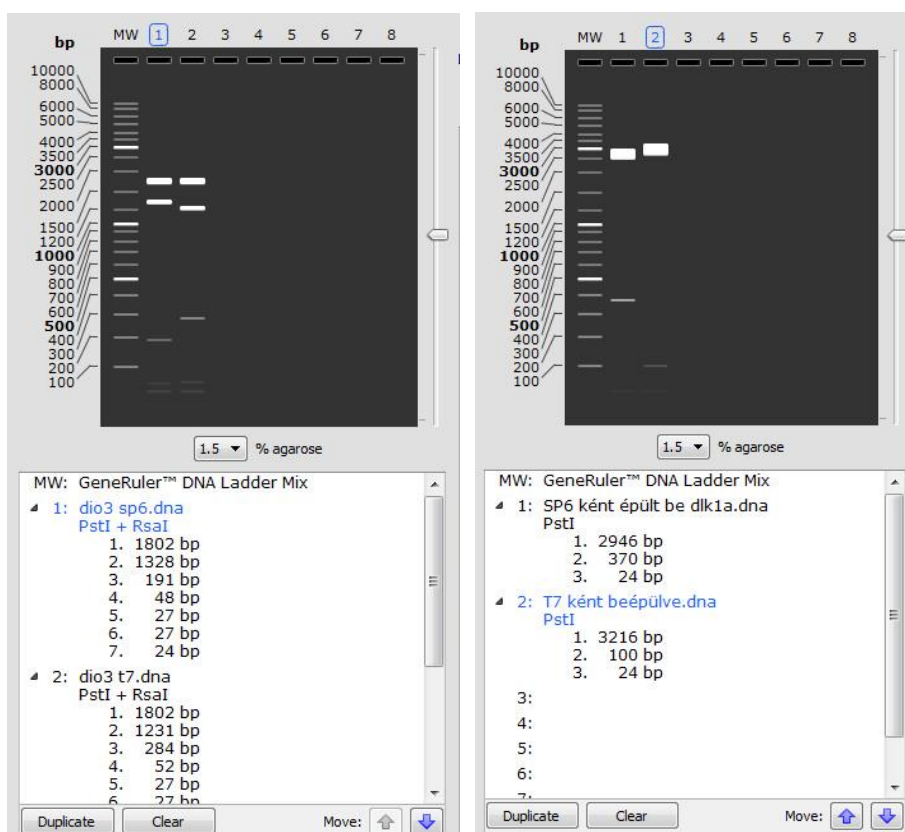
Ciklusszám	Időtartam	Hőmérséklet
1 x	2 perc	94 °C
	1 perc	94 °C
3 x	2 perc	53 °C
	9 perc	72 °C
35 x	20 másodperc	94 °C
	30 másodperc	55 °C
	9 perc	72 °C
1 x	5 perc	72 °C

14. ábra: kolónia PCR

A mintákat ezután 1,5 %-os agaróz gélen futtattuk és dlk1 gén esetén 450 bázispár hosszúságnál, dio3b gén esetén pedig 557 bázispárnál vártunk rekombináns terméket. Miután meggyőződünk róla, hogy az inzertet tartalmazó vektorunk beépült a kompetens sejtbe, a folyékony táptalajból Geneaid plazmid tisztító kittel (High-Speed Plasmid Mini Kit) tisztítottuk a megfelelő plazmidokat a protokoll szerint. Végül koncentrációt mértünk nanofotométerrel.

4.3.9. Az irányultság ellenőrzése, plazmid linearizálás

Az irányultság ellenőrzéséhez a folyékony táptalajból tisztított plazmidokat *dlk1* gén esetén *Pst*I restrikciós endonukleázzal, *dio3b* gén esetén pedig *Rsa*I és *Pst*I restrikciós endonukleázzal emésztették. A restrikciós enzimek a SnapGene programmal (Korf, 2004) készített szimulációk alapján kerültek kiválasztásra. A pGEM-T Easy plazmidba (3015 bp) mindkét irányban beépülhet az inzert, így restrikciós emésztés után, a keletkező termék hosszából következtethetünk a beépülés irányára. 1-1 µl plazmidhoz, 0,5 µl enzimet és 0,5 µl puffert, valamint 3 µl MQ vizet mértünk. 37 °C-on inkubáltuk egy órán át, majd gélelektroforézist végeztünk. *Dlk1* gén esetében, T7 irányultságú inzerettel a keletkező termékek várt hossza 3178 bp és 100 bp, míg SP6-os beépülési irányban 2946 bp és 370 bp. *Dio3b* gén esetén T7 irányultságnál 1802 bp és 1231 bp-nál vártunk fragmentet, míg SP6-os beépülési irányban 1802 és 1328 bázispárnál.



15. ábra: emésztés szimulálása SnapGene programmal *dio3* (bal) és *dlk1* (jobb) génre

A plazmid linearizáláshoz a *dlk1* génnél *RsaI* restrikciós enzimet, a *dio3* génnél pedig *ScaI* restrikciós enzimet használtunk, melyek nem vágnak bele az inzertbe. Ezután a mintákat NucleoSpin PCR clean-up kittel tisztítottuk és 1 %-os agaróz gélen futtattuk. Végül koncentrációt mértünk nanofotométerrel és úgy végeztük el a számításokat, hogy a próba jelölése során minden mintában 1 ng/μl DNS templát legyen.

4.3.10. A próba jelölése

A tisztított és linearizált DNS plazmidokból digoxigenin-uridin-5-trifoszfáttal jelölt antiszensz RNS próbákat és szensz kontroll próbákat hoztunk létre DIG RNA Labeling kit segítségével, az alábbi protokoll szerint:

Összetevő	Mennyiség (μl)
DNS templát	13
NTP labeling mix (10 x)	2
transzkripció puffer (10 x)	2
protektor RNáz inhibitor	1
RNS polimeráz	2

16. ábra: DIG RNS jelölés

Ezután két órán át inkubáltuk 37 °C-on, majd 2 μl RNáz mentes DNáz I-et hozzáadva 37 °C-on 15 percig, hogy a reakció lejárta után eltávolítsuk a fennmaradó DNS fragmenteket. Végül 2 μl EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav) segítségével leállítottuk a reakciót.

SP6-os beépülési iránynál SP6, T7 beépülési iránynál T7 RNS polimerázt használtunk, valamint kontroll csoportként, szensz próba esetén az irányultsággal ellentétes RNS polimerázt alkalmaztunk.

4.4. In situ hibridizáció

Az in situ hibridizációt egy 2008-as Nature közleményben megjelent protokoll szerint végeztük (Thisse és Thisse, 2008).

4.4.1. Az embriók fixálása

Vizsgálatainkat 5 napos embriókon végeztük el. A fixálásuk 4%-os paraformaldehid oldatban történt 4 °C-on egy éjszakán át. Másnap történt a pigmentáció eltávolítása hidrogén-peroxid kezeléssel. Erre azért van szükség, mert a kromogén szubsztrát könnyen megfesti a pigmentsejteket is, így a tényleges génexpresszió nehezebben figyelhető meg. A kezelés során az embriókat 3 %-os hidrogén-peroxid kálium-hidroxid elegyben inkubáltuk 30-60 percig. Ezután 1x-es foszfátpufferes sóoldattal eltávolítottuk a felesleges hidrogén-peroxidos oldatot. Az embriókat dehidratáltuk 5-5 percen keresztül 25, 50, 75 majd 100 %-os metanolban, amelyhez oldószerként PBS-t használtunk. A lárvák ennél a lépésnél 100% metanol oldatban -20 °C-on néhány hónapig eltárolhatók.

4.4.2. Az embriók permeábilissá tétele és hibridizáció

Az embriókat rehidratáltuk 5-5 percen keresztül 75, 50, majd 25 %-os etanollal, végül négyszer átmostuk PBS-el. A permeábilissá tétel proteináz K-val történt 30 percen keresztül. Az emésztési reakció célja, hogy a próba könnyebben átjusson a membránokon. A reakciót paraformaldehiddel állítottuk le 20 perc után, a túlemésztődés elkerülése végett. A mintákat ezután blokkoló pufferrel átmostuk, hogy növeljük a vizsgálat érzékenységét és csökkentjük a zajt.

Az embriókat előkezeltük egy hibridizációs mix segítségével, majd a digoxigeninnel jelölt próbát tartalmazó hibridizációs mixben inkubáltuk őket egy éjszakán át 70 °C-on.

4.4.3. Az embriók mosása és alkalikus foszfáttal konjugált digoxigenin antitest hozzáadása

A hibridizációs mixből és NaCl-os, triszodium citrátos oldatból elegyet készítettünk 75, 50, 25 %-os arányban. A mintákat leszálló oldatsorban átmostuk, végül tiszta NaCl-os, triszodium citrátos oldattal kétszer. Ezután ismét blokkoló pufferben inkubáltuk őket, majd

egy éjszakán át alkalikus foszfatázzal konjugált digoxigenin antitesttel (Roche, Anti-Dioxygenin-AP) kezeltük 4 °C-on.

4.4.4. Mosás és festés

Az embriókat blokkoló pufferrel mostuk át, hogy a felesleges digoxigenin antitesteket eltávolítsuk. Ezt követte a festés, amelyhez nitroblue-tetrazoliumot (NBT), és 5-bromo-4-kloro-3-indol foszfatázt (BCIP) használtunk alkalikus tris pufferben oldva (2-amino-2-hidroximetil-propán-1,3-diol). Az NBT/BCIP detektálás célja, hogy a digoxigenin antitesthez kötött alkalikus foszfatáz aktivitását jelöljük. Az NBT és a BCIP a kromogén szubsztrát, melyekből az enzim jelenlétében kékes-lilás színű termék keletkezik. A módszer nagy érzékenységgel és pontos detektálást tesz lehetővé (Jékely és Arendt, 2007). Az eljárás során fontos, hogy a festéshez használt oldatot sötétben kell tartani. A reakciót rendszeres időközönként ellenőrizni kell, majd kellő mértékű festődés elérése esetén leállítani EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav) tartalmú Stop oldat segítségével.

4.4.5. Mikroszkópos detektálás

A mikroszkópos detektáláshoz Leica M205 FA típusú sztereomikroszkópot használtunk. A készülék teljesen automatizált, rendelkezik FusionOptics™ és TripleBeam® path fluoreszcens technológiával. A maximális nagyítási lehetőség 2560x. Maximális felbontása 1050 vonalpár/mm. A tárgy mező 59 mm, munka távolság 61,5 mm. Rendelkezik motorizált fókusszal, zoom-mal, négyféle szűrővel fluoreszcens mintákhoz, teljes apokromatikus korrekcióval, iris diaphragm-mal.

5. Eredmények

5.1. In silico analízis

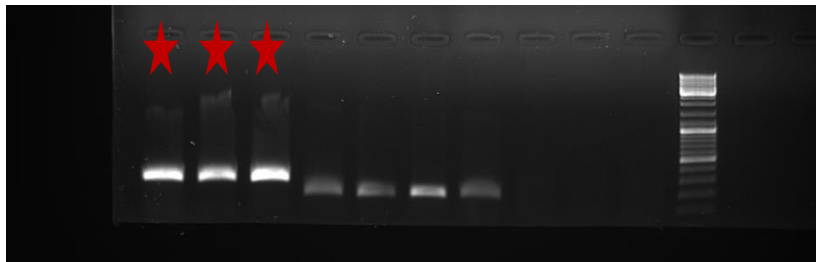
Humán	Név	Transzkript	Elhelyezkedés	Zebradánió	Transzkript	Elhelyezkedés
DLK1 (NG_016863.2)	delta-like 1	5	14kr.	dlk1 (NC_007128.6)	1	17kr.
RTL1 (NG_045001.1)	retrotransposon-like 1	1	14kr.	-	-	-
DIO3 (NC_000014.9)	deiodinase, iodothyronine, type III	1	14kr.	dio3b (NC_007131.6)	1	20kr.
				dio3a (NC_007128.6)	1	17kr.
MEG3 (NG_016853.1)	matrenally expressed 3	27	14kr.	-	-	-
MEG8 (NG_045000.2)	matrenally expressed 8	7	14kr.	-	-	-
				-	-	-
SNORD113-1 (NR_003229.1)	small nucleolar RNS	1	14kr.	-	-	-
PTTG1 (NC_000005.10)	Pituitary tumor- transforming gene	7	5kr.	pttg1 (NC_007125.6)	4	14kr.

17. ábra: Adenóma kialakulásában szerepet játszó gének összehasonlítása humán és zebradánió vonalon

5.2. A próba gyártása

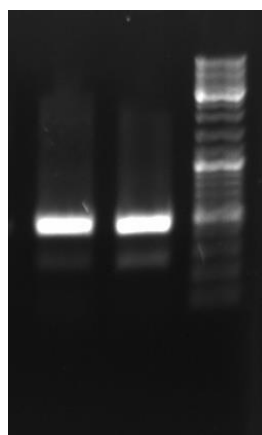
5.2.1. PCR optimalizálás

A *dlk1* génre tervezett két primerrel és *ef1a* háztartási gén primerrel, 3-3 cDNS-sel PCR optimalizálást végeztünk. A hőmérsékleteket és az összetevők mennyiségét úgy állítottuk be, hogy a reakció lejátszódásához a legmegfelelőbb legyen. A *dlk1* primerekre primer tervező program alapján a legmegfelelőbb hőmérséklet: 61,7 °C és 62 °C, valamint 60,6 °C és 60,8 °C a forward és reverz primerekre. A protokoll során 60 °C –os hőmérsékletet állítottunk be, az első primerrel 324 bázispár, a második primerrel pedig 231 bázispár hosszúságú terméket vártunk. Az *ef1a* a háztartási gént kontrollként használtuk. Az elektroforézis során az első primer adta a legerősebb fragmentet körülbelül 300 bázispár hosszúságnál, így a további munkákat ezzel a primerrel végeztük.



18. ábra: PCR optimalizálás *dlk1* és *ef1a* primerekkel (a csillaggal jelöltek)

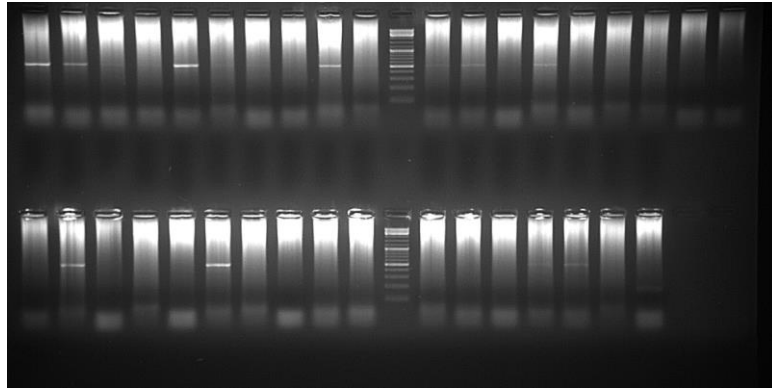
A *dio3b* gén esetében 431 bázispár hosszúságnál vártunk terméket. A primer tervező szoftver alapján a legmegfelelőbb hőmérséklet a forward és a reverz primerre: 61,6 °C és 62,2°C. A PCR reakciók során megfigyeltük, hogy áltermék nem keletkezett.



19. ábra: PCR optimalizálás *dio3-ra*

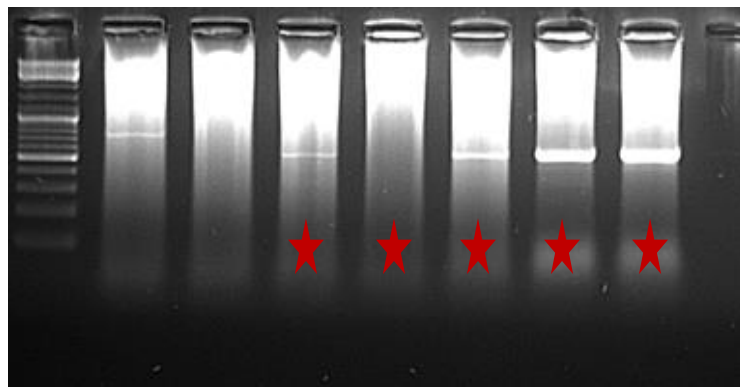
5.2.2. Kolónia PCR

Kolónia PCR-rel ellenőriztük, hogy a kompetens sejtünk tartalmazza-e a rekombináns plazmidot. A pGEM-T Easy vektor klónozó helyei (T7 és SP6) 126 bázispár hosszúságúak, a próbánk pedig a *dlk1* esetében 324 bázispár. Így a megfelelő fragmenteket 450 bázispárnál kaptuk, ezekből a mintákból tisztítottunk plazmidot folyékony táptalajból a próba készítéséhez.



20. ábra: Kolónia PCR *dlk1*-re pGEM-T Easy plazmiddal

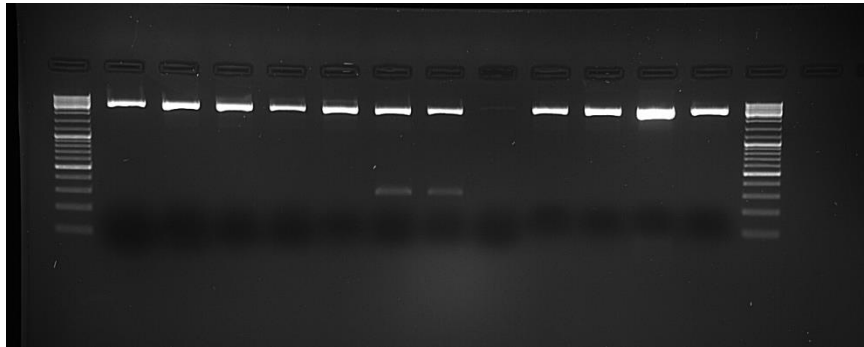
A *dio3b* génre tervezett primerek terméke 431 bázispár hosszúságú, így a kolónia PCR során azokból a mintákból végeztük el a tisztítást, ahol a klónozó helyekkel megnövelt, 557 bázispár hosszúságú terméket kaptuk.



21. ábra: Kolónia PCR *dio3*-ra pGEM-T Easy plazmiddal (a csillaggal jelöltek)

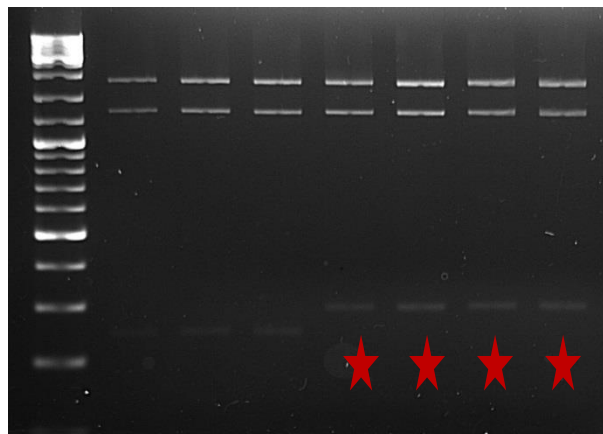
5.2.3. Az irányultság ellenőrzése

Dlk1 génre az inzert beépülésének irányát PstI-el történő restrikciós emésztéssel ellenőriztük. T7 irányultságú inzerettel a keletkező termékek várt hossza 3200 bp és 100 bp. SP6-os beépülési irányban 2946 bp és 370 bp-nál vártunk fragmentet. Az agaróz gélen való futtatás után jól látszik, hogy a hatodik és a hetedik zsebbe töltött minta SP6, a többi T7 irányultságú.



22. ábra: dlk1: irányultság ellenőrzése PstI-el

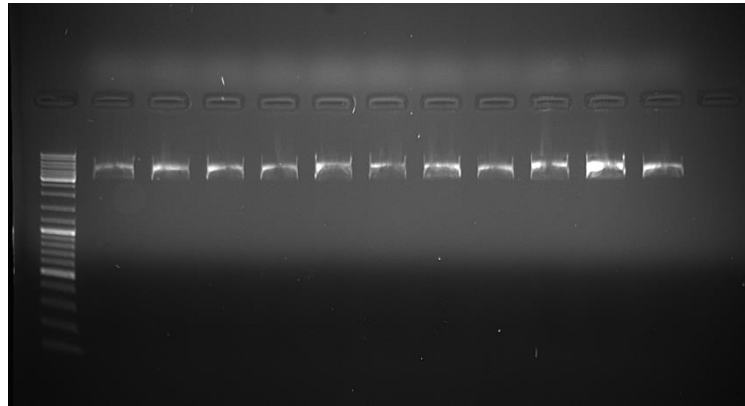
Dio3b gén esetén T7 irányultságnál 2100 bp és 1300 bp-nál vártunk fragmentet, míg SP6-os beépülési irányban 1500 és 1900 bázispárnál. A dio3b génre gyártott próbák esetében az összes inzert T7 irányban épült be a pGEM-T Easy plazmidba.



23. ábra: dio3: irányultság ellenőrzése RsaI-el és PstI-el (a csillaggal jelöltek)

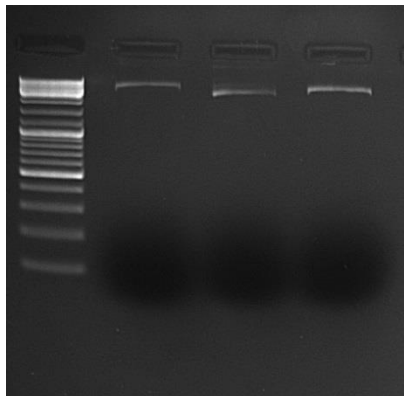
5.2.4. Plazmid linearizálás

A plazmid linearizáláshoz a dlk1 génre Rsa I restrikciós enzimet használtunk, ami csak egy helyen hasít és nem vág bele az inzertünkbe. A gélelektroforézis során meggyőződünk róla, hogy mindegyik plazmidot sikerült lineárisra tenni, ezt jelzik a fragmentek körülbelül 3000 bp hosszúságnál.



24. ábra: Dlk1 plazmid linearizálás Rsa 1-el

A dio3b gén esetében ScaI restrikciós endonukleázzal végeztük el a linearizálást, így 3500 bp hosszúságú fragmenteket kaptunk. Átermék nem keletkezett.

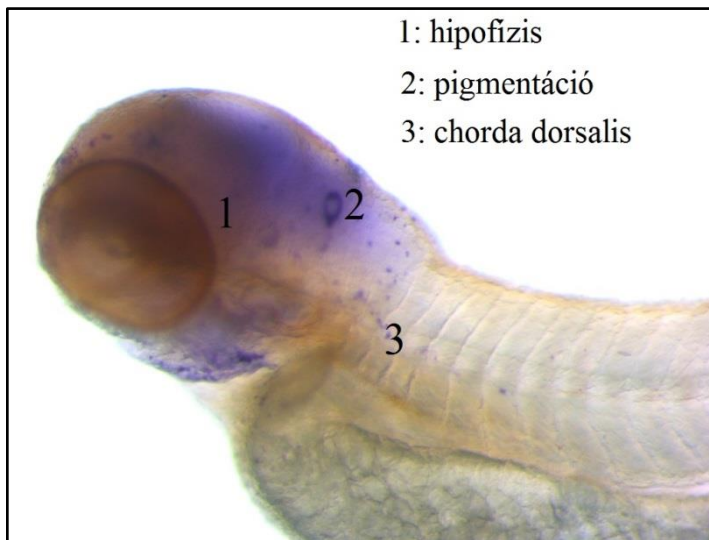


**25. ábra: Plazmid linearizálás
ScaI-el dio3-ra**

5.3. In situ hibridizáció

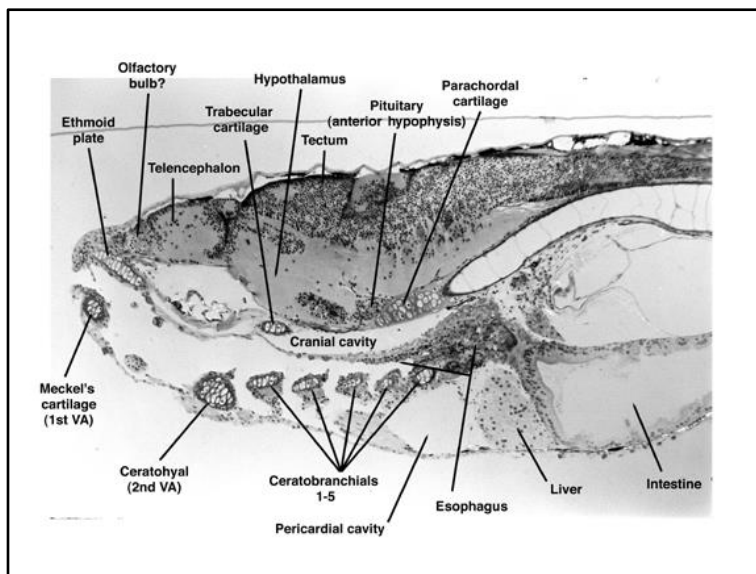
5.3.1. dlk1

A mikroszkópos detektálást 5 napos lárvákon végeztük el Leica M205 FA típusú sztereomikroszkóppal. Megfigyelhető, hogy az egész agy területe festődött, beleértve az agyalapi mirigyet is. A külső pigmentáció festődése a hidrogén-peroxid kezelés ellenére bizonyos egyedeknél látható. A fókusz állításával jól elkülöníthető a tényleges expressziós mintázattól, mely a mélyebb rétegekben fejeződik ki.



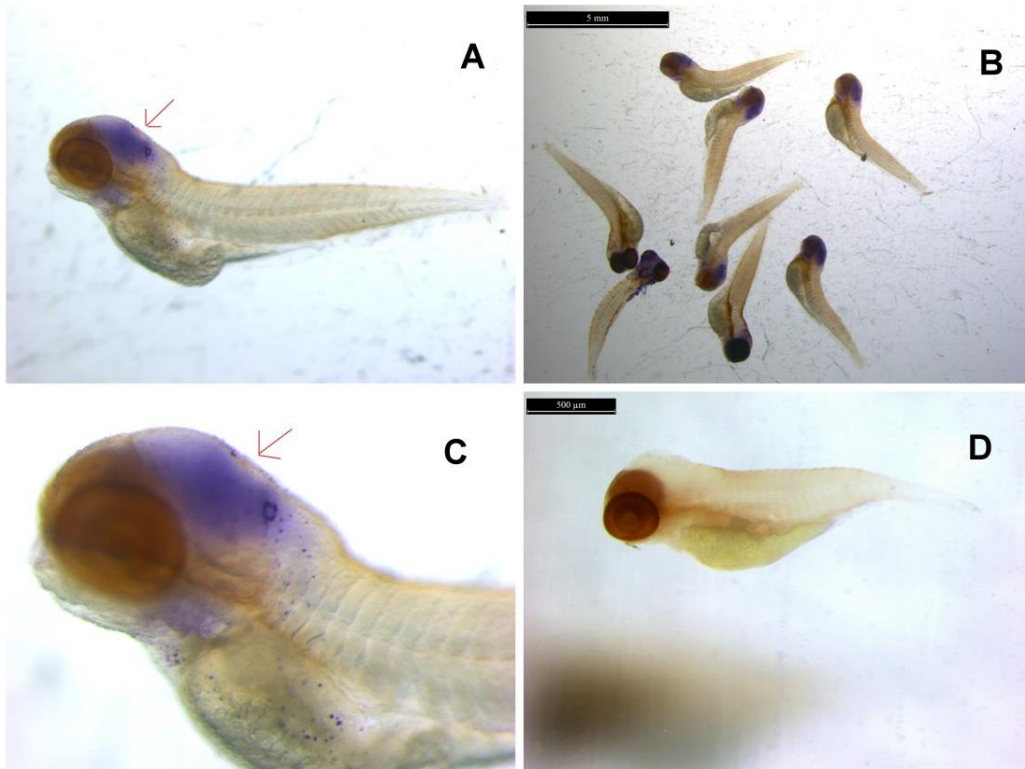
26. ábra: 5 napos lárva ventrális nézetből, 120x-os nagyítás

Ventrális irányból jól látható a *chorda dorsalis* és az attól rostrálisan elhelyezkedő parakordális porcszövet. Az agyalapi mirigy ebben a fejlődési stádiumban (120 hpf=hours post fertilization) a porcszövettől rostrális irányban, a szemkezdemények kaudális oldalán, a test középsíkjában helyezkedik el.



27. ábra: The Zebrafish Model Organism Database

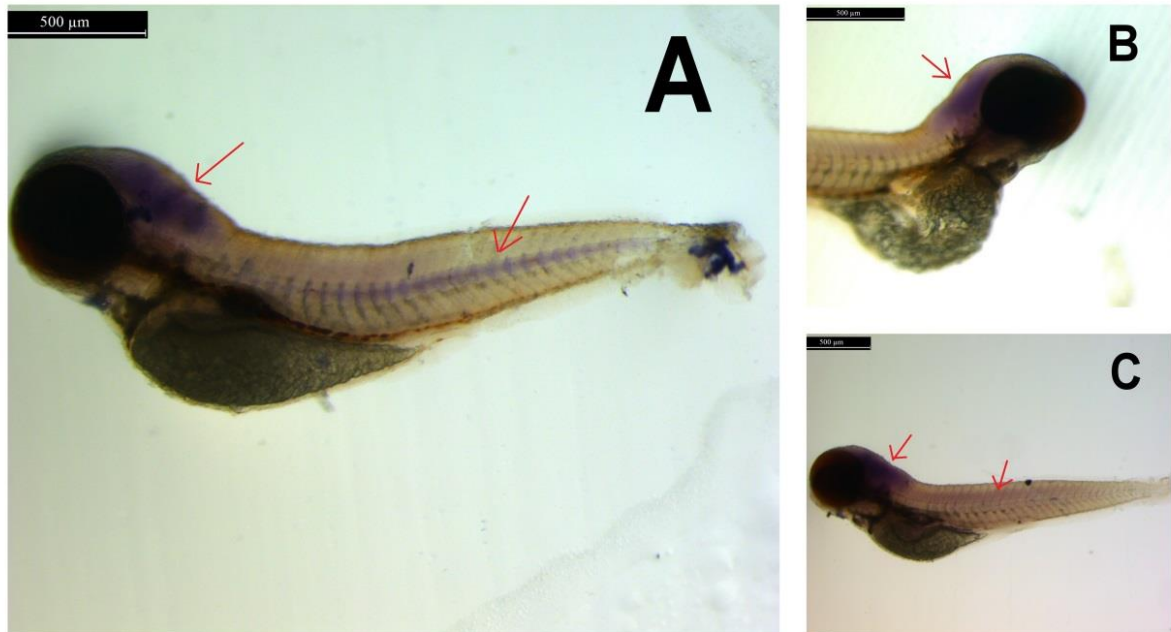
A mediális metszet a ZFIN adatbázisból származik és egy 5 napos embrió feji régióját mutatja. Az agyalapi mirigy már 24 órával a fertilizáció után kialakul (Chapman és mtsai., 2005). ebben a fejlődési stádiumban már kompakt szerv.



28. ábra: dlx1 gén kifejeződése: A. 38x-os nagyítás; B. 20x-os nagyítás; C. 130x-os nagyítás; D. szensz kontroll, 38x-os nagyítás

Erőteljes színreakció jelent meg az egész feji régióban, beleértve az agyalapi mirigyet is, mely nagyfokú génexpressziót feltételez az egész területen. A színreakció az összes megvizsgált egyedén jól látható volt. A test más részein egyik egyednél sem figyeltünk meg színreakciót, így valószínűsíthetjük, hogy a dlx1 ebben a fejlődési stádiumban csak az agy területén expresszálódik. A negatív kontrollként használt szensz próbával egyetlen egyed sem festődött.

5.3.2. dio3



33. ábra: dio3 in situ hibridizáció lárvákon; A: antiszensz próba, 55x nagyítás, B:antiszensz próba, 78x nagyítás, C:szensz kontroll, 55x nagyítás (piros nyilak jelölik a génkifejeződés helyét)

A *dio3* gén 5 napos zebradánió lárvákon mind a feji régióban, mind a gerincevelő területén expresszálódott. A kontrollként használt szensz próba estén szintén megfigyeltünk elszíneződést. Az imprintálódó lókuszon gyakran előfordul, hogy a DNS komplementer száláról antiszensz gének íródnak át, melyeknek az imprintálódás kialakításában lehet szerepük (Hernandez és mtsai., 2002; Werner, 2005). A *dio3* génről antiszensz transzkript íródik át humán vonatkozásban (NC_000014.9), illetve egér (NC_000078.6) és patkány (NC_005105.4) vonalon (Hernandez és mtsai., 2002). Jelenlegi ismereteink szerint zebradánióban még nem detektálták *dio3* antiszensz transzkript jelenlétét, de feltételezhetjük, hogy ebben az esetben is hasonló jelenség játszódik le, ezért kaptunk pozitív eredményt a kontrollnak szánt szensz próbára.

6. Következtetések

Munkánkkal szeretnénk olyan hipofízis adenoma modell alapjait megteremteni, ami a későbbiekben alkalmas lehet az agyalapimirigy-daganatok kezelésére szánt készítmények és egyéb terápiás eljárások tesztelésére. Elsősorban tumor-szupresszor gének csendesítésével szeretnénk ezt megvalósítani (Wilkinson és Wiedenheft, 2014). Olyan klinikai adatokból ismert géneket választottunk ki, amelyek zebradánióban is megtalálhatóak és feltételezhetően a humán vonalon megfigyeltekkel hasonló funkcióval bírnak.

Vizsgálataink során a humán klinikailag nem funkcionáló adenomára jellemző tumor-szupresszor gének in situ hibridizációs vizsgálatát végeztük el 5 napos lárvákon. A mikroszkópos detektálás során azt találtuk, hogy ebben a fejlődési stádiumban a *dlk1* az egész feji régióban expresszálódik. Humán vonatkozásban, a *DLK1* gén szerepet játszik az embrionális pluripotens idegi őssejtek differenciálódásában (Surmacz és mtsai., 2012). Eredményeink tükrében feltételezhetjük, hogy zebradánióban is hasonló regulátor funkciót tölt be. Az 5 napos lárva stádiumban még nem minden agyi régió különül el markánsan és javában zajlanak az idegsejt differenciálódások. Ezzel magyarázható az in situ hibridizációs képeken látható teljes agyi régió elszíneződése. A test más részein nem tapasztaltunk színreakciót, így valószínűsíthetjük, hogy a *dlk1* gén ebben a fejlődési stádiumban csak az agy területén expresszálódik.

A *dio3b* 5 napos zebradánió lárváknál a feji régióban, valamint a gerincvelőben fejeződik ki. A *dio3* génhez kontrollnak használt szensz próba is pozitív reakciót adott. A *DIO3* gén esetében korábban már detektálták az ellentétes szárlól átíródo antiszensz RNS transzkript jelenlétét humán (NC_000014.9), egér (NC_000078.6), illetve patkány (NC_005105.4) vonalon, azonban jelenlegi tudásunk szerint zebradánióban még nem (Hernandez és mtsai., 2002, 2004). Az általunk negatív kontrollnak használt szensz próba festődése feltételezhetően antiszensz RNS transzkript jelenlétét jelzi.

További terveink közt szerepel a génkifejeződés vizsgálata felnőtt hal agyon, valamint más tumor-szupresszorok esetében. A pozitív eredmények függvényében ezen gének csendesítését kívánjuk elvégezni.

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet fejezni ki témavezetőimnek Reining Mártának és Dr. Patócs Attilának a szakdolgozat megírása során nyújtott rengeteg segítségért, belső konzulensemnek Szabó Krisztiánnak, valamint a Halmgazdálkodási Tanszék összes dolgozójának

8. Irodalomjegyzék

- ANDERSEN, D.; S. PETERSSON, L. JØRGENSEN, P. BOLLEN, P. JENSEN, B. TEISNER, H. SCHROEDER, és C. JENSEN. 2009. Characterization of DLK1+ cells emerging during skeletal muscle remodeling in response to myositis, myopathies, and acute injury. *Stem Cells* 27: 898–908.
- BÁLINT, P. 1986. Orvosi élettan. Medicina Könyvkiadó, Budapest.
- BARLOW, D.P., és M.S. BARTOLOMEI. 2014. Genomic Imprinting in Mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6: 018382.
- BERGHMANS, S., C. JETTE, D. LANGENAU, K. HSU, R. STEWART, T. LOOK, és J.P. KANKI. 2005. Making waves in cancer research: New models in the zebrafish. *BioTechniques* 39: 227–237.
- BOUZAFFOURA, M., C. RAMPONA, M. RAMAUGÉC, F. COURTINC, és S. VRIZ. 2010. Implication of type 3 deiodinase induction in zebrafish fin regeneration. *General and Comparative Endocrinology* 168: 88–94.
- BROWN, T.A. 2010. Gene cloning and DNA analyses. Sixth edit. Wiley-Blackwell, Hong-Kong.
- BUTT, W.R. 1975. Hormone Chemistry. John Wiley & Sons, London.
- BUTZ, H. 2011. MikroRNS-ek szerepe a sporadikus hypophysis adenomák patogenezisében. *Doktori tézis*.
- CÁMARA GÓMEZ, R. 2014. Non-functioning pituitary tumors: 2012 update. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)* 61: 160–170.
- CAMPBELL, I.M., T. GAMBIN, P. DITTWALD, C.R. BECK, A. SHUVARIKOV, P. HIXSON, A. PATEL, és MTSAL. 2014. Human endogenous retroviral elements promote genome instability via non-allelic homologous recombination. *BMC biology* 12: 74.
- CELIS, J.E. 2006. Cell biology- A laboratory handbook, Elsevier Academic Press, London.
- CHAPMAN, S., A. SAWITZKE, D. CAMPBELL, és S. GC. 2005. A three-dimensional atlas of pituitary gland development in the zebrafish. *THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY* 487: 428 – 440.
- CHEUNSUCHON, P., Y. ZHOU, X. ZHANG, H. LEE, W. CHEN, Y. NAKAYAMA, K.A. RICE, és MTSAL. 2011. Silencing of the Imprinted DLK1-MEG3 Locus in Human Clinically Nonfunctioning Pituitary Adenomas. *The American Journal of Pathology* 179: 2120–2130.
- COOPER, O., és S. MELMED. 2012. Subclinical hyperfunctioning pituitary adenomas: The silent tumors. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 26: 447–460.
- CROTEAU, W., S.L. WHITTEMORE, M.J. SCHNEIDER, és D.L. ST. GERMAIN. 1995. Cloning and Expression of a cDNA for a Mammalian Type III Iodothyronine Deiodinase. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 16569–16575.
- CSOKONYA, M., és G. HOFFMANN. 2000. Fejlődésbiológia I-II. Pro Pannónia Kiadói Alapítvány, Pécs.

- DONANGELO, I., és S. MELMED. 2012. Pituitary Adenomas. *In Handbook of Neuroendocrinology*, 739–760. Academic Press, London.
- DONG, W., L. MACAULAY, K.W. KWOK, D.E. HINTON, és H.M. STAPLETON. 2013. Using Whole mount In Situ Hybridization to Examine Thyroid Hormone Deiodinase Expression in Embryonic and Larval Zebrafish: a Tool for examining OH-BDE toxicity to early life stages. *Aquatic Toxicology* 15: 190–199.
- DR. OBÁL, F. 1982. Az emberi test I-II. Gondolat Kiadó, Budapest.
- DR. PERRY, S.F., M. DR. EKKER, A.P. DR. FARRELL, és C.J. BRAUNER. 2010. Zebrafish. Academic Press, London.
- DR. ZBORAY, G. 2010. Összehasonlító anatómiai praktikum I-II. *In Nemzeti Tankönyvkiadó*, Budapest,
- FALIX, F.A., D.C. ARONSON, W.H. LAMERS, és I.C. GAEMERS. 2012. Possible roles of DLK1 in the Notch pathway during development and disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1822: 988–995.
- FARREL, A.P. 2011. Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment. Academic Press, London.
- FEITSMA, H., és E. CUPPEN. 2008. Zebrafish as a Cancer Model. *Molecular Cancer Research* 6: 685–695.
- GREENSPAN, F.S., és D.G. GARDNER. 2001. Basic and Clinical Endocrinology. Lange Medical Books/McGraw-Hill.
- GUO, C., X. CHEN, H. SONG, M.A. MAYNARD, Y. ZHOU, A. V LOBANOV, V.N. GLADYSHEV, és MTSAI. 2015. Intrinsic Expression of a Multiexon Type 3 Deiodinase Gene Controls Zebrafish Embryo Size. *Endocrinology* 155: 4069–4080.
- GURUHARSHA, K.G., M.W. KANKEL, és S. ARTAVANIS-TSAKONAS. 2015. The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nature Review Genetics* 13: 654–666.
- HEIJLEN, M., A.M. HOUBRECHTS, E. BAGCI, S.L.J.V. HERCK, S. KERSSEBOOM, C. V ESGUERRA, R. BLUST, és MTSAI. 2014. Knockdown of Type 3 Iodothyronine Deiodinase Severely Perturbs Both Embryonic and Early Larval Development in Zebrafish. *Endocrinology* 155: 1547–1559.
- HEIJLEN, M., A.M. HOUBRECHTS, és V.M. DARRAS. 2013. Zebrafish as a model to study peripheral thyroid hormone metabolism in vertebrate development. *General and Comparative Endocrinology* 188: 289–296.
- HELEN, M.T., G. LEGRADI, T. BARTHA, D. SALVATORE, R.M. LECHAN, és P.R. LARSEN. 1999. Regional Expression of the Type 3 Iodothyronine Deiodinase Messenger Ribonucleic Acid in the Rat Central Nervous System and Its Regulation by Thyroid Hormone. *Endocrinology* 140: 784–790.
- HELFMAN, G.S., B.B. COLLETTE, D.E. FACEY, és B.W. BOWEN. 2009. The Diversity of Fishes. Wiley-Blackwell.
- HERNANDEZ, A., S. FIERING, E. MARTINEZ, V.A. GALTON, és S.G. DONALD. 2002. The gene locus encoding iodothyronine deiodinase type 3 (Dio3) is imprinted in the fetus and expresses antisense transcript. *Endocrinology* 143: 4483–4486.

- HERNANDEZ, A., M.E.. MARTINEZ, W. CROTEAU, és D.L. ST. GERMAIN. 2004. Complex organization and structure of sense and antisense transcripts expressed from the DIO3 gene imprinted locus. *Genomics* 83: 413–424.
- HERZOG, W., X. ZENG, Z. LELE, C. SONNTAG, J. TING, C. CHANG, és M. HAMMERSCHMIDT. 2003. Adenohypophysis formation in the zebrafish and its dependence on Sonic hedgehog. *Developmental Biology* 254: 36–49.
- HOWE, K., M.D. CLARK, C.F. TORROJA, J. TORRANCE, M. MUFFATO, J.E. COLLINS, S. HUMPHRAY, és MTSAL. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496: 498–503.
- HUANG, S.A., D.M. DORFMAN, D.R. GENEST, D. SALVATORE, és P.R. LARSEN. 2016. Type 3 Iodothyronine Deiodinase Is Highly Expressed in the Human Uteroplacental Unit and in Fetal Epithelium. 88: 1384–1388.
- JÉKELY, G., és D. ARENDT. 2007. Cellular resolution expression profiling using confocal detection of NBT / BCIP precipitate by reflection microscopy. *BioTechniques* 42: 751–755.
- KAMESWARAN, V., N.C. BRAMSWIG, L.B. MCKENNA, M. PENN, J. SCHUG, N.J. HAND, Y. CHEN, és MTSAL. 2014. Epigenetic regulation of the DLK1-MEG3 microRNA cluster in human type 2 diabetic islets. *Cell metabolism* 19: 135–45.
- KATOH, K., K. MISAWA, K. KUMA, és T. MIYATA. 2002. MAFFT : a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleid Acid Research* 30: 3059–3066.
- KESTER, M.H.A., M.J.M. TOUSSAINT, C.A. PUNT, R. MATONDO, A.M. AARNIO, V.M. DARRAS, M.E. EVERTS, és MTSAL. 2009. Large Induction of Type III Deiodinase Expression After Partial Hepatectomy in the Regenerating Mouse and Rat Liver. 150: 540–545.
- KIMMEL, C.B., W.W.; BALLARD, S.R.; KIMMEL, B.; ULLMANN, és T.F. SCHILLING. 1995. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics* 203: 255–310.
- KOPAN, R., és M.X.G. ILAGAN. 2009. The Canonical Notch Signaling Pathway : Unfolding the Activation Mechanism. *Cell*.
- KORF, I. 2004. Gene finding in novel genomes. *BMC bioinformatics* 5: 59.
- KÜHNEL, W. 1997. SH orvosi atlasz: Szövevény. Springer Hungarica Kiadó, Budapest.
- LALITHA, S. 2004. Primer Premier 5. *Biotech Software & Internet Report* 1: 270–272.
- LAWRENCE, C. 2007. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* 269: 1–20.
- LEHNER, B., P. KUNZ, H. SAEHR, és J. FELLEBERG. 2014. Epigenetic silencing of genes and microRNAs within the imprinted Dlk1-Dio3 region at human chromosome 14 . 32 in giant cell tumor of bone. *BMC Cancer* 14: 1–10.
- LEVSKY, J.M., és R.H. SINGER. 2003. Fluorescence in situ hybridization : past , present and future. *Journal of Cell Science* 116: 2833–2838.
- LEVY, A. 2004. Pituitary disease: presentation, diagnosis, and management. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 75: 47–52.

- MIAO, Z., Y. MIAO, Y. LIN, és X. LU. 2012. Overexpression of the Notch3 receptor in non-functioning pituitary tumours. *Journal of Clinical Neuroscience* 19: 107–110.
- MOORE, T.O.M., és D. HAIG. 1991. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends in genetics* 7: 45–49.
- MUSTAFA, O.G., és A.M. MCGREGOR. 2013. Diagnosis of pituitary disease. *Medicine* 41: 497–503.
- OCZKOWICZ, M., A. PIESTRZYSKA-KAJTOCH, K. PIÓRKOWSKA, B. REJDUCH, és M. RÓZYCKI. 2010. Expression of DLK1 and MEG3 genes in porcine tissues during postnatal development. *Genetics and molecular biology* 33: 790–794.
- OLIVEIRA, R.F., és D.M. GONÇALVES. 2008. Hormones and Social Behaviour of Teleost Fish. Science Publishers.
- PALMA, F., és L. LARIZZA. 2014. Pituitary Adenomas. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* 9: 338–340.
- POLLÁK, E. 2011. Összehasonlító anatómiai gyakorlat. Comenius Kiadó, Pécs.
- PREECE, M.A., és G.E. MOORE. 2000. Genomic Imprinting, Uniparental Disomy and Foetal Growth. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 11: 270–275.
- REIK, W., és J. WALTER. 2001. Genomic Imprinting : Parental Influence on the Genome. *Nature Review Genetics* 2: .
- RODRÍGUEZ, P., M. HIGUERAS, A. GONZÁLEZ-RAJAL, A. ALFRANCA, M. FIERRO-FERNÁNDEZ, R. GARCÍA-FERNÁNDEZ, M. RUIZ-HIDALGO, és M.TSAI. 2012. The non-canonical NOTCH ligand DLK1 exhibits a novel vascular role as a strong inhibitor of angiogenesis. *Cardiovascular Research* 93: 232–41.
- ROULSTON, J.E., és J.M.S. BARTLETT. 2004. Molecular Diagnosis of Cancer.
- ROZIER, F., V. MIRABET, T. VERNOUX, és P. DAS. 2014. Analysis of 3D gene expression patterns in plants using whole-mount RNA in situ hybridization. *Nature Protocols* 9: 2464–2475.
- SADLER, T.W. 2000. Langman's Medical Embryology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- SÁNCHEZ-SOLANA, B., M.L. NUEDA, M.D. RUVIRA, M.J. RUIZ-HIDALGO, E.M. MONSALVE, S. RIVERO, J.J. GARCÍA-RAMÍREZ, és M.TSAI. 2011. The EGF-like proteins DLK1 and DLK2 function as inhibitory non-canonical ligands of NOTCH1 receptor that modulate each other ' s activities. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813: 1153–1164.
- SPENCE, R., M.K. FATEMA, M. REICHARD, K.A. HUQ, M.A. WAHAB, Z.F. AHMED, és C. SMITH. 2006. The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology* 44: 1435–1448.
- STOLETOV, K., és R. KLEMKE. 2008. Catch of the day: zebrafish as a human cancer model. *Oncogene* 27: 4509–4520.
- SURMACZ, B., P. NOISA, J. RISNER-JANICZEK, K. HUI, U. M, W. CUI, és LI M. 2012. DLK1 promotes neurogenesis of human and mouse pluripotent stem cell-derived neural progenitors via modulating Notch and BMP signalling. *Stem Cell Riview* 8: 459–471.
- SZEBERÉNYI, M. 2011. Molekuláris sejtbológia. Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs.

- SZENTÁGOTHAJ, J. 1975. Funkcionális anatómia I-II. Medicina Könyvkiadó, Budapest.
- THISSE, C., és B. THISSE. 2008. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nature* 3: 59–69.
- TICHOMIROVA, M.A., A.F. DALY, és A. BECKERS. 2009. Familial pituitary adenomas. *Journal of Internal Medicine* 266: 5–18.
- TILGHMAN, S.M. 1999. The Sins of the Fathers and Mothers : Genomic Imprinting in Mammalian Development. *Cell* 96: 185–193.
- VERLOOP, H., O.M. DEKKERS, R.P. PEETERS, J.W. SCHOONES, és J.W.A. SMIT. 2014. Genetic variation in deiodinases : a systematic review of potential clinical effects in humans. *GENETICS IN ENDOCRINOLOGY* 3: 123–135.
- VIGH, H.B., és L. KONDICS. 1997. Összehasonlító szövettan. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest.
- WADDELL, J.N., P. ZHANG, Y. WEN, S.K. GUPTA, A. YEVTODIYENKO, J. SCHMIDT, C.A. BIDWELL, és M.TSAI. 2010. Dlk1 Is Necessary for Proper Skeletal Muscle Development and Regeneration. *PLoS One* 5: .
- WATERHOUSE, A.M., J.B. PROCTER, D.M.A. MARTIN, M. CLAMP, és G.J. BARTON. 2009. Jalview Version 2 — a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25: 1189–1191.
- WERNER, A. 2005. Natural Antisense Transcripts. *RNA Biology* 2: 53–62.
- WILKINSON, R., és B. WIEDENHEFT. 2014. A CRISPR method for genome engineering. *F1000Prime Rep* 6: 3.
- YEN, J., R.M. WHITE, és D.L. STEMPLE. 2014. Zebrafish models of cancer: progress and future challenges. *Current opinion in genetics & development* 24: 38–45.