10.14751/SZIE.2014.049

Szent István Egyetem

Ösztrogén hatást kimutató biomarker zebradánió vonal létrehozása

Doktori (Ph. D.) értekezés

Csenki-Bakos Katalin

GÖDÖLLŐ

2014

10.14751/SZIE.2014.049

A doktori iskola
megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola
tudományága: Mezőgazdaság-tudomány
alprogram: Halbiológia és halgazdálkodás

vezetője: Dr. Mézes Miklós
egyetemi tanár, az MTA levelező tagja
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Állattudományi Alapok Intézet,
Takarmányozástani Tanszék

témavezető: Dr. Kovács Balázs
tudományos főmunkatárs, PhD
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet
Halgazdálkodási Tanszék

társtémavezető: Dr. Müller Ferenc
adjunktus, CSc
Klinikai és Kísérleti Orvostudományi Iskola
Orvos- és Fogorvostudományi Kar
Birminghami Egyetem
Edgbaston, Birmingham, Egyesült Királyság

.....

Dr. Mézes Miklós, az iskolavezető jóváhagyása

....

Dr. Kovács Balázs, témavezető jóváhagyása

Dr. Müller Ferenc társtémavezető jóváhagyása

Tartalomjegyzék

1 Rövidítések jegyzéke 9

2 Bevezetés és célkitűzés 15

3 Irodalmi áttekintés 19

3.1 Hormonhatású anyagok 19

3.2 Ösztrogénhatású anyagok a vízi környezetben 19

3.3 A halak endokrin rendszere 21

3.4 Természetes és mesterséges ösztrogénhatású anyagok 24

3.4.1 Mesterséges ösztrogén hatású vegyületek 24

3.4.2 Nehézfémek 25

3.4.3 Természetes ösztrogének 26

3.4.3.1 A zearalenon 27

3.5 Az ösztrogénhatású anyagok hatásmechanizmusa 28

3.6 Ösztrogénhatású anyagok kimutatása 30

3.6.1 Analitikai módszerek 30

3.6.2 *in vitro* tesztrendszerek 31

3.6.3 *in vivo* tesztrendszerek 33

3.6.4 Toxikológiai tesztek a jövőben 36

3.6.5 Biomarker gének 37

3.6.5.1 Aromatáz (cyp19) 38

3.6.5.2 Vitellogenin 39

3.7 Vitellogenin géntermékek kimutatása 40

3.7.1 Fehérje szintű módszerek 40

3.7.2 *mRNS* szintű módszerek 42

3.8 Vitellogenin géntermékek vizsgálata zebradánióban 43

3.9 Állatmodellek szerepe a toxikológiában 46

3.10 Toxikológiai vizsgálatokban használt halfajok 46

3.11 A zebradánió, mint toxikológiai modellállat 49

3.12 Transzgenikus állatok a toxikológiában 49

3.13 Bioszenzor zebradánió vonalak 51
3.13.1 Aromatáz transzgenikus zebradánió vonal 52
3.13.2 Vitellogenin transzgenikus zebradánió vonal 53
3.14 Génkonstrukciók, vektorok típusai 54
3.14.1 Zebradánióban használt transzpozonok 55
3.14.1.1 A Gateway technika 56
3.15 Génbeviteli módszerek halakban 58
3.16 Riportergének a toxikológiában 58
3.17 A zebradánió májfejlődése 60
4 Anyag és módszer 61
4.1 A kísérletek helyszíne 61
4.2 Felhasznált állatok és tartási körülmények 61
4.3 DNS-tisztítás 61
4.4 Agaróz gélelektroforézis 62
4.5 A vtg1-mCherry génkonstrukció létrehozása 62
4.5.1 Vitellogenin transzkripciós start hely azonosítása 62
4.5.2 A vtg-1 promóter elemzése 62
4.5.3 A *vtg1:*mCherry génkonstrukció létrehozásához szükséges primerek tervezése 62
4.5.4 PCR reakciók 63
4.5.4.1 A promóter régió felsokszorozása 63
4.5.4.2 A fluoreszcens fehérjét kódoló szakasz felsokszorozása 63
4.5.4.3 Fragment tisztítás agaróz gélből 63
4.5.4.4 Gateway technika 64
4.5.4.4.1 BP klónozás 64
4.5.4.4.2 LR klónozás 65
4.5.4.4.3 Transzformálás 65
4.5.4.4.4 Kolónia PCR 65
4.5.4.4.5 Restrikciós emésztés 66

4.6 A *vtg1*-mCherry transzgenikus vonal létrehozása 66
4.6.1 A *vtg1*-mCherry konstrukció linearizálása 66
4.6.2 Transzpozáz mRNS létrehozása 66
4.6.3 Mikroinjektálás 66
4.6.4 Tranziens expresszió vizsgálata 66
4.6.5 A konstrukció öröklődésének vizsgálata 67
4.6.5.1 Primertervezés és mCherry specifikus PCR reakció 67
4.6.5.2 A transzgenikus vonal további generációinak létrehozása 67
4.7 Az mCherry indukció kezdetének vizsgálata 68
4.8 A *vtg1:mCherry* vonal indukálhatóságának vizsgálata ösztrogén hatású anyagokkal 68
4.8.1 Felhasznált anyagok 68
4.8.2 Az embriók kezelése 68
4.8.3 Mikroszkópos vizsgálatok 69
4.8.4 Fluoreszcens felvételek kiértékelése 69
4.9 Az mCherry indukció vizsgálata kifejlett hímekben 69
4.10 Vitellogenin „*whole mount" in situ* hibridizáció 70
4.10.1 Az *in situ* hibridizációhoz használt próba előállítása 70
4.10.1.1 Primertervezés 70
4.10.1.2 PCR termék előállítása 70
4.10.1.2.1 Klónozás és a próba előállítása 70
4.10.2 A *„whole mount" in situ* hibridizáció menete 71
4.11 Zearalenon egyedfejlődésre és vtg indukcióra gyakorolt hatásának vizsgálata 71
4.11.1 Kifejlett hímek kezelése 71
4.11.2 FET teszt 72
4.11.3 Mintaelőkészítés 72
4.11.4 Vitellogenin ELISA 73
4.11.5 RNS tisztítás és reverz transzkripció 73
4.11.6 Vitellogenin qRT PCR 73

4.12 Dózis-hatás görbék felvétele, statisztikai módszerek ... 74

5 Eredmények ... 75

5.1 Ösztrogénhatásra érzékeny biomarker zebradánió vonal létrehozása ... 75

5.1.1 A vitellogenin-1 promóter elemzése ... 75

5.1.2 *Vitellogenin*-mCherry génkonstrukció létrehozása Gateway technikával ... 77

5.1.2.1 BP klónozás ... 77

5.1.2.2 LR klónozás ... 78

5.1.3 Mikroinjektálás, tranziens expresszió vizsgálata ... 79

5.1.4 A *vtg1:*mCherry transzgenikus vonal egymást követő nemzedékeinek létrehozása ... 80

5.2 A fluoreszcens jel kifejeződésének vizsgálata különböző fejlődési stádiumokban ... 84

5.3 A fluoreszcens jel kifejeződésének koncentrációfüggése ... 85

5.3.1 Fluoreszcens jel kifejeződése az F3 generáció embrióiban ... 85

5.3.2 Fluoreszcens jel kifejeződése kifejlett hímekben ... 86

5.3.3 „Alvonalak” érzékenységének összevetése ... 87

5.3.4 Dózis-hatás összefüggés különböző ösztrogénhatású anyagok esetén ... 87

5.4 *vtg1 in situ* hibridizáció ... 89

5.5 Egy ösztrogén hatású mikotoxin vizsgálata ... 91

5.5.1 Embriótoxicitás vizsgálat ... 91

5.5.2 A zearalenon ösztrogénhatásának mérése vitellogenin indukció alapján ... 93

5.5.2.1 Kifejlett hímeken végzett vitellogenin mérések ... 93

5.5.2.2 Vitellogenin szint mérése embriókorban ... 95

6 Következtetések és javaslatok ... 97

6.1 A vtg1:mCherry transzgenikus vonallal kapcsolatos következtetések ... 97

6.1.1 A vitellogenin-1 promóter elemzése ... 97

6.1.2 Klónozás ... 98

6.1.3 A *vtg1:* mCherry vonal létrehozása ... 99

6.1.4 Az ösztrogénválasz kialakulásának kezdete ... 99

6.1.5 A vtg1:mCherry zebradánió vonal ösztrogénérzékenysége embriókorban ... 101

6.1.6 A *vtg1:*mCherry zebradánió vonal ösztrogénérzékenysége ivarérett halakban 102

6.1.7 A *vtg1:*mCherry zebradánió vonal vizsgálata különböző ösztrogénhatású anyagokkal 103

6.1.8 A *vtg1:*mCherry zebradánió vonal általános értékelése 105

6.2 A zearalenon hatásának vizsgálata alapján levont következtetések 106

6.2.1 A zearalenonnal végzett halembrió toxicitás teszt értékelése 106

6.2.2 A zeralaneon vitellogenin indukcióra gyakorolt hatásának értékelése 107

6.3 Javaslatok 109

7 Új tudományos eredmények 111

8 Összefoglalás 113

9 Summary 115

10 Irodalomjegyzék 117

11 Mellékletek 143

12 Köszönetnyilvánítás 157

10.14751/SZIE.2014.049

1 Rövidítések jegyzéke

11-KT	11-ketotesztoszteron
17-OH P5	17-α-hidroxil-pregnenolon
3pERE-TATA-Gal4ff	szintetikus ERE elemeket hordozó, ösztrogén hatásra zöld fluoreszcens fehérjét termelő transzgenikus zebradánió vonal
3R stratégia	Az állatkísérletekek kiváltására, a felhasznált állatok számának csökkentésére és az állati szenvedés minimalizálására (Replacement-az állatmodellek helyettesítése, Reducement-a kísérleti állatok számának csökkentése, Refinement-az állati szenvedés minimalizálása) irányuló stratégia
4-BP	4-benzapirén
4-n-NP	4-n-nonilfenol és 1,1,1-Trikloro-2-(2-klorofenil)-2-(4-klorofenil)-etán keveréke
4-t-3	4-t-peniylfenol
4-t-OP	4-t oktilfenol
AhR	aromás szénhidrogén receptorok (Aromatic Hydrocarbon Receptor)
ALL	a vérplazma alkalikus környezetben labilis lipidtartalmának (Alkali Labile Lipid) mérésére szolgáló indirekt módszer
ALP	a vérplazma alkalikus környezetben labilis foszfortartalmának (Alkali Labile Phosphate) mérésére szolgáló indirekt módszer
APE	alkilfenol-polietoxilátok
aPKC	atipikus protein-kináz C
ATR	atrazin
attB	baktérium eredetű, helyspecifikus rekombinációt elősegítő szekvencia, a rekombináz enzim felismerési helye (attachment site)
attL	helyspecifikus rekombinációt elősegítő szekvencia
attP	fág eredetű, helyspecifikus rekombinációt elősegítő szekvencia, a rekombináz enzim felismerési helye (attachment site)
attR	helyspecifikus rekombinációt elősegítő szekvencia
BAC	mesterséges baktérium kromoszóma (Bacterial Arificial Chromosome)
BBP	butil-benzil-ftalát
BCIP	5-bromo-4-kloro-3-indolil foszfát (5-bromo-4-chloro-3-indolil-phosphate)
BF	világos látótérrel (Bright Field) készített fénymikroszkópos felvétel
BP klónozás	fragmentek plazmidba építése az attB és attP szakaszok között történő helyspecifikus rekombinációval
BPA	biszfenol-A

BS	testgörbülés (bent spine)
CA	koncentráció addíció (Concentration Addition) (komplex anyagkeverékek hatásmechanizmusának egyik formája)
ccdB	gén, amelynek terméke a DNS-girázt tönkretéve letalitást okoz
CdCl2	kadmium-klorid
cDNS	az mRNS-ről *in vitro* reverz transzkripcióval létrehozott DNS másolat (cDNS)
cgh	koriogenin H
cyp19a1b-GFP	Agyi aromatáz promótert hordozó, ösztrogén hatásra zöld fluoreszcens fehérjét termelő transzgenikus zebradánió vonal.
cyp19b	aromatáz b
DBP	di-(N-butil)-ftalát-észter
DDT	dikloro-difenil-triklór-etán
DE	dezintegrált embrió (desintegrated embryo)
DE-71	polibrómozott-difenil-éter keverék
DEHP	di-(etil-hexil)-ftalát
DES	dietil-besztrol
DHEA	dehidroepi-androszteron
DHT	dihidro-tesztoszteron
DIG	digoxigenin
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNS	dezoxiribonukleinsav (dezoxyribonucleic acid)
dNTP	dezoxiribonukleotid trifoszfát
dpf	az ikra termékenyítésétől számított napok száma (days post fertilization)
E1	ösztron
E2	17-ß-ösztradiol
E3	ösztriol
EAD	az FDA ösztrogén hatású anyagokra vonatkozó adatbázisa (Estrogenic Activity Database)
EC_{10}	A maximális hatás 10%-ának eléréshez szükséges koncentráció
EC_{50}	Félhatásos koncentráció. Az a koncentráció, ami a maximális hatás felének eléréshez szükséges.
EC_{90}	A maximális hatás 90%-ának eléréshez szükséges koncentráció
EDC	endokrin rendszert megzavaró vegyületek (Endocrine Disrupting Compounds)
EE2	17-α-etinil-ösztradiol
ELISA	enzimhez kötött ellenanyag vizsgálat (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
ELRA	enzimhez kötött receptor vizsgálat (Enzyme Linked Receptor Assay)

EPA	az Amerikai Egyesült Államok Környezetvédelmi Ügynöksége (Environmental Protection Agency)
EPRE	elektrofil válasz elemek gének promóter régiójában
ER	ösztrogén receptor (Estrogen Receptor)
ER-CALUX	*ösztrogénreceptor* közvetített, kémiailag aktivált luciferáz expresszió (Estrogen receptor-mediated, chemical-activated luciferase reporter gene-expression)
ERE	ösztrogén hormonválasz elem (Estrogen Response Element)
ere-zvtg1:gfp	vitellogenin transzgenikus, zöld fluoreszcens fehérjét kifejező zebradánió vonal
EROD	toxirezorufin-O-deetiláz enzimaktivitás mérése halmáj homogenizátum posztmitokondriális frakciójában
FDA	amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hatóság (Food and Drug Administration)
FET teszt	halembrió toxicitás teszt (Fish Embryo Toxicity Test)
FSH	follikulus stimmuláló hormon
GC/MS	gázkromatográfia-tömegspektroszkópia (Gas Chromatography–Mass Spectrometry)
GC-MS/MS	gázkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektroszkópia (*gas chromatography/tandem* mass spectrometry)
GEN	genistein
GFP	zöld fluoreszcens fehérje (Green Fluorescent Protein)
GFR	növekedési faktor receptor (Growth Factor Receptor)
GH	növekedési hormon (Growth Hormone)
GSI	gonadoszomatikus index
has mutáns	aPKC gén mutációt hordozó „heart and soul” mutáns
HEX	hexösztrol
hpf	az ikra megtermékenyítését követő órák száma (hours post fertilization)
HPLC	nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (High Performance Liquid Chromatography)
HPV	nagy mennyiségben előállított (High Production Volume) anyagok, amelyekből a világon éves szinten több, mint 1000 tonnát állítanak elő.
ICM	embriócsomó belső sejtrétege (Inner Cell Mass)
IdMOC	integrált sejttenyészet (Integrated discrete Multiple Organ Culture)
ISO	Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (International Organization for Standardization)
ITR	transzpozonokban előforduló fordított ismétlődések (inverted repeat)
LC-MS/MS	folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektroszkópia (*liquid chromatography/tandem* mass spectrometry)

LD_{10}/LC_{10}	Az egyedek 10%-ának pusztulását okozó koncentráció vagy dózis
LD_{50}/LC_{50}	félhalálos koncentráció vagy dózis, a tesztorganizmusok felének pusztulását okozza
lfabp	zsírsav-kötő fehérje a májban (*liver*-type fatty acid-binding protein)
LH	luteinizáló hormon
LOEC	a hatás kiváltásához szükséges legalacsonyabb vizsgált koncentráció (Lowest Observed Effect Concentration)
LR klónozás	fragmentek plazmidba építése az attL és attR szakaszok között történő helyspecifikus rekombinációval
MCF-7	humán emlőrákból származó sejtvonal
MFA	metil-fluoroacetát
$MgCl_2$	magnézium-klorid
$MgSO_4$	magnézium-szulfát
MIS	17α,20β-dihidroxi-4-pregnen-3-on
MRE	fémekre érzékeny válasz elemek gének promóter régiójában
mRNS	messenger RNS
MS	tömegspektrometria (Mass Spectrometry)
MSZ	Magyar Szabvány
MT	metil-tesztoszteron
MXC	metoxiklor
NBT	nitro-kék tetrazólium-klorid (nitroblue-tetrasolium-chloride)
NOEC	az a legalacsonyabb vizsgált koncentráció, ami a tesztszervezetekben elváltozást még nem okoz (No Observed Effect Concentration)
NP	nonil-fenol
NP	nonil-fenol
OECD	európai Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet (Organisation for Economic Co-operation and Development)
OP	oktil-fenol
P4	progeszteron
P5	pregnenolon
PBB	polibrómozott bifenilek
PBDE	polibrómozott-difenil-éter
PCB	poliklórozott bifenilek
PCR	polimeráz láncreakció
PE	perikardiális vagy szívburok ödéma (pericardial edema)
pEREtata-Luc	ERE elemeket hordozó, ösztrogén hatásra luciferázt termelő transzgenikus zebradánió vonal
PFOS	perfluorooktán-szulfonát

pMVTG1-EGFP	vitellogenin-1 promótert hordozó, májban ösztrogénhatásra zöld fluoreszcens fehérjét (EGFP) kifejező transzgenikus medaka vonal
PPAR	peroxiszóma proliferátor aktivált receptor (P*eroxisome Proliferator-activated Receptor)*
ppb	megadja az adott komponens mennyiségét a rendszer milliárd (10^9) tömeg-, térfogat-, vagy anyagmennyiség-egységében, ugyanazon egységben (parts per billion). A meghatározásnak a ng/g, µg/kg, mg/t, mm^3/m^3 és nmol/mol koncentrációk felenek meg.
ppt	megadja az adott komponens mennyiségét a rendszer billiárd (10^9) tömeg-, térfogat-, vagy anyagmennyiség-egységében, ugyanazon egységben (parts per trillion). A meghatározásnak a pg/g, ng/kg, µg/t, $\mu m^3/cm^3$ és pmol/mol koncentrációk felenek meg.
PR	progeszteron receptor
PRL	prolaktin
qRT-PCR	kvantitatív valós idejű PCR (quantitative real-time PCR)
QSAR	Quantitative structure–activity relationship vizsgálat, mennyiségi összefüggést keres egy vegyi anyag szerkezete és aktivitása között
RARE, RXRE	retinolsav válasz elemek gének promóter régiójában
REACH irányelvek	Az Európai Unió anyagok regisztrációjára, vizsgálatára, engedélyezésére és korlátozására (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) vonatkozó irányelve
RFP	vörös fluoreszcens fehérje (Red Fluorescent Protein)
RGB színskála	vörös zöld és kék színek (Red Green Blue) kombinációin alapuló színskála
RIA	radioaktív jelölés alapú immunanalitikai módszer (Radioimmunoassay)
RNS	ribonukleinsav (ribonucleic acid)
rYES	ösztrogén receptort kifejező, ösztrogén hatás vizsgálatára kifejlesztett élesztőtesztrendszer (Recombinant Yeast Estrogen Screen)
SB	Sleeping Beauty, mesterséges transzpozon
SERM	szelektív ösztrogén receptor modulátor (*Selective Estrogen Receptor Modulator)*
SET puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, 200 mM NaCl és 0.5% SDS
SHBG	szexhormon kötő globulin (Sex Hormone Binding Globulin)
ß-ZEE	ß- zearalanol
T	tesztoszteron
T3	trijódtironin
T4	tiroxin
T47D	humán emlőrákból származó sejtvonal
TB	trenbolon
TBBPA	tetrabromo-biszfenol-A

TLm	A kísérleti szervezetek felének pusztulását okozó hígítás (közepes tűréshatár) szennyvíz vagy környezeti minták esetében
TM	faroktorzulás (tail malformation)
vep	vitellinburok fehérjék (Vitellin Envelope Proteins)
vtg	vitellogenin
vtg1:mCherry	A doktori munka során létrehozott, vitellogenin-1 promótert hordozó, májban ösztrogénhatásra vörös fluoreszcens fehérjét (mCherry) kifejező transzgenikus zebradánió vonal
WISH	*whole mount in situ* hibridizáció
YE	sziködéma (yolk sac edema)
YES	élesztő alapú, ösztrogénhatás vizsgálatára kifejlesztett tesztrendszer (Yeast Estrogen Screen)
ZEA	zearalenon
ZFIN	Zebradánió adatbázis **(**The Zebrafish Model Organism Database)
ZIRC	Nemzetközi Zebradánió Adatbázis (Zebrafish International Resource Center)
zp	zona pellucida fehérjék
zrp	zona radiata fehérje (zona radiata protein)
α-ZEE	α-zearalanol

Megjegyzés: A dolgozatban a zebradánió gének és mRNS nevét és rövidítését dőlt betűvel, a fehérjék nevét és rövidítését normál betűtípussal, nagy kezdőbetűvel jelöltem, a zebradánióra érvényes gén- és fehérjenevezéktannak megfelelően.

2 Bevezetés és célkitűzés

A szervezet egészséges, zavartalan működéséhez elengedhetetlenül szükség van olyan rendszerekre, amelyek az egyes szervek működését hatékonyan összehangolják. A gerincesek szervezetében a szabályozásért két fő szervrendszer, az idegrendszer és a hormonrendszer (endokrin rendszer) felelős. A hormonrendszer régóta áll a kutatók érdeklődésének középpontjában, az orvostudomány, a kémia és a molekuláris biológia eszköztárának bővülésével a 20. század tudományos kutatásai során számos olyan új ismeret született, amelyek mind közelebb vittek e bonyolult rendszer működésének megértéséhez. Ezzel párhuzamosan fény derült arra is, hogy a szervezetben található komplex molekulákon kívül számos, a környezetben jelen lévő anyag is rendelkezik hormonhatással. Ezek az anyagok képesek az endokrin rendszer működését megzavarni, így károsan befolyásolhatják a kulcsfontosságú élettani folyamatokat (pl. egyedfejlődés, növekedés, szaporodás, anyagcsere folyamatok).

A hormonhatású anyagok egy része ösztrogénhatással rendelkezik, azaz a természetes ösztrogének analógjaként működve képes felborítani az ösztrogén által szabályozott mechanizmusokat. Az ösztrogénhatású anyagok csoportjába kémiai szempontból igen sokféle vegyület tartozik. Csupán kémiai szerkezet alapján ezért igen nehéz megállapítani, hogy egy anyag valóban képes-e ösztrogénként működni. Emellett ezek az anyagok a környezetben sohasem önállóan, tiszta oldat formájában vannak jelen, így hatásukat más vegyületek is befolyásolhatják. Egy környezeti minta valós ösztrogenitását csak *in vitro* és *in vivo* ökotoxikológiai tesztrendszerekből álló komplex tesztsorozattal lehet felderíteni.

A közelmúltban számos sejtvonal és élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) alapú tesztrendszer változatot fejlesztettek az ösztrogénhatás kimutatására. Ezek azonban általában csak az anyag ösztrogén receptorhoz kötődését képesek kimutatni, nem szolgáltatnak információt az alternatív útvonalakon keresztül kifejtett hormonhatásról. Emellett nem képesek modellezni a szervezetben zajló komplex élettani folyamatokat, vagy felderíteni a hormonhatásra érzékeny életszakaszokat, ezért sokszor hamis eredményre vezetnek.

Ismert, hogy az élőlényekben bizonyos gének ösztrogénhatásra érzékenyen reagálnak. A géntermékek kimutatása molekuláris biológiai módszerekkel fehérje vagy *mRNS* szinten is lehetséges, viszont általában az állat feláldozásával jár. Az állatvédelmi törvények egyre szigorúbbá válnak, ezért egyre nagyobb az igény az alternatív tesztrendszerek iránt, amelyekkel a kísérletben felhasznált állatok száma és szenvedése a minimálisra csökkenthető vagy az állatmodell más modellrendszerrel helyettesíthető.

Erre adnak lehetőséget a transzgenikus technológiák, amelyek fejlődésével és a fluoreszcens fehérjék felfedezésével megnyílt az út a bioszenzor vonalak létrehozása felé, amelyek segítségével *in vivo* vizsgálható pl. egy ösztrogénérzékeny gén aktiválódása. Adott anyagra érzékeny vonal bármilyen állatmodellből fejleszthető, az emlős szervezetektől az alacsonyabbrendű gerinces modellekig.

A gerincesek közül a halak szerepe a környezeti kockázatbecslésben kiemelkedő. Az emlős modellekkel szemben számos előnyt kínálnak: vízi szerveztek lévén teljes testfelületükön keresztül képesek a szennyezőanyagot felvenni, nagyszámú utódot hoznak létre és egyes fajaik rövid generációs idővel jellemezhetők. Endokrin rendszerük és élettani folyamataik nagymértékű hasonlóságot mutatnak más gerincesekkel, sőt az emlősökkel, így az emberrel is. A halakon végzett ökotoxikológiai vizsgálatoknak emellett gazdasági haszna is van. Az emberi táplálkozásban egyre fontosabb szerepet tölt be a halhús, ezért a halgazdaságok számára egyre fontosabbá válik a nevelt halak egészségi állapota, amelynek előrejelzésében szintén segítséget nyújthatnak a halakon végzett kísérletek. Ráadásul a jelenleg hatályos állatvédelmi rendszabályok szerint lárváik a táplálkozó kor eléréséig nem minősülnek élő állatnak, ezért a rajtuk végzett kísérleteket nem tekintik állatkísérletnek.

Halakban több ösztrogénhatás kimutatására alkalmas gén is ismert. A legjelentősebbek az *ösztrogén receptor*, az *aromatáz-b*, a *koriogenin-H* és a *vitellogenin*. A transzgenikus halmodellek az ösztrogénhatás vizsgálatában kiemelt fontosságúak. A közelmúltban több ösztrogénhatást kimutató bioszenzor vonalat hoztak létre laboratóriumban használt halmodellekből, medakából (*Oryzias latipes*) és zebradánióból (*Danio rerio*). A munka kezdetéig létrehozott vonalak azonban nem bizonyultak megfelelően érzékenynek a környezeti koncentrációk kimutatásához.

A zebradánió legfőbb előnye a bioszenzor vonalak létrehozása szempontjából, hogy az embriók és lárvák teste transzparens, ezért a fluoreszcens riporter jele könnyen tanulmányozhatóvá válik *in vivo*, az állat elpusztítása nélkül. Ez az állatvédelmi szempontok mellett azért is értékes sajátság, mert lehetővé teszi ugyanazon egyed reakciójának tanulmányozását a kezelés különböző időpontjaiban. Egy másik fontos előny, hogy mára a zebradánió teljes genomi szekvenciája ismertté vált megkönnyítve a transzgén konstrukciók tervezését, és a közelmúltban számos technikát dolgoztak ki a faj transzgenezisére.

Az ösztrogénérzékeny gének közül az egyik gyakran használt biomarker gén a *vitellogenin*. Terméke a szik fehérjéinek legfontosabb előanyaga. A gén működésének feltétele az ösztrogén jelenléte, ezért lárvákban és kifejlett hímekben a géntermék minimális mennyiségben van jelen. A vitellogenin a májban termelődik, majd onnan szállítódik a fejlődő oocytákba.

Egy *vitellogenin* promóter által irányított, fluoreszcens fehérjét kifejező biomarker vonal jó kiegészítője lehet az ösztrogénhatás tesztelésére alkalmazott laboratóriumi teszteknek. A vízmintában jelenlévő ösztrogének a *vitellogenin* promóterre hatva indukálhatják a fluoreszcens jel kifejeződését, amely a májban jelenne meg. Amennyiben ez így van, a jelerősség alapján következtetni lehetne a minta ösztrogénhatásának mértékére is. A vonal lehetőséget nyújthat az anyagok különböző fejlődési stádiumokban kifejtett ösztrogénhatásának vizsgálatára, valamint a fellépő fejlődési rendellenességek *in vivo* tanulmányozására is. Kifejlett nőstényeken emellett a toxikus anyagok májkárosító hatása is egyszerűen tanulmányozhatóvá válhat, valamint az ösztrogénhatás mellett az antiösztrogén vagy androgén hatások vizsgálatának is kitűnő eszköze lehet. Doktori munkám elsődleges célja ezért egy vitellogenin transzgenikus zebradánió vonal létrehozása, az ösztrogénérzékenység meghatározása, valamint egy jól alkalmazható vizsgálati

protokoll kidolgozása volt. Amennyiben a vonal megfelelően működik, a későbbiekben a toxikológiai gyakorlatba is bekerülhet. Mint alternatív modell, a későbbiekben alkalmas lehet akár környezeti minták komplex ösztrogénhatásának tesztelésére is.

Az új bioszenzor vonal mellett a zearalenon halak egyedfejlődésére és vitellogenin termelődésre gyakorolt hatását is vizsgáltam, vad típusú zebradánió vonalon. A zearalenon az egyetlen ismert gomba eredetű, ösztrogénhatású toxin, amelyet főként takarmányokban és gabona eredetű élelmiszerekben mutattak ki, de a talajban és a vizekben is megtalálható. Előfordulását és hatásait haszonállatokban vagy *in vitro* tesztrendszerekben széleskörűen tanulmányozták, azonban halakból eddig viszonylag kevés információ áll rendelkezésre. A toxin a természetes populációk mellett veszélyt jelenthet a gazdasági szempontból fontos halfajokra (pl. ponty) is, a víz illetve a zearalenonnal szennyezett gabona eredetű takarmányok révén, ezért a vizsgálatok eredményei a halgazdaságok számára is értékesek lehetnek a jövőben.

10.14751/SZIE.2014.049

3 Irodalmi áttekintés

3.1 Hormonhatású anyagok

A környezetben előforduló többezer természetes vagy mesterséges eredetű vegyület számos különböző hatást gyakorolhat az érintkező élő szervezetekre. A közelmúlt kutatási eredményei rávilágítottak arra, hogy bizonyos, főként lipidoldékony anyagok képesek az endokrin rendszer működését megzavarni, így felboríthatnak olyan kulcsfontosságú élettani folyamatokat, mint az egyedfejlődés, a növekedés, a szaporodás vagy az anyagcsere folyamatok (Kavlock et al., 1996.; Ankley et al, 1997.). Azokat az anyagokat, amelyek a természetes hormonok analógjaiként működve veszélyt jelentenek az élő szervezetek hormonháztartására összefoglaló néven endokrin rendszert megzavaró vegyületeknek (Endocrine Disrupting Compounds – EDC) nevezzük.

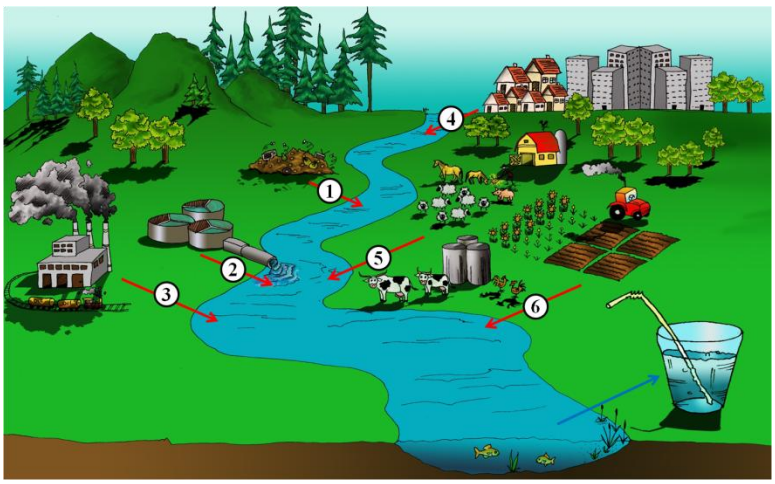
Az Egyesült Államok Környezetvédelmi Ügynökségének (Environmental Protection Agency - EPA) definíciója szerint EDC vegyületeknek nevezzük azokat az exogén anyagokat, amelyek befolyásolják a vérben szállított, homeosztázisért, reprodukcióért és fejlődési folyamatokért felelős természetes hormonok termelését, kibocsátását, transzportját, kötődését, reakcióját vagy kiürülését, így káros hatással vannak az érintkező élőlényekre, azok utódaira vagy alpopulációira (Vos et al., 2000).

Az ipar és a mezőgazdaság fejlődésével egyre többféle hormonháztartást zavaró anyag kerül a környezetbe, amelyek többsége a toxikus koncentráció alatti (szubtoxikus) mennyiségben (ppb, ppt) van jelen. Azonban ez az alacsony koncentráció is elegendő a biológiai hatás kiváltásához, mivel az élőlények általában hosszabb ideig érintkeznek az anyaggal, a vegyületek többsége stabil és némelyik képes a szervezetben felhalmozódni, valamint sokszor más anyagokkal együtt, keverékek formájában idézi elő a hormonhatást (Gagnon et al. 1995; McMaster et al. 1991; Crews et al. 2003).

Az EDC vegyületek a szervezetbe juthatnak szennyezett vízzel, szennyezett levegő belégzésével, táplálékon keresztül, valamint a szennyezett talajjal való érintkezéssel. Az eddig ismert ilyen anyagok főként a reproduktív rendszer (ösztrogének, androgének) és a pajzsmirigy működésére (antitiroid hatások) valamint a cukor- és zsíranyagcserére hatnak (Dudutz et al., 2009).

3.2 Ösztrogénhatású anyagok a vízi környezetben

Az EDC vegyületekkel legnagyobb mértékben szennyezett természetes közeg a víz. Erre utal, hogy az elmúlt években több országban is megfigyelték a természetes halpopulációk ivararányának megváltozását, a tejesek „elnőiesedését” (Jobling et al., 1998). A vegyületek főként antropogén forrásokból (mezőgazdasági és ipari tevékenység, háztartások, kórházak szennyvíz, hulladéklearkók) kerülnek a szennyvízbe vagy a talajvízbe, majd onnan a természetes vizekbe (1. ábra). Az ismert EDC vegyületek többsége ösztrogén hatású.



1. ábra Ösztrogén hatású anyagok útja a természetes vizek és az ivóvíz felé. A vegyületek hulladéklerakókból (1), szennyvíztisztító telepekről (2), ipari tevékenység következtében (3), háztartások és kórházak elfolyó vizéből (4), állattartó telepekről (5) vagy szántóföldekről, gabonatárolókból (6) juthatnak a talajvízbe és a természetes vizekbe.

Sajnos az ösztrogén hatású anyagok egy része az ivóvízben is megtalálható, azokat a mai szennyvíztisztítási eljárások nem képesek teljes mértékben eltávolítani. A természetes valamint a szintetikus szteroid ösztrogének maradványát alacsony ng/l-es koncentrációban, több esetben is kimutatták a szennyvíztisztítókból kilépő vizekben (Baronti et al., 2000, Desbrow et al. 1998). Az elfolyó vizek gyakran 100 ng/l feletti ösztrogénkoncentrációval rendelkeznek, a felszíni vizekben kialakuló koncentráció függ a beömlés helyétől való távolságtól, a víz mikrobiális aktivitásától, valamint különféle fizikokémiai jellemzőktől. Az angliai tisztított szennyvizek ösztogén-aktivitása például főként a magas ösztradiol szintre vezethető vissza (Desbrow et al. 1998). Németországban a forgalomban lévő ásványvizek mintegy 60%-ában mutattak ki kis mennyiségben ösztrogénhez hasonló anyagokat (Wagner és Oehlmann, 2009). Az esetek többségében a környezeti hatásokért elsősorban a szteroid ösztrogének (természetes és mesterséges) felelősek (Desbrow et al., 1998). Az ösztrogének mellett a következő fejezetekben bemutatott ösztrogénhatású anyagokat sok esetben az ösztrogéneknél jóval nagyobb koncentrációban mutatták ki a vízi környezetből. Pontos sorsukról és valós hatásaikról csak keveset tudunk, az azonban egységesen elmondható, hogy a legtöbb potenciális ösztrogén hatást kiváltó anyag hormonhatása három- négy nagyságrenddel kisebb, mint a 17-ß-ösztradiolé (E2) (White et al. 1994).

Ha becsülni akarjuk az ösztrogénhatású anyagok által okozott szennyezés hatását, akkor több tényezőt is figyelembe kell vennünk: az adott anyag ösztrogenitását (erős vagy gyengébb hormonhatással bír), környezeti koncentrációját, a kitettség idejét (mennyi ideig volt jelen a környezetben), felhalmozódási (akkumulációs) potenciálját, más ösztrogén hatású anyagok jelenlétét, az érintkező élőlények korát és fejlődési stádiumát és egyéb környezeti tényezőket (hőmérséklet, sókoncentráció, pH, más szennyezőanyagok jelenléte) (Sheehan et al. 1999). Az érzékenység fajonként és egyedenként is változhat, bizonyos élőlények adott életszakaszban jóval nagyobb érzékenységet mutathatnak egy anyag iránt, mint más fajok egyedei. A kép tehát meglehetősen összetett és a felsorolt tényezők mindegyikéről csupán becslések adhatók. A

környezeti koncentrációról például szinte lehetetlen reális becslést adni, hiszen sokféle vízből, sokféle technikával vett és vizsgált mintákból származnak az irodalomban fellelhető adatok. Jin és munkatársai (2008) vizsgálták a szennyvíz ösztrogén hatású összetevőinek szezonális változását. Eredményeik alapján a téli időszakban a természetes ösztrogének (E1, E2, E3) és a dietil-besztrol (DES) domináltak, míg nyáron ezek mellett a nonilfenol (NP) is nagy mennyiségben jelen volt. A mért koncentrációk az anyagokra külön-külön nézve is elég magasak voltak ahhoz, hogy a vízi élőlények endokrin rendszerét megzavarják.

Az ösztrogén hatás vizsgálatát manapság a legtöbb laboratóriumban egy-egy anyagra vonatkozóan, külön-külön végzik el. Így a kapott eredmények sok esetben nem tükrözik a valóságot, mert nem veszik figyelembe a környezeti mintában jelenlévő többi anyag hatását. A közelmúltban egyre több kutatócsoport kezdte vizsgálni az egyes mintákban együttesen jelenlévő anyagok hatását, mesterségesen létrehozott keverékekben és a vizsgálandó környezeti mintában. A legtöbb esetben 17-ß-ösztradiol (E2), ösztron (E1), nonilfenol (NP) és biszfenol-A (BPA) különböző arányú keverékeit vizsgálták. Néhány mintában az anyagok a hatás kiváltásához szükséges effektív koncentrációnál kisebb mennyiségben voltak jelen. A különböző tesztrendszerek, sejtvonal alapú teszt (E-screen) (Payne et al., 2001), élesztő alapú, ösztrogénhatás vizsgálatára kifejlesztett tesztrendszer (YES) (Silva et al., 2002; Schmitt et al., 2012), tűzcsellén (*Pimelas promelas*) (Brian et al., 2007) és transzgenikus zebradánión (*Danio rerio, Cyp19a1b-GFP*) (Petersen et al., 2013.) végzett vizsgálatok eredményei egybehangzóan arra utalnak, hogy a környezeti ösztrogének additív módon, egymás hatását kiegészítve hatnak (koncentráció addíció révén – CA) és a hatás koncentrációfüggő.

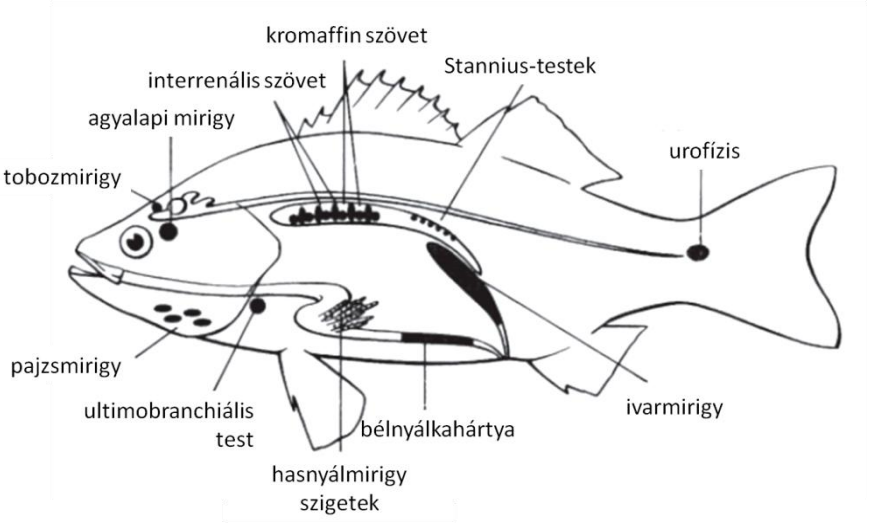
Az ösztrogénhatás a vízi szervezetek esetén többféle formában jelentkezhet, pl. a nemi funkciók zavarához vagy megszűnéséhez (pl. hermafroditizmus, hímeknél vitellogenin termelés), az ivararány eltolódásához vezethet. Teratogén vagy karcinogén hatásúak is lehetnek, károsíthatják az immunrendszert és viselkedészavarokat is okozhatnak (Sumpter, 2005). Halakon laboratóriumi körülmények között csökkent ikratermelést, az ivararány eltolódását, csökkent GSI (gonadoszomatikus index) értéket, a szaporodási viselkedés megváltozását, *ovotestis* megjelenését, csökkent termékenyülést, spermaszám csökkenést, késleltetett ivarérést tapasztaltak (Mills és Chichester, 2005.) Emellett káros hatással vannak az idegrendszerre, a szív- és érrendszerre, felboríthatják a zsíranyagcserét, valamint daganatos elváltozásokat okozhatnak (Kavlock et al., 1996).

3.3 A halak endokrin rendszere

Az élőlények homeosztázisát, viselkedését, szervezetének működését alapvetően két nagy „belső kommunikációs rendszer”, az idegrendszer és az endokrin rendszer szabályozza. Az idegrendszer membránpotenciál változás segítségével közvetít információt, ezért gyorsabb válaszreakciót eredményez, az endokrin rendszer ezzel szemben kémiai jelek (hormonok) útján „kommunikál”. A hormonok a keringésen keresztül a szervezet minden sejtjéhez képesek eljutni, emellett tovább

fennmaradnak a szervezetben, mint az idegrendszer által közvetített elektromos jel, ezért bár az endokrin rendszer válasza lassúbb, hosszabb ideig fennmarad.

Az endokrin rendszer szigorú szabályozás alatt álló hormontermelő mirigyekből álló rendszer, amely a fejlett keringési rendszerrel és idegrendszerrel rendelkező élőlényekre jellemző. A gerincesek és gerinctelenek endokrin rendszere nagymértékben konzervált, így a halak endokrin rendszere nagymértékű hasonlóságot mutat az emlősökével. A fő hormontermelő mirigyek és sejtek az agyalapi mirigy (*hypothalamus*), a tobozmirigy (*glandula pineale*), a pajzsmirigy (*glandula thyroidea*), a hasnyálmirigy (*pancreas*) szigetek, a bélnyálkahártya sejtjei és az ivarmirigyek (*gonádok*). Mivel a halak nem rendelkeznek mellékvesével (*glandula suprarenalis*), az emlősök mellékvese kéreg- és velőállományában zajló hormontermelésért a kromaffin szövet és az interrenális sejtek felelősek, a mellékpajzsmirigyet (*glandula parathyroidea*) pedig a Stannius és az ultimobranchiális testek „helyettesítik". Ezen kívül a halak ún. kaudális neuroszekréciós sejtekkel is (*urofízis*) rendelkeznek, amelyek funkciója jelenleg ismeretlen (Bond et al., 1979; Bone at al., 1995) (2. ábra). A halak hormontermelő mirigyeit, a termelt hormonokat és azok funkcióját az 1. táblázat foglalja össze.



2. ábra A halak endokrin rendszere (Bond, 1979 nyomán)

A mirigyek „kommunikációs láncolatokat", ún. tengelyeket alkotnak, amelyekben az egyes mirigyek meghatározott sorrendben kommunikálnak egymással. A legfontosabb tengelyek a hipotalamusz-pajzsmirigy-ivarmirigyek (hypothalamus – pituitary – gonad, HPG), a hipotalamusz-hipofízis- mellékvese (hypothalamus – pituitary – adrenal, HPA) és a hipotalamusz-hipofízis-pajzsmirigy (hypothalamus – pituitary – thyroid, HPT) tengelyek. A tengelyek hormontermelése és működése feedback mechanizmus (visszacsatolás) révén szabályozott. Az endokrin rendszer hormonjai fontos szerepet töltenek be a homeosztázis (szervezet belső egyensúlyának) fenntartásában és számos létfontosságú folyamat (növekedés, anyagcsere folyamatok, ivarrendszer fejlődése és működése) szabályozásában, így a megfelelő hormonreceptorokon keresztül a szervezet legtöbb sejtjének működésére hatással vannak (Bone et al., 1995).

Mirigy	Hormon	célszerv/sejt	Hatás
Agyalapi mirigy	prolaktin (PRL)	számos sejt/szerv	ozmoreguláció, szaporodás, lipid metabolizmus, anyagcsere szabályozása
	növekedési hormon (GH)	számos sejt/szerv	növekedés serkentése
	pajzsmirigy stimmuláló hormon (TSH)	pajzsmirigy	tiroxintermelés serkentése
	gonadotróp hormon (GnRH)	ivarmirigyek	ivarmirigyek hormontermelésének serkentése
	izotocin, mezotocin	vérerek	kopoltyúerek összehúzódása, szisztemikus vazodilatáció
Pajzsmirigy	tiroxin (T4), trijódtrionin (T3)	számos sejt/szerv	környezeti változásokhoz (hőmérséklet, ozmoreguláció) történő alkalmazkodás
	kalcitonin	kopoltyúk és vese	kalcium homeosztázis szabályozása
Stannius-testek	hipokalcin	koplotyúk	kalcium homeosztázis szabályozása
Hasnyálmirigy	inzulin	minden sejt	glükóz permeabilitás serkentése
	glukagon	minden sejt	glikogén és lipid anyagcsere szabályozása
Kromaffin szövet	adrenalin	keringési rendszer	kopoltyúerek tágulása, szisztemikus vazokonstrikció
	noradrenalin	keringési rendszer	szívműködés és glükózanyagcsere serkentése
Interrenális sejtek	kortikoszteroidok	kopoltyúk és vese	stresszválasz, ozmoreguláció szabályozása
Ivarmirigyek	androgének és ösztrogének	számos sejt/szerv, agy	reproduktív státusz és szaporodási viselkedés szabályozása (feromonok)

1. táblázat A halak endokrin mirigyei és a termelt hormonok hatása (Bone et al., 1995 nyomán)

3.4 Természetes és mesterséges ösztrogénhatású anyagok

Az ösztrogénhatású anyagok, az ún. xenoösztrogének a hormonhatású vegyületek legszélesebb körűen tanulmányozott csoportját alkotják. Egy részük természetes eredetű, többségük azonban szintetikus vegyület.

Kémiai szerkezetüket tekintve rendkívül változatosak. Bizonyos vegyületek egy vagy több, szénatomokból álló gyűrűt tartalmaznak, amelyek különbözőképpen kapcsolódhatnak egymáshoz, mások klórt vagy egyéb oldalláncokat hordoznak, míg néhány vegyület a felsoroltak egyikével sem rendelkezik. Általánosságban elmondható, hogy az ösztrogén hatású vegyületek csoportja kémiai szempontból és molekulaméretet (< 1000 Dalton) tekintve is rendkívül diverz, ezért a kutatók számára továbbra is nagy kihívást jelent annak meghatározása, hogy egy anyag rendelkezik-e hormonhatással (Hester et al., 1999).

3.4.1 Mesterséges ösztrogén hatású vegyületek

A környezetbe kerülő ösztrogénhatású anyagok többsége antropogén forrásokból származik. Ösztrogén hatású anyagot tartalmaz több az iparban és a háztartásokban használt készítmény (például mosóporok, gyártási- és élelmiszeripari adalékok), a különböző gyógyszerek és hormonkészítmények (pl. fogamzásgátló tabletták, nem-szteroid gyulladásgátlók) vagy a növényvédő szerek. Emellett több olyan ipari melléketrmék is ismert (pl. dioxin) amely hormonhatás kiváltására képes. Egy részük direkt ösztrogénhatással rendelkezik, míg másoknak a környezetben keletkező bomlástermékei hormonhatásúak. Sok esetben a vegyületekről csak véletlenül derül ki, hogy ösztrogénaktívak (Soto et al. 1991, Krishnan et al. 1993). További kockázati tényző, hogy bizonyos xenoösztrogének a nagy mennyiségben előállított (High Production Volume – HPV) anyagok közé tartoznak, amelyekből a világon éves szinten több, mint 1000 tonnát állítanak elő. Néhány pedig a környezetben rendkívül stabil és képes a táplálékláncban vagy biológiai mátrixokban (pl. zsírszövetben) felhalmozódni (Kerdivel et al., 2013). Az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hatóság (Food and Drug Administration – FDA) ösztrogén hatású anyagokra vonatkozó adatbázisában (Estrogenic Activity Database – EAD) jelenleg 8212 anyagot tartanak számon, amelyeket többféle tesztrendszerrel vizsgáltak *in vivo* és *in vitro* egyaránt (forrás: internet 1). Valószínű, hogy a most ösztrogénhatásúként nyilvántartott vegyületek száma csak töredéke a lehetségesnek, ez a szám az ismeretek bővülésével bizonyosan tovább nő majd a közeljövőben.

Purdom és munkatársai (1994) szerint a környezetbe kerülő xenoösztrogének legnagyobb részét felületaktív anyagok vagy tisztítószerek alkilfenol-polietoxilátok (APE) közé tartozó hatóanyagai és azok szennyvízkezelés során keletkező bomlástermékei alkotják. Évente megközelítőleg 300000 tonna alkilfenol-polietoxilátot állítanak elő, amelynek körülbelül 60%-a a vízi környezetbe kerül, ahol perzisztens, ösztrogén hatású bomlástermékek keletkeznek (Sumpter és Jobling, 1993) belőle.

A másik, a környezetben is nagy mennyiségben kimutatható, ösztrogén hatású anyag a fogamzásgátló tabletták hatóanyagaként használt szintetikus ösztrogén, az etinilösztradiol (EE2).

Szintén a mesterséges ösztrogének közé tartoznak az antioxidánsként vagy műanyagok, epoxibevonatok gyártásánál használt alkilfenolok és származékaik (biszfenol-A (BPA), p-nonil-fenol (NP), oktil-fenol (OP)) (Sumpter és Jobling, 1993). Az alkilfenolok gyakran az élelmiszerek csomagolásánál használt műanyagokból, dobozokból, ásványvizes palackokból jutnak a környezetbe és az élő szervezetbe. Meglepő, de laboratóriumi eszközök autoklávozása során is kioldódhatnak. A polisztirén eszközökből nonil-fenolt (Soto et al., 1991), a műanyag eszközökből biszfenol-A-t mutattak ki az ösztrogén hatású anyagok kimutatására alkalmas tesztrendszerek fejlesztése során (Krishnan et al., 1993).

A kozmetikai szerek, tisztítószerek gyártásánál használt ftalátok és ftalátészterek szintén ösztrogén hatással bírnak (pl. butil-benzil-ftalát (BBP), di-(N-butil)-ftalát-észter (DBP), di-(etil-hexil)-ftalát (DEHP)), ugyanígy a kozmetikaiparban és a gyógyszeriparban tartósítószerként alkalmazott, alkil-hidroxi-benzoátok közé tartozó parabének vagy a monitorok, képernyők, textilek és műanyaghabok éghetőségét csökkentő polibrómozott bifenilek (PBB). A poliklórozott bifenileket (PCB), másnéven poliklórozott szénhidrogéneket 1930 és 1960 között alkalmazták nagyobb mennyiségben festékek adalékanyagaként, transzformátorok és kondenzátorok hőcserélő folyadékának hatóanyagaként, vagy műanyagokban lágyító anyagként. Bár használatukat 1976-ben betiltották, ma is mintegy 113 féle poliklórozott szénhidrogén mutatható ki környezeti mintákból, valamint az ezekkel készült műszerek egy része napjainkig használatban van (Tanabe, 1988; Geisy et al., 1994; Crisp et al., 1997).

A dioxinok melléktermékként keletkeznek égéskor, növényvédőszerek gyártása során vagy a cellulóz papírgyártás során, fehérítéskor. Nagymértékben toxikusak és ösztrogénhatásúak.

Számos növényvédőszer (peszticid) hatóanyaga (atrazin, metoxiklór, klórpirifosz, toxafen, dieldrin, vinkozolin) szintén képes ösztrogénhatás kiváltására. A peszticidek közül a leghírhedtebb a DDT (dikloro-difenil-triklór-etán). Rovarirtó hatásának felismerését 1948-ban Nobel-díjjal jutalmazták. Hatékonyan használták malária és tífusz ellen is a II. világháború idején. Toxikus hatásai miatt használatát 1971-ben betiltották, azonban nagyfokú stabilitása miatt a DDT és bomlástermékei máig jelen vannak a környezetben. Mindezek ellenére Afrikában és Dél-Amerikában jelenleg is használatban van (Darvas, 1999; van den Berg, 2009).

A dietil-besztrolt (DES) állati takarmányokban valamint gyógyszerhatóanyagként (prosztatarák és mellrák kezelésére, valamint vetélés ellen) használták, majd a fejlődő magzatokban kialakuló rákos elváltozások miatt humán orvosi célú felhasználását 1971-ben betiltották (Veurink et al., 2005).

3.4.2 Nehézfémek

Az iparban és mezőgazdaságban használt vegyi anyagok mellett több fém (főként nehézfémek pl. arzén (Kaltreider et al. 2001), kadmium (Henson and Chedrese 2004), antimon, lítium, bárium, szelén, króm, higany (Choe et al.; 2003, Martin et al, 2003) és fémtartalmú vegyület is rendelkezik ösztrogén vagy antiösztrogén hatással. Közülük a kadmiumot tanulmányozták leginkább, azonban a különböző *in vivo* és *in vitro* tesztrendszerekben (emlős sejtvonalak, rekombináns élesztő teszt, hal májsejt vonal, patkány) végzett vizsgálatok ösztrogén és antiösztrogén hatást is kimutattak. A

hatások hátterében álló mechanizmusok még ismeretlenek (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). A nehézfémek a természetes és mesterséges ösztrogének „közös halmazába” tartoznak, mivel a környezetben természetes módon is jelen vannak, azonban az emberi tevékenység során kibocsátott mennyiségek miatt válnak ökotoxikológiai szempontból fontossá.

3.4.3 Természetes ösztrogének

A természetes szteroid ösztrogének csoportját a női nemi hormonok, az ösztron (E1), az ösztradiol (E2) és az ösztriol (E3) alkotják. Minden gerincesben és néhány rovarfajban termelődnek, széleskörű jelenlétük az ösztrogének közös ősi evolúciós eredetét sugallja (Ryan, 1982, Callard et al., 2011). A környezetbe kerülő szteroid ösztrogének egyik fő forrása az emberi szervezet, hiszen egy nő napi ösztrogén kibocsátása néhány tíz mikrogrammos nagyságrendtől várandós nő esetében akár 30 milligrammig is terjedhet (Aldercruetz et al., 1994). További forrás lehet bizonyos ráktípusok, az oszteoporózis, a változó kori panaszok és a hipogonadizmus kezelésére használt konjugált ösztrogének természetbe kerülése. Ezen szerekből megközelítőleg 1700 kg kerül felhasználásra évente csak az Egyesült Államok területén (Arcand-Hoy et al., 1998). A szteroid ösztrogéneket állattartó telepek hulladékaiban és elfolyó vizében, felszíni vizekben és szennyvizekben is kimutatták (Desbrow et al., 1998; Kuch és Ballschmiter, 2001; Ternes et al., 1999).

A természetes, nem szteroid típusú ösztrogének közé a növények által termelt fitoösztrogének és a gomba eredetű mikoösztrogének tartoznak.

Fitoösztrogéneknek a növényekben termelődő nem szteroid típusú ösztrogéneket nevezzük. Több, mint 300 növényfaj termel fitoösztrogéneket, pl. zöldség- és diófélék, a cékla (*Beta vulgaris*), a szójabab (*Glycine soya*), a rozs (*Secale cereale*), a búza (*Triticum sp.*), a lucerna (*Medicago sp.*), a lóhere (*Trifolium sp.*), az alma (*Malus domestica*) és a cseresznye (*Cerasus avium*). A legtöbb fitoösztrogén (izoflavonok, kumesztrol, formononetin, daidzein, biokain A, genistein, stb.) ösztrogén hatású, azonban ismert néhány ösztrogén és antiösztrogén hatással egyszerre rendelkező fitoösztrogén is (pl. naringenin) (Hughes, 1988; Ruh et al., 1995; Crisp et al., 1997)). A fitoösztrogének affinitása az ösztrogén receptorhoz meglehetősen alacsony, viszont főként a szójatartalmú táplálékokkal nagyobb mennyiségen a szervezetbe jutva képesek hormonhatás kiváltására (Kuiper et al, 1998; Dickerson és Gore, 2007; Cao et al., 2009). A legnagyobb mennyiségben az izoflavonok, a genistein és a daidzein kerülnek a táplálékláncba. Újabb tudományos eredmények alapján javasolják a fitoösztrogének bevonását a humán terápiába, rák, szívbetegségek, csontritkulás megelőzésére és menopauza tüneteinek csökkentésére (Osoki és Kennelly, 2003; Kerdivel et al., 2013).

A növények mellett bizonyos gombafajok is képesek ösztrogén hatású anyag termelésére. Az egyetlen ismert ösztrogén hatású gombatoxin (mikoösztrogén) a zearalenon (Kerdivel et al., 2013).

3.4.3.1 A zearalenon

A zearalenon (ZEA, F2) egy nem szteroid típusú, ösztrogén hatású mikotoxin, amelyet gabonaféléken élősködő *Fusarium* gombafajok termelnek (Williams et al.,1989; Bennett és Klich, 2003; Bucheli et al., 2008). Mint a legjelentősebbb gombatoxinok egyikét, előfordulását széles körűen tanulmányozták takarmányokban, élelmiszerekben és környezeti mintákban. Takarmányokban átlagosan 5-50 mg/kg koncentrációban mutatták ki, de a szennyezettség bizonyos esetekben a 600 mg/kg-ot is elérte (Kuiper-Goodman et al. 1987; Zinedine et al., 2007) Élelmiszerekben ennél jóval alacsonyabb 3-180 μg/kg mennyiségben mutatták ki (Müller et al., 1997a, b). Több tanulmány is beszámol a zearalenon előfordulásáról (0-220 ng/l) talajban, elfolyó vizekben és természetes vizekben (Lagana et al., 2001, 2004; Hartmann et al. 2007; Lundgren és Novak, 2009; Gromadzka et al., 2009; Kolpin et al., 2010; Dudziak, 2011; Maragos, 2012).

A zearalenon ösztrogén hatása felülmúlja más, nem szteroid típusú természetes ösztrogének hatását (Kuiper-Goodman et al., 1987; Bennett és Klich, 2003; Zinedine et al., 2007).

Káros hatásait laboratóriumi modelleken és háziállatokon is mélyrehatóan tanulmányozták. A tapasztalt rendellenességek többsége az ösztrogénhatás következtében alakult ki (ösztrogén érzékeny sejtek, szövetek osztódásának serkentése, elnőiesedés, szaporodási rendellenességek: terméketlenség, csökkent spermaszám, reproduktív ciklus felborulása, stb. (Kuiper-Goodman et al., 1987; Williams et al., 1989; Metzler et al., 2010). Ösztrogénhatása mellett az örökítőanyagra gyakorolt káros hatása (genotoxikus hatás) is jelentős (Eriksen et al., 2000).

A zearalenon biológiai hatásait számos halfajon vizsgálták: atlanti lazac (*Salmo salar*) (Arukwe et al., 1999), szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) (Olsen et al., 2005; Tollefsen et al., 2003; Van den Belt et al., 2003; Wozny et al., 2010), tűzcselle (*Pimephales promelas*) (Johns et al., 2011) és ponty (*Cyprinus carpio*) (Vanyi et al., 1974; Sandor és Vanyi, 1990). A rövid- és hosszútávú tesztek során főként interszex hímek, csökkent spermaszám és motilitás, here degeneráció, csökkent termékenység, immunrendszer és növekedési zavarok, ösztrogénérzékeny gének (*vitellogenin* (*vtg*) és *zona radiata* fehérje (*zrp*) koncentrációfüggő indukciója volt megfigyelhető. Szivárványos pisztráng és humán ösztrogén receptort kifejező élesztőtesztek (rYES) során kapott eredmények alapján a zearalenon affinitása a szivárványos pisztráng receptorhoz 14,8-28,1x erősebb, mint az emberi receptorhoz (Matthews et al., 2000; Le Guevel és Packdel, 2001).

A zearalenon rövid-és hosszútávú hatását zebradánióban Schwartz és munkatársai (2010, 2011), vizsgálták mélyrehatóbban. Rövidtávú kitettség esetén a toxin csökkentette az ívási hajlamot. Hosszútávú, kezelésmentes periódust is magába foglaló életciklus tesztek esetén az ikrások nedves tömege, testhossza és kondíciós faktora (testtömeg x 100 / testhossz^3) nőtt, utódaik nagyobb növekedési eréllyel és jobb szaporodóképességgel rendelkeztek, az ivararány az ikrások irányába tolódott el. A rövid- és hosszútávú vizsgálatok során egyaránt megfigyelték a vitellogeninszint emelkedését, de a kezelés egyik esetben sem befolyásolta a termékenységet, a kelés sikerességét, az embriók életképességét vagy az ivarszervek felépítését és alakulását.

A legtöbb eredmény arra utal, hogy a zearalenon csekély ökotoxikológiai kockázatot hordoz, bár hozzájárul a környezeti mintákban mérhető teljes ösztrogénhatás kialakításához (Schwartz et al.,

2013; Maragos, 2012). Mindemellett azonban a haltakarmányok zearalenon fertőzöttsége magasnak mondható, így potenciális veszélyforrást jelenthet pl. a pontytermelő országok és gazdaságok számára. Szerbiában végzett vizsgálatok szerint a pontytakarmányozáshoz használt kukorica (5,3 mg/kg), búza (2,06 mg/kg) és árpa (2 mg/kg) a mezőgazdasági termékekben mérhető átlagkoncentrációknál 10-1000x több zearalenont tartalmazott (Jakic-Dimic et al., 2005.). Ha a zearalenon képes a halakban felhalmozódni, az élelmezés során emberre is veszélyt jelenthet, a felhalmozódásról azonban eddig nincs adat.

3.5 Az ösztrogénhatású anyagok hatásmechanizmusa

Az ösztrogének kulcsfontosságú szerepet töltenek be az élőlények fejlődésében, növekedésében, a szaporodási folyamatokban és a viselkedésben.

Működésük során a szteroidhormonok hatásmechanizmusát követve elsősorban sejtmagi vagy citoplazmatikus ösztrogén receptorokhoz (ER) kötődnek. A citoplazmában található receptorok emlősökben két izoformával rendelkeznek (α és ß), amelyek közül az α változatot számos *in vitro* tesztben használják (ld. 2.6.2 fejezet). A csontoshalakban (*Teleostei*) az evolúció során lezajlott genomduplikációs események (Taylor et al., 2003) miatt a ß változatnak két formája figyelhető meg zebradánióban (ERß1 és ß2), amelyek szöveti eloszlása eltérő. Az ösztrogénreceptorok zebradánióban már az egyedfejlődés igen korai szakaszában, a megtermékenyítést követő 3. órában (3 hpf – hours post fertilization) kimutathatók. A receptorok egy része (ER ß1) anyai eredetű, az anyától származó *mRNS*-ről íródik át. A receptorok száma a 72. órától drasztikusan emelkedik (Bardet et al., 2002).

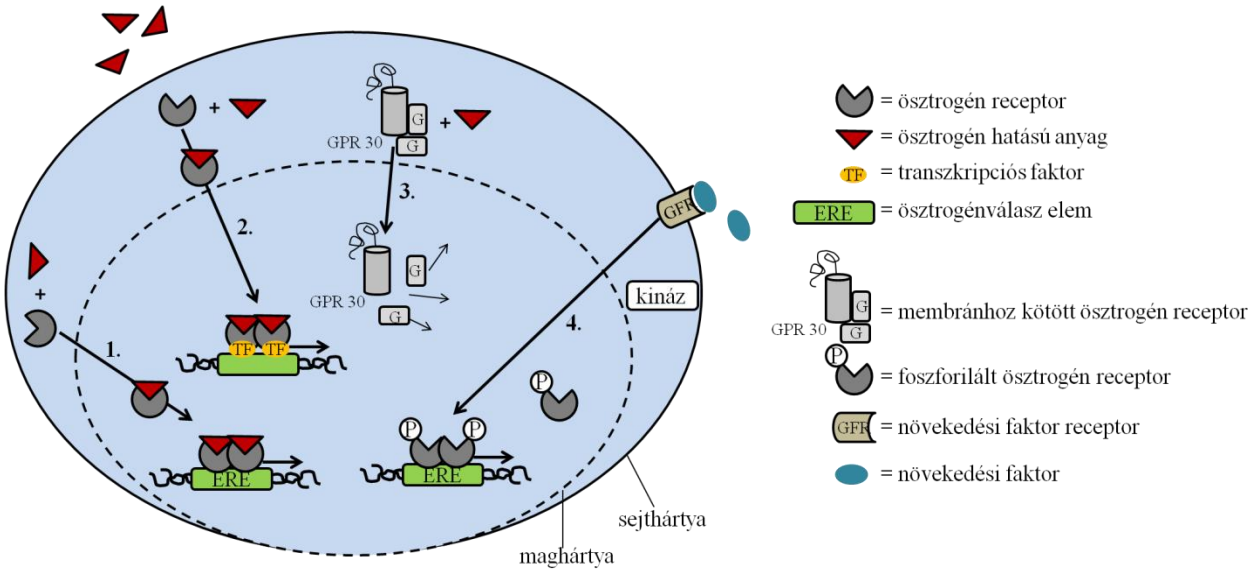
A hormonkötődés következményeként a receptor konformációja megváltozik, ezt követően a receptorok párba állnak (dimerizálódnak) és a sejtmagba jutnak. A sejtmagban koaktivátor fehérjékhez kötődve aktív ösztrogén-receptor komplexekké alakulnak. Specifikus DNS-szakaszokhoz, ún. ösztrogén hormonválasz elemekhez (Estrogen Response Element – ERE) kötődve megváltoztatják a célgének kifejeződését (3. ábra).

A válaszelemek az ösztrogénhatásra érzékeny gének molekuláris kapcsolójában, a promóter régióban találhatóak. A leggyakrabban előforduló konszenzus ERE szekvencia 13 bázist foglal magába: 5'-GGTCAnnnTGACC- 3', de előfordulnak ettől eltérő vagy rövidebb, ún. fél-ERE szekvenciák is (Driscoll et al, 1998). A legismertebb ösztrogénhatásra érzékeny géneket biomarker génként használják az ösztrogénhatású anyagok vizsgálata során (ld. 2.6.5 fejezet).

Az ösztrogén-receptor komplex a célgének mellett transzkripciós faktorokhoz is kötődhet, így olyan gének átíródását is szabályozhatja, amelyek promóter régiójában nincsenek ösztrogénválasz elemek (pl. kolleganáz, ciklinek, LDL receptor, stb.) (Liu et al., 2002, Brüning et al, 2003) (3. ábra).

A közelmúlt kutatási eredményei szerint a szteroid hormonok sejtfelszíni receptorokkal (pl. főként növekedési faktor receptorok: GFR, szerotonin, dopamin, norepinefrin receptorok) vagy más magreceptorokkal (pl. aromás szénhidrogén receptorok – AhR, peroxiszóma proliferátor aktivált receptor – 3AR) is kapcsolódhatnak (Kuiper et al. 1998, Dickersonés Gore 2007), így nem specifikus, gyors választ képesek kiváltani, jelátviteli kaszkádok beindításán keresztül (Razandi et

al., 2004; Levin, 2008). Az ilyen hatások rendkívül összetettek, számos szervrendszerre kiterjednek, közvetett módon több hormon szintjét és működését befolyásolhatják (Dudutz et al, 2009). Ráadásul megfelelő ligand jelenléte nélkül is beindíthatják az ERE-vel rendelkező gének átíródását, pl. az ösztrogén receptor aktiválódhat bizonyos növekedési faktorok hatására is (Kato et al, 1995, Gehm et al, 2000) (3. ábra).



3. ábra Ösztrogénválasz mechanizmusok. **1.: ligandfüggő ERE közvetített válasz:** klasszikus útvonal, a ligand hatására az α és ß receptorok dimerizálódnak, majd a genomi DNS ösztrogénválasz elemeihez (ERE) kapcsolódva beindítják, vagy fokozzák a gén expresszióját. **2.: ligandfüggő, nem ERE közvetített ösztrogénválasz:** a ligandot kötött receptordimerek (α és ß) transzkripciós faktorokhoz kapcsolódva olyan gének válaszreakciójához vezetnek, amelyek szabályozó régiójában nincs ERE. **3.: ligandfüggő, gyors ösztrogénválasz:** a sejthártyában vagy annak közelében található ösztrogénreceptorok protein kinázokat aktiválva jelátviteli útvonalakat indítanak be. **4.: ligand független ösztrogén receptor aktiváció:** a növekedési faktor receptorok ösztrogénfüggetlen mechanizmus során tirozin-kinázokat aktiválnak, amelyek az ösztrogénreceptort foszforilálják. A receptorok dimereket képeznek, majd az ERE-ken keresztül génexpressziót indítanak be. (van Lipzig, 2011 alapján)

Az ösztrogén és antiösztrogén hatású anyagok egyaránt képesek nagy affinitással az ösztrogén receptorokhoz kötődni. Az antagonisták hatására az ösztrogén receptor konformációja úgy változik meg, hogy a koaktivátor fehérjék nem tudnak a komplexhez kötődni. Bizonyos anyagok más-más szöveti környezetben képesek agonistaként vagy antagonistaként is viselkedni. Ezeket az anyagokat összefoglaló néven szelektív ösztrogén receptor modulátorokként (SERM) tárgyalja a szakirodalom. A parciális ösztrogén agonisták bár képesek nagy affinitással a receptorokhoz kötődni, mégis kismértékű hormonhatást idéznek elő. Érdekes csoport a szelektív ösztrogén receptor gátlók csoportja, amelyek igen nagy jelentőségűek lehetnek bizonyos ösztrogénekhez köthető betegségek gyógyításában. Az ilyen anyagok úgy változtatják meg az ösztrogén receptor szerkezetét, hogy azok nem tudnak dimerizálódni, így függetlenül a szövet típusától és a jelenlevő kofaktoroktól, nem tudnak hormonválaszt kiváltani (Kerdivel et al., 2013).

Az ER-hoz kötött útvonalak mellett az ösztrogének képesek megváltoztani a szteroidhormonok szintézisében résztvevő enzimek aktivitását (pl. aromatáz) ezáltal felboríthatják a szervezet ösztrogén/androgén egyensúlyát. Továbbá a hormonok transzportjában fontos fehérjék (pl. szexhormon kötő globulin SHBG – Sex Hormone Binding Globulin) megkötésével befolyásolhatják a hormonok szállítódását (Kerdivel et al, 2013).

3.6 Ösztrogénhatású anyagok kimutatása

A környezeti minták vizsgálata során két fő szempontot kell figyelembe venni: milyen koncentráció tartományban találhatóak meg a szennyezőanyagok a mintában és azok milyen biológiai hatással bírnak az emberre vagy a természetes populációkra nézve. Ahhoz, hogy a mintáról megközelítőleg reális képet kapjunk, vizsgálatok egész sorát kell elvégezni. Az analitikai vizsgálatokon túl, amelyek az anyagok fizikokémiai sajátságain alapulnak molekuláris, sejt, szövet és szervezet szintű biológiai hatásvizsgálatokat is kell végezni. A módszerek egy része direkt vizsgálati módszer (analitikai, sejtmentes rendszerekben végzett vizsgálatok), ezek azonban csak az anyag jelenlétéről adnak információt, a bomlástermékeket vagy az anyag(ok) szervezetre kifejtett hatásait nem vizsgálják. Ehhez bonyolultabb, ún. indirekt vizsgálati rendszerek szükségesek.

Az Egyesült Államok Környezetvédelmi Ügynökségének (EPA) és az európai Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet (OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development) ajánlása szerint (OECD, 2010; EDTA Conceptual Framework, 2012; Gourmelon, 2013) a hormonhatású anyagok vizsgálata során integrált, többlépcsős vizsgálati rendszert kell alkalmazni. A vizsgálat első szintjén azonosítani kell a potenciális hormonhatású anyagot, a második szinten pedig igazolni kell annak biológiai hatását. Mindkét szinten többféle tesztrendszert és vizsgálati módszert kell alkalmazni, majd ezek erdményeit egymással összevetve kell képet alkotni a vizsgált anyagról.

3.6.1 Analitikai módszerek

Az ösztrogénhatású anyagok vizsgálatára használt analitikai módszerek nagy érzékenységű, leggyakrabban tömegspektrometrián, extrakción vagy ezek kombinációján alapuló analitikai módszerek: tömegspektrometria (MS), nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (HPLC), gázkromatográfia-tömegspektroszkópia (GC/MS), gázkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektroszkópia (GC-MS/MS), folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektroszkópia (LC-MS/MS) (Kerdivel et al., 2013). A módszerek hátránya, hogy a nagy érzékenység ellenére sem alkamasak közvetlen vizsgálatra. A mintákat a vizsgálat előtt százszorosára-ezerszeresére kell töményíteni és az ösztrogénhatású anyagot valamilyen fázison meg kell kötni (folyadék-folyadék extrakcióval (LL) vagy szilárd fázisú extrakcióval (SPE, SPME, SBSE).

A klasszikus analitikai módszerek mellett gyakran használnak ellenanyag alapú módszereket is: immunaffinitás kromatográfiát, RIA (Radioimmunoassay) (Linberg et al., 1974), ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) vagy ELRA (Enzyme Linked Receptor Assay) módszereket

(Gascon et al. 1997, Seifert et al. 1999). Ezek az immunanalitikai módszerek azon a jelenségen alapulnak, hogy a szervezetben bármilyen anyag lehet antigén, azaz bármilyen anyag ellen lehetőség van ellenanyagot termeltetni. Az ellenanyagok antigénspecifikusak, így a rájuk épülő immunanalitikai módszerek is, amelyek fő előnye, hogy szinte bármilyen mátrixból (biológiai minta, környezeti minta, stb.) képesek a vizsgálandó anyagot specifikusan, nagy érzékenységgel kimutatni. Hátrányuk, hogy kidolgozásukhoz minden új anyag vizsgálata esetén létre kell hozni a megfelelő ellenanyagot, ami meglehetősen költséges.

3.6.2 *in vitro* tesztrendszerek

Az *in vitro* tesztrendszerek az anyagok biológiai aktivitásán, az ösztrogén hatású anyagok vizsgálata esetén az ösztrogén receptorhoz kötődésen alapuló kvantitatív rendszerek. Az ösztrogén hatású anyagok hatásmechanizmusának első lépése a receptorhoz kötődés, így egy anyag affinitása az ösztrogén receptorhoz jól jellemzi annak ösztrogén potenciálját. A következő lépésben a receptor konformációs változása jelátviteli kaszkádokat indít el, amelyek végül megváltoztatják az ösztrogénhatásra érzékeny gének átíródását. Az *in vitro* tesztrendszerek hátránya, hogy az anyagok szervezeten belüli sorsáról (biotranszformációjáról, farmakokinetikájáról) nem adnak információt. Előnyük az analitikai módszerekkel szemben, hogy tiszta anyagok vizsgálata mellett ismeretlen hatású anyagok és komplex környezeti minták vagy anyagkeverékek teljes ösztrogénhatásának vizsgálatát is lehetővé teszik. Ezért sok esetben a költséges analitikai vizsgálatok előtt a mintákat *in vitro* tesztrendszerekkel „előszűrik” és a hatást kiváltó mintákkal dolgoznak tovább (Falconer et al., 2006).

A kompetitív ösztrogén receptor kötődési tesztekben (Competitive Estrogen Receptor Binding Assay) az ösztrogén agonista vagy antagonista vegyületek kötődését vizsgálják legtöbbször juhok méhéből, szivárványos pisztráng agyból, májból, vagy patkánymájból izolált ösztrogén receptorokhoz (Rider et al., 2009). A vizsgálandó mintából hígítási sort készítenek, majd a sor tagjait ismert mennyiségű ösztrogénreceptort és (radioaktívan) jelölt agonistát tartalmazó oldathoz adják. A nem kötődött agonisták eltávolítása után leolvassák az egyes mintákból származó jelet. Félhatásos koncentrációnak (EC_{50}) azt a koncentrációt vagy környezeti minta esetén térfogatot értik, ami a radioaktívan jelölt agonista 50%-át „leszorítja” a receptorról.

Az ösztrogén receptor aktivációs és sejtosztódási tesztek során már nemcsak az anyag receptor affinitását vizsgálják, hanem azt is, hogy az anyag receptorhoz kötődése beindítja-e az ösztrogénhatásra jellemző sejtszintű válaszreakciót. Előnyük, hogy képesek az ösztrogén és antiösztrogén hatású anyagok elkülönítésére és alacsony koncentrációban jelen lévő anyagok tesztelésére is. A vizsgálatokat sejtvonalakon végzik, amelyeken többféle végpontja is vizsgálható egyidőben. Egy szivárványos pisztráng vagy atlanti lazac májsejteken végzett vizsgálat (fish hepatocyte bioassay) során pl. az akut toxicitás mellett vizsgálhatják az anyag DNS károsító hatását, általános citotoxikus hatását, gátló metabolikus hatását és bizonyos ösztrogénérzékeny célgének (pl. vitellogenin vagy aromatáz) termékének megjelenését is (Maitre et al., 1986; Tollefsen et al, 2006). A humán mellrákból származó sejtvonalon (pl. MCF-7, T47D) végzett tesztek, ún. E-screen

vizsgálatok esetében egy jóval egyszerűbben vizsgálható végpontot, a sejtosztódást vizsgálják. A teszt alapja, hogy az ösztrogénhatású anyagok a nőivarú egyedek szaporítószervekben sejtosztódást idéznek elő, már meglehetősen alacsony (pg/l) koncentrációk esetén is (Soto et al 1995, Isidori et al., 2010). A teszt továbbfejlesztésével humán emlőrák sejtekből (MCF-7, T47D) és humán ösztrogén receptort kifejező sejtek (T47D) ösztrogénhatásra luciferáz enzimet termelő, ER-CALUX (Estrogen receptor-mediated, chemical-activated luciferase reporter gene-expression) riporter sejtvonalakat is létrehoztak (Legler et al, 1999; Balaguer et al., 1999). A sejtvonalaknál egyszerűbben kezelhető, élesztő tesztrendszert is fejlesztettek ösztrogén hatású anyagok kimutatására. Az élesztők eredendően nem hordoznak szteroid hormon receptorokat, azonban rendelkeznek a hormonválasz létrejöttéhez szükséges faktorokkal és útvonalakkal. A humán ösztrogén receptort kifejező transzgenikus élesztőben az ösztrogénhatás könnyen láthatóvá tehető riporter konstrukciók (pl. ösztrogén hormonválasz elem mögé épített ß-galaktozidáz gén) segítségével (Arnold et al, 1996, Routledge és Sumpter 1996, Coldham et al, 1997). Ha a rekombináns, ösztrogénhatást kimutató élesztősejteket (rYES –Recombinant Yeast Estrogen Screen) kezelik, ösztrogénhatásra ß-galaktozidáz enzim termelődik. Az enzim jelenléte egyszerűen kimutatható, például a reakció során színt változtató szubsztrát segítségével (pl. az X-Gal színtelenből kék színűvé válik). A teszt időtartama rövid (5 nap), ami mindössze néhány órára lerövidíthető, ha az élesztő ß-galaktozidáz enzim helyett litikáz enzimet (Schultis és Metzger 2004), biolumineszcenciára (Sanseverino et al, 2005) vagy fluoreszciára képes fehérjét termel (Beck et al., 2005). Így az ösztrogénhatás szubsztrát hozzáadása nélkül, a sejtek széteséséből, biolumineszcencia alapján vagy a fluoreszcens jelből közvetlenül megállapítható. Az élesztő alapú tesztek 2-5-ször érzékenyebbnek bizonyultak a sejtvonalon végzett tesztekhez képest (Coldham et al, 1997).

A mesterséges biológiai szövettervezés vagy az IdMOC (Integrated discrete Multiple Organ Culture) technológia lehetővé teszi egy szövetben jelenlévő sejtek vagy különböző szövetekből származó, a biológiai válaszban kulcsfontosságú szerepet betöltő sejtek mesterséges együtt tenyésztését és a sejtek közötti kommunikáció vizsgálatát (Li et al., 2004), de ez a módszer sem képes a teljes szervezet modellezésére.

A bioszenzorok a sejtmentes, *in vitro* tesztrendszerek érdekes csoportját alkotják. Két alegységből, egy biológiai jelet felismerő elemből és egy jelátalakító egységből, ún. transzduktorból állnak. A felismerő egység képes a vizsgálandó molekulát felismerni és specifikusan megkötni. A bioszenzor szerkezete megváltozik, és a jelátalakító a biológiai felismerési eseményt elektromos jellé alakítja. Az elektromos jel ezt követően mérhető, a jelerősség alapján következtetni lehet az anyag affinitására és koncentrációjára. A bioszenzorokat 1962-ben alkalmazták először vércukorszint mérésére (Clark és Lyons, 1962). Azóta számos különböző bioszenzor alegységet fejlesztettek, amelyek közül leggyakrabban ösztradiol antitesteket, ösztrogén receptor fehérjét (rekombináns, módosított), ösztrogén receptor dimereket, DNS-kötő alegységet használják az ösztrogénhatás kimutatására. A kiértékelés elektromos vagy optikai jel (fluoreszcens anizotrópia, fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET), felületi plazmon rezonancia (SPR), stb.) mérésén alapul. Az alegységek sokfélesége és az eltérő kiértékelési módszerek miatt azonban az egyes mérések

eredményei sokszor nehezen összevethetők, emellett a módszer érzékenysége alulmarad más *in vitro* tesztrendszerekhez képest ezért a mintákat mérés előtt az analitikai módszerekhez hasonlóan töményíteni kell. A felsorolt hátrányok miatt a bioszenzorokat környezeti minták vizsgálata során ritkán használják, de kutatási és orvosi célú felhasználásuk elterjedt (Kerdivel et al., 2013).

3.6.3 *in vivo* tesztrendszerek

Az élő szervezeteken végzett tesztek bár sok esetben hosszabbak és költségesebbek, mint az *in vitro* tesztek, alkalmazásuk mégis nélkülözhetetlen az ösztrogénhatású anyagok vizsgálata során. A toxikológiai tesztek közül csak az *in vivo* tesztrendszerek alkalmasak a teljes szervezetben zajló komplex folyamatok modellezésére, a szervezet egészére kifejtett biológiai hatás kimutatására. Számos állat (ízeltlábúak, kétéltűek, halak, patkány, egér) esetében léteznek kidolgozott, jól működő, az ösztrogénhatás kimutatására alkalmas tesztek. A gerinctelenek közül férgeket (pl.: földigiliszta (*Eisenia fetida/Eisenia andrei,* OECD 207, 1984, OECD 208, 2003), planária fajok *(Dugesia sp.)* (Pagán et al., 2009), planktonikus kisrákokat (*Daphnia magna, Daphnia pulex, Ceriodaphnia dubia* (Adema, 1978; Versteeg et al., 1997), gyümölcslegyeket (*Drosophila melanogaster*, Siddique et al., 2005; Rand, 2010), szúnyogokat (pl. *Chironomus sp.*, OECD 218, 2004, OECD 219, 2004), puhatestűeket (pl.: *Potamopyrgus antipodarum*, Jobling et al., 2004) használnak hormonhatás vizsgálatára. A vizsgálat leggyakoribb végpontjai a termékenyülés sikeressége, az életképes peték száma, a teljes átalakulás időpontja, vedlések száma és sikeressége, ivararány, lárvák túlélési sikeressége, szaporodási viselkedés megváltozása, morfológia, kifejlett egyedek mérete és biomarker géntermékek (pl. vitellogenin) termelése (deFur 2004, Jobling et al, 2004).

Az ösztrogénhatást halakban, kétéltűekben, madarakban és emlősökben is széleskörűen tanulmányozzák. Főként morfológiai elváltozások, szaporodási rendellenességek, utódok száma és fejlődése, vérplazma összetételének változása és génkifejeződés vizsgálatok alapján következtetnek a hormonhatásra. A halakon végzett vizsgálatokat részletesebben a 2.8 fejezet mutatja be.

Az emlős modelleken alkalmazott tesztek közül a legismertebb az uterotrofikus teszt, amely az *in vitro* végzett E-screen tesztekhez hasonlóan az ösztrogén hatású anyagok proliferatív hatásán alapul. Régóta ismert, hogy az emlősökben a normál női ciklus során a méhnyálkahártya (endometrium) sejtjeinek osztódását, a nyálkahártya vastagodását az ösztrogén szabályozza. Az ösztrogént az érésben lévő follikulusok termelik a petefészekben. Ezért a tesztet fiatal (még nem ivarérett) vagy olyan kifejlett nőstényeken végzik, amelyeknek petefészkeit eltávolították. 3 napos kezelést követően az állatok méhének tömegéből következtetnek az anyag ösztrogén hatására. A vizsgálat kiegészíthető az endometrium morfometriai elemzésével, vagy a méh/méhnyak/hüvely szövettani vizsgálatával A tesztet sok esetben hatékonyabbnak tartják az ösztrogénhatásra reagáló gének vizsgálatánál. Előfordulhat, hogy néhány biomarker gén kifejeződése más hatás miatt változik meg, azonban uterotrofikus aktivitással csak az ösztrogénhatású anyagok rendelkeznek (Soto et al, 1995). A vizsgálatot széles körben használják ösztrogénhatás kimutatására (Padilla-Banks et al., 2001,

Kang et al, 2000), valamint az OECD (OECD 440, 2007) és az amerikai Hormonháztartást Megzavaró Anyagok Vizsgálatáért Felelős Tanácsadó Testület (Advisory Group of Endocrine Disruptors Testing and Assessment - EDTA) is validálta.

Az emlős és halmodellekből a közelmúltban számos biomarker transzgenikus vonalat is létrehoztak (2.12 fejezet), amelyekben az állatok fő toxikológiai célszerveiben folyamatosan vagy ösztrogén indukció hatására fluoreszcens fehérje termelődik. A fluoreszcens jel az állat elpusztítása nélkül *in vivo* leolvasható, ami alapján az előbbi esetben az anyag által előidézett morfológiai elváltozásokat, utóbbi esetben pedig az ösztrogénhatás erősségét lehet kimutatni (Kerdivel et al., 2013).

Az OECD 1998-ban kezdeményezte a hormonhatású anyagok vizsgálatához használt tesztrendszerek felülvizsgálatát. Azóta számos új, a javasolt protokollokba beépíthető tesztrendszert dolgoztak ki, és több új irányelv is kidolgozás alatt áll. Bizonyos tesztek azért nem kapnak OECD minősítést, mert vagy nem áll rendelkezésre elegendő információ a megbízhatóságukat illetően (pl. néhány gerinctelenen végzett teszt), vagy nem mutatnak túl a jelenleg is alkalmazott OECD szabványokon (pl. hal májsejteken végzett vitellogenin tesztek).

Az EPA és az OECD egyaránt egy ötlépcsős vizsgálati rendszert ír elő a hormonhatású anyagok kimutatására és tesztelésére. Az újonnan kifejleszett vagy már régóta elterjedt az *in vitro* rendszerek vagy az *in silico* megközelítések csak a tesztelés korai fázisában vagy a mérgezőanyagok hatásának kezdeti vizsgálatainál jöhetnek szóba, kiindulási alapként szolgálhatnak további vizsgálatokhoz. A szervek és sejtek közötti folyamatos, bonyolult kommunikációs rendszereket még a közelmúltban kifejlesztett alternatív tesztrendszerek (pl. sejt ko-kultúrák) sem képesek úgy reprodukálni, mint ahogyan azt az élő szervezetben látnánk. Ezért a harmadik lépcsőtől már mindkét rendszerben csak *in vivo* tesztek szerepelnek.

Az OECD keretirányelvének („OECD Conceptual Framework for the Screening and Testing of Endocrine Disrupting Chemicals”) ösztrogénhatású anyagokra vonatkozó főbb elemeit a 2. táblázat mutatja be. A felsorolt tesztek többsége viszonylag új, ezért az irányelvet „élő dokumentumnak” kell tekinteni, ami a közeljövőben az új kutatási eredményeknek vagy fejlesztéseknek köszönhetően bármikor változhat (OECD, 2010, Gourmelon, 2013).

vizsgálat szintje		**teszt**	**azonosító**	**végpont**	**tesztrendszer**
1. szint	rendelkezésre álló adatok	fizikokémiai sajátságok (pl. molekulatömeg, reakciókészség, stabilitás), ökotoxikológiai vizsgálatok eredményeinek vizsgálata, számítógépes predikciók	-	-	-
2. szint	*in vitro* vizsgálatok (hatásmechanizmus vizsgálata)	ER kötődés vizsgálat (ER binding assay)	-	kötődés az ösztrogén receptorhoz	patkány uterus sejtek
		BG1Luc ER transzaktivációs teszt	OECD-TG 457	ER-hoz kapcsolt riportergén (luciferáz) aktiválása	gerincesekből származó ER-hoz kapcsolt luciferázt kifejező BG1Luc4E2 sejtek

		Humán ER-α transzkripciós aktivációs teszt	OECD-TG 455	ER-hoz kapcsolt riportergén (luciferáz) aktiválása vagy gátlása	luciferázt kifejező hERα-HeLa-9903 sejtvonal
		MCF-7 sejtproliferációs teszt	-	sejtosztódás mértéke	MCF-7 sejtvonal
		Aromatáz teszt	-	aromatáz (CYP19) enzimaktivitás gátlás	H295R sejtvonal
3. szint	*in vivo* vizsgálatok (hatásmechanizmus vizsgálata)	Rövidtávú reprodukciós teszt halakon (Fish Short Term Reproduction Assay - FSTRA)	OECD-TG 229	ösztrogénhatású anyagok (♂VTG ↑), anti-ösztrogénhatású anyagok (♀VTG↓), aromatizálható androgének (♂VTG ↑), aromatáz gátlók (♀VTG↓), szövettani vizsgálatokkal kiegészíthető	tűzcselle (*Pimephales promelas*)
		21 napos halteszt	OECD-TG 230		OECD által javasolt halfajok *
		Rágcsáló uterotrofikus teszt (UT)	OECD-TG 440	ösztrogénhatású anyagok (méh nedves és száraz tömege↑), anti-ösztrogénhatású anyagok (stimmulált méh tömeg↓), szövettani vizsgálatokkal kiegészíthető	patkány (*Rattus rattus*), egér (*Mus musculus*)
4. szint	*in vivo* vizsgálatok (toxikus hatások vizsgálata)	Halak ivarkialakulásának vizsgálata (Fish Sexual Development Test - FSDT)	-	ösztrogénhatású anyagok (♀ és ♂VTG ↑, fenotípusos ivararány ♀↑), anti-ösztrogénhatású anyagok (♀VTG↓, fenotípusos ivararány ♂↑, ivari differenciálódás hiánya ↑), szövettani és genetikai vizsgálatokkal kiegészíthető	OECD által javasolt halfajok *
		Madár reprodukciós teszt	OECD-TG 206	tojásmennyiség, embrió életképesség, kelésképesség, stb.	tőkés réce (*Anas platyrhynchos*),virgíniai fogasfürj (*Colinus virginiatus*), japán fürj (*Coturnix japonica*)
		Más fajokon végzett szaporodási tesztek	-	több végpont	más fajok (kétéltűek, madarak, puhatestűek, stb.)

5. szint	*in vivo* vizsgálatok (toxikus hatások mélyrehatóbb vizsgálata)	Teljes életciklus toxicitás teszt halakon (Fish Lifecycle Toxicity Test - FLCTT)	-	ivarérés időtartama, kifejlettkori ivararány, termékenységvizsgálatok, nincsenek egyértelmű ösztrogénhatást kimutató végpontok	tűzcselle (*Pimephales promelas*), tarka fogasponty (*Cyprinodon variegatus*), zebradánió (*Danio rerio*), medaka (*Oryzias latipes)*
		Teljes életciklus és többgenerációs tesztek	-	ivarérés időtartama, kifejlettkori ivararány, termékenységvizsgálatok, nincsenek egyértelmű ösztrogénhatást kimutató végpontok	más fajok (medaka, ágascsápú rákok, puhatestűek, stb.)

2. táblázat Az OECD keretirányelv („OECD Conceptual Framework for the Screening and Testing of Endocrine Disrupting Chemicals”) ösztrogénhatású anyagokra vonatkozó főbb elemei. (* szivárványos pisztráng: *Oncorhynchus mykiss*, zebradánió: *Danio rerio*, ponty: *Cyprinus carpio*, medaka: *Oryzias latipes*, tűzcselle: *Pimephales promelas*)

3.6.4 Toxikológiai tesztek a jövőben

A hormonhatás vizsgálatára napjainkban használt módszerek jelentős része az életciklus egy részét (lárvakor) vagy a teljes életciklust lefedő, esetleg több generációt is vizsgáló közép- vagy hosszútávú teszt. Ezek egy része nagyszámú kísérleti állat felhasználásával jár. Ahogy az állatvédelmi jogszabályok és a laboratóriumi állatkísérletekkel kapcsolatos előírások egyre szigorúbbá válnak, egyre nő az igény az élő szervezetet helyettesítő, alternatív tesztrendszerek iránt. Az alternatív modellekkel szemben támasztott fő követelmények a megbízhatóság és az érzékenység. Az új módszer legalább annyira érzékeny és megbízható kell, hogy legyen, mint a helyettesíteni kívánt rendszer. A fejlesztés során cél, hogy az új módszer minél több minta egyidejű vizsgára adjon lehetőséget (high throughput) és a vizsgálat minél egyszerűbben és rövidebb idő alatt végrehajtható legyen. Az új teszt csak akkor kerülhet bevezetésre, ha a felsorolt kritériumoknak megfelel, és több laboratóriumban validálták.

Az alternatív módszer tervezés három fő iránya (1) az *in silico* módszerek fejlesztése, azaz számítógépes modellezés és predikciók kidolgozása, (2) hatásmechanizmuson alapuló, nagy áteresztőképességű *in vitro* tesztek fejlesztése és (3) rövidtávú, útvonalspecifikus végpontokat vizsgáló *in vivo* tesztrendszerek létrehozása, valamint alternatív állatmodellek.

Az *in silico* módszerek közül a legismertebbek a QSAR (Quantitative structure–activity relationship) vizsgálat és a read-accross elemzés. A QSAR modellezés regressziós vagy klasszifikációs statisztikai módszereken alapul, mennyiségi összefüggést keres egy vegyi anyag szerkezete és aktivitása között. Elsőként az anyagok fiziko-kémiai tulajdonságai és a biológiai hatás közötti összefüggést tárják fel ismert anyagok meglévő adatai alapján. Ezt követően az új anyag szerkezete alapján megbecsülik az általa kiváltott potenciális biológiai hatást és annak erősségét. A read accross elemzés azon alapul, hogy a hasonló szerkezetű anyagok általában hasonló

hatásmechanizmussal rendelkeznek. Így ha egy anyagcsoport néhány tagjáról ismert azok biológiai hatása, akkor feltételezhető, hogy a csoport többi tagja is hasonló biológiai válasz kiváltására képes. Az *in silico* módszerek alkalmazásával az állatmodellek kiváltása mellett jelentős költségek takaríthatók meg, mert a laboratóriumi tesztek egy részét már nem kell elvégezni (Ankley et al, 2012).

Az alternatív *in vitro* és *in vivo* tesztek fejlesztése során az egyik fő irány a fluoreszcens jelet kifejező transzgenikus sejtvonalak vagy állatmodellek létrehozása. Ha a fluoreszcens fehérjét kódoló génszakaszt ösztrogén hatásra érzékeny DNS-kötő motívum és ösztrogénhatásra indukálható promóter mögé építik, a fluoreszcens jel erősségéből, minden más bonyolult molekuláris vagy analitikai módszer bevonása nélkül egyértelműen következtetni lehet a hormonhatás erősségére. Az alternatív állatmodellekből létrehozott bioszenzor vonalak különösen értékesek lehetnek a toxikológiai vizsgálatok számára. Ilyen modellek lehetnek pl. a halak és a kétéltűek embriói, amelyeket a táplálkozó kor eléréséig nem tekintenek „élő állatnak" a vonatkozó jogszabályok (40/2013. (II. 14.) Kormányrendelet, Animals (Scientific Procedures) Act 1986 of the UK, Directive 86/609/EEC Art. 2b of the European Union).

Az élő állatokon végzett kísérleteket azonban lehetetlen lenne teljes mértékben helyettesíteni, de nem is ez a cél. Az alternatív módszerek abban nyújtanak segítséget, hogy minél kevesebb állatkísérletre és hosszútávú tesztre legyen szükség, amivel jelentősen csökkenthető az egy anyag vizsgálata során felhasznált állatok száma, valamint idő és pénz takarítható meg, nem is beszélve a felhasznált és környezetbe kibocsátott veszélyes anyag mennyiségéről.

3.6.5 Biomarker gének

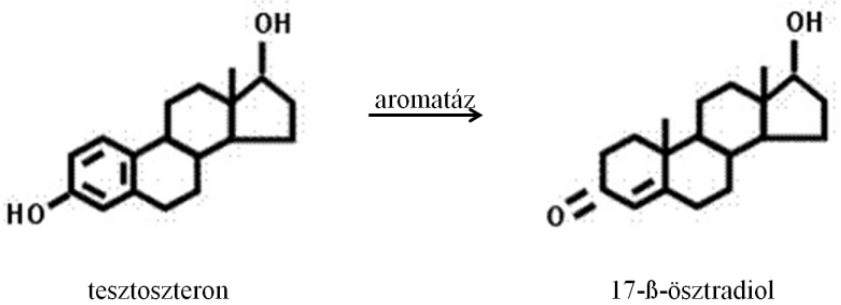
A biomarkerek valamilyen biológiai státuszra, vagy állapotra jellemző, mérhető, vagy számszerűsíthető tulajdonságok. Használatuk széles körben elterjedt normál biológiai folyamatok, patológiás elváltozások, biológiai, toxikológiai válaszreakciók vizsgálatánál (Strimbu és Tavel, 2010). Ideális biomarkernek az a sajátság tekinthető, ami megfelelően érzékenyen reagál a vizsgálandó hatásra és az általa mutatott válaszreakció specifikus és kifejezett. Bármilyen körülmények között, más anyagok jelenlétében, különböző koncentrációkban alkalmazott kezelések esetén, eltérő hőmérsékleteken, eltérő idejű kitettség esetén, különböző analitikai módszerekkel bármelyik laboratóriumban és más fajokban is jól mérhető, egyértelmű, ismételhető eredményt ad (Gunnarsson et al., 2007).

Az elmúlt években számos ösztrogénhatás biomarkert azonosítottak. Az emlősökre jellemző markereket főként patkány méhből vagy humán emlőrák sejtekből írták le: pl. sejtkapcsoló struktúrák génjeit (konnexin 26 és 43), a komplement C3 gént, plazma és sejtfelszíni glikoproteint (klaszterin, mucin-1), a progeszteron receptor: PR, egy sejtplazmában található kalciumkötő fehérjét (kalbindin – CaBp-9k) és az ösztrogén receptort (ER) (Diel et al, 2000, Heikaus et al, 2002, Jung et al, 2012). Madarakban, kétéltűekben vagy halakban az ösztrogénhatást a deformitások, testparaméterek, ivarszervek és testtömeg aránya (gonadoszomatikus index), szaporodási zavarok, utódok fejlődése, ivararány vérplazma összetételének megváltozása (pl. vitellogenin) vagy

génkifejeződés alapján mérik. A biomarker gének (*vitellogenin* (*vtg*), *aromatáz* (*cyp19b*), *vitellinburok fehérjék* (*vep*-ek), *koriogenin H (cgh), zona radiata* és *zona pellucida fehérjék* (*zrp, zp*), *ösztrogén-receptor alfa* (*ER-α*), *albumin, nukleozid difoszfát-kináz* (*nm23*), stb.) közül leggyakrabban a vitellogenint és az aromatázt használják (Lee et al., 2002.) Bár néhány gén érzékenyebbnek bizonyult, ösztrogénspecificitásukat még nem tudták meggyőzően igazolni (Gunnarson et al., 2007). A továbbiakban a halakban vizsgált két fő biomarkert mutatom be részletesebben.

3.6.5.1 Aromatáz (cyp19)

A citokróm P450 aromatázok (P450aro, CYP19) a hormonhatású anyagok potenciális célpontjai. A CYP 19 aromatázok az ösztrogén androgénekből történő bioszintézisének utolsó lépését, a tesztoszteron – ösztrogén átalakulást katalizálják a szervezetben (4. ábra) így számos ösztrogénfüggő folyamatot (szaporodás, ivari differenciáció, gametogenezis) szabályoznak (Simpson et al, 1994., Cheshenko et al., 2007).



4. ábra Az aromatáz a tesztoszteront ösztrogénné alakítja

Míg az emlősökben csak egy, a halakban, így a zebradánióban is két aromatáz gén található, az egyik (cyp19a1 vagy cyp19 a) a petefészekben, a másik az agyban (cyp19a2 vagy cyp19b) fejeződik ki (Tchoudakova és Callard, 1998, Chiang et al., 2001). A cyp19a1 a petefészekfejlődést legkorábban jelző biomarker gén, ami az ösztrogének ivarmeghatározásban betöltött szerepére utal (Vizziano-Cantonnet et al., 2008).

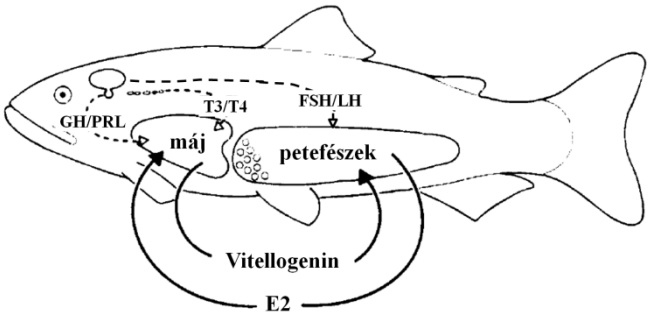
Zebradánióban a két izoforma közül csak a cyp19b promótere tartalmaz teljes ösztrogénválasz elemeket (ERE) (Tong és Chung, 2003; Kazeto et al.,2001), ezért ösztrogénhatású anyagokkal jobban indukálható. Az aril-hidrokarbon receptor közvetítette hormonválasz kimutatására mindkét változat alkalmas. Az aromatáz B indukcióját zebradánió embriókban, lárvákban és felnőtt egyedekben is kimutatták (Kishida és Callard, 2001; Kazeto et al., 2004; Menuet et al., 2005, Kallivretaki, 2006).

Bizonyos xenoösztrogének (pl. metoxiklór vagy atrazin) az ösztrogén recepetoron alapuló *in vitro* tesztrendszerekben nem képesek hatást kiváltani, mert nem kötődnek a receptorhoz. Az ilyen anyagok ösztrogénhatásukat az aromatázok serkentésén keresztül fejtik ki, növelve a szervezet ösztrogénszintjét, ami az ösztrogénválasz fokozásához vezet. Az aromatáz tehát alkalmas a nem ösztrogén receptoron keresztül ható ösztrogénhatású anyagok kimutatására is.

3.6.5.2 Vitellogenin

A halak, kétéltűek és más tojásrakó élőlények embriói az egyedfejlődés kezdeti szakaszában a szikből táplálkoznak. A vitellogenin (Vtg) a szikanyag legfontosabb összetevőjének a vitellin nevű fehérjének prekurzora.

A vitellogenin gén működését sok más génhez hasonlóan több hormon szabályozza. Ezek közül a legerősebb a petefészek sejtjeiben (follikulusok granulosa sejtjeiben) termelődő ösztrogén (17-ß-ösztradiol) hatása (Wallace et al, 1985.). Kétéltűekben kimutatták, hogy a hipofízisben termelődő növekedési hormon és prolaktin, valamint a pajzsmirigy hormonjai (T3 és T4) képesek a szervezet ösztrogénszintjét növelni, így közvetett módon a vitellogenin termelődést serkenteni (5. ábra, Sumpter és Jobling, 1995) Az ösztrogén hatására folyamatosan nő a vérplazma vitellogenin szintje, ami egy kifejlett ikrásban akár a több tíz mg/l-t is elérheti. A vitellogenezis során a vitellogenin receptor mediált endocitózis révén kerül az egyre növekedő petesejtekbe (*oocyták*) (Denslow et al., 1999), így a szikkel telt oocytákat tartalmazó petefészek akár az ikrás testtömegének 25%-át is kiteheti. Az ívási időszakban a plazma vitellogenin koncentrációja lazacfélékben akár milliószorosára is nőhet.



5. ábra A vitellogenin termelődés hormonális szabályozása. A petefészekben termelődő 17-ß-ösztradiol hatására a májban vitellogenin termelődik. Az ösztrogénszintet a halakban a kétéltűekhez hasonlóan az agyalapi mirigy és a pajzsmirigy hormonjai (GH: növekedési hormon, PRL: prolaktin, FSH: follikulus stimmuláló hormon, LH: luteinizáló hormon, T3/T4 trijódtrionon/tiroxin) is befolyásolhatják (Sumpter és Jobling, 1995).

A vitellogenin termelődése ösztrogénfüggő, ezért lárvákban és hímekben normális körülmények között nem vagy csak minimális mennyiségen mutatható ki (Copeland et al. 1986). Külső ösztrogénhatásra azonban a vitellogenin szintézis fokozódik, így a fehérje fiatal egyedekben és hímekben is kimutatható (Lazier és McKay 1993, Tyler et al. 1996, Tyler et al. 1999.), ezért a vitellogenin kiváló biomarker az ösztrogénhatású anyagok kimutatására (Hansen et al., 1998; Tyler et al., 1999). Mind a természetes, mind a szintetikus ösztrogének hatására nagyon kifejezett dózis – válasz görbék figyelhetők meg. Halakban a 17-ß-ösztradiol 0,1 ng/l-es koncentrációban is szignifikánsan növeli a plazma vitellogenin koncentrációját (Purdom et al. 1994). Ez is azt mutatja, hogy a halak rendkívül érzékenyek a vízben jelenlévő ösztrogénekre. Az emelkedett, normálistól eltérő plazma-vitellogenin szint ösztrogén hatású anyag jelenlétére utalhat (Hutchinson és Pickford, 2002).

A vitellogenin gének nagy mértékben konzerváltak, a kódoló régió nagy mértékű hasonlóságot mutat halakban, kétéltűekben és más tojásrakó (*ovipar*) gerincesekben valamint a gerinctelenekben, különösen a puhatestűekben (Blaise et al., 1999). A gének egy multigén családba tartoznak (Nagler et al., 1987). A csendes-óceáni osztrigában (*Crassostrea gigas*) kimutatták, hogy a *vitellogenin mRNS* bázissorrendje, főként az N-terminális régió homológ más puhatestűek, halak, rákok és fonálférgek *mRNS-ével* (Matsumoto et al., 2003).

A közönséges karmosbékából /*Xenopus laevis*/ négy (Wahli et al., 1979), a *Caenorhabditis elegans* fonalféregből hat vitellogenin gént írtak le (Blumenthal et al., 1984). A halak esetében a leírt vitellogenin gének száma fajonként igen változatos, a szivárványos pisztrángban /*Oncorhynchus mykiss*/ több mint húsz vitellogenin gént találtak (Trichet et al., 2000). A zebradánióban a vitellogenineket 7 gén kódolja, két kromoszómán, defeltételezhető, hogy van egy 8. kódoló gén is. A *vtg3* a a 11-es, a másik hat gén pedig a 22-es kromoszómán található, egymás közeli szomszédságában. Ez alapján valószínű, hogy a hat gén génduplikációs események következményeként jött létre (Wang et al., 2005). Ziv és munkatársai 2008-ban végzett összehasonlító proteomikai vizsgálatai alapján a 22-es kromoszómán egy nyolcadik vitellogenin gén jelenléte is feltételezhető. A *vtg* gének elsősorban az ikrások májában fejeződnek ki, de a géntermék 17-ß-ösztradiol hatására tejesekben is megjelenik. A májon kívül zsírszövetekben is kimutatták a *vtg mRNS* jelenlétét, főként a bélben, petefészekben és ösztrogénnel kezelt hímek heréjében (Wang et al. 2005). A legerősebben a *vtg1* gén fejeződik ki, mértéke akár százszor-ezerszer meghaladhatja a többi *vtg* génét. A vitellogenin fehérjék három típusba sorolhatók: a VtgA1 öt gén terméke (*vtg1, 4, 5, 6* és *7*), míg a VtgA2-t a *vtg2*, a VtgC-t pedig a *vtg3* kódolja (Wang et al., 2005).

Halakban a vitellogenin gének kifejeződését az ösztrogének mellett az aril-hidrokarbon receptor (AhR) ligandjai is befolyásolják. Az AhR egy transzkripciós faktor, xenobiotikumok lebontásáért felelős enzimek (pl. CYP450 1) átíródását aktiválja. Az AhR útvonal képes meggátolni az ösztrogén receptorhoz kötött útvonalakat, így gátolja az ösztrogénválasz kialakulását (Bemanian et al, 2004).

A zebradánió ösztrogén érzékenységét több tanulmányban is vizsgálták. Az eredmények és más fajokkal végzett összevetés alapján kitűnő modellállatnak bizonyult az ösztrogénhatás meghatározására vitellogenin indukció alapján (Rose et al., 2002, Örn et al, 2003, Van der Ven et al, 2003., Van den Belt et al., 2003, Lange et al, 2012.).

3.7 Vitellogenin géntermékek kimutatása

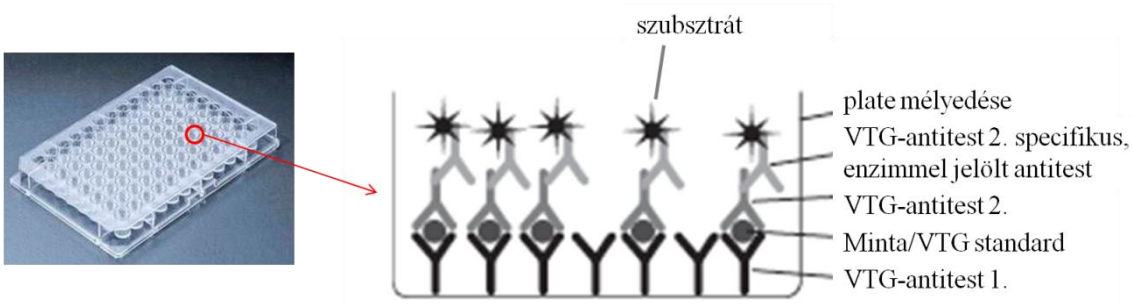
3.7.1 Fehérje szintű módszerek

A vitellogenin indukció mérésekor kezdetben csak a vitellogenin fehérje mennyiségi meghatározására volt lehetőség. A legkorábbi módszerek indirekt mérésen alapultak. A vitellogenin kémiai természetét tekintve a foszfolipoproteinek közé tartozik, nagy lipidtartalmú és erősen foszforilált fehérje. Az indirekt módszerek a vérplazma alkalikus környezetben labilis foszfor és lipidtartalmának mérése (Alkali Labile Lipid (ALL), Alkali Labile Phosphate (ALP) módszer)

alapján következtettek a vitellogenin mennyiségére (Jones et al., 2000, Kramer et al. 1998). Néhány nem specifikus módszer (a fehérje elválasztása gélelektroforézissel molekulasúly alapján vagy kromatográfiás elválasztás HPLC-vel) szintén alkalmas a fehérje kimutatására. A felsorolt módszerek bár költséghatékonyak és viszonylag egyszerűek, nem elég pontosak, mert más fehérjék vagy a vérplazma bizonyos alkotóelemei bizonytalanná tehetik a kimutatást. Ezért specifikus, immunanalitikai módszerek kidolgozására volt szükség. Az immunanalitikai módszerek alapfeltétele a vizsgálandó anyagra specifikus ellenanyag megléte, amit a vitellogenin esetében fajonként vagy közel rokon fajonként kell létrehozni a keresztreaktivitás minimalizálása miatt. Az ellenanyagok azonosítása, termeltetése és tisztítása a módszereket jóval költségesebbé teszi a fent leírt technikáknál, de a megbízhatóság ellensúlyozza a felmerülő költségeket. Több fajra (szivárványos pisztráng, ponty, nyelvhal, tűzcselle, medaka, zebradánió, stb.) is kidolgoztak radioaktív vagy enzim alapú (radioimmunoassay – RIA, enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA) eljárásokat (Sumpter, 1985; Mourot és Le Bail, 1995, Tyler és Sumpter, 1990, Nuňez Rodriguez et al., 1989, Tyler et al ., 2004, Kordes et al 2002, Fenske et al, 2001, Holbech et al, 2001), amelyek egy része kereskedelmi forgalomban kapható.

Az ELISA az egyik legnépszerűbb enzim alapú immunanalitikai módszer (6. ábra). Alapja az antigének és antitestek között kialakuló, specifikus kölcsönhatás. A kötődést antitest vagy antigén specifikus, enzimmel kapcsolt antitest vagy antigén segítségével mutatják ki, innen a módszer elnevezése is.

Többféle típusa ismert. A vitellogenin fehérje kimutatásához az ún. szendvics ELISA módszert használják. A kiindulási minta vérminta (vérplazma) vagy teljes test homogenizátum. A leolvasott eredményt vitellogenin fehérje standard sorhoz viszonyítják.



6. ábra A szendvics-ELISA sematikus ábrája. A szendvics ELISA módszerhez a VTG fehérje specifikus antitestet kötik a plate felszíneihez. Ezt követően hozzáadják a vizsgálandó mintát, majd egy másik, vitellogenin specifikus antitestet, végül egy vitellogenin antitest specifikus, enzimmel jelölt antitestet. Az enzim leggyakrabban tormaperoxidáz vagy alkalikus foszfatáz. A szubsztrát az enzimműködés hatására színes, kemilumineszcens vagy fluoreszcens termékké alakul.

A kis méretű laboratóriumi modellhalaktól viszonylag kis mennyiségű vér (néhány mikroliter) nyerhető, ezért az ELISA tesztek során általában teljes test vagy a test egy részéből (fej, farok, stb.) készített homgenizátumból indulnak ki. Zebradánióban kezdetben ponty vagy koi specifikus antitestekkel próbálták kimutatni a vitellogenint. Azonban az ellenanyagok relatíve kis affinitása miatt ezek nem bizonyultak megfelelően érzékenynek. Két kutatócsoport párhuzamos

fejlesztőmunkája során (Fenske et al, 2001, Holbech et al, 2001) sikerült kifejleszteni zebradánió specifikus antitesteket.

Az ELISA mellett széleskörűen használnak immunhisztokémiai módszereket is vitellogenin kimutatására. Ezek a módszerek jelölt vitellogenin antitest segítségével a fehérje szervezeten/szerven/szöveten belüli elhelyezkedésére (lokalizációjára) adnak választ.

3.7.2 *mRNS* szintű módszerek

A molekuláris biológiai technikák fejlődésével lehetővé vált a géntermékek *mRNS* szintű kimutatása is. Az első ilyen módszerek specifikus RNS próbákat használó, hibridizáció alapú módszerek voltak (Northern blot). Ezek a módszerek viszont az eltérő hibridizációs felületek (membránok) és a módszer kivitelezésekor felmerülő hibalehetőségek miatt nem biztosítottak megfelelő adatokat a mennyiségi kiértékeléshez.

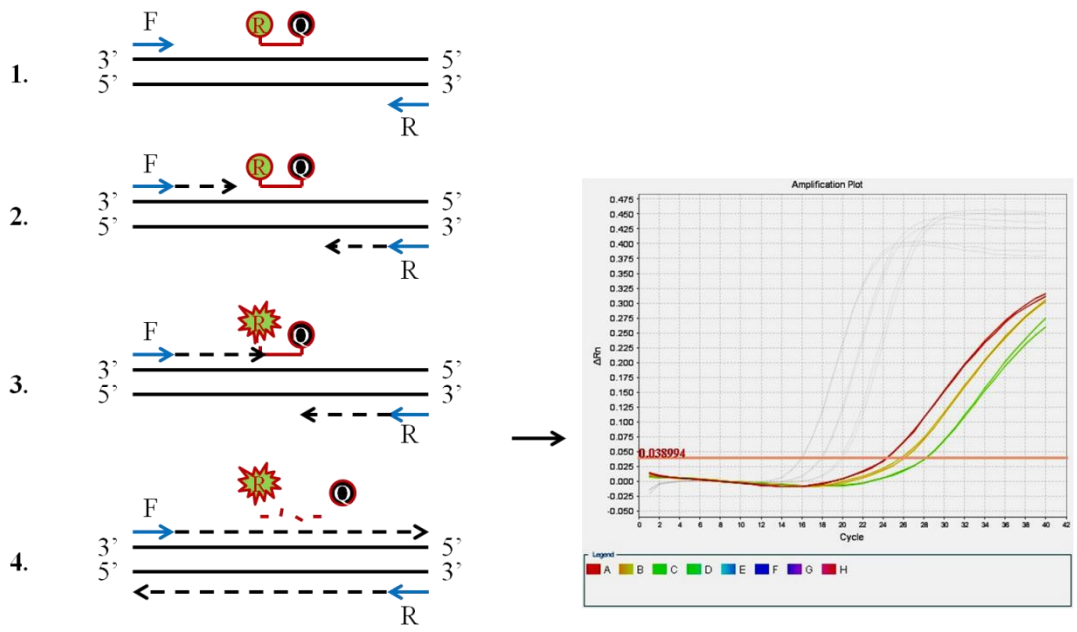
A hibridizációs módszereket (*in situ* hibridizáció) ma leggyakrabban a génkifejeződés helyének meghatározásához használják.

A laboratóriumok többsége ma az mRNS-ről létrehozott, stabilabb cDNS mennyisége alapján vizsgálja a géntermékét, leggyakrabban valós idejű, kvantitatív PCR reakcióval.

A valós idejű kvantitatív PCR (real-time PCR) vizsgálat a hagyományos PCR technikákkal szemben lehetőséget nyújt a PCR termék mennyiségének valós idejű nyomon követésére az egymást követő ciklusokban (Higuchi et al., 1992; Higuchi et al., 1993). A reakció DNS-be interkalálódó festéket (pl. SYBR Green, Eva Green, stb.) vagy jelölt, szekvenciaspecifikus próbát (TaqMan próba, molekuláris beacon, Scorpion, stb.) tartalmaz, amely a reakció során a termékhez kötődve fluoreszcens jelet bocsát ki (Lee et al., 1993; Livak et al., 1995). A fluoreszcens jel növekedése egyenesen arányos a PCR-reakcióban keletkező termék mennyiségével. A PCR reakció exponenciális szakaszában a keletkező termékmennyiség növekedése összefügg a templát kezdeti mennyiségével (7. ábra).

A real-time PCR reakciók kiértékelése során a célgén expresszióját mindig viszonyítani kell vagy egy standard sor értékeihez, vagy egy ún. referencia génhez. A referencia gének, másnéven háztartási gének konstitutív gének, azaz kifejződésük a szervezet minden sejtjében azonos és állandó. A megfelelő háztartási gén kiválasztása azonban nem egyszerű feladat. Fajtól, fejlődési állapottól és szövet- /sejttípustól függően más-más referenciagén mutat a környezettől nem befolyásolt stabil egyenletes expressziót. Emellett azt is figyelembe kell venni, hogy a háztartási gén kifejeződésének szintje abba a tartományba kell, hogy essen, ahol a vizsgálandó gén várhatóan kimutatható.

A leggyakrabban használt háztartási gének (3. táblázat) kifejeződését és stabilitását a zebradánió különböző fejlődési állapotaiban és kezelések hatására McCurley és Callard (2008) tanulmányozták. Ideális, minden kísérleti körülmények között használható háztartási gént nem találtak. Eredményeik alapján hormonhatású anyagok vizsgálatához minden fejlődési állapotban a ß-aktin és az elongációs faktor 1-α a legalkalmasabb.



7. ábra A valós idejű kvantitatív PCR sematikus ábrája, TaqMan próba használata esetén. 1. A primerek és a próba a DNS-szálhoz hibridizálnak, 2. Megindul az átíródás, 3. A Taq polimeráz elhasítja a próbát, a fluoreszcens jel aktívvá válik, 4. Az átírás befejeződik, újabb PCR ciklus kezdődhet. F és R: forvard és reverz primerek, R és Q: a TaqMan próba riporter és a riporter jelét semlegesítő ún. quencher festékei. A jobb oldalon a fluoreszcens jelerőség alapján (függőleges tengely) felvett amplifikációs görbék láthatók a PCR ciklusszámok fügvényében (vízszintes tengely).

gén	rövidítés	funkció
ß-aktin1	*baktin1*	sejtváz alkotó
α-tubulin-1	*tuba I*	sejtváz alkotó
gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz	*gapdh*	glikolízis enzim
glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz	*g6dh*	glikolízis enzim
TATA-box-kötő fehérje	*tbp*	transzkripció
ß-2-mikroglobulin	*b2m*	immunfunkció (MHC)
elongációs faktor 1-α	*e1fa*	transzláció
18S riboszomális RNS	*18S*	riboszóma alegység alkotó

3. táblázat A zebradánióban leggyakrabban használt háztartási gének

3.8 Vitellogenin géntermékek vizsgálata zebradánióban

Zebradánióban a vitellogenin indukciót több különböző anyag hatására, többféle módszerrel vizsgálták (4. táblázat). A VTG fehérje indikrekt kimutatásáról - feltételezhetően a kis testméret és kis vértérfogat miatt - zebradánióban nincs adat. Az első vizsgálatokat ELISA módszerrel végezték (Holbech et al., 2001). Rose és munkatársai (2002) már a vitellogenin indukcióját mérték ösztrogének hatására, ELISA módszerrel teljes test homogenizátumból, kifejlett zebradánión. Később, a valós idejű PCR technikák megjelenése lehetővé tette a vitellogenin géntermék kimutatását mRNS szinten embriókorban is. A vizsgálatok időtartamáról és a kezelés kezdetéről

megoszlanak a vélemények. Rose és munkatársai 2002-ben megállapították, hogy a vitellogenin fehérje a kitettség ötödik napján éri el a maximumát kifejlett zebradánióban, a tesztek időtartama azonban ennél általában hosszabb, leggyakrabban 21 nap. Wang és munkatársai 2011-ben végzett vizsgálatai szerint a vitellogenin csak 7 napos kortól mutatható ki a fejlődő zebradánióban. Más szerzők azonban már 5 napos vagy négy napos korban is ki tudták mutatni a géntermékét (Muncke és Eggen, 2006, Muncke et al, 2007, Chow et al, 2013).

Nem egyszerű eldönteni azt sem, hogy a fehérje- vagy az *mRNS* szintű vizsgálatok a megbízhatóbbak. Az instabil *mRNS*-ek sokkal rövidebb ideig képesek a szervezetben fennmaradni, mint a fehérjék. A Vitellogenin fehérje féléletideje zebradánióban 2,4 nap (Andersen et al, 2003), az mRNS-ről nincs adat. Karmosbékában azt találták, hogy az ösztrogén hatású anyagok képesek a *vtg mRNS*-t stabilizálni, ami halakban is igaz lehet (Brock et al., 1983).

A felnőtt halakon végzett rövid távú vizsgálatokat egyre inkább felváltják a hosszútávú, többgenerácós tesztek és az embriókorban végzett vizsgálatok. A tiszta anyagok vizsgálata mellett a kutatók egyre nagyobb hangsúlyt fektetnek az anyagok keverékekben történő vizsgálatára, a környezeti koncentrációk figyelembevételével. Madueira és munkatársai (2012) megállapították, hogy az ösztrogén hatású anyagok mellett a hormonhatással nem rendelkező anyagok is befolyásolhatják a keverékek hatását.

A vitellogenin mérésére ezidáig két OECD protokollt (OECD-TG 230 és 234) dolgoztak ki, ELISA vizsgálat alapján, kifejlett egyedekben. A vitellogenin mérés menetét ezek mellett egy nemrég megalkotott ISO szabvány (ISO/TS 23893-3:2013) szabályozza. Az embrió és lárvakorban végzett *vtg* vizsgálatokra még nem dolgoztak ki egységes protokollt.

Referencia	**vizsgált anyag**	**kitettség**	**fejlődési stádium/ ivar**	**módszer**
Rose et al, 2002	E2, EE2	8 nap	M	ELISA
Van den Belt et al, 2001	EE2, OP	21 nap	M és F	ELISA
Van den Belt et al, 2002	E2	24 nap	F	ELISA
Andersen et al, 2003	EE2, MT	7 nap	M és F	ELISA
Van der Ven et al, 2003	EE2	10-21 nap	M	hisztokémia, szérum immun-hisztokémia, in situ hibridizáció, ELISA
Van den Belt et al, 2003	OP, EE2, NP, BPA, DBP, E2	21 nap	M	szemikvantitatív ELISA
Van den Belt et al, 2004	E2, E1, EE2, NP	21 nap	F	ELISA
Versonnen et al, 2004	metoxiklor	14 nap	M és F	fehérje elektroforézis, Western blot
Muncke és Eggen, 2006	EE2	5 nap	E	qRT-PCR

Jurcikova et al, 2007	metazaklor	20 dpf-40 dpf	L	ELISA
Muncke et al, 2007	E2, EE2, BPA, NP, atrazin, cyprokonazol	5 nap	E	qRT-PCR
Du et al, 2008	PFOS	14 dpf-54/84 dpf	L	qRT-PCR
Jin et al, 2010	EE2, NP és keverékeik	21 nap	M	qRT-PCR
Schwartz et al, 2010	ZEA	21 nap	M és F	ELISA
Schwartz et al, 2011	ZEA	42 nap	M és F	ELISA
Wang et al, 2011	DES, BPA, TBBPA, DE-71, 4-BP	7 nap	E	qRT-PCR
Keiter et al, 2012	PFOS, BPA és keverékeik	2 generációs teszt, 90 és 180 nap	M, F, E, L	ELISA
Kraugerud et al, 2012	PCB-k, PBDE-k, DDT keverékekben	2 generációs teszt	M és F	immunfestés
Lange et al, 2012	EE2	7 nap	M	qRT-PCR
Madureira et al, 2012	karbamazepin, fenofibrinsav, proplanolol, szulfometoxazol, trimetoprim és keverékeik	?	M és F	immunfestés
Urbatzka et al, 2012	chol, P5, P4, 17–OH P5, MIS, DHEA, A4, T, 11-KT, E1, E2 és keverékeik	21 nap	M és F	qRT-PCR
Baumann et al, 2013	EE2, DHT, TB, prochloraz, 4-tert-pentylphenol	60 nap	E-L	ELISA
Chow et al, 2013	BPA, endoszulfán, heptklor, metoxiklor, TBBPA	4 nap	E	qRT-PCR
Jung et al, 2013	MFA	36 nap	E és M	ELISA és qRT-PCR
Tu et al, 2013	butachlor	84 óra	E	qRT-PCR
Puy-Azurmendi et al, 2014	NP és OP izomerek	1 - 28 dpf	E-L	qRT-PCR

4. táblázat Összefoglaló táblázat az ösztrogénhatású anyagok kifejlett zebradánión végzett vitellogenin indukció alapú vizsgálatairól (E2: 17-ß-ösztradiol, EE2: 17-α-etinil-ösztradiol, E1: ösztron, OP-oktil-fenol, MT: metil-tesztoszteron, NP: nonil-fenol, BPA: biszfenol-A, DBP: dibutil-ftalát, PFOS: perfluorooktán-szulfonát, DES: dietil-besztrol, TBBPA: tetrabromo-biszfenol-A, PBDE: polibrómozott-difenil-éter, DE-71: polibrómozott-difenil-éter keverék, 4-BP: 4-benzapirén, DDT: diklór-difenil-triklóretán, P4: progeszteron, P5: pregnenolon, 17-OH P5: 17-α-hidroxil-pregnenolon, MIS: 17α,20β-dihidroxi-4-pregnen-3-on, DHEA: dehidroepi-androszteron, T: tesztoszteron, 11-KT: 11-ketotesztoszteron, TB: trenbolon, MFA: metil-fluoroacetát).

3.9 Állatmodellek szerepe a toxikológiában

Az Európai Unió tagállamai, valamint más, iparilag fejlett országok egyre nagyobb hangsúlyt fektetnek a már forgalomban lévő vagy új vegyi anyagok kockázatbecslésére. Az anyagok regisztrációja, vizsgálata, engedélyezése és korlátozása az EU által meghatározott REACH irányelvek (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) mentén történik. A szervezetben zajló komplex folyamatok modellezése, a szervezet egészére kifejtett biológiai hatás kimutatása csak az *in vivo* tesztrendszerek segítségével lehetséges, ezért a modellálatok kiemelt fontosságúak a toxikológiai tesztek szempontjából. A vizsgálat céljától függően más-más modellszervezetek használata terjedt el. Az emberre vonatkoztatott, egészségügyi kockázat vizsgálatánál elterjedtebbek az emlős modellek, míg a környezeti kockázatbecslésben inkább kétéltűeket és halmodelleket használnak ösztrogénhatású anyagok vizsgálatára (lásd 2.10. fejezet).

Az OECD 3R (Replacement, Reduction, Refinement) stratégiának megfelelően az állatkísérletekek kiváltására, a felhasznált állatok számának csökkentésére és az állati szenvedés minimalizálását szem előtt tartva dolgozta ki a jelenleg hatályos, 2010-ben módosított vizsgálati rendszert.

Az embrió modellek komplex, multicelluláris rendszerek, melyekben a megfigyelhetők a különböző szervek közötti interakciók, valamint a differenciálódási folyamatok, ezért a hal vagy kétéltű embriókon folytatott vizsgálatok alternatív modellként szolgálhatnak az emlős modellek helyettesítésében (Scholtz et al., 2008). Ennek egyik fő oka, hogy a hal és kétéltű embriókat a táplálkozó kor eléréséig a jelenleg hatályos törvények, ahogy az korábban is említésre került, nem tekintik élő állatnak (ISO (International Organization for Standardization – Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) és MSZ (Magyar Szabvány)).

3.10 Toxikológiai vizsgálatokban használt halfajok

A halak kitűnő modellállatok, nemcsak környezeti kockázatbecslére alkalmasak, de a hormonhatású anyagok vizsgálatára is (Braunbeck et al., 2005). Az eredmények jól extrapolálhatók más állat fajokra, vagy az emberre. A fejlődésbiológiai és élettani folyamatok genetikai háttere a gerincesek és gerinctelenek körében nagymértékben konzervált (Bond, 1979). Így pl. a halak endokrin rendszere, szöveteik és szerveik többsége nagymértékű hasonlóságot mutatnak a legtöbb gerincesével. A halakon végzett ökotoxikológiai vizsgálatoknak emellett gazdasági haszna is van. Az emberi táplálkozásban egyre fontosabb szerepet tölt be a halhús, ezért a halgazdaságok számára egyre fontosabbá válik a nevelt halak egészségi állapota, amelynek előrejelzésében szintén segítséget nyújthatnak a halakon végzett kísérletek. Számos, különböző életszakaszban végzett, többféle végpontú toxikológiai tesztet dolgoztak ki halakra, amelyek egy része szabványokban rögzített (5. táblázat). Időtartamuk változó, a 48 órás tesztektől a teljes életszakaszon vagy akár több generáción átívelő vizsgálatokig.

Vizsgálat neve	szabvány száma	vizsgálat időtartama	vizsgálat kimenete	javasolt halfajok
Halembrió toxicitás vizsgálat (FET)	OECD-TG 236	96 óra	24 óránként pusztulási mutatók (koaguláció, szívverés, szomiták kialakulásának és farokkezdemény leválásának hiánya) leolvasása és LC_{50} meghatározása.	Zd
Korai életszakaszban végzett toxicitás vizsgálat halakon	OECD-TG 210	táplálkozó kor eléréséig	letális és szubletális végpontok leolvasása	Zd, Ol, Pp, Omy, Cv, M sp.
Rövidtávú reprodukciós vizsgálat halakon (FSTRA)	OECD-TG 229	21 nap	ikratermelés, endokrin hatások: vitellogenin és másodlagos nemi jellegek vizsgálata	Pp
Hal ivarkialakulási vizsgálat	OECD-TG 234	ikrától ivarérettségig	vitellogenin mérése, hímek, nőstények, interszex és differenciálatlan egyedek arányának meghatározása szövettani vizsgálatok (és genetikai markerek) alapján	Zd, Ol, Ga
21 napos halteszt	OECD-TG 230	21 nap	vitellogenin és aromatáz mérése, másodlagos nemi jellegek vizsgálata	Zd, Ol, Pp
Lárvanövekedési vizsgálat halakon	OECD-TG 215	28 nap	külső rendellenességek, rendellenes viselkedés, növekedési ráta vizsgálata (testtömeg alapján)	Zd, Ol, Omy
Embrió és nem táplálkozó lárva korban végzett toxicitásvizsgálat halakon	OECD-TG 212	a szik felszívódásáig	letális és szubletális végpontok leolvasása	Zd, Ol, Pp, Omy, Cc
Akut toxicitásteszt halakon	OECD-TG 203, MSZ EN ISO 7346-1:2000	96 óra	pusztulás vizsgálata 24 óránként, LC_{50} meghatározása	Zd, Ol, Pp, Omy, Cc, Pr, Lm
14 napos, meghosszabbított toxicitás vizsgálat halakon	OECD-TG 204	14 nap (+7-14 nap)	pusztulás vizsgálata 24 óránként, LC_{50} meghatározása	Zd, Ol, Pp, Omy, Cc, Pr, Lm
Statikus halteszt	MSZ 22902-3:1990	96 óra	kifejlett egyedek pusztulás vizsgálata 24 óránként, LC_{50} vagy közepes tűréshatár (TLm) meghatározása	Zd
Halteszt	MSZ 21978-3: 1986	48 óra	kifejlett egyedek pusztulásvizsgálata, LC_{50} vagy közepes tűréshatár (TLm) meghatározása	Pr
Szennyvizek akut toxicitásának vizsgálata zebradánió embriókon	ISO 15088:2007	48 óra	embriók pusztulás vizsgálata szennyvízminták hatására, közepes tűréshatár (TLm) meghatározása	Zd
Akut toxicitás vizsgálat édesvízi halfajon	ISO 7346-3:1996	96 óra	kifejlett egyedek pusztulás vizsgálata, viselkedésvizsgálat, LC_{50} vagy közepes tűréshatár (TLm) meghatározása	Zd
Meghosszabbított toxicitás vizsgálat édesvízi halfajon	ISO 10229:1994	7-120 nap	pusztulás vizsgálatok, növekedési ráta vizsgálata	Omy

Biokémiai és élettani vizsgálatok halakon - mintaelőkészítés és tárolás	ISO/TS 23893-1:2007	változó	halakból származó minták előkészítési szabályzata biokémiai és élettani vizsgálatokhoz	nincs
Biokémiai és élettani vizsgálatok halakon - etoxirezofurin-O-deetiláz (EROD) enzimaktivitás mérése	ISO/TS 23893-2:2007	változó	toxirezorufin-O-deetiláz (EROD) enzimaktivitás mérése halmáj homogenizátum posztmitokondriális frakciójában	nincs
Biokémiai és élettani vizsgálatok halakon - vitellogenin szint mérése	ISO/TS 23893-3:2013	változó	vitellogenin (Vtg) koncentráció mérése ELISA módszerrel halak vérplazmájában	nincs
Szemi-sztatikus toxicitásvizsgálat édesvízi halembriókon és lárvákon	ISO 12890:1999	7-120 nap	pusztulás vizsgálatok, növekedési ráta vizsgálata, LC_{50} vagy közepes tűréshatár (TLm) meghatározása	Zd

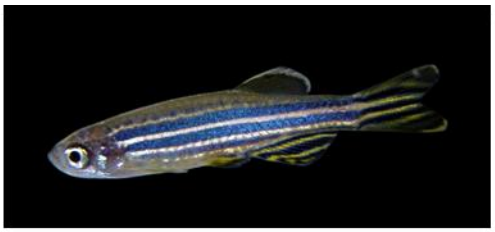
5. táblázat Halakra alapozott toxikológiai vizsgálatok OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development - Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet), ISO (International Organization for Standardization – Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) és MSZ (Magyar Szabvány) szabványok ajánlása alapján. Dr-zebradánió (*Danio rerio*), Ol-medaka (*Orizias latipes*), Pp-tűzcselle (*Pimephales promelas*), Omy-szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*), Cc-ponty (*Cyprinus carpio*), Pr-szivárványos guppi (*Poecilia reticulata*), Lm-kék naphal (*Leopomis macrochirus*), Ga-háromtüskés pikó (*Gasterosteus acuelatus*), Cv-tarka fogasponty (*Cyprinodon variegatus*), M sp.-atlanti ezüstösoldalú halak csoportja (*Menidia sp.*).

A halakon végzett toxikológiai tesztelés számos előnyt kínál az emlős modellekhez képest. A tesztek rövidebb idő alatt és olcsóbban kivitelezhetőek. A halak vízi szervezetek révén teljes testfelületükkel érintkeznek a vízben található szennyezőanyagokkal, ahonnan képesek azt felvenni. Ezért az anyagok szervezetbe juttatásának leggyakoribb módja, hogy a tesztalanyokat egyszerűen csak „ússztatják” a kívánt oldatban. Az emlősökhöz hasonlóan továbbá lehetőség van az anyagok táplálékkal vagy intraperitonealis (hashártya alá) bejuttatására is. A toxikológiai vizsgálatok során használt fajok köre rendkívül széles. Az extrémen rövid életciklusú *Fundulus heteroclitus*-tól kezdve az akváriumi díszhalakon (szivárványos guppi - *Poecilia reticulata*) át a gazdaságilag fontos halfajokig (harcsa – *Silurus glanis*, süllő –*Sander lucioperca*, ponty- *Cyprinus carpio*, pisztrángfélék -*Salmonidae*) bármilyen fajra nézve vizsgálható a szennyezőanyagok hatása. A kisméretű laboratóriumi halak közül az Egyesült Államokban a leggyakrabban a tűzcsellét (fathead minnow, *Pimephales promelas*), Japánban a medakát (*Orizias latipes*), Európában a zebradániót (*Danio rerio*) használják (Ankley és Johnson, 2004).

A hormonhatású anyagokról, hatásmechanizmusuk miatt a hosszútávú tesztek szolgálnak a legtöbb információval (Ankley et al., 2004). Ezek azonban magas költségvonzatuk miatt nem alkalmasak nagy teljesítőképességű vizsgálatokra. Ezért ún. részleges életszakasz teszteket dolgoztak ki, amelyek vagy embrió/lárvakortól kezdődve vizsgálják az ivarszervek és nemi jellegek kialakulását vagy a szaporodóképességet veszik górcső alá, kifejlett egyedek kezelését követően.

3.11 A zebradánió, mint toxikológiai modellállat

A zebradánió (*Danio rerio*) (8. ábra) a pontyfélek családjába (*Cyprinidae*) tartozik, Indiában és Pakisztánban őshonos. Genetikai és fejlődésbiológiai szempontból az egyik legjobban ismert halfaj. Kezdetben főként fejlődésbiológiai modellként tartották számon, mára azonban kiváló betegségmodellé és toxikológiai valamint gyógyszerkísérleti "tesztalannyá" lépett elő (Müller, 2005; Strähle et al., 2012). A közelmúltban egyre több laboratóriumban és kutatóműhelyben előtérbe került Magyarországon is (Csenki et al, 2010; Varga et al., 2011; Rohner et al., 2009).



8. ábra A zebradánió

A zebradánió számos előnyös tulajdonsággal jellemezhető, amelyek miatt méltán vált népszerű modellállattá a kutatásokban. Relatíve kis méretű (4-5 cm), olcsón és egyszerűen tartható csapathal. Rövid generációs idővel jellemezhető, az ikrából mindössze három hónap alatt ivarérett, felnőtt egyed fejlődik. Emiatt alkalmas többgenerációs és teljes életciklust igénylő tesztek elvégzésére, amelyre a toxikológiai vizsgálatok során gyakran szükség van. Rövid időn belül nagy mennyiségű ivarterméket állít elő, így szaporításonként egyetlen pártól több száz utód nyerhető. Teljes genomi szekvenciáját meghatározták, a különböző folyamatok hátterében álló mechanizmusok jól ismertek vagy ma is a kutatás célpontjai. Az embrió fejlődése az átlátszó ikrahéjon keresztül jól nyomon követhető. Számos egyszerű, költséghatékony kísérleti eljárást (mikromanipulálás, génexpressziós vizsgálatok) dolgoztak ki zebradánióra, de az emlősöknél használt módszerek bizonyos része is könnyen adaptálható (Winn et al., 2001). A zebradánióban található gének, receptorok, molekuláris és élettani folyamatok nagymértékű hasonlóságot mutatnak az emberével (Müller, 2005).

Ennek köszönhetően a közelmúltban több ezer transzgenikus zebradánió vonalat hoztak létre, leginkább fejlődésbiológiai vizsgálatok céljából.

Kis méretének köszönhetően a toxikológiai vizsgálatok költséghatékonyabban végezhetőek zebradánión, mivel a kezelések viszonylag kis térfogatban elvégezhetők, így kevés toxikus anyagot kell felhasználni és kevesebb veszélyes hulladék keletkezik.

A zebradánió számos a toxikológiai gyakorlatban alkalmazott OECD protokoll által javasolt modellállat (lásd 2.10 fejezet, 5. táblázat).

3.12 Transzgenikus állatok a toxikológiában

Transzgénikus állatnak azokat az állatokat tekintjük, amelyek genomja emberi közvetítéssel bejuttatott DNS-t tartalmaz. Az első transzgenikus állatmodellt – egy emberi növekedési hormont termelő egérmodellt - egy amerikai kutatócsoport hozta létre 30 évvel ezelőtt (Palmiter et al, 1983). Abban az időszakban a növekedési hormon és hatásai nagy érdeklődésre tartottak számot. Ezért

néhány évvel később (Maclean és Talwar, 1984, Zhu et al, 1985) megjelentek az első transzgenikus halak is, szivárványos pisztráng és egy kitűnő növekedési eréllyel rendelkező, szintén humán növekedési hormont termelő aranyhal.

A növekedési hormont termelő modellek megjelenését számos, (többezer) transzgenikus állatmodell létrehozása követte, amelyek génfunkciók, biológiai útvonalak, mutagén, karcinogén és más toxikus hatások, valamint betegségek tanulmányozásának hatékony eszközeivé váltak világszerte. A kutatási céllal létrehozott modellek mellett több kutatócsoport foglalkozik gazdasági célú transzgenikus fejlesztésekkel. Az első példák alapján létrehozott növekedési hormont termelő atlanti lazac piacra kerülését a közeljövőben engedélyezhetik (Ledford, 2013).

A toxikológiában kezdetben főként *in vivo* mutagén és karcinogén hatások kimutatásához használtak transzgenikus modelleket (Muta egér, LacZ egér, „Big Blue" és Gpt delta rágcsáló modellek, lacI és rpsL mutációs tesztek halakon) (Boverhof et al, 2011, Winn, 2001).

A riporter gének alkalmazása állatmodellek létrehozásához új perspektívát nyitott a toxikológusok számára. Az élőlényekbe olyan vektort juttatnak be, amelyben a riporter fehérje kifejeződése a szervezetben jól működő promóter irányítása alatt áll. A biolumineszcens vagy fluoreszcens fehérjék jele az invazív módszerek helyett *in vivo* képalkotó eljárásokkal leolvasható, így az állat elpusztítása nélkül tanulmányozható, különböző időpontokban, ugyanabban a modellben. Az anyagok kiürülése után az állatokon újabb anyagok tesztelhetők, bár az érzékenység változhat. A következő kezeléskor az egyedek még érzékenyebben reagálhatak.

Két típusú transzgenikus élőlény használható a toxikológiában. Ha a promóter konstitutív, azaz folyamatosan bekapcsolva tartja a riportert, olyan vonalak tervezhetők, amelyekben bizonyos sejtek/szervek folyamatosan kifejezik a riporter jelét. Ezzel a módszerrel az anyagok bizonyos célszervekre gyakorolt toxikus hatása tanulmányozható. Indukálható promóterekkel ún „riporter", „biomarker" vagy „bioszenzor" vonalak hozhatók létre, amelyekben a jel specifikus külső inger (pl. ösztrogénhatás) válik aktívvá. A riportervonalak indikátor szervezetekként vagy koncentrációfüggő, dózis-hatás vizsgálatokra is alkalmasak.

Biomarker vonalak tervezésénél az alábbi fő szempontokat kell figyelembe venni: (1) a riportergén a szervezet valamely sejtjében, szabályozható módon kifejezhető legyen, (2) a riporterfehérje féléletideje ne legyen túl hosszú, (3) a riporterrendszer megfelelően érzékeny legyen. A riporter géneket a 2.16 fejezet mutatja be.

Az első ösztrogénérzékeny, emlős riportervonalat Ciana és munkatársai alkották meg 2001-ben. Az ERE-Luc egérben luciferáz fejeződik ki ösztrogén receptor promóter irányítása alatt, így lehetővé teszi az ösztrogénreceptor aktivitásának és ösztrogén függőségének, valamint az anyagok szervezeten belüli megoszlásának és a szervek ösztrogén érzékenységének *in vivo* vizsgálatát, továbbá SERM anyagok azonosítását. Később több fajból is hoztak létre biomarker vonalakat receptor aktivitás vagy xenobiotikum metabolizmus tanulmányozására. A hormonhatású anyagokra érzékeny modellszervezetek csupán a közelmúltban kerültek a kutatások középpontjába, ezért az új biomarker vonalak kidolgozása „forrongó terület". Az új modellek létrehozása során előtérbe kerültek az alternatív modellszervezetek, amelyek közül az egyik legjelentősebb a zebradánió.

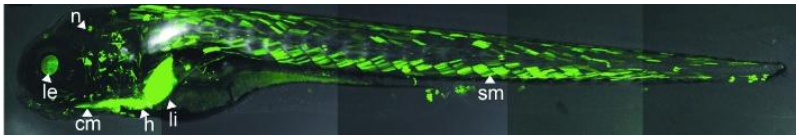
3.13 Bioszenzor zebradánió vonalak

A transzgenikus zebradánió vonalak egyre népszerűbb modellállatok a kutatólaboratóriumok körében. Amióta Stuart és munkatársai (1988) bebizonyították, hogy a megtermékenyített zebradánió embrió citoplazmájába injektált DNS képes beépülni az embrió genomjába és öröklődni az utódokba, számos transzgenikus vonalat hoztak létre. A Nemzetközi Zebradánió Adatbázisban (ZIRC – Zebrafish International Resource Center) jelenleg 25575 transzgenikus vonalat tartanak számon (2014. január 29.). A szövetspecifikus promóterekkel létrehozott transzgenikus zebradánióvonalak kitűnő eszközök promóterek és gének kifejeződésének vizsgálatában. A fejlődésbiológiában olyan megfigyeléseket tesznek lehetővé, amelyek az egyszerű fénymikroszkópos vizsgálatok során rejtve maradnak (Hadzhiev et al, 2007; Lawson és Weinstein, 2002; Yaqoob et al., 2009; Gehrig et al, 2009). Lehetővé teszik pl. transzplantációs vizsgálatok során a beültetett donor sejtek/szervek sorsának nyomon követését (Csenki et al., 2006, Csenki et al., 2010). A víztoxikológiai vizsgálatokban is egyre gyakrabban használnak transzgenikus vonalakat, leginkább hormonhatású anyagok és anyagkeverékek káros hatásainak vizsgálatára. Segítségükkel reálisabb képet kaphatunk egy-egy anyag hatásáról *in vivo*, térben és időben.

Blechinger és munkatársai (2002) egy általános toxikológiai marker, a hsp 70 nevű hősokk fehérje promóterének irányítása alá helyezték a riportergént. A vonal bármilyen anyag általános toxikus hatását képes kimutatni a reagáló szövetekben (Blechinger et al, 2002, Seok et al, 2006). A legtöbb riportervonal válasza ezzel szemben valamilyen specifikus receptorhoz kötött. Transzgenikus zebradánió vonal segítségével vizsgálták például az arilhidrokarbon receptor (AhR) aktiválódását dioxin (TCDD) hatására (Mattingly, 2001) valamint pajzsmirigyműködést befolyásoló anyagok hatását és a tiroid-kortikoid jelátviteli útvonalak kapcsolatát (Terrien et al, 2011, Opitz et al, 2012). Carvan és munkatársai (2000) aril hidrokarbon receptor (AhR), elektrofil válasz elemek (EPRE) és fémekre érzékeny válasz elemek (MRE) promóterét használták fel egyetlen transzgenikus zebradánió vonal létrehozásához. Az első receptor policiklusos szénhidrogének, a második elektrofil oxidálószerek (pl. kinonok) a harmadik nehézfémionok kimutatására alkalmas. Vizsgálataik szerint mindhárom anyagcsoport képes volt a riportegén (luciferáz vagy zöld fluoreszcens fehérje-GFP) specifikus aktiválására. A későbbiekben ösztrogén (ERE) és retinolsav válasz elemek (RARE, RXRE) bevonását is tervezték, azonban a transzgént csak a második generációig tudták fenntartani a vonalban.

Az első ösztrogénhatás kimutatására alkalmas modellállat egy zebradánió vonal volt, amelyben a luciferáz riporter három ösztrogén válasz elem kontrollja alatt állt. A vonal nagy áttörést hozott a toxikológiai vizsgálatokban. Bár érzékenysége jóval alacsonyabb, mint az újonnan kifejlesztett modelleké, a szteroid és a nemszteroid típusú ösztrogének egyaránt képesek voltak a riporter szövetspecifikus jelét indukálni, így első ízben sikerült igazolni a riportervonalak alkalmasságát hormonhatás és az érintett szervek *in vivo* vizsgálatára. A teszteket 35 napos korig végezték és igazolták az ösztrogénhatás és az ivarkialakulás közötti összefüggést (Legler et al 2000). Gorelick és Halpern (2011) később egy zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) kifejező érzékenyebb, 5 ERE-t hordozó vonalat hoztak létre, amelyben azonosították az ösztrogénhatással érintett legfőbb

szerveket: preoptikus régió, szaglószervek, szívbillentyűk és a máj. 2012-ben Lee és munkatársai egy még érzékenyebb vonalat hoztak létre, amelyben a GFP több ERE és az ER promóter irányítása alatt áll. Vizsgálataik szerint az ösztrogénhatással érintett szervek a máj, a szív, a vázizomzat, a hallószerv/otolit kapszula (otic vesicle), az előagy, az oldalvonal szerv és a ganglionok (Lee et al 2012).



9. ábra Zöld fluoreszcens fehérje kifejeződése az ösztrogénhatással érintett szervekben, 4 napos zebradánió lárvában (cm: koponya izmai, h: szív, le: szemlencse, li: máj, n: neuromaszt, sm: szelvények izomzata) (Lee et al, 2012).

2012-ig a halak közül csak medaka és zebradánió riportervonalakat hoztak létre. Egy Lee és munkatársai által 2012-ben fejlesztett, ösztrogén receptoron alapuló, tranziens vizsgálati rendszer viszont bármely más halfajban is használható lehet a jövőben (9. ábra). Tranziens vizsgálatok esetén nem cél a stabil vonalak létrehozása, az embriókat az injektálást követően kezelik a vizsgálandó anyaggal, majd mikroszkóp alatt vizsgálják a riporter kifejeződését. A riporter jele esetenként a kezeletlen embriókban is megfigyelhető, viszont a kezelés hatására a fluoreszcens fehérje kifejeződése felerősödik és elszórt, mozaikos mintázatot ad. A nem szövetspecifikus kifejeződés ellenére ezek a rendszerek is alkalmasak lehetnek nagy teljesítőképességű (high-throughput) vizsgálatokhoz.

Az ösztrogénválasz vizsgálatához a két széleskörűen használt marker, az aromatáz és a vitellogenin indukció vizsgálatára alkalmas riportervonalat is létrehoztak.

3.13.1 Aromatáz transzgenikus zebradánió vonal

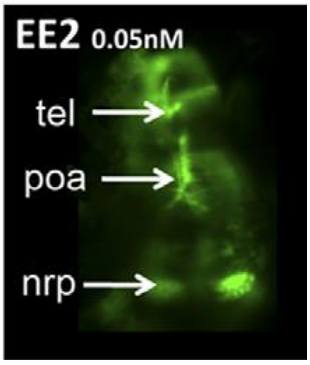
Számos korábbi vizsgálat igazolta, hogy a *Cyp19b* (*Cyp19a1b*) aromatáz ösztrogén hatású anyagokkal indukálható, kiváló biomarker (Cheshenko et al., 2007). Az indukciót azonban csak molekuláris biológiai módszerrel lehet a kezelt halakban kimutatni.

Az aromatáz-b az agy radiális gliasejtjeiben fejeződik ki. A luciferázzal kapcsolt aromatáz promóter használhatóságát gliasejtekből készített sejtvonalon vizsgálták (Cheshenko et al., 2007). Bebizonyosodott, hogy a promóter régió önmagában már sejtvonalban is képes aktiválni a mögötte elhelyezkedő génszakasz kifejeződését.

Az *in vitro* eredmények alapján egymással párhuzamosan két kutatócsoport is létrehozott zöld fluoreszcens fehérjét kifejező, aromatáz promótert hordozó konstrukciót.

Mivel a stabil transzgenikus vonalak létrehozása még zebradánió esetében is hosszadalmas és költséges, Kim és munkatársai (2009) tranziens aromatáz vizsgálati rendszert dolgoztak ki. Ösztrogénkezelés hatására a szaglógumóban/hagymában, az előagyban (telencephalon), a preoptikus régióban és a mediobazális hipotalamuszban figyelték meg a riporterfehérje kifejeződését.

A napjainkban is több laboratóriumban használt *Cyp19a1b-GFP* vonalat Tong és munkatársai hozták létre (2009). Minden újonnan kifejlesztett biomarker vonalhoz, így ehhez is ki kellett dolgozni a legmegfelelőbb vizsgálati rendszert. Az általuk létrehozott rendszerben az embriók kezelését 0 vagy 24 hpf korban kell kezdeni. Az aromatázok 5 napos korra érik el a legmagasabb kifejeződési szintet (Trant et al, 2001), ezért a mikroszkópos vizsgálatokat ekkor kell elvégezni. A kiértékelés az embriókról felülnézetből készített fluoreszcens felvételek alapján történik (10. ábra) (Brion et al, 2012).



10. ábra Zöld fluoreszcens fehérje kifejeződése cyp19a1b-GFP zebradánióban 0,05 nM 17-α-etinil-ösztradiol (EE2) kezelés hatására (tel: előagy, poa: preoptikus régió, nrp: nucleus recessus posterioris). (Brion et al, 2012).

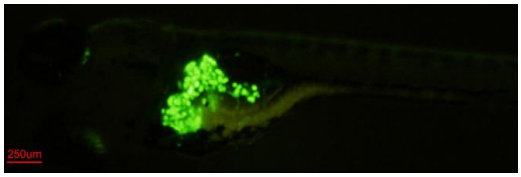
A vonalon több ösztrogénhatású anyagot is viszgáltak. A legerősebbnek a 2,2-bisz(p-hidroxifenil)-1,1,1-triklór-etándietil-besztrol (DES), a hexösztrol (HEX) és a természetes ösztrogének (17α-etinilösztradiol (EE2), 17-ß-ösztradiol (E2), ösztron (E1)) hatása bizonyult, de az ösztriol (E3) jóval gyengébb hatású volt. A zearalenon (ZEA) tiszta anyagként, metabolitjaival ellentétben (α-zearalanol (α-ZEE), ß- zearalanol (ß-ZEE)) koncentrációfüggő választ váltott ki,. Az iparban használt ösztrogénhatású anyagok közül (biszfenol-A (BPA), 4-t-peniylfenol (4-t-3), 4-t oktilfenol (4-t-OP), 4-n-nonilfenol és 1,1,1-Trikloro-2-(2-klorofenil)-2-(4-klorofenil)-etán keveréke) a 4-n-NP hatástalan volt. A nonil-fenol keverék jóval erősebb ösztrogén hatást mutatott, mint a biszfenol-A. A tesztoszteron inaktív, míg a dihidro-tesztoszteron (DHT) ösztrogénhatású volt. A metoxiklor (MXC) és genistein (GEN) hormonhatását szintén sikerült igazolni (Brion et al, 2012.) A modellen emellett EE2, E2, E1, BPA és OP négy anyagból álló, különböző arányú keverékeit is vizsgálták (Petersen et al, 2013).

3.13.2 Vitellogenin transzgenikus zebradánió vonal

A közelmúltban, a doktori munkám megkezdése után egy kínai munkacsoport bemutatott egy vitellogenin transzgenikus zebradánió (ere-zvtg1:gfp) vonalat (Chen et al, 2010).

E vonal létrehozásakor a legerősebben kifejeződő vtg-1 gén promóterének 1,7 kb-os szakaszával nem sikerült kellő érzékenységű vonalat kialakítani, ezért a válasz fokozásához a régió elé egy 39 bp-ból álló ERE-t építettek. A fejlődő embriókban EE2 (100 ng/l) kezelés hatására a vitellogenin 53 órás korban jelent meg. A vonal érzékenységét több anyaggal is vizsgálták (E2, CdCl2, E3, DES, BPA, NP, progeszteron, 17-hidroxiszteroid), dózis-hatás görbéket azonban nem vettek fel. A fluoreszcens jel felnőtt hímekben koncentráció függő módon megjelent, nőstényekben fokozódott

EE2 kezelés hatására (11. ábra) (Chen et al, 2010). A vonallal kapcsolatban eddig több publikáció nem született.



11. ábra Fluoreszcens fehérje kifejeződése 6 napos ere-zvtg1:gfp embrió májában, 100 ng/l EE2 kezelés hatására.

3.14 Génkonstrukciók, vektorok típusai

A bioszenzor zebradánió vonalak létrehozása során az első lépés a megfelelő génkonstrukciók létrehozása. A génkonstrukció három fő elemből áll: egy molekuláris kapcsolóból (indukálható promoter/enhanszer), egy riporterfehérjét kódoló szakaszból és a poliadenilációs szignálból. A megfelelő szakaszokat PCR reakcióval felsokszorozzák, majd olyan plazmid vektorok segítségével építik össze, ami baktériumokban fenntartható és képes sokszorozódni. A génkonstrukciót egy-két sejtes zebradánió embrió citoplazmájába vagy a szikbe juttatják, ahonnan a sejtmagba kerül és beépül az embrió genomjába. A konstrukció működését már az injektált embriókban lehet vizsgálni (tranziens vizsgálatok) a riporter jele alapján, ilyenkor viszont a kifejeződés még mozaikos. Bár a konstrukciót 1-sejtes embrióba juttatják, az csak később képes a genomba épülni, ezért csak az utódsejtek egy részében lesz jelen (Stuart et al, 1988, 1990, Culp et al 1991). A tranziens vizsgálat során pozitívnak talált embriókat felnevelik, és vizsgálják a transzgén átörökítését az utódokba. A stabilan örökítő alapítók utódaiból aztán létrehozzák a transzgenikus vonalat.

Kezdetben vektorként plazmidokat használtak, amelyeket linearizálva juttattak a sejtekbe. Azonban sok esetben azt tapasztalták, hogy a riporter egyáltalán nem, vagy nem a kívánt helyen fejeződött ki. Előfordulhat, hogy a konstrukció olyan genomi pozícióba épül, ahol a környező szekvenciák gátolják a működését. Ennek elkerülésére ún. inzulátor szakaszokat építettek a vektorokba, amelyek megakadályozták, hogy a konstrukció „a környezetével kommunikáljon”. A transzgén ennek ellenére sokszor nem volt fenntartható az egymást követő generációkban és mindössze 3-5, %-os hatékonysággal épült be a genomba.

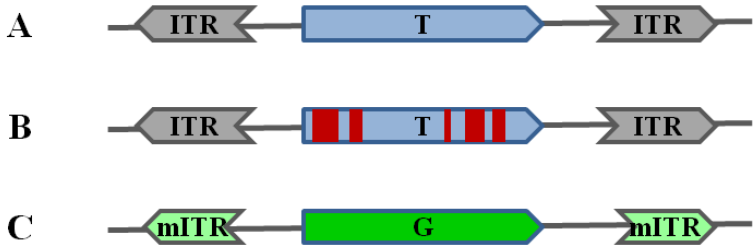
A hatékonyság növelésére több új módszert dolgoztak ki (pl. medakában kifejlesztett I-SceI meganukleáz mediált génbevitel (Thermes et al, 2002), pszeudotipizált retrovírus vektorok használata (Gaiano, 1996), BAC (Bacterial Arificial Chromosomes) és transzpozon mediált BAC transzgenezis (Yang et al, 2006, Suster et al, 2009), a Gal4-UAS rendszer (Sheer és Campos-Ortega, 1999), a *Cre-Lox* rendszer és a transzpozonok). A riporter vonalak létrehozása mellett alkalmasak irányított génexpressziós vizsgálatokra, géneket szabályozó szekvenciák, pl. enhanszerek keresésére (enhanszer trap), génfunkció vizsgálatára (gene trap, gain of function, loss of function). A közelmúltban kifejlesztett cinkujj nukleáz (Meng et al, 2008, Doyon et al, 2008), TALEN (Cade at al., 2012) és CRISPR (Hwang at al., 2013) technikákkal célzott génbevitelre is lehetőség nyílhat.

A dolgozatban bemutatott zebradánió vonal transzpozon rendszerrel készült, ezért részletesebben csak a transzpozonokat mutatom be.

3.14.1 Zebradánióban használt transzpozonok

A transzpozonokat Barbara McClintock fedezte fel az 1940-es években (McClintock, 1948 és 1951). A korábbi nevükön „ugráló gének”-nek nevezett DNS szakaszok képesek a helyüket megváltoztatni a genomban. Két típusuk ismert, az RNS intermedieren keresztül működő I. típusú transzpozonok vagy retrotranszpozonok és II. típusú, ún. „cut and paste” (kivágódás és beillesztés) mechanizmusú transzpozonok. Molekuláris vektorként a II. típusba tartozó transzpozonokat használják. Az első sikeres transzpozon alapú transzgenezist ecetmuslicában végezték (Rubin és Spradling, 1982).

A transzpozonokat ún. fordított ismétlődések (ITR) határolják. Mélyrehatóbb vizsgálatuk rávilágított arra, hogy az ITR szekvenciának egy kisebb szakasza is elegendő a működéshez, ezért ún. mini ITR-ekkel rendelkező transzpozonokat alkottak. Segítségükkel a transzgenezis hatékonysága 50%-ra emelhető. Emellett nagy előnyük, hogy a plazmidokkal ellentétben egy inszerciós helyen csak egy kópiában épülnek be, nem képeznek konkatamereket és az egymásra következő generációkban is stabilan fennmaradnak. A transzpozáz enzim egyszerűen bevihető, halaknál *mRNS* formában a konstrukcióval együtt juttatják be. Ahhoz, hogy a transzpozonok egy adott pozícióból kivágódjanak, majd új helyre épüljenek, transzpozáz enzimet igényelnek. A transzpozáz működése során a transzpozonokat határoló ún. fordított ismétlődéseket (ITR – inverted repeat) ismeri fel (12. ábra).



12. ábra A transzpozonok és egy transzpozon alapú vektor sematikus ábrája. A: Autonóm transzpozon fordított ismétlődésekkel (ITR) és transzpozázt kódoló szakasszal (T), B: ITR-ekkel határolt, a transzpozázt kódoló szakaszban deléciókat hordozó (pirossal jelölt szakaszok), nem autonóm transzpozon, C: transzgént és módosított ITR-eket hordozó, génkonstrukcióként használható transzpozon (Clark et al., 2011 nyomán)

A genomban két transzpozon forma fordulhat elő. A hosszabb, ún autonóm forma hordozza a transzpozázt kódoló szakaszt. A nem autonóm formák rövidebbek, deléciók következtében elveszítették a transzpozázt kódoló szekvenciát (Clark et al., 2011). Utóbbiak önmagukban nem képesek aktív transzpozonként működni, de transzpozáz jelenlétében újra kivágódhatnak és új helyre épülhetnek. Ez alapján a transzpozonok segítségével az ITR szakaszok közé bármilyen szekvencia a genomba építhető, illetve onnan kivágható (12. ábra).

A zebradánióban használt transzpozonok három fő csoportba sorolhatók: (1) gerinctelenekből származó transzpozonok, (2) mesterséges transzpozonok és (3) halakból származó transzpozonok. A gerinctelenek transzpozonjai közül az ecetmuslicából származó *mariner*-t és a C. elegansból

származó *Tc3*-at valamint a kukoricából Barbara McClintock által izolált Ac/Ds transzpozont is sikerült zebradánióban működésre bírni (Kawakami, 2005; Emelyanov et al., 2006) A legjelentősebb mesterséges transzpozont, a Sleeping Beauty-t (SB) egy magyar kutató házaspár és munkatársai hozták létre (Izsvák et al, 1995, Ivics et al 1997). A Tc1/mariner transzpozon családra jellemző Tc1-szerű elemeket (TcE) kerestek halak genomjában. Aktív transzpozont nem sikerült azonosítani. A mesterséges transzpozont lazacfélékben talált TcE elem és szintetikus, transzpozázt kódoló szakaszokból alakították ki. Később továbbfejlesztett hiperaktív formáját is megalkották. Az SB kb. 5,5 kb DNS befogadására alkalmas. Efölött a tartomány fölött beépülési hatékonysága a befogadott szekvencia méretével arányosan drasztikusan csökken. Szekvenciaspecifikus, az AT gazdag genomi régiókba épül (ATATATATAT). A SB-t hal és emlős modellrendszerekben is elterjedten használják. A hasonló elvek szerint létrehozott, békákból származó transzpozon (Frog Prince – FP) szintén nagy hatékonysággal működik zebradánióban. Emellett a közelmúltban mesterséges zebradánió transzpozont is építettek (*Harbinger_3DR*) (Sinzelle et al, 2008).

Halakban az egyetlen működő, természetes transzpozont, a *Tol2*-t medaka fajok (*Oryzias latipes és curvinotus*) tirozináz génjében találták (Koga et al, 1996, Kawakami et al., 1998). Szekvenciája alapján a hAT transzpozon családba tartozik. A transzpozon klónozott változata beváltotta a hozzá fűzött reményeket (Parinov et al., 2004). Több fajban: zebradánióban, karmosbékában, csirkében, egérben és humán modellekben is hatékonyan működik. A *Tol2* esetén jellegzetes beépülési szekvencia nem ismert, bár a tapasztalatok szerint gyakrabban épül intronokba vagy más, fehérjét nem kódoló szakaszokba. A zebradánióval foglalkozó kutatásokban a *Tol2* transzpozont használják leggyakrabban. A SB-nál hatékonyabban képes a zebradánió embrió genomjába épülni, beépülési hatékonysága nagy méretű DNS szakasz beépítése esetén (> 10 kb) sem esik vissza (Balciunas et al., 2006). A kutatások előrehaladtával több *Tol2* alapú klónozó rendszert is fejlesztettek (Balciunas et al., 2006; Urasaki et al., 2006). Az ún Gateway rendszerek megjelenése (Kwan et al., 2007; Villefranc et al., 2007) tovább növelte a *Tol2* népszerűségét. (Lee et al., 2012)

3.14.1.1 A Gateway technika

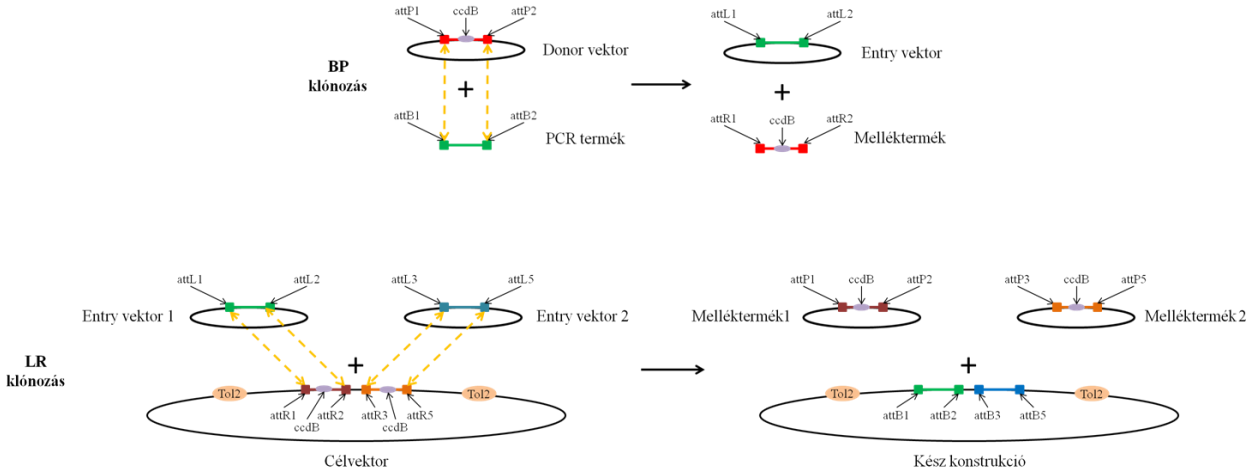
A hagyományos klónozási technikák több lépésből álló, sokszor hosszadalmas módszerek. A fragment beépítéséhez a gyűrűvé záródott DNS-vektort fel kell nyitni és egymásnak megfelelő DNS végeket kell létrehozni. Ehhez szekvenciaspecifikus restrikciós enzimeket használnak. Az enzimet azonban körültekintően kell megválasztani, mert bizonyos enzimek belehasíthatnak vagy feldarabolhatják a beépítendő szekvenciát. A klónozás sikeressége különösen a nagyobb méretű szakaszok esetén alacsony, ráadásul a fragmentek többféle irányultságban is a vektorba épülhetnek.

A Gateway rendszerek esetén a fragmentek bejuttatása nagy hatékonyságú, reverzibilis, helyspecifikus rekombináció alapján történik, így jóval egyszerűbb a hagyományos restrikciós emésztés-ligálás eljárásoknál (Suzuki et al., 2005, Roure et al., 2007).

A helyspecifikus rekombinázok DNS szakaszok irányított áthelyezését katalizáló enzimek. A Gateway rendszerben használt rekombinázok a λ bakteriofágból származnak. A λ fág egy baktériumokat fertőző vírus, gazdasejtje a laboratóriumokban különböző vektorok fenntartására és

szaporítására is használt *Escherichia coli*. A vírus szaporodási stratégiája során képes örökítőanyagát helyspecifikus rekombinációval a gazdabaktérium genomjába építeni. A genetikai átrendeződés minden esetben a rekombináz két felismerési helye az ún. *attachment site*-ok között történik. A baktériumban található felismerési motívumot *attB*- nek, a fágban találhatóakat pedig *attP*-nek nevezzünk. A „B" a baktérium szóból, a „P" a fág angol megfelelőjéből (*phage*) ered. Az integráció után a kicserélődött szakaszokat *attL* és *attR* szakaszok határolják, melyek az *attB* és *attP* DNS szekvenciákból jönnek létre. Az *attL* és *attR* között végbemenő reverz reakció eredményeként a fág DNS kivágódik, és visszakapjuk az eredeti *attB* és *attP* szekvenciákat (Suzuki et al., 2005).

A Gateway klónozó rendszerekben a kívánt fragment bejuttatása két lépésben, a fent leírt elv alapján történik (13. ábra). Első lépésben a beépíteni kívánt szakaszt PCR reakcióval felsokszorozzák, amelynek során a fragment végeire megfelelő *attB* szekvenciákat építenek. Ezt követően a PCR terméket BP klonáz enzim segítségével *attP* helyeket hordozó, ún. „donor" plazmidba építik, amely így ún. „entry" klónná alakul. A reakció eredményeképpen a plazmidba épült szakaszt *attL*, a kivágódott szakaszt pedig *attR* szekvenciák határolják. Második lépésben (LR klónozás) a fragment az „entry" klónból a végső plazmid vektorba (célvektorba vagy „destination" vektorba) építhető, amely az L végeknek megfelelő R szakaszokat és a *Tol2* transzpozon működéséhez szükséges *Tol2* karokat hordozza.



13. ábra A Gateway klónozás sematikus ábrája. Első lépésként az *attB* rekombinációs helyeket hordozó PCR termékeket BP klónozás során az *attP* helyeket hordozó donor vektorba építjük. Így ún. „entry" vektorok keletkeznek, amelyekben a kívánt fragmenteket már *attL* rekombinációs helyek fogják közre. Az *attL* és *attR* szakaszok közötti helyspecifikus rekombinációval (LR klónozás) az „entry" vektorokból a fragmentek a célvektorba építhetők (ccdB: a hatékony szelekcióhoz szükséges génszakasz, Tol2: transzpozon kar).

A plazmidokat mindkét rekombinációs lépés után *E. coli*-ban sokszorozzák fel. A kívánt plazmidokat hordozó telepek egy ötletes szelekciós stratégiának köszönhetően azonosíthatók. A donor- és a célvektorok antibiotikum rezisztenciáért felelős és ún. *ccdB* génszakaszokat hordoznak. A *ccdB* géntermék a baktériumra nézve toxikus. A *ccdB* szakasz a rekombináció során kicserélődik, az antibiotikum rezisztencia gén viszont a plazmidban marad. Antibiotikumot tartalmazó táptalajon így elvileg csak azok a baktériumok képesek fennmaradni, amelyek hordozzák a rezisztenciáért felelős plazmidot, de *ccdB* szakaszt nem tartalmaznak.

A helyspecifikus rekombináció csak egymásnak megfelelő *att* szakaszok között megy végbe. Molekuláris módszerekkel számos különböző változat hozható létre, így egyszerre több fragment helyspecifikus befogadására alkalmas, „multisite" Gateway rendszerek is építhetők (Suzuki et al, 2005, Villefranc et al, 2007).

A létrehozott konstrukció a többi transzpozon vektorhoz hasonlóan akkor működik hatékonyan, ha a transzpozázt kódoló szakaszt is a sejtbe juttatják.

3.15 Génbeviteli módszerek halakban

A halak esetében a legnépszerűbb génbeviteli módszer a mikroinjektálás. Az első sikeres mikroinjektálást Stuart és munkatársai (1988) végezték aranyhalon, később sikeresen alkalmazták atlanti lazac, ponty, harcsafélék, aranyhal, csík, medaka, szivárványos pisztráng, tilápia, zebradánió és sok más halfaj embrióin (Chen és Powers, 1990). Mivel a halak embrióiban a pronukleusz hagyományos fénymikroszkóp alatt nem vagy rosszul látható, az emlősökkel ellentétben a vektorokat kezdetben az 1-2 sejtes embriók citoplazmájába injektálták. Ehhez két kapillárisra volt szükség, az egyik, az ún. tartókapilláris rögzítette az embriót, a másikból pedig bejuttaták a kívánt konstrukciót. A folyamat viszonylag lassú és munkaigényes volt, valamint több embrió pusztulását eredményezte (Powers et al, 1992, Dunham et al, 1987). A nehézségek kiküszöbölésére olyan új módszereket dolgoztak ki, mint az elektroporáció (Inoue, 1992.), a génpuska (Zelenin et al., 1991), a liposzóma, spermium vagy retrovírus közvetített génbevitel (Szelei et al., 1994; Khoo et al., 1992, Sarmasik et al., 2001).

A génbevitel hatékonyságát több tényező határozza meg: az embriók túlélési aránya, a módszer egyszerűsége, idő-, felszerelés- és költségigénye, az egyszerre manipulálható embriók száma, a konstrukció beépülésének sikeressége, örökítése az utód generációba stb. Ezeket figyelembe véve kis számú embrió transzgeneziséhez a mikroinjektálás terjedt el legjobban.

Későbbi megfigyelések rávilágítottak arra, hogy a konstrukciót a fejlődő embrió a szikből is képes felvenni, így injektáláskor kevésbé sérül. Tovább egyszerűsíti a módszert, hogy a halak embrióinak többsége képes sérülés nélkül agarból készített aljzathoz tapadni, így elkerülhető a tartókapilláris használata. Ráadásul bizonyos fajok (pl. zebradánió) ikrahéja átlátszó és a kapillárissal átszúrható. Így injektálás előtt nem szükséges az ikrahéjat eltávolítani, ezáltal az embriók túlélési esélye tovább nő. A zebradánió embriók az ikrahéj segítségével agar aljzat nékül is biztonságosan kitapaszthatók egy petricsésze felületére. A módszer egyetlen sarkalatos pontja a munkaigényesség maradt, amelynek kiküszöbölésére automatizált, nagy hatékonyságú mikroinjektáló berendezéseket fejlesztettek (Wang et al, 2007). A mai mikroinjektáló berendezések többsége nitrogéngázzal működik.

3.16 Riportergének a toxikológiában

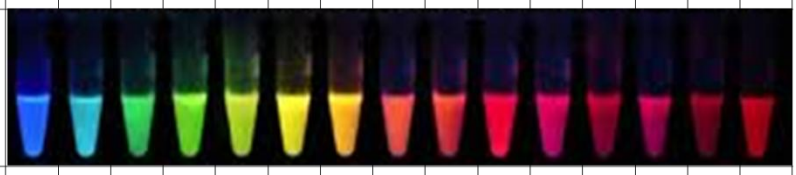
Az eddig nyilvántartott (ZFIN adatbázis) többezer létező zebradánió vonalban a riportergének széles skálája fellelhető. Kezdetben enzimek génjeit használták riportergénként (pl. ß-galaktozidáz, kloramfenikol-acetil-transzferáz, stb.). Ezek kimutatása *in vivo* nem lehetséges, mert a

színreakcióval reagáló szubsztrátok az élő állatban nem működnek. Az első toxikológiai zebradánió modellekben a szentjánosbogárból (*Photinus pyralis*) származó luciferáz riportert használták (Legler et al 2000). A luciferáz még a korábbi rendszerekhez hasonlóan egy enzim, ezért kimutatása szubsztrát jelenlétéhez kötött. Az újabb technikák azonban lehetővé teszik az enzimaktivitás *in vivo* vizsgálatát. Ehhez két konstrukció bejuttatására van szükség: az egyik a toxikológiai szempontból fontos indukálható promótert és a luciferázt kódoló szakaszt tartalmazza, a másikról a szubsztrát egy konstitutív promóter hatására folyamatosan átíródik. Ha a toxikus anyag jelen van, az enzim átíródik és felhasználja a jelenlévő szubsztrátot, amelynek jele az élő állatban biolumineszcencia alapján mérhető.

A fluoreszcens fehérjék felfedezése forradalmasította a riportergéneket felhasználó kutatásokat. Kimutatása egyszerű, szubsztrátot és kofaktorokat nem igényel, működéséhez mindössze a megfelelő energiájú fotonokat kell biztosítani. Aktivitása fluoreszcens szűrők alkalmazásával mikroszkóp alatt *in vivo* tanulmányozható.

A legtöbb ma használt fluoreszcens fehérje az elsőként azonosított, kristálymedúzából (*Aequoria victoria*) származó zöld színű (GFP- *green fluorescent protein*) és a korallból (*Discosoma sp.*) izolált vörös fluoreszcens fehérje (RFP- red fluorescent protein) módosított változatai (6. táblázat).

Egymással nem átfedő kibocsátási és elnyelődési spektrumú fluoreszcens fehérjék alkalmazásával lehetővé vált olyan vonalak kifejlesztése is, amelyekben a különböző fehérjék kifejeződése ugyanabban az egyedben egyszerre, egymástól függetlenül vizsgálható (Yang et al., 2009)

	GFP eredetű				RFP eredetű										
gerjesztési hullámhossz (nm)	380	433/ 452	488	516	487/ 504	540	548	554	568	574	587	595	596	605	590
kibocsátási hullámhossz (nm)	440	475/ 505	509	529	537/ 542	553	562	581	585	596	610	620	625	636	648
fehérje színe															
fehérje neve	EBFP	ECFP	EGFP	YFP	mHoneydew	mBanana	mOrange	tdTomato	mTargenine	mStrawberry	mCherry	mGrape1	mRaspberry	mGrape2	mPlum

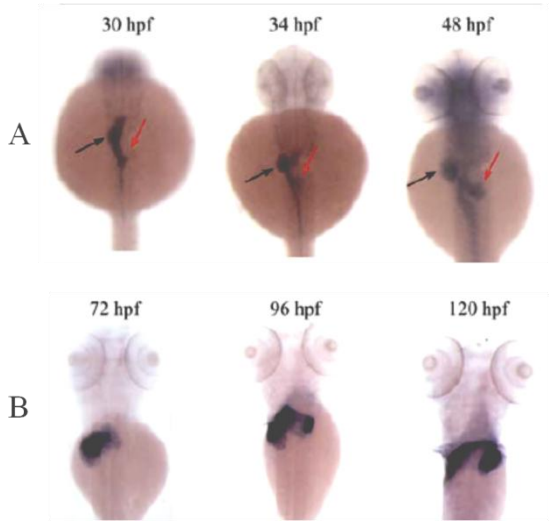
6. táblázat Néhány fluoreszcens fehérje a gerjesztési és kibocsátási hullámhosszokkal (Kép: www.photobiology.info)

A transzgenikus halak előállítása során kulcsfontosságú lépés a szervezetben jól átíródó, megfelelően erős fénykibocsátású és stabilitású fluoreszcens fehérje megválasztása. A konstrukciótervezésekor ezért a fehérje gerjesztési és kibocsátási hullámhosszán kívül más szempontokat is figyelembe kell venni: az ún „quantum efficiency” értéket (az egységnyi abszorbeált foton hatására kibocsátott fotonok száma), a fehérje stabilitását, a működőképességhez optimális hőmérsékleti tartományt (bizonyos fehérjék csak 30 ^{o}C alatt érnek megfelelően), az aggregációs hajlamot (monomer, dimer, esetleg tetramer forma képzése), az érés ideje és az érés

során esetlegesen megjelenő fluoreszcenciát. A *vtg1:*mCherry transzgenikus vonal létrehozása során használt mCherry monomer, és bár „quantum efficiency" értéke az egyik legalacsonyabb a fluoreszcens fehérjék között (Seefeldt et al., 2008), zebradánióban mégis meglehetősen erős (a GFP-nél is intenzívebb) jelet ad.

3.17 A zebradánió májfejlődése

A zebradánió az egyik legnépszerűbb fejlődésbiológiai modell. Egyedfejlődését széleskörűen vizsgálták, a máj kialakulásának folyamatát azonban csak az elmúlt évtizedben tárták fel. A zebradánió egyedfejlődése során az embriócsomóban (ICM – Inner Cell Mass) elsőként a vérképzés szervei és kezdetleges vérsejtek jelennek meg, a máj és a vese csak a folyamat végén alakulnak ki.
A máj a belső csíralemezből (endoderma) származik. A májsejt prekurzorok (hepatoblast) a korai gasztrula fázisban, a megtermékenyítést követő 6. órában (6 hpf) jelennek meg az endoderma hasi oldalán. A máj fejlődése két fő szakaszra bontható. A kialakulási (budding) fázis 24-50 órás korig tart. Az endodermális sejtek a garat és a farki régióban rúdszerű képződményt hoznak létre, majd az első szelvény alatti része megvastagszik, amelynek elülső szakaszából kialakul a máj primordium. A máj primordium sejtjei tovább osztódnak és a szervkezdemény a bal oldalra elhajlik és kialakul a májat a nyelőcsőtől elválasztó barázda, valamint a máj előbélbe torkolló vezetéke. A növekedési fázisban a májkezdemény drámai átalakuláson megy át. Az aktív sejtosztódásnak köszönhetően mérete, alakja és elhelyezkedése is megváltozik. Megkezdődik a hepatoblastok differenciálódása májsejtekké és epevezetékké. 96 órás korban a máj a ventrális középvonalon átnyúlik és kialakul a jobb oldali májlebeny. Kiterjedése a szívburoktól a szik elülső részéig tart (14. ábra) (Tao és Peng, 2009).



14. ábra A zebradánió májfejlődése felülnézetből 30, 34, 48, 72, 96 és hpf korban, a fontos szerepet betöltő gének (A: *foxA3,* B: *lfabp*) *whole-mount in situ* hibridizációval vizsgált kifejeződése alapján. A májat fekete, a hasnyálmirigyet piros nyilak jelölik. (Forrás: Tao és Peng, 2009)

4 Anyag és módszer

4.1 A kísérletek helyszíne

Kísérleteimet a gödöllői Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékének és Környezetipari Regionális Egyetemi Tudásközpontjának laboratóriumaiban, valamint a Birminghami Egyetem Orvosi és Fogászati Kar, Klinikai és Kísérleti Orvostudományi Intézetében (Birmingham, Egyesült Királyság) és a németországi Lipcsében található UFZ Helmholtz Association kutatóintézeteinek Bioanalitikai Ökotoxikológiai Intézetében végeztem.

4.2 Felhasznált állatok és tartási körülmények

A vizsgálatokat zebradánió (*Danio rerio*) halfaj vad típusú AB vonalán végeztem. A halak tartása külön haltartó szobában, zebradánióra kifejlesztett recirkuláriciós rendszerben (Tecniplast ZebTEC) történt. A vad típusú állomány ikrás és tejes egyedei szétválogatva, 3 literes medencékben kerültek elhelyezésre. A rendszer állandó pH-t, sókoncentrációt és 25,5°C-os vízhőmérsékletet tartott fenn. A 14 órás világos és 10 órás sötét időszakot automatán vezérelt fényprogram biztosította. A kifejlett egyedek táplálása naponta kétszer, zebradánió számára fejlesztett teljes értékű táppal (zebrafish basic food, Special Diets Services /SDS/) történt, hetente kétszeri élő sórák lárva (*Artemia nauplii*) kiegészítéssel. A halak szaporítása speciális, 1 literes szaporítóedényekben zajlott (Tecniplast), melyekbe a halak az ívatást megelőző napon kerültek kihelyezésre ivar szerint, egymástól egy válaszfallal elválasztva. Az ikrák gyűjtése a következő nap reggelén szinkronizáltan történt, a válaszfalak eltávolítását követően. A kísérletekhez megfelelő, egészséges ikraszemek mikroszkóp alatt kerültek kiválogatásra.

Az ivadékok az elúszásuk után napi háromszor kaptak haltápot, majd a tizedik naptól naponta kaptak sórák kiegészítést.

4.3 DNS-tisztítás

A konstrukcióhoz szükséges DNS-minták előállításához 5 vad típusú egyedtől vettem farokúszó mintákat. Az úszódarabokat Proteináz K enzimmel (Macherey- Nagel) emésztettem egy éjszakán át 55 ^{o}C-on, 500 µl SET pufferben (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, 20% w/v szacharóz), majd fenol-kloroformos módszerrel (Sambrook et al., 1989) kitisztítottam a genomi DNS-t, amit 40 µl DNáz-mentes vízben vettem fel.

A munkához szükséges plazmidokat és a konstrukcióhoz szükséges plazmidokat plazmid izoláló kittel (Geneaid) tisztítottam.

A konstrukció öröklődésének vizsgálatához az egy-egy szülőpártól származó embriók összességét (pool-ok) vagy egyedi lárvák farokúszóját használtam fel, amelyből DNS-t E.Z.N.A. genomi DNS izoláló kittel (Omega Bio-Tek) nyertem ki a gyártó előírásai szerint.

A DNS-ek koncentrációját (ng/µl) és tisztaságát (a 260 és 280 nm-en mért abszorbancia hányadosa) nano-fotométerrel (Implen) határoztam meg. Emellett a DNS minták integritását 1,5%-os agaróz gélben is ellenőrizem.

4.4 Agaróz gélelektroforézis

A DNS-t, RNS-t, PCR termékeket, valamint a konstrukció létrehozása során kitisztított plazmidokat és a restrikciós emésztések eredményét 1,5 %-os, a kolónia PCR eredményét 0,8 %-os agaróz gélben ellenőriztem. Molekulasúly markerként Fermentas GeneRuler DNA Ladder Mix-et használtam. A mintákat etídium-bromid segítségével tettem láthatóvá UV- fényben. A gélképeket GeneSnap program (Syngene) segítségével rögzítettem.

4.5 A vtg1-mCherry génkonstrukció létrehozása

4.5.1 Vitellogenin transzkripciós start hely azonosítása

A vitellogenin kódoló szakaszát és az azt megelőző 4600 bp hosszúságú szakaszt PROSCAN 1.7 online promóter elemző alkalmazás (Prestridge, 1995) segítségével vizsgáltam. A program az eukariótákra jellemző PolII RNS polimeráz kötőhelyek valamint a TATA box elhelyezkedése alapján azonosítja a gén transzkripciós start helyét.

4.5.2 A vtg-1 promóter elemzése

A konstrukcióba épített promóterszakasz transzkripciós faktor kötőhelyeit és a rajtuk található ERE szakaszokat interneten szabadon elérhető ALGGEN PROMO (Messeguer et al., 2002, Farré et al., 2003), MATINSPECTOR (GenoMatix) (Quandt et al., 1995, Cartharius et al., 2005) és Dragon ERE Finder 3.0 (Bajic et al., 2003) alkalmazások segítségével azonosítottam. Emellett a publikációkban szereplő ERE motívumokat manuális szekvenciaazonosítással is vizsgáltam.

4.5.3 A *vtg1:*mCherry génkonstrukció létrehozásához szükséges primerek tervezése

A zebradánió vitellogenin-1 génjének promóter szakaszait és a fluoreszcens fehérjét (mCherry) kódoló génszakaszt felsokszorozó primerpárokat a szabadon hozzáférhető Primer3 szoftver (http://simgene.com/Primer3) szoftver segítségével terveztem úgy, hogy azok 5’ végei hordozzák a rekombinációs lépésekhez szükséges szekvenciákat (7. táblázat). A fluoreszcens fehérje esetén Roure (2009) szerint két lépésben építettem a rekombinációs helyet a fragment végére. Tapasztalataim szerint a PCR egy lépésben is végrehajtható, ezért a promóter régió felsokszorozását már leegyszerűsítve végeztem el.

primer neve	primer szekvenciája
vtg1-attB3 F1	5’ **GGGGACAAGTTTGTATAATAAAGTAGGCT**CACTGCCCAAATAAAATTCAACG 3’
vtg1-attB3 F2	5' **GGGGACAAGTTTGTATAATAAAGTAGGCT**TTTATCTTTCCCATGATGACAGCA 3'
vtg1 attB5 R	5' **GGGGACCACTTTGTATACAAAAGTTGGGT**GGCTGGTGGTTTGTGAAGAAC 3'
mCherry attB1 F	5' **AAAAAGCAGGCT**GCCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGA 3'
mCherry attB2 R	5' **AGAAAGCTGGGT**AGATCTCCGCGAATTAAAAAACCTCCCAC3'
att1B F	5' **GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT 3'**
attB2 R	5' **GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA** 3'

7. táblázat A *vtg1:mCherry* génkonstrukció létrehozásához szükséges primerek szekvenciája (a rekombinációhoz szükséges *att* szakaszokat félkövér betű jelöli)

A vitellogenin-1 gén promóter régiójához az Ensembl adatbázisból kikerestem a zebradánió vitellogenin-1 gént kódoló szakaszt, majd a primerpárt először a transzkripciós start helyet megelőző 4082 bp hosszúságú, majd egy 3357 bp hosszúságú, a feltételezett promóter régiót magába foglaló szakaszra terveztem. A fluoreszcens fehérjét a kódoló pCS2 mCherry plazmidról (1. melléklet) sokszoroztam fel, amelyet Dr. Müller Ferenc bocsátott a rendelkezésemre. Fontos kritérium volt, hogy a felsokszorozandó szakasz *poliA* régiót is tartalmazzon, hogy a konstrukcióról érett mRNS, majd fehérje tudjon képződni.

4.5.4 PCR reakciók

4.5.4.1 A promóter régió felsokszorozása

A tisztított zebradánió genomi DNS-ből az alábbi összetétel és PCR-profil alkalmazásával felsokszoroztam a promóter régiót. Mivel a felsokszorozandó szakasz hosszú és a PCR reakció során kapott fragmentben nem lehet báziseltérés, a hibajavító (*proofreading*) aktivitással rendelkező *Pfu* enzimet (Roche) használtam. Először a hosszabb, 4082 bp hosszúságú promóter régiót, majd a rövidebb 3357 bp hosszúságú szakaszt sokszoroztam fel (10 x puffer, 0,198 pM F és R primer, 25 nM dNTP, 4 nM $MgSO_4$, 1,00 µg DNS, 1 µl enzim mix, 25 µl végtérfogatban) (primerek: 7. táblázat). A reakciókat Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler típusú PCR gépben hajtottam végre (94 ^oC 2 min; 3x 94 ^oC 1 min, 55 ^oC 2 min, 70 ^oC 9 min; 35x 94 ^oC 2 min, 56 ^oC 30 sec, 70 ^oC 9 min; 70 ^oC 5 min).

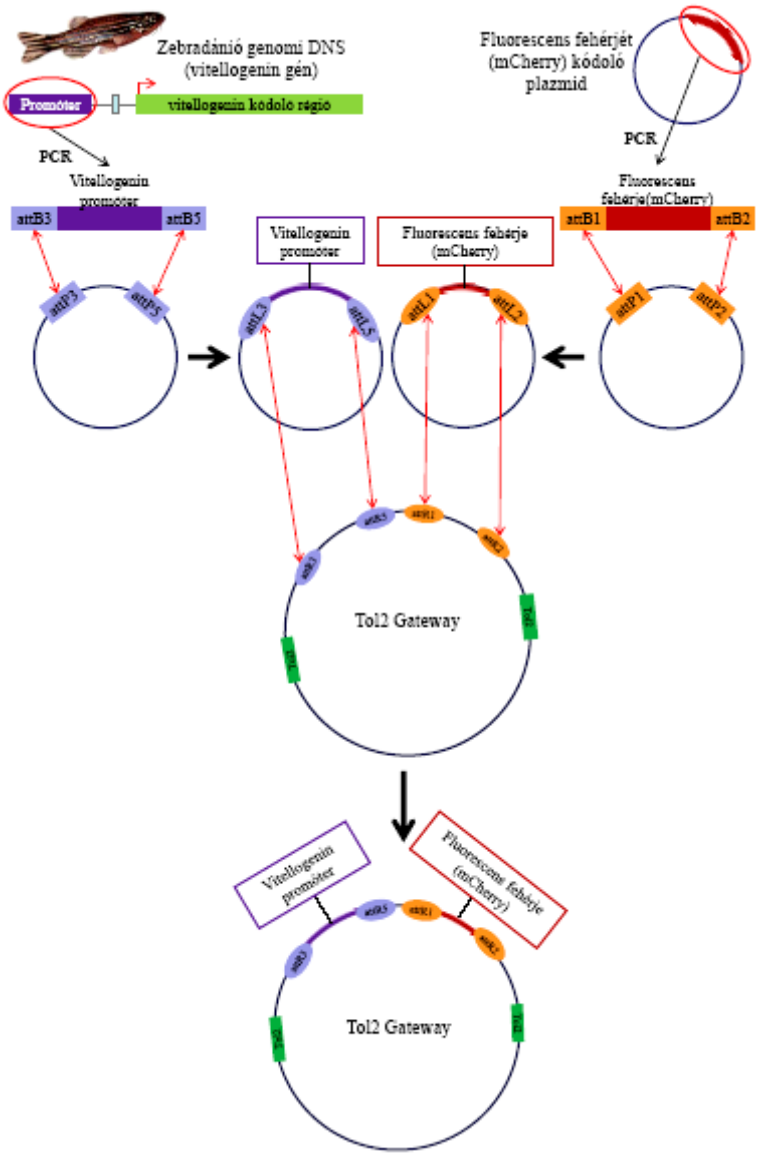
4.5.4.2 A fluoreszcens fehérjét kódoló szakasz felsokszorozása

Az mCherry-t kódoló szakaszt ún. PCR Extender System (5Prime) sokszoroztam fel, alábbi összetétel és hőmérsékleti profil szerint, 20 µl végtérfogatban: 2x (25mM $MgCl_2$ tartalmú) puffer, 0,25 nM dNTP, 0,5 pM F és R primer, 1 µg DNS, 0,3 µl Taq polimeráz; 97 ^oC 2 min; 35x 94 ^oC 20 sec, 60 ^oC 20 sec, 72 ^oC 3 min; 25x 94 ^oC 20 sec, 62 ^oC 20 sec, 72 ^oC 3 min (primerek szekvenciája: 7. táblázat. Ezt követően ugyanezt a protokollt követve a fragment végére építettem a teljes *attB* szekvenciákat. A reakciókat ABI 2720 Thermal Cycler típusú PCR gépben (Applied Biosystems) hajtottam végre. A primerek szekvenciáját a 7. tálázat mutatja.

4.5.4.3 Fragment tisztítás agaróz gélből

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

4.5.4.4 Gateway technika



15. ábra A *vtg1-mCherry* konstrukció létrehozása Gateway klónozó rendszerrel. Első lépésben a PCR-rel felsokszorozott fragmenteket donor plazmidokba építettem amelyből a második rekombinációs lépésben a Tol2 karokat hordozó célvektorba juttattam.

A klónozások során a rekombinációs helyeket is hordozó PCR termékeket helyspecifikus rekombinációval a megfelelő plazmidokba juttattam (*BP* klónozás), majd ezeket a plazmidokat egy *Tol2* karokat tartalmazó plazmiddal rekombináltatva létrehoztam a konstrukciót (*LR* klónozás) (15. ábra). A reakciókat minden esetben proteináz-K enzimmel állítottam le.

4.5.4.4.1 BP klónozás

A *BP* klónozás során a különböző *attB* rekombinációs szekvenciákkal rendelkező PCR termékeket (vitellogenin-1 gén promóter régiója – *attB3*, *attB5*, mCherryt-t kódoló szakasz – *attB1*, *attB2*) helypecifikus rekombináció segítségével két külön donor plazmidba (pDONR221-P1P2 és pDONR221-335) építettem.

A rekombinációt a *BP* klonáz enzim katalizálja. A klónozáshoz 20 fmol plazmidra és 10 fmol PCR termékre volt szükség. A bemérendő fragmentek és plazmidok mennyiségét a DNS-ek méretei alapján az alábbi képlet segítségével számítottam ki (5. melléklet):

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

A donor plazmidok térképét a 2. és 3. melléklet mutatja.
Mindkét reakció esetén az elegyhez 2 µl *BP* klonáz (Invitrogen) enzimet adtam és TE pufferrel (10 mM Tris, pH, 1 mM EDTA) 10 µl-re egészítettem ki. A reakciókat egy éjszakán át 25 ^{o}C-on inkubáltam.

4.5.4.4.2 LR klónozás

Az *LR* klónozás során a *BP* klónozás eredményeként kapott plazmidokból a kívánt szakaszokat a *Tol2* karokat tartalmazó célvektorba (pSP17.2BSSPE-R3-R5-RFA-Venus Tol2LR, 4. melléklet) juttattam, így jött létre a végleges konstrukció. A rekombinációt az *LR* klonáz (1 µl) enzim katalizálta, a rendszer leírásának javaslatával (20 fmol) ellentétben 30 fmol *Tol2* karokat hordozó vektor és 10 fmol, a kívánt fragmenteket hordozó plazmidok között (6. melléklet). A bemérendő mennyiség kiszámítását a *BP* klónozásnál használt, fent leírt képlet segítségével végeztem. A reakció végtérfogatát TE pufferrel 5 µl-re állítottam be, majd a csöveket 25 ^{o}C-on, 16 órán át inkubáltam.

4.5.4.4.3 Transzformálás

Az mCherry fehérjét kódoló plazmidot, valamint a rekombinációs reakciók során létrehozott plazmidokat hősokk transzformációval XL10 GOLD *Escherichia coli* kompetens sejtekbe jutattam. A sejteket antibiotikumot tartalmazó LB táptalajon szaporítottam, 37 ^{o}C-on (8. táblázat). Ezt követően a plazmidokat a DNS-tisztítás fejezetben leírtak szerint tisztítottam ki.

plazmid neve	**antibiotikum rezisztencia**
pCS2 mCherry	Ampicillin
pDONR221-P1P2 - mCherry, pDONR221-P1P2 - vtg1 promóter	Kanamicin
pSP17.2BSSPE-R3-R5-RFA-Venus Tol2LR - vtg1 - mCherry	Kloramfenikol

8. táblázat A felhasznált plazmidokon található antibiotikum rezisztenciája

4.5.4.4.4 Kolónia PCR

A transzformálás után keletkező telepeket kolónia PCR-rel előszűrtem. A donor plazmidokban az *att* szakaszokat M13 primer kötőhelyek határolják (2. és 3. melléklet), ezért a fragmentek beépülése M13 primerek (F: TGTAAAACGACGGCCAGT, R: CAGGAAACAGCTATGAC) segítségével

vizsgálható (0,16 pM M13 F és R primer, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM dNTP, 1 µl Taq polimeráz 25 µl végtérfogatban; 3x 95 ^oC 2 min, 45 ^oC 1 min, 72 ^oC 3 min; 41x 95 ^oC 30 sec, 45 ^oC 30 sec, 72 ^oC 3 min; 72 ^oC 5 min). A reakciók templátjaként a reakciókba fogpiszkáló segítségével bejuttatott baktériumtelep szolgált.

4.5.4.4.5 Restrikciós emésztés

A *BP* és *LR* klónozás után a plazmidok szekvenciáját, azaz a kívánt fragmentek beépülését restrikciós emésztéssel ellenőriztem *RsaI*, *PstI* + *XbaI* valamint *HindIII* + *EcoRV* enzimek felhasználásával. A várt fragmentméreteket a 7. melléklet mutatja. A reakciókat 10 µl végtérfogatban állítottam össze az enzimnek megfelelő puffer vagy 20x Tango puffer (Fermentas) alkalmazásával. A reakciókat 37 ^oC-n, 1 órán át inkubáltam, majd agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem.

4.6 A *vtg1*-mCherry transzgenikus vonal létrehozása

4.6.1 A *vtg1*-mCherry konstrukció linearizálása

A létrehozott konstrukció akkor épül be hatékonyan az embrió genomjába, ha restrikciós enzimmel felnyitjuk, linearizáljuk. A linearizálást *PvuI* enzimmel (Fermentas) végeztem 10 µl végtérfogatban, majd injektálás előtt fragmenttisztító kit (NucleoSpin, Macherey-Nagel) segítségével kitisztítottam.

4.6.2 Transzpozáz mRNS létrehozása

A transzpozáz enzimet kódoló pCS2 plazmidot NotI enzim segítségével az enzimnek megfelelő pufferben, 37 ^oC-on végzett 4 órás inkubálás során lineraizáltam. Az mRNS létrehozásához olyan kitet kellett választani, ami az érett mRNS-re jellemző 5' sapkát is képes *in vitro* létrehozni. Enélkül a létrehozott mRNS nem lenne működőképes az embrióban. Ezért az mRNS-t a linearizált plazmidról mMESSAGE mMACHINE Kit (Ambion) segítségével hoztam létre, SP6 RNS-polimerázzal, a gyártó előírása szerint.

A reakcióban maradt DNS-t TURBO DNáz enzim (Invitrogen) segítségével eltávolítottam. Az mRNS-t NucleoSpin RNS tisztító kittel (Macherey-Nagel) tisztítottam, majd -80 ^oC-on tároltam.

4.6.3 Mikroinjektálás

A konstrukciót (25 ng) transzpozáz mRNS-sel (25 ng) együtt mikroinjektálással juttattam be 1-2 sejtes zebradánió embriók szikébe. Az injektálást 1 mm külső és 0,75 mm belső átmérőjű boroszilikát üvegkapillárisból húzott kapillárissal végeztem (Harvard Apparatus Ltd.). Az injektáló oldat az embriók számára semleges fenol-vörös festéket (0,1 %) (Sigma) is tartalmazott, hogy az injektálás helye és sikeressége láthatóvá váljon.

4.6.4 Tranziens expresszió vizsgálata

Az injektálást követően az embriókat 100 ng/l 17-ß-ösztradiollal kezeltem, és 5 napos korig 27,5 ^oC-os inkubátorban, 10 cm átmérőjű petricsészékben neveltem. Fluoreszcens mikroszkóp alatt,

RFP szűrő használatával vizsgáltam a riportergén tranziens kifejeződést 5 és 10 dpf korban, 500 és 384 embrióban. A riporter jelet mutató embriókról digitális felvételeket készítettem.

4.6.5 A konstrukció öröklődésének vizsgálata

Az injektált embriók egy részét kezelés és válogatás nélkül felneveltem, majd a felnevelt egyedeket vad típusú zebradániókkal kereszteztem. Az utódokat az előzőekben leírtak szerint ösztrogénnel kezeltem és fluoreszcens mikroszkóp alatt (Leica M205 FA), mCherry szűrő alkalmazásával vizsgáltam a riporter kifejeződését. A hatékonyság növelése érdekében P0 nemzedék többségének utódait embriókból tisztított DNS-ből, mCherry specifikus PCR reakcióval vizsgáltam.

4.6.5.1 Primertervezés és mCherry specifikus PCR reakció

A Gateway vektorba épített szakaszok közül az mCherry-t kódoló szakasz nem található meg a konstrukciót nem hordozó utódok genomjában. Azok az utódok tehát, amelyek alkalmasak a vonal további generációinak létrehozásához, egy egyszerű, mCherry szakaszra tervezett PCR reakcióval azonosíthatók. A primerek tervezéséhez a vektorba épített szekvenciát vettem alapul, (9. táblázat).

primer neve	primer szekvenciája
mCherry realtime 2F	5’ GGGCGAGATCAAGCAGAGG 3’
mCherry realtime 2R	5' CACAACGAGGACTACACCATCG 3'

9. táblázat Az örökítés vizsgálata során használt PCR primerek szekvenciája

A PCR reakciókat az alábbi összetétel és hőmérsékleti profil alkalmazásával hajtottam végre: 100 ng DNS, 10x TaqMan puffer, 0,4752 pM F és R primer, 2,5 mM dNTP, 2 mM $MgCl_2$, 1 µl Taq polimeráz; 95 ^{o}C 1 min; 35x 95 ^{o}C 15 sec, 56 ^{o}C 20 sec, 72 ^{o}C 1 min; 72 ^{o}C 3 min.

Pozitív kontrollként a pCS2 mCherry plazmidból 1 plazmidot tartalmazó, azaz a fluoreszcens fehérje gént 1 kópiában hordozó hígítást, negatív kontrollként pedig vad típusú (nem injektált) zebradánióból származó DNS-t használtam.

4.6.5.2 A transzgenikus vonal további generációinak létrehozása

A PCR reakció alapján pozitívnak talált alapítók utódait felnevelve a *vtg1*-mCherry vonal F1 generációjához jutottam. A *Tol2* plazmidok zebradánióban a mozaikosság miatt általában több, sejtenként eltérő helyre (max. 7-15) épülnek be a genomba. Az F1 egyedek már általában csak 1-1 integrációs helyet hordoznak, amelyek különbözőek lehetnek, ezért az egyedeket külön kell kezelni. Az F1 egyedeket újból vad típusú egyedekkel keresztezve létrehoztam a vonal F2 generációját. Az F2 egyedeket ismét vad típusú zebradániókkal kereszteztem. Az F4 nemzedéket az így nyert F3 generáció „hordozó” egyedeinek egymás közti keresztezésével vagy az F3 és F2 egyedek egymás közti keresztezésével hoztam létre, az ösztrogén indukciót követő mikroszkópos vizsgálatok eredményei alapján. Minden generáció létrehozásakor elvégeztem a fent leírt mikroszkópos vizsgálatot és az F4 létrehozásakor a PCR reakciót.

4.7 Az mCherry indukció kezdetének vizsgálata

Az mCherry jel indukciójának kezdetét 0 dpf korban kezdett, 200 ng/l EE2 kezelést követően vizsgáltam 500 embrióban, naponta, fluoreszcens mikroszkóp alatt különböző nagyításokban.

4.8 A *vtg1:mCherry* vonal indukálhatóságának vizsgálata ösztrogén hatású anyagokkal

Az F1 és F2 generációk embrióit csak 100 ng/l 17-α-etinil-ösztradiollal (EE2) kezeltem (30-70 embrió/kezelés), az öröklődés ellenőrzése érdekében. Az F3 és F4 generáció embrióiban már több ösztrogén hatású anyag különböző koncentrációinak hatását vizsgáltam, az ösztrogénérzékenység és a koncentrációfüggés valamint a vonal érzékenységének felderítése érdekében. Koncentrációnként minden vizsgálatban 50-100 embriót vizsgáltam, a vizsgálatot háromszor ismételtem.

4.8.1 Felhasznált anyagok

Az embriók kezelését 17-ß-ösztradiol (E2), 17-α-etinil-ösztradiol (EE2), zearalenon (ZEA), biszfenol-A (BPA), nonilfenol (NP) és atrazin (ATR) (Sigma-Aldrich) oldatokkal végeztem. Az anyagokból törzsoldatot készítettem, amelyeket felhasználásig -20 vagy -80°C-on tároltam. A törzsoldatokból a zebradániós haltartó rendszer vizét használva készítettem el a hígításokat, minden kezelés előtt (10. táblázat). A nonilfenol műanyagokból is kioldódhat, ezért a törzsoldatot üvegedényben készítettem el.

Vegyszer neve (gyártó cég)	Rövidítése	Törzsoldat koncentrációja	Oldószer (gyártó cég)
17-ß-ösztradiol (Sigma-Aldrich)	E2	10 g/l	etil-alkohol (Reanal)
17-α-etinil-ösztradiol (Sigma-Aldrich)	EE2	0,1 g/l	etil-alkohol (Reanal)
zearalenon (Sigma-Aldrich)	ZEA	50 g/l	etil-alkohol (Reanal)
biszfenol-A (Sigma-Aldrich)	BPA	1 g/l	etil-alkohol (Reanal)
nonilfenol (Sigma-Aldrich)	NP	2 g/l	etil-alkohol (Reanal)
atrazin (Sigma-Aldrich)	ATR	5 g/l	DMSO

10. táblázat Az embriók kezelése során felhasznált ösztrogén hatású anyagok törzsoldat koncentrációi és az alkalmazott oldószerek

4.8.2 Az embriók kezelése

Az F3 és F4 embriókat a korábbi tapasztalatok alapján 3dpf-5dpf korig kezeltem különböző koncentrációjú ösztrogénhatású anyagokkal (11. táblázat). Az F3 generációban csak E2, EE2 és ZEA 50 és 100 ng/l, 25, 50 és 100 ng/l valamint 50, 100 és 250 µg/l koncentrációit vizsgáltam. A kezeléseket 10 vagy 5 cm átmérőjű petricsészékben, a NP esetében üveg petricsészében végeztem és az embriókat a mikroszkópos vizsgálatokig 27,5 °C-os inkubátorban neveltem. Az anyagok

mellett minden esetben a törzsoldathoz használt oldószerek hatását is vizsgáltam. Az oldószeres kontrollt a legtöményebb kezelőoldat oldószer tartalmának megfelelő töménységben készítettem el.

Vegyszer neve	Rövidítése	Kezelőoldatok koncentrációja
17-ß-ösztradiol	E2	200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 0,1 µg/l
17-α-etinil-ösztradiol	EE2	200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 ng/l
zearalenon	ZEA	500; 250; 100; 50; 10; 5; 1; 0,1 µg/l
biszfenol-A	BPA	20; 10; 8; 6; 5; 2,5; 1; 0,1; 0,01 mg/l
nonilfenol	NP	300, 150, 75 µg/l
atrazin	ATR	10000; 1000; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 µg/l

11. táblázat Az embriók kezelése során használt ösztrogén hatású anyagok koncentrációja

4.8.3 Mikroszkópos vizsgálatok

Ahhoz, hogy a kifejeződő riporter jele értékelhető legyen, az embriókat ugyanolyan nézetben kell vizsgálni. Ezért a mikroszkópos vizsgálatok előtt az embriókat 0,02%-os MS-222 (Tricaine-metán-szulfonát) oldatban elaltattam, majd 0,5%-os metilcellulózban a megfelelő helyzetbe állítottam. Fluoreszcens mikroszkóp alatt (Leica M205 FA) minden kezelt kishalról fénymikroszkópos és fluoreszcens felvételt (exponálási idő: 1 s) is készítettem, 30x-os nagyításban (Leica DFC 425C kamera, LAS V3.8 szoftver).

4.8.4 Fluoreszcens felvételek kiértékelése

A felvételeket a szabadon hozzáférhető ImageJ szoftverrel, saját fejlesztésű macro-val értékeltem ki. A képeket az RGB (Red, Green, Blue) színskála szerint szétbontottam és csak a vörös tartományba eső jellel dolgoztam tovább. Minden felvételen azonos nagyságú, ellipszis alakú területet jelöltem ki, hogy az esetleges fals jelek ne zavarják a kiértékelést. Az ellipszist a fénymikroszkópos felvétel alapján azonosított máj területére húztam, majd a szoftverrel meghatároztam a jel erősségét és az érintett terület nagyságát. A két értékből integrált értéket képeztem (Integrated density) és az indukciót ez alapján értékeltem. A májban jelet mutató embriók száma is koncentrációfüggőnek mutatkozott, ezért a kiértékelést a „világító embriók” százalékos megoszlására is elvégeztem.

4.9 Az mCherry indukció vizsgálata kifejlett hímekben

Az F1 generáció felnőtt (3 hónapos) hím egyedeit 5, 10, 50 és 100 ng/l E2-vel kezeltem. A kezeléseket koncentrációnként két párhuzamos, 3 l-es, 15-15 egyedet tartalmazó medencékben végeztem. Fluoreszcens mikroszkóp alatt (Leica M205 FA) naponta vizsgáltam a fluoreszcens jel megjelenését. A vizsgálatok előtt az egyedeket 0,02% MS-222 (Tricaine-metán-szulfonát) oldatban elaltattam.

4.10 Vitellogenin „*whole mount*" *in situ* hibridizáció

Munkám során az endogén vitellogenin gén kifejeződését is vizsgáltam, vad típusú és transzgenikus embriókban is. A vad típusú embriókat 0-5 dpf korig 300 ng/l, a transzgenikus embriókat 3 dpf-5 dpf korig 200 ng/l EE2-vel kezeltem. A kísérletek során 50 vad típusú és 20 transzgenikus embriót használtam fel.

4.10.1 Az *in situ* hibridizációhoz használt próba előállítása

4.10.1.1 Primertervezés

A vitellogenin *in situ* hibridizációs próba tervezésekor két fő szempontot vettem figyelembe: a próba specifikus legyen és képes legyen bejutni az 5 napos zebradánió embrióba. Az első kritérium alapján minél hosszabb, a második kritérium alapján minél rövidebb próba lenne az ideális, ezért egy 545 bázispár hosszúságú szakaszra terveztem primereket (12. táblázat). A *vtg1* génről két alternatív, fehérjét is kódoló mRNS jön létre zebradánióban, az egyik 10, a másikat 28 exonból áll. A tervezett próba mindkét transzkriptumot képes kimutatni.

primer neve	primer szekvenciája
vtg1 pr 6F	5' GTACTTGGCACACCATAGCG 3'
vtg1 pr 6R	5' TCAAGGACCTCTGAGATGGC 3'

12. táblázat A vitellogenin *in situ* hibridizációs próba létrehozásához tervezett primerek szekvenciája

4.10.1.2 PCR termék előállítása

Az *in situ* hibridizációhoz szükséges próba a lárvában kifejeződő *vtg* mRNS-t kell, hogy kimutassa. A próba előállításához ezért elsőként az ösztrogénnel kezelt lárvákból Trizol (Invitrogen) felhasználásával RNS-t izoláltam, majd a genomi DNS-t DNáz kezeléssel (Fermentas) eltávolítottam. Ezt követően random nonamer primerről indulva, Omniscript RT kit (Qiagen) segítségével, reverz transzkripcióval az összes *mRNS*-t cDNS-sé írtam át, a gyártó előírása szerint.
A cDNS-ről a fent leírt primerek segítségével az alábbi reakcióösszetétel és hőmérsékleti profil alkalmazása mellett létrehoztam a megfelelő fragmentet: 100 ng cDNS, 10x $MgCl_2$-tartalmú Finnzym puffer, 0,198 pM F és R primer, 0,5 mM dNTP, 0,12 µl Taq polimeráz; 95 ^oC 1 min; 40x 95 ^oC 15 sec, 56 ^oC 40 sec, 72 ^oC 4 min; 72 ^oC 3 min. A PCR termékeket agaróz gélben ellenőriztem és a fent leírt módon kitisztítottam a gélből.

4.10.1.2.1 Klónozás és a próba előállítása

A kitisztított PCR terméket ligálás segítségével (Dual Promoter TA cloning Kit, Invitrogen) segítségével pCRII plazmidba (8. melléklet) építettem, a gyártó előírása szerint. A plazmidokat hősokk transzformációval TOP10 *E. coli* kompetens sejtekbe juttattam, ahol felszaporítottam, majd a telepeket kolónia PCR reakció segítségével szűrtem. A kolónia PCR reakcióban a próbához tervezett primereket, valamint templátként fogpiszkáló segítségével a reakcióba mosott telepeket használtam (10x $MgCl_2$-tartalmú Finnzym puffer, 0,4 pM F és R primer, 0,5 mM dNTP, 0,12 µl Taq polimeráz; 95 ^oC 5 min; 35x 95 ^oC 15 sec, 56 ^oC 90 sec, 72 ^oC 30 sec; 72 ^oC 3 min).

A megfelelő plazmidot hordozó telepekből GeneJet Plasmid MiniPrep kit segítségével plazmidot tisztítottam, majd a fragmentek plazmidokba épülését és annak irányát *Hind III* enzimmel végzett restrikciós emésztéssel vizsgáltam. Forvard irányú beépülés esetén 207 bp + 4306 bp, reverz irányú beépülés esetén 449 bp + 4034 bp méretű fragmentek keletkeznek.

A plazmid *NotI* enzimmel végzett linearizálása után 500 ng linearizált plazmidról indulva, *T7* RNS polimeráz enzimmel, *in vitro* transzkripcióval (DIG RNA Labeling Kit SP6/T7, Roche) DIG jelölt antiszensz RNS próbát hoztam létre. A reakciót követően a plazmid DNS-t DNáz enzimmel eltávolítottam, majd a próbát RNS tisztító kit (Qiagen) kitisztítottam. A próba tisztaságát agaróz gélben, koncentrációját NanoDrop (NanoDrop Technologies, Inc) fotométerrel vizsgáltam. A jelölt próbát felhasználásig -80 ^{o}C-on tároltam.

4.10.2 A *„whole mount" in situ* hibridizáció menete

Az *in situ* hibridizáció során Thisse és Thisse (2008) zebradánió embriókra kidolgozott protokollját követtem. A vad típusú embriókat a hibridizáció előtt 3% hidrogén-peroxid (H_2O_2) és 0,5 % kálium-hidroxid (KOH) elegyében depigmentáltam. A transzgenikus embriókat depigmentálás nélkül vizsgáltam. Az embriók átjárhatóságát proteináz-K enzimmel (10 µg/ml) növeltem (permeabilizálás), a kezelést a depigmentált embriók esetében 15, a transzgenikus embriók esetében 30 percig végeztem. A hibridizációhoz 50 ng, digoxigeninnel (DIG) jelölt RNS próbát használtam. A próba kötődését BCIP (5-bromo-4-kloro-3-indolil foszfát) és NBT (nitro-kék tetrazólium-klorid) elegyével tettem láthatóvá a protokoll előírása szerint. A depigmentált embriók festéséhez 3, a pigmentált embriókéhoz 5 és fél órára volt szükség.

4.11 Zearalenon egyedfejlődésre és vtg indukcióra gyakorolt hatásának vizsgálata

Az ösztrogénhatású anyagok közül munkám során a zearalenon hatását kifejlett zebradánió hímeken és embriókon is vizsgáltam.

4.11.1 Kifejlett hímek kezelése

Vad típusú zebradánió hímeket 1000, 10, 0.1 µg/l ZEA oldattal kezeltem. A kezeléseket 3 literes medencékben végeztem, koncentrációnként 2 párhuzamos medencében 7-7 ivarérett zebradánió hímen. Pozitív kontrollként 0.1 µg/l E2-t, negatív kontrollként rendszervizet használtam. A szemi-sztatikus kísérleti rendszerben 4 naponta került sor oldatcserére. A koncentráció visszaméréséhez minden medence vizéből mintát vettem (500 ml), amelyet az analitikai vizsgálatok elvégzéséig fagyasztva (-20 ^{o}C) tároltam. A kísérletet 27.5°C-on, az oxigénellátás biztosítása érdekében folyamatos levegőztetés (10 ml/perc) mellett végeztem. A 14 órás megvilágítást és 10 óra sötét periódust fényprogram biztosította. A halak táplálása naponta egyszer, kifejezetten zebradániók számára kifejlesztett táppal (SDS) történt.

A zearalenon koncentrációk visszamérése immunaffinitásos dúsítást követően HPLC módszerrel történt (Food Analitika Kft, Békéscsaba).

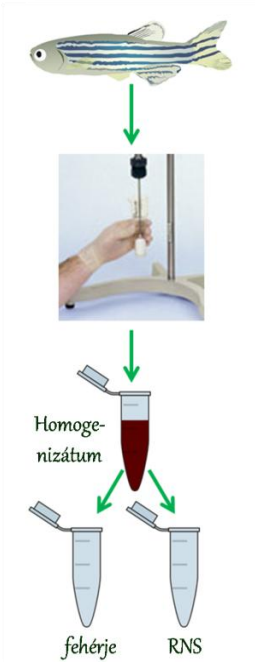
4.11.2 FET teszt

A FET teszt (Fish Embryo Toxicity Test) egy OECD által javasolt teszttípus az anyagok általános toxicitásának felderítésében (2.10 fejezet).

A zebradánió embriókat 1 hpf korban egyenként 24 lyukú plate mélyedéseibe helyeztem. A plate-ek 5000, 4000, 3000, 2000, 1750, 1500, 1250, 1000, 750, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5, 1 és 0,1 µg/l, valamint 1 ng/l ZEA oldatokat tartalmaztak. Pozitív kontrollként 100 ng/l E2-t, negatív kontrollként a zebradániós haltartó rendszer vizét használtam. Koncentrációnként 4x12 embriót vizsgáltam. A plate-eket 27,5 ^{o}C-on inkubáltam, és mikroszkóp alatt naponta vizsgáltam az elhullást és a kialakuló fejlődési rendellenességeket. Az előírással ellentétben a tesztet az embriók 120 órás koráig folytattam, hogy több információt nyerjek és mintákat biztosítsak a további vizsgálatokhoz. Az embriókról naponta, oldalnézetben, 30x-os nagyításban digitális felvétel is készült (Leica M205 FA, Leica DFC 425C kamera, LAS V3.8 szoftver).

4.11.3 Mintaelőkészítés

A vitellogenin indukció vizsgálatához a hímekből PBS pufferben teljes test homogenizátumot készítettem, az ELISA kit (Biosense) előírásai szerint. A homogenizátumot ezt követően két részre osztottam, az egyik részből fehérje szinten (ELISA) a másik részből *mRNS* szinten (real-time PCR mutattam ki a vitellogenin géntermékét, így a két módszerrel vizsgált minták valódi párhuzamosoknak tekinthetők (16. ábra). A mintákat a vizsgálatok megkezdéséig -80 ^{o}C-on tároltam.



16. ábra A zearalenonnal kezelt hímekből származó minták előkészítése a vitellogenin géntermék fehérje vagy mRNS szintű vizsgálatához.

A FET teszt lezárása után a párhuzamos plate-ekből 10-10 még élő, 120 órás embrióból álló mintát vettem (pool), amelyekből teljes RNS-t tisztítottam. Az 1000 µg/l zearalenonnal kezelt csoportból

csak két pool-t sikerült nyerni, a magas pusztulási arány miatt. Az ennél magasabb koncentrációkat a vitellogenin vizsgálatokba nem vontam be.

4.11.4 Vitellogenin ELISA

A zebradánióra kidolgozott vitellogenin ELISA kit (Biosense) csak felnőtt halakból származó minták vizsgálatára alkalmas, az embriók rendkívül kis mérete miatt. A vizsgálatokat ezért csak a hímekből származó homogenizátummal végeztem el a gyártó előírásait követve. A kiértékeléshez zebradánió vitellogenin fehérjéből készített hígítási sor szolgált sztenderdként. A VTG ellenanyag kötődése következtében kialakuló jelet Gene5 microplate leolvasóval (BioTek) mértem, 492nm-en. A minták vitellogenin fehérje koncentrációját a nem specifikus kötődés korrekcióját és az adatok logaritmikus transzformációját követően regressziós analízissel történt, a kit leírása alapján.

4.11.5 RNS tisztítás és reverz transzkripció

A hímekből származó homogenizátumok feléből valamint az embrió pool-okból Trizol reagenssel teljes RNS-t tisztítottam a gyártó előírásai szerint. Az RNS-t jéghideg izopropanolban csaptam ki, majd 75%-os etanollal mostam, végül RNáz mentes vízben vettem fel. Az RNS koncentrációját és tisztaságát nanofotométer (Implen) segítségével vizsgáltam, az integritást pedig 1,5%-os agaróz gélben ellenőriztem. A genomi DNS szennyeződést DNáz (Fermentas) kezeléssel távolítottam el, a reakciót a DNáz puffer $MgCl_2$ tartalmával egyenértékű EDTA oldattal állítottam le. Mintánként 500 ng RNS-ből random nonamerrel végzett reverz transzkripcióval (High Capacity Reverse Transcription kit, Applied Biosystems) cDNS-t hoztam létre.

4.11.6 Vitellogenin qRT PCR

A vitellogenin megjelenését a transzkripció szintjén kvantitatív, duplex valós idejű PCR-rel vizsgáltam. Belső kontrollgénként a ß-aktin gént használtam, más szerzők munkái alapján (Muncke és Eggen 2006; Muncke et al., 2007; Liedtke et al., 2008; Jin et al., 2008). A vitellogeninre és a háztartási génre tervezett specifikus primerek és eltérő fluoreszcens festékkel jelölt TaqMan próbák lehetővé tették a két géntermék egyidejű, egy csőben történő vizsgálatát. A primereket és próbákat a szabadon hozzáférhető Primer3 szoftver (http://simgene.com/Primer3) segítségével terveztem (13. táblázat).

primer/próba neve	gén	bázissorend	jelölés
vtg1_cDNS_1DKR	vitellogenin	5' TGCCAAAAAGCTGGGTAAAC 3'	-
vtg1_cDNS_2DKF	vitellogenin	5' GACATTGTGATCTCTGGAATC 3'	-
ZF_VITE_P2	vitellogenin	5' ACAGCGAGAAAGAGATTGAACTGAC 3'	FAM
ZF_baktin_F	ß-actin	5' AGGAGATCACCTCTCTTG 3'	-
ZF_baktin_R	ß-actin	5' CCAGACGGAGTATTACG 3'	-
ZF_baktin_P	ß-actin	5' TGAAGATCAAGATCATTGCTCC 3'	HEX

13. táblázat A vitellogenin mRNS szintű vizsgálata során használt primerek és próbák bázissorrendje és jelölése

Minden mintából 3 hígítást (1x, 4x, 16x) készítettem RNáz és Dnáz mentes vízben, majd minden hígításból 3 párhuzamos reakciót állítottam össze. A reakciókat 20 µl végtérfogatban végeztem: 10x PCR puffer (Fermentas) 0,132 pM F és R vtg1 primer, 0,198 pM vtg1 próba, 0,33 pM F és R ß-aktin primer, 0,462 pM ß-aktin próba, 0,8 mM dNTP, 2 mM $MgCl_2$, 1x ROX, 0,2 U Taq polimeráz (Fermentas).

A PCR vizsgálatokat StepOne Plus real-time PCR készülékben hajtottam végre (Applied Biosystems): 95°C 10 min.; 40x 95°C 10 sec, 54°C 30 sec, 75°C 1 min. A készülék az adatokat az anellációs lépésben gyűjtötte. A Ct értékek meghatározását követően az eredmények kiértékelését Pfaffl (Pfaffl et al. 2001; 2002) reakció hatékonysággal (PCR efficiencia) korrigált módszerével (REST - Relative Expression Software Tool) végeztem.

4.12 Dózis-hatás görbék felvétele, statisztikai módszerek

A különböző zearalenon koncentrációk hatására kialakult fejlődési rendellenességek relatív gyakoriságát minden esetben ANOVA (one-way analysis of variance) módszerrel összevetettem a kontrollal. Mivel a csoportok közötti variancia különbözőnek adódott, az egyes kezelési csoportokat Dunnett-féle T3 post hoc teszttel vetettem össze. Ezek alapján minden napra meghatároztam az elváltozást még nem okozó (NOEC – No Observed Effect Concentration) koncentrációt és a hatás kiváltásához szükséges legalacsonyabb koncentrációt (LOEC – Lowest Observed Effect Concentration). A dózis-letalitás görbéket valamint az LC_{50} és LC_{10} értékeket Probit analízis (Minitab 16.1.1) segítségével határoztam meg. A dózis-hatás görbéket és az EC_{50} értékek kiszámítását a vitellogenin kifejeződésének vizsgálata során és a fluoreszcens jel kiértékelése során is Graphpad Prism 4.0. szoftverrel végeztem. A kilógó értékeket ROUT módszerrel zártam ki és a dózis-hatás vizsgálatokat az adatok logaritmikus transzformálását és %-os normalizálását követően végeztem el, a szigmoidális görbéket nem lineáris, regressziós illesztéssel generáltam. A görbéket minden esetben Graphpad Prism 4.0. szoftverrel hoztam létre. Az EC_{10} EC_{90} értékeket a GraphPad ajánlása alapján az alábbi képlettel számítottam ki: $EC_F = (F/100-F)^{1/H} \times EC_{50}$, ahol F az effektív koncentráció %, H pedig a dózis-hatás görbe meredeksége.

Az ELISA és real-time PCR eredmények, valamint a kifejlett és lárvákon mért indukciók összevetéséhez Pearson korrelációt használtam az adatok %-os normalizálását követően. A variancia homogenitást Levene teszttel vizsgáltam, az adatok normalizálása előtt.

5 Eredmények

5.1 Ösztrogénhatásra érzékeny biomarker zebradánió vonal létrehozása

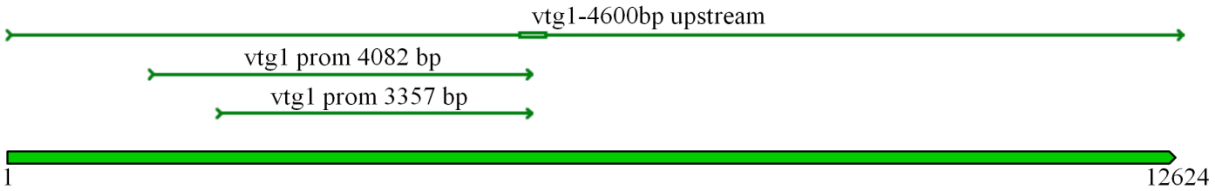
Zebradánióban több olyan ösztrogénhatásra indukálódó gén ismert, amely alkalmas lehet bioszenzor zebradánió vonalak létrehozására. A legismertebbek az ösztrogén receptor, az aromatáz és a vitellogenin. A kísérletek kezdetekor még csak az ösztrogén receptor aktiválódását kimutató riporter vonalak voltak ismertek. Ezekkel a vonalakkal szemben egy vitellogenin transzgenikus vonal nagy előnye lehet, hogy a gén kifejeződése szövetspecifikus, kizárólag a májra korlátozódik és embriókban, lárvákban, fiatal egyedekben valamint ivarérett hímekben igen alacsony, gyakorlatilag alig kimutatható alap expresszióval rendelkezik. A máj az egyik fő toxikológiai célszerv, ezért a vonal amellett, hogy bioszenzor vonalként működhet, alkalmas lehet a szennyezőanyagok májra kifejtett káros hatásainak kimutatására is *in vivo*, az állatok feláldozása nélkül. Mivel az ivarérett nőstényekben normál körülmények között az endogén ösztrogén hatására is működésbe lép a fluoreszcens jel, a nőivarú egyedeken olyan anyagok májkárosító hatásai is jól felmérhetőek, amelyek ösztrogénhatással nem rendelkeznek.

5.1.1 A vitellogenin-1 promóter elemzése

A vonal létrehozásához elsőként meg kellett határozni azokat a szekvenciákat, amelyekkel egy várhatóan megfelelő érzékenységű transzgén konstrukció kialakítható: egy a vitellogenin promóter régiót is feltételezhetően magába foglaló szakaszt, amely jól indukálhatóan képes irányítani a mögé építendő fluoreszcens fehérje kifejeződését, és egy zebradánióban jól működő, stabil, erős jelet adó fluoreszcens fehérjét kódoló régiót.

A zebradánióban 8 *vtg* gén található (Wang et al., 2005; Ziv et al., 2008), amelyek közül a legerősebben a *vtg-1* fejeződik ki. Ezért a transzgenikus vonal létrehozásához a *vtg-1* gén promóter régióját és egy vörös fluoreszcens fehérjét, az mCherry-t választottam.

A *vtg-1* kódoló régióján és az azt megelőző 4600 bp szakaszon sikeresen azonosítottam a feltételezett transzkripciós start helyet (17. ábra).



17. ábra A *vitellogenin-1* gén kódoló szakasza az azt megelőző, promóter régiót is magában foglaló 4600 bp-os szakasszal (vtg1-4600 bp upstream) és a konstrukció létrehozásához felsokszorozott 4082 és 3357 bp hosszúságú promóter szakaszok (vtg1 prom 4082 bp és vtg1 prom 3357 bp). A zöld téglalap a feltételezett transzkripciós start helyet jelöli.

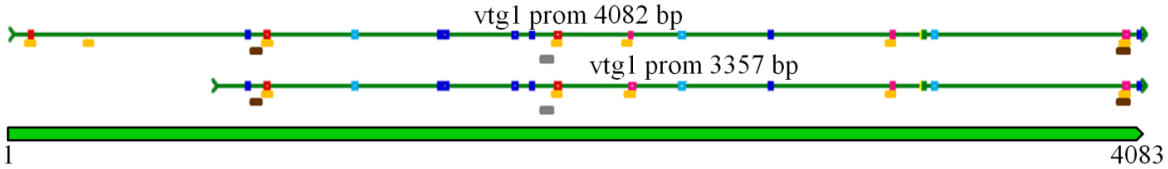
Ezt követően megterveztem a régió felsokszorozására alkalmas PCR reakciót. Az első primer párt a start hely 64 bp-nyi szakaszát magába foglaló 4082 bp hosszúságú szakaszra terveztem (vtg 1-attB3 F1, vtg 1- attB5 R) azonban a fragment hosszúsága miatt azt nem sikerült rekombinációs klónozással a Gateway rendszer plazmidjába klónozni. A primer pár *forvard* tagját ezért újra

terveztem (vtg 1-attB3 F2), amellyel egy rövidebb, 3357 bp hosszúságú promóter szakaszt sokszoroztam fel. Mindkét fragment feltételezhetően magában foglalja a teljes promóter régiót és a gént megelőző *upstream* szabályozó régiók nagy részét.

A konstrukció ösztrogén érzékenységének alapfeltétele, hogy a felhasznált promóter régió minél több, a vitellogenin gén működését szabályozó ösztrogén receptor kötőhelyet tartalmazzon. A felsokszorozandó szakaszon ezért több szabadon elérhető program segítségével és manuális módszerrel is vizsgáltam a feltételezett transzkripciós faktor kötőhelyeket, különös tekintettel az ERE szekvenciákra (14. táblázat). Az eredmények összevetése alapján látható, hogy jelenleg nincs megbízható, egyértelmű eredményt adó szoftver a lehetséges ERE szakaszok kimutatására. Ráadásul a szoftverekkel azonosított szakaszok még koránt sem biztos, hogy biológiailag is aktívak. A genomban random, bármelyik szakaszon is találhatnak hasonló szekvenciát, amelyek nem befolyásolják egyetlen ösztrogén érzékeny gén kifejeződését sem.

Az egyetlen, kifejezetten ERE szekvenciák azonosítására szolgáló alkalmazás a 2003-ban kifejlesztett Dragon ERE Finder (Bajic et al., 2003), amelynek azóta számos új, online elérhető verzióját hozták létre. A szoftver összesen egy ösztrogén válasz elemet azonosított a promóter szakaszokon, amely az „új motívum” nevet viseli és mindkét fragment hordozta.

A többi, szabadon hozzáférhető alkalmazás több transzkripciós faktor kötőhely azonosítására is lehetőséget ad, a transzkripciós faktorokat tartalmazó TRANSFAC (Matys et al., 2006) adatbázisban elérhető szekvenciák alapján. Ezért ezek a programok más feltételezett, ösztrogén érzékeny kötőhelyet is kimutatnak. Az ALGEN PROMO (Messeguer, 2002) alkalmazás a hosszabb promóter szakaszon 15, a rövidebben 10 olyan motívumot talált, amelyek szerepet játszhatnak az ösztrogénválaszban. A MATINSPECTOR program segítségével egy ösztrogén receptor kötőhelyet és 4, fordított ismétlődéseket is tartalmazó ERE szakaszt térképezett fel a fragmenteken. Az irodalomban fellelhető adatok alapján manuális szekvenciaazonosítással is elemeztem a régiókat. A konszenzus ERE szekvencia két fő szakaszból áll, amelyek néhány bázist fognak közre: GGTCAnnnTGACC. Ez jelent egy teljes ERE szakaszt, amely azonban a *vtg1* promóteren nem azonosítható. Sok esetben a motívum fele (ún. fél ERE) vagy annak 1-1 bázisban eltérő szakasza is elegendő az ösztrogénválasz kiváltásához (Driscoll et al., 1998). Ezeket a szakaszokat keresve a hosszabb szakaszon 11, a rövidebb szakaszon 10 fél kötőhelyet találtam (9. melléklet, 18. ábra).



18. ábra A konstrukció építése során használt *vtg1* promóter szakaszokon azonosított, az ösztrogén válaszban feltételezhetően szerepet játszó szekvenciák (piros, kék, világoskék, zöld, sárga, rózsaszín: manuálisan azonosított ½ ERE elemek, narancs: ALGEN PROMO, barna: MATINSPECTOR, szürke: DRAGON ERE FINDER programokkal azonosított ERE szekvenciák)

A különböző módszerekkel azonosított szakaszok átfednek (18. ábra), így a hosszabb promóter szakaszon 19, a rövidebben 17 ösztrogénválasz elemet hordozó régió található. A rövidebb

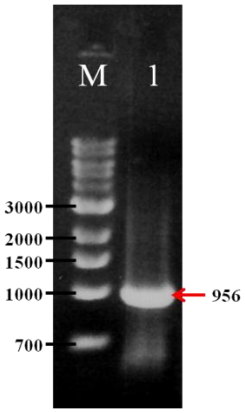
promóter szakasz is hordozza az azonosított elemek nagy részét, ezért feltételeztem, hogy a konstrukció ezzel a régióval is működőképes lesz.

5.1.2 *Vitellogenin*-mCherry génkonstrukció létrehozása Gateway technikával

5.1.2.1 BP klónozás

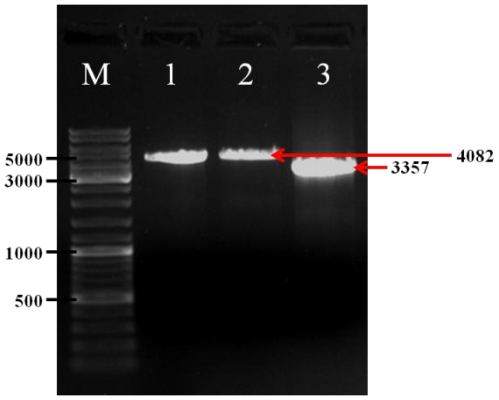
A konstrukció létrehozásához szükséges szakaszok *in silico* azonosítása és elemzése után a fragmenteket PCR reakció segítségével sokszoroztam fel úgy, hogy a PCR termékek 5' végei hordozták a Gateway rendszer *donor* plazmidjaiba történő, megfelelő beépüléshez (hely és irány) szükséges *attB* szekvenciákat.

A fluoreszcens fehérjét kódoló régiót a hordozó, *pCS2* mCherry plazmidról hoztam létre, *attB3* és *attB5* szakaszokkal láttam el (19. ábra).



19. ábra A PCR reakcióval felsokszorozott, *attB* szakaszokat hordozó mCherry fragment gélelektroforetikus képe (M: molekulasúly marker, 1: PCR termék)

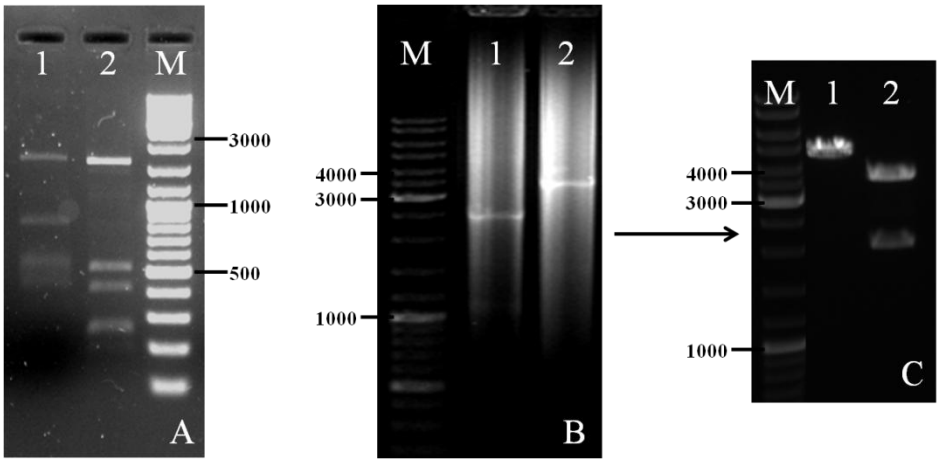
A vtg1 promóter régiót zebradánió genomi DNS-ből sokszoroztam fel, *attB1* és *attB2* rekombinációs helyeket építettem a végeire (20. ábra).



20. ábra A vtg1 promóter régió PCR-rel felsokszorozott, rekombinációs szekvenciákat hordozó szakaszai, agaróz gélelektroforézist követően. (M: molekulasúly marker, 1, 2: 4082 bp-os szakasz, 3357 bp-os szakasz)

A Gateway klónozás első lépése a fragmentek bejuttatása BP klónozással az ún. *donor* plazmidokba, a PCR termékek végein található *attB* és a plazmidokon található *attL* szakaszok közötti helyspecifikus rekombinációval. A fragmenteket ezért agaróz gélelektroforézist követően kitisztítottam, majd BP klonáz enzim segítségével két külön plazmidba (*donor* vektorba) építettem őket. A reakcióval ún. entry klónokat hoztam létre, amelyek a *donor* vektorok *attP* és a fragmentek

attB szakaszából származó *attL* helyeket hordozták. A sikeres beépülést restrikciós emésztéssel ellenőriztem (21. ábra), amit a promóter szakasz esetében az emésztést megelőző kolónia PCR-es előszűréssel egészítettem ki (21. ábra).



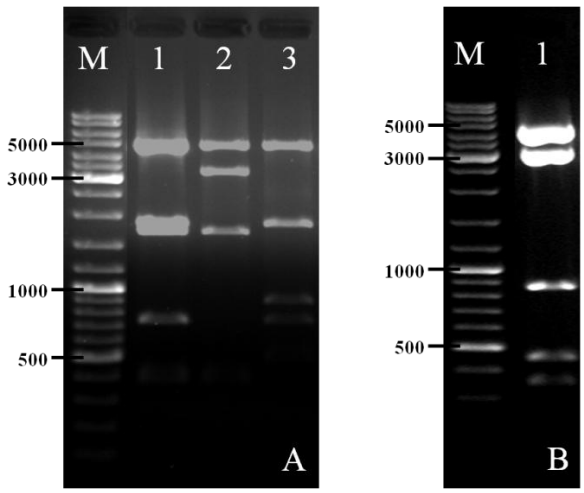
21. ábra Fragmentek vektorba épülésének ellenőrzése BP klónozás után. A: mCherry-t kódoló szakaszt hordozó entry klón emésztése *RsaI* enzimmel, B: promótert hordozó telepek ellenőrzése kolónia PCR reakcióval, C: promótert hordozó plazmidok ellenőrzése *HindIII* és EcoRV emésztéssel (M: molekulasúly marker, 1: negatív telep/plazmid, 2: a kívánt fragmentet hordozó pozitív telep/plazmid). Az emésztések a várt méretű fragmenteket eredményezték. A méreteket az 7. melléklet mutatja.

Tapasztalataim alapján a Gateway rendszer szelekciós hatékonysága ilyen méretű fragmentek esetén meglehetősen alacsony. A hosszabb promóter szakaszt nem sikerült a vektorba építeni, míg a rövidebb szakaszt a baktérium telepek kb. 4%-a hordozta.

5.1.2.2 LR klónozás

BP klónozás során létrehoztam a *vtg1* promótert és az mCherry fluoreszcens fehérjét kódoló szakaszt hordozó *entry* klónokat. A Gateway klónozás következő lépése a fragmentek „áthelyezése" *entry* vektorokból a célvektorba, a vektorokon található *attL* és *attR* szakaszok közötti helyspecifikus rekombinációval (*LR* klónozás). A célvektor az L végeknek megfelelő R szakaszokat és a *Tol2* transzpozon működéséhez szükséges *Tol2* karokat hordozta.

Az *LR* klónozási lépést követően a szakaszok beépülését ismét restrikciós emésztéssel ellenőriztem (22. ábra). A reakció eredményeként 3 féle, beépült fragmentet hordozó vektor jött létre. A plazmidok egy részéből mindkét szekvenciát hordozó, teljes génkonstrukció keletkezett. Néhány plazmidba viszont csak a fluoreszcens fehérjét kódoló szakasz, vagy csak a promóter régió épült be.



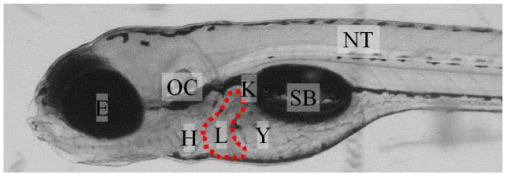
22. ábra A promóter és a fluoreszcens fehérjét kódoló szakasz beépülésének ellenőrzése restrikciós emésztéssel (*PstI*) az *LR* reakciót követően. A klónozás eredményeként 3 féle, fragmentet hordozó vektor keletkezett (M: molekulasúly marker, A/1: fragmentet nem hordozó célvektor, A/2: *mCherry*-t kódoló szakaszt hordozó célvektor, A/3: *vtg1* promótert hordozó célvektor, B/1: kész *vtg1:mCherry* konstrukció). Az emésztések a várt méretű fragmenteket eredményezték. A méreteket az 7. melléklet mutatja.

5.1.3 Mikroinjektálás, tranziens expresszió vizsgálata

A transzgenikus vonal előállításához a génkonstrukciókat stabilan be kell építeni a zebradánió genetikai állományába. A munka során használt Gateway rendszer egy *Tol2* transzpozon karok közé épített rendszer, ami hatékonyabbá teszi a génkonstrukció integrálódását. Ehhez transzpozáz enzimre van szükség, amelyhez a kódoló plazmidról *in vitro* transzpozáz *mRNS*-t hoztam létre. A promótert és fluoreszcens fehérjét kódoló kész génkonstrukciót restrikciós enzimmel linearizáltam (23. ábra).

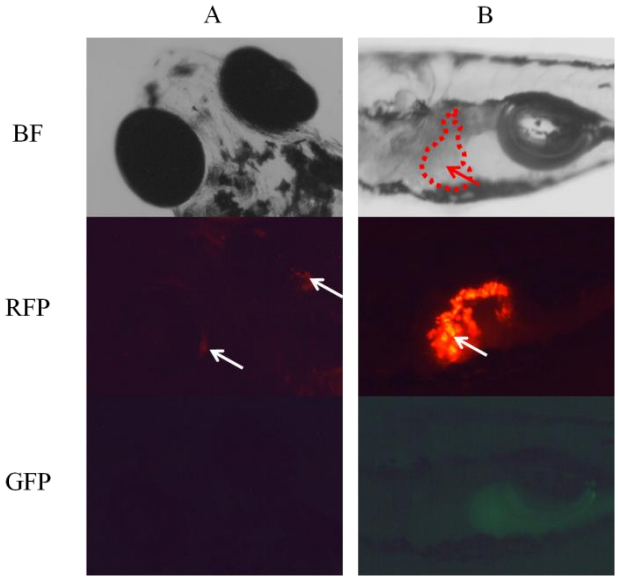
23. ábra A restrikciós enzimmel linearizált, injektálásra előkészített *vtg1:mCherry* génkonstrukció sematikus ábrája.

A linearizált konstrukciót (23. ábra) és a transzpozáz *mRNS-t* mikroinjektálással 1-2 sejtes, vad típusú zebradánió embriók szikébe juttattam. Az injektálást követően az embriókat 100 ng/l 17-ß-ösztradiollal kezeltem, hogy a transzgén kifejeződését indukáljam. Mivel zebradánió esetében a máj a megtermékenyítést követő 5-6. napra fejlődik ki (Tao és Peng, 2009), a létrehozott P0 nemzedék embrióit 5-10 dpf korban vizsgáltam. A vizsgálatokat fluoreszcens mikroszkóp alatt világos látótérrel (24. ábra), valamint RFP (vörös) és GFP (zöld) szűrő alkalmazásával végeztem.



24. ábra 5 napos zebradánió embrió fénymikroszkópos képe. E: szemlencse, OC: otolit kapszula, NT: notokord (gerinchúr), H: szív, L: máj (pirossal jelölve), K: vese, Y: szik, SB: úszóhólyag

384 embrió tranziens vizsgálata során a fluoreszcens fehérje kifejeződését az embriók kb. 20%-ában figyeltem meg. A májon kívül a szikben az embriók többségében erős fluoreszcens jel jelent meg, míg a szemekben és a vesék területén gyenge expresszió volt megfigyelhető néhány embrióban (kevesebb, mint 1%) (25. ábra). A fluoreszcens jel csak vörös (RFP) szűrő alkalmazása mellett volt látható, ezért egyértelmű, hogy a konstrukcióról származott.



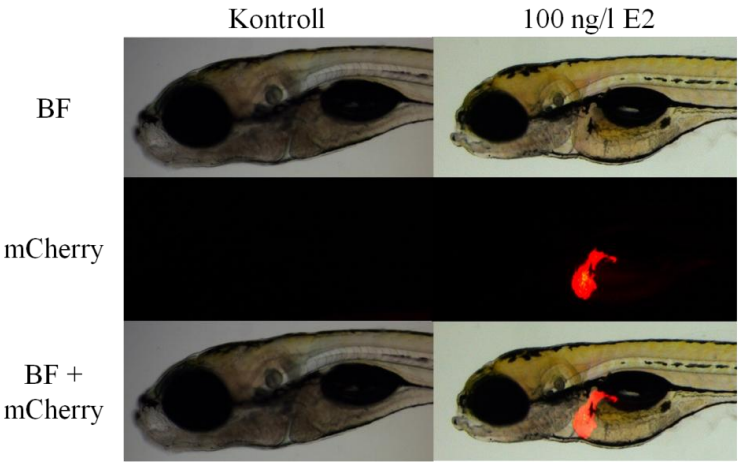
25. ábra Ösztrogén indukcióra megjelenő tranziens fluoreszcens fehérje kifejeződés 10 napos, *vtg1:mCherry* konstrukcióval injektált zebradánió lárvák szemlencséjében a fejről (A) és májában a test középső részéről készült (B) fotón. A májat piros szaggatott vonal és nyíl, a kifejeződés helyét fehér nyilak jelölik. (Azonos nagyítás és beállítások mellett, BF: világos látótérrel, RFP és GFP: vörös és zöld fluoreszcens szűrővel készült felvételek).

5.1.4 A *vtg1:*mCherry transzgenikus vonal egymást követő nemzedékeinek létrehozása

Az ösztrogén károsan hathat a zebradánió lárvák fejlődésére és eltolhatja az ivararányt. Emellett a génkonstrukció az injektálást követően csak később jut be a sejtmagba és az embrió sejtjeinek csak egy részébe épül be. A felnevelt egyedek zebradánió esetében ezért mindig mozaikosak. Előfordulhat, hogy a májban jelet adó embriók ivarsejtjei nem hordozzák a transzgént, illetve olyan embriókból is válhat a konstrukciót örökítő alapító, amelyekben tranziens expresszió nem volt megfigyelhető. Az embriók egy részét ezért az injektálást követően kezelés nélkül ivarérésig felneveltem, ezzel sikeresen létrehoztam a vonal P0 generációját.

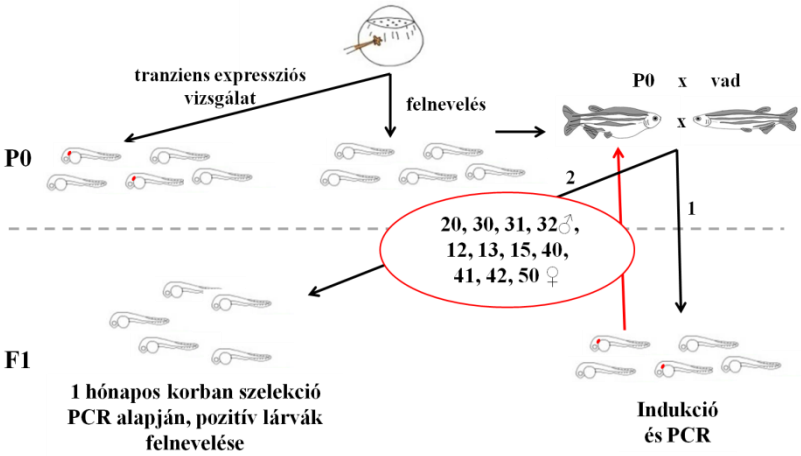
A kifejlett P0 halakat vad típusú zebradániókkal szaporítottam. Azért nem egymás között, mert a transzgén feltételezhetően az egyes egyedek különböző sejtjeiben más-más genomi régiókba épült be. A génkonstrukció működését ismét 100 ng/l ösztrogénnel váltottam ki. Ekkor már korábban, 5 napos korban vizsgáltam a fluoreszcens jel megjelenését a májban (26. ábra).

A fehérje kifejeződése a vesék és a szem régiójából eltűnt, azonban a szikben ösztrogén hatására továbbra is megjelent (ld. 32. ábra), ami arra utal, hogy a jel transzgén aktivitás eredménye. Az embriók ekkor még csak a kromoszómapárok egyikén hordozták a konstrukciót, azaz hemizigóták voltak.

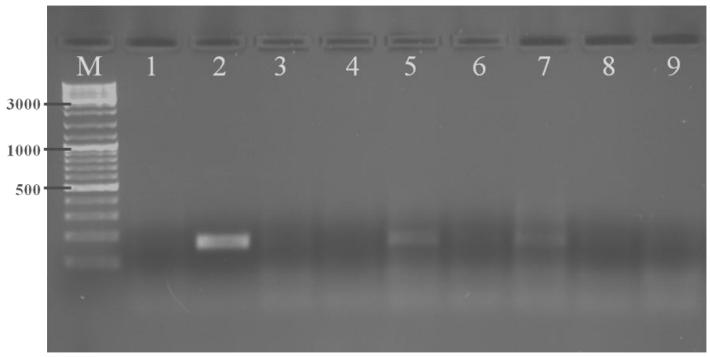


26. ábra Fluoreszcens fehérje kifejeződése a *vtg1:mCherry* vonal 5 napos, F1, hemizigóta embriójának májában, ösztrogén indukció hatására. A kezeletlen, kontroll embriókban fluoreszcens jel nem volt megfigyelhető. (BF: fénymikroszkópos felvétel, mCherry: vörös fluoreszcens szűrővel készült felvétel, BF+mCherry: a fénymikroszkópos és fluoreszcens felvétel egymásra vetítése).

A szülőpáronként külön vizsgált embriók 0-20%-ában figyeltem meg fluoreszcens jelet a májban. Mivel a P0 nemzedékben az ivarszervek is mozaikosak voltak, nem minden utód öröklölte a transzgént, ezért sok esetben előfordult, hogy a vizsgált embriók közül mindössze 1 mutatott májspecifikus jelet. Hely- és költségtakarékosság céljából ezért egy a konstrukciót kimutató PCR reakciót dolgoztam ki. Az utódokat 5 napos korig neveltem, majd az egy P0 szülőtől származó embriók keverékéből DNS-t tisztítottam. A PCR alapján sikeresen azonosítottam 11, a konstrukciót tovább adó szülőt (4 tejes és 7 ikrás), amelyeket újból szaporítottam, majd az embriókat ösztrogénnel kezeltem (27. ábra).



27. ábra A *vtg1:mCherry* vonal F1 generációjának létrehozása. A konstrukciót 1-2 sejtes zebradánió embriók szikállományába mikroinjektáltam. Az injektált embriók egy részén tranziens expressziós vizsgálatokat végeztem, hogy bizonyítsam a konstrukció működőképességét. A többi embriót felneveltem, majd vad típusú párral szaporítottam (1). A létrehozott embriókban ismét vizsgáltam az ösztrogénhatásra megjelenő fluoreszcens jelet. A konstrukció öröklődését PCR reakcióval is teszteltem. Azokat a P0 szülőket, amelyek mindkét vizsgálat alapján örökítették a transzgént (piros nyíl és pirossal bekarikázott azonosítójú egyedek), ismét vad típusú párral kereszteztem (2). Az utódokat egy hónapos korig neveltem, majd PCR reakció segítségével kiválogattam a konstrukciót hordozó lárvákat, amelyeket felneveltem.

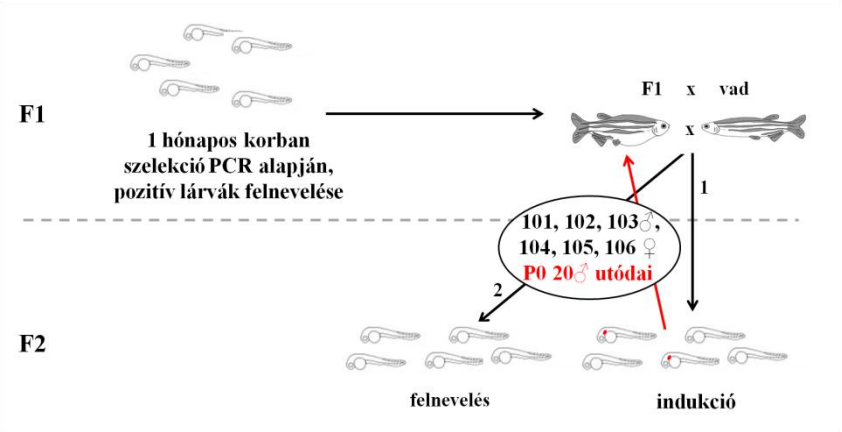


28. ábra 1 hónapos lárvák transzgén öröklésének ellenőrzése (M: molekulasúly marker, 1: negatív kontroll, 2: pozitív kontroll, 3.-19. lárvákból származó DNS minták. Az 5. és a 7. lárva örökölte a konstrukciót).

Az indukció minden esetben megerősítette a PCR eredményét és bizonyította a konstrukció jelenlétét. Ösztrogén érzékenység alapján mind a 11 egyed megfelelő alapítónak tűnt a vonal további generációinak létrehozásához. Az alapítójelölteket újra szaporítottam és a tőlük származó lárvákat egy hónapos korig neveltem, majd minden egyedtől farokúszó mintát vettem. A mintából PCR reakcióval azonosítottam a konstrukciót hordozó egyedeket (27. és 28. ábra).

A gélelektroforézis eredménye alapján pozitívnak talált lárvákat megtartottam és tovább neveltem. Az F1 nemzedékben még előfordulhatott, hogy egy egyed a genom több pontján is hordozta a konstrukciót, ha a P0 gonádjának sejtjeiben többszörös integráció történt, ezért a halakat ismét vad típusú zebradániókkal kereszteztem (29. ábra).

A még kezelhető létszám megtartása miatt ekkor ki kellett választani egy alapítót, amelynek utódaiból a további nemzedékek létrehozhatók. A cél egy érzékeny biomarker vonal kialakítása volt, ezért molekuláris módszerek alkalmazása helyett az F2 embriók ösztrogén érzékenységét vizsgáltam. Ez alapján a 20-as számmal jelölt P0 alapító hím utódai tűntek a legígéretesebbnek, amelyek közül 3 hímet és 3 nőstényt választottam ki a vonal továbbviteléhez.

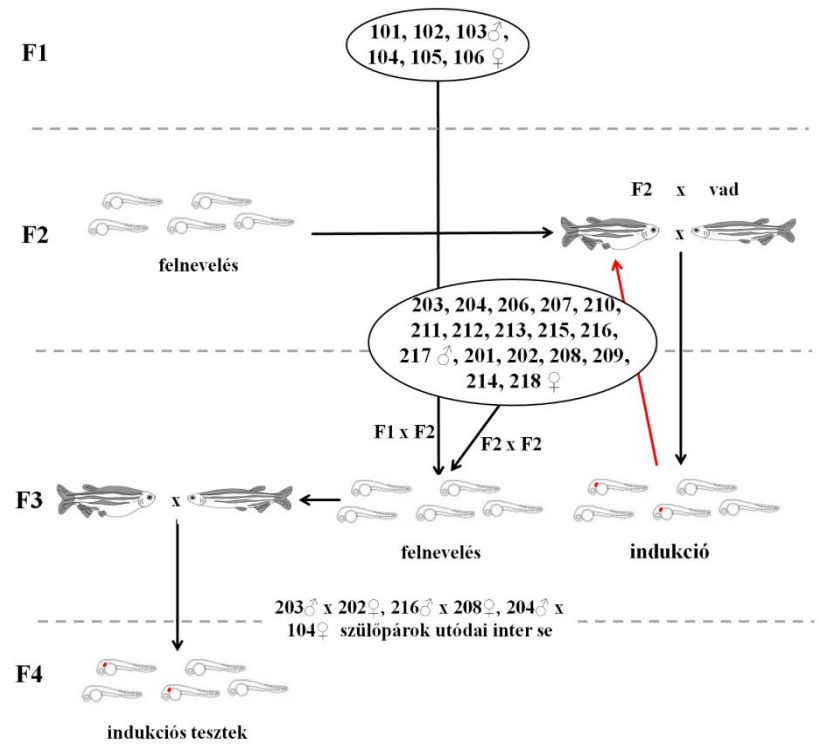


29. ábra A *vtg1:mCherry* vonal F1 generációjának létrehozása. A PCR reakció alapján kiválasztott, konstrukciót hordozó F1 lárvákat felneveltem, majd vad típusú párral szaporítottam (1). Az embriókban a fluoreszcens jel indukcióját ismét vizsgáltam, majd az eredmények alapján kiválasztottam a konstrukciót örökítő egyedeket. Helytakarékosság céljából a továbbiakban csak a 20 ♂ alapítótól származó F1 egyedekkel dolgoztam tovább (piros nyíl és keretben felsorolt azonosítójú halak). Ezeket vad típusú párral újra szaporítottam (2), majd az embriókat felneveltem.

Az F2 generáció a kiválasztott 6 haltól származik. Ebben a generációban a transzgén beépülése már stabil, és feltételezhetően minden egyedben egy kópiás. A felnevelt F2 egyedeket vad típusú párral kereszteztem. Az utódokban (F3) ismét vizsgáltam a transzgén indukálhatóságát, és 11 hímet és 6 nőstényt találtam alkalmasnak a következő generációk létrehozásához.

Ezt követően kiválasztottam azokat a transzgenikus szülőpárokat, amelyekből a legérzékenyebb, stabil biomarker vonal(ak) létrehozhatók. Kezdetben csak az F2 egyedeket kereszteztem különböző kombinációkban, végül az F1 halakat is bevontam a vizsgálatba (30. ábra). A szikben látható, ösztrogén indukcióra megjelenő fluoreszcens jel néhány egyed utódaiban még ezekben a generációkban is megfigyelhető volt, számuk 5-100% között változott. Ezért az embriókban a májban megfigyelhető fluoreszcens aktivitás mellett a szik jelét is vizsgáltam. Az eredmények alapján 3 szülőpárt választottam ki: 203♂ x 202♀, 216♂ x 208♀ és a 204♂ x 104♀. Bár az első páros esetében a szikben mérhető jel viszonylag erős volt, az utódok érzékenyen reagáltak az ösztrogén hatásra. A másik két szülőpár esetén a szikben nem jelent meg fluoreszcens jel.

Az azonos szülőpároktól származó embriókat felneveltem, majd azokat egymás közt szaporítva létrehoztam a három „alvonal” F4 generációját (30. ábra).



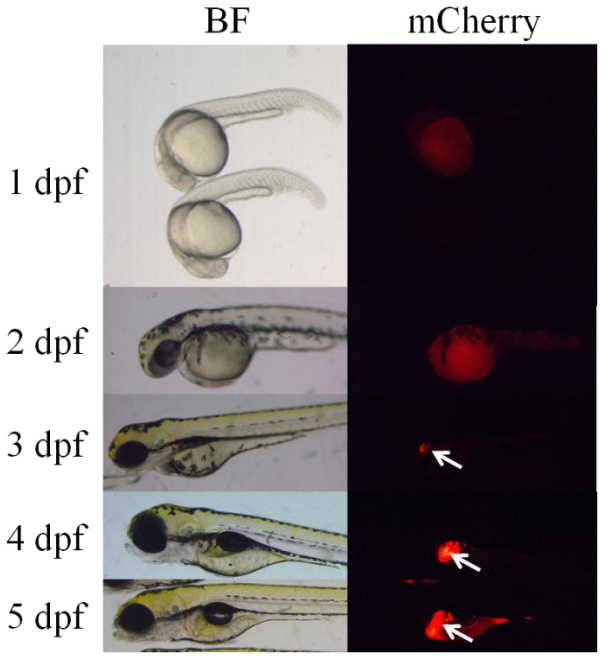
30. ábra A *vtg1: mCherry* transzgenikus vonal F3 és F4 generációjának létrehozása. A kiválasztott F2 halakat vad típusú párral szaporítottam, majd az utódokban ismét vizsgáltam a fluoreszcens aktivitást. Az eredmények alapján 16 egyedet választottam ki a következő generáció létrehozásához (piros nyíl és a keretben felsorolt azonosítójú egyedek), amelyeket egymás közt valamint az F1 generációból kiválasztott halakkal kereszteztem. Az embriókat felneveltem, majd a 203♂x202♀, 216♂x208♀ és 204♂x104♀ halak utódain vizsgáltam a fluoreszcens jel kifejeződésének anyag- és koncentrációfüggését.

A halak az F3 generációig még hemizigóták voltak, mert az őket létrehozó szülőpár egyik tagja vad típusú volt. Az F3 és F4 generációban már homozigóta egyedek is létrejöttek.

5.2 A fluoreszcens jel kifejeződésének vizsgálata különböző fejlődési stádiumokban

A zebradánió májfejlődése 6 hpf korban kezdődik, azonban csupán a növekedési fázis elején (50 hpf kor után) kezd működőképes szervvé alakulni. A jobb oldali májlebeny 96 hpf, a máj végleges formája 120 hpf korra alakul ki (Tao és Peng, 2009.).

Az embriók kezelését kezdetben 0-5 napos (dpf) korig végeztem. Minél hosszabb ideig érintkezik az embrió egy toxikus anyaggal, annál valószínűbb, hogy fejlődési rendellenességek alakulnak ki, esetleg az embrió elpusztul. Felmerült a kérdés, hogy ha a hepatoblast sejtek csak 50 órás kor után alakulnak májsejtekké, mikor kezdődik a sejtek fluoreszcens fehérje (és vitellogenin) termelése. Ezért az F3 nemzedék embrióit 0 hpf kortól 200 ng/l EE2-vel kezeltem és naponta vizsgáltam a fluoreszcens jel megjelenését a májban. Ez a koncentráció elég magas ahhoz, hogy már korai stádiumban is képes legyen indukciót kiváltani. Mivel a bal oldali májlebeny nagyobb és korábban alakul ki, az embriókat jobb oldalukra fektetve vizsgáltam.



31. ábra A fluoreszcens jel kifejeződése különböző fejlődési stádiumú, eltérő nagyításokban vizsgált *vtg1:mCherry* transzgenikus zebradánió lárvákban, 200 ng/l EE2 kezelés hatására. Az 1 dpf korú lárvákról bemutatott képen egy szikben fluoreszcens jelet adó és egy fluoreszcens aktivitást nem mutató lárva is látszik. A májban megjelenő expressziót fehér nyilak mutatják. (BF: fénymikroszkópos felvétel, mCherry: vörös fluoreszcens szűrővel készült felvétel).

Az eredmények igazolták a feltételezést: a fluoreszcens jel 2-3 napos kor között jelent meg és 3 napos kortól volt erőteljes. A konstruciót kifejező terület mérete fokozatosan, a májjal együtt nőtt, 5 dpf korra érte el legnagyobb méretét a vizsgálati időszakban (31. ábra).

Az eredmények alapján a kezelések kezdetét 0 dpf korról 3 dpf korra tettem át, így az embriók kevésbé károsodnak és nincs szükség oldatcserére a kezelések alatt, ezért kevesebb veszélyes hulladék termelődik.

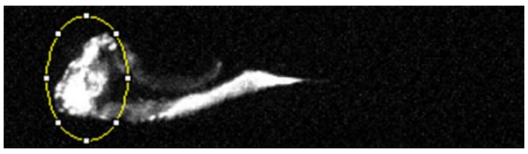
5.3 A fluoreszcens jel kifejeződésének koncentrációfüggése

Egy ösztrogéneket kimutató biomarker vonalat akkor lehet a toxikológiai vizsgálatokban hatékonyan használni, ha többféle ösztrogénhatású anyagot is képes kimutatni, megfelelően érzékeny (alacsony koncentrációkra is reagál) és a fluoreszcens válasz koncentrációfüggő.

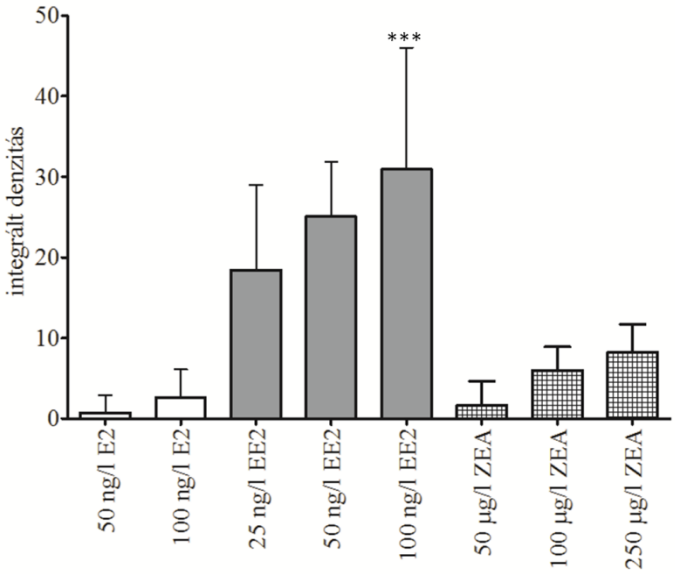
5.3.1 Fluoreszcens jel kifejeződése az F3 generáció embrióiban

A fluoreszcens jel koncentrációfüggését elsőként az F3 generációban vizsgáltam, 17-α-etinil-ösztradiol, 17-ß-ösztradiol és zearalenon hatására. Ekkor még csak néhány koncentrációval kezeltem az embriókat, 3 dpf-5dpf korig.

Az embriókat az előzőekben leírtak alapján jobb oldalukra fektetve, oldalnézetben vizsgáltam. A digitális felvételeken egy ellipszissel kijelölt, a májat magában foglaló területet vettem figyelembe (32. ábra), hogy a háttérzaj vagy a szikben kifejeződő jel ne zavarja a kiértékelést. ImageJ szoftverrel a mért értékekből (jel erőssége és érintett terület nagysága) integrált értéket képeztem (integrált denzitás) és az indukciót ez alapján értékeltem (32. ábra).



32. ábra Az ImageJ szoftverrel végzett kiértékeléshez használt, RGB színskála szerint szétválasztott felvétel vörös színcsatornát mutató képe. A vizsgált, májat magában foglaló területet ellipszis alakú kijelölés jelzi. A fotón egy szikben és májban fluoreszcens jelet kifejező embrió látható.



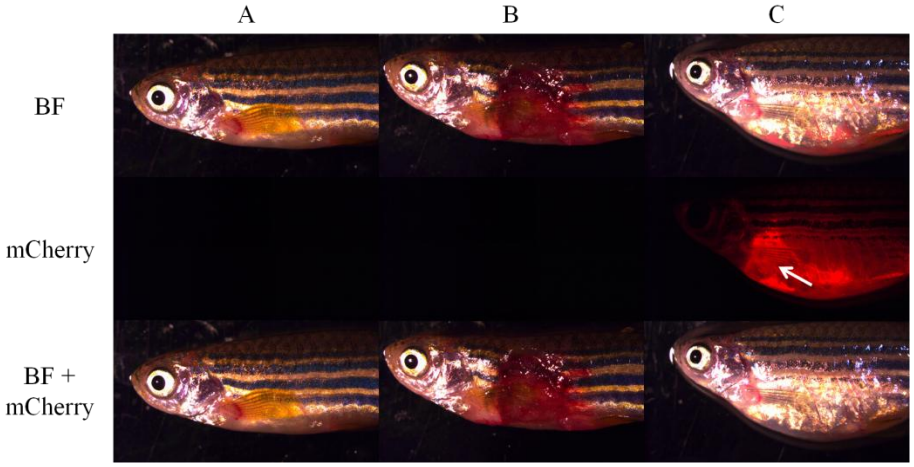
33. ábra A fluoreszcens válasz koncentrációfüggésének vizsgálata 3 ösztrogénhatású anyag hatására, F3 embriókon (20 fluoreszcens aktivitású embrió/koncentráció, ***: p<0,001) (E2: 17-ß-ösztradiol, EE2: 17-α-etinil-ösztradiol, ZEA: zearalenon).

Az 33. ábrán a kiválasztott F2 halak vad típusú párral történő keresztezéséből származó embriók összesített eredménye látható. Az állomány inhomogenitása miatt (feltételezhetően eltérő integrációs helyek) az eredmények nagy szórást mutattak, ezért szignifikáns jelintenzitás különbség csak az EE2 kezelésnél volt megfigyelhető, de a koncentrációfüggő választ mindhárom

ösztrogénhatású anyag esetében feltételezhető volt. Az oldószeres kontrollban egyik esetben sem tapasztaltam fluoreszcens jelet.

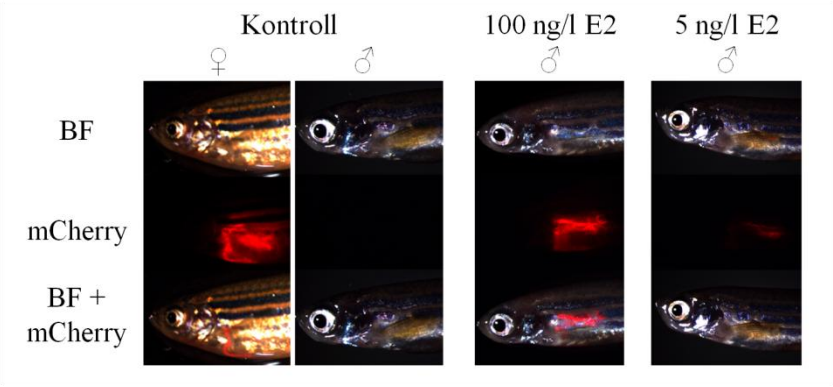
5.3.2 Fluoreszcens jel kifejeződése kifejlett hímekben

A vitellogenin normál körülmények között csak kifejlett nőstényekben termelődik, ivarérett hímekben szintje meglehetősen alacsony. A hímekben, a lárvákhoz hasonlóan ösztrogénhatásra a vitellogenin termelés beindítható és koncentrációfüggő módon fokozható (Tyler et al., 1999). A génkonstrukciónak is hasonlóan kell működnie. Hogy ezt ellenőrizzem, az F1 generáció ivarérett nőstény és hím egyedeit altatást követően fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltam. A nőstények májában az mCherry fehérje olyan erősen fejeződött ki, hogy a pigmentált testfalon keresztül is megfigyelhető volt (34. ábra). A hímekben a jel boncolást követően sem látszott a májban (34. ábra).



34. ábra Kifejlett, kezeletlen *vtg1:mCherry* tejes és ikrás fénymikroszkópos és fluoreszcens képe boncolás nélkül (A: ♂, C: ♀) és azt követően (B: ♂). A tejesekben még boncolás után sem látszott fluoreszcens jel, míg az ikrások erős, májból származó jele már a testfalon keresztül is megfigyelhető volt. (BF: fénymikroszkópos felvétel, mCherry: vörös fluoreszcens szűrővel készült felvétel, BF+mCherry: a fénymikroszkópos és fluoreszcens felvétel egymásra vetítése)

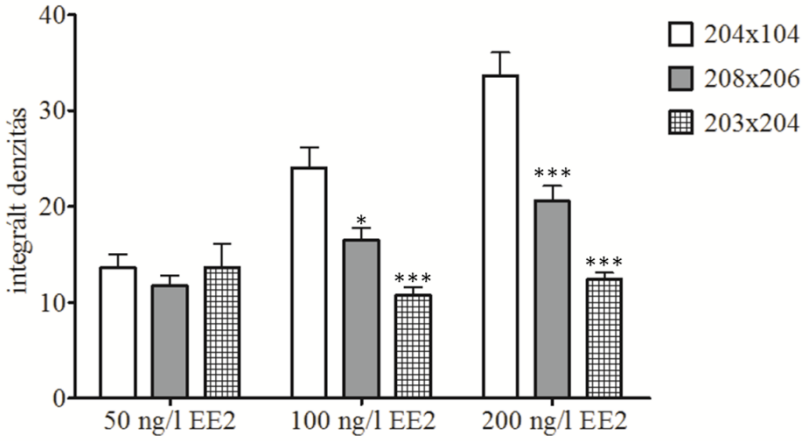
A *vtg1:*mCherry ivarérett hímek tehát alkalmasak lehetnek ösztrogénhatású anyagok vizsgálatára. Hogy ezt bizonyítsam, a tejeseket különböző koncentrációjú (5, 10, 50 és 100 ng/l) 17-ß ösztradiol oldatokkal kezeltem és naponta vizsgáltam a fluoreszcens jel megjelenését. A 4. napra minden vizsgált koncentráció kiváltotta az mCherry termelődését (35. ábra). A kifejlett egyedek alacsonyabb ösztrogénkoncentrációkra is reagáltak az embriókhoz képest. Az eredményeket statisztikailag nem értékeltem, mert ebben a generációban az egyedek még valószínűleg más-más integrációs helyen és kópiaszámban hordozták a génkonstrukciót.



35. ábra Fluoreszcens fehérje termelődése kifejlett, kezeletlen hímben és nőstényben, valamint E2-vel kezelt kezelt hímekben (E2: 17-ß-ösztradiol, BF: fénymikroszkópos felvétel, mCherry: vörös fluoreszcens szűrővel készült felvétel, BF+mCherry: a fénymikroszkópos és fluoreszcens felvétel egymásra vetítése).

5.3.3 „Alvonalak" érzékenységének összevetése

Az F2 valamint az F1 kiválasztott egyedeinek keresztezéséből három szülőpárt választottam ki a stabil transzgenikus vonal létrehozásához: 203♂ x 202♀, 216♂ x 208♀ és a 204♂ x 104♀. Ezek érzékenységét 50, 100 és 200 ng/l EE2 kezelést követően vetettem össze.



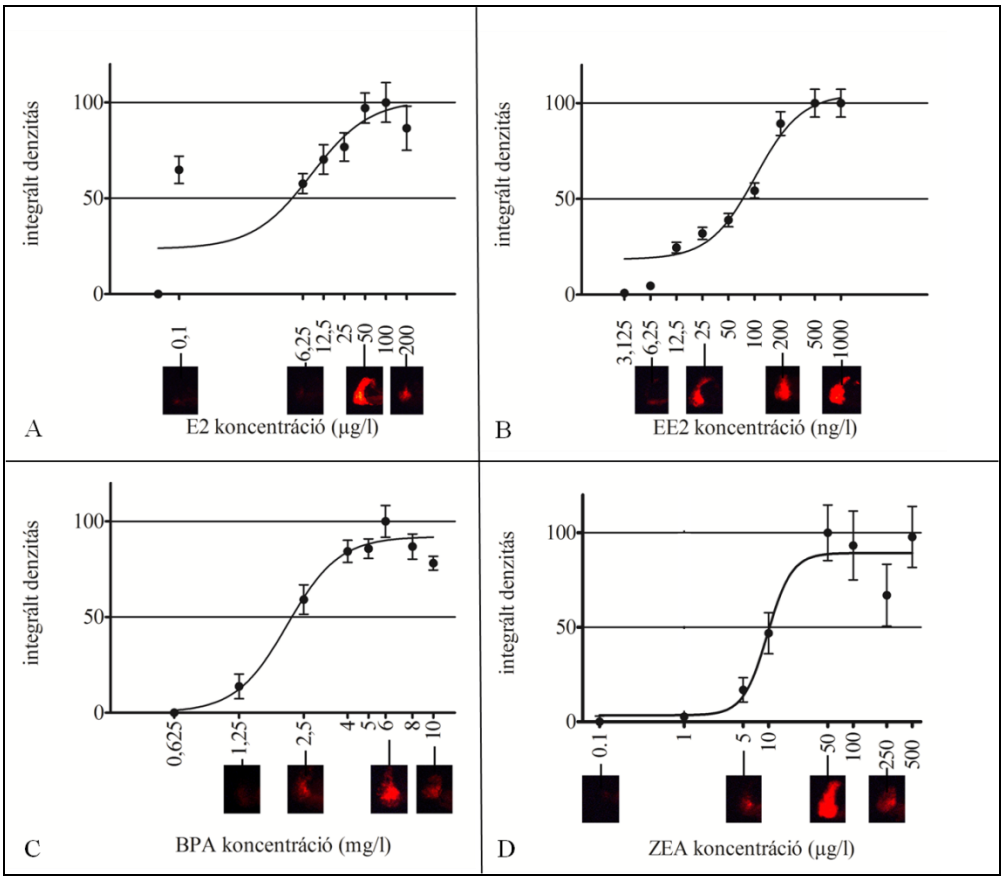
36. ábra A 20 ♂-től származó alvonalak érzékenységének összevetése EE2 indukció alapján az F3 nemzedék 5 napos embrióiban (204x104: 204 ♂ x 104 ♀ utódai, 208x216: 208 ♂ x 216 ♀ utódai, 203x202: 203 ♂ x 202 ♀ utódai). Az adatokat kétszempontos varianciaanalízissel (Two-way ANOVA, Bonferroni post hoc test) vetettem össze (*: $p<0,05$; ***: $p<0,001$).

Szignifikáns különbség csak a 100 ng/l-es és a 200 ng/l-es koncentrációnál mutatkozott. A legerősebb mértékű indukciót a 204 ♂ x 104 ♀ párosítása esetén tapasztaltam, de a másik két alvonal is alkalmas lehet az ösztrogénhatás kimutatására. A későbbiek során a legérzékenyebbnek tűnő 204 ♂ x 104 ♀ alvonalat vizsgáltam részletesebben (36. ábra).

5.3.4 Dózis-hatás összefüggés különböző ösztrogénhatású anyagok esetén

A 204 ♂ x 104 ♀ párosításából származó F3 egyedeket felneveltem, majd utódaikat egymást közt szaporítottam. Az így nyert F4 embriókat különböző koncentrációjú 17-ß-ösztradiol, 17-α-etinil-ösztradiol, zearalenon, biszfenol-A, nonilfenol és atrazin oldatokkal kezeltem. A fluoreszcens jel indukcióját sztereomikroszkóp mCherry szűrője alatt készített felvételek alapján vizsgáltam. Az oldószert tartalmazó negatív kontrollban nem jelent meg fluoreszcens jel. Az első négy anyag

esetében koncentrációfüggő indukciót tapasztaltam, ami a fluoreszcens jel erőssége (integrált denzitás) esetében valamint a világító embriók számában is megfigyelhető volt. Mindkét paraméter alapján dózis-hatás görbéket vettem fel és meghatároztam a maximális hatás felének, 10%-ának és 90%-ának eléréséhez szükséges EC_{50}, EC_{10} és EC_{90} értékeket (37. ábra és 15. táblázat). Látható, hogy az integrált denzitás alapján számított indukció mértéke mind a négy anyag esetében eltér a világító embriók számával jelzettől. Az eltérés a biszfenol-A esetén a legkisebb, míg az 17-α-etinil-ösztradiol esetében a legszembetűnőbb.



37. ábra A fluoreszcens jelerősség és a terület mérete (integrált denzitás) alapján felvett dózis-hatás görbék 204 ♂ x 104 ♀ alvonal F4 embrióinak eredményei alapján. (E2: 17-ß-ösztradiol, EE2: 17-α-etinil-ösztradiol, BPA: biszfenol-A, ZEA: zearalenon)

Kezelés	integrált denzitás alapján			világító embriók száma (%) alapján		
	EC_{50}	EC_{10}	EC_{90}	EC_{50}	EC_{10}	EC_{90}
E2	10,38 µg/l	5,02 µg/l	21,47 µg/l	6,46 µg/l	2,13 µg/l	19,65 µg/l
EE2	76,95 ng/l	37,21 ng/l	159,13 ng/l	15,86 ng/l	5,22 ng/l	48,22 ng/l
ZEA	9,68 µg/l	4,68 µg/l	20,02 µg/l	7,31 µg/l	2,40 µg/l	22,23 µg/l
BPA	2,10 mg/l	1,01 mg/l	4,34 mg/l	2,53 mg/l	0,83 mg/l	7,69 mg/l

14. táblázat A maximális hatás felének, 10%-ának és 90%-ának eléréséhez szükséges EC_{50}, EC_{10} és EC_{90} értékek különböző ösztrogénhatású anyagok esetében, a 204 ♂ x 104 ♀ alvonal F4 embrióiban (E2: 17-ß-ösztradiol, EE2: 17-α-etinil-ösztradiol, ZEA: zearalenon, BPA: biszfenol-A)

A legalacsonyabb, mCherry kifejeződést kiváltó koncentráció 17-ß-ösztradiol esetében 0,1 µg/l, 17-α-etinil-ösztradiol esetében 6,25 ng/l, zearalenon és biszfenol-A esetében 0,1 µg/l valamint 1,25 mg/l volt.

Az egyes anyagok esetében az integrált denzitásból számított EC_{50} értékeket összevetettem az E2-re jellemző EC_{50} értékkel. Az eredmény alapján következtetni lehetett az adott anyag ösztrogénhatásának erősségére, ún. relatív ösztrogénpotenciáljára (16. táblázat).

Kezelés	EC_{50}	$EC_{50E2}/EC_{50\ vizsg.\ anyag}$
E2	8,304 µg/l	1,000
EE2	106,4 ng/l	78,05
ZEA	9,68 µg/l	1,072
BPA	2,098 mg/l	0,005

15. táblázat Különböző anyagok relatív ösztrogenitásának meghatározása az EC_{50} értékek összevetése alapján. (E2: 17-ß-ösztradiol, EE2: 17-α-etinil-ösztradiol, ZEA: zearalenon, BPA: biszfenol-A)

A *vtg:*mCherry transzgenikus vonalon tapasztalt fluoreszcens fehérje indukció alapján a biszfenol-A kb. 5000x gyengébb, a zearalenon megközelítőleg azonos, míg az 17-α-etinil-ösztradiol kb. 78x erősebb ösztrogénhatású, mint a természetes ösztrogén.

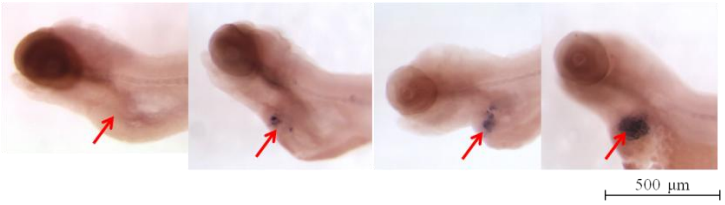
Nonilfenol esetében csak néhány embrió májában, igen kis területre kiterjedően figyeltem meg a fluoreszcens fehérje kifejeződését, ez azonban kevésnek bizonyult ahhoz, hogy dózis-hatás görbéket sikerüljön felvenni. Az atrazin ebben a fejlődési stádiumban nem befolyásolta a vitellogenin szintet.

5.4 *vtg1 in situ* hibridizáció

Minden generációban, koncentrációtól és ösztrogénhatású anyagtól függetlenül azt tapasztaltam, hogy bizonyos embriók májában gyengébb, másokban erősebb a jel kifejeződése, és ugyanez igaz az érintett terület nagyságára is. Emellett a terület nagysága és a jel erőssége nem mutatott összefüggést. Kíváncsi voltam arra, hogy ez a konstrukció működésének eredménye, vagy az endogén vitellogenin termelődésre is igaz.

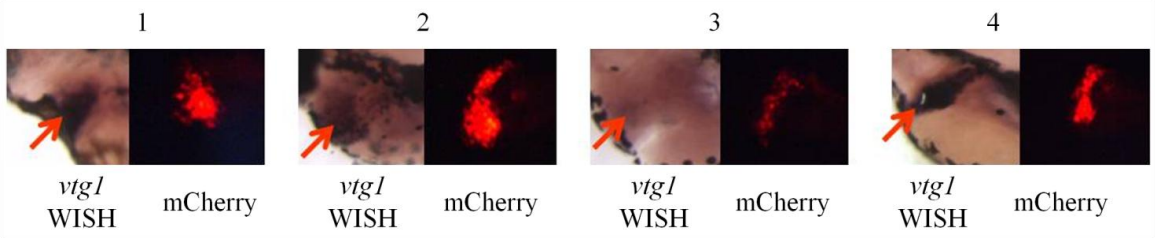
Vad típusú és transzgenikus (F3) zebradánió embriókat 300 és 200 ng/l α-etinil-ösztradiollal kezeltem, majd az endogén vitellogenin termelődését antiszensz, digoxigeninnel (DIG) jelölt RNS próba segítségével, *in situ* hibridizációval vizsgáltam. A vizsgálatokat 5 napos embriókon végeztem. A transzgenikus embriókról a fixálást megelőzően felvételeket készítettem.

A vizsgált EE2 koncentrációk elég magasak voltak ahhoz, hogy az emriókban a vitellogenin termelődését biztosan kiváltsák. Ennek ellenére az *in situ* hibridizációban vizsgált vad típusú és a transzgenikus embriók esetében is tapasztaltam a korábban megfigyelt jelenséget, miszerint a fehérje nem termelődik minden egyedben, az embriók között jelentős érzékenységbeli különbség mutatkozik. Emellett a vitellogenint termelő egyedek is különböztek egymástól. Bizonyos embriókban erős vitellogenin termelődést figyeltem meg a teljes májban, míg másokban kisebb területet érintő vagy gyengébb, teljes májra vagy kisebb területre kiterjedő expressziót figyeltem meg (38. ábra).



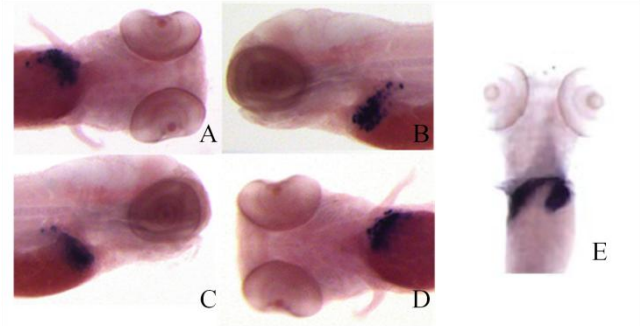
38. ábra A *vitellogenin-1* mRNS eltérő kifejeződése vad típusú, 300 ng/l EE2-vel kezelt, 5 napos zebradánió embriókban.

Ezt követően a transzgenikus embriók *in situ* hibridizációs felvételét összevetettem a fixálást megelőzően készült fluoreszcens felvételekkel. Az embriók a fixálás során torzultak, ezért pontos összevetést nem végezhettem. Az eredmény mégis egyértelműen igazolta, hogy a gyengébb jelet adó, vagy kisebb területre kiterjedő expressziót mutató embriókban az endogén vitellogenin termelődése is hasonlóan működött (39. ábra).



39. ábra A *vitellogenin* whole-mount *in situ* hibridizáció és a májban megjelenő fluoreszcens jel összevetése a biomarker zebradánió vonal (*vtg1:mCherry*) 200 ng/l EE2-vel kezelt, 5 napos embrióiban (*vtg1* WISH: *vitellogenin-1 mRNS*-t kimutató whole mount *in situ* hibridizáció, mCherry: a fluoreszcens fehérjének megfelelő szűrő alkalmazásával készült felvétel).

Az embriókat a megszokott, bal oldali oldalnézet mellett több nézetből is vizsgáltam. Megfigyeltem, hogy bár az 5 napos zebradánió embriók már jobb oldali májlebennyel is rendelkeznek, a vitellogenin termelődése ebben a stádiumban még csak a bal oldali lebenyre jellemző (40. ábra). Ezért indokolt, hogy a transzgenikus embriókat minding jobb oldalukra fektetve, felülnézetből vizsgáljuk.



40. ábra Vitellogenin whole-mount *in situ* hibridizáció eredménye 300 ng/l EE2-vel kezelt, 5 napos, vad típusú lárvákon (A: felülnézet, B: bal oldali nézet, C: jobb oldali nézet, D: alulnézet, saját vizsgálatok alapján).
Az E ábrán a teljes májban kifejeződő *lfabp* gén termékét (zsírsav-kötő fehérje - *liver-type fatty acid-binding protein*) kimutató *in situ* hibridizáció eredménye látható 5 napos zebradánió lárvában, felülnézetből (forrás: Tao és Peng, 2009).

5.5 Egy ösztrogén hatású mikotoxin vizsgálata

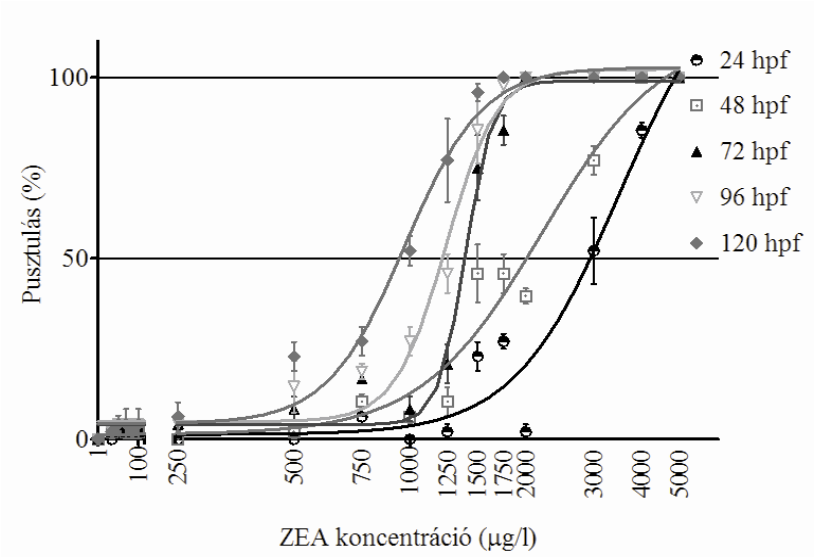
Az ösztrogén hatású anyagok közül a kezelések során használt E2, EE2 és BPA hatását zebradánió embriókon már széleskörűen tanulmányozták. Kivételt képez ezalól az ösztrogénhatású mikotoxin (ZEA), amelynek zebradánióra gyakorolt hatásait csak a közelmúltban tárták fel kifejlett egyedeken (Schwartz et al., 2010 és 2011), azonban az egyik legérzékenyebb fejlődési stádiumban, embriókorban még nem vizsgálták.

5.5.1 Embriótoxicitás vizsgálat

Az embriótoxicitás vizsgálatát az OECD szabványban (OECD-TG 206) rögzített FET teszt szerint végeztem. 1 órás (1 hpf), vad típusú zebradánió embriókat különböző koncentrációjú zearalenon oldatokkal kezeltem és naponta vizsgáltam az embriók életben maradását és a megjelenő fejlődési rendellenességeket. A tesztet az ajánlott 96 óra helyett 120 órás korig végeztem, hogy még pontosabb eredményekhez juthassak, valamint mintát nyerjek a későbbi vizsgálatokhoz.

A kezeletlen kontroll embriókban elváltozást nem tapasztaltam, az embriók normálisan fejlődtek. Normál méretű és alakú szemekkel rendelkeztek, testük és farkuk egyenes volt, pigmentáltságuk a fejlődési stádiumnak megfelelően alakult, ödémák nem mutatkoztak. Az 50 µg/l alatti koncentrációkban a kezelés nem volt káros hatással az embriókra a kísérlet időtartama alatt. Magasabb koncentrációkban a káros hatások súlyossága a kezelés időtartamától és az alkalmazott koncentrációtól függően változott. Az embriók 1000 µg/l alatti koncentrációkban megfelelő időben keltek ki (3 dpf), de 1000 µg/l koncentrációban és afölött néhány embrió a kísérlet végéig az ikrahéjban maradt.

Az elpusztult embriók száma alapján 24 óránként pusztulási görbéket vettem fel, amelyek alapján kiszámítottam az embriók 50 és 10%-ának pusztulását okozó koncentrációkat (LC_{50} és LC_{10}) (41. ábra).



hpf	LC_{50}	LC_{10}
24	2854 µg/L	1424 µg/L
48	2067,8 µg/L	869,4 µg/L
72	1298,6 µg/L	610,1 µg/L
96	1099,4 µg/L	456,2 µg/L
120	893 µg/L	335,1 µg/L

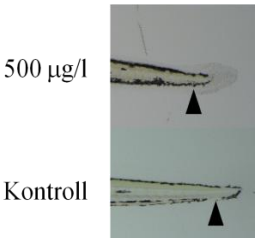
41. ábra Az elpusztult embriók száma alapján felvett pusztulási görbék és az ezek alapján meghatározott LC_{50} és LC_{10} értékek vad típusú zebradánió embriók zearalenon kezelése során (ZEA: zearalenon, hpf: a megtermékenyítéstől számított órák száma, LC_{50} és LC_{10}: az embriók 50 és 10%-ának pusztulását okozó koncentrációk).

A megfigyelt fejlődési rendellenességeket az 42. ábra mutatja. Az eredmények alapján minden napra vonatkozóan meghatároztam azt a koncentrációt, amely a kontrollhoz képest statisztikailag igazolható elváltozást még nem okozott (NOEC) és azt a legalacsonyabb koncentrációt, amelyben a rendellenességek már jelentkeztek (LOEC).

hpf	Perikardiális és sziködéma		Testgörbülés		Hiányos pigmentáció		Kelési sikertelenség	
	NOEC	LOEC	NOEC	LOEC	NOEC	LOEC	NOEC	LOEC
24	1000 µg/l	1500 µg/l	-	-	-	-	-	-
48	750 µg/l	1000 µg/l	250 µg/l	500 µg/l	-	-	-	-
72	50 µg/l	100 µg/l	250 µg/l	500 µg/l	500 µg/l	750 µg	750 µg/l	1000 µg/l
96	50 µg/l	100 µg/l	500 µg/l	750 µg/l	25 µg/l	50 µg	-	-
120	50 µg/l	100 µg/l	500 µg/l	750 µg/l	25 µg/l	50 µg	-	-

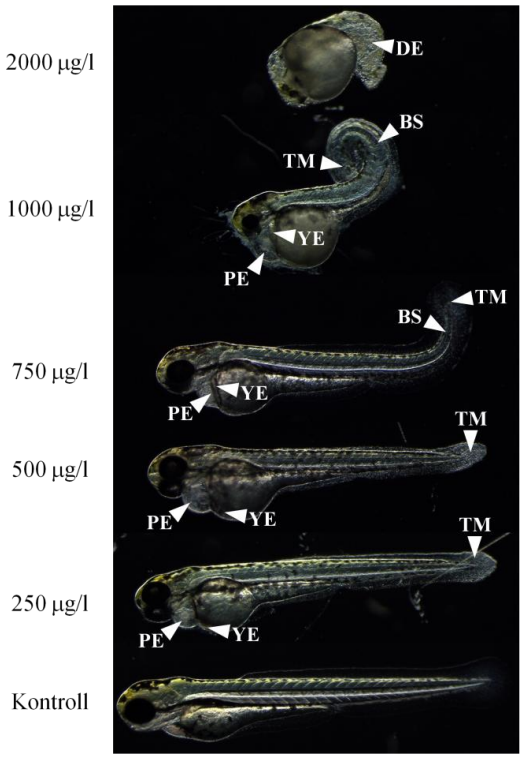
42. ábra Vad típusú zebradánió embriók zearalenon kezelése során megfigyelt fejlődési rendellenességeket kiváltó legalacsonyabb koncentrációk (LOEC), valamint a rendellenességet még nem okozó koncentrációk (NOEC) (hpf: a megtermékenyítéstől számított órák száma).

Az általános, mérgezésekre jellemző fenotípusos elváltozások mellett két, zearalenonra vagy ösztrogenikus anyagokra jellemző rendellenességet figyeltem meg. Normális fejlődésű zebradánió embriókban a test körvonalán körbefutó pigmentsáv a farokúszó eredési helyénél megszakad. 72 órás korú embriókban a pigmentsáv 500 µg/l zearalenon koncentráció fölött folyamatos maradt (43. ábra).

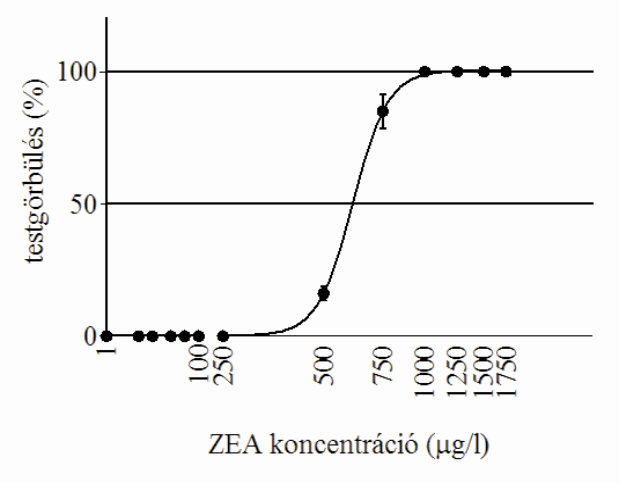


43. ábra 72 órás embriókban zearalenon kezelés hatására 250 µg/l koncentráció fölött a testen körbefutó pigmentsáv a farokúszó eredési helyénél (a nyilakkal jelölt területen) nem szakad meg.

48 órás korban 500 µg/l koncentrációtól az embriók teste felfelé (dorzális irányba) görbült, amely abnormális szem- és szívfejlődéssel járt. A torzulás 72 órás kortól már egyértelmű koncentrációfüggést mutatott (44, 45. ábra). Ezt a fenotípust korábban más ösztrogenikus anyagok hatására is megfigyeltem, 5 napos korban.



44. ábra A test háti irányú görbülése 72hpf, különböző koncentrációjú zearalenon oldatokkal kezelt zebradánió lárvákban (DE – dezintegrált embrió, PE – perikardiális ödéma,YE – sziköd éma, TM – faroktorzulás, BS – görbülés). Az embriók szív- és szemfejlődési rendellenességeket is mutattak.



45. ábra Zearalenonnal kezelt embriókban jelentkező, háti irányú testgörbülés alapján, 72 órás korban felvett dózis-hatás görbe.

5.5.2 A zearalenon ösztrogénhatásának mérése vitellogenin indukció alapján

A zearalenon ösztrogénhatású anyag lévén koncentrációfüggően serkenti a vitellogenin termelést. Az indukció mértékét kifejlett zebradánió tejesekben mértem ELISA módszerrel, valamint lárvákban és tejesekben valós idejű kvantitatív PCR segítségével.

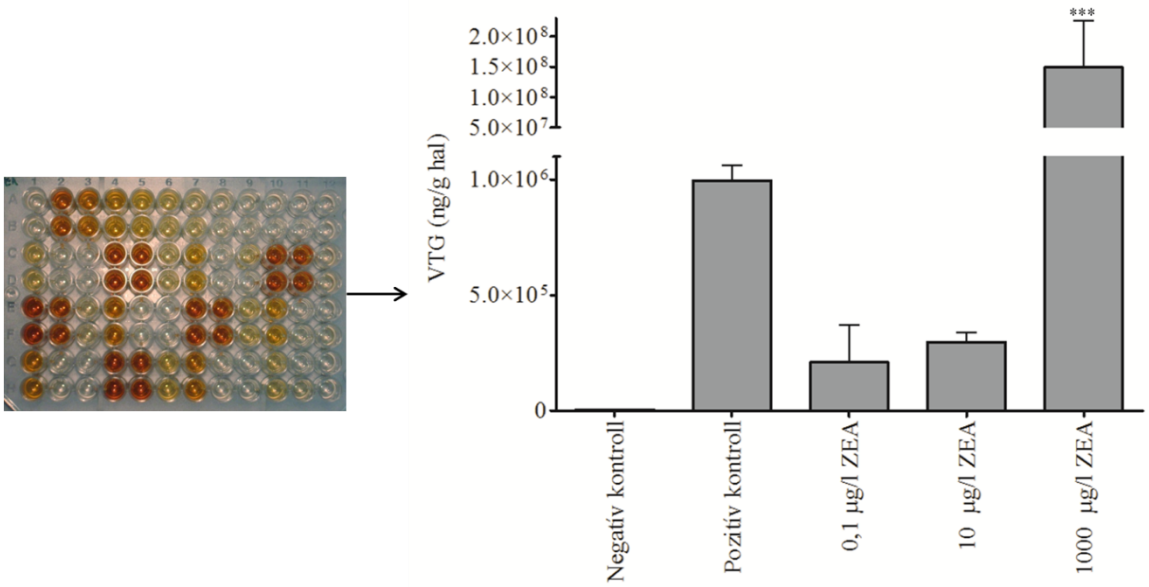
5.5.2.1 Kifejlett hímeken végzett vitellogenin mérések

A vitellogenin kifejeződés serkentéséhez ivarérett zebradánió hímeket 21 napon át kezeltem különböző koncentrációjú zearalenon oldatokkal. Pozitív kontrollként 17-ß-ösztradiol 100 ng/l-es oldatát használtam. A kezelőmedencékbe 4 naponta friss kezelőelegy került. Az analitikai

vizsgálatok eredménye alapján a zearalenon koncentráció a nominális (várt) koncentráció 64 és 134 %-a között mozgott a kezelő elegy frissítését megelőzően (a 4. napon), de az esetek többségében az OECD által előírt ± 20%-os tartományban maradt.

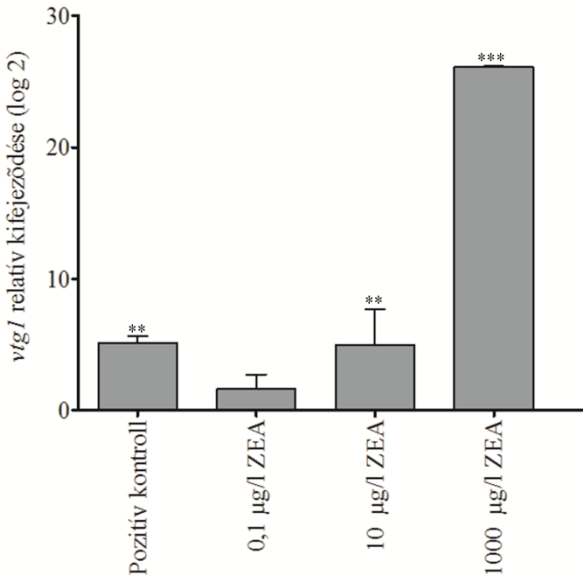
A kezelést követően az egyes hímekből származó teljes test homogenizátumokat két részre osztottam. Az egyikben a vitellogenin fehérje szintjét mértem ELISA módszerrel, a másikban a *vtg1 mRNS* szintjét vizsgáltam. A kétféle vizsgálatot azért végeztem el, hogy összevethessem a fehérje és *mRNS* szinten mérhető indukciót. Az embriók túlságosan kis méretűek ahhoz, hogy megfelelő mintát szolgáltassanak az ELISA vizsgálatokhoz. Valós idejű PCR vizsgálatokhoz azonban alkalmasak, ezért egy olyan duplex real-time PCR módszert dolgoztam ki, amellyel egy reakcióban vizsgálható a vitellogenin és a viszonyítási alapként szolgáló referencia gén (*ß-aktin*) szintje. A módszert először a kifejlett hímek mintáin alkalmaztam.

A zearalenon minden vizsgált töménységben kiváltotta a vitellogenin koncentrációfüggő termelődését, bár szignifikáns eltérés a negatív kontrollhoz képest csak a legnagyobb koncentrációban volt tapasztalható (46. ábra).



46. ábra Vitellogenin termelődés mérése zearalenon hatására ivarérett hímekben, ELISA módszerrel, teljes test homogenizátumból. A jobb oldalon az ELISA plate fotója látható, a jobb oldalon a vitellogenin sztenderdhez viszonyított fehérjeértékek ng-ban kifejezve, 1 g halra vonatkoztatva. Az eredményeket egyszempontos varianciaanalízissel (One-way ANOVA) vetettem össze (***: P<0,001) (ZEA: zearalenon, Pozitív kontroll: 100 ng/l 17-ß-ösztradiol, VTG: vitellogenin fehérje).

A valós idejű PCR alátámasztotta az ELISA eredményét, a zearalenon által kiváltott koncentrációfüggő vitellogeninválaszt. *mRNS* szinten a vitellogenin szignifikáns indukcióját a pozitív kontrollban valamint 10 és 1000 µg/l zearalenon kezelés esetén tapasztaltam (47. ábra).

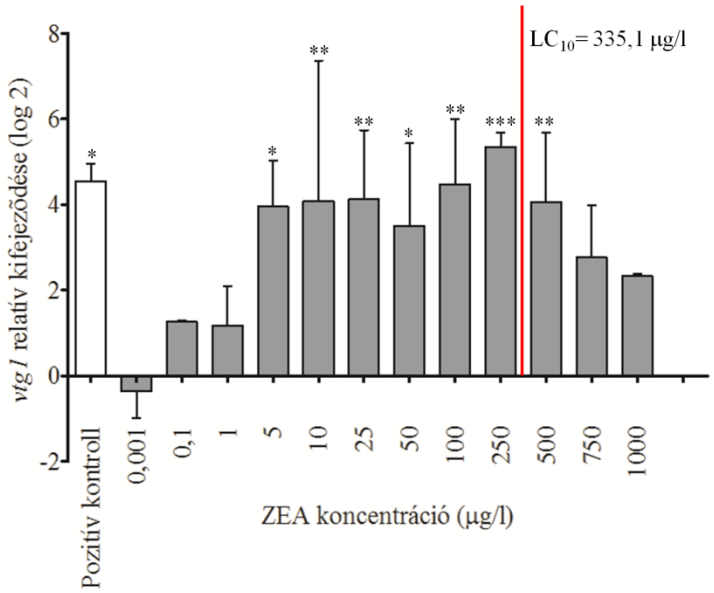


47. ábra Vitellogenin-1 mRNS szint mérése zearalenonnal kezelt zebradánió hímekben, valós idejű kvantitatív PCR-rel. Az adatokat egyszempontos varianciaanalízissel (One-way ANOVA) értékeltem (**: P<0,05, ***: P<0,001) (ZEA: zearalenon, Pozitív kontroll: 100 ng/l 17-ß-ösztradiol, *vtg1*: *vitellogenin-1 mRNS*).

A két módszer eredményeinek normalizálását követően (%) az *mRNS* és fehérje szintű indukciót Pearson korrelációval vetettem össze. Az eredmények magas szintű, statisztikailag igazolható összefüggést mutattak (R^2= 0,9789, p= 0,0037). A real-time PCR módszer ez alapján jó alternatíva lehet a vitellogenin indukció vizsgálatában.

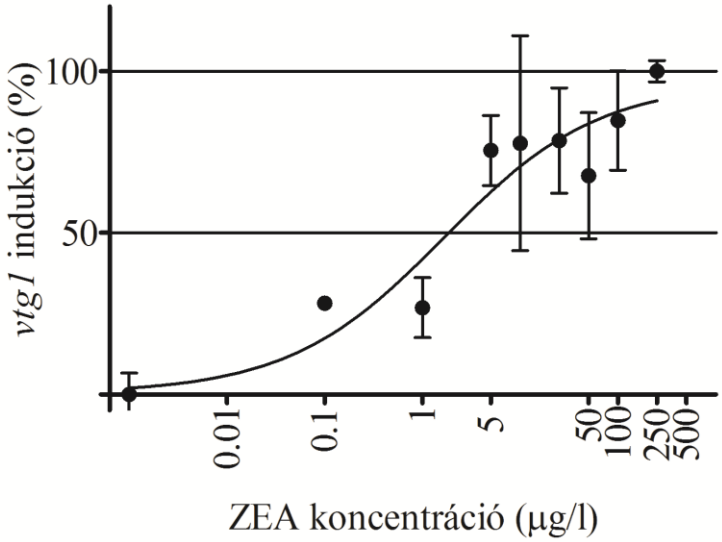
5.5.2.2 Vitellogenin szint mérése embriókorban

A mérésekhez a FET tesztből származó, 5 napos embriókból képzett csoportokat használtam (10 embrió/csoport). A zearalenon a legalacsonyabb koncentráció (0,1 µg/l) kivételével embriókorban is koncentrációfüggően serkentette a vitellogenintermelést, bár bizonyos koncentrációkban kissé visszaesik. Szignifikáns indukciót az 5 µg/l és afölötti koncentrációk tudtak kiváltani. A legnagyobb mértékű indukciót a 250 µg/l-es kezelés esetén mértem, magasabb koncentrációkban a vitellogenin termelődés fokozatosan visszaesett. Az embrióteszt eredmények alapján az embriók 10%-ának pusztulásához 335,1 µg/l zearalenon koncentráció szükséges. Ennél töményebb oldatokban az embriók sejtjei, így a májsejtek is károsodnak, ami feltételezhetően a vitellogenin indukció hanyatlását okozza (48. ábra), ezért a toxikológia vizsgálatokban általános előírás, hogy molekuláris vizsgálatok csak LC_{10} alatti koncentrációkban végezhetők. Az adatok nagymértékű szórást mutattak, ami összefüggésben állhat a vitellogenin *in situ* hibridizációnál megfigyelt egyedi különbségekkel (4.4 fejezet).



48. ábra Zebradánió embriókban mért vitellogenin indukció mértéke 5 napos korban, zearalenon kezelés hatására. A szignifikanciaszintet egyszempontos varianciaanalízissel (One-way ANOVA) vizsgáltam (*: p<0,01**: p<0,05, ***: p<0,001) (ZEA: zearalenon, Pozitív kontroll: 100 ng/l 17-ß-ösztradiol, *vtg1*: *vitellogenin-1 mRNS*, $LC_{10:}$ az embriók 10%-ának pusztulását okozó zearalenon koncentráció).

Az eredmények alapján az LC_{10} alá eső koncentrációk bevonásával dózis-hatás görbét vettem fel (49. ábra). A görbe alapján meghatároztam a maximális vitellogenin indukció felének kiváltásához szükséges zearalenon koncentrációt (EC_{50}=1,648 µg/l). A pozitív kontrollban tapasztalt vitellogenin indukció nagyjából a 100 és 250 µg/l toxin által kiváltott vitellogenin válasz közé tehető.



49. ábra Zearalenon-vitellogenin dózis-válasz görbe 5 napos zebradánió embriókon végzett real-time PCR eredményei alapján (ZEA: zearalenon, *vtg1*: *vitellogenin-1 mRNS*).

6 Következtetések és javaslatok

Az elmúlt évtizedekben a környezetbe kerülő szennyezőanyagok, köztük a hormonhatású anyagok vizsgálata egyre inkább a figyelem középpontjába kerül. A környezeti toxikológia és az anyagok kimutatására alkalmas módszerek tárháza ezért folyamatosan bővül.

A halak kiemelt szerepet töltenek be a hormonhatású és az ösztrogénhatású anyagok vizsgálatában. Számos gén (ösztrogén receptor, aromatáz, koriogenin H, vitellogenin) ösztrogénhatásra aktiválódik (Lee et al., 2002.). A géntermékek kimutatása molekuláris biológiai módszerekkel fehérje vagy *mRNS* szinten is lehetséges, viszont az állat feláldozásával jár. A transzgénikus technológiák fejlődésével és a fluoreszcens fehérjék felfedezésével megnyílt az út a bioszenzor vonalak létrehozása felé, amelyek segítségével *in vivo* vizsgálhatóvá válik pl. egy ösztrogénérzékeny gén aktiválódása. A közelmúltban több ösztrogénhatást kimutató bioszenzor vonalat hoztak létre laboratóriumban használt halmodellekből, medakából és zebradánióból. A munkám kezdetekor vitellogenin és koriogenin H indukcióját kimutató medaka vonalak (Zeng et al., 2005; Kurauchi et al., 2005) és több, ösztrogén receptor aktiválódását vizsgáló zebradánió vonal (Legler et al., 2000; Tong et al., 2009) volt ismert. Időközben egy ösztogén válaszelemeket felhasználó tranziens vizsgálati rendszer és három új bioszenzor zebradánió vonal jelent meg az irodalomban (Gorelick és Halpern, 2011; Lee et al., 2012-1, 2012-2) köztük egy vitellogenin transzgenikus zebradánió vonal (*ere-zvtg1:gfp*) is (Chen et al., 2010).

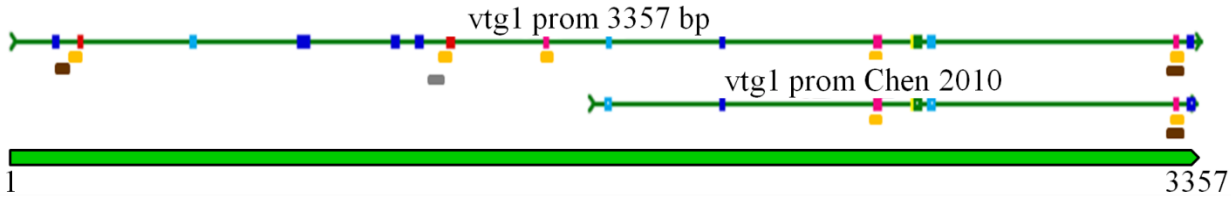
Az eddig leírt vonalakat plazmid vagy transzpozon vektorral hozták létre, kisebb promóter szakaszokkal (500 és 3005 bp). Az általam létrehozott *vtg1:*mCherry transzgenikus vonal az eddig létrehozott bioszenzor vonalak közül a legnagyobb természetes promóter szakaszt hordozza.

6.1 A vtg1:mCherry transzgenikus vonallal kapcsolatos következtetések

6.1.1 A vitellogenin-1 promóter elemzése

A gének ösztrogénválasza a promóter régió ösztrogénérzékenységétől függ, amelyben az ösztrogénválasz elemeknek nevezett szekvenciák kulcsfontosságúak. Ezért egy bioszenzor vonal kialakítása során fontos szempont, hogy a beépítendő promóter régió ösztrogénválasz elemeket hordozzon. A *vtg1:*mCherry transzgenikus vonal létrehozása során első lépésben a *vtg-1* kódoló régióját megelőző 4600 bp-os szakaszt elemeztem. Azonosítottam a feltételezett transzkripciós start helyet, majd szabadon hozzáférhető transzkripciós faktorokat azonosító programok segítségével és manuális szekvenciaazonosítással kerestem az ösztrogénválasz elemeket. A génkonstrukcióba épített 3357 bp hosszúságú promóter szakaszon összesen 26 olyan szekvenciát azonosítottam, amelyeknek szerepe lehet az ösztrogénreceptorhoz kötött válaszban. Ezzel szemben az *ere-zvtg1:gfp* vonal (Chen et al., 2010) létrehozása során alkalmazott 1700 bp-os szakaszon csupán 12 hasonló régió található. A kifejezetten ösztrogénválasz elemek azonosítására szolgáló DRAGON ERE Finder alkalmazás nem ismert fel ösztrogénválasz elemet ezen az 1700 bp-os szakaszon, a

*vtg1:*mCherry transzgén konstrukció promóter szakaszán viszont egy teljes szekvenciát azonosított (9. melléklet, 50. ábra). A szekvencia az alkalmazás szerint új ERE szekvenciának számít.
Az azonosított szekvenciarégiók átfednek, az új transzgenikus vonalhoz használt promóterszakasz összesen 17 ERE régiót hordoz, ezzel szemben az *ere-zvtg1:gfp* vonalban csak 8 szakasz található (50. ábra).



50. ábra A *vtg1:mCherry* (vtg1 prom 3357 bp) és az *ere-zvtg1:gfp* (vtg prom Chen2010) vonalba épített promóter szakaszokon azonosított, ösztrogén válaszban szerepet játszó szekvenciák (piros, kék, világoskék, zöld, sárga, rózsaszín: manuálisan azonosított ½ ERE elemek, narancs: ALGEN PROMO, barna: MATINSPECTOR, szürke: DRAGON ERE FINDER programokkal azonosított ERE szekvenciák).

Chen és munkatársai az alkalmazott promóter segítségével nem tudtak megfelelő érzékenységű vonalat létrehozni, ami valószínűleg az ösztrogénválasz elemek alacsony számának, vagy az „új ERE szekvencia" hiányának köszönhető. Ezért a promóter régió elé egy mesterséges ERE szekvenciát építettek. A *vtg1:* mCherry bioszenzor vonal kizárólag a természetes promótert hordozza, ezért jobb közelítéssel adhat választ az anyagok valós ösztrogénhatásának vizsgálatában.
Az eddig leírt ösztrogénhatást vizsgáló vonalakat plazmid vagy transzpozon vektorral hozták létre, kisebb promóter szakaszokkal (500 és 3005 bp). Az általam létrehozott *vtg1:*mCherry transzgenikus vonal az eddig létrehozott bioszenzor vonalak közül a legnagyobb természetes promóter szakaszt hordozza.

6.1.2 Klónozás

Elsőként egy hosszabb, 4082 bázispárból álló promóter szakaszt terveztem a konstrukcióba építeni. Azonban az első klónozási lépés után nem sikerült olyan plazmidot azonosítani, amely a fragmentet hordozta volna. Elképzelhető, hogy a plazmidba ilyen méretű szakasz már csak kis eséllyel építhető be, de az is lehetséges, hogy a klónozás sikeres volt, de a nagyméretű vektort nem sikerült hősokk transzformációval az alkalmazott kompetens sejtbe juttatni. A konstrukciót ezért egy kisebb promóter szakasszal (3357 bp) hoztam létre, amely mindössze 2 feltételezett ösztrogénválasz szakasszal (6 szekvencia) hordoz kevesebbet, mint a hosszabb szakasz. A teljes ERE szekvencia mindkét szakaszban megtalálható (50. ábra).
A rövidebb promóter szakaszt két egymást követő, helyspecifikus rekombináción alapuló klónozási lépéssel (*BP* és *LR*) juttattam be a végső, *Tol2* karokat hordozó vektorba. Az *LR* reakció eredményeként 3 féle, beépült fragmentet hordozó vektor jött létre. A plazmidok egy részéből mindkét szekvenciát hordozó, teljes génkonstrukció keletkezett. Néhány plazmidba viszont csak a fluoreszcens fehérjét kódoló szakasz, vagy csak a promóter régió épült be. Ezek a vektorok a későbbiekben jól használhatóak újabb konstrukciók építéséhez, az előbbibe promóter, az utóbbiba

más színű fluoreszcens fehérje gén klónozható. Így lerövidíthető az újabb konstrukciók létrehozásához szükséges idő.

6.1.3 A *vtg1:* mCherry vonal létrehozása

A *vtg1* promóter régiót és a fluoreszcens fehérjét (mCherry) kódoló, *Tol2* karokat hordozó transzpozon vektort mikroinjektálással 1-2 sejtes zebradánió embriók szikállományába juttattam. Ezt követően vizsgáltam a fluoreszcens jel tranziens kifejeződését ösztrogénindukció hatására. A szem, a szik és a vesék területén aspecifikus kifejeződést figyeltem meg, ami a tranziens génkonstrukciók esetén gyakran megfigyelhető (Müller Ferenc személyes közlés). A szikben a fluoreszcens jel a későbbi generációkban is fennmaradt, és látszólag az alacsonyabb koncentrációk hatására adott erősebb jelet. A jelenség okát nem sikerült megfejteni. Feltételezhető lenne, hogy a konstrukcióról képződő termék a vitellogeninhez hasonlóan kijut a májból és a fejlődő oocyták szikébe épül. De a feltételezést két tény is cáfolja. Egyrészt ha a hipotézis igaz lenne, a transzgenikus nőstények petefészkében is látnunk kellene a fluoreszcens jelet. A nőstényekben azonban csak a májban figyelhető meg az mCherry kifejeződése. Emellett ismert tény, hogy a vitellogenin fehérje receptorhoz kötött endocitózis révén jut be a petesejtekbe. A receptorok a vitellogenin fehérjén található szignált ismerik fel (Davail et al., 1998). Ez a konstrukcióról képződő termékre egészen biztosan nem jellemző, mert a vektor csak a vitellogenin promóter régiót hordozza a vitellogenin gén szekvenciából. Elképzelhető, hogy a termék valamilyen módon anyai *mRNS* formájában a szikbe kerülhet, de ez igen merész feltételezés. A dolgozat célja egy transzgenikus vonal létrehozása volt, ezért a jelenséget mélyrehatóbban nem vizsgáltam.

A tranziens vizsgálatok mellett az injektált embriók egy részét felneveltem, majd létrehoztam a vonal következő generációit. A P0 nemzedékből az egyedek kb. 25%-a adta tovább a konstrukciót utódainak. A *Tol2* vektorokkal elméletileg ennél nagyobb hatékonyság érhető el (40-50%). Más transzpozon vektorokkal szemben a *Tol2* vektorok előnye, hogy a konstrukció beépülésének hatékonyságát a beépített fragment mérete nem befolyásolja (csökkenti) (Kawakami, 2007). Elképzelhető, hogy esetünkben a mikroinjektálás hatékonysága volt valamivel alacsonyabb.

6.1.4 Az ösztrogénválasz kialakulásának kezdete

A vitellogenin transzgenikus vonalak nagy előnye más ösztrogénhatást vizsgáló vonalakkal szemben, hogy a gén promóter régiója szövetspecifikusan működik, ezért a génkonstrukciókról származó jel csak a májban jelenik meg. Az aromatáz transzgenikus zebradánió vonalban (*cyp19a1b-GFP*, Tong et al., 2009) is szövetspecifikus fluoreszcens fehérje kifejeződés figyelhető meg az agyban. A gén azonban ösztrogén indukció nélkül is viszonylag magas alap expressziós szintet mutat. A kontroll embriókban is megfigyelhető zöld fluoreszcens jel nehezebbé teszi a kísérletek kiértékelését. A *vitellogenin* transzgenikus vonalakban a riporter ösztrogénhatás nélkül nem lép működésbe, ezért egyértelmű igen-nem választ ad.

A zebradánió mája a megtermékenyítést követő 6. órában (6hpf) kezd kialakulni, és az 50. óra (50 hpf) után kezd el működni. Elsőként a bal oldali májlebeny jön létre, majd 96 órás korban a jobb

oldali májlebeny is megjelenik. A máj végleges formája az 5. nap környékén (120 hpf) alakul ki (Ober et al., 2003; Tao és Peng, 2009).

Feltételeztem, hogy a máj csak később kezd vitellogenint termelni. A létrehozott vonal F3 nemzedékének 0 dpf korú embrióit ezért 200 ng/l EE2-vel kezeltem, majd naponta vizsgáltam a fluoreszcens jel megjelenését. Az indukció a 2.-3 naptól volt megfigyelhető. A máj növekedésével a fluoreszcens terület nagysága is fokozatosan nőtt az embriók 5 napos koráig. Az eredmény összhangban van Chen és munkatársai (2010) megfigyeléseivel. Vizsgálataik szerint a máj az embrió 2-3 napos korától képes ösztrogénhatásra *vitellogenint* termelni. A géntermék annál később jelenik meg, minél alacsonyabb koncentrációban alkalmazzák az ösztrogént. Az általuk létrehozott vonal (*ere-zvtg1:gfp*) zöld fluoreszcens fehérje termelése is ugyanezt az eredmény mutatta, hűen igazodott a vitellogenin termelődéshez.

Megállapítottam, hogy a *vtg* transzgenikus vonalak kezelését elegendő 3 napos korban elkezdeni, a más vonalakon alkalmazott 0-1 dpf korban kezdett vizsgálatokkal szemben (16. táblázat).

A vitellogenin transzgenikus vonalakkal szemben az aromatázt alkalmazó bioszenzor zebradánió vonallal (*cyp19a1b-GFP*, Tong et al., 2009; Brion et al., 2012) az anyagok ösztrogénhatása már alacsonyabb koncentrációk esetén is kimutatható az embriófejlődés 3. napján. A fluoreszcens jel azonban jóval kisebb területre korlátozódik, mint a máj, ezért az embriókat nagyobb felbontásban kell vizsgálni. Emellett a gén alapszintű expressziója (amely nem azonos a kezeletlen embriók esetén) tovább nehezíti a kiértékelést. A kiértékelés megkezdése előtt meg kell határozni azt a küszöbértéket, ami fölött a fluoreszcens jel erőssége már indukciónak számít.

A transzgenikus vonal F1 ivarérett hím egyedein is vizsgáltam a konstrukció működésének kezdetét. A halakat 5-100 ng/l E2 oldatokkal kezeltem, majd naponta vizsgáltam a fluoreszcens jel megjelenését. A riporter válasza a kezelés 4. napjától vált láthatóvá, minden alkalmazott koncentrációban. Ezzel szemben Rose és munkatársai (2002) ELISA módszerrel végzett vizsgálatai szerint zebradánió hímekben a vitellogenin válasz kialakulásához (E2 és EE2 kezelés esetén) 5 nap szükséges. Chen és munkatársai (2010) az *ere-zvtg1:gfp* vonalban már a kezelés 2. napján is megfigyelték a fluoreszcens jel kialakulását, igaz, a jóval erősebb ösztrogénhatású anyag, EE2 100 ng/l-ben alkalmazott koncentrációja esetén. Az embriókon végzett vizsgálathoz hasonlóan azt tapasztalták, hogy a vitellogenin indukció kezelés kezdetétől számított megjelenése koncentrációfüggő. Ez alapján feltételezhető, hogy a dolgozatban bemutatott bioszenzor vonal is képes lenne magasabb koncentrációk hatására már a 2. napon indukciót mutatni. Emellett valószínűleg érzékenyebb, mint az *ere-zvtg1:gfp* vonal, mert a gyengébb ösztrogénhatású E2 igen alacsony koncentrációjának (5 ng/l) hatására is képes már 4 nap után reagálni. Sőt, valószínűleg még alacsonyabb koncentrációk kimutatására is alkalmas, mivel az *ere-zvtg1:gfp* vonal a legalacsonyabb koncentrációban csak 7 nappal a kezelés kezdete után kezdte el a zöld fluoreszcens fehérjét termelni. A legalacsonyabb kimutatható ösztrogénkoncentráció (LOEC) az *ere-zvtg1:gfp* transzgenikus zebradánió vonal esetében 0,1 ng/l EE2, a vitellogenin transzgenikus medaka vonal (Zeng et al., 2005) esetében pedig annál jóval magasabb, 50 ng/l EE2 volt. A vtg1:mCherry

zebradániók érzékenységének pontos megállapításához kifejlett korban még további vizsgálatok szükségesek.

6.1.5 A vtg1:mCherry zebradánió vonal ösztrogénérzékenysége embriókorban

A létrehozott vonal ösztrogénérzékenységét más modellekkel összevetni nehéz feladat. Az eddig leírt bioszenzor vonalakat mind más-más protokoll szerint tesztelték, általában fiatal lárva vagy felnőtt korban (18. táblázat). Az *pEREtata-Luc* transzgenikus zebradánió vonal kezelését például 6 hetes korban végezték, 48 vagy 96 órás kitettséget követően (Legler et al., 2000). Ennek oka, hogy a zebradánió ösztrogén receptorai az ivarszervek differenciálódásának kezdetét (28 dpf) követően jóval nagyobb mértékben fejeződnek ki, mint a korábbi fejlődési stádiumokban. A vonal így 100 nM, azaz kb. 27 µg/l 17-ß-ösztradiol szinttől volt képes kimutatni az ösztrogénhatást. A később kifejlesztett ERE transzgenikus vonalakat már egynél több ERE elem beépítésével hozták létre, ezért érzékenységük felülmúlja az első ösztrogénhatást kimutató vonal érzékenységét (16. táblázat). Az elmúlt évtizedben az állatvédelmi törvények szigorúbbá váltak, és a kísérlettervezéskor egyre inkább követelmény a 3R stratégia. A halak és kétéltűek lárváit azonban a táplálkozó kor eléréséig (zebradánió esetében 5 dpf korig) a jelenleg hatályos rendszabályok nem tekintik élő állatnak (Animals (Scientific Procedures) Act 1986 of the UK, Directive 86/609/EEC Art. 2b of the European Union). Ezért mind inkább olyan tesztelési protokollok kidolgozása kerül előtérbe, amelyek legfeljebb a táplákozó kor eléréséig, vagy a legfrissebb álláspont szerint az úszóhólyag megjelenéséig tartanak. Így az aromatáz enzim aktiválódását kimutató zebradánióra (*cyp19a1b-GFP*) kidolgozott tesztmódszer során már az embriókat korábbi fejlődési stádiumban, 5 napos korban vizsgálják. Az eddig létrehozott legérzékenyebb, tandem ERE szakaszokat hordozó zebradánió modell már 3 napos korban is megbízható eredményt ad (Lee et al., 2012-1).

bioszenzor vonal	**referencia**	**tesztelés kezdete**	**időtartama**	**LOEC (E2)**
pEREtata-Luc zebradánió	Legler et al., 2000	6 hetes kor	48 vagy 96 h	**100nM≈27 µg/l**
5xERE-GFP zebradánió	Gorelick és Halpern, 2011	6-8 hpf	72 h	**500 ng/l**
3pERE-TATA-Gal4ff zebradánió	Lee et al., 2012	0 hpf	72 h	**5-10 ng/l**
pMVTG1-EGFP medaka	Zeng et al., 2005	3 hónapos kor	30 nap (boncolva)	**100 ng/l**
ere-zvtg1:gfp zebradánió	Chen et al., 2010	7 dpf	13 nap	**100 ng/l**
cyp19a1b-GFP zebradánió	Tong et al., 2009 (Brion et al., 2012)	0 dpf	5 nap	**nincs adat**

16. táblázat Az ösztrogénhatást kimutató bioszenzor halak érzékenysége és a tesztelések időtartama

A dolgozatban bemutatott transzgenikus vonal érzékenyebbnek tűnik az eddig leírt, természetes promótert hordozó medaka és zebradánió vonalaknál. A kezelés a leírt protokollokkal szemben 3

napos korban kezdődik és az embriók 5 napos koráig tart. A vonal a 3 napos kitettséget követően már képes kimutatni 100 ng/l 17-ß ösztradiol hatását. Ezzel szemben az *ere-zvtg1:gfp* vonal ezt a koncentrációt csak 13 nap kezelést követően mutatja ki, az aromatáz bioszenzor vonal pedig 130 ng/l koncentrációtól reagál az anyagra. A vitellogenin aktiválódását kimutató medaka vonal (*pMVTG1-EGFP*) csak kifejlett korban képes ezt a koncentrációt kimutatni, és a fluoreszcens jel csak a halak felboncolását követően válik láthatóvá, azaz az in vivo érzékenység ennél alacsonyabb. A *vtg1:*mCherry vonal érzékenységét csupán a legújabb, szintetikus ERE szekvenciákat hordozó vonal (*3pERE-TATA-Gal4ff*) múlja felül (18 táblázat), ami a nagyszámú beépített ERE szakasznak köszönhető. A természetes promóterek ilyen mennyiségben nem hordoznak ERE szakaszokat.

Érdekes, hogy az általam kialakított új vonalban még a 4. generációban is jellemző, hogy a kezeléseket követően nem jelenik meg minden utódban 5 napos korra a fluoreszcens jel. A világító embriók száma anyag és koncentrációfüggő. Ugyanezt figyelték meg a zöld fluoreszcens fehérjét termelő zvtg1:gfp transzgenikus vonal és a tandem ERE szakaszokat hordozó *3pERE-TATA-Gal4ff* zebradánió vonal esetében is. Ennek igazolására whole mount *in situ* hibridizációval vizsgáltam az endogén vitellogenin kifejeződését a májban gyenge és erős jelet adó és a fluoreszcens jelet nem mutató embriókban. A hibridizáció előtt az embriókról fluoreszcens felvételeket készítettem, majd az mCherry-t kifejező területeket összevetettem a vitellogenin *in situ* hibridizáción megmutatkozó kifejeződési helyével. Bár az összevetést nem lehet pontosan elvégezni, mert az embriók az *in situ* hibridizáció során torzulnak, egyértelműen kiderült, hogy azok az embriók, amelyekben a fluoreszcens jel gyenge volt a *vitellogenint* is alacsonyabb szinten és ugyanazon a területen fejezték ki. A vitellogenin kifejeződését nem transzgenikus, vad típusú embriókban is vizsgáltam, és megállapítottam, hogy a vitellogenin kifejeződése nagy szórást és egyedi érzékenységbeli különbségeket mutat. A jelenséget feltehetően az ösztrogén receptor működését befolyásoló egyéb faktorok okozzák. Amennyiben ezek a faktorok genetikai eredetűek, egyszerű szelekcióval kiszelektálhatók a legérzékenyebb genotípusok és csökkenthetők az egyedi különbségek.

6.1.6 A *vtg1:*mCherry zebradánió vonal ösztrogénérzékenysége ivarérett halakban

Jóllehet, az előírások miatt minél fiatalabb korban célszerű elvégezni a vizsgálatokat, a zebradánió ösztrogénérzékenysége az ivarszervek kialakulásának kezdetétől fokozatosan nő (Legler et al., 2000). Emellett a „receptorösszetétel” is változik. Legler és munkatársai (2000) az ERα már 1 napos korban is kifejeződik, de a zebradánió embriók májában 5 napos korig csak az ERß2 receptor található meg (Gorelick és Halpern, 2011). Más vizsgálatok szerint az ER-ok a májban valószínűleg már 1 dpf korban is működnek (Lee et al., 2012), de a sejtek még nem képesek vitellogenint termelni (Chen et al., 2010). Chandrasekar és munkatársai (2010) mélyrehatóbb vizsgálatai szerint az ösztrogén receptorok az embrió 3 órás korában kezdenek kifejeződni. Kezdetben a három receptortípus közel azonos mennyiségben jön létre, majd a *esr2a* gén (*ERß1*) kifejeződése fokozatosan csökken és ezzel párhuzamosan nő a ERα és ERß2 receptorokat kódoló gének (*esr1 és esr2b*) kifejeződése. 5 napos korban az ERα túlsúlya jellemző, de jelentős az ERß2 jelenléte is. Kifejlett egyedek májában már mindhárom ösztrogénreceptor megtalálható, legnagyobb számban az

ERß1 (*esr2a*), kisebb számban az ERß2 és az ERα. Ez alapján egyértelmű, hogy a kifejlett zebradániók mája jóval érzékenyebb, mint az embrióké, illetve valószínűleg olyan anyagok kimutatására is képes, amelyekre embrió/lárva korban még nincs lehetőség.

A *vtg1:*mCherry vonal érzékenységét ezért kifejlett korban is vizsgáltam. Kezeléseket eddig még csak az F1 generáció hím egyedein végeztem, 17-ß-ösztradiol különböző koncentrációival. Dózis-hatás görbéket nem vettem fel, mert ebben a stádiumban még a vonal nem volt homogén, és a vizsgált egyedek a konstrukcióra nézve hemizigóták voltak, azaz a kromoszómapárok egyik tagján hordozták a beépült szekvenciát. Az érzékenység mégis szembetűnő volt, a halak már a legalacsonyabb alkalmazott koncentrációra (5 ng/l) is egyértelmű választ adtak 4 nap kitettséget követően. A zvtg1-gfp vonalban ugyan az ivarérett hímek 0,1 ng/l α-etinil-ösztradiolt ki tudtak mutatni, de csak 7 nap kitettség után, a medaka vonal pedig csak 100 ng/l 17-ß-ösztradiol koncentrációtól képes az ösztrogénhatás kimutatására, 30 nap kezelést és boncolás követően. Az α-etinil-ösztradiol az 17-ß-ösztradiol-nál jóval erősebb ösztrogénhatással bír, a különbség nagyjából 16,5-ös (Rose et al., 2002).

A *vtg1:*mCherry transzgenikus vonal kifejlett, kezeletlen nőstényeinek májában a fluoreszcens fehérje olyan erősen fejeződik ki, hogy a pigmentált testfalon keresztül is igen intenzív jelet ad. Az *ere-zvtg1:gfp* vonal ikrásaiban a zöld fluoreszcens fehérje jele ezzel szemben kezelés nélkül csak gyengén kivehető. Bár közvetlen összehasonlításra eddig nem volt lehetőség, a rendelkezésre álló adatok alapján feltételezhető, hogy az új transzgenikus vonal kifejlett korban is érzékenyebb, mint a Chen és munkatársai (2010) által létrehozott vonal vagy a medaka vonal. A kifejlett korban jellemző érzékenység pontos megállapításához azonban további kísérletek szükségesek.

6.1.7 A *vtg1:*mCherry zebradánió vonal vizsgálata különböző ösztrogénhatású anyagokkal

A létrehozott vonal érzékenységének meghatározásához a vonal F4 embrióit 17-ß-ösztradiol, 17-α-etinilösztradiol, zearalenon, biszfenol-A, nonilfenol és atrazin különböző koncentrációival kezeltem 3-5 dpf korig. Az eredmények alapján dózis-hatás görbéket vettem fel.

Az embriók a 17-ß-ösztradiolt 100 ng/l, a 17-α-etinilösztradiolt 1 ng/l, a zearalenont 100 ng/l, a biszfenol-A-t 1 mg/l-től tudták kimutatni, a jelerősség alapján 8,304; 0,1064; 9,68 és 2198 µg/l, a fluoreszkáló embriók száma alapján pedig 6,46; 0,2308; 7,31 és 2530 µg/l EC_{50} értékekkel. A két kiértékelés alapján kapott értékek kis mértékben térnek el. Kivételt képez az 17-α-etinil-ösztradiol, ahol az embriók száma alapján a vonal lényegesen érzékenyebbnek tűnhet. Az eltérés oka a magasabb koncentrációk által kiváltott nagy fluoreszcens jelerősség, ami még akkor is fokozódik, amikor a fluoreszkáló embriók száma már alig változik. Így érdemes lehet a két kiértékelés alapján egy összevont értéket képezni (pl. a két érték szorzatából), amellyel a vonal érzékenységét még pontosabban meg lehetne adni. Az új vitellogenin transzgenikus vonal érzékenysége a környezetben vagy az elfolyó vizekben előforduló koncentrációtartományokba esik, ezért a kifejlesztett tesztelési protokoll mellett bioszenzor vonalként környezeti minták tesztelésének hatékony eszköze lehet. A legtöbb leírt ösztrogénszenzitív vonal esetében dózis-hatás görbéket embriókorban nem vettek fel. A *zvtg1:gfp* vonal a 17-ß-ösztradiolt 100 ng/l, a zearalenont 50 µg/l, a biszfenol-A-t 1 mg/l

koncentrációtól mutatta ki. A határértékek a zearalenon kivételével hasonlóak, viszont a kezeléseket 7 napos korban kezdték és 20 napos korig végezték, amikor az ösztrogén receptorok száma már magasabb, mint 5 napos korban. Az aromatáz bioszenzor vonal esetében felvett dózis hatás görbék alapján a 17-ß-ösztradiolra 0,48 nM (≈130 ng/l), a 17-α-etinilösztradiolra 0,013 nM(≈ 3,85 ng/l), a zearalenonra 16 nM (5093 ng/l), a biszfenol-A-ra 3303 nM (754,04 µg/l) EC_{50} értékek jellemzőek. A kezeléseket 0-5 dpf korig végezték. Az értékek alacsonyabbak, mint az új transzgenikus vonal EC_{50} értékei, azonban bár a legalacsonyabb kimutatható koncentrációkat a publikációban nem írták le, az ábrák alapján az értékek közel esnek vagy alig alacsonyabbak, mint a vtg1:mCherry vonal értékei, de úgy tűnik, az agyi aromatáz a biszfenol-A-ra érzékenyebb. A különbségek fő oka a gének érzékenységének eltérése, valamint a két területen kifejeződő, eltérő számú és típusú ösztrogén receptorokkal magyarázható. Az aromatáz aktiválódását kimutató vonal vizsgálata viszont nehezebben megoldható, mint a vitellogenin transzgenikus vonalé. A fluoreszcens jel kifejeződés igen kis területre korlátozódik, ezért a vizsgálatokat konfokális mikroszkóppal végezték. Emellett az aromatáz (így a fluoreszcens jel is) kezelés nélkül is kifejeződik, így a kiértékelés során meg kell adni azt az alap kifejeződési szintet, ami fölött már indukcióról beszélhetünk. Ezzel szemben a vitellogenin transzgenikus vonalban a fluoreszcens jel jóval nagyobb területet érint (máj), és a kezeletlen embriókban nem figyelhető meg fluoreszcens aktivitás, ezért egyértelmű igen-nem választ kapunk.

Nonilfenol esetében csak néhány embrió májában, igen kis területre kiterjedően figyeltem meg a fluoreszcens fehérje kifejeződését a májban, ez azonban kevésnek bizonyult ahhoz, hogy megfelelő dózis-hatás görbéket sikerüljön felvenni. A *zvtg1:gfp* vonal nonilfenolra nem ad választ, míg az aromatáz transzgenikus vonal 406 nM EC_{50} értékkel volt képes kimutatni egy 4-nonilfenolokból álló keverék hatását. Az atrazin 5 napos korban nem befolyásolta a vitellogenin szintet. A többi anyaggal ellentétben hatását nem közvetlenül az ösztrogén receptoron keresztül fejti ki, hanem az aromatáz enzimet indukálja, amelynek hatására a szervezetben tesztoszteronból ösztrogén keletkezik. Az így termelődő ösztrogén már indukálhatja a vitellogenin termelődését. A tesztoszteron azonban a többi nemi hormonhoz hasonlóan embriókorban még nincs jelen, csak az ivari differenciálódás kezdetén indul meg a termelése. Feltételezhető, hogy ivarérett hímekben már képes a fluoreszcens fehérje termelődését előidézni, ennek megállapításához azonban további vizsgálatok szükségesek. Az atrazin hatását az aromatáz bioszenzor vonalon nem vizsgálták.

Az új vonal vizsgálata során kapott EC_{50} értékek alapján meghatároztam az egyes anyagokra jellemző ún. „relatív ösztrogénpotenciált”, azaz az anyagok ösztrogénhatásának erősségét a szervezetben jelenlévő 17-ß ösztradiollal összevetve. Ez alapján a 17-α-etinilösztradiol 78x tűnt erősebbnek, a zearalenon nagyjából azonos ösztrogénhatással rendelkezett, míg a biszfenol-A ösztrogénpotenciálja mindössze 5% volt a referenciához képest. Rose és munkatársai (2002) szerint az EE2 nagyjából 16,48x erősebb ösztrogénhatással rendelkezik, mint az E2. Azonban a vizsgálatokat kifejlett egyedeken végezték, amelyekben az ösztrogénreceptor összetétel jelentősen eltér az embriókorban megfigyelhetőtől. A legfeltűnőbb a zearalenon és az E2 hasonló ösztrogenitása. Az élesztő alapú rYES rendszerben a zearalenon 250x gyengébbnek tűnik az E2-höz

képest (Schwartz et al., 2010), míg atlanti lazac lárvákban fele olyan erősnek bizonyult (Arukwe et al., 1999). Az eddigi vizsgálatok alapján a zearalenon 17-ß-ösztradiolhoz vizsonyított ösztrogenitása igen nagy tartományban mozog, 5,4-1439x gyengébb, mint az E2 (Le Guevel és Packdel,2001; Olsen et al., 2005; Tollefsen et al., 2003). Az eltérések a modellrendszerek közti különbségekből és a mérési módszerekből adódnak, azonban egyik vizsgálat eredménye sem utal arra, hogy a zearalenon az E2-vel azonos ösztrogénhatással rendelkezne. Elképzelhető, hogy az anyag affinitása az embriókori receptorokhoz erősebb, de a jelenség magyarázatához további vizsgálatok szükségesek.

6.1.8 A *vtg1:*mCherry zebradánió vonal általános értékelése

A hormonhatású és más, környezetben előforduló toxikus anyagok hatásának vizsgálata összetett megközelítést igényel. Az OECD és az amerikai EPA is többszintű, ún „tiered" rendszer szerint írja elő az egyes anyagok vizsgálatát, amelyeknek a számítógépes becsléstől az *in vitro* tesztrendszereken át az alternatív *in vivo* tesztek és emlőstesztek is részét képezik. A rendszerek más-más mechanizmussal működnek, érzékenységük is eltérő. Az egyes anyagok affinitása például a különböző élőlényekből származó ösztrogén receptorokhoz más és más lehet. A zebradánió ß és γ (ß2) receptoraihoz a xenoösztrogének nagyobb affinitással kötődnek, mint a humán ER-okhoz. Az *in vivo* tesztek vagy a zebradánió ER-okat felhasználó *in vitro* rendszerek ezért nagyobb érzékenységgel reagálhatnak a környezeti ösztrogénekre (Legler et al., 2002). Emellett a zebradánió az *in vitro* tesztekkel ellentétben nem csak egy sejt vagy receptor válaszáról ad információt, hanem a szervezetben lezajló komplex folyamatok vizsgálatát is lehetővé teszi. A zebradánió mellett a másik legnépszerűbb kisméretű modellhal a medaka. Valós idejű kvantitatív PCR vizsgálatok eredményei alapján úgy tűnik, hogy a medaka rövidtávon gyorsabban képes a xenoösztrogénekre reagálni, a zebradánióban azonban hosszabb távon a vitellogenin nagyobb mértékben indukálható. Ezért a medaka az akut, míg a zebradánió a krónikus vizsgálatokhoz lehet jobb alany (Tong et al., 2004). A vitellogenin transzgenikus vonalak összevetése alapján viszont a *vtg1:*mCherry *vonal* rövidebb távon is hatékonyan képes a környezeti ösztrogénhatás kimutatására. Érzékenysége alulmarad a legújabb ERE elemeket hordozó vonalhoz képest. Az ERE transzgenikus vonalak azonban inkább a hatásmechanizmus és szövetspecificitás vizsgálatokhoz jó modellek, dózis-hatás összefüggés vizsgálatokhoz pedig azok a vonalak használhatóak jobban, amelyekben a fluoreszcens jel szövetspecifikusan fejeződik ki. A *vtg1:*mCherry vonal a későbbiekben környezeti toxikológiai tesztelések mellett segítséget nyújthat az ivarérés során az ösztrogéntermelés kezdetének felderítésében, morfolino injektálással vagy génkiütéssel az ösztrogénhatás és a vitellogenin aktiválódás molekuláris hátterének felderítésében. Elképzelhető, hogy a nőstény egyedek androgének vizsgálatára is alkalmasak lehetnek, ahol a kiértékelés alapját a fluoreszcens jel erősségének csökkenése adhatja. Emellett toxikus anyagok májra gyakorolt káros hatásainak *in vivo* vizsgálatára is lehetőséget adhat.

6.2 A zearalenon hatásának vizsgálata alapján levont következtetések

A zearalenon a legismertebb mikotoxinok közé tartozik, és jelenleg az egyetlen ismert mikoösztrogén. A világ számos országában elterjedt, ezért előfordulását széleskörűen tanulmányozták, biológiai hatásait halakban azonban eddig csak néhány faj esetében vizsgálták, lárva és kifejlett korban (atlanti lazac (*Salmo salar*) (Arukwe et al., 1999), szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) (Olsen et al., 2005; Tollefsen et al., 2003; Van den Belt et al., 2003; Wozny, 2010), tűzcselle (*Pimephales promelas*) (Johns et al., 2011), ponty (*Cyprinus carpio*) (Vanyi et al., 1974; Sandor and Vanyi, 1990)). A toxikus hatás és a vitellogenin indukció ismerete embriókorban, a fejlődés egyik legkritikusabb szakaszában is kulcsfontosságú lehet, főként a gazdaságilag fontos halfajok (pl. ponty) szempontjából, amelyek a takarmányok révén igen magas zearalenon koncentrációkkal érintkezhetnek. A dolgozatban ezért a bioszenzor vonal létrehozása mellett a zearalenon hatásait zebradánió embriókon mélyrehatóbban is tanulmányoztam.

6.2.1 A zearalenonnal végzett halembrió toxicitás teszt értékelése

Az embriók kezelését az OECD által javasolt protokoll (2006) szerint végeztem, de a vizsgálatok időtartamát a vitellogenin génkifejeződés vizsgálatok miatt 48 óráról 120 órára hosszabbítottam meg (Muncke et al., 2007).

A zearalenonra jellemző, 24, 48, 72, 96 és 120 órás korra meghatározott LC_{10} és LC_{50} értékek a környezeti koncentrációkhoz képest 10-1000x magasabbnak adódtak. Ez alátámasztja azt a megfigyelést, hogy a zeralenon jelentős ökotoxikológiai kockázatot nem hordoz, azonban hozzájárulhat a környezeti minták összesített ösztrogén potenciáljához (Schwartz et al., 2013; Maragos, 2012).

Az embriótesztek során az általános, toxicitásra utaló jelek (sziködéma, szívburok ödéma, pigmentáltságbeli eltérések) mellett két, a zeraralenonra jellemző rendellenességet figyeltem meg. Már 48 órás korban is látható volt, hogy az anyag hatására az embriók teste háti irányba görbül. Az görbület mértéke 72 órás kortól, 250 µg/l koncentráció fölött egyértelmű koncentrációfüggést mutatott. A rendellenesség eddigi megfigyeléseim alapján más ösztrogén hatású anyagok esetében is megfigyelhető, azonban élettani és molekuláris hátterét eddig nem vizsgáltam. Az elváltozás nagy hasonlóságot mutat az irodalomból ismert ún. *heart and soul (has)* mutánsok fenotípusával, amely az atipikus protein-kináz C (*aPKC*) gén mutációjára vezethető vissza. A mutánsok teste felfelé görbül, emellett szívburok megnagyobbodás és epiteliális rendellenességek alakulnak ki az emésztőrendszerben, a szemben és az idegrendszerben. A rendellenes szívburok és szemek a zearalenon esetében is megfigyelhetőek voltak a hasonló fenotípusú embriókban. A *has* mutáció a Par3/Par6/aPKC komplexre hat, amely gerincesekben fontos szerepet tölt be a sejtpolaritás, valamint az epitheliális szövetek kialakulásában és bizonyos szervek fejlődésében, így összefüggésbe hozható a testgörbület kialakulásával (Horne-Badovinac et al., 2001; Peterson et al., 2001). A fenotípust a szójából származó, ösztrogén hatású genistein esetében is megfigyelték (Bakkiyanathan et al., 2010). A genistein hatékony protein-tirozin kináz inhibitor, így feltételezhető, hogy a zearalenon is a kinázok gátlásán keresztül idézi elő a *„has-szerű”* fenotípust. A

bizonyításhoz, illetve a Par3/Par6/aPKC komplexre gyakorolt esetleges hatás felderítéséhez további vizsgálatokra lesz szükség.

A zearalenon másik érdekes fejlődésbiológiai hatását 72 hpf korú lárvák farokrégiójában figyeltem meg. A zebradánió lárvák testét szegélyező pigmentsáv normál esetben hasi oldalon, a farokúszó eredési helyénél megszakad. 500 µg/l és afölötti zearalenon koncentrációk esetén azonban a pigmentsáv folyamatos marad. A jelenséget korábban Hadzhiev és munkatársai (2007) figyelték meg *Shh* (sonic hedgehog) funkcióvesztéses mutánsokban, majd később metil-higany (MeHg) kezelés hatására is beszámoltak a fenotípus kialakulásáról (Yang et al., 2009). A metil-higany valószínűleg nem befolyásolja az *Shh* útvonalat, így feltételezhetően más útvonalon keresztül, a szöveti újraépülésben (remodelling) szerepet játszó metalloproteázokra (Mmp9 és Mmp13) hatva alakítja ki a fenotípust. Más nehézfémek és vegyületeik nem okoznak hasonló elváltozást (Yang et al., 2009). A metil-higany endokrin rendszert megzavaró hatással is rendelkezik (Darbre 2006; Georgescu et al., 2011), így feltételezhető, hogy a zearalenon is hasonló útvonalakon keresztül alakítja ki a megfigyelt rendellenességet.

6.2.2 A zeralaneon vitellogenin indukcióra gyakorolt hatásának értékelése

A zearalenon ösztrogén hatását a vitellogenin termelődés serkentésén keresztül vizsgáltam, különböző zearalenon koncentrációkkal 21 napig kezelt, kifejlett zebradánió tejesekben és az embriótesztből származó 5 napos embriókban. A géntermékет a kifejlett egyedek mintáiból fehérje és *mRNS* szinten is kimutattam (ELISA és valós idejű PCR módszerrel), míg az embriók esetében a vizsgálatokat csak *mRNS* szinten végeztem el.

Zebradánió hímekben korábban Schwartz és munkatársai (2010) mutatták ki a vitellogenin koncentrációfüggő indukcióját, 21 napon át, átfolyóvizes rendszerben végzett kezelést követően. A vitellogenin géntermékет fehérje szinten, ELISA módszerrel vizsgálták a kezelt halak vérplazmájában. A zebradánió lárvák kis mérete miatt azonban korai fejlődési stádiumokban a Vitellogenin szint ELISA-val nem mérhető, ezért Muncke és munkatársai (2006, 2007) egy valós idejű, kvantitatív PCR alapú kimutatási eljárást dolgoztak ki. Munkám során egy ettől eltérő, duplex valós idejű PCR módszert hoztam létre, amelyet kifejlett és embrió korú zebradániókon is teszteltem.

A hímek esetében a fehérje és *mRNS* vizsgálatok eredményeit egymással összevetve azt tapasztaltam, hogy a két módszer (ELISA és duplex real-time PCR) eredményei jól korreláltak egymással (R^2= 0.9789, p= 0.0037). A szoros korreláció meglepő lehet, mert a fehérjék közismerten stabilabbak, mint az elsődleges géntermék (*mRNS*). Zebradánióban a vitellogenin fehérje fél életideje 2,4 nap (Andersen et al., 2003), az *mRNS* stabilitásáról azonban nincs adat. Érdekes jelenség, hogy karmosbékákban exogén ösztrogének képesek a vitellogenin mRNS-t stabilizálni (Brock és Saphiro, 1983), ami zebradánió esetében is előfordulhat. Az összevetés során azonban nem a kétféle géntermék összes mennyiségét határoztam meg, hanem az indukciók mértékét (*mRNS* relatív %-os mennyisége és a fehérje relatív mennyiségi növekedése alapján) vetettem össze, ami szintén magyarázhatja a szoros összefüggést.

Kifejlett hímekben a legalacsonyabb vizsgált zearalenon koncentráció (0,1 μg/l) is kiváltotta a vitellogenin termelődést. Annak felderítésére, hogy kifejlett korban ennél alacsonyabb koncentrációk is hatnak-e a vitellogenin termelődésre, további vizsgálatok szükségesek, azonban embrióknál a 0,1 μg/l-es koncentráció bizonyult a legkissebb hatásos dózisnak. Ez a koncentráció közel áll a szennyvizekben kimutatható zearalenon értékekhez. Az embriókorban megfigyelt EC_{50} érték (3,247 μg/l) 100-szor magasabb a környezeti koncentrációknál és 53,5-ször alacsonyabb, mint az EE2 esetében, 5 napos embriókban tapasztalt EC_{50} érték (Muncke et al., 2007). A lárvákban a legmagasabb *vtg mRNS* szintet 250 μg/l kezelés hatására mértem, magasabb koncentrációkban a *vitellogenin* termelés visszaesett. A 120 órás korban 335,1 μg/l LC_{10} érték volt jellemző, ezért valószínű, hogy a magasabb koncentrációkban az embriók sejtjei már pusztultak, ezért élettani folyamataik lassultak.

A hímekben és embriókban mért *vtg mRNS* szintek szintén szoros korrelációt mutattak (R^2=0,998, p=0.002). Az összehasonlítás nem pontos a hímeken vizsgált kisszámú koncentráció, valamint az eltérő kezelési protokollok miatt. Bár a hímek kezelését 21 napon át végeztem, Rose és munkatársai (2002) megfigyelése alapján valószínű, hogy a vitellogenin szint már az 5. nap környékén (koncentrációtól függően) elérte maximumát és a kezelés további szakaszában nem változott. Az elméletet a vitellogenin transzgenikus zebradániókon kapott eredmények is megerősítik (lásd 5.1.4. fejezet). Bár a zebradánió embriók/lárvák és kifejlett egyedek metabolikus aktivitása eltér, ismert, hogy az ösztrogén receptorok már a fejlődés korai szakaszában is jelen vannak (lásd 5.1.6. fejezet). A dolgozatban bemutatott bioszenzor vonal eredményei alapján viszont valószínű, hogy a kifejlett halak a vizsgáltnál alacsonyabb zearalenon koncentrációk kimutatására is képesek lehetnek, amit Schwartz és munkatársai megfigyelései (2010) cáfolnak. Esetükben 0,1 μg/l zearalenon esetén még nem volt kimutatható a vitellogenin termelődés. Jin és munkatársai (2009) vizsgálatai szerint a zebradánió lárvák korai fejlődési stádiumokban érzékenyebbek bizonyos ösztrogénhatású anyagokra (E2 és NP), bár a fiatal lárvák és kifejlett halak érzékenysége megközelítőleg azonos. A vitellogeninre nézve a halak érzékenysége a fejlődés előrehaladtával nőtt. A dolgozatban bemutatott zearalenon vizsgálatok szerint az embriók valóban érzékenyebbek a magasabb zearalenon koncentrációkra, ez viszont a túlélésben és a fejlődési rendellenességek terén sokkal inkább megmutatkozik, mint a vitellogenin indukcióban. Alacsony koncentrációk és a vitellogenin termelés esetében a kifejlett egyedek tűnnek érzékenyebbnek.

A zearalenon tehát a vizekben mérhető környezeti koncentrációk alapján nem tűnik önmagában veszélyesnek, de más hasonló hatású anyagok keverékében jelentős mértékben hozzájárulhat az összesített ösztrogénhatáshoz. Emellett ismert tény, hogy a takarmányok zearalenon fertőzöttsége bizonyos esetekben igen magas. A már korábban leírt biológiai hatások, valamint a fent leírt eredmények tekintetében ezért a takarmányok vizsgálata a halgazdaságok szempontjából is kiemelt fontosságú lehet.

6.3 Javaslatok

- A dolgozatban bemutatott transzgenikus zebradánió vonalnak jelenleg 3 alvonalát (204♂ x 104♀, 208♂ x 212♀ és 203♂ x 202♀) tartjuk fenn. Az alvonalak érzékenysége eltér. A konstrukció integrációs helyének és kópiaszámának meghatározása magyarázatot adhatna a vonalak közötti különbségekre. A különböző integrációs hellyel jellemezhető alvonalak összekeresztezésével nagyobb érzékenységű, új alvonal kialakítására nyílhat lehetőség.
- A bioszenzor vonal bizonyos embrióiban ösztrogének hatására a májon kívül a szikben is kifejeződik a fluoreszcens fehérje. Érdemes lenne a csak májban jelet adó embriókat felnevelni, majd ezek keresztezésével új alvonalat létrehozni. Ha az embriókat alacsony koncentrációjú ösztrogénkezelést követően szelektálnánk, elképzelhető, hogy az alvonal érzékenysége is felülmúlná az eddigi alvonalakét.
- A *vtg1*-mCherry vonal feltételezhetően kifejlett korban nagyobb érzékenységgel reagál a környezeti ösztrogénekre és nagyobb koncentrációtartományt képes elviselni. Bár a zebradánió kifejlett példányain végzett kísérletezés már állatkísérletnek minősül, mégis javasolnám a felnőtt halak részletesebb vizsgálatát a közeljövőben.
- A létrehozott zebradánió vonal a későbbiekben jól használható, alternatív tesztrendszer lehet az ösztrogénhatású anyagok vizsgálatában. Javaslom a vonal tesztelését több, különböző típusú ösztrogénhatású anyag és anyagkeverékek alkalmazásával is.
- A *vitellogeninre* elvégzett whole mount *in situ* hibridizáció alapján a zebradánió homogén, laboratóriumi vonalainak embriói is eltérő érzékenységgel mutatják ki a környezeti ösztrogéneket. Ez a máj eltérő fejlettségi állapotaiból is adódhat, amit további *in situ* hibridizációs vizsgálatokkal lehetne igazolni.
- Az ösztrogén hatású mikotoxin (zearalenon) esetén tapasztalt megfigyelések alapján számos új kísérlet tervezhető. Érdemes lenne az anyagspecifikus fejlődési rendellenességek molekuláris hátterét felderíteni, illetve a zearalenonnal szennyezett takarmányok ivadékokra kifejtett káros hatásait tanulmányozni gazdasági szempontból fontos halfajok (pl. ponty) esetén.

10.14751/SZIE.2014.049

7 Új tudományos eredmények

1. Létrehoztam az eddigi legnagyobb vitellogenin promóter szakaszt hordozó ösztrogén indukciót kimutató zebradánió vonalat, amely a legérzékenyebb vitellogenin promóter alapú transzgenikus bioszenzor vonal.

2. Kialakítottam az új transzgenikus vonal ajánlott vizsgálati protokollját, amely szerint az embriók kezelését elegendő 3 napos korban megkezdeni.

3. Megállapítottam, hogy a *vtg1:*mCherry vonal az ösztrogén hatású anyagok környezetben előforduló koncentrációinak kimutatását is lehetővé teszi. Embriókorban 100 ng/l 17-ß ösztradiol és azzal egyenértékű illetve afölötti ösztrogénhatásra reagál, de a kifejlett hím egyedek az embrióknál is jóval érzékenyebbek.

4. *In situ* hibridizációs vizsgálattal megállapítottam, hogy 5 napos zebradánió embrióban még csak a bal oldali májlebenyben figyelhető meg vitellogenin termelés. Az egyes embriók érzékenysége nagymértékű eltérést mutathat, de a *vtg1:*mCherry vonal fluoreszcens fehérje termelése az endogén vitellogeninhez hasonlóan működik.

5. Zebradánió embriók kezelése során megállapítottam, hogy zearalenon hatására két tipikus fejlődési rendellenesség jön létre: a testen körbefutó, normál esetben a farokúszó eredésénél megszakadó pigmentsáv folyamatos marad, és a test koncentráció függően felfelé görbül, a „heart-and-soul” fenotípushoz hasonló megjelenés alakul ki.

6. Megállapítottam, hogy zearalenon kezelés hatására kifejlett korban és embriókorban is termelődik vitellogenin. Kifejlett korban a Vitellogenin fehérje mennyisége jól korrelál az *mRNS* szinttel, az eltérő stabilitás ellenére. Az ELISA módszerrel végzett vizsgálatok ezért a jóval költségtakarékosabb, kvantitatív valós idejű PCR-rel kiválthatók.

10.14751/SZIE.2014.049

8 Összefoglalás

Az endokrin rendszer vizsgálata, működésének megértése hosszú múltra tekint vissza. Arra azonban, hogy számos, a környezetbe kerülő mesterséges vegyület és bizonyos növények vagy gombák által termelt anyagok is rendelkeznek hormonhatással, csak a közelmúlt kutatásai során derült fény. A hormonhatású anyagok képesek az endokrin rendszer működését megzavarni, így károsan befolyásolhatják a kulcsfontosságú élettani folyamatokat (pl. egyedfejlődés, növekedés, szaporodás, anyagcsere folyamatok). A hormonhatású anyagok egy része a természetes ösztrogének analógjaként működve az ösztrogén által szabályozott folyamatokra (egyedfejlődés, ivar kialakulása, szaporodási funkciók) hat. Az ösztrogénhatású anyagok csoportjába kémiai szerkezetet tekintve igen sokféle vegyület tartozik, ezért az anyagok ösztrogenitását pusztán a szerkezet alapján megjósolni szinte lehetetlen. Emellett a különböző környezeti minták összetétele rendkívül komplex, így az anyagok hatását más vegyületek is befolyásolhatják. Egy környezeti minta valós ösztrogenitását csak *in vitro* és *in vivo* ökotoxikológiai tesztrendszerekből álló komplex tesztsorozattal lehet felderíteni.

Doktori munkám célja egy olyan transzgenikus zebradánió vonal létrehozása és jellemzése, amelynek májában ösztrogén hatású anyagok jelenlétében vörös fluoreszcens fehérje termelődik. A vonalat *Tol2* transzpozon alapú vektorral hoztam létre, a zebradánió *vitellogenin-1* gén promóter régiója mögé épített fluoreszcens fehérjét kódoló szakasz (mCherry) alkalmazásával. A fragmenteket helyspecifikus rekombináció segítségével, Gateway módszerrel építettem a konstrukcióba. A vitellogenin gének normál esetben csak kifejlett nőstényekben működnek, lárvákban és hímekben nem vagy nagyon alacsony szinten fejeződnek ki, azonban ösztrogén jelenlétében aktiválódnak. Ezzel párhuzamosan a transzgenikus vonalban a vitellogeninek mellett a fluoreszcens fehérje kifejeződése is koncentrációfüggően fokozódik. A vonalnak 3 alvonalából eddig 4 generációt hoztam létre, amelyek érzékenységét különböző ösztrogénhatású anyagokkal teszteltem. Az embriókat a termékenyítést követő 3.-5. napig kezeltem. Az embriók a 17-ß-ösztradiolt 100 ng/l, a 17-α-etinilösztradiolt 1 ng/l, a zearalenont 100 ng/l, a biszfenol-A-t 1 mg/l-től tudták kimutatni. A három alvonal ösztrogénérzékenysége eltérő volt. Kifejlett korban eddig csak a 17-ß-ösztradiol hatását vizsgáltam F2 generáció hím egyedein. Az eredmények alapján a vonal kifejlett korban érzékenyebbnek tűnt, már 5 ng/l koncentrációban is képes volt az anyagot kimutatni.

Az új vitellogenin transzgenikus vonal a későbbiekben környezeti toxikológiai tesztelések mellett segítséget nyújthat az ivarérés során az ösztrogéntermelés kezdetének felderítésében, morfolino injektálással vagy génkiütéssel az ösztrogénhatás és a vitellogenin aktiválódás molekuláris hátterének felderítésében. Elképzelhető, hogy a nőstény egyedek androgének vizsgálatára is alkalmasak lehetnek, ahol a kiértékelés alapját a fluoreszcens jel erősségének csökkenése adhatja. Emellett toxikus anyagok májra gyakorolt káros hatásainak *in vivo* vizsgálatára is lehetőséget adhat.

A zearalenon az egyetlen jelenleg ismert ösztrogénhatású mikotoxin. A világ számos országában elterjedt, ezért előfordulását széleskörűen tanulmányozták, biológiai hatásait halakban azonban eddig csak néhány faj esetében tárták fel. Embriókorban, a fejlődés egyik legkritikusabb szakaszában még nem vizsgálták. A toxikus hatás és a vitellogenin indukció ismerete nagy jelentőséggel bírhat főként a gazdaságilag fontos halfajok (pl. ponty) szempontjából, amelyek a takarmányok révén igen magas zearalenon koncentrációkkal érintkezhetnek. A dolgozatban ezért a bioszenzor vonal létrehozása mellett a zearalenon hatásait zebradánió embriókon mélyrehatóbban is tanulmányoztam. Megállapítottam, hogy az általános mérgezésre jellemző fenotípusos elváltozásokon kívül a zearalenon két tipikus rendellenességet okoz. 48 órás kortól 500 µg/l koncentráció fölött az embriók az ún. *heart and soul* mutánsokhoz hasonló testalakulást mutatnak, testük felfelé görbül, a szív és a szemek rendellenesen fejlődnek. A test görbülésének mértéke koncentrációfüggő módon alakul. A testen körbefutó, normál esetben a farokúszó eredési helyénél megszakadó pigmentsáv 72 órás embriókban, 250 µg/l és afölötti zearalenon koncentrációk hatására folyamatos marad, ami a farokúszó primordium fejlődési rendellenességére utal. A toxin ösztrogénhatását a vitellogenin indukción keresztül mértem. Kifejlett hímeket 21 napon át kezeltem az anyaggal, majd fehérje és *mRNS* szinten vizsgáltam a géntermék mennyiségét ELISA és kvantitatív valós idejű PCR módszerrel. A két módszer eredményei a két géntermék eltérő stabilitása ellenére jól korreláltak egymással (R^2= 0.9789, p= 0.0037), ezért a real-time PCR jó alternatívának tűnhet a költséges ELISA vizsgálatok kiváltására. A vitellogenin indukciót mRNS szinten embriókorban is vizsgáltam, 5 napos (0-5 dpf) kezelést követően. A géntermék szintje 0,1 µg/l zearalenon kezelés hatására már kimutathatóan megemelkedett. Ez a koncentráció közel esik a szennyvizekben mért zearalenon szintekhez, ezért a teszt alkalmas lehet elfolyó vizek ösztrogenitásának tesztelésére. A zearalenon kezelés eredményei arra utalnak, hogy ösztrogén hatása mellett a toxin fejlődésbiológiai folyamatokba is képes beavatkozni, ezek pontos molekuláris háttere azonban még ismeretlen.

9 Summary

The endocrine system and its function has long been studied, however, it has only recently been recognised that a number of synthetic chemicals released to the environment as well as some natural compounds produced by plants and fungi have hormonal effects. These agents can disrupt the endocrine system, thus adversely affect key physiological processes such as development, growth, reproduction and metabolism. Some hormonal substances act as analogues of natural estrogens and disrupt estrogen regulated processes during ontogeny, including sexual development and reproductive function. Chemical structure of estrogenic substances is highly diverse, so estrogenicity can hardly be predicted on the basis of structure. In addition, environmental samples might be extremely complex and additional compounds present in the sample might also affect overall estrogenicity of a substance. The full estrogenic impact of an environmental sample can thus only be revealed by a complex series of *in vitro* and *in vivo* ecotoxicological tests.

The main objective of my PhD work was to establish and characterize a transgenic (biosensor?) zebrafish line that - in the presence of estrogenic substances - produces red fluorescent protein in the liver. The line was generated by using the Tol2 transposon-based genomic integration system. The mCherry fluorescent protein encoding region was built downstream to the promoter of the zebrafish *vitellogenin-1* gene. Fragments were cloned into the construct with the Gateway site-specific recombination technique. Normally, *vitellogenin* genes are only expressed in adult females, and not or at very low levels in larvae and males, however the expression gets activated in the presence of estrogens. In the transgenic line, along with endogenous *vitellogenin*, fluorescent protein gene expression is expected to be induced in a concentration dependent manner. During my PhD work four generations of three transgenic lines have been established, and their responsiveness was tested with different estrogenic substances. Embryos were exposed to the substance from 3 to 5 day post fertilisation (dpf). Fluorescence in embryos could be detected upon treatment with 17-ß-estradiol from a concentration of 100 ng/L, 17-α-ethynilestradiol from 1 ng/L, zearalenone from 100 ng/L and bisphenol-A from 1 mg/L respectively. Sensitivity to compounds appeared different in the 3 lines. In the adult stage only the effect of 17-ß-estradiol was examined in males of F2 generation up to date. Based on the results of this line transgene activity appeared to be more sensitive to treatment in the adult age, with detectable transgene activity from 5 ng/L concentration.

In addition to environmental toxicology tests the new transgenic line may help in the future in: i) determining the onset of estrogen synthesis during sexual development; ii) investigating the molecular background of estrogenic effects and vitellogenin induction by morpholino injection or gene knockout; iii). examining the effect of androgens on females by evaluating decrease in the strength of the fluorescent signal; iv) studying the adverse effects of toxic substances on the liver *in vivo*.

Zearalenone is the only known estrogenic mycotoxin to date. Its occurance has been examined extensively, however, biological effects on fish have been revealed only in larvae and adults of few species. Consequences of early stage exposure, the most sensitive stage of development have not been evaluated before.

Evaluation of the toxicity and estrogenic activity of the toxin is of major importance especially in case of economically important fish species (eg. carp) as fish could be exposed to very high zearalenone concentrations through their feed. Therefore, besides the establishment of the biosensor line, I also studied the effects of zearalenone in zebrafish embryos in detail. I found that in addition to general phenotypic effects of toxicity zearalenone induces two typical abnormalities. In larvae exposed to zearalenone (from 500 µg/L) similar phenotype was observed to the so-called *heart and soul*, with defects in heart and eye development and upward curvature of the body axis. The degree of the curvature was concentration dependent. From 250 µg/L at 72 hpf the gap in the melanophore streak at the base of the tail fin was missing and the fin fold was abnormal, suggesting disturbance in the development of the adult tail fin primordium. Estrogenic potency was measured on the basis of vitellogenin induction. Adult males were exposed to the substance for 21 days and the gene product was measured on the protein and mRNA level by ELISA and quantitative real-time PCR. Results of the two methods correlated well (R^2= 0.9789, p= 0.0037), thus real-time PCR proved to be sufficient substitute to costly ELISA tests. The induction of vitellogenin mRNA levels was also studied in embryos following 5 days (0-5 dpf) of exposure. The gene product was elevated upon treatment with zearalenone from 0.1 ug/L concentration. This concentration is close to levels observed in wastewaters, therefore embryos could be suitable alternatives in testing estrogenicity of effluents. Our results suggest that besides direct estrogenic effects, the toxin might interact with other ontogenic pathways, however, the exact molecular basis remains unknown.

10 Irodalomjegyzék

Adema DMM. (1978): Daphnia magna as a test animal in acute and chronic toxicity tests. Hydrobiologia, 59 (2): 125-134

Aldercruetz H., Gorbach SL., Goldin BR., Woods MN., Dwyer JT., Hamalaimen E. (1994): Estrogen metabolism and excretion in oriental and Caucasian women. – J. Natl. Cancer Inst, 86: 1076–1082.

Andersen L., Bjerregaard P., Korsgard B. (2003): Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters. Fish Physiol Biochem, 28 (1-4): 319-321

Ankley G. (2012): Possible strategies for EDC testing in the future: exploring roles of pathway-based in silico, in vitro and in vivo methods. SETAC Europe Special Science Symposium Environmental Endocrine Disruptor Testing and Evaluation: Current and Future developments, 24-25 October 2012, Brussels, Belgium:

Ankley GT., Johnson RD. (2004): Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals. ILAR J, 45(4): 469-83.

Ankley GT., Johnson RD., Toth G., Folmar LC., Detenbeck NE., Bradbury SP. (1997): Development of a research strategy for assessing the ecological risk of endocrine disruptors. Rev Toxicol Ser B: Environ Toxicol, 1: 231-267

Arcand-Hoy LD., Nimrod AC., Benson WH. (1998): Endocrinemodulating substances in the environment: estrogenic effects of pharmaceutical products. Int. J. Toxicol, 17: 139–158.

Arnold SF., Robinson MK., Notides AC., Guillette LJ. Jr, McLachlan JA. (1996): A Yeast Estrogen Screen for Examining the Relative Exposure of Cells to Natural and Xenoestrogens. Environ Health Perspect, 104: 544-548.

Arukwe A., Grotmol T., Haugen TB., Knudsen FR., Goksoyr A. (1999): Fish model for assessing the in vivo estrogenic potency of the mycotoxin zearalenone and its metabolites. Sci Total Environ, 236: 153-161.

Bajic VB., Tan SL., Chong A., Tang S., Ström A., Gustafsson JA., Lin CY., Liu ET (2003): Dragon ERE Finder version 2: A tool for accurate detection and analysis of estrogen response elements in vertebrate genomes. Nucleic Acids Res, 31 (13): 3605-7.

Bakkiyanathan A., Joseph AM., Tharani L., Malathi R. (2010): Genistein, the phyto-estrogen induces heart-and-soul (has) phenotypes in zebrafish embryo. J Dev Biol Tissue Eng, 2 (2): 18–22.

Balaguer P., François F., Comunale F., Fenet H., Boussioux AM., Pons M., Nicolas JC., Casellas C. (1999): Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. Sci Total Environ, 233 (1–3): 47–56

Balciunas D., Wangensteen KJ., Wilber A., Bell J., Geurts A., Sivasubbu S, Wang X, Hackett PB, Largaespada DA, McIvor RS, Ekker SC. (2006): Harnessing a High Cargo-Capacity Transposon for Genetic Applications in Vertebrates. PLoS Genet, 2 (11): e169.

Bardet PL., Horard B., Robinson-Rechavi M., Laudet V., Vanacker JM. (2002): Characterization of oestrogen receptors in zebrafish (Danio rerio). J Mol Endocrinol, 28 (3): 153-63.

Baronti C., Curini C., D'Ascenzo G., Di Corcia A., Gentili A., Samperi R. (2000): Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in receiving river water. Environ Sci Technol, 24: 5059-5066.

Baumann L., Holbech H., Keiter S., Kinnberg KL., Knörr S., Nagel T., Braunbeck T. (2013): The maturity index as a tool to facilitate the interpretation of changes in vitellogenin production and sex ratio in the Fish Sexual Development Test. Aquat Toxicol, 128-129: 34-42.

Beck V., Pfitscher A., Jungbauer A. (2005): GFP-reporter for a high throughput assay to monitor estrogenic compounds. J Biochem Biophys Methods, 64 (1): 19-37.

Bemanian V., Male R., Goksøyr A. (2004): The aryl hydrocarbon receptor-mediated disruption of vitellogenin synthesis in the fish liver: Cross-talk between AHR- and ER α-signalling pathways. Comp Hepatol, 3:2

Bennett JW., Klich M. (2003): Mycotoxins. Clin Microbiol Rev, 16: 497–516.

Blaise C., Gagné F., Pellerin J., Hansen PD. (1999): Determination of vitellogenin-like properties in Mya arenaria hemolymph (Saguenay Fjord, Canada): a potential biomarker for endocrine disruption. Environ Toxicol, 14: 455–65.

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 (10): 1041–1046.

Blumenthal T., Squire M., Kirtland S., Cane J., Donegan M., Spieth J., Sharrock W. (1984): Cloning of a yolk protein gene family from Caenorhabditis elegans. J Mol Biol, 174: 1–18.

Bond CE. (1979): Biology of Fishes. WB Saunders Company, Philadelphia, PA. 514 pp.

Bone Q., Marshall NB., Blaxter, J H S. (1995): Biology of Fishes, Chapman and Hall, New York, 332 pp.

Boverhof DR., Chamberlain MP., Elcombe CR., Gonzalez FJ., Heflich RH., Hernández LG., Jacobs AC., Jacobson-Kram D., Luijten M., Maggi A., Manjanatha MG., Benthem Jv., Gollapudi BB. (2011): Transgenic animal models in toxicology: historical perspectives and future outlook. Toxicol Sci, 121 (2): 207-33.

Braunbeck T., Böttcher M., Hollert H., Kosmehl T., Lammer E., Leist E., Rudolf M., Seitz N. (2005): Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species—An update. ALTEX, 22: 87–102.

Brian JV., Harris CA., Scholze M., Kortenkamp A., Booy P., Lamoree M., Pojana G., Jonkers N., Marcomini A., Sumpter JP. (2007): Evidence of estrogenic mixture effects on the reproductive performance of fish. Environ Sci Technol, 41(1):337-44.

Brion F., Le Page Y., Piccini B., Cardoso O., Tong S-K., Chung B., Kah O. (2012): Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures in vivo using transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos. PLoS ONE, 7 (5)

Brock ML., Shapiro DJ. (1983): Estrogen Stabilizes Vitellogenin mRNA against cytoplasmic degradation. Cell, 34: 207-214.

Brüning JC., Lingohr P., Gillette J., Hanstein B., Avci H., Krone W., Müller-Wieland D., Kotzka J. (2003): Estrogen receptor-alpha and Sp1 interact in the induction of the low density lipoprotein-receptor. J Steroid Biochem Mol Biol, 86(2):113-21.

Bucheli TD., Wettstein FE., Hartmann N., Erbs M., Vogelgsang S., Forrer HR., Schwarzenbach RP. (2008): Fusarium mycotoxins: overlooked aquatic microp-ollutants? J Agr Food Chem, 56: 1029–1034.

Cade L., Reyon D., Hwang WY., Tsai SQ., Patel S., Khayter C., Joung JK., Sander JD., Peterson RT., Yeh JR. (2012): Highly efficient generation of heritable zebrafish gene mutations using homo- and heterodimeric TALENs. Nucleic Acids Res, 40(16):8001-10.

Callard GV., Tarrant AM., Novillo A., Yacci P., Ciaccia L., Vajda S., Chuang GY., Kozakov D., Greytak SR., Sawyer S., Hoover C., Cotter K. (2011): Evolutionary origins of the estrogen signaling system: insights from amphioxus. J Steroid Biochem Mol Biol, 127 (3-5): 176–188.

Cao Y., Calafat AM., Doerge DR., Umbach DM., Bernbaum JC., Twaddle NC., Ye X., Rogan WJ. (2009): Isoflavones in urine, saliva and blood of infants—data from a pilot study on the estrogenic activity of soy formula. J Expo Sci Environ Epidemiol, 19:223–234

Cartharius K., Frech K., Grote K., Klocke B., Haltmeier M., Klingenhoff A., Frisch M., Bayerlein M., Werner T. (2005): MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. Bioinformatics, 21 (13): 2933-42.

Carvan MJ., Dalton TP., Stuart GW., Nebert DW. (2000): Transgenic zebrafish as sentinels for aquatic pollution. Ann N Y Acad Sci. 2000;919:133-47.

Chandrasekar G., Archer A., Gustafsson JA., Lendahl MA. (2010): Levels of 17beta-estradiol receptors expressed in embryonic and adult zebrafish following in vivo treatment of natural or synthetic ligands. PLoS One, 5 (3): e9678.

Chen H., Hu J., Yang J., Wang Y., Xu H., Jiang Q., Gong Y., Gu Y., Song H. (2010): Generation of a fluorescent transgenic zebrafish for detection of environmental estrogens. Aquatic Toxicol, 96 (1): 53–61.

Chen TT., Powers DA. (1990): Transgenic fish. Trends Biotechnol, 8: 209-214

Cheshenko K., Brion F., Page YL., Hinfray N., Pakdel F., Kah O., Segner H., Eggen RIL. (2007): Expression of zebrafish aromatase cyp19a and cyp19b genes in response to the ligands of estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor. Toxicol Sci, 96 (2): 255–267.

Chiang EFL., Yan YL., Guiguen Y., Postlethwait J., Chung BC. (2001): Two Cyp19 (P450 aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain. Mol Biol Evol, 18 (4): 542-50.

Choe SY., Kim SJ., Kim HG., Lee JH., Choi Y., Lee H., Kim Y. (2003): Evaluation of estrogenicity of major heavy metals. Sci Total Environ, 312 (1-3): 15-21.

Chow WS., Chan WK., Chan KM.. (2013): Toxicity assessment and vitellogenin expression in zebrafish (Danio rerio) embryos and larvae acutely exposed to bisphenol A, endosulfan, heptachlor, methoxychlor and tetrabromobisphenol A. J Appl Toxicol, 33 (7): 670-8.

Ciana P., Di Luccio G., Belcredito S., Pollio G., Vegeto E., Tatangelo L., Tiveron C., Maggi A. (2001): Engineering of a mouse for the in vivo profiling of estrogen receptor activity. Mol Endocrinol, 15 (7): 1104-13.

Clark KJ., Urban MD., Skuster KJ., Ekker SC. (2011): Transgenic zebrafish using transposable elements. Methods Cell Biol, 104: 137-49.

Clark LC. Jr., Lyons C. (1962): Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. Ann NY Acad Sci, 102: 29–45.

Coldham NG., Dave M., Sivapathasundaram S., McDonnell DP., Connor C., Sauer MJ. (1997): Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. Environ Health Perspect, 105: 734-742.

Copeland PA., Sumpter JP., Walker JP., Croft M. (1986): Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (Salmo gairdneri Richardson) at various stages of the reproductive cycle. Comp Biochem Physiol, 83B: 487-493.

Crews D., Putz O., Thomas P., Hayes T., Howdeshell K. (2003): Animal models for the study of the effects of mixtures, low doses, and the embryonic environment on the action of endocrine disrupting chemicals. Pure Appl Chem, SCOPE/IUPAC Project

Crisp TM., Clegg ED., Cooper RL., Anderson DG., Baetcke KP., Hoffmann JL., Morrow M.S., Rodier DJ., Schaeffer JE., Touart LW., Zeeman MG., Patel YM., Wood WP. (1997): Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis.

EPA/630/R-96/012, Risk Assessment Forum, U.S. Environmental Protection Agency Washington, D.C.

Culp P., Nüsslein-Volhard C., Hopkins N. (1991): High-frequency germ-line transmission of plasmid DNA sequences injected into fertilized zebrafish eggs. PNAS, 88 (18): 7953-7957.

Csenki Z., Zaucker A., Kovacs B., Hadzhiev Y., Hegyi A., Lefler KK., Muller T., Kovacs R., Urbanyi B., Varadi L., Muller F. (2010): Intraovarian transplantation of stage I-II follicles results in viable zebrafish embryos. Int J Dev Biol 54 (4): 585-589.

Csenki Zs., Müller F., Váradi L., Magyary I., Horváth Á., Urbányi B. (2006): A zebradánió (*Danio rerio*), mint a modern biotechnológia kísérleteinek modellállata: jelenlegi helyzet és jövőbeni lehetőségek, Állatbiotechnológiai kutatások Magyarországon konferencia, MTA kivonat: 19. pp

Darbre PD. (2006): Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogenswith potential to add to the oestrogenic burden of the human breast. J Appl Toxicol, 26: 149–153.

Darvas B. (1999): A piszkos tizenkettő és felebarátai. 1. Egy Nobel-díjas: a DDT. Élet és Tudomány, 54: 1350-1352

Davail B., Pakdel F., Bujo H., Perazzolo LM., Waclawek M., Schneider WJ., Le Menn F. (1998): Evolution of oogenesis: the receptor for vitellogenin from the rainbow trout. J Lipid Res, 39 (10): 1929-37.

deFur PL. (2004): Use and Role of Invertebrate Models in Endocrine Disruptor Research and Testing. ILAR J, 45 (4): 484-493.

Denslow ND., Chow M., Kroll KJ., Green L. (1999): Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogen or estrogen mimics. Ecotoxicology 8: 385–398.

Desbrow C., Routledge EJ., Brighty GC., Sumpter JP., Waldock M. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. Environ Sci Technol, 32: 1549–1558.

Diamanti-Kandarakis E., Bourguignon JP., Giudice LC., Hauser R., Prins GS., Soto AM., Zoeller RT., Gore AC. (2009): Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. Endocr Rev, 30 (4): 293-342.

Dickerson SM., Gore AC. (2007): Estrogenic environmental endocrine- disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle. Rev Endocr Metab Disord, 8: 223-234.

Diel P.; Schulz T.; Smolnikar K.; Strunck E.; Vollmer G.; Michna H. (2000): Ability of xeno- and phytoestrogens to modulate expression of estrogen-sensitive genes in rat uterus: estrogenicity profiles and uterotropic activity. J Steroid Biochem Mol Biol, 73: 1-10.

Doyon Y., McCammon JM., Miller JC., Faraji F., Ngo C., Katibah GE., Amora R., Hocking TD., Zhang L., Rebar EJ., Gregory PD., Urnov FD., Amacher SL. (2008): Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. Nat Biotechnol, 26 (6): 702–708.

Driscoll MD., Sathya G., Muyan M., Klinge CM., Hilf R., Bambara RA. (1998): Nucleic acids, protein synthesis and molecular genetics: elements receptor binding to estrogen response sequence requirements for estrogen. J Biol Chem, 273: 29321-29330.

Du Y., Shi X., Yu Ke, Liu C., Zhou B. (2008): Chronic effects of waterborne PFOS exposure on growth, development, reproduction and hepatotoxicity in zebrafish. in: Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry—Biological Responses to Chemical Pollutant, Eds., Y. Murakami, K. Nakayama, S.-I. Kitamura, H. Iwata and S. Tanabe, pp. 37–54.

Dudutz Gy., Kincses-Ajtay M., Csép K. (2009): Fontosabb endokrin diszruptor vegyületek és az élő szervezetekre kifejtett hatásaik. Orvostudományi Értesítő, 82 (3): 156-164.

Dudziak M. (2011): Analysis of zearalenone in aqueous environment using GC-MS. Pol J Environ Stud, 20 (1): 231–235.

Dunham RA., Eash J., Askins J., Townes TM. (1987): Transfer of the metallothionein human growth hormone fusion gene into channel catfish. T Am Fish Soc, 116: 87-91.

Emelyanov A., Gao Y., Naqvi NI., Parinov S. (2006): Trans-kingdom transposition of the maize dissociation element. Genetics, 174 (3): 1095-104.

Eriksen GS., Pennington J., Schlatter J., Alexander J., Thuvander A. (2000): Safety evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Food Additives Series, 44.

Falconer IR., Chapman HF., Moore MR., Ranmuthugala G. (2006): Endocrine-disrupting compounds: a review of their challenge to sustainable and safe water supply and water reuse. Environ Toxicol, 21 (2): 181-91.

Farré D., Roset R., Huerta M., Adsuara JE., Roselló L., Albà MM., Messeguer X. (2003): Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. Nucleic Acids Res, 13: 3651-3653.

Fenske M., van Aerle R., Brack S., Tyler CR., Segner H. (2001): Development and validation of a homologous zebrafish (Danio rerio Hamilton-Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp Biochem Physiol Part C, 129: 217-232.

Gagnon MM., Bussieres D., Dodson JJ., Hodson PV. (1995): White sucker (Catostomus commersoni) growth and sexual maturation in pulp mill–contaminated and reference rivers. Environ Toxicol Chem, 14: 317–27.

Gaiano N., Allende M., Amsterdam A., Kawakami K., Hopkins N. (1996): Highly efficient germ-line transmission of proviral insertions in zebrafish. Proc Natl Acad Sci USA, 93 (15): 7777–7782.

Gascón J., Oubiña A., Barceló D. (1997): Detection of endocrine-disrupting pesticides by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): application to atrazine. Trends Anal Chem. 16 (10): 554-562.

Gehm BD., McAndrews JM., Jordan VC., Jameson JL. (2000): EGF activates highly selective estrogen-responsive reporter plasmids by an ER-independent pathway. Mol Cell Endocrinol, 159 (1-2): 53-62.

Gehrig J., Reischl M., Kalmár É., Ferg M., Hadzhiev Y., Zaucker A., Song C., Schindler S., Liebel U., Müller F. (2009): Automated high-throughput mapping of promoter-enhancer interactions in zebrafish embryos. Nature methods, 6 (12) 911-916.

Geisy JP., Ludwig JP., Tillitt DE.(1994): Deformities in birds of the Great Lakes region: assigning causality. Environ Sci Technol, 28:128-135.

Georgescu B., Georgescu C., Dărăban S., Bouaru A., Pasçalău S. (2011): Heavy metals acting as endocrine disrupters. J Anim Sci Biotechnol, 44 (2): 89–93.

Gorelick DA., Halpern ME. (2011): Visualization of estrogen receptor transcriptional activation in zebrafish. Endocrinology, 152 (7): 2690-703.

Gourmelon A. (2013): OECD recent activities on endocrine disrupters testing and assessment. EFSA Stakeholders Meeting-Human Health and Environmental Risks of Endocrine Active Substances, 20 March 2013.

Gromadzka K., Wa´skiewicz A., Goli´nski, P.,´Swietlik J. (2009): Occurrence of estrogenic mycotoxin – Zearalenone in aqueous environmental samples with various NOM content. Water Res, 43 (4): 1051–1059.

Gunnarsson L., Kristiansson E., Förlin L., Nerman O., Larsson DGJ. (2007): Sensitive and robust gene expression changes in fish exposed to estrogen – a microarray approach. BMC Genomics, 8: 149.

Hadzhiev Y., Lele Z., Schindler S., Wilson SW., Ahlberg P., Strähle U., Müller F. (2007): Hedgehog signaling patterns the outgrowth of unpaired skeletal appendages in zebrafish. BMC Dev Biol, 27 (7): 75.

Hansen P., Dizer H., Hock B., Marx A., Sherry J., McMaster M., Blaise C. (1998): Vitellogenin - a biomarker for endocrine disruptors. Trend Anal Chem, 17: 448-451.

Hartmann N., Erbs M., Wettstein FE., Schwarzenbach RP., Bucheli TD. (2007): Quantification of estrogenic mycotoxins at the ng/L level in aqueous environ-mental samples using deuterated internal standards. J Chromatogr A, 1138 (1–2): 132–140.

Heikaus S., Winterhager E., Traub O., Grummer R. (2002): Responsiveness of endometrial genes Connexin26, Connexin43, C3 and clusterin to primary estrogen, selective estrogen receptor modulators, phyto- and xenoestrogens. J Mol Endocrinol, 29: 239-249.

Henson M., Chedrese P. (2004): Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. Exp Biol Med, 229: 383-392.

Hester RE., Harrison RM. (1999): Endocrine Disrupting Chemicals, The Royal Society Chemistry, Cambridge, pp. 1-25, 83-92, 109-133.

Higuchi R., Dollinger G., Walsh PS., Griffith R. (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology (N Y), 10 (4): 413-7.

Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. (1993): PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology (N Y), 11 (9): 1026-30.

Holbech H., Andersen L., Petersen G., Korsgaard B., Pedersen K., Bjerregaard P. (2001.): Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio). Comp Biochem Phys C, 130: 119-131.

Horne-Badovinac S., Lin D., Waldron S., Schwarz M., Mbamalu G., Pawson T., Jan Y-N., Stainier D.Y.R., Abdelilah-Seyfried S. (2001): Positional cloning of heart and soul reveals multiple roles for PKC in zebrafish organogenesis. Curr Biol, 11: 1492–1502.

Hughes CL. Jr. (1988): Phytochemical mimicry of reproductive hormones and modulation of herbivore fertility by phytoestrogens. Environ Health Perspect, 78: 171–174.

Hutchinson TH., Pickford DB. (2002): Ecological risk assessment and testing for endocrine disruption in the aquatic environment. Toxicology, 181 (182): 383-387.

Hwang WY., Fu Y., Reyon D., Maeder ML., Tsai SQ., Sander JD., Peterson RT., Yeh J-RJ., Joung JK. (2013): Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. Nat Biotechnol, 31: 227–229

ICCVAM (2003): ICCVAM evaluation of in vitro test methods for detecting potential 102 endocrine disruptors: estrogen receptor and androgen receptor binding and transcriptional activation assays. NIH Publication no. 03-4503, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA

Inoue K. (1992): Expression of reporter genes introduced by microinjection and electroporation in fish embryos and fry. Mol Mar Biol Biotechnol, 1(4-5):266-70.

Isidori M., Cangiano M., Palermo FA., Parrella A. (2010): E-screen and vitellogenin assay for the detection of the estrogenic activity of alkylphenols and trace elements. Comp Biochem Phys C, 152: 51–56.

Ivics Z., Hackett PB., Plasterk RH., Izsvák Zs. (1997): Molecular reconstruction of sleeping beauty, a tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. Cell, 91: 501–510

Izsvák Z, Ivics Z, Hackett PB. (1995): Characterization of a Tc1-like transposable element in zebrafish (Danio rerio). Mol Gen Genet, 247 (3): 312-22.

Jakic-Dimic D., Jeremic S., Nesic K., Radosavljevic V. (2005): The influence of myco-toxins in food on fish health status. Matica Srpska Proceedings for Natural Sciences, 109: 73–79.

Jin S., Yang F., Liao T., Hui Y., Xu Y. (2008): Seasonal variations of estrogenic compounds and their estrogenicities in influent and effluent from a municipal sewage treatment plant in China. Environ Toxicol Chem, 27 (1): 146-53.

Jin Y., Chen R., Sun L., Qian H., Liu W., Fu Z. (2009): Induction of estrogen-responsive gene transcription in the embryo, larval, juvenile and adult life stages of zebrafish as biomarkers of short-term exposure to endocrine disrupting chemicals. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 150 (3): 414-20.

Jin Y., Shu L., Sun L., Liu W., Fu Z. (2010): Temperature and photoperiod affect the endocrine disruption effects of ethinylestradiol, nonylphenol and their binary mixture in zebrafish (Danio rerio). Comp Biochem Physiol C, 151 (2): 258–263.

Jobling S., Casey D., Rogers-Gray T., Oehlmann J., Schulte-Oehlmann U., Pawlowski S., Baunbeck T., Turner AP., Tyler CR. (2004): Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. Aquat Toxicol, 66 (2): 207-22.

Jobling S., Nolan M., Tyler CR., Brighty G., Sumpter JP. (1998): Widespread sexual disruption in wild fish. Environ Sci Technol, 32: 2498–2506.

Johns SM., Denslow ND., Kane MD., Watanabe KH., Orlando EF., Sepúlveda MS. (2011): Effects of estrogens and antiestrogens on gene expression of fatheadminnow (Pimephales promelas) early life stages. Environ Toxicol, 26 (2): 195–206.

Jones PD., De Coen WM., Tremblay L., Giesy JP. (2000): Vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. Water Sci Technol, 42 (7-8):1–14.

Jung EM., An BS., Yang H., Choi KC., Jeung EB. (2012): Biomarker genes for detecting estrogenic activity of endocrine disruptors via estrogen receptors. Int J Environ Res Public Health, 9 (3): 698-711.

Jung EM., An BS., Yang H., Choi KC., Jeung EB. (2012): Biomarker genes for detecting estrogenic activity of endocrine disruptors via estrogen receptors. Int J Environ Res Public Health, 9 (3): 698-711.

Jurčíková J., Mikula P., Dobšíková R., Némethová D., Svobodová Z. (2007): Effects of Metazachlor on Vitellogenin Induction in Zebrafish (*Danio rerio*). Acta Vet. Brno, 76: 61-66

Kallivretaki E., Eggen R., Neuhauss S., Alberti M., Kausch U., Segner H. (2006): Aromatase in zebrafish: a potential target for endocrine disrupting chemicals. Mar Environ Res, 62 Suppl: S187-90.

Kaltreider RC., Davis AM., Lariviere JP., Hamilton JW. (2001): Arsenic alters the function of the glucocorticoid receptor as a transcription factor. Environ Health Perspect, 109: 245-251.

Kang KS., Kim HS., Ryu DY., Che JH., Lee YS. (2000): Immature uterotrophic assay is more sensitive than ovariectomized uterotrophic assay for the detection of estrogenicity of p-nonylphenol in Sprague-Dawley rats. Toxicol Lett, 18: 109–115.

Kato S., Endoh H., Masuhiro Y., Kitamoto T., Uchiyama S., Sasaki H., Masushige S., Gotoh Y., Nishida E., Kawashima H., Metzger D., Chambon P. (1995): Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. Science, 270 (5241): 1491-4.

Kavlock RJ., Daston GP., DeRosa C., Fenner-Crisp P., Gray LE. Jr., Kaattari S., Lucier G., Luster M., Mac MJ., Maczka C., Miller R., Moore J., Rolland R., Scott G., Sheehan DM., Sinks T., Tilson HA. (1996): Research needs for the assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. Environ Health Perspect, 104 (Suppl 4): 715-740.

Kawakami K. (2005): Transposon Tools and Methods in Zebrafish. Dev Dynam, 234: 244–254.

Kawakami K. (2007): Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. Genome Biol, 8 Suppl 1:S7.

Kawakami K., Koga A., Hori H., Shima A. (1998): Excision of the Tol2 transposable element of the medaka fish, Oryzias latipes in zebrafish, Danio rerio. Gene, 225: 17–22.

Kazeto Y, Ijiri S., Place AR., Zohar Y., Trant JM. (2001): The 5'-flanking regions of CYP19A1 and CYP19A2 in zebrafish. Biochem Biophys Res Commun, 288 (3): 503-8.

Kazeto Y., Place AR., Trant JM. (2004): Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (Danio rerio) juveniles. Aquat Toxicol, 69: 25–34.

Keiter S., Baumann L., Färber H., Holbech H., Skutlarek D., Engwall M., Braunbeck T. (2012): Long-term effects of a binary mixture of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and bisphenol A (BPA) in zebrafish (Danio rerio). Aquat Toxicol, 118-119: 116-29.

Kerdivel G., Habauzit D., Pakdel F. (2013): Assessment and molecular actions of endocrine-disrupting chemicals that interfere with estrogen receptor pathways. Int J Endocrinol, 2013(14)

Khoo HW., Ang LH., Lim HB., Wong KY. (1992): Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish. Aquaculture, 107 (1): 1–19.

Kim DJ., Seok SH., Baek MW., Lee HY., Na YR., Park SH., Lee HK., Dutta NK., Kawakami K., Park JH. (2009): Estrogen-responsive transient expression assay using a brain aromatase-based reporter gene in zebrafish (Danio rerio). Comp Med, 59 (5): 416-23.

Kishida M., Callard GV. (2001): Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (Danio rerio) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. Endocrinology, 142 (2): 740-50.

Koga A., Suzuki M., Inagaki H., Bessho Y., Hori H. (1996): Transposon element in fish. Nature, 383: 30.

Kolpin DW., Hoerger CC., Meyer MT., Wettstein FE., Hubbard LE., Bucheli TD. (2010): Phytoestrogens and mycotoxins in Iowa streams: an examination ofunderinvestigated compounds in agricultural basins. J Environ Qual, 39: 2089–2099.

Kordes C., Rieber EP., Gutzeit HO. (2002): An in vitro vitellogenin bioassay for oestrogenic substances in the medaka (Oryzias latipes). Aquat Toxicol, 58 (3-4): 151-64.

Kramer VJ., Miles-Richardson S., Pierens SL., Giesy JP. (1998): Reproductive impairment and induction of alkaline-labile phosphate, a biomarker of estrogen exposure, in fathead minnows (Pimephales promelas) exposed to waterborne 17β-estradiol. Aquat. Toxicol, 40: 335–360.

Kraugerud M., Doughty RW., Lyche JL., Berg V., Tremoen NH., Alestrøm P., Aleksandersen M., Ropstad E. (2012): Natural mixtures of persistent organic pollutants (POPs) suppress ovarian follicle development, liver vitellogenin immunostaining and hepatocyte proliferation in female zebrafish (Danio rerio). Aquat Toxicol, 116-117: 16-23.

Krishnan AV., Stathis P., Permuth SF., Tokes L., Feldman D. (1993): Bisphenol A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. Endocrinology, 132: 2279-2286.

Kuch HM., Ballschmitter K. (2001): Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. Environ Sci Technol, 35: 3201–6.

Kuiper GG., Lemmen JG., Carlsson B., Corton JC., Safe SH., van der Saag PT., van der Burg B., Gustafsson JA. (1998): Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor. Endocrinology, 139: 4252–4263.

Kuiper-Goodman T., Scott PM., Watanabe H. (1987): Risk assessment of the myco-toxin zearalenone. Regul Toxicol Pharm, 7: 253–306.

Kurauchi K., Nakaguchi Y., Tsutsumi M., Hori H., Kurihara R., Hashimoto S., Ohnuma R., Yamamoto Y., Matsuoka S., Kawai S., Hirata T., Kinoshita M. (2005): In vivo visual

reporter system for detection of estrogen-like substances by transgenic medaka. Environ Sci Technol, 39 (8): 2762-8.

Kwan KM., Fujimoto E., Grabher C., Mangum BD., Hardy ME., Campbell DS., Parant JM., Yost HJ., Kanki JP., Chien CB. (2007): The Tol2kit: a multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. Dev Dyn, 236 (11): 3088-99.

Lagana A., Bacaloni A., De Leva I., Faberi A., Fago G., Marino A. (2004): Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. Anal Chim Acta, 501: 79–88.

Lagana A., Fago G., Marino A., Santarelli D. (2001): Development of an analytical system for the simultaneous determination of anabolic macrocyclic lactones inaquatic environmental samples. Rapid Comm Mass Sp, 15: 304–310.

Lange A., Katsu Y., Miyagawa S., Ogino Y., Urushitani H., Kobayashi T., Hirai T., Shears JA., Nagae M., Yamamoto J., Ohnishi Y., Oka T., Tatarazako N., Ohta Y., Tyler CR., Iguchi T. (2012): Comparative responsiveness to natural and synthetic estrogens of fish species commonly used in the laboratory and field monitoring. Aquat Toxicol, 109: 250-8.

Lawson ND., Weinstein BM. (2002): In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. Dev Biol, 248 (2): 307-18.

Lazier CB., McKay ME. (1993): Vitellogenin gene expression in teleost fish. In:Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (Eds.), Biochemistry and Molecular Biologyof Fishes, vol. 2. Elsevier, Amsterdam, pp. 391–405.

Le Guevel R., Packdel, F. (2001): Assessment of oestrogenic potency of chemicals used as growth promoter by in-vitro methods. Hum Reprod, 16: 1030–1036.

Ledford H. (2013): Transgenic salmon nears approval. Nature, 497: 17–18.

Lee C., Na JG., Lee KC., Park K. (2002): Choriogenin mRNA induction in male medaka, Oryzias latipes as a biomarker of endocrine disruption. Aquat Toxicol, 61 (3-4): 233-41.

Lee LG. (1993): Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. Nucleic Acids Res, 21 (16): 3761-6.

Lee O., Takesono A., Tada M., Tyler CR., Kudoh T. (2012): Biosensor zebrafish provide new insights into potential health effects of environmental estrogens. Enviro Health Perspect, 120: 990–996.

Lee O., Tyler CR., Kudoh T. (2012): Development of a transient expression assay for detecting environmental oestrogens in zebrafish and medaka embryos. BMC Biotechnol, 12: 32.

Legler J., Broekhof JLM., Brouwer A., Lanser PH., Murk AJ., van der Saag PT., Vethaak AD., Wester P., Zivkovic D., van der Burg B. (2000): A novel in vivo bioassay for (xeno-)estrogens using transgenic zebrafish. Environ Sci Technol, 34 (20): 4439 – 4444.

Legler J., van den Brink CE., Brouwer A., Murk AJ., van der Saag PT., Vethaak AD., van der Burg B. (1999): Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. Toxicol Sci, 48 (1): 55–66.

Levin ER. (2008): Rapid signaling by steroid receptors. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 295 (5): R1425-R1430.

Li AP., Bode C., Sakai Y. (2004): A novel in vitro system, the integrated discrete multiple organ cell culture (IdMOC) system, for the evaluation of human drug toxicity: comparative cytotoxicity of tamoxifen towards normal human cells from five major organs and MCF-7 adenocarcinoma breast cancer cells. Chem Biol Interact, 150 (1): 129-36.

Liedtke A., Muncke J., Rüfenacht K., Eggen RI. (2008): Molecular multi-effect screening of environmental pollutants using the MolDarT. Environ Toxicol, 23 (1): 59-67.

Lindberg BS., Lindberg P., Martinsson K., Johansson EDB. (1974): Radioimmunological methods for the estimation of oestrone, oestradiol 17β and oestriol in pregnancy plasma. Acta Obstet Gyn Scan, 53 (S32): 5–19.

Liu MM., Albanese C., Anderson CM., Hilty K., Webb P., Uht RM., Price RH. Jr, Pestell RG., Kushner PJ. (2002): Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. J Biol Chem, 277 (27): 24353-60.

Livak KJ., Flood SJ., Marmaro J., Giusti W., Deetz K. (1995): Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. PCR Methods Appl, 4 (6): 357-62.

Lundgren MS., Novak PJ. (2009): Quantification of phytoestrogens inindustrial waste streams. Environ Toxicol Chem, 28: 2318–2323.

Maclean N., Talwar S. (1984): Injection of cloned genes with rainbow trout eggs. Journ. Embryol and Exp. Morphol, 82 (Supp): 187

Madureira TV., Rocha MJ., Cruzeiro C., Rodrigues I., Monteiro RA., Rocha E. (2012): The toxicity potential of pharmaceuticals found in the Douro River estuary (Portugal): evaluation of impacts on fish liver, by histopathology, stereology, vitellogenin and CYP1A immunohistochemistry, after sub-acute exposures of the zebrafish model. Environ Toxicol Pharmacol, 34 (1): 34-45.

Maitre J-L., Valotaire Y., Guguen-Guillouzo C. (1986): Estradiol-17β stimulation of vitellogenin synthesis in primary culture of male rainbow trout hepatocytes. In Vitro Cell Dev B, 22 (6): 337-343.

Maragos CM. (2012): Zearalenone occurrence in surface waters in central Illinois,USA. Food Addit Contam B Surveillance,5 (1): 55–64.

Martin MB., Reiter R., Pham T., Avellanet YR., Camara J., Lahm M., Pentecost E., Pratap K., Gilmore BA., Divekar S., Dagata RS., Bull JL., Stoica A. (2003): Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells. Endocrinology, 144 (6): 2425–2436.

Matsumoto T., Nakamura AM., Mori K., Kayano T. (2003): Molecular characterization of a cDNA encoding putative vitellogenin from the pacific oyster Crassostrea gigas. Zool Sci, 20: 37–42.

Matthews J., Celius T., Halgren R., Zacharewski T. (2000): Differential estrogenreceptor binding of estrogenic substances: a species comparison. J Steroid Biochem, 74: 223–234.

Mattingly CJ., McLachlan JA., Toscano WA. Jr. (2001): Green fluorescent protein (GFP) as a marker of aryl hydrocarbon receptor (AhR) function in developing zebrafish (Danio rerio). Environ Health Perspect, 109 (8): 845–849.

Matys V., Kel-Margoulis OV., Fricke E., Liebich I., Land S., Barre-Dirrie A., Reuter I., Chekmenev D., Krull M., Hornischer K., Voss N., Stegmaier P., Lewicki-Potapov B., Saxel H., Kel AE., Wingender E. (2006): TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes. Nucleic Acids Res, 34: D108-110.

McClintock B. (1948): Mutable loci in maize: Nature of the Ac action. The mutable c loci. The mutable wx loci. Conclusions. Carnegie Institution of Washington Year Book No. 47 [Issued 10 December 1948, submitted June 1948] pp. 155-169.

McClintock B. (1951): Mutable loci in maize. Carnegie Institution of Washington Year Book No. 50 [Issued 14 December 1951, submitted June 1951] pp. 174-181.

McCurley AT., Callard GV. (2008): Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. BMC Mol Biol, 9: 102.

McMaster ME., Van Der Kraak GJ., Portt CB., Munkittrick KR., Sibley PK., Smith IR., Dixon DG. (1991): Changes in hepatic mixed–function oxidase (MFO) activity, plasma steriod levels and age of maturity of a white sucker (Catostomas commersoni) population exposed to bleached kraft mill effluent. Aquat Toxicol, 21: 199–218.

Meng X., Noyes MB., Zhu LJ., Lawson ND., Wolfe SA. (2008): Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zincfinger nucleases. Nat Biotechnol, 26 (6): 695–701.

Menuet A., Pellegrini E., Brion F., Gueguen MM., Anglade I., Pakdel F., Kah O. (2005): Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. J Comp Neurol, 485 (4): 304-20.

Messeguer X., Escudero R., Farré D., Nuñez O., Martínez J., Albà M.M.(2002): PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. Bioinformatics, 18 (2): 333-334.

Metzler M., Pfeiffer E., Hildebrand AA. (2010): Zearalenone and its metabolites as endocrine disrupting chemicals. World Mycotoxin J, 3 (4), 385–401.

Mills LJ., Chichester C. (2005): Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? Sci Total Environ, 343 (1-3): 1-34.

Mourot B., Le Bail P-Y. (1995): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) vitellogenin. J. Immunoassay, 16: 365–377.

Muller F. (2005): Comparative Aspects of Alternative Laboratory Fish Models. Zebrafish, 2 (1): 47-54.

Muncke J., Eggen RIL. (2006): Vitellogenin 1 mRNA as an early molecular biomarkerfor endocrine disruption in developing zebrafish (Danio rerio). Environ Toxicol Chem, 25 (10): 2734–2741.

Muncke J., Junghans M., Eggen RIL. (2007): Testing estrogenicity of known andnovel (xeno-)estrogens in the MolDarT using developing zebrafish (Danio rerio). Environ Toxicol, 22 (2): 185–193.

Müller HM., Reimann J., Schumacher U., Schwadorf K. (1997a): Natural occurrence of Fusarium toxins in barley harvested during five years in an area of southwest 527 Germany. Mycopathologia, 137: 185-192.

Müller HM., Reimann J., Schumacher U., Schwadorf K. (1997b): Fusarium toxins in wheat harvested during six years in an area of southwest Germany. Nat Toxins, 5: 24-30.

Nagler JJ.; Ruby SM.; Idler DR., So YP. (1987): Serum phosphoprotein phosphorus and calcium levels as reproductive indicators of vitellogenin in highly vitellogenic mature female and estradiol-injected immature rainbow trout (Salmo-gairdneri). Can J Zool, 65 (10): 2421-2425.

Nunˇez Rodriguez J., Kah O., Geffard M., Le Menn F. (1989): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for sole (Solea vulgaris) vitellogenin. Comp Biochem Physiol B, 92: 741–746.

Ober EA., Field HA., Stainier DYR. (2003): From endoderm formation to liver and pancreas development in zebrafish. MOD, 120: 5–18.

OECD (2007): OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Uterotrophic Bioassay in Rodents: a Short - term Screening Test for Estrogenic Properties. Test Guideline 440.

OECD (2010): Guidance Document on the Assessment of Chemicals for Endocrine Disruption Version 9, 17 November 2010)

Olsen CA., Meussen-Elholm ETM., Hongslo JK., Stenersen J., Tollefsen KE. (2005): Estrogenic effects of environmental chemicals: An interspecies comparison. Comp Biochem Physiol C, 141: 267–274.

Opitz R., Maquet E., Huisken J., Antonica F., Trubiroha A., Pottier G., Janssens V., Costagliola S. (2012): Transgenic zebrafish illuminate the dynamics of thyroid morphogenesis and its relationship to cardiovascular development. Dev Biol, 372 (2): 203-16.

Osoki L., Kennelly E. (2003): Phytoestrogens: A Review of the Present State of Research. Phytother Res, 17: 845–869.

Örn S., Holbech H., Madsen TH., Norrgren L., Petersen GI. (2003): Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (Danio rerio) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. Aquat Toxicol, 65: 397–411.

Örn S., Yamani S., Norrgren L. (2006): Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and japanese medaka after exposure to 17a-ethinylestradiol and 17b-trenbolone. Arch Environ Contam Toxicol, 51: 237–243.

Padilla-Banks E., Jefferson WN., Newbold RR. (2001): The immature mouse is a suitable model for detection of estrogenicity in the uterotropic bioassay. Environ Health Perspect, 109 (8): 821–826.

Pagán OR., Coudron T., Kaneria T. (2009): The flatworm planaria as a toxicology and behavioral pharmacology animal model in undergraduate research experiences. JUNE, 7 (2): A48-A52.

Palmiter RD., Norstedt G., Gelinas RE., Hammer RE., Brinster RL. (1983): Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. Science, 222: 809-814.

Parinov S., Kondrichin I., Korzh V., Emelyanov A. (2004): Tol2 transposon mediated enhancer trap to identify developmentally regulated zebrafish genes in vivo. Dev Dyn, 231: 449-459.

Payne J., Scholze M., Kortenkamp A. (2001): Mixtures of four organochlorines enhance human breast cancer cell proliferation. Environ Health Perspect, 109: 391-397.

Petersen K., Fetter E., Kah O., Brione F., Scholz S., Tollefsen KE. (2013): Transgenic (cyp19a1b - GFP) zebrafish embryos as a tool for assessing combined effects of oestrogenic chemicals. Aquatic Toxicol, 138–139: 88–97.

Peterson RT., Mably JD., Chen JN., Fishman MC. (2001): Convergence of distinctpathways to heart patterning revealed by the small molecule concentramide and the mutation heart-and-soul. Curr Biol, 11: 1481–1491.

Pfaffl MW. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-timeRT-PCR. Nucleic Acids Res, 29 (9): e45.

Pfaffl MW., Horgan GW., Dempfle L. (2022): Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Res, 30 (9): e36.

Powers DA., Hereford L., Cole T., Chen TT., Lin CM., Kight K., Creech K., Dunham I. (1992): Electroporation: a method for transferring genes into the gametes of zebrafish (Brachydanio

rerio) channel catfish (Ictalurus punctatus) and common carp (Cyprinus carpio). Mol Mar Biol Biotechnol, 1: 301-6.

Prestridge DS. (1995): Predicting Pol II Promoter Sequences Using Transcription Factor Binding Sites. J Mol Biol, 249: 923-32.

Purdom CE., Hardiman PA., Bye VJ., Eno NC., Tyler CR., Sumpter JP. (1994): Estrogenic effects of effluents from sewage treatments works. Chem Ecol, 8: 275-285.

Puy-Azurmendi E., Olivares A., Vallejo A., Ortiz-Zarragoitia M., Piña B., Zuloaga O., Cajaraville MP. (2014): Estrogenic effects of nonylphenol and octylphenol isomers *in vitro* by recombinant yeast assay (RYA) and in vivo with early life stages of zebrafish. Sci Total Environ, 466–467: 1–10.

Quandt K., Frech K., Karas H., Wingender E., Werner T. (1995): MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. Nucleic Acids Res, 23: 4878-84.

Rand MD. (2010): Drosophotoxicology: the growing potential for Drosophila in neurotoxicology. Neurotoxicol Teratol, 32(1): 74-83.

Razandi M., Pedram A., Merchenthaler I., Greene GL., Levin ER. (2004): Plasma membrane estrogen receptors exist and function as dimers. Mol Endocrinol, 18: 2854–2865.

Rider CV., Hartig PC., Cardon MC., Wilson VS. (2009): Development of a competitive binding assay system with recombinant estrogen receptors from multiple species. Toxicol Lett, 184 (2): 85-9.

Rohner N., Bercsényi M., Orbán L., Kolanczyk ME., Linke D., Brand M., Nüsslein-Volhard C. (2009): Duplication of fgfr1 permits fgf signaling to serve as a target for selection during domestication. Curr Biol, 19: 1642–164.

Rose J., Holbech H., Lindholst C., Nřrum U., Povlsen A., Korsgaard B., Bjerregaard P. (2002): Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (Danio rerio). Comp Biochem Phys C, 131: 531–539.

Roure A, Rothbächer U., Robin F., Kalmar E., Ferone G., Lamy C., Missero C., Mueller F., Lemaire P. (2007): A multicassette gateway vector set for high throughput and comparative analyses in *Ciona* and vertebrate embryos. PLoS ONE, 2 (9): e916.

Routledge EJ., Sumpter JP. (1996): Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. Environ Toxicol Chem, 15: 241–248.

Rubin GM., Spradling AC. (1982): Genetic transformation of Drosophila with transposable element vectors. Science, 218 (4570): 348-53.

Ruh MF., Zacharewski T., Connor K., Howell J., Chen I., Safe S. (1995): Naringenin: a weakly estrogenic bioflavonoid that exhibits antiestrogenic activity. Biochem Pharmacol, 50: 1485-1493.

Ryan KJ. (1982): Bio Chemistry of aromatase: significance to female reproductive physiology. Cancer Res, 42 (8 Suppl): 3342s–3344s.

Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sandor G., Vanyi A. (1990): Mycotoxin research in the Hungarian Central Veterinary Institute. Acta Vet Hung, 38 (1–2), 61–68.

Sanseverino J., Gupta RK., Layton AC., Patterson SS., Ripp SA., Saidak L., Simpson ML., Schultz TW., Sayler GS. (2005): Use of Saccharomyces cerevisiae BLYES expressing bacterial bioluminescence for rapid, sensitive detection of estrogenic compounds. Appl Environ Microb, 71: 4455-4460.

Sarmasik A., Jang I-K., Chun CZ., Lu JK., Chen TT. (2001): Transgenic live-bearing fish and crustaceans produced bytransforming immature gonads with replication-defective pantropic retroviral vectors. Mar Biol, 3: 470-477.

Scheer N., Campos-Ortega JA. (1999): Use of the Gal4-UAS technique for targeted gene expression in the zebrafish. Mech Dev, 80 (2): 153-8.

Schmitt S., Reifferscheid G., Claus E., Schlüsener M., Buchinger S. (2012): Effect directed analysis and mixture effects of estrogenic compounds in a sediment of the river Elbe. Environ Sci Pollut Res Int, 19 (8): 3350-61.

Scholz S., Fischer S., Gündel U., Küster E., Luckenbach T., Voelker D. (2008): The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. Environ Sci Pollut Res, 15:394–404.

Schultis T., Metzger JW. (2004): Determination of estrogenic activity by LYES-assay (yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase). Chemosphere, 57 (11): 1649–1655.

Schwartz P., Bucheli TD., Wettstein FE., Burkhardt-Holm P. (2013): Life-cycle expo-sure to the estrogenic mycotoxin zearalenone affects zebrafish (Danio rerio) development and reproduction. Environ Toxicol, 28 (5): 276-89.

Schwartz P., Thorpe KL., Bucheli TD., Wettstein FE., Burkhardt-Holm P. (2010): Short-term exposure to the environmentally relevant estrogenic mycotoxin zearalenone impairs reproduction in fish. Sci Total Environ, 409: 326-333.

Seefeldt B., Kasper R., Seidel T., Tinnefeld P., Dietz KJ., Heilemann M., Sauer M. (2008): Fluorescent proteins for single-molecule fluorescence applications. J Biophotonics, 1 (1): 74-82.

Seifert M., Haindl S., Hock B.(1999): Development of an enzyme linked receptor assay (ELRA) for estrogens and xenoestrogens. Anal Chim Acta, 386: 191–9.

Seok SH., Park JH., Baek MW., Lee HY., Kim DJ., Uhm HM., Hong JJ., Na YR., Jin BH., Ryu DY., Park JH. (2006): Specific activation of the human HSP70 promoter by copper sulfate in mosaic transgenic zebrafish. J Biotechnol, 126: 406–413.

Sheehan DM., Willingham EJ., Bergeron JM., Osborn CT., Crews D. (1999): No treshold dose for estradiol- induced sex reversal of turtle embryos: how little is too much? Environ Health Perspect, 107 :155-159.

Siddique HR., Chowdhuri DK., Saxena DK., Dhawan A. (2005): Validation of Drosophila melanogaster as an in vivo model for genotoxicity assessment using modified alkaline Comet assay. Mutagenesis 20(4):285-90

Silva E., Rajapakse N., Kortenkamp A. (2002): Something from “nothing”–eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. Environ Sci Technol, 36: 1751-1756.

Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, Mendelson CR., Bulun SE. (1994): Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. Endocr Rev, 15 (3): 342-55.

Sinzelle L., Kapitonov VV., Grzela DP., Jursch T., Jurka J., Izsvak Z., Ivics Z. (2008): Transposition of a reconstructed Harbinger element in human cells and functional homology with two transposon-derived cellular genes. Proc Natl Acad Sci USA, 105: 4715-4720.

Soto AM., Justicia H., Wray JW., Sonnenschein C. (1991): p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. Environ Health Perspect, 92: 167-173.

Soto AM., Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO. (1995): The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. Environ Health Perspect, 103 (Suppl 7):113-22.

Strähle U., Scholz S., Geisler R., Greiner P., Hollert H., Rastegar S., Schumacher A., Selderslaghs I., Weiss C., Witters H., Braunbeck T. (2012): Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments--a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. Reprod Toxicol, 33 (2):128-32.

Strimbu K., Tavel JA. (2010): What are Biomarkers? Curr Opin HIV AIDS, 5 (6): 463–466.

Stuart GW., McMurray JV., Westerfield M. (1988): Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. Development, 103 (2):403-12.

Stuart GW., Vielkind JR., McMurray JV., Westerfield M. (1990): Stable lines of transgenic zebrafish exhibit reproducible patterns of transgene expression. Development, 109 (3): 577-84.

Sumpter JP. (1985): The purification, radioimmunoassay and plasma levels of vitellogenin from the rainbow trout Salmo gairdneri. In: Lofts, B., Holmes, W.H. (Eds.), Trends in Comparative Endocrinology. University Press, Hong Kong.

Sumpter JP. (2005): Endocrine disrupters in the aquatic environment: an overview. Acta Hydroc Hydrob, 33 (1): 9–16.

Sumpter JP., Jobling S. (1993): Detergent components in sewage effluent are weakly estrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) hepatocytes. Aquat Toxicol, 27: 661-672.

Sumpter JP., Jobling S. (1995): Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environ Health Perspect, 103 (Suppl 7): 173-178.

Suster ML., Sumiyama K., Kawakami K. (2009): Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish and mice. BMC Genomics, 10: 477.

Suzuki Y., Kagawa N., Fujino T., Sumiya T., Andoh T., Ishikawa K., Kimura R., Kemmochi K., Ohta T., Tanaka S. (2005): A novel high-throughput (HTP) cloning strategy for site-directed designed chimeragenesis and mutation using the Gateway cloning system Nucleic Acids Res, 33 (12).

Szelei J., Váradi L., Müller F., Erdélyi F., Orbán L., Horváth L., Duda E. (1994): Liposome-mediated gene transfer in fish embryos. Transgenic Res, 3 (2): 116-119.

Tanabe S. (1988): PCB problems in the future: foresight from current knowledge. Environ Pollut. 50: 5-28.

Tao T., Peng J. (2009): Liver development in zebrafish (Danio rerio). J Genet Genomics, 36: 325-334.

Taylor JS, Braasch I, Frickey T, Meyer A, Van de Peer Y. (2003): Genome duplication, a trait shared by 22000 species of ray-finned fish. Genome Res, 13 (3): 382-90.

Tchoudakova A., Callard GV. (1998): Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. Endocrinology, 139: 2179–2189.

Ternes TA., Stumpf M., Mueller J., Haberer K., Wilken RD., Servos M. (1999): Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants—I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. Sci Total Environ, 225: 81–90.

Terrien X., Fini J-B., Demeneix BA., Schramm K-W., Prunet P. (2011): Generation of fluorescent zebrafish to study endocrine disruption and potential crosstalk between thyroid hormone and corticosteroids. Aquat Toxicol, 105(1–2): 13–20.

Thermes V., Grabher C., Ristoratore F., Bourrat F, Choulika A., Wittbrodt J., Joly JS. (2002): I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. Mech Dev, 118 (1-2): 91-8.

Thisse C., Thisse B. (2008): High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. Nature Protocols, 3 (1): 59-69.

Tollefsen K-E., Bratsberg E., Bøyum O., Finne EF., Gregersen IK., Hegseth M., Sandberg C., Hylland K. (2006): Use of fish in vitro hepatocyte assays to detect multi-endpoint toxicity in Slovenian river sediments. Mar Environ Res, 62 (Suppl 1): S356–S359.

Tollefsen KE., Mathisen R., Stenersen J. (2003): Induction of vitellogenin synthesisin an Atlantic salmon (Salmo salar) hepatocyte culture: a sensitive in vitro bioassay for the oestrogenic and antioestrogenic activity of chemicals. Biomarkers, 8: 394–407.

Tong SK., Chung BC.. (2003): Analysis of zebrafish cyp19 promoters. J Steroid Biochem Mol Biol, 86 (3-5): 381-6.

Tong SK., Mouriec K., Kuo MW., Pellegrini E., Gueguen MM., Brion F., Kah O., Chung BC. (2009): A cyp19a1b-gfp (aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells. Genesis, 47 (2): 67-73.

Tong Y., Shan T., Poh YK., Yan T., Wang H., Lam SH., Gong Z. (2004): Molecular cloning of zebrafish and medaka vitellogenin genes and comparison of their expression in response to 17beta-estradiol. Gene, 328: 25-36.

Trant JM., Gavasso S., Ackers J., Chung BC., Place AR. (2001): Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (Danio rerio). J Exp Zool, 290 (5): 475-83.

Trichet V., Buisine N., Mouchel N., Morán P., Pendás AM., Le Pennec JP., Wolff J. (2000): Genomic analysis of the vitellogenin locus in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) reveals a complex history of gene amplification and retroposon activity. Mol Gen Genet, 263: 828–837.

Tu W., Niu L, Liu W, Xu C. (2013): Embryonic exposure to butachlor in zebrafish (Danio rerio): endocrine disruption, developmental toxicity and immunotoxicity, Ecotoxicol Environ Saf, 89:189-95.

Tyler CR., Sumpter JP. (1990): The development of a radioimmunoassay for carp, Cyprinus carpio, vitellogenin. Fish Physiol Biochem, 8: 129–140.

Tyler CR., Van Aerle R., Hutchinson TH., Maddix S., Trip H. (1999): An in vivo testing system for endocrine disruption in fish early life stagesusing induction of vitellogenin. Environ Toxicol Chem, 18: 337–347.

Tyler CR., van Aerle R., Santos EM. (2004): ELISAs for detecting vitellogenin in the fathead minnow (Pimephales promelas)—a critical analysis. Response to Mylchreest et al., Comp Biochem Physiol C 134: 251–257. Comp Biochem Physiol C, 138: 531–532.

Tyler CR., van der Eerden B., Jobling S., Panter G., Sumpter JP. (1996): Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to estrogenic chemicals in a wide variety of Cyprinid fish. J Comp Physiol B, 166: 418–426.

Urasaki A., Morvan G., Kawakami K. (2006): Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal cissequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition. Genetics, 174: 639-649.

Urbatzka R., Rocha E., Reis B., Cruzeiro C., Monteiro R.A.F., Rocha M.J. (2012): Effects of ethinylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens on steroidogenic gene expression and specific transcription factors in zebrafish. Environ Pollut, 164: 28–35.

Van den Belt K., Berckmans P., Vangenechten C., Verheyen R., Witters H. (2004): Comparative study on the in vitro/in vivo estrogenic potencies of 17β-estradiol, estrone, 17α-ethynylestradiol and nonylphenol. Aquat Toxicol, 66 (2): 183–195.

Van den Belt K., Verheyen R., Witters H. (2001): Reproductive effects of ethynylestradiol and 4t-octylphenol on the zebrafish (Danio rerio). Arch Environ Contam Toxicol, 41 (4): 458-67.

Van den Belt K., Verheyen R., Witters H. (2003): Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. Ecotox Environ Safe, 56: 271–281.

Van den Belt K., Wester PW., van der Ven LT., Verheyen R., Witters H. (2002): Effects of ethynylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (Danio rerio): time dependency and reversibility. Environ Toxicol Chem, 21 (4): 767-75.

van den Berg H. (2009): Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease. Environ Health Perspect, 117: 1656-1663.

Van der Ven LT., Holbech H., Fenske M., Van den Brandhof EJ., Gielis-Proper FK., Wester PW. (2003): Vitellogenin expression in zebrafish Danio rerio: evaluation by histochemistry, immunohistochemistry, and in situ mRNA hybridisation. Aquat Toxicol, 65 (1): 1-11.

Van der Ven LTM., Holbech H., Fenske M., Van den Brandhof E-J., Gielis-Proper FK., Wester PW. (2003): Vitellogenin expression in zebrafish Danio rerio: evaluation by histochemistry, immunohistochemistry, and in situ mRNA hybridisation. Aquat Toxicol, 65: 1-11.

van Lipzig Marola MH. (2011): The estrogen receptor, environmental estrogens and the role of cytochrome P450 in bioactivation. Doktori értekezés. de Vrije Universiteit Amsterdam.

van Lipzig MMH. (2011): The estrogen receptor, environmental estrogens and the role of cytochrome P450 in bioactivation Printed by GVO drukkers & vormgevers bv. Pons & Looien, Ede. ISBN 978-90-6464-459-7 oldalszám: 29.

Vanyi A., Buza L., Széka A. (1974): Fusariotoxicosis IV. The effect of F-2 toxin (zear-alenone) on the spermiogenesis of the carp. Hungarian Veterinary Journal, 29: 457–461.

Varga M., Maegawa S., Weinberg ES. (2011**)**: Correct anteroposterior patterning of the zebrafish neurectoderm in the absence of the early dorsal organizer. BMC Dev Bio, 11: 26.

Versonnen BJ, Roose P, Monteyne EM, Janssen CR. (2004): Estrogenic and toxic effects of methoxychlor on zebrafish (Danio rerio). Environ Toxicol Chem, 23 (9): 2194-201.

Versteeg DJ., Stalmanst M., Dyer SD., Janssen C. (1997): Ceriodaphnia and Daphnia: a comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. Chemosphere, 34 (4): 869-892.

Veurink M., Koster M., de Jong -van den. Berg LTW. (2005):The history of DES, lessons to be learned. Pharm World Sci, 27 (3): 139-143.

Villefranc JA., Amigo J., Lawson ND. (2007): Gateway compatible vectors for analysis of gene function in the zebrafish. Dev Dynam, 236: 3077–3087.

Vizziano-Cantonnet D., Baron D., Mahè S., Cauty C, Fostier A, Guiguen Y. (2008): Estrogen treatment up-regulates female genes but does not suppress all early testicular markers during rainbow trout male-to-female gonadal transdifferentiation. J Mol Endocrinol, 41 (5): 277-88.

Vos JG., Dybing E., Greim HA., Ladefoged O., Lambré C., Tarazona JV., Brandt I., Vethaak AD. (2000): Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. Crit Rev Toxicol, 30: 71-133.

Wagner M., Oehlemann J. (2009): Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles, Environ Sci Pollut Res, 16: 278-286.

Wahli W., Dawid IB., Wiler T., Jaggi RB., Ryffel GU. (1979): Vitellogenin in Xenopus laevis is encoded in a small family of genes. Cell, 16: 535-549.

Wallace RA. (1985): Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates, - In: Browder, L.W. (Ed.), Developmental Biology, vol. 1. Plenum, New York, pp. 127-177.

Wang H., Tan JT., Emelyanov A., Korzh V., Gong Z. (2005): Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, Danio rerio. Gene, 15 (356): 91-100.

Wang J., Shi X., Du Y., Zhou B. (2011): Effects of xenoestrogens on the expression of vitellogenin (vtg) and cytochrome P450 aromatase (cyp19a and b) genes in zebrafish (Danio rerio) larvae. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng, 46 (9): 960-7.

Wang W., Liu X., Gelinas D., Ciruna B., Sun Y. (2007): A Fully Automated Robotic System for Microinjection of Zebrafish Embryos. PLoS ONE, 2(9).

White R., Jobling S., Hoare SA., Sumpter JP., Parker MG. (1994): Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. Endocrinology, 135: 175-182.

WHO (2003). Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. Eds: Damstra T., Barlow S., Bergman A., Kavlock R., Van der Kraak G., WHO/PCS/EDC/02.2, World Health Organisation, Geneva. 180 pp.

Williams BA., Mills KT., Burroughs CD., Bern HA. (1989): Reproductive alterationsin female C57BLCrgl mice exposed neonatally to zearalenone, an estrogenicmycotoxin. Cancer Lett, 46 (3): 225–230.

Winn RN. (2001): Transgenic Fish as Models in Environmental Toxicology. ILAR J. 42 (4): 322-329.

Wo´zny M., Brzuzan P., Wolinska L., Góra M., Luczynski K.M. (2010): Preliminaryevaluation of ER and AhR-mediated gene expression patterns in rainbow trout(Oncorhynchus mykiss) liver after short-term exposure to zearalenone in binary mixtures. Environmental Biotechnology, 6 (1): 16–23.

Yang L., Ho NY., Alshut R., Legradi J., Weiss C., Reischl M., Mikut R., Liebel U., Müller F., Sträle U. (2009): Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects og chemicals. Rep Tox, 28: 245-253.

Yang Z., Jiang H., Chaichanasakul T., Gong S., Yang XW., Heintz N., Lin S. (2006): Modified bacterial artificial chromosomes for zebrafish transgenesis. Methods, 39 (3): 183-8.

Yaqoob N., Holotta M., Prem C., Kopp R., Schwerte T. (2009): Ontogenetic development of erythropoiesis can be studied non-invasively in GATA-1:DsRed transgenic zebrafish. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 154 (2): 270-8.

Zelenin AV., Alimov AA., Barmintzev VA., Beniumov AO., Zelenina IA., Krasnov AM., Kolesnikov VA. (1991): The delivery of foreign genes into fertilized fish eggs using high-velocity microprojectiles. FEBS Lett, 287: 118-20.

Zeng Z., Shan T., Tong Y., Lam SH., Gong Z. (2005): Development of estrogen-responsive transgenic medaka for environmental monitoring of endocrine disrupters. Environ Sci Technol, 39 (22): 9001-8.

Zhu ZY., Li G., He L., Chen S. (1985): Novel gene transfer into the fertilised eggs of the goldfish (Carassius auratus L. 1758). Journ Appl Ichthyol, 1: 31-34.

Zinedine A., Soriano JM., Moltó JC., Ma˜nes J. (2007): Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: anoestrogenic mycotoxin. Food Chem Toxicol, 45 (1): 1–18.

Ziv T., Gattegno T., Chapovetsky V., Wolf H., Barnea E., Lubzens E., Admon A. (2008): Comparative proteomics of the developing fish (zebrafish and gilthead seabream) oocytes. Comp Biochem Physiol D, 3 (1): 12-35.

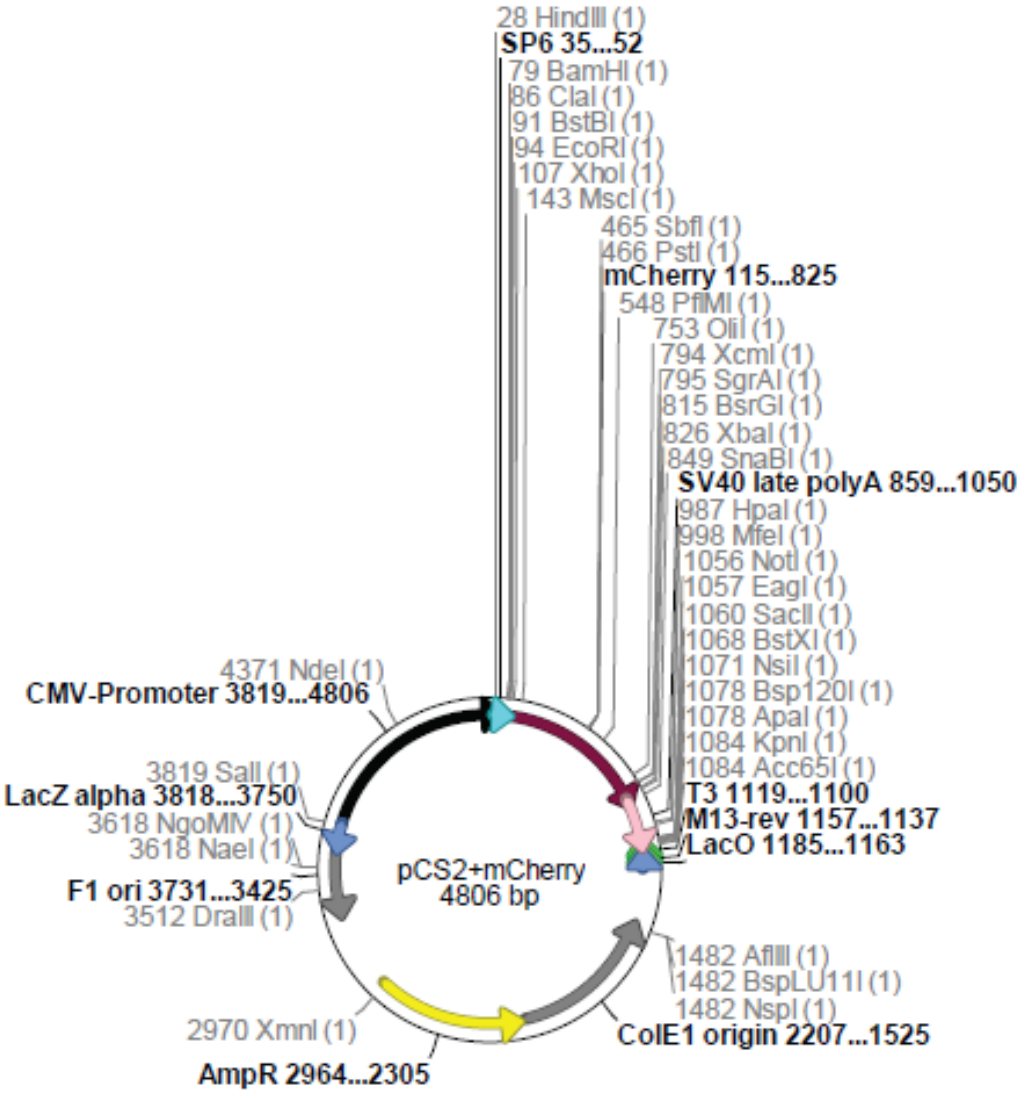
Internet:

http://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTools/EstrogenicActivityDatabaseEADB/default.htm

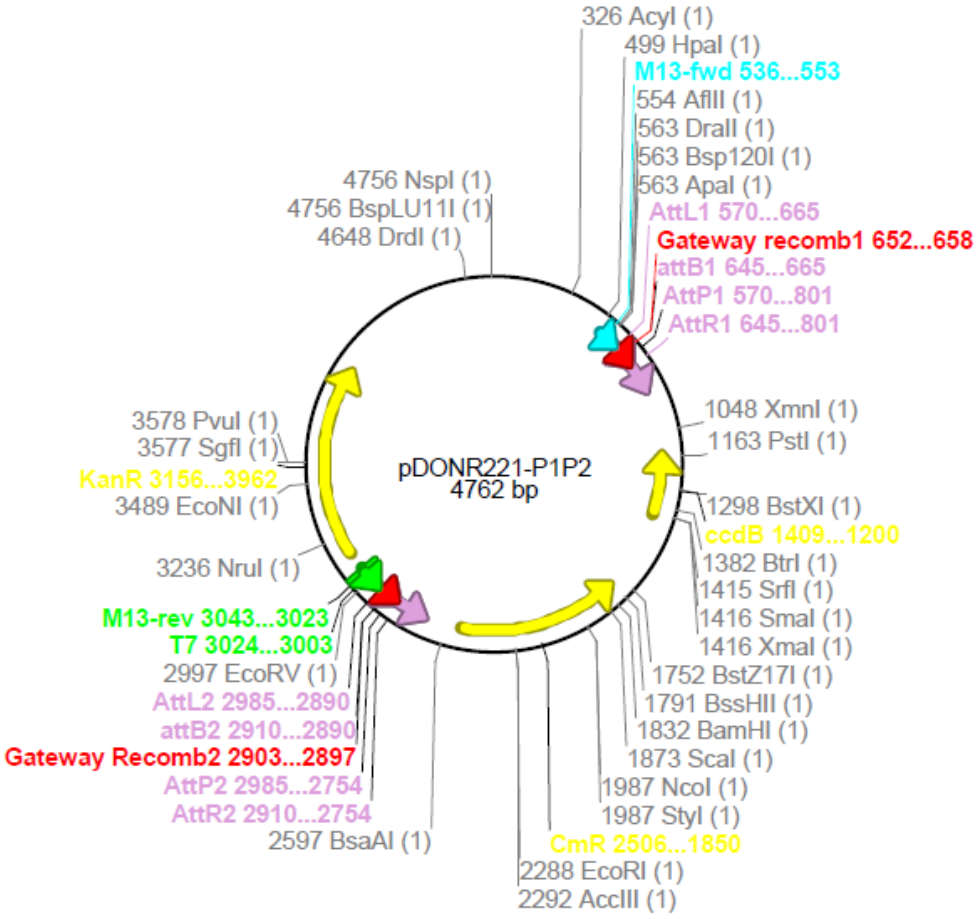
10.14751/SZIE.2014.049

11 Mellékletek

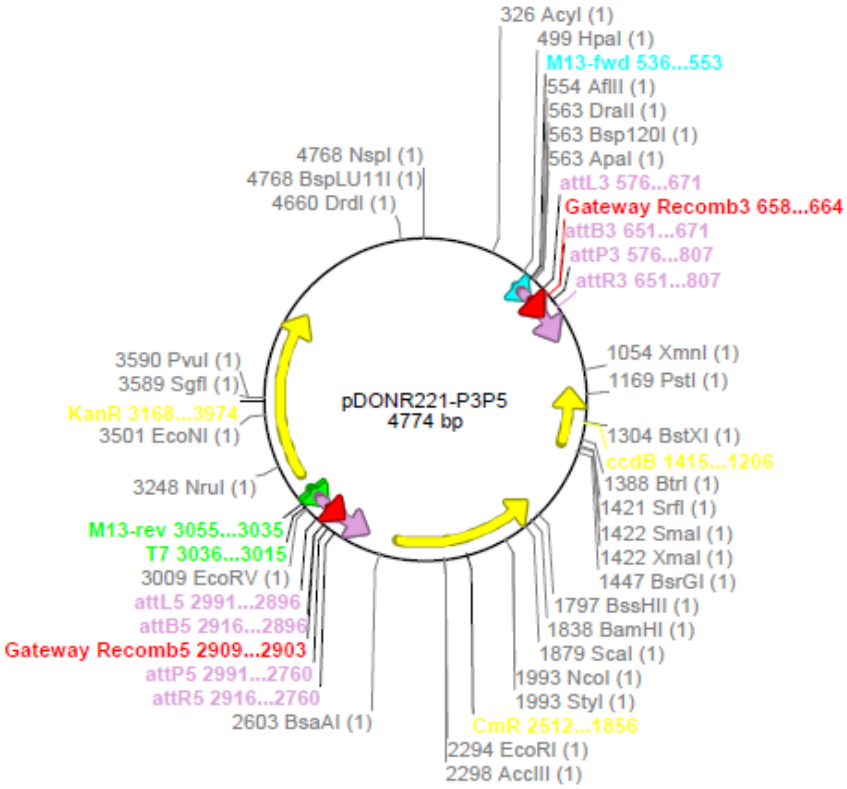
1. melléklet A *pCS2*-mCherry plazmid térképe



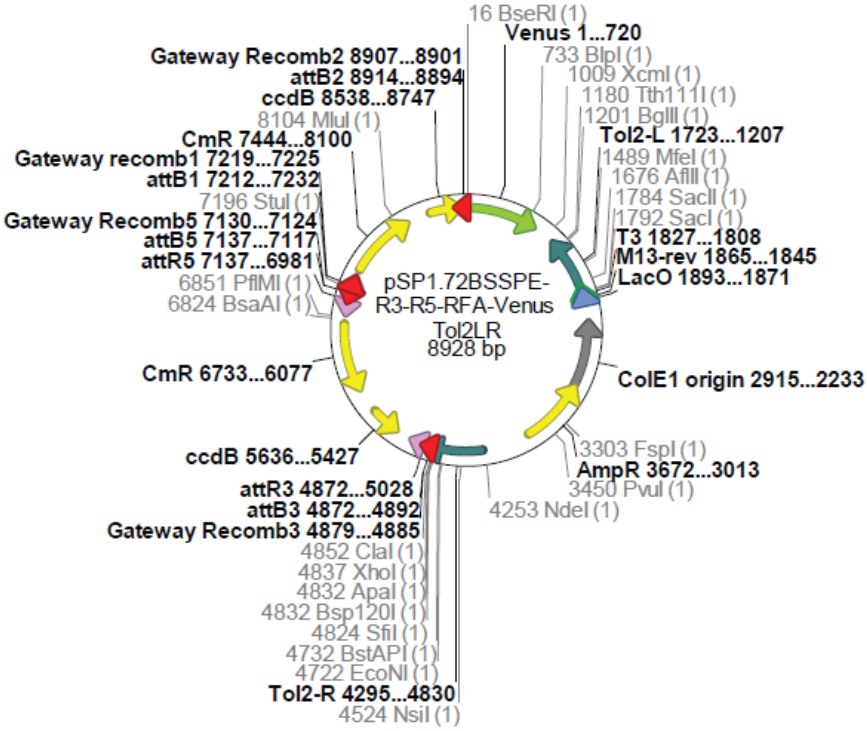
2. melléklet Az mCherry szakasz befogadására alkalmas *attP1* és *attP2* rekombinációs helyeket hordozó donor plazmid térképe



3. melléklet A *vitellogenin* promóter régió befogadására alkalmas *attP3* és *attP5* rekombinációs helyeket hordozó donor plazmid térképe



4. melléklet A *Tol2* karokat hordozó célvektor (destination vektor) térképe



5. melléklet A konstrukció építése során a *BP* reakcióhoz használt PCR termékek és vektorok mérete és mennyisége

fragment/ plazmid neve	**mérete (bp)**	**bemérendő mennyiség (ng)**	**reakció**
vtg-1 promóter-B3B5 (hosszabb)	4082	134,64	**A**
vtg-1 promóter-B3B5 (rövidebb)	3357	22,16	
pDONR221-P3P5	4774	63	**B**
mCherry-B1B2			
pDONR221-P1P2	4762	150	

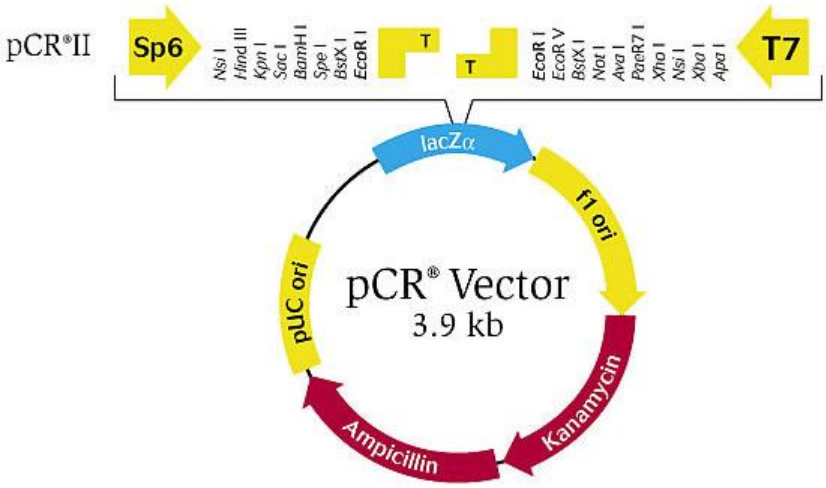
6. melléklet Az LR klónozás során felhasznált vektorok mérete és mennyisége

fragment/ plazmid neve	**mérete (bp)**	**bemérendő mennyiség (ng)**
pDONR221-L1L2 - mCherry	3474	22,93
pDONR221-L3L5 - vtg1 promóter	6142	40,53
pSP17.2BSSPE-R3-R5-RFA-Venus Tol2LR	8928	176,8

7. melléklet Fragmentek vektorba épülésének ellenőrzése restrikciós emésztéssel. A táblázat a várt fragmentméreteket mutatja

reakció	plazmid	beépült szakasz	restrikciós enzim	fragmentméret (bp)
BP klónozás	pDONR221-P3P5	-	Hind III + EcoRV	4774
		vtg1 promóter		3811 + 2065
		-	PstI + XbaI	2342 + 1829 + 603
		vtg1 promóter		3169 + 2342 + 251 + 114
		-	RsaI	1581 + 1214 + 1009 + 538 + 342
		vtg1 promóter		1581 + 1173 + 736 + 606 + 547 + 449 + 335
	pDONR221-P1P2	-	RsaI	1581 + 790 + 538 + 515 + 438 + 432 + 418
		mCherry		1581 + 767 + 644 + 252 + 189 + 48
LR klóno-zás	pSP17.2BSSPE-R3-R5-RFA-Venus Tol2LR	-	PstI	4501 + 1762 + 1627 + 684 + 354
	pSP17.2BSSPE-R3-R5-RFA-Venus Tol2LR - mCherry	mCherry		4501 + 3062 + 1627 + 354 + 326 + 114
	pSP17.2BSSPE-R3-R5-RFA-Venus Tol2LR	vtg1 promóter		4501 + 1762 + 831 + 684 + 419
	pSP17.2BSSPE-R3-R5-RFA-Venus Tol2LR	vtg1 promóter + mCherry		4501 + 3062 + 831 + 419 + 326 + 114
	pSP17.2BSSPE-R3-R5-RFA-Venus Tol2LR	-	DraI	2600 + 1855 + 1487 + 692 + 619 + 592 + 386 + 339
	pSP17.2BSSPE-R3-R5-RFA-Venus Tol2LR	mCherry		2600 + 1849 + 1487 + 692 + 619 + 592 + 339
	pSP17.2BSSPE-R3-R5-RFA-Venus Tol2LR	vtg1 promóter		1855 + 1487 + 1453 + 1317 + 1256 + 1125 + 692 + 619 + 453 + 386 + 339 + 140 + 99
	pSP17.2BSSPE-R3-R5-RFA-Venus Tol2LR	vtg1 promóter + mCherry		1849 + 1487 + 1453 + 1317 + 1256 + 1125 + 692 + 619 + 453 + 386 + 339 + 140 + 99

8. melléklet A vitellogenin *in situ* hibridizációs próba előállítása során használt *pCRII* plazmid térképe



9. melléklet A vonal létrehozása során használt és az ere-zvtg1:gfp vonalba (Chen et al., 2010) épített promóter régiókon *in silico* azonosított ERE régiók

transzkrip-ciós faktor	**rövidítés**	**bázissorrend**	**vtg1_prom _4082 bp**	**vtg1_prom _3357 bp**	**vtg1_prom _Chen 2010**	**program**
			régió	**régió**	**régió**	
ösztrogén receptor-α kötőhely	ER-alpha [T00261]	ATGACCAT	83- 90	-	-	ALGGEN PROMO
ösztrogén receptor-α kötőhely	ER-alpha [T00261]	GTGACCAA	392- 399	-	-	
ösztrogén receptor-α kötőhely	ER-beta [T04651]	TGACCATAG	84- 92	-	-	
ösztrogén receptor-α kötőhely	ER-beta [T04651]	TGACCAAGT	393- 401	-	-	
ösztrogén receptor-α kötőhely	ER-alpha [T00264]	TGACCTTAAA	931- 940	202-211	-	
ösztrogén receptor-α kötőhely	ER-alpha [T00261]	TTGACCTT	930- 937	201-208	-	
ösztrogén receptor-α kötőhely	ER-alpha [T00261]	TTGACCAG	1972- 1979	1243-1250	-	
ösztrogén receptor-α kötőhely	ER-alpha [T00261]	ACGGTCAA	2238- 2245	1509-1516	-	
ösztrogén receptor-α kötőhely	ER-alpha [T00261]	AGGGTCAG	3174- 3181	2445-2452	813- 820	
ösztrogén receptor-α kötőhely	ER-alpha [T00261]	TTGGTCAG	4015- 4022	3287-3294	1655- 1662	

ösztrogén receptor-ß kötőhely	ER-beta [T04651]	TGACCTTAA	931- 939	202-210	-	
ösztrogén receptor-ß kötőhely	ER-beta [T04651]	TGACCAGAT	1973- 1981	1244- 1252	-	
ösztrogén receptor-ß kötőhely	ER-beta [T04651]	GCACGGTCA	2236- 2244	1507- 1515	-	
ösztrogén receptor-ß kötőhely	ER-beta [T04651]	CAAGGGTCA	3172- 3180	2443- 2451	811- 819	
ösztrogén receptor-ß kötőhely	ER-beta [T04651]	ACTTGGTCA	4013- 4021	3285- 3293	1653- 1661	
ösztrogén receptor kötőhely, IR3	V$ER.01	tatacagGTTAaagtg acattta	3998-4020	3273-3295	-	MAT-INSPECTOR (GenoMatix)
ösztrogén válasz elem, IR3	V$ER.03	tccagaggttaggttAA CCtggc	890-912	165-187	-	
ösztrogén válasz elem, IR3	V$ER.03	atgacaggccaggttA ACCtaac	897-919	172-194	-	
ösztrogén válasz elem, IR3	V$ER.03	ggggcagggcaacctA ACCcaaa	2888-2910	2163-2185	1529-1551	
ösztrogén válasz elem, IR3	V$ER.03	attaaggggcagggcA ACCtaac	2893-2915	2168-2190	1536-1558	
ösztrogén válasz elem	új motívum	CAGGGCAACCT AACCCA	1903-1920	1174-1191	-	Dragon ERE Finder 3.0
1/2 ösztrogén válasz elem	1/2 ERE b	TGACC	85-89	-	-	manuális szekvenciaazonosítás
1/2 ösztrogén válasz elem	1/2 ERE b	TGACC	932-936	203-207	-	

1/2 ösztrogén válasz elem	1/2 ERE alternatív	CAGCTG	1248-1253	519-524	-	
1/2 ösztrogén válasz elem	1/2 ERE b	TGACC	1974-1978	1245-1249	-	
1/2 ösztrogén válasz elem	1/2 ERE a	GGTCA	2241-2245	1512-1516	-	
1/2 ösztrogén válasz elem	1/2 ERE alternatív	CAGCTG	2421-2426	1692-1697	60-65	
1/2 ösztrogén válasz elem	1/2 ERE a	GGTCA	3177-3181	2448-2452	816-820	
1/2 ösztrogén válasz elem	1/2 ERE a alternatív	CAGTCA	3282-3287	2553-2558	921-926	
1/2 ösztrogén válasz elem	1/2 ERE b alternatív	TGACT	3292-3296	2563-2567	931-935	
1/2 ösztrogén válasz elem	1/2 ERE alternatív	CAGCTG	3330-3335	2601-2606	969-974	
1/2 ösztrogén válasz elem	1/2 ERE a	GGTCA	4019-4023	3290-3294	1658-1662	

10. melléklet

A doktori munkával kapcsolatos publikációk:

Tudományos közlemények folyóiratban:

Bakos K., Kovács R., Staszny Á., Kánainé S. D., Urbányi B., Müller F., Csenki Zs., Kovács B. (2013): Developmental toxicity and estrogenic potency of zearalenone in zebrafish (*Danio rerio*). Aquatic Toxicology, 136–137: 13-21. (IF: 3,761)

Bakos K., Csenki Zs., Kovács R., Kánainé S. D., Müller F., Hadzhiev Y., Kovács B., Urbányi B. (2011): Hormonháztartást zavaró anyagok monitorozása szennyezett vizekben transzgenikus zebradánióval. Halászat 104, 1 (2011): 24-28.

Bakos K., Csenki Zs, Kovács R, Kánainé S. D., Bencsik D., Hadzhiev Y., Kovács B., Müller F., Urbányi B. (2011): Transzgenikus zebradánió vonal létrehozása ösztrogén hatású anyagok vizsgálatához. (Establishment of a transgenic zebrafish line for testing estrogenic compounds). Animal welfare, etológia és tartástechnológia (AWETH), 7:(4):200-201.

Konferencia kiadványban összefoglalóként megjelent közlemények:

Bakos K., Csenki Zs., Kovacs R., Kanaine S. D., Hadzhiev Y., Kovacs B., Müller F., Urbanyi B. (2012): Establishment of an EDC screening system: a liver transgenic zebrafish line. Fish and Amphibian Embryos as Alternative Models in Toxicolgy and Teratology Symposium, 2012. október 11-12., Aulnay sous-Bois, Párizs (Franciaország) (poszter)

Bakos K., Csenki Zs., Staszny A., Kovacs R., Kanaine S. D., Urbanyi B., Müller F., Kovacs B. (2012): Assessment of the developmental effects and estrogenic potency of zearalenone in zebrafish (Danio rerio), Fish and Amphibian Embryos as Alternative Models in Toxicolgy and Teratology Symposium, 2012. október 11-12., Aulnay sous-Bois, Párizs (Franciaország) (poszter)

Bakos K., Csenki Zs., Bencsik D., Kovács R., Kánainé S. D., Hadzhiev Y., Kovács B., Müller F., Urbányi B. (2012): Estrogenic compounds in water: establishment of a fish-based screening system. Global Aquaculture "Securing our future" conference 2012. szeptember 1-5., Prága (Csehország) (poszter)

Bakos K., Csenki Zs., Kovács R., Kánainé S. D., Bencsik D., Hadzhiev Y., Müller F., Kovács B., Urbányi B. (2012): Establishment of a transgenic zebrafish line for detecting estrogenic activity, 10th International Congress on the Biology of Fish, 2012. július 15-19., University of Wisconsin – Madison, Wisconsin (USA) (előadás)

Bakos K., Csenki Zs., Kovács R., Kánainé S. D., Urbányi B., Kovács B. (2012): Két módszer a zearalenon ösztrogén hatásának vizsgálatára zebradánión (*Danio rerio*). XXVI. Halászati Tudományos Tanácskozás, 2012. május 23-24. ,Szarvas (poszter)

Bakos K., Gindele R., Kovács R., Bencsik D., Gazsi Gy., Tarcai Zs., Horváth B. R., Urbányi B., Kócsó A., Csenki Zs. (2012): Akut toxicitási tesztek laboron belüli ismételhetőségének

vizsgálata különböző zebradánió (*Danio rerio*) vonalakon. XXVI. Halászati Tudományos Tanácskozás, 2012. május 23-24., Szarvas (poszter)

Bakos K., Csenki Zs., Kovács R., Kánainé S. D., Bencsik D., Hadzhiev Y., Müller F., Kovács B., Urbányi B. (2012): Establishment of a liver transgenic zebrafish line for screening estrogenic compounds. 75th Anniversary of Albert Szent-Györgyi's Nobel Prize Award. 2012. március 22-25., Szeged (előadás)

Bakos K., Csenki Zs., Kovács R., Kánainé S. D., Bencsik D., Hadzhiev Y., Kovács B., Müller F., Urbányi B. (2011): Transzgenikus zebradánió vonal létrehozása ösztrogén hatású anyagok vizsgálatához. III. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok, 2011. október 14-15., Gödöllő (előadás)

Bakos K., Csenki Zs., Kovacs B., Kovacs R., Kanaine S.D., Hadzhiev Y., Müller F., Urbányi B. (2011): Establishment of a transgenic zebrafish (*Danio rerio*) based EDC screening system. Genomics in *Aquaculture* symposium, 2011 szeptember 14-17., Heraklion (Kréta) (poszter)

Bakos K., Csenki Zs., Kovács R., Kánainé S. D., Bencsik D., Hadzhiev Y., Kovács B., Müller F., Urbányi B. (2011): Transgenic zebrafish lines as *in vivo* EDC screening systems. 7th European Zebrafish Meeting, 2011. június 5-9., Edinburgh (Skócia) (poszter)

Bakos K., Csenki Zs., Kovács R., Kánainé S. D., Müller F., Hadzhiev Y., Kovács B., Urbányi B. (2011) Ösztrogén hatású anyagok vizsgálatára alkalmas transzgenikus zebradánió vonal létrehozása. XXXV. Halászati Tudományos Tanácskozás, 2011. május 25-26., Szarvas (poszter)

Bakos K., Kovács B., Csenki Zs., Kovács R., Kánainé S. D., Hadzhiev Y., Müller F., Urbányi B. (2010): Establishment of a new, zebrafish based toxicological test system. Aquaculture Europe 2010. "Seafarming Tomorrow" konferencia, 2010. október 6-8., Porto, (Portugália) (poszter)

Bakos K., Kovacs B., Csenki Zs., Kovács R., Kánaine S. D., Hadzhiev Y., Müller F., Urbányi B. (2010): Establishment of transgenic zebrafish lines for EDC tests. „The zebrafish model in toxicology and teratology"konferencia, 2010. szeptember 2-3., Karlsruhe (Németország) (poszter)

Bakos K. (2010): Ösztrogén hatású szennyezőanyagok kimutatására alkalmas zebradánió alapú tesztrendszer létrehozása. Kárpát-medencei Doktoranduszok Nemzetközi Konferenciája (TUDOC), 2010. május 27., Gödöllő (előadás)

Bakos K., Csenki Zs., Kovács R., Kánainé S. D., Müller F., Hadzhiev Y., Kovács B., Urbányi B. (2010): Multikolor zebradánió alapú tesztrendszer toxikológiai vizsgálatokhoz. XXXIV. Halászati Tudományos Tanácskozás, 2010. május 12-13., Szarvas (poszter)

10.14751/SZIE.2014.049

12 Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni köszönetemet mindazoknak, akik segítségemre voltak doktori értekezésem elkészítésében. Elnézést kérek azoktól a jelenlegi és volt kollégáktól és barátoktól, akiket hely hiányában most nem tudok név szerint megemlíteni.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Kovács Balázsnak** doktori tanulmányaim hatékony támogatásáért és ösztönzéséért, hogy mindvégig támogatta önálló munkavégzésemet és segítette szakmai előmenetelemet.

Köszönetet mondok **Dr. Müller Ferenc** társtémavezetőmnek, aki végig önzetlenül támogatott, bíztatott és szakított időt doktori munkám elősegítésére.

Hálával tartozom a Halgazdálkodási Tanszék tanszék vezetőjének, **Dr. Urbányi Béla**nak bíztató szavaiért, támogatásáért, és hogy lehetővé tette számomra, hogy a doktori munka során külföldi tapasztalatokkal is gazdagodjak. Külön köszönöm, hogy a tanszéki kollektíva tagja lehetek.

Szeretnék köszönetet mondani minden jelenlegi és volt munkatársamnak, akikkel az évek során együtt dolgoztam és tanultam. Külön szeretném kiemelni a következő személyeket:

Köszönöm **Dr. Szentirmai Attilának**, hogy a pályámon elindított, irányt mutatott és önálló gondolkodásra, kutatómunkára nevelt.

Köszönetet szeretnék mondani **Dr. Varga Lászlónak**, hogy szakmai és magánéleti kérdésekben is végig támogatott, és nem engedett letérni a kutatói pályáról.

Hálával tartozom **Dr. Orosz Lászlónak** a segítségéért és hogy példaértékű életútján elsajátított szakmai tudását és élettapasztalatát megosztotta velem.

Köszönönetet mondok munkatársaimnak illetve hallgatóimnak is, akikben egyben barátra is leltem: **Dr. Horváth Ákos**nak, **Kánainé Sipos Dóra**nak, **Kovács Róbert**nek, **Uri Csilla**nak, **Reining Márta**nak, **Ősz Ágnes**nek, **Bencsik Dóra**nak, **Gazsi Gyöngyi**nek, **Csepeli Andreá**nak, **Holes Annamária**nak és **Staszny Ádám**nak.

Sokat köszönhetek egykori diáktársaimnak, legjobb barátaimnak, **Dr. Kovács Endrének, Dr. Matta Csabának, Brázda Péternek** és **Kozma-Vízkeleti Elizának**, akikkel számos kalandot éltünk át és akik elviseltek és bíztattak, nemcsak szakmai kérdésekben.

Köszönet a Birminghami Egyetem és a lipcsei UFZ Helmholtz Association kutatóintézet munkatársainak, **Dr. Yavor Hadzhiev**nek, **Dr. Stefan Scholtz**nak és **Fetter Évá**nak az értékes szakmai tapasztalatokért és az önzetlen, baráti segítségért.

Köszönöm **Tollonics Évi**nek, hogy mindig segít eligazodni az élet dzsungelében.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni Családomnak, hogy eljuthattam idáig.

Köszönöm édesanyámnak, **Bakosné Fülöp Katalin**nak, édesapámnak, **Bakos Iván**nak, testvéremnek, **Bakos Mónikán**ak, nagyszüleimnek, **Bakos István**nak és **Bakos Istvánné**nak, **Fülöp László**nak és **Fülöp Lászlóné**nak, nagynénémnek, **Chikány Lóránt**nak és férjének **Chikány Lóránt**nak a boldog családi hátteret, hogy hittek bennem, és támogatásukra, szeretetükre mindig számíthattam. Az otthonról hozott gyökerek olyan értékek számomra, amelyek az életben bármikor biztos kapaszkodókat jelentenek.

Nagybetűs köszönet jár férjemnek, **Dr. Csenki-Bakos Zsolt Imrének,** akiben igazi társra találtam, aki mindig türelemmel mellettem áll, ha segítségre szorulok és velem örül, ha boldog vagyok.

A doktori munka a következő pályázatok támogatása nélkül nem valósulhatott volna meg: OTKA (NNF-78834), Baross Gábor Program (HALEDC09-REG-KM-09-2-2009-0066), Mycostop pályázat (NKTHTECH 08-A3/2-2008-0385), TÁMOP-4.2.2.B-10/1-2010-0011 és TÁMOP-4.2.1.B-11/2KMR-2011-0003 pályázatok, Magyar-Német Projektalapú Kutatócserék (DAAD 29836), VKSZ_12-1-2013-0078, KMR_12-1-2012-0221, KTIA_AIK_12-1-2012-0010, KTIA_AIK_12-1-2013-0017 és Cytrothreat EU FP7 265264 pályázatok.