



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**Ösztrogén hatást kimutató biomarker zebraadánió vonal
létrehozása**

Doktori értekezés tézisei

Csenki-Bakos Katalin

GÖDÖLLŐ

2014

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

.....
Az iskolavezető jóváhagyása



.....
A témavezető jóváhagyása

.....
A társtémavezető jóváhagyása

1 A munka előzményei, kitűzött célok

1.1 A munka előzményei

A hormonrendszer régóta áll a kutatók érdeklődésének középpontjában. A szervezetben található komplex molekulákon kívül számos, a környezetben jelen lévő anyag is rendelkezhet hormonhatással, ezen belül ösztrogénhatással. 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 tiszta formában vannak jelen, így hatásukat más vegyületek is befolyásolhatják. Egy környezeti minta valós ösztrogenitását csak *in vitro* és *in vivo* ökotoxikológiai tesztszerekből álló komplex tesztsorozattal lehet felderíteni.

A közelmúltban számos sejtvonala és élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) alapú tesztszere 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 tesztszerekről, 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 biomarker vonalak létrehozása felé. Az ilyen vonalak segítségével *in vivo* vizsgálható pl. egy ösztrogénérzékeny gén aktiválódása.

A gerincesek közül a halak szerepe a környezeti kockázatbecslésben kiemelkedő. Az emlős modellekkel szemben számos előnyt kínálnak: vízi szervezetek 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 aromataz-b, a koriogenin-H és a vitellogenin (vtg). A közelmúltban ezekkel több ösztrogénhatást kimutató bioszenzor vonalat hoztak létre laboratóriumban használt halmodellekből, medakából (*Oryzias latipes*) és zebradánióból (*Danio rerio*). A transzgenikus halmodellek az ösztrogénhatás vizsgálatában kiemelt fontosságúak, azonban a munkám kezdetéig létrehozott vonalak 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 sajátosság, 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 transzgen konstrukciók tervezését, és a közelmúltban számos technikát dolgoztak ki a faj transzgenézisére.

1.2 Célkitűzés

Munkám elsődleges célja egy ösztrogénhatás kvantitatív kimutatására alkalmas transzgenikus zebraadánió vonal létrehozása és a vonalon alkalmazható kísérleti protokoll kialakítása volt. Zebraadánióban több olyan ösztrogénhatásra indukálódó gén ismert, amely alkalmas lehet ilyen vonalak létrehozására. 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 amellet, hogy biomarker 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. A zebraadánióban 8 vtg gén található, 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 transzgenikus vonal mellett a zearalenon halak egyedfejlődésére és vitellogenin termelésére gyakorolt hatását is vizsgáltam, vad típusú zebraadánió 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.

2 Anyag és módszer

2.1 Felhasznált állatok és tartási körülmények

A vizsgálatokat zebra-dánió (*Danio rerio*) halfaj vad típusú AB vonalán végeztem. A halak tartása külön haltartó szobában, zebra-dánióra kifejlesztett recirkulációs rendszerben (Tecniplast ZebTEC), 25,5°C-os vízhőmérsékleten, fényprogram (14 óra világos, 10 óra sötét) mellett történt. A kifejlett egyedek táplálása naponta kétszer, zebra-dánió számára fejlesztett teljes értékű táppal (zebrafish basic food, Special Diets Services /SDS/) történt, hetente kétszeri élő sórák lárva (*Artemia nauplii*) kiegészítéssel. Az ivadékok az elúszásuk után napi háromszor kaptak haltápot, majd a tizedik naptól naponta kaptak sórák kiegészítést.

A halak szaporítása speciális, 1 literes szaporítóedényekben zajlott (Tecniplast), melyekbe a halak az ívatást megelőző napon kerültek kihelyezésre ivar szerint, egymástól válaszfallal elválasztva. Az ikrák gyűjtése a következő nap reggelén szinkronizáltan történt, a válaszfalak eltávolítását követően. A kísérletekhez megfelelő, egészséges ikraszemek mikroszkóp alatt kerültek kiválogatásra.

2.2 A vtg1-mCherry génkonstrukció létrehozása

PROSCAN 1.7 programmal azonosítottam a feltételezett transzkripciós start helyet a vtg-1 gén kódoló szakaszát megelőző szekvencián. Ezt követően a konstrukció ösztrogén érzékenységéhez szükséges ösztrogén válasz elemet (ERE-Estrogen Response Element) vizsgáltam DRAGON ERE Finder, ALGEN PROMO és MATINSPECTOR szoftverekkel, valamint manuális szekvenciaazonosítással.

Primereket terveztem, majd PCR reakcióval felszorzoztam a génkonstrukcióba építendő szakaszokat úgy, hogy azok 5' végei hordozzák a rekombinációs lépésekhez szükséges szekvenciákat. A vtg-1 gén promóter régióját tartalmazó, a transzkripciós start helyet megelőző 4082 és 3357 bp hosszúságú szakaszokat zebra-dánió genomi DNS-ből, a fluoreszcens fehérjét kódoló szakaszt pCS2 mCherry plazmidról sokszoroztam fel.

A különböző *attB* rekombinációs szekvenciákkal rendelkező PCR termékeket (vtg-1 gén promóter régiója – *attB3*, *attB5*, mCherry-t kódoló szakasz – *attB1*, *attB2*) BP klónozás segítségével helyspecifikus rekombinációval két külön plazmidba (pDONR221-P1P2 és pDONR221-335) építettem. A plazmidokból a kívánt szakaszokat LR klónozás során a

Tol2 karokat tartalmazó célvektorba (pSP17.2BSSPE-R3-R5-RFA-Venus Tol2LR) juttattam. Az alkalmazott plazmidokat XL10 GOLD *Escherichia coli* kompetens sejtekben szaporítottam fel és kolónia PCR-rel előszűrtem. A kívánt fragmentek plazmidba épülését restriktációs emésztéssel ellenőriztem *RsaI*, *PstI* + *XbaI* valamint *HindIII* + *EcoRV* enzimek felhasználásával.

2.3 A *vtg1-mCherry* transzgenikus vonal létrehozása

A konstrukciót a hatékony genomba épülés érdekében linearizáltam. Transzpozáz enzimet kódoló plazmidról SP6 RNS-polimerázzal mRNS-t hoztam létre. A konstrukciót (25 ng) transzpozáz mRNS-sel (25 ng) együtt mikroinjektálással 1-2 sejtés zebradánió embriók szikébe juttattam.

A riportergén tranziens kifejeződését 100 ng/l 17- β -ösztadiol (E2) kezelést követően vizsgáltam az injektált embriókban 5 és 10 napos korban, fluoreszcens mikroszkóp alatt, RFP szűrő használatával.

Az injektált embriók egy részét kezelés és válogatás nélkül felneveltem és vad típusú zebradániókkal kereszteztem. A konstrukciót átörökítő ún. P0 alapítókat két módszerrel, az utódok ösztrogén kezelését követő fluoreszcens mikroszkópos vizsgálattal, valamint az embriókból tisztított DNS-ből végzett, mCherry specifikus PCR reakcióval vizsgáltam.

A PCR reakció alapján pozitívnak talált alapítók utódait felnevelve a *vtg1-mCherry* vonal F1 generációjához jutottam. Az F1 egyedeket vad típusú egyedekkel keresztezve létrehoztam az F2 generációt. Az F2 egyedeket ismét vad típusú zebradániókkal kereszteztem. Az F2 és F3 generáció „hordozó” egyedeinek egymás és generációk közti keresztezésével hoztam létre az F4 generációt. Minden generáció létrehozásakor elvégeztem a fent leírt mikroszkópos vizsgálatot és az F4 létrehozásakor a PCR reakciót.

2.4 Az mCherry indukció kezdetének vizsgálata

Az mCherry fehérje indukciójának kezdetét 0 napos (dpf – days post fertilization) korban kezdett, 200 ng/l 17- α -etinil-ösztadiol (EE2) kezelést követően vizsgáltam 500 embrióban naponta, fluoreszcens mikroszkóp alatt, különböző nagytításokban.

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

Az F1 és F2 generációk embrióit 100 ng/l EE2-vel kezeltem (30-70 embrió/kezelés), az öröklődés ellenőrzése érdekében. Az F3 és F4 generáció embrióiban már több ösztrogén hatású anyag és több koncentráció hatását vizsgáltam 3-5 napos korig, háromszori ismétlésben, koncentrációnként 50-100 embriót vizsgálva.

Az F3 generációban csak E2, EE2 és zearalenon (ZEA) 50 és 100 ng/l, 25, 50 és 100 ng/l valamint 50, 100 és 250 µg/l koncentrációit vizsgáltam. Az F4 generáció embrióit E2 (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 0,1 µg/l), EE2 (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 ng/l), 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) és atrazin (ATR) (10000; 1000; 100; 50; 25; 25; 12,5; 6,25 µg/l) oldatokkal kezeltem. A kezeléseket petricsészében végeztem 27,5 °C-on. A törzsoldathoz használt oldószerek hatását a legtöményebb kezelőoldat oldószer tartalmának megfelelő koncentrációban vizsgáltam.

A mikroszkópos vizsgálatok előtt az embriókat 0,02%-os MS-222 (Tricaine-metán-szulfonát) oldatban elaltattam, majd 0,5%-os metilcellulózban bal oldalukra fektettem őket. Minden kishalról fénymikroszkópos és fluoreszcens felvételt (exponálási idő: 1 s) is készítettem, 30x-os nagyításban (Leica M205 FA, Leica DFC 425C kamera, LAS V3.8 szoftver).

Az RGB (Red, Green, Blue) színskála szerint a vörös tartományba eső jelet ImageJ szoftverrel, saját fejlesztésű macro-val értékeltem ki. Minden felvételen azonos nagyságú, ellipszis alakú területet jelöltem ki, amelyet a máj területére húztam, majd meghatároztam a jel erősségét és az érintett terület nagyságát. A két értékből integrált értéket képeztem (Integrated density) és az indukciót ez alapján értékeltem.

Az egyes anyagok ösztrogénhatásának erősségét, ún. relatív ösztrogénpotenciálját az integrált denzitásból számított EC₅₀ értékek E2-re jellemző EC₅₀ értékkel történő összevetésével határoztam meg.

2.6 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 literes, 15-15 egyed tartalmazó medencékben végeztem. Fluoreszcens mikroszkóp alatt naponta vizsgáltam a fluoreszcens jel megjelenését. A vizsgálatok előtt az egyedeket 0,02% MS-222 oldatban elaltattam.

2.7 Vitellogenin „whole mount” *in situ* hibridizáció

Az endogén vtg gén kifejeződését, vad típusú és transzgenikus embriókban is vizsgáltam. A vad típusú embriókat (50 db) 0-5 dpf korig 300 ng/l, a transzgenikus embriókat (20 db) 3 dpf-5 dpf korig 200 ng/l EE2-vel kezeltem.

Az *in situ* hibridizációt a vtg *mRNS* 545 bázispár hosszúságú szakaszára tervezett próbával végeztem. Ösztrogénnel kezelt lárvák teljes RNS-ét cDNS-sé írtam át, majd a próba szekvenciát PCR reakcióval felszaporítottam. A kitisztított PCR terméket ligálás segítségével (Dual Promoter TA cloning Kit, Invitrogen) pCRII plazmidba építettem, a plazmidokat TOP10 *E. coli* kompetens sejtekben felszaporítottam, majd a telepeket kolónia PCR reakció segítségével szelektáltam. A hordozó plazmidokat linearizáltam, majd *in vitro* transzkripcióval (DIG RNA Labeling Kit SP6/T7, Roche) DIG jelölt antiszensz RNS próbát hoztam létre. Az *in situ* hibridizáció során Thisse és Thisse (2008) zebraadánió embriókra kidolgozott protokollját követtem.

2.8 Zearalenon egyedfejlődésre és vtg indukcióra gyakorolt hatásának vizsgálata

A zearalenon hatását kifejlett zebraadánió hímeken és embriókon is vizsgáltam.

Koncentrációnként 14 vad típusú hímeket 1000, 10, 0.1 µg/l ZEA oldattal kezeltem, 2-2 párhuzamos, 3 literes medencében. Pozitív kontrollként 0,1 µg/l E2-t, negatív kontrollként rendszervizet használtam. A szemi-sztatikus kísérleti rendszerben 4 naponta került sor oldatcserére. A halak naponta egyszer kaptak haltápot (SDS). A zearalenon koncentrációk visszamérése immunaffinitásos dúsítást követően HPLC módszerrel történt (Food Analitika Kft, Békéscsaba).

Az embriókat 1 hpf (hours post fertilization) korban egyesével 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 tartalmazó 24 lyukú plate mélyedéseibe helyeztem. Pozitív kontrollként 100 ng/l E2-t, negatív kontrollként a zebraadániós haltartó rendszer vizét használtam. Koncentrációnként 4x12 embriót vizsgáltam. A plate-eket 27,5 °C-on inkubáltam, és 120 órás korig mikroszkóp alatt naponta vizsgáltam az elhullást és a kialakuló fejlődési rendellenességeket. Az embriókról naponta, oldalnézetben, 30x-os nagyításban digitális felvétel is készült.

A vtg indukció vizsgálatához a hímekből PBS pufferben teljes test homogenizátumot készítettem, amelyet két részre osztottam, az egyik

részből fehérje szinten (ELISA, Biosense) a másik részből *mRNS* szinten (real-time PCR) mutattam ki a génterméket. Az embriók esetében 10-10 még élő, 120 órás embrióból gyűjtöttem (pool), amelyekből RNS-t tisztítottam és real-time PCR vizsgálatot végeztem.

Az ELISA teszt leolvasását Gene5 microplate leolvasóval (BioTek), 492 nm-en végeztem. A kiértékeléshez zebradánió VTG fehérjéből készített hígítási sor szolgált sztenderdként. A minták VTG fehérje koncentrációját a nem specifikus kötődés korrekcióját és az adatok logaritmikus transzformációját követően regressziós analízissel határoztam meg, a kit leírása alapján.

A *vtg* megjelenését a transzkripció szintjén kvantitatív, duplex valós idejű PCR-rel vizsgáltam. Belső kontroll génként a β -aktin gént használtam. A PCR reakciókat TaqMan próbákkal, StepOne Plus real-time PCR készülékben hajtottam végre. Minden mintából 3 hígítást (1x, 4x, 16x), hígításonként 3 párhuzamos reakciót vizsgáltam. A Ct értékek meghatározását követően az eredmények kiértékelését REST módszerrel (Relative Expression Software Tool) végeztem.

2.9 Dózis-hatás görbék felvétele, statisztikai módszerek

A fejlődési rendellenességek relatív gyakoriságát a kontrollhoz képest ANOVA (one-way analysis of variance) módszerrel vizsgáltam, az egyes kezelési csoportokat Dunnett-féle T3 post hoc teszttel vettem 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 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 Graphpad Prism 4.0. szoftverrel hoztam létre. Az EC_{10} EC_{90} értékeket a GraphPad ajánlása alapján 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 kifejtett és lárvákon mért indukciók összevetéséhez Pearson korrelációt használtam az adatok %-os normalizálását követően. A variancia homogenitást Levene teszttel vizsgáltam, az adatok normalizálása előtt.

3 Eredmények

3.1 Ösztrogénhatásra érzékeny biomarker zebradánió vonal létrehozásának eredményei

Sikeresen azonosítottam a *vtg-1* feltételezett transzkripciós start helyét. A konstrukcióba építendő hosszabb (4082 bp) és rövidebb (3357 bp) promóter szakaszon ALGEN PROMO szoftverrel 15 és 10, MATINSPECTOR-ral 5 fél ERE elemet, DRAGON ERE Finder segítségével pedig egy, mindkét szakaszon megtalálható, teljes ösztrogénválasz elemet azonosítottam. Az irodalomban leírt szekvenciákat keresve a hosszabb szakaszon 11, a rövidebb szakaszon 10 fél kötőhelyet találtam. A különböző módszerekkel azonosított elemek átfednek, így a hosszabb promóter szakaszon 19, a rövidebben 17 ösztrogénválasz elemet hordozó régió található. A hosszabb promóter szakaszt nem sikerült rekombinációs klónozással a Gateway rendszer plazmidjába klónozni. Az azonosított elemek nagy részét azonban a rövidebb promóter szakasz is hordozza, ezért feltételeztem, hogy a konstrukció ezzel a régióval is működőképes lesz.

BP klónozás során létrehoztam a *vtg1* promótert és az mCherry fluoreszcens fehérjét kódoló szakaszt hordozó vektorokat, amelyekből ún. *LR* klónozási lépést követően a szakaszokat a *Tol2* karokat hordozó vektorba juttattam. 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.

A génkonstrukciót zebradánió embriók szikébe mikroinjektáltam. Ösztrogénindukciót követően a fluoreszcens fehérje kifejeződését az injektált embriók kb. 20%-ában figyeltem meg. A májon kívül a szikben az embriók többségében erős tranzienst fluoreszcens jel jelent meg, míg néhány embrióban (<1%) a szemekben és a vesék területén gyenge expresszió volt megfigyelhető.

Az embriók egy részét az injektálást követően kezelés nélkül ivarérésig felneveltem, ezzel sikeresen létrehoztam a vonal P0 generációját.

A további generációk létrehozásához azonosítani kellett a konstrukciót továbbadó P0 alapítókat. Kidolgoztam egy a konstrukciót kimutató PCR reakciót, amellyel sikeresen azonosítottam 11, a konstrukciót továbbadó szülőt (4 tejes és 7 ikrás). A kiválasztott alapítók utódainak ösztrogénkezelését követően az indukció minden esetben megerősítette a PCR eredményét és bizonyította a konstrukció jelenlétét.

Az F1 nemzedékben embriók 0-20%-ában figyeltem meg fluoreszcens jelet a májban. A fehérje kifejeződése a vesék és a szem régiójából eltűnt, azonban a szikben ösztrogén hatására továbbra is megjelent, ami arra utal, hogy a jel transzgen aktivitás eredménye.

A még kezelhető létszám megtartása miatt ösztrogénérzékenység alapján ekkor kiválasztottam egy alapítót (20 ♂), amelynek utódaiból létrehoztam a további nemzedékeket. Az F2 generáció a kiválasztott alapító 3 hím és 3 nőtény F1 utódjától származik. Ebben a generációban a transzgen beépülése már stabil, és feltételezhetően minden egyedben egy kópiás volt. Az F2 egyedeket vad genotípusú párral szaporítva létrehoztam az F3 nemzedéket, amelyből ösztrogénindukció alapján 11 hímét és 6 nőtényt 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. 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. 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.

3.2 A fluoreszcens jel kifejeződésének vizsgálata különböző fejlődési stádiumokban

Az embriók kezelését kezdetben 0-5 dpf korig végeztem. A zebradánió májfejlődése azonban 6 óras korban kezdődik és csupán a 50 óras kor után kezd működőképes szervvé alakulni. Vizsgálataim igazolták, hogy a máj vtg termelése csak később indul meg. A fluoreszcens jel a májban 2-3 napos kor között jelent meg és 3 napos kortól volt erőteljes. A konstrukciót kifejező terület mérete fokozatosan, a

májjal együtt nőtt, 5 dpf korra érte el legnagyobb méretét a vizsgálati időszakban. A kezelések kezdetét ezért 3 napos korra tettem át.

3.3 A fluoreszcens jel kifejeződésének koncentrációfüggése

A vtg normál körülmények között csak kifejlett nőstényekben termelődik, ivarérett hímekben szintje meglehetősen alacsony. A hímekben, a lárvákhoz hasonlóan ösztrogénhatásra a vtg termelés beindítható és koncentrációfüggő módon fokozható. A génkonstrukció is hasonlóan működik. Kezeletlen nőstények májában az mCherry fehérje olyan erősen fejeződik ki, hogy a pigmentált testfalon keresztül is megfigyelhető, hímekben a jel boncolást követően sem látszik a májban. Az indukálhatóságot ivarérett tejesek E2 kezelésével igazoltam. A 4. napra a legalacsonyabb koncentráció (5 ng/l) is kiváltotta az mCherry termelődését.

A fluoreszcens jel koncentrációfüggését embriókorban elsőként az F3 generációban vizsgáltam. Az állomány inhomogenitása (a feltételezhetően eltérő integrációs helyek) miatt az eredmények nagy szórást mutattak, ezért szignifikáns jelintenzitás különbség csak az EE2 kezelésnél volt megfigyelhető, de a koncentrációfüggő választ mindhárom anyag esetében (E2, EE2, ZEA) feltételezhető volt. Az oldószeres kontrollban egyik esetben sem tapasztaltam fluoreszcens jelet.

A stabil transzgenikus vonal létrehozásához kiválasztott három szülőpár utódainak érzékenységét EE2 kezelést követően vettem össze. Szignifikáns különbség csak a 100 és 200 ng/l-es koncentrációnál mutatkozott. A legerősebb mértékű indukciót a 204 ♂ x 104 ♀ párosítása esetén tapasztaltam, de a másik két alvonal is alkalmasnak bizonyult az ösztrogénhatás kimutatására.

A fluoreszcens válasz dózis-hatás függését a legérzékenyebbnek tűnő 204 ♂ x 104 ♀ alvonal F4 generációjában vizsgáltam. A legalacsonyabb, mCherry kifejeződést kiváltó koncentráció E2 esetében 0,1 µg/l, EE2 esetében 6,25 ng/l, ZEA és BPA esetében 0,1 µg/l valamint 1,25 mg/l volt. NP esetében csak néhány embrió májában, igen kis területre kiterjedően figyeltem meg a fluoreszcens fehérje kifejeződését. Az ATR ebben a fejlődési stádiumban nem befolyásolta a vtg szintet.

A vtg:mCherry transzgenikus vonalon tapasztalt fluoreszcens fehérje indukció alapján a BPA kb. 5000x gyengébb, a ZEA megközelítőleg azonos, míg az EE2 kb. 78x erősebb ösztrogénhatású anyagnak bizonyult, mint a természetes ösztrogén.

3.4 *vtg in situ* hibridizáció

Minden generációban, koncentrációtól és ösztrogénhatású anyagtól függetlenül azt tapasztaltam, hogy bizonyos embriók májában gyengébb, másokban erősebb volt a jel kifejeződése, és ugyanez volt igaz az érintett terület nagyságára is. Emellett a terület nagysága és a jel erőssége nem mutatott összefüggést.

A vitellogenin génterméket kimutató *in situ* hibridizáció során a vad típusú és a transzgenikus embriók esetében is azt tapasztaltam, hogy a géntermék nem termelődik minden egyedben és az embriók között jelentős érzékenységbeli különbség mutatkozik. Emellett a *vtg*-t termelő egyedek is különböztek egymástól. Bizonyos embriókban erős *vtg* termelődést figyeltem meg a teljes májban, míg másokban kisebb területet érintő vagy gyengébb, teljes májra vagy kisebb területre kiterjedő expressziót figyeltem meg.

A transzgenikus embriók *in situ* hibridizációs felvételét összevettem a fixálást megelőzően készült fluoreszcens felvételekkel. Az eredmény egyértelműen igazolta, hogy a gyengébb jelet adó, vagy kisebb területre kiterjedő expressziót mutató embriókban az endogén *vtg* termelődése is hasonlóan működött.

Megfigyeltem, hogy bár az 5 napos zebradánió embriók már rendelkeztek jobb oldali májlebennyel, a *vtg* termelődése ebben a stádiumban még csak a bal oldali lebenyre volt jellemző.

3.5 Egy ösztrogén hatású mikotoxin vizsgálata

A zearalenon vizsgálatát embriótoxicitás vizsgálattal kezdtem. 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 görbét vettem fel, amelyek alapján kiszámítottam az embriók 50 és 10%-ának pusztulását okozó koncentrációkat (LC₅₀ és LC₁₀).

Az általános, mérgezésekre jellemző fenotípusos elváltozások mellett két, ZEA-ra 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.

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

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

Kifejlett korban a zearalenon minden vizsgált töménységben kiváltotta a VTG koncentrációfüggő termelődését, bár szignifikáns eltérés a negatív kontrollhoz képest csak a legnagyobb koncentrációban (1000 µg/l) volt tapasztalható. *mRNS* szinten a *vtg* szignifikáns indukcióját a pozitív kontrollban valamint 10 és 1000 µg/l ZEA kezelés esetén tapasztaltam

Az *mRNS* és fehérje szintű indukció összevetése során 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 vtg indukció vizsgálatában.

Embriókban a zearalenon a legalacsonyabb koncentráció (0,1 µg/l) kivételével koncentrációfüggően serkentette a *vtg* termelést. 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 *vtg* termelődés fokozatosan visszaesett. Az embrióteszt eredményei 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 *vtg* indukció hanyatlását okozza, ezért a toxikológia vizsgálatokban általános előírás, hogy molekuláris vizsgálatok csak LC₁₀ alatti koncentrációkban végezhetőek. Az adatok nagymértékű szórást mutattak, ami összefüggésben állhat a *vtg in situ* hibridizációnál megfigyelt egyedi különbségekkel.

Az eredmények alapján az LC₁₀ alá eső koncentrációk bevonásával dózis-hatás görbét vettem fel. A görbe alapján meghatároztam a maximális *vtg* indukció felének kiváltásához szükséges ZEA koncentrációt (EC₅₀=1,648 µg/l). A pozitív kontrollban tapasztalt vitellogenin indukció nagyjából a 100 és 250 µg/l toxin által kiváltott *vtg* válasz közé tehető.

4 Új tudományos eredmények

1. Európában elsőként hoztam létre vitellogenin indukciót kimutató, legnagyobb természetes promóter szakaszt hordozó ösztrogén érzékeny zebradánió vonalat, amely a vitellogenin transzgenikus vonalak közül a legérzékenyebb.
2. Kialakítottam az újonnan létrehozott transzgenikus vonal ajánlott vizsgálati protokollját, amely szerint az embriók kezelését elegendő 3 napos korban megkezdeni.
3. A *vtg1:mCherry* vonal az ösztrogén hatású anyagok környezetben előforduló koncentrációinak kimutatását is lehetővé teszi. Embriókorban 100 ng/l 17- β 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 embriók érzékenysége nagymértékű eltérést mutat, de a *vtg1:mCherry* vonal fluoreszcens fehérje termelése az endogén vitellogeninhez hasonlóan működik.
5. Zearalenon kezelés során megállapítottam, hogy a zebradánió embriókban két, tipikus fejlődési rendellenesség jön létre: a testen körbefutó, normál esetben a farokúszó eredésénél megszakadó pigmentsáv folyamatos marad, és a test felfelé görbülésével jellemezhető, „*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 kvantitatív valós idejű PCR-rel kiválthatók.

5 Következtetések és javaslatok

5.1 A *vtg1:mCherry* transzgenikus vonallal kapcsolatos következtetések

A *vtg1:mCherry* vonal jobb közelítéssel adhat választ az anyagok valós ösztrogénhatásának vizsgálatában, mert az eddig alkalmazott promóter szakaszok közül a leghosszabb, kizárólag természetes promótert hordozza és nem tartalmaz mesterséges ERE szakaszt. A beépített 3357 bp-os promóteren összesen 26, míg egy korábban létrehozott *vtg* transzgenikus zebradánió vonal (*ere-zvtg1:gfp*) esetén alkalmazott 1700 bp-os promóteren 12 természetes ERE szakaszt azonosítottam. A régiók átfednek, a *vtg1:mCherry* konstrukció 17, az *ere-zvtg1:gfp* vonal 8 ERE régiót hordoz. A DRAGON ERE Finder alkalmazás csak a *vtg1:mCherry* transzgen konstrukció promóter szakaszán talált egy teljes, eddig még nem leírt ERE szekvenciát.

A *vtg* transzgenikus vonalakban a riporter szövetspecifikusan, kizárólag a májban lép működésbe. A promóter ösztrogénhatás nélkül inaktív, ezért a vonalak egyértelmű igen-nem, és jó közelítéssel koncentrációfüggő választ adnak. Az aromataz transzgenikus zebradánió vonal (*cyp19a1b-GFP*) válasza bár szövetspecifikus (agy), a gén ösztrogén indukció nélkül is viszonylag magas alap expressziós szintet mutat, ami nehezebbé teszi a kísérletek kiértékelését.

Az állatvédelmi előírások miatt a vizsgálatokat minél fiatalabb korban célszerű elvégezni. A zebradánió ösztrogénérzékenysége az ivarszervek kialakulásának kezdetétől fokozatosan nő, és a fejlődés során a „receptorösszetétel” is változik. Az embriók májában 5 napos korig csak a $\beta 2$ receptor található meg és a sejtek még nem képesek *vtg-t* termelni. Kifejlett egyedek májában már mindhárom ER (α , $\beta 1$, $\beta 2$) megtalálható, ezért jóval érzékenyebbek és valószínűleg olyan anyagok kimutatására is képesek, amelyekre embrió/lárva korban még nincs lehetőség.

A *vtg1:mCherry* embriókban a fluoreszcens jel a fejlődés 3. napjától válik láthatóvá. Ez összhangban áll a korábban leírt megfigyelésekkel, amelyek szerint a máj az embrió 2-3 napos korától képes ösztrogénhatásra *vtg-t* termelni. A géntermék annál később jelenik meg, minél alacsonyabb koncentrációban alkalmazzák az ösztrogént.

A *vtg1:mCherry* vonal 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

lehet, mivel az *ere-zvtg1:gfp* vonal a legalacsonyabb koncentrációra csak 7 nappal a kezelés kezdete után reagált.

A *vtg1:mCherry* embriók által kimutatható ösztrogénhatású anyag koncentrációk a ZEA kivételével hasonlóak *zvtg1:gfp* vonal határértékeihez, viszont a kezeléseket utóbbi esetben 7 napos korban kezdték és 20 napos korig végezték, amikor az ösztrogén receptorok száma már magasabb, mint 5 napos korban. Az aromatóz bioszenzor vonal esetében felvett dózis hatás görbék alapján meghatározott EC₅₀ értékek alacsonyabbak, mint az új transzgenikus vonal EC₅₀ értékei. A kezeléseket 0-5 dpf korig végezték. A különbségek fő oka a gének érzékenységének eltérése, valamint a két területen kifejeződő, eltérő számú és típusú ösztrogén receptor lehet.

A *vtg1:mCherry* vonalban NP hatására csak néhány embrió májában, igen kis területre kiterjedően figyeltem meg a fluoreszcens fehérje kifejeződését. A *zvtg1:gfp* vonal NP-ra nem adott választ, míg az aromatóz transzgenikus vonal 406 nM EC₅₀ értékkel volt képes kimutatni egy 4-nonilfenolokból álló keverék hatását. Vizsgálataim alapján az ATR 5 napos korban nem befolyásolta a vtg szintet. Az ATR hatását nem közvetlenül az ösztrogén receptoron keresztül fejt ki, hanem az aromatóz enzimet indukálja. Ennek hatására a szervezetben tesztoszteronból ösztrogén keletkezik, ami már indukálhatja a vtg termelődését. A tesztoszteron azonban a többi nemi hormonhoz hasonlóan embriókorban még nincs jelen, de feltételezhető, hogy ivarérett hímekben már képes lehet a fluoreszcens fehérje termelődését előidézni.

Az E2-höz viszonyított. „relatív ösztrogénpotenciált” alapján az EE2 78x tűnt erősebbnek, a ZEA nagyjából azonos ösztrogénhatással rendelkezett, míg a BPA ösztrogénpotenciálja mindössze 5% volt a referenciához képest. Irodalmi adatok alapján az EE2 nagyjából 16,48x erősebb ösztrogénhatással rendelkezik, mint az E2. A legfeltűnőbb a ZEA és az E2 hasonló ösztrogenitása. Az eddig leírt vizsgálatok alapján a ZEA E2-höz viszonyított ösztrogén hatása igen nagy tartományban mozog, 5,4-1439x gyengébb, mint az E2. Elképzelhető, hogy az anyag affinitása az embriókori receptorokhoz erősebb.

A *vtg1:mCherry* vonalban még a 4. generációban sem jelenik meg minden utódban 5 napos korra a fluoreszcens jel. A világító embriók száma anyag és koncentrációfüggő. Ugyanezt figyelték meg a *ere-zvtg1:gfp* transzgenikus vonal és a *3pERE-TATA-Gal4ff* zebraadánió vonal esetében is. *Vtg in situ* hibridizáció során igazoltam, hogy azok az embriók, amelyekben a fluoreszcens jel gyenge volt, a *vtg-t* is alacsonyabb szinten és ugyanazon a területen fejezték ki. A jelenséget feltehetően az ösztrogén receptor működését befolyásoló egyéb faktorok

okozzák. Amennyiben ezek a faktorok genetikai eredetűek, egyszerű szelekcióval kisselektálhatók a legérzékenyebb genotípusok és csökkenthetők az egyedi különbségek.

Eredményeim alapján a *vtg1:mCherry* vonal érzékenysége a környezetben vagy az elfolyó vizekben előforduló koncentrációtartományokba esik, ezért a kifejlesztett tesztelési protokoll alkalmazásával biomarker vonalként környezeti minták tesztelésének is hatékony eszköze lehet. A későbbiekben segítséget nyújthat az ivaréres során az ösztrogéntermelés kezdetének felderítésében, morfolino injektálással vagy génkiütéssel az ösztrogénhatás és a *vtg* aktiválódás molekuláris hátterének felderítésében. Elképzelhető, hogy a nőstény egyedek androgének vizsgálatára is alkalmasak lehetnek, ahol a kiértékelés alapját a fluoreszcens jel erősségének csökkenése adhatja. A vonal emellett toxikus anyagok májra gyakorolt káros hatásainak *in vivo* vizsgálatára is lehetőséget adhat.

A zearalenon hatásának vizsgálata alapján levont következtetések

A ZEA-val végzett zebradánió embriótoxicitás vizsgálat során kapott LC₁₀ és LC₅₀ értékek a környezeti koncentrációkhoz képest 10-1000x magasabbnak adódtak. Az általános toxicitásra utaló jelek mellett a ZEA két, az anyagra jellemző fejlődési rendellenességet idézett elő. Az embriók testének háti irányú görbülését korábban más ösztrogén hatású anyagok esetében is megfigyeltem. Az elváltozás nagy hasonlóságot mutat az ún. *heart and soul (has)* mutánsok fenotípusával. A mutáció a Par3/Par6/aPKC komplexre hat, amely közvetten összefüggésbe hozható a testgörbület kialakulásával. A fenotípust genistein esetében is megfigyelték, amely hatékony protein-tirozin kináz inhibitor, így feltételezhető, hogy a ZEA is a kinázok gátlásán keresztül idézi elő a fenotípust.

A normál esetben a lárvák testét szegélyező, a farokúszó eredési helyénél megszakadó pigmentsáv 500 µg/l és afölötti koncentrációk esetén folyamatos marad. A jelenséget korábban *Shh* (sonic hedgehog) funkcióvesztéses mutánsokban és metil-higany (MeHg) kezelés hatására is megfigyelték. A MeHg feltételezhetően a szöveti újraépülésben szerepet játszó metalloproteázokra hatva alakítja ki a fenotípust. Endokrin rendszert megzavaró hatással is rendelkezik, így valószínű, hogy a ZEA is hasonló útvonalakon keresztül alakítja ki a megfigyelt rendellenességet.

A ZEA ösztrogén hatását a *vtg* termelődés serkentésén keresztül vizsgáltam. Kifejlett hímekben a legalacsonyabb vizsgált zearalenon koncentráció (0,1 µg/l) is kiváltotta a *vtg* termelődést, embrióknál

ugyanaz a koncentráció bizonyult a legkisebb hatásos dózissnak. A szennyvizekben kimutatható ZEA értékek hasonló tartományba esnek. Az embriókban megfigyelt EC_{50} érték 100-szor magasabb a környezeti koncentrációknál.

A hímek esetében a fehérje és *mRNS* vizsgálatok eredményei jól korreláltak egymással, ami a fehérjék nagyobb stabilitása miatt meglepő lehet. Zebradánióban a Vtg fehérje fél életideje 2,4 nap, az *mRNS* stabilitásáról azonban nincs adat. Dél-afrikai karmosbékákban (*Xenopus laevis*) exogén ösztrogének képesek a *vtg mRNS*-t stabilizálni, ami zebradánió esetében is előfordulhat. Az összevetés során azonban nem a géntermékek mennyiségét vizsgáltam, hanem az indukciók mértékét vettem össze, ami szintén magyarázhatja a szoros összefüggést.

A hímekben és embriókban mért *vtg mRNS* szintek szintén szoros korrelációt mutattak. Az összehasonlítás nem pontos a hímeken vizsgált kis számú koncentráció, valamint az eltérő kezelési protokollok miatt. Bár a hímek kezelését 21 napon át végeztem, korábbi megfigyelések alapján valószínű, hogy a *vtg* szint már az 5. nap környékén (koncentrációtól függően) elérte maximumát és a kezelés további szakaszában nem változott. Az elméletet a *vtg* transzgenikus zebradániókon kapott eredmények is megerősítik.

A dolgozatban bemutatott biomarker vonal eredményei alapján valószínű, hogy a kifejlett halak a vizsgálatnál alacsonyabb ZEA koncentrációk kimutatására is képesek lehetnek, amit más szerzők megfigyelései cáfolnak. Esetükben $0,1 \mu\text{g/l}$ ZEA esetén még nem volt kimutatható a *vtg* termelődés. Korábbi leírások 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 *vtg*-re nézve a halak érzékenysége a fejlődés előrehaladtával nőtt. A dolgozatban bemutatott ZEA vizsgálatok szerint az embriók valóban érzékenyebbek a magasabb koncentrációkra, ez viszont a túlélésben és a fejlődési rendellenességek terén sokkal inkább megmutatkozik, mint a *vtg* indukcióban. Alacsony koncentrációk és a *vtg* termelés esetében a kifejlett egyedek tűnnek érzékenyebbek.

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

Javaslatok

- A dolgozatban bemutatott transzgenikus zebraadánió 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 összekeresztelésével 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 kifejelett korban nagyobb érzékenységgel reagál a környezeti ösztrogénekre és nagyobb koncentrációtartományt képes elviselni. Bár a zebraadánió kifejelett példányain végzett kísérletezés már állatkísérletnek minősül, mégis javasolnám a felnőtt halak részletesebb vizsgálatát a közeljövőben.
- A létrehozott zebraadánió 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 zebraadánió 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.

Az értekezés témakörében megjelent közlemények

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., Kovács R., Kánainé S. D., Hadzhiev Y., Kovács B., Müller F., Urbányi B. (2012): Establishment of an EDC screening system: a liver transgenic zebrafish line. *Fish and Amphibian Embryos as Alternative Models in Toxicology and Teratology Symposium*, 2012. október 11-12., Aulnay sous-Bois, Párizs (Franciaország)
- Bakos K.**, Csenki Zs., Staszny Á., Kovács R., Kánainé S. D., Urbányi B., Müller F., Kovács B. (2012): Assessment of the developmental effects and estrogenic potency of zearalenone in zebrafish (*Danio rerio*), *Fish and Amphibian Embryos as Alternative Models in Toxicology and Teratology Symposium*, 2012. október 11-12., Aulnay sous-Bois, Párizs (Franciaország)
- 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)
- 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)
- Bakos K.**, Csenki Zs., Kovács R., Kánainé S. D., Urbányi B., Kovács B. (2012): Két módszer a zearalenon ösztrogén hatásának vizsgálatára zebra-dánió (*Danio rerio*). XXVI. Halászati Tudományos Tanácskozás, 2012. május 23-24., Szarvas
- 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 ismételtetésének vizsgálata különböző zebra-dánió (*Danio rerio*) vonalakon. XXVI. Halászati Tudományos Tanácskozás, 2012. május 23-24., Szarvas
- 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
- Bakos K.**, Csenki Zs., Kovács R., Kánainé S. D., Bencsik D., Hadzhiev Y., Kovács B., Müller F., Urbányi B. (2011): Transzgenikus zebra-dánió vonal létrehozása ösztrogén hatású anyagok vizsgálatához. III. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok, 2011. október 14-15., Gödöllő
- Bakos K.**, Csenki Zs., Kovács B., Kovács R., Kánainé 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)
- 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)
- Bakos K.**, Csenki Zs., Kovács R., Kánainé S. D., Müller F., Hadzhiev Y., Kovács B., Urbányi B. (2011) Ösztrogén hatású anyagok vizsgálatára alkalmas transzgenikus zebra-dánió vonal létrehozása. XXXV. Halászati Tudományos Tanácskozás, 2011. május 25-26., Szarvas
- 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)

- 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)
- Bakos K.** (2010): Ösztrogén hatású szennyezőanyagok kimutatására alkalmas zebradánió alapú tesztrendszer létrehozása. Kárpát-medencei Doktoranduszok Nemzetközi Konferenciája (TUDOC), 2010. május 27., Gödöllő
- 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

Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó, fontosabb közlemények:

Tudományos közlemények folyóiratban:

- Staszny Á., Havas E., Kovács R., Urbányi B., Paulovits G., Bencsik D., Ferincz Á., Müller T., Specziár A., **Bakos K.**, Csenki Zs. (2013): Impact of environmental and genetic factors on the scale shape of zebrafish *Danio rerio* (Hamilton 1822): a geometric morphometric study. Acta Biologica Hungarica, In press
- Müller T., Horváth Á., Takahashi E., Kolics B., **Bakos K.**, Decsi K., Kovács B., Taller J., Urbányi B., Bercsényi M., Horváth L., Adachi S., Arai K., Yamaha E. (2012): Artificial hybridization of Japanese and European eel (*Anguilla japonica* × *A. anguilla*) by using cryopreserved sperm from freshwater reared males. Aquaculture, 350–353: 130-133. (IF: 2,041)
- 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, 7:(4):200-201.
- Korom E., **Bakos K.**, Veress Gy., Pinke O., Reed K. M., Varga L., Kovács B. (2010): Isolation of 11 new polymorphic microsatellites

- from CA enriched turkey genomic libraries. *Archiv Tierzucht* 53 (5): 618-622. (IF: 0,519)
- Veress Gy., **Bakos K.** (2009): A miosztatin gén szerepe a különböző háziállatfajták hiperizmoltságának kialakulásában. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 131 (8): 483-488. (IF: 0,2)
- Veress Gy., **Bakos K.**, Korom E., Pinke O., Kovács B., Varga L. (2009): Sequence and expression analysis of the androgen receptor gene from Compact mouse. *Archiv Tierzucht* 52 (2): 212-214. (IF: 0,595)
- Bakos K.**, Veress Gy., Pinke O., Kovács B., Varga L. (2008): Néhány hiperizmoltságra ható, modifikátor szerepre esélyes gén vizsgálata Compact egéren. *Animal welfare, etológia és tartástechnológia (AWETH)* 4 (2) 416-423.
- Bakos K.**, Veress Gy., Korom E., Pinke O., Kovács B., Varga L. (2008): 52 új pulyka mikroszatellit izolálása és térképezése. *Animal welfare, etológia és tartástechnológia (AWETH)* 4 (2) 409-415.
- Pinke O., **Bakos K.**, Veress Gy., Korom E., Kovács B., Müller G., Varga L. (2008): Advanced Intercross Lines kísérleti populáció kialakítása és tenyésztése. *Animal welfare, etológia és tartástechnológia (AWETH)* 4 (2) 445-452.
- Veress Gy., Pinke O., **Bakos K.**, Kovács B., Müller G., Varga L. (2008): Hiperizmoltságra ható, X kromoszómán elhelyezkedő modifikátor gének térképezése *Animal welfare, etológia és tartástechnológia (AWETH)* 4 (2) 462-467.

Magyar nyelvű könyvrészlet:

- Kovács B., **Bakos K.**, Kánainé S. D. (2011): A harcsafajok molekuláris biológiája és genetikája. In: Horváth L, Urbányi B, Horváth Á (szerk.) *A harcsa (Silurus glanis) biológiája és tenyésztése*. Gödöllő: Szent István Egyetemi Kiadó, 2011. pp. 47-55. (ISBN:978-963-269-266-1)