

Szent István Egyetem

OOCYTA TRANSZPLANTÁCIÓ HALAKON (PETESEJT ÁTÜLTETÉS ZEBRADÁNIÓ (*DANIO RERIO*) HALFAJON)

Doktori (Ph. D.) értekezés

Csenki Zsolt Imre

GÖDÖLLŐ

A doktori iskola

megnevezése: tudományága: alprogram:	Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola Mezőgazdaság-tudomány Halbiológia és halgazdálkodás
vezetője:	Dr. Mézes Miklós egyetemi tanár, az MTA lev. tagja SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Állattudományi Alapok Intézet, Takarmányozástani Tanszék
témavezető:	Dr. Váradi László egyetemi docens, PhD SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet Halgazdálkodási Tanszék
társtémavezető:	Dr. Müller Ferenc senior lecturer, PhD Department of Medical and Molecular Genetics Division of Reproductive and Child Health Institute of Biomedical Research

University of Birmingham

Edgbaston, Birmingham, UK

.....

Az iskolavezető jóváhagyása

A témavezető jóváhagyása

.....

the F

A társtémavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

	ARTALOMJEGYZÉK	. 1
1	BEVEZETÉS	. 3
	1 Célkitűzés	. 4
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	. 5
	1 A halakon történő petesejt átültetés előzményei	. 5
	2 A téma gazdasági jelentősége	. 6
	3 A téma alapkutatási jelentősége	. 7
	4 A zebradánió petefészek-anatómiája és a follikulusok fejlődési stádiumai	9
	2.4.1 A petefészek anatómiája	9
	2.4.2 A zebradánió follikulusainak fejlődési stádiumai	10
	2.4.3 I stádium: Az elsődleges növekedés fázisa	10
	2.4.3.1 IA stadium: az elsődleges növekedés pre-tollikulus tázisa	10
	2.4.3.2 IB stadium: az elsődleges nővekedes follikulus fazisa	11
	2.4.4 II stadium: kortikalis alveolus stadium	12
	2.4.5 III. stadium: vitellogenezis	14
	2.4.6 IV stadium: vegso oocyta eres	15
	2.4./ V Stadium. ereti ikra	10
	 A csontosnatak peterejiouesenek tipusat Módszorak az oposták tenylmányozására ás izelágiájára 	10
	 Mouszerek az obcytak tanumanyozasara es izotaciojara Az apuei hetés biológiója 	19 20
	 Az anyai hatások vizsgálatára irányuló fontosabb tachnikák halakban 	20
	2 8 1 Δηγαί mutáns vonalak előállítása	$\frac{21}{21}$
	2.8.1 Anyai mutans vonatak cioannasa	23
	2.8.2 Morpholino alanú sénfunkció sátlás (knock down)	23
	2.8.4 PGC transzplantáció	25
	9 Riportergének	27
	2.9.1 A fontosabb riportegének összefoglaló iellemzése	27
	2.9.2 Zöld fluoreszcens fehérje (GFP)	29
	10 A transzplantáció biológiája	30
	2.10.1 Immunológiai alapfogalmak és a transzplantáció fajtái	30
	2.10.2 A szövetösszeférhetőséget befolyásoló faktorok	31
	2.10.3 Immunológiailag kiváltságos helyek	32
	2.10.4 Humorális és celluláris immunválaszok	32
	2.10.5 A kilökődési reakciók típusai	33
	11 A zebradánió (Danio rerio)	34
	2.11.1 A faj jellemzése	34
	2.11.2 A zebradánió, mint modellállat	35
	2.11.3 A zebradánió laboratóriumi tartása	36
	2.11.3.1 A tartóvíz fizikai és kémiai tulajdonságaival támasztott követelmények	36
	2.11.3.2 Takarmányozás	37
2	2.11.3.3 Szaporitás	38
3	ANYAG ES MODSZER.	39
	 A KISETIETEK NEIVSZINEI Várárlati állatalz tartága 	<u>39</u>
	 A triadalate has a second de la constante de la c	39 40
	 A KISCHELEKDEN NASZNAH ZEDFADANIO VONAJAK JEHEMZESE	4U 71
	 4 FUIIIaszliall allyagok	41 //1
	5 I cusefick auticityctick megnatarozasa	41

3	.6	Oocyták gyűjtése	.41
3	.7	A recipiens anyák előkészítése és a petesejtek átültetése	.41
3	.8	In situ hibridizációs vizsgálatok	.43
3	.9	Mikroszatellit analízis	.43
3	.10	Az oocyta injektálásnál használt konstrukciók előállítása és az injektálás menete.	.45
3	.11	Alkalmazott statisztikai módszerek	.46
3	.12	Állatvédelem	.46
3	.13	Tudományos kísérletek	.47
	3.13	.1 A petesejtfejlődés dinamikájának vizsgálata	.47
	3.13	.2 Transzplantált follikulusok kimutatása és beépülésének vizsgálata a recipens	5
	pete	fészekből	.47
	3.13	.3 A follikulus-beépülés hatékonyságának vizsgálata	.47
	3.13	.4 Transzplantált follikulusok növekedésének kimutatása a recipiens	
	pete	fészekből	.48
	3.13	.5 Szaporítási kísérletek	. 49
	3.13	.6 Oocyta mikromanipuláció	. 49
4	ERE	DMÉNYÉK	50
4	.1	A petesejtfejlődés-dinamika vizsgálatának eredményei	. 50
4	.2	Transzplantált follikulusok kimutatása és beépülése, eredmények	. 55
4	.3	Eredmények a follikulus-beépülés hatékonyságáról	. 57
4	.4	Transzplantált follikulusok növekedésének kimutatása, eredmények	58
4	.5	A szaporítási kísérletek eredményei	. 60
4	.6	Az oocyta mikromanipuláció eredményei	. 63
5	ΚÖV	VETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	. 66
5	.1	A petesejtfejlődés dinamikájának vizsgálatából levonható következtetések	. 66
5	.2	Transzplantált follikulusok kimutatásából és beépülésének vizsgálatából levonhat	ó
k	övetk	eztetések	. 67
5	.3	A beépülés hatékonyságának vizsgálatából levonható következtetések	. 68
5	.4	A transzplantált follikulusok növekedésének vizsgálatából levonható	
k	övetk	eztetések	.70
5	.5	A szaporítási kísérletekből levonható következtetések	.71
5	.6	Az oocyták mikromanipulációjából levonható következtetések	.72
5	.7	A két módszer eredményeinek összegzése alapján levonható következtetések	.73
5	.8	Javaslatok	.75
	5.8.1	Javaslatok a follikulus transzplantáció témakörében	.75
	5.8.2	2 Javaslatok az oocyta mikromanipuláció témakörében	.75
6	ÚJ T	UDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	. 77
7	ÖSS	ZEFOGLALÁS	. 78
8	SUN	/IMARY	. 80
9	IRO	DALOMJEGYZÉK (1. számú melléklet)	. 82
10	Μ	IELLÉKLETEK 1	02
	M2 .	A kísérleteknél használt különböző fejlődési állapotú β-actin:yfp és AB	
	folli	kulusokról készült referenciaképek 1	02
	M3 .	A felhasznált pufferek és oldatok 1	03
	M4 .	A mikroszatellit vizsgálatoknál felhasznált primerek listája 1	04
	M5 .	A petefészekmintákban számolt eltérő fejlődési stádiumú follikulusok gyakorisága	ł
	az ic	lő függvényében (összefoglaló táblázat) 1	05
	M6 .	A petefészekmintákban számolt eltérő fejlődési stádiumú follikulusok gyakorisága	ì
	az ic	lő függvényében (összefoglaló ábra) 1	06
11	Κ	ÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS1	07

1 BEVEZETÉS

A halak oocytáinak, follikulusainak tanulmányozása hosszú múltra tekint vissza. Az oocyták morfológiai, hisztológiai és biokémiai tulajdonságainak megismerése elengedhetetlen feltétele a gazdaságilag jelentős halfajok hatékony mesterséges szaporításának. Annak ellenére, hogy az oocyták biológiájáról széleskörű információval rendelkezünk, néhány fontos kérdés továbbra is megválaszolatlan:

 i) Nem ismert az egyes halfajok follikulus fejlődése során a különböző fejlődési stádiumokba történő átmenetek ideje, amellyel pontosan meghatározhatóak lennének a petesejtek optimális fejlődéséhez szükséges élettani és környezeti feltételek.

ii) Halaknál a spermiumok mélyhűtésére már hosszú ideje jól működő módszerek állnak a rendelkezésünkre, a közeljövőben néhány faj esetében a keltetőházi szaporításkor történő felhasználás széleskörű elterjedése is várható. A follikulusok mélyhűtése szintén megoldott, azonban a mélyhűtött oocyták ikrává érlelésére még nincs kidolgozott módszer, így ezek az ivarsejtek a szaporításra nem alkalmasak.

iii) A fejlődésbiológiai kutatásokban, azon belül is az anyai hatással kapcsolatos vizsgálatoknál a hal, mint modellállat, egyre nagyobb szerepet kap. Számos eljárást alkottak már az anyai hatások vizsgálatára, ezek azonban nehezen kivitelezhető nagy technikai felszereltséget igényelő módszerek. Az eddig használt technikák nem tudják közvetlenül az oocytában befolyásolni, illetve vizsgálni az anyai hatást kiváltó faktorokat, ezekhez az oocyta-manipulációk új eljárásainak kifejlesztésére van szükség.

A fent vázolt problémákra a korai fejlődési állapotú follikulusokra kidolgozott transzplantációs és mikromanipulációs eljárás jelentheti a megoldást.

1.1 Célkitűzés

Elsődleges célom volt korai fejlődési stádiumú follikulusok felhasználásával a petsejt átültetésre alapozott ikraérlelés egy lehetséges módszerének kidolgozása zebradánió (*Danio rerio*) halfajra. Ezen fő célkitűzésen belül további feladatokat tűztem ki:

- Célom volt a transzplantált follikulusok beépülésének vizsgálata a recipiens petefészkekben.
- További célom volt életképes utód létrehozása átültetett follikulusból.
- Vizsgálni kívántam a szaporítás után a petefészekben található, eltérő fejlődési stádiumban lévő follikulusok egymáshoz viszonyított arányát az idő függvényében.
- A lehető legpontosabban meg kívántam határozni a különböző follikulus fejlődési állapotok eléréséhez szükséges időket zebradánió halfajban.
- Választ szerettem volna kapni arra a kérdésre, hogy lehetséges-e mesterségesen irányított fehérjeszintézis, vagy a génmegnyilvánulás manipulációja, a korai fejlődési stádiumú follikulusokban mRNS és DNS bevitellel.

2.1 A halakon történő petesejt átültetés előzményei

A petesejt manipulációs eljárások nagy jelentőséggel bírnak az alapkutatás, az állattenyésztés és a humán gyógyászat szempontjából egyaránt. Az elmúlt időszak biotechnológiai vívmányainak köszönhetően számos fajban lehetővé vált a női ivarsejtek, ivarszervek mélyhűtése, fajon belüli illetve fajok közötti transzplantálása és genetikai manipulálása.

Az ivarszervek transzplantációja, beleértve a petefészek és petesejt-transzplantációt is, több mint 100 éves múltra tekint vissza (NEWTON et al. 1996). A petefészek-transzplantáció évtizedek óta rutin eljárásnak számít az egér (*Mus musculus*) modellel dolgozó laboratóriumokban, amelynek kidolgozásában a magyar származású Nagy András munkássága alapvető jelentőséggel bír (NAGY 2003).

Az emlősmodellre kidolgozott módszer jól kombinálható mélyhűtésen alapuló eljárásokkal (SZTEIN et al. 1998; AGCA 2000). A génbankok világszerte gyűjtenek és tárolnak fagyasztott petefészek szövetet veszélyeztetett állatfajokból a genetikai diverzitás megőrzése céljából, mivel a petefészek, vagy a petesejtek lefagyasztása egy egyszerű és hatékony módszer a különböző nőstény egyedek ivarsejtjeinek megőrzésére. A módszert széleskörben használják az állattenyésztésben is (BAIRD et al.1999; WILDT 2000)

Az eljárást az 1990-es évektől a humángyógyászatban is alkalmazzák olyan nőknél, akik kemo- vagy sugárterápián esnek át. A petefészek kiműtése és lefagyasztása a kezelés előtt, majd ezt követően a petefészek visszaültetése számukra is lehetővé teszi a gyermekvállalást (NEWTON et al. 1996; GOOK et al. 2001).

A petesejt transzplantáció felhasználása szorosan kötődik a transzgenikus állatok létrehozásához is (SHAW és NAKAGATA 2002). Gerinces állatok esetében ahhoz, hogy a teljes utód transzgenikus legyen, az ivarsejteket kell genetikai módosításnak alávetni, vagyis bejuttatni a szükséges gént tartalmazó DNS-t vagy a fehérje termeléséhez szükséges mRNS konstrukciót. A manipulált petesejtet vagy a petefészekbe, vagy a blasztula stádium elérése után a méhbe ültetik be (MÜLLER 1996).

A kutatások szempontjából a halak szerepe kiemelkedő, mivel a halakon számos olyan eljárás kivitelezhető, amelyekre más modelleken nincs lehetőség. Annak ellenére, hogy az elvégezhető vizsgálatok jelentős része az emlősmodellre kidolgozott eljárások adaptációján alapul, a halak ivarsejtjeinek manipulációja is hosszú múltra tekint vissza (HORVÁTH és ORBÁN 1995; MÜLLER 1996). Számos eljárás kifejlesztése magyar származású kutatók nevéhez fűződik, mint a halak ivarsejtjeinek manipulációján alapuló módszerek, például ginoés androgenezis (NAGY és CSÁNYI 1984; BERCSÉNYI et al. 1998), vagy a ploiditási fok megváltoztatása (HORVÁTH és ORBÁN 1995). A halakon szerzett információk kisebbnagyobb módosításokkal, akár az emlősökre is igazak lehetnek.

Az említett módszerek illetve a módszerek felhasználásával kapott tudományos eredmények hatására merült fel a halakon történő petesejt átültetési módszer kidolgozásának ötlete.

2.2 A téma gazdasági jelentősége

A gazdasági haszonállatok esetében a mesterséges termékenyítés és a hozzá kapcsolódó spermavételi és tartósítási módszerek (a spermahígítás és a spermamélyhűtés) már a múlt század derekán bevezetésre kerültek a rutin állattenyésztésbe. A szarvasmarha esetében napjainkra külön iparággá vált a spermamélyhűtés, mely üzemi gyakorlattá fejlődött és nagymértékben hozzájárult a genetikai előrehaladás gyorsításához (CAFFEY és TIERSCH 2000).

A halak spermamélyhűtése is hosszú múltra tekint vissza, napjainkig a kutatók több mint 200 halfaj spermamélyhűtésével foglalkoztak. A halak hímivarsejtjeinek mélyhűtésére jól kidolgozott módszerek állnak rendelkezésre (LAHNSTEINER et al. 2000; RANA 1995; TIERSCH 2000). A mélyhűtésben elért sikerek ellenére, jelenleg nincs, vagy alig van piaca a mélyhűtött sperma alkalmazásának a halgazdálkodásban (DONG et al. 2007), a keltetőházi szaporítási technológiába történő beépítésre csak néhány utalás található (BOKOR et al. 2007; 2008). Kivételt képez ez alól a génbanki alkalmazás, amelynek célja alapvetően a védett halfajok (MARIA et al. 2006) vagy az értékes genetikai anyag megőrzésére irányul (KATASSONOV et al. 1995; HORVÁTH 2007). Egy faj genetikai anyagának teljeskörű megőrzéséhez azonban nemcsak az apai, hanem az anyai ivarsejtek megőrzésére is szükség van.

A halak oocytáira irányuló sikeres mélyhűtési technológiák kidolgozása csak rövidebb múltra tekint vissza (GUAN et al. 2008; TSAI et al. 2009). A nőstény egyedek ivarsejtjeinek mélyhűtésére elsősorban a korai fejlődési állapotú, szikfelhalmozódás előtti oocyták az alkalmasak, mivel ezek felépítése, az ikrával ellentétben, elég homogén (TSAI et al. 2009). Annak ellenére, hogy léteznek sikeres oocyta mélyhűtési technikák, gyakorlati használatuk még távoli, hiszen a sikeres mélyhűtés után a felolvasztott ivarsejteknek ikrává kell fejlődniük, és meg kell, hogy maradjon a termékenyítőképességük. Ennek eléréséhez azonban nem áll rendelkezésre megfelelő indukált oocyta érlelési technológia.

A fenti probléma áthidalására egy megfontolandó alternatíva lehet az oocytáknak recipiens anyákba történő visszaültetése, ahol az ovárium által biztosított környezetben az oocyták ikrává érése bekövetkezhet. Sikeres petesejt átültetéses technika kidolgozásával, ahol a felolvasztott ivarsejt egy recipiens anya szervezetében termékenyíthető ikrává érne, lehetővé válna az oocyta mélyhűtés gyakorlati felhasználása. Ezzel, a spermamélyhűtéssel együtt, nemcsak a szaporítás kockázatainak csökkentésére nyílna mód, hanem teljes génbankok létrehozásával a biodiverzitás megőrzésében is segítséget nyújthatna.

2.3 A téma alapkutatási jelentősége

A magzatburok-nélküli fajokban (Anamnia) a termékenyülés után az embriók bizonyos fejlettségi állapotáig (a midblasztula átmenetig) az anyából származó faktorok biztosítják az utód megfelelő fejlődését. Ebben a kezdeti állapotban az embrió saját genetikai állománya inaktív, csak bizonyos idő után veszi át a fejlődés irányítását (NEWPORT és KIRSCHNER 1982; KANE és KIMMEL 1993).

Zebradániónál az anyai hatású faktorok már az oocyta korai fejlődési fázisaiban elkezdenek felhalmozódni a petesejtben és már ekkor olyan fontos folyamatok irányításáért felelősek, mint például az animális-vegetatív tengely meghatározása (BALLY-CUIF et al. 1998), később a termékenyülés után még hosszú ideig nélkülözhetetlen szabályozó funkciókat töltenek be a kulcsfontosságú fejlődési folyamatokban (pl.: szervdifferenciálódás, KANE és KIMMEL 1993).

Annak ellenére, hogy több ezer anyai hatású géntermék, illetve fehérje befolyásolja az embrió kezdeti fejlődését, ennek a jelenségnek a genetikai és molekuláris mechanizmusairól még keveset tudunk. Ennek oka az, hogy kevés olyan eljárás áll rendelkezésre, ami lehetővé teszi az anyai gének működésébe való beavatkozást annak érdekében, hogy megismerhessük

az oogenezis és embrionális fejlődés során szükséges anyai hatásokat. Ezek az eljárások ráadásul technológiailag igen bonyolultak. Zebradániónál jó példa erre a négy generációs recesszív anyai mutációkat felfedő, anyai hatasú fenotípust vizsgáló mutáns előállítás (PELEGRI et al. 2004; DOSCH et al. 2004), melynek során a mutáns vonalak előállítása több évet vesz igénybe, emellett a szükséges több ezer keresztezés elvégzése olyan hely és költségigénnyel bír, amellyel csak a nagyobb laboratóriumok rendelkeznek.

Az említett hátrányok kiküszöbölésére több alternatív eljárást fejlesztettek ki. Ilyen eljárásra példa a recesszív géneket kutató ginogenezis (PELEGRI et al. 2004), az ősivarsejt átültetés (TAKEUCHI et al. 2003), vagy az embriók anyai hatású faktorait befolyásoló mRNS-sel, vagy Morpholino oligonukleotiddal történő mikroinjektálás (NASEVICIUS és EKKER 2000). Bár ezek a módszerek drasztikusan lecsökkentik az anyai mutáns vonalak előállításához szükséges időt és egyedszámot, hátrányuk az, hogy szükség van hozzájuk a megfelelő zigotikus mutánsra, hogy vizsgálhassák az adott gén anyából származó termékének funkcióját. További hátrányuk, hogy nem alkalmasak a korai fejlődési stádiumú petesejtek közvetlen manipulálására.

Az anyai hatások vizsgálatára és az anyai faktorok hatékony befolyásolásához az oocyta-manipulációk új eljárásainak kifejlesztésére van szükség. A korai fejlődési stádiumú follikulusok transzplantációja révén lehetőség nyílik ezeknek az oocytáknak a közvetlen manipulációjára és segítséget nyújthat azoknak a géntermékeknek az azonosításában, melyek az oocytában aktiválódnak és így részt vesznek az oocyta-fejlődésben és az embriógenezisben. A follikulus transzplantáció további fontos előnye lehet, hogy a vizsgálatokhoz nincs szükség mutáns vonalak előállítására sem.

A valódi csontoshalak (Teleostei) szaporodásbiológiája iránt az elmúlt évtizedekben megnőtt az érdeklődés. Ennek oka az egyes fajok gazdasági vagy természetvédelmi értékében keresendő.

A vizsgált fajoknál nem elég csak a szaporodási szokásaikról vagy a szaporodásuk környezeti feltételeiről tájékozódni. A fajra jellemző szaporodási stratégia meghatározásához és a mesterséges szaporítás hatékony kidolgozásának érdekében szükség van az ivarsejtek biológiájával kapcsolatos alapvető információk megszerzésére is (HORVÁTH 1980).

Annak ellenére, hogy a csontoshalak petefejlődésének a legtöbb mozzanata ismert, főleg a többször ivó fajoknál, ahol a petefészekben többféle fejlődési stádiumú follikulus található egyszerre, olyan alapvető kérdések nem tisztázottak, mint az oocytafejlődés pontos

üteme, vagy a szaporodás után a petefejlődés dinamikájában bekövetkező változások ismerete (LEFLER et al. 2008).

A petesejt átültetés egy olyan technikai lehetőséget nyújthatna, ahol markerrel jelölt oocyták recipiens petefészekbe juttatásával, majd bizonyos időközönként a bejuttatott oocyták sorsának nyomon követésével, pontosan meghatározható lehetne az egyes fejlődési stádiumok közötti átalakulásokhoz szükséges idő.

Ezzel olyan alapvető, a jelenlegi tudásanyagot kiegészítő, biológiai információkhoz jutnánk, amellyel pontosan meghatározható lehetne, hogy milyen környezeti és élettani körülmények a legalkalmasabbak a petesejtek optimális fejlődéséhez. Ezáltal mind a gazdasági, mind a természetvédelmi értékkel bíró halfajok mesterséges szaporítása hatékonyabbá válhatna.

2.4 A zebradánió petefészek-anatómiája és a follikulusok fejlődési stádiumai

2.4.1 A petefészek anatómiája

A valódi csontoshalaknál az egyedfejlődés (ontogenezis) kezdetén az ivarszervek más gerincesekhez hasonlóan, a gononefrotom ventromediális részéről ventrális irányban megjelenő hosszanti kettőzetből, a genitális redőből indulnak fejlődésnek. Ebben a kettőzetben helyezkednek el az ősivarsejtek (KISS 2000; LUBZENS et al. 2009).

Az ivarszervek differenciálódása során az ikrásoknál a petefészek-kezdemény külső felszínén egy vékony peritoneális eredetű hártya keletkezik, mely kívülről beburkolja az ivarszervet, alatta fejlődik ki a kötőszöveti burok. Később lemezek nyúlnak be a kialakuló petefészek üregébe. A lemezek kötőszöveti rostokból, a csírahám sejtjeiből és ősivarsejtekből állnak. Az ivarsejteket ellátó tápanyagokat a lemezek belsejében húzódó csatornákban áramló testfolyadék és a vér szállítja (HORVÁTH 1980; HORVÁTH és URBÁNYI 2000).

A zebradánió petefészke páros szerv, amit a hasüreg zár körbe. A petefészket az ivarnyílással a petevezető köti össze. A különböző fejlődési állapotú follikulusok véletlenszerűen helyezkednek el a petetartó lemezeken. Az oogóniumok és a petefejlődés korai stádiumában lévő oocyták közvetlenül a petefészek szövetébe vannak beágyazva, míg a fejlődő oocyták a petefészek follikulusaiban helyezkednek el, amit szomatikus sejtek rétege borít be. Az ikrák az ovulációt követően a petefészek üregébe kerülnek, ami egy rövid petevezetőben folytatódik. Az ivarnyílás a végbélnyílás és a farok alatti úszó között helyezkedik el (DODD 1977; SELMAN et al. 1993; MAACK és SEGNER 2003).

2.4.2 A zebradánió follikulusainak fejlődési stádiumai

A petefejlődés egyes szakaszainak jellemzése, a fejlődési stádiumok elkülönítése többféle szempont alapján lehetséges. A főbb oocyta fejlődési stádiumok a legtöbb csontoshalnál azonosak (HORVÁTH 1980, SELMAN és WALLACE 1989). A főbb fejlődési szakaszok: az oogóniumok mitotikus osztódása és átalakulása elsőrendű oocytává, a follikuláris sejtek megjelenése, a kortikális alveólusok kialakulása (elhelyezkedése és alakja), a vitellogenezis és az oocyták végső érésének folyamata (TYLER és SUMPTER 1996; LUBZENS et al. 2009). A továbbiakban a zebradánió follikulusainak főbb fejlődési állapotait tekintem át, melyek rövid összefoglalását az 1. táblázat tartalmazza.

2.4.3 I stádium: Az elsődleges növekedés fázisa

Az oocyták/follikulusok átmérője ebben az elsődleges növekedés fázisában 7-140 μm közötti. Az oocyták növekedni kezdenek, és az osztódási folyamatok a meiózis első főszakasza profázisának diplotén szakaszáig jutnak el (HISAOKA és FIRLIT 1962). Az elsődleges növekedés állapotát a csontoshalaknál további két részre lehet osztani, a kromatin nukleusz fázisra és a perinukleusz fázisra (LUBZENS et al. 2009). Zebradánióban is megtalálható ez a két fázis, az elkülönítés viszont nem a sejtmag eltérésein, hanem az oocyták elhelyezkedésén alapul. A pre-follikulus stádiumban az oocytát még nem veszi körül follikuláris tok, és minden oocyta a meiotikus profázis állapotában található (IA stádium). A follikulus fázisban az oocyta már a follikuláris tokban található (IB stádium) (SELMAN et al. 1993).

2.4.3.1 IA stádium: az elsődleges növekedés pre-follikulus fázisa

Az oocyták átmérője 7-20µm között van. A kisméretű oocyták a petefészek támasztószövete és más follikulusok által elkülönülten találhatók meg a petefészekben. Az ebben a stádiumban lévő oocyták sejtmagja a citoplazmához (ooplazmához) képest viszonylag nagy, néha nehéz elkülönült citoplazmát tartalmazó részt megfigyelni ezekben a

sejtekben. Kezdetben nem láthatók kromoszómák sem a korai meiotikus fázisban lévő oocyták sejtmagján belül, de ahogy a kondenzációjuk előrehalad a profázis során, egyre inkább láthatóvá válnak, majd a leptotén fázisban már könnyen megfigyelhetőek. Ezt az állapotot nevezik "kromatin-sejtmag állapotnak" (LUBZENS et al. 2009). A kromoszómák kondenzációja tovább folyik a zigotén és a pachitén fázisokban is.

Ahogy az oocyta növekedni kezd, teljesen beburkolják a pre-follikulus sejtek, amik az oocytákat különálló sejtekké szeparálják a petefészek szövetében. Amikor az oocyta elhagyja a kötőszövetes állományt, még nem éri el a diplotén fázist (SELMAN et al. 1993).

2.4.3.2 IB stádium: az elsődleges növekedés follikulus fázisa

A kialakult follikulusok átmérője 20-140µm közötti. Ebben a stádiumban a follikulus átlátszó, és fénymikroszkóp alatt jól megfigyelhető az oocytában található sejtmag. Az oocytát körülfogja a follikulus sejtek rétege, és ahogy az oocyta növekszik, az ooplazma bazofilan festődővé válik. A sejten belüli organellumok száma egyre gyarapszik. Röviddel az IB stádium kezdete után, megkezdődik a kromoszómák dekondenzációja és belépnek a diplotén fázisba, amiben az oocytafejlődés végéig maradnak (SELMAN et al. 1993).

Kezdetben csak kevés nagyobb sejtmagvacska figyelhető meg (15 µm-es átmérőig) a sejtmagban (germinális vezikulum). Ahogy az oocyta fejlődik, a sejtmagvacskák száma növekszik, méretük csökken, és a megnövekedett sejtmag szélére húzódnak. A sejtmagvacskák egy külső fibrilláris (szálas) és egy belső granuláris (szemcsés) rétegből állnak. Egyedülálló vagy csoportokba rendeződött ismeretlen funkciójú és összeállítású granulumok is találhatók a sejtmagon belül (SELMAN et al. 1993). Hasonló képleteket más halak korai fejlődési állapotban lévő oocytáiban is leírtak (BEGOVAC és WALLACE 1988).

A későbbiekben az oocyták elhagyják a kötőszövetes állományt, majd az oocytát beburkolják a szomatikus szövet rétegei és kialakítják a végleges follikulust, ami ekkor az oocyta membránját teljesen körülhatároló, pikkelyszerű follikulus sejtek egyetlen rétegéből áll. Ezen kívül a komplexet körülveszi egy vaszkularizált kötőszövet, a téka, amelyet a felszíni epitélium borít. Az I. stádium végére a kortikális ooplazmában a gyűrűs lemezek, a mitokondriumok, a Golgi-készülékek, és az endoplazmatikus retikulum-ciszternák számának növekedése figyelhető meg. Az oocyta felszínéről rövid *mikrovilli* nyúlványok indulnak a felszínét borító follikulus sejtek fellé. A follikulus sejteknek szintén vannak *mikrovilli* nyúlványai az oocyta felé. A nyúlványok között, először csak foltokban, feltűnik egy amorf,

elektrodenz anyag is. Ez az extracelluláris anyag az első jele a *zona radiata* (zona pellucida, vitellin burok) kialakulásának, ami ≤0,15 µm vastag az I. stádium végén (SELMAN et al. 1993).

2.4.4 II stádium: kortikális alveolus stádium

A második stádium végére a follikulusok átmérője 0,14- 0,34 mm közötti. Ennek a stádiumnak a kezdetét az oocytán belül megjelenő kortikális alveólusok jelzik. Ahogy a follikulus mérete nő és a kortikális alveólusok száma növekszik, az oocyta egyre opálosabbá válik, és a középen elhelyezkedő sejtmagot egyre nehezebb megfigyelni.

A kortikális alveólusok különböző méretű, szénhidrátokat és fehérjéket tartalmazó membránnal határolt hólyagocskák, melyek a Golgi-készülékek közelében helyezkednek el (SELMAN és WALLACE 1986, 1989; SELMAN et al. 1988). Ahogy az oocyta növekszik, az alveólusok száma és mérete szintén növekszik, méretben elérhetik a 25µm-t, a II stádium végére elfoglalják az ooplazma nagy részét. A kortikális alveólusok az oocyta fejlődés későbbi stádiumaiban kiszorulnak az oocyta külső, kortex állományába a centrálisan felhalmozódó szikanyagok miatt, majd az ikra termékenyülésekor kiürítik tartalmukat (kortikális reakció) (HART et al. 1977; HART és YU 1980; HART 1990; SZABÓ 2000a.).

A kortikális alveólus stádium során a germinális vezikulum növekedése folytatódik, egyre szabálytalanabb alakúvá válik, és szemmel látható változások következnek be benne, a sejtmagvacskák száma egyre növekszik. HISAOKA és FIRLIT (1962) 1500 sejtmagvacskát is számolt az ebben a stádiumban lévő oocyták sejtmagjában. A sejtmagvacskák alakban és méretben különbözhetnek egymástól. A nagyobb, szabálytalan alakúak a sejtmag burkának közelében, a kisebb, gömbölyűbb sejtmagvacskák középen helyezkednek el.

Az ooplazmában a mitokondriumok megnyúlnak, összekapcsolódnak a szemcsés endoplazmatikus retikulum ciszternáival. Ez a sejtalkotó egyre nagyobb számban lesz jelen a kortex mentén. A gyűrűs lemezek száma is mindenütt látványosan növekszik az oocytában, és ugyanúgy, mint a sejtmaghártyánál, néhány ezekből a ciszternákból is szemcsés endoplazmatikus retikulumban folytatódik (SELMAN et al. 1993).

A II. stádium végére lizoszómaszerű testecskék figyelhetők meg az oocytában. Ezek a kortikális alveólusok mellett találhatóak. Különböző sűrűségben és gyakoriságban tartalmaznak hártyás és szemcsés részeket, szerepük a szikanyagok képzésében van

(WALLACE et al. 1983; BUSSON-MABILLOT 1984; WALL és MELEKA 1985; BEGOVAC és WALLACE 1988).

Egy másik fontos szintézis tevékenység a II. stádiumú oocytában a háromrészből álló *zona radiata* kialakulása. A három réteg a *zona radiata externa*, a *zona radiata interna* 1, és a *zona radiata interna* 2 (KESSEL et al. 1985). A II. stádium kezdetén alakul ki a második réteg, az első réteg és az oolemma között. A külső réteg homogén és mérsékelten elektrodenz marad, míg a belső új réteg erősen elektron-lucens. A vastag komplex réteg nagyszámú vízszintes réteget foglal magában a sejthártya közelében. Az újonnan kialakult *zona radiata* csatornákkal lyuggatott, ezekben a csatornákban *mikrovilli* nyúlványok találhatók. Egy csatornában megtalálhatók mind az oocyta felszínéről induló, mind a follikuláris tokból induló nyúlványok. Az oocyta felszínéről eredők akár 8µm hosszúak is lehetnek és benyúlhatnak a follikuláris tok sejtjei közé, míg a tokból eredőek általában nem érik el az oocyta felszínét (KESSEL et al. 1985). Ennek a stádiumnak a végére a *zona radiata* vastagsága megközelítőleg 6 µm (SELMAN et al. 1993).

A háromrétegű *zona radiata* külső rétege és a follikulus sejtek között sűrű anyagfelhalmozódás történik. Ez az alkotórész egyre nagyobb lesz és egészen az ovulációig fennmarad. Az eredetük, összetételük, funkciójuk még nem teljesen tisztázott, de hasonlóak a korion fibrilláival, ami a *zona radiata*-hoz kapcsolódik más valódi csontoshalfajoknál is (FLÜGEL 1967; DUMONT és BRUMMET 1980; SELMAN és WALLACE 1982).

A téka sejtek között speciális sejtek tűnnek fel, amiket "speciális téka sejteknek", vagy "intersticiális sejteknek" neveznek és morfológiai, valamint enzim hisztokémiai megfigyelések alapján szteroid termelő funkciót látnak el a zebradánió follikulusaiban. Az I. stádiumban kevés található belőlük, a II. stádiumtól viszont megnő a számuk, differenciálódnak, csoportokba rendeződve találhatók a téka kapillárisai mellett (YAMAMOTO és ONOZATO 1968; LAMBERT 1978).

A follikulusok az első két stádiumban még kevés szikanyagot tartalmaznak, viszonylag homogén felépítésűek, áttetszőek és még jól megfigyelhető bennük a sejtmag (germinális vezikulum) is. Így a különböző manipulációkra az ebben a stádiumban lévő follikulusok látszanak a legalkalmasabbnak.

2.4.5 III. stádium: vitellogenezis

A vitelleogenezis stádiumában a follikulusok 0,34-0,69 mm átmérőjűek, és egyre opálosabbá válnak, a germinális vezikulum is teljesen kivehetetlen lesz. Ebben a stádiumban az oocyták elsősorban a szikanyagok beépülése miatt látványos méretbeli növekedésen mennek keresztül. Az oocyta endocitózissal veszi fel a májból származó fehérjetermészetű anyagot, a vitellogenint és később dolgozza fel szikanyaggá, amit menbránhatárolt sziktestecskékbe zár (WALLACE 1985). Két főbb vitellogenin típust írtak le zebradániónál, a nagy- és kis molekulatömegű vitellogenint. Ugyanúgy, mint a többi ikrarakó halfajnál, a zebradániónál is csak a nőstény egyedek vérplazmájában van jelen a vitellogenin, a hímekből - néhány speciális esetet leszámítva - hiányzik (WANG et al. 2005; RUGGERI et al. 2008).

SELMAN és munkatársai (1993) biokémiai vizsgálatokat és morfológiai megfigyeléseket végeztek annak meghatározására, hogy milyen mérettől tartalmaz a follikulus vitellogenint tartalamzó oocytát. Különböző méretű oocytákból készült homogenizátumokat vizsgálva azt találták, hogy a 0,34 mm-es follikulus átmérőtől kezdve már kimutatható mennyiségű vitellogenint tartalmaznak a petesejtek. Az ilyen méretű follikulusokban már megtalálhatók az apró membránnal burkolt sziktestecskék az oocytán belül, és ezek száma, valamint a mérete folyamatosan nő az oocyta további fejlődése során. Az oocyta felszínén ilyenkor jelentős mértékű endocitózis figyelhető meg. A lizoszóma-szerű testecskék egyre kevésbé észrevehetőek az oocytában, miközben a szikberakódás folyamata zajlik. A fejlődés ideje alatt, a szikszemcsék különböző méretben vannak jelen, néhány közülük eléri a 40µm-t. A legtöbb szikszemcse nem homogén és rendszerint egy vagy több vonallal határolt részre oszlik (YAMAMOTO és OOTA 1967). Ebben a stádiumban (vitellogenezis) történik a fehérjék legnagyobb mértékű beépülése, az átlagos növekedés 0,18 mg fehérje/mm³ (WALLACE és SELMAN 1985). A fehérjebeépülés, ha kisebb mértékben is, egészen a végső oocyta érésig tart.

A vitellogenezis korai szakaszában a follikulus epitéliumában speciális follikulus sejtek ún. mikropyle sejtek jelennek meg. Ezek hozzák létre a későbbiek folyamán a mikropyle csatornát a *zona radiata*-ban (HORVÁTH 1980; SELMAN et al. 1993).

A geminális vezikulum a stádium végére elmozdul az ooplazma centrumából, miközben a körvonala egyre egyenletesebb lesz, ezt a folyamatot anyai hatású faktorok irányítják (BALLY-CUIF et al. 1998). A sejtmagvacskák száma is erősen lecsökken, formájuk szabályossá válik, a kisebbek általában a germinális vezikulum közelében találhatóak. Ahogy a szikszemcsék kitöltik az oocyta belsejét, a kortikális alveólusok

fokozatosan egyre inkább a perifériára szorulnak a némiképp elektron-lucens ooplazmában. A vitellogenezis végére a follikulusok érzékennyé válnak az endogén hormonokra és készen állnak a végső érésre (IV stádium) (SELMAN et al. 1993).

2.4.6 IV stádium: végső oocyta érés

A végső oocyta érés (maturáció) stádiumában lévő follikulusok átmérője 0,69 - 0,73 mm. A IV. stádium alatt a germinális vezikulum az oocyta széléhez vándorol a későbbi animális pólus felé, a sejtmagburok szétesik, az első meiotikus osztódás megtörténik és a kromoszómák a második meiotikus osztódás metafázisába kerülnek. Ennél a pontnál alakul az oocyta ikrává (SELMAN és WALLACE 1989). A maturáció előtti follikulus opálos, emiatt nehéz, de nem lehetetlen megfigyelni benne a germinális vezikulumot. A maturáció stádiumában a follikulus átteszőbbé válik, a germinális vezikulum is könnyebben megfigyelhető (SELMAN et al. 1993).

Ebben a stádiumban a csontoshalak oocytája a follikulusban *in vitro* is eléri a maturációt szövettenyésztő médiumba is, ami nem kell, hogy tartalmazzon exogén hormonokat, ha már *in vivo* is belépett a maturáció szakaszába (WALLACE és SELMAN 1978; GREELEY et al. 1986b).

Csontoshalaknál az oocyta maturáció alatt, különösen a tengerben élőknél, a hidratációnak köszönhetően az oocyták méretbeli növekedése tovább folytatódik, valamint néhány szikfehérje proteolízisen megy keresztül (WALLACE és BEGOVAC 1985; GREELEY et al. 1986a; SELMAN és WALLACE 1989). Édesvizi fajoknál, ahol ezt dokumentálták, sokkal kisebb mértékben volt jelen ez a folyamat (GREELEY et al. 1986a; IWAMATSU et al. 1992). A zebradánió follikulusaiban ez a növekedés csak 10-15%-ot tesz ki az oocyta maturáció során *in vivo* és valamivel kevesebbet *in vitro*. A maturáció előtti, a maturáció utáni oocyták, illetve az ikra elektroforetikus profilját összehasonlítva kimutatható egy kismértékű proteolízis a maturáció alatt (*in vivo* és *in vitro* is) (SELMAN et al. 1993).

Ellentétben más csontoshalakkal, a zebradániónál szembetűnő strukturális változások mennek végbe a szikben a IV. stádiumban: a szikszemcsék elveszik kristályos szerkezetüket és homogénekké válnak. A szikszemcsék a maturáció utáni oocytákban kevésbé szögletes, simább kontúrral rendelkeznek, mint a maturáció előtt (SELMAN et al. 1993).

Az ovulációt megelőzően a follikulus sejtjei elhúzódnak az oocytától, a *mikrovilli*-k visszahúzódnak a *zona radiata* csatornáiból. Ezzel ellentétben számos oocyta *mikrovilli*

folytatja behatolását a zona radiátába még az ovuláció után is. Az ovuláció után a legtöbb valódi csontoshalnál a follikulus maradványa lesz a posztovulációs follikulus (SELMAN et al. 1993).

2.4.7 V stádium: érett ikra

Az érett ikra 0,73- 0,75 mm átmérőjű. Az áttetsző ikrák az ovulációt követően a petefészek üregébe kerülnek. A fajra jellemző follikulus méret, amiből az ikra kilökődik (ovuláció), egyedenként valamelyest eltérhet. A follukláris tok, ami körülveszi a még nem ovulált ikrát, hozzávetőlegesen 10µm vastag így az ikrák csak egy kicsit kisebbek, mint a follikulusok, amiből ovuláltak. A *zona radiata* háromrétegű, vékonyabb 3µm-nél, és benne található a tölcsérformájú mikropyle (HART et al. 1992). Az elektrondenz anyag (corion fibrilla) továbbra is fedi a burok külső felületét, amit pehelyszerű anyag borít. Bár a pórusok üresnek tűnnek az ovulált ikrákon, az ikra felszíne továbbra is kapcsolatot tart a zona radiátával, a *mikrovilli* nyúlványokon keresztül. A kortikális alveólusok rétege az ikra kortexében található, közvetlenül a szikszemcsék felett. Ellentétben más csontoshalakkal (MIGAUD et al. 2003; JIANG et al. 2010) lipidcseppecskék nem találhatóak sem az ikrában, sem a fejlődésben lévő oocytában, jóllehet a sziknek van zsírtartalma (MALONE és HISAOKA 1963).

1. táblázat A zebradánió follikulusok fejlődési állapotainak összefoglaló táblázata SELMAN és munkatársai (1993) munkája alapján

Fejlődési stádium	Fő morfológiai jellemzők
I. stádium	Az elsődleges növekedés fázisában a follikulusok (a kép közepén csoportban helyezkednek el) átmérője 7-140 µm közötti. A follikulusok átlátszóak, megfigyelhetőek bennük a sejtmagok. A sejtmag a citoplazmához képest nagy, sokszor nehéz elkülönült citoplazmát tartalmazó részt megfigyelni.
II. stádium	A kortikális alveolus stádiumban a follikulusok átmérője 0,14- 0,34 mm közötti. Ennek a stádiumnak a kezdetét a kortikális alveólusok megjelenése jelzi az oocytán belül. Ahogy a follikulus mérete nő és a kortikális alveólusok száma növekszik, az oocyta egyre opálosabbá válik, és a középen elhelyezkedő germinális vezikulumot egyre nehezebb megfigyelni.
III stádium	A vitelleogenezis stádiumában 0,34-0,69 mm átmérőjűek a follikulusok, és egyre opálosabbá válnak, a germinális vezikulum is teljesen kivehetetlen lesz. Ebben a stádiumban az oocyták elsősorban a szikanyagok beépülése miatt látványos méretnövekedésen mennek keresztül.
IV stádium	A maturáció stádiumában lévő follikulusok átmérője 0,69-0,73 mm. A maturáció előtti follikulus opálos és néha megfigyelhető benne a germinális vezikulum. Strukturális változások mennek végbe a szikben ebben a stádiumban: a szikszemcsék elveszik kristályos szerkezetüket és homogénekké vállnak.
V stádium	Az érett ikra 0,73-0,75 mm átmérőjű, és áttetszőbb, mint a IV stádiumban lévő follikulusok. A kortikális alveólusok rétege az ikra kortexében találhatóak, közvetlenül a szikszemcsék felett.

2.5 A csontoshalak petefejlődésének típusai

A petefejlődés típusai alapján a csontoshalakat három fő csoportba sorolhatjuk (SZABÓ 2000b).

- Az első csoportba az életük során csak egyszer ívó fajok, mint a csendes- óceáni lazacfajok (*Salmonidae*), vagy az angolna (*Anguilla anguilla*) tartoznak. A petefészkükben az ívási ciklus során a petesejtek azonos stádiumban vannak, fejlődésük egyidejű.

- A második csoportba azok a fajok tartoznak, melyek petefészkében két vagy több olyan oocyta csoport található, melyek fejlődési fázisukban különböznek. Az ikrások fajtól és a környezeti feltételektől függően többször is ívhatnak a szaporodási időszakon belül. Ebbe a csoportba tartozik például a ponty (*Cyprinus carpio*) és az aranyhal (*Carassius auratus auratus*). Az ovuláció után a következő sejtgeneráció a már előrehaladott petesejtekből fejlődik ki, ezért lehetséges, hogy míg az ivarérés rendszerint több évig tart, a már egyszer ívott ikrások minden évben képesek érett oocytákat termelni.

- A harmadik csoportba az aszinkronizált petefejlődésű halfajok tartoznak, ahol a petefészek oocytái különböző fejlődési fázisban vannak. Az azonos fejlődési állapotú petesejtek nem képeznek jól megkülönböztethető csoportokat a petefészken belül. A viszonylag hosszú szaporodási időszakban az ikrások meghatározott időközönként ovulálnak és ívnak. Ezt a csoportot képviselik többek között az ökle (*Rhodeus sp.*) vagy a dánió (*Danio sp.*) fajok.

A keléstől az első szaporodásig tartó időszakig lezajló változások, vagy az ovulációt követő regenerációs időszak eseményei elsősorban a gazdaságilag fontos halfajoknál jól ismertek, hiszen meghatározásuk alapvető fontosságú volt az optimális keltetőházi szaporítási technikák kidolgozásában (HORVÁTH 1980; BROMAGE és CUMARANATUNGA 1988; KITAJIMA et al. 1994). Nem tisztázott azonban, hogy az azonos fejlődési fázisban jelenlévő oocyták közül melyik, és miért lép tovább a fejlődés következő fázisába, illetve ehhez minimálisan mennyi idő szükséges. Nem ismert az oka annak sem, hogy két ívás között mely stádiumú petesejtek és miért maradnak nyugalmi fázisban. Az oocyták fejlődésének nyomon követésével választ kaphatnánk ezekre a kérdésekre és betekintést nyehetnénk a szaporodásbiológia olyan tényezőire, melyek a halfajok mesterséges szaporítása során a hatékonyság növeléséhez fontosak.

2.6 Módszerek az oocyták tanulmányozására és izolációjára

A halak oocytái számos vizsgálat tárgyát képezik. Ilyen vizsgálatok például a meiotikus osztódásokat irányító molekuláris folyamatok tanulmányozása, a nőstény egyedek genetikai anyagának megőrzésére irányuló vitrifikációs technikák, az ikrák *in vitro* maturációjára irányuló kísérletek, illetve az anyai hatások eredetének vizsgálata. A vizsgálatok egyik fontos pontja az oocyták nagy mennyiségben történő izolálása a petefészekből és az oocyták *in vitro* életben tartása a kísérlet ideje alatt.

A vizsgálatok elvégzéséhez mintát kell venni a petefészekből. A mintavétel történhet az egész petefészek kiműtésével, illetve a nagyobb testű halfajoknál biopszia segítségével (HORVÁTH 1980). Az oocyták kézzel történő izolációja a petefészek szövetéből, fáradságos és időigényes folyamat. Amennyiben a vizsgálatokhoz különálló oocytákra van szükség, a szeparálás folyamata még inkább meghosszabbítja a kísérletek előkészítési idejét, a folyamat alatt a petesejtek sérülhetnek, az életképességük csökkenhet. Az izolálási folyamatot meggyorsító egy, az emlősöknél használatos enzimatikus petesejt-izolációs eljárások (ROY és GREENWALD 1985; ROY és TREACY 1993; SAHA et al. 2000) halakra történő adaptálásáról a közelmúltban publikáltak először (GUAN et al. 2008). Az enzimatikus eljárással izolált oocyták életképessége megegyezik, illetve kissé alatta marad a kézzel történő szeparálásnak, viszont nagyságrendekkel több oocyta gyűjtését teszi lehetővé azonos idő alatt, így a továbbiakban ennek a módszernek az elterjedésére nagy az esély.

Egy másik módszer az izoláció megkönnyítésére a különböző sejt-sejt kapcsolatokat megszüntető, kalcium és magnézium-mentes oldatok használata (VÁRADI és HORVÁTH 1997), az ilyen médiumokban való hosszú inkubációs idő azonban erősen ronthatja a sejtek életképességét.

A szeparáció után a következő fontos lépés az oocyták életben tartása. Az oocyták vizsgálatával és manipulációjával kapcsolatos közlemények többféle oldatot javasolnak a tárolásra, melyek közül a legelterjedtebbek a Leibowitz L-15 oldat (SELMAN et al. 1993; GUAN et al. 2006; TSAI et al. 2009), a zebrafish Ringer oldat (TOKUMOTO et al. 2005), és a különböző koncentrációjú Hank's oldatok (WESTERFIELD 1995; GUAN et al. 2008). Minden médium közös jellemzője, hogy az izolált petesejtek akár több napon keresztül is károsodás nélkül tarthatók bennük, amennyiben tartalmaznak valamilyen antibiotikumot is, amely megakadályozza a médium befertőződését.

A halak oocytáinak *in vivo* megfigyelésére is van lehetőség a petefészek ultrahangos képelemzésével (BLYTHE et al. 1994; KOTRIK et al. 2008).

2.7 Az anyai hatás biológiája

A halaknál, a termékenyüléstől a blasztula stádiumig, az embrionális sejtek genomja inaktív és ebben a korai időszakban az embrió fejlődését az anyából származó anyagok (a petesejtben jelenlévő RNS-ek, fehérjék, és mitokondriumok) szabályozzák, melyek az oogenezis során szintetizálódnak és halmozódnak fel az oocytában (BALLY-CUIF et al. 1998). Az anyából származó szabályozó faktorok irányítása alatt a sejtosztódások gyorsan és szinkronizáltan zajlanak le az embrióban (NEWPORT és KIRSCHNER 1982; KANE és KIMMEL 1993).

Ezt a korai szakaszt követi a midblasztula átmenet (az angol kifejezésből elterjedt rövidítése: MBT), amit az időben elnyúló, ciklikusságukat elvesztő sejtosztódások és a transzkripció kezdete jellemeznek (GERHART 1980), ez az időpont egybeesik a gasztruláció kezdetével (NEWPORT és KIRSCHNER 1982). Az MBT-t a sejtmag-citoplazma arány kritikus megváltozása indítja el (nucleocytoplasmic ratio). Ezt a megfigyelést tanúsítja, hogy haploid embrióknál később (EDGAR és SCHUBIGER 1986), tertaploidoknál hamarabb kezdődik az MBT, mint a vad típusú diploid sejteket tartalmazó embrióban (NEWPORT és KIRSHNER 1982; MITA és OBATA 1984). Amellett, hogy DECKENS és munkatárasi (2003) *fue* (futile cycle, eredménytelen ciklus) mutáns zebradánión folytatott kísérletei szintén alátámasztják ezt a megfigyelést, a sejtmag citoplazma arány megváltozása mellett eddig még fel nem fedezett molekuláris mechanizmusok is fontos szerepet játszhatnak a midblasztula átmenet beindulásában.

Csontoshalaknál általában az első hét osztódás történik szinkronizáltan. A hetedik osztódást követően történik az MBT, ami fajonként valamelyest eltérhet. Zebradánióban a midblasztula átmenet a tizedik osztódást követően történik meg (KANE és KIMMEL 1993).

Az anyai hatás az embriógenezis folyamatában nem szűnik meg az MBT-nél, hanem továbbra is a kulcsfontosságú fejlődési folyamatok nélkülözhetetlen szabályozó eleme marad (DOSCH et al. 2004; WAGNER et al. 2004), beleértve a dorzo-ventrális tengely kifejlődését (GORE et al. 2005; FLORES et al. 2008), az ivari redők antero-poszterior tengelyének kialakulását (GRITSMAN et al. 1999; LUNDE et al. 2004), a gerincvelő és az ősivarsejtek fejlődését (PELEGRI 2003). Az anyai hatású géntermékek hozzájárulnak az embrionális fejlődéshez a szervi differenciálódás késői szakaszában is. Erre utal, hogy az anyai

géntermékeket még 3 nappal a termékenyülés után is megtalálták a zebradánió lárvákban (RYU et al. 2005) és később is befolyásolták a zebradánió fejlődését.

Az anyai géntermékek embrionális funkcióját bizonyítja az a megfigyelés, hogy számos olyan zebradánió gén zigotikus mutációja nem okoz sejthalált embriókban, amely gének homológjai, például az RNS pol II alegysége, vagy a TAF gének, az egysejtűekben esszenciálisak. A vizsgált zigotikus mutációktól az embriók pusztulását várták, ennek ellenére csak enyhe fenotípusos eltéréseket figyeltek meg a vizsgált egyedekben (AMSTERDAM et al. 2004). Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy az anyai géntermékek helyettesítik az esetleg még hiányosan működő zigotikus vagy más szóval embrionális géneket akár a lárvafejlődés 4-5. napjáig is, amikor a szervek többsége már jelen van és működik.

Annak ellenére, hogy több ezer anyai gén expresszál az embrióban (MATHAVAN et al. 2005) és ismeretlen számú különböző fehérje szintén az anyától öröklődik, még mindig kevéssé ismertek a genetikai és molekuláris mechanizmusai annak, hogy ezek hogyan befolyásolják a fejlődést. Pontosan nem tisztázott még az sem, hogy az embrionális gének hogyan veszik át az anyai tényezők szerepét (SCHIER 2007). Ez az anyai géntermékek hatásának vizsgálatára használt, fordított (forward genetikai megközelítés, egy adott fenotípus genetikai hátterét vizsgálja) vagy klasszikus (reverse genetikai megközelítés, egy adott gén által kialakított tulajdonságokat vizsgálja) genetikai megközelítést alkalmazó technológiákkal végzett beavatkozások nehézségeiből adódik.

2.8 Az anyai hatások vizsgálatára irányuló fontosabb technikák halakban

2.8.1 Anyai mutáns vonalak előállítása

Kémiai mutagéneket már régóta alkalmaznak random pontmutációk kialakítására a különböző állatfajokon. Zebradániónál a legelterjedtebb mutációk előállítására használatos vegyület a *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) (DRIEVER et al. 1996; HAFFTER et al. 1996; WIENHOLDS et al. 2002). A recesszív anyai mutációk vizsgálatára használt mutagenezis eljárás sémáját az 1. ábra tartalmazza.

A kiindulási (F1) populáció előállításához kifejlett hímivarú halakat kezelnek ENU-t tartalmazó oldattal, majd nem kezelt vad típusú ikrásokkal keresztezik őket (G0). A tejesek kezelésénél a koncentrációt és az expozíciós időt úgy állítják be, hogy csak olyan mennyiségű mutáció képződésére legyen esély a genomban, amely még nem zavarja a kiértékelést, és a

halak fertilisek maradnak. Ha a kezelés megfelelő volt, az F1 populáció nagy mennyiségben fog heterozigóta mutációkat tartalmazni (1. ábra, pirossal csíkozott halak). A kiindulási populáció tejeseitől rendszerint DNS mintát vesznek a későbbi vizsgálatok számára, illetve spermamélyhűtéssel kiegészítve, élő génkönyvtárak segítségével megőrzik azok genetikai anyagát (WIENHOLDS et al. 2003; SOOD 2006).

Az F2 populációhoz a kiindulási állomány ikrásait keresztezik vad típusú tejesekkel így az utódok fele heterozigóta kombinációban fogja tartalmazni a mutáns allélt (*/+). A F2 populációból testvérkeresztezéseket végezve, a megfelelő genotípusok párosításával, az utódok között (F3) már homozigóta formában is megjelenik a mutáció (1. ábra, */*, piros halak). Az F4 utódokban történik az életképesség és a morfológiai elváltozások vizsgálata, a termékenyülést követő első naptól (DRIEVER et al. 1996; HAFFTER et al. 1996; WIENHOLDS et al. 2002; DOSCH et al. 2004). Az utódokban, recesszív mutáció esetén, csak abban az esetben jelentkezik fenotípusosos eltérés, amennyiben az anya homozigóta volt a mutációra. A heterozigóta ikrásoktól származó utódokban az anyai hatás miatt nem alakul ki fenotípusos elváltozás.

Az ilyen típusú vizsgálatok nemcsak idő, hanem rendkívül helyigényesek is, hiszen akár több ezer keresztezést is el kell végezni, az utódok származását pontosan nyomon kell kísérni a kísérlet ideje alatt. Emiatt csak a nagyon jól felszerelt laboratóriumokban van lehetőség az ilyen típusú vizsgálatok elvégzésére.



1. ábra Anyai mutáns vonalak előállítási sémája DOSCH et al. (2004) alapján

2.8.2 A TILLING módszer

A TILLING módszer (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) egy olyan molekuláris biológiai, fordított genetikai megközelítésen alapuló eljárás, amely segítségével egy kiválasztott génben előforduló pontmutációk közvetlenül azonosíthatók és vizsgálhatók. Az eljárás a kémiai anyagokkal előidézett mutagenezist kombinálja egy érzékeny DNS vizsgáló technikával (MCCALLUM et al. 2000 a, b). Az eljárást először növényeken próbálták ki, de nem sokkal később zebradániónál is alkalmazták (WIENHOLDS et al. 2002; 2003; SOOD et al. 2006).

A vizsgálatokban azokat a mutagénnel kezelt egyedeket azonosítják, amelyekben megtalálható a célgént érintő mutáció. Ehhez a kezelt populációból származó egyedek

genomjának azon részét, amely a célgént tartalmazza felsokszorosítják és a fragmentek végeit festékekkel (IRDye700) jelölik. Ezzel párhuzamosan vad típusú, nem kezelt egyedekből is felsokszorosítják a kívánt DNS szakaszt és ugyancsak megjelölik a végeket egy más színű festékkel (IRDye800), majd a két különböző DNS fragmentumot hibridizáltatják egymással. A két fragment összekapcsolódik, azonban a pontmutációk helyén a kapcsolódás nem jön létre (angol névvel missmatch). A hibridizált fragmentekhez, egy olyan nukleáz enzimet (CEL I) adnak, ami a kapcsolódási hibáknál elvágja a DNS szálat. A kapott terméket denaturálva és gélen futtatva könnyen meghatározható, hogy a mutagénnel történt kezelés mely egyedek genomjában okozott a célgénben elváltozást, így az adott egyedek további vizsgálatok céljára elkülöníthetőek. Az érintett szakasz megszekvenálásával az is kideríthető, hogy hol és milyen változást okozott a kezelés (GILCHRIST és HAUGHN 2005).

2.8.3 Morpholino alapú génfunkció gátlás (knock down)

A Morpholino antiszensz oligonukletotid (MO) alapú eljárás egy hatékony, fordított genetikai megközelítést használó technika, amely egy kiválasztott célgén működésének (transzlációjának) gátlásával biztosít lehetőséget funkcióvesztéses fenotípusok azonosítására és vizsgálatára (SUMMERTON és WELLER 1997; COREY és ABRAMS 2001).

A Morpholino oligonukleotidok szintetikus, nukleinsav analóg molekulák, melyeket a normál nukleinsav-struktúra újratervezésével állítottak elő. A Morpholinoban egy hat atomból álló gyűrű (morfolin gyűrű) helyettesíti a ribóz vagy a dezoxiribóz gyűrűt, az egyes gyűrűket ionos töltéssel nem rendelkező foszforodiamidát csoport köti össze. Ehhez a gerinchez csatlakoznak a standard bázisok, így a Morpholino oligonukleotid molekula mind DNS-el, mind RNS molekulákkal képes hibridizálni. A Morpholinok szerkezetükből adódóan ellenállóak a sejtekben található nukleázok bontásával szemben (SUMMERTON és WELLER 1997; COREY és ABRAMS 2001).

A Morpholinok szekvenciaspecifikusak, a nem megfelelő bázissorrendű molekulák nem okoznak változást a fehérjeszintézisben. A kísérletekben használatos molekulák általában 25 bázis hosszúságúak, melyet speciálisan a célgénről termelődő mRNS bizonyos szekvenciáira terveznek (COREY és ABRAMS 2001).

A Morpholino bázisszekvenciáitól függően két úton gátolhatja az adott mRNS-en keresztül a fehérjeszintézist. Az első esetben a Morpholino a célgénről közvetlenül átíródó pre-mRNS érési folyamatában az intronok helyes kivágódását akadályozza meg, ezáltal hibás,

nem működő fehérje képződését idézi elő. A második esetben a transzláció folyamatát gátolja meg azáltal, hogy az érett mRNS-hez kapcsolódva megakadályozza az iniciációs komplex szabályos kialakulását, így az mRNS-ről egyáltalán nem képződik fehérje (COREY és ABRAMS 2001).

A Morpholino oligonukleotid embriókba történő mikroinjektálása alkalmas az anyai hatások vizsgálatára, az anyai eredetű mRNS-ek blokkolása által (NASEVICIUS és EKKER 2000; DRAPER et al. 2001), viszont az oocyták közvetlen manipulációjára, a petesejtek visszajuttatására szolgáló technika hiányában nem alkalmas.

2.8.4 PGC transzplantáció

Az ősivarsejtek (angol néven, primordial germ cells, rövidítése: PGC) olyan sejtek, melyekből ivarsejtek alakulnak ki az egyedfejlődés során. Halaknál az ivarszervekben található hatalmas mennyiségű ivarsejt csak néhány tucat primordiális őssejtből származik (SAITO et al. 2006). Az embriófejlődés során az ősivarsejtek az egyedüli olyan sejtek, melyekben benne rejlik a lehetőség, hogy genetikai információt juttathatnak át a következő generációba. Az ősivarsejtek alkalmazásában nagy lehetőségek rejlenek a génbanki felhasználástól, az un. "germ line" kimérákból származó utódok előállításáig (CIRUNA et al. 2002; YOSHIZAKI et al. 2004).

Két eljárás létezik az ősivarsejtek transzplantására. TAKEUCHI és munkatársai (2003) kifejlett szivárványos pisztrángok ivarszervéből izolált sejteket, nem tisztán csak PGC-ket, juttattak be mikroinjektálással szivárványos pisztráng ivadékok hasüregébe. A transzplantált sejtek megjelentek a recipiens ivarszervében, érett ivarsejteket képeztek, melyeket termékenyítési kísérletek során felhasználtak és belőlük életképes utódokat kaptak. Az általuk leírt eljárás, nem minden halfajnál használható, mivel egyes fajok frissen kelt ivadékai nem rendelkeznek megfelelő méretű hasüreggel a nagy mennyiségű sejt befogadására.

A másik eljárásnál blasztula fejlődési stádiumú embriókból származó ősivarsejteket ültettek át hasonló fejlődési stádiumú embriókba. Az ősivarsejtek izolációjának megkönnyítése érdekében a donor embriókat egy olyan konstrukcióval (GFP-nos1 3'UTR mRNS) injektálták, mely csak ezekben a sejtekben működik (SAITO et al. 2006). A jelölt sejtekkel intra- és interspecifikus átültetéseket végeztek és minden esetben találtak olyan egyedeket melyek ivarsejtjeiben megtalálható volt a donor egyedek genetikai anyaga (SAITO et al. 2008).

Interspecifikus ősivarsejt kimérákból eddig nem sikerült ikrát előállítani (SAITO et al. 2008). Fontos megjegyezni, hogy a graft, a körültekintő izolálás ellenére is tartalmazhatott szomatikus sejteket. A PGC-k és az ivarsejtek biológiájának pontosabb megismeréséhez fontos lenne, hogy ezt a hibát kiküszöböljék. Az sem tisztázott, hogy mennyi PGC szükséges a halak petefészkének fejlődéséhez és a gametogenezishez, ennek a kérdésnek a megválaszolása további vizsgálatokat, illetve a transzplantációs technika továbbfejlesztését igényli.

Az ősivarsejt transzplantációt anyai mutáns vonalak előállítására is felhasználták. Letális, anyai hatású mutációt hordozó embriók ősivarsejtjeit ültették át vad típusú embriókba. A vad típusú, recipiens embriók ősivarsejtjeinek fejlődését egy erre a célra tervezett Morpholino oligonukleotid (α.PGC-MO) injektálás segítségével blokkolták. Mivel az embrió csak a primordiális őssejtjeiben tartalmazta a mutáns gént, az utód fejlődése zavartalanul történt. A kifejlett egyedek ivarszerveiben csak a donor ősivarsejtekből képződő ivarsejtek voltak jelen, így a mutáció az összes oocytába öröklődött. Ezt az eljárást alkalmazva sikerült kikerülni az anyai mutáns vonalak előállítására irányuló több generációs keresztezési eljárásokat (CIRUNA et al. 2002). Az eljárás sematikus ábráját a 2. ábra mutatja be.





2.9 Riportergének

2.9.1 A fontosabb riportegének összefoglaló jellemzése

Az olyan géneket, melyek megnyilvánulása a fenotípusban jól látható, és ha valamilyen egyszerű eljárással könnyen és főleg gyorsan kimutatható, riportergéneknek vagy riporternek nevezzük (MÜLLER 1996; NAYLOR 1999). A riporter kifejeződését markerként használva könnyen nyomon követhetővé válik célszekvenciák, teljes gének, és fehérjék működésének vagy sejten, szervezeten belüli hollétének figyelemmel kísérése.

A riportergének használatán alapuló technikákat először a különböző regulálóelemek (promóterek, enhanszerek) tesztelésére, illetve a transzgén bejuttatások hatékonyságának vizsgálatára, ellenőrzésére használták, mind eukarióta, mind prokarióta élőlényeken (ALAM és COOK 1990; WOOD 1995; MÜLLER 1996; WELSH és KAY 1997).

Célfehérjék és riporterfehérjék kovalens összekapcsolásával lehetőség nyílik arra, hogy az egyes fehérjék transzportját és más fehérjékkel való kapcsolatát is vizsgálják, például a receptorfehérjék és a ligandumaik kapcsolatát, vagy a sejtek közötti információcserét biztosító fehérjék működését (CASTANON és SPEVAK 1994; HOLZSHUH et al. 2001). Több különböző, vagy egy riportergén több változatának együttes használatával fehérjék szimultán nyomon követése is megvalósítható (WAN et al. 2002; SATO et al. 2005).

A riportergének használatában rejlő lehetőségeket gyógyászati célú génterápiás alkalmazások kidolgozásában is kihasználják (SERGANOVA et al. 2007; CHUANG és CHENG 2010), a betegségek hátterének feltérképezése után úgy, hogy a betegség gyógykezelésére szolgáló terápiás fehérjét kódoló géneket juttatnak be a sejtekbe, majd riportergének segítségével figyelik a sorsát (SON et al. 2003; LIESCHKE és CURRIE 2007). A riportergéneket alkalmazó eljárásoknak toxikológiai célú felhasználási lehetőségei is ismertek. Indukálható promóterek ripotergénekkel történő összekapcsolásával olyan indikátor élőlényeket hoztak létre, melyek jelzik, ha a környezetükben bizonyos mérgező anyagok vannak jelen (HEITZER et al. 1994; VAN DYK et al. 1994, BAKOS et al. 2010).

Riportergéneket tartalmazó halakkal és egerekkel az állatkereskedésekben is találkozhatunk, hiszen a hobbiállattartók részére a közelmúltban "világító" transzgenikus állatokat is forgalomba hoztak (GloFish, NeonMice).

Munkám során csak a zöld világító fehérje génjét (angolul: green fluorescent protein rövidítve: GFP), vagy annak valamilyen változatát tartalmazó transzgenikus zebradánió vonalakat és nukleinsav konstrukciókat használtam fel, magukban vagy egymássalkombinálva, így a riportergének közül csak ennek a részletesebb ismertetésére térek ki. A leggyakrabban használt riportergének főbb tulajdonságait a 2. táblázat tartalmazza.

Riportergén	Előnyök	Hátrányok	
Kloramfenikol acetil-	Nincs zavaró endogén aktivitás,	Kvantitatív mérésre nem	
transzferáz (CAT)	könnyen kimutatható ELISA	alkalmas, nem ad információt a	
(Escherichia coli)	teszttel	térbeli elhelyezkedésre	
Neomycin foszfotranszferáz	Aminoglükozid típusú	Magasabbrendű élőlényekben	
(neo)	antibiotikumokkal történő	nem vagy csak körülményesen	
(Escherichia coli)	szelekcióval könnyen	alkalmazható (mozaikosság)	
	kimutatható.		
β- galaktozidáz (<i>lacZ</i>)	Hisztokémiai festéssel,	Gerincesekben endogén	
(Escherichia coli)	lumineszencián alapuló	aktivitás zavarhatja a	
	eljárásokkal könnyen	kielemzést, ami megfelelő pH-n	
	kimutatható	csökkenthető.	
Luciferáz (<i>luc</i>)	Prokariótákban jól használható	Emlősöknél nem alkalmazható,	
(Photobacterium fischerii)	transzkripciós vizsgálatokhoz	viszonylag gyenge jelet ad.	
Luciferáz (luc) (fekete	Nagy a fajlagos aktivitása,	Kimutatás a megfelelő	
szentjánosbogár Photinus	könnyen kivitelezhető eljárások	szubsztrát nélkül nem	
pyralis)	léteznek a kimutatására, amit	lehetséges.	
	nem zavar endogén aktivitás		
Alkaline phosphatase (Homo	Kimutatása olcsó kolorimetriás	Endogén aktivitás zavarhatja a	
sapiens)	eljárásokkal, és érzékeny	kimutatását néhány sejttípusnál.	
	lumineszcens próbákkal is		
	lehetséges		
Receptor- vagy	Radioaktív próba kötődése után	In vivo kimutatásához speciális	
transzportfehérje alapú	pozitron emissziós	műszerek szükségesek, a	
riporterrendszerek (pl:	tomográfiával (PET) in vivo is	vizsgálat viszonylag hosszú	
Somatostatin subtype 2 SSTr2	lehetséges a szervezet bármely	előkészítést igényel.	
vagy Norepinephrine	pontján. Erős expressziós szint.		
Transporter NET)			
(Homo sapiens)			

2. táblázat A leggyakrabban használt riportergének összehasonlító táblázata MÜLLER (1996), NAYLOR (1999), ANDO (2002) és SERGANOVA (2007) munkája alapján.

Enzim alapú riporterrendszerek	Radioaktív próba kötődése után	In vivo kimutatásához speciális	
(pl.: Mitochondrial thymidine	pozitron emissziós	műszerek szükségesek, a	
Kinase <i>TK2</i>)	tomográfiával (PET) in vivo is	vizsgálat viszonylag hosszú	
(Homo sapiens)	lehetséges a szervezet bármely	előkészítést igényel. Alacsony	
	pontján.	expressziós szint.	
Zöld fluoreszcens fehérje	Kimutatása egyszerű, nincs	Háttér autofluoreszencia	
(GFP) (kristály medúza	hozzá szükség szubsztrátra.	zavarhatja a kiértékelést,	
Aequorea victoria)	Több színváltozata ismert.	amennyiben a jel gyenge.	
Kaede	Kimutatása egyszerű, nincs	Háttér autofluoreszencia	
(Kőkorall Trachyphyllia	hozzá szükség szubsztrátra.	zavarhatja a kiértékelést,	
geoffroyi)	Megfelelő hullámhosszú	amennyiben a jel gyenge.	
	fénnyel megvilágítva a		
	fluoreszencia zöldből pirosba		
	vált.		

2.9.2 Zöld fluoreszcens fehérje (GFP)

A kristály medúzából (*Aequorea victoria*) izolált GFP fehérje 238 aminosavat tartalmaz, 26,9 kDa tömegű, a fluoreszenciáért felelős régió (fluorofór) három egymást követő aminosav: a Ser-65, a Tyr-66, és a Gly-67 közötti kölcsönhatása révén alakul ki, melyet egy hordó alakú fehérjeburok vesz körül. Kék (475 nm) és UV (396 nm) fénnyel egyaránt gerjeszthető, 508 nm-es zöld fényt bocsát ki (PAKHOMOV és MARTINOV 2008).

A GFP nem igényel sem szubsztrát molekulát sem kofaktort, mindössze a megfelelő energiájú fotonokat kell biztosítani a működéséhez és a megfelelő szűrővel ellátott fluoreszceins mikroszkóp alatt *in vivo* is megfigyelhető az aktivitása.

Az utóbbi években a GFP-nek több színváltozata is megjelent. Ezek az eredeti fehérjétől a térbeli struktúrában, illetve a gerjesztéshez szükséges és a kibocsátott fény hullámhosszában térnek el egymástól (HEIM et al. 1994; ORMO et al. 1996; PATTERSON et al. 2001). Multikolor transzgenikus élőlényekben egyidejűleg is megoldható az eltérő színű világító fehérjék vizsgálata megfelelő szűrők alkalmazásával, amennyiben a fehérjék emissziós intervalluma nem fed át egymással (WAN et al. 2002; SATO et al. 2005). A legfontosabb GFP változatok emissziós és excitációs jellemzőit a 3. táblázat tartalmazza.

Fluoreszceins fehérje	Gerjesztési maximum	Emissziós maximum	<i>in vivo</i> struktúra
	(nm)	(nm)	
BFP (kék)	383	445	monomer
CFP (cián)	439	476	monomer
GFP (zöld)	396	508	monomer
YFP (sárga)	514	527	monomer
DsRed (piros),	558	583	tetramer
DsRed variánsok	548-595	559-655	dimer
(piros)			vagy monomer

3. táblázat A legfontosabb fluoreszcens fehérjék emissziós és excitációs jellemzőinek összefoglaló táblázata PAKHOMOV és MARTINOV (2008) munkája alapján

Mivel a GFP stabil fehérje, a sejt pusztulása után is jó ideig megőrzi fluoreszcens tulajdonságait, ezért olyan esetekben, ahol a transzkripciót is igazolni kell szükség lehet alternatív kimutatási eljárásokra is. Erre jó lehetőséget nyújt a GFP tartalmazó génről átíródó mRNS in situ ellenanyagfestéssel történő kimutatása, a módszer hátránya, hogy csak fixált szöveten lehetséges az elvégzése (HAUPTMANN 1999).

2.10 A transzplantáció biológiája

Bár immunológiával kapcsolatos vizsgálatokat nem folytattam a doktori munkám során, az immunológiai folyamatok és a kilökődést befolyásoló tényezők alapszintű ismerete elengedhetetlen volt a kísérlettervezési folyamatok során, így ennek a témakörnek a rövid ismertetése következik.

2.10.1 Immunológiai alapfogalmak és a transzplantáció fajtái

Az élő szervezet egyik homeosztatikus működése az, hogy a számára idegen, káros anyagok bejutásakor arra valamilyen módon reagál. Az immunválaszt kiváltó anyagokat antigéneknek vagy immunogéneknek nevezzük. Az antigének két fő jellemzője, hogy az élő szervezetet specifikus ellenanyagok képzésére készteti (immunogenitás), és a képződő ellenanyagokkal, az antitestekkel, *in vivo*, és *in vitro* is reagál (reaktivitás) (HUSVÉTH 1994). Az ellenanyagok az antigénnek csak egy bizonyos részét, az antigéndeterminánst képesek felismerni, és azzal reakcióba lépni (GERGELY és ERDEI 2000).

A szervezet bármely sejtcsoportjának, szövetének, szervének saját szervezeten belüli vagy más egyedbe való áthelyezését transzplantációnak nevezzük. Az átültetendő szervet vagy szövetet transzplantátumnak vagy graftnak nevezzük, ami a donorból származik és a recipiensbe kerül beültetésre. A transzplantátumok eredetük szerint lehetnek auto-, szin-, allovagy xenograftok. Az autograft a saját szövet átültetést jelenti a test egyik pontjáról a másikra, a szingraft a genetikailag azonos, például beltenyésztett vonalak egyedei közötti, az allograft ugyanazon faj két egyede közötti, míg a xenograft a különböző fajok egyedei közötti átültetést jelenti (GERGELY és ERDEI 2000).

Ortotopikus az átültetés, ha a graftot a szervezeten belül anatómiailag az eredeti helyére ültetik vissza, és heterotopikus, ha a szervezet más részére kerül (MÁTHÉ 2007).

Az antigénszerkezetükben hasonló sejtek, szövetek összeférhetőek (hisztokompatibilisek), átültetésük után immunreakciót nem váltanak ki. Ha azonban antigéntulajdonságaikban nagyon eltérnek egymástól, nem összeférhetőek (hisztoinkompatibilisek), az átültetésük után immunválaszt, ennek következtében kilökődést fognak okozni. А szöveti összeférhetőséget elsősorban meghatározó antigének а fő hisztokompatibilitási génkomplex (MHC) termékei (EDWARS és HEDRICK 1998).

2.10.2 A szövetösszeférhetőséget befolyásoló faktorok

Az MHC- (Major Histocompatibility Complex - fő szövetösszeférhetőségi komplex) molekulák onnan kapták a nevüket, hogy először a szövet- és szervátültetések kapcsán fedezték fel őket, mint olyan antigéneket, amelyek elsődlegesen kiváltják a beültetett idegen szerv kilökésére irányuló immunfolyamatokat. Az MHC-molekuláknak két fő típusát ismerjük. Az MHCI molekulák minden magvas sejten, az MHCII molekulák konstitutív módon az ún. professzionális antigénbemutató (prezentáló) sejtek felszínén vannak jelen. Fő fiziológiás feladatuk a sejt által feldolgozott antigének peptidjeinek bemutatása a T-sejtek számára (SAKAI 1995).

Az MHC antigének kodominánsan öröklődnek, ami a régóta ismert összeférhetőségi szabályok genetikai magyarázatát adja. Az átültetések során tapasztalható kilökődési reakciókért a donor és a recipiens szervezet MHCI és MHCII molekuláiban tapasztalható szerkezeti eltérések a felelősek (EDWARS és HEDRICK 1998).

A szervátültetést követő kilökődési reakciókért, elsősorban a lassú kilökődésekért, a minor hisztokompatibilitási antigének (minor-H) is felelősek. Minor-H antigén lehet minden a

sejt felszínén jelenlévő polimorf fehérje (SIMPSON és ROOPENIAN 1997). A minor-H antigének ellenanyagválaszt nem indukálnak, különbözőségük a donorban, illetve a recipiensben önmagában nem vált ki erős kilökődési reakciót, de megnöveli az MHC-antigének eltérése esetén beinduló kilökődési folyamatok erősségét. (RAYFIELD 1988)

2.10.3 Immunológiailag kiváltságos helyek

Speciális esetet jelentenek a szervezet immunológiailag kiváltságos helyeinek nevezett részei, ahol az átültetett szövet nem okoz immunreakciót. A test bizonyos szövetei, a herék, a petefészek, az agy, a porc, a máj, a szaru- és szivárványhártya, az ivarsejtek, a szervezet egyéb szöveteihez képest másként viselkednek a kilökődési reakciók során. Ezeket a szerveket immunológiailag védett szöveteknek nevezik (PETRÁNYI 1986; VAN ROOD 2002). Az ilyen speciális helyek kialakulását, a szervezet fizikai határai, az efferens nyirokkeringés hiánya, a helyileg képződő immunszupresszív faktorok, a fő hisztokompatibilitási gének által kódolt fehérjék korlátozott megjelenése együttesen alakítják ki (HEDGER 2007). Feltételezhető, hogy a halak petefészke is bizonyos tekintetben immunológiailag kiváltságos helynek tekinthető (VÁRADI saját, nem publikált kísérletei eredményein alapuló szóbeli közlése 2005).

2.10.4 Humorális és celluláris immunválaszok

A szervezet az antigén szerkezetének még kismértékű megváltozására is reagál, felismeri azt és ellene speciális ellenanyagot, antitestet termel. Ezt a reakciót humorális immunválasznak nevezzük. A kérdéses antigénre specifikus sejteket is mozgósít a szervezet, ezt a reakciót celluláris immunválasznak nevezzük. A védekezés sejtes és humorális elemei egymásra épülve, közösen biztosítják a szervezet antigénekkel szembeni védelmét, és a gerincesekben közel azonosan játszódnak le ezek a folyamatok (HUSVÉTH 1994).

A celluláris immunreakció során a T-sejtek játsszák az elsődleges szerepet (JADUS és WEPSIC 1992; ZAPATA 2006; HANINGTON 2009).

A csontoshalaknál általában a csecsemőmirigy (*thymus*) az első szerv, amely limfoiddá válik, ez az elsődleges T-sejt termelő (ZAPATA et al. 1996). A zebradániónál és a pontynál a

csecsemőmirigy limfoiddá differenciálódása már a harmadik-negyedik nappal a termékenyülés után megkezdődik (ROMANO et al. 1999; WILLET et al. 1999).

A humorális immunválasznál az immunrendszer B-sejtjei töltik be a meghatározó szerepet (TATNER 1986; ZAPATA 2006).

Csontoshalaknál a vese az első olyan szerv, amely elkezdi a B típusú fehérvérsejtek termelését. A B- típusú sejtek aktivitását már három nappal a termékenyülés után sikerült zebradánióban kimutatni (TREDE 2001; LAM et al. 2004). Bár a vese marad az elsődleges B-sejt termelő, B-sejt termelést a hasnyálmirigyben is leírtak (DANILOVA 2002; LANGENAU et al. 2004).

2.10.5 A kilökődési reakciók típusai

A kilökődési reakcióknak különböző típusai különböztethetőek meg attól függően, hogy a szervezet mikor és milyen immunológiai folyamat eredményeként próbál megszabadulni a beültetett idegen szövettől.

Hiperakut reakció során a kilökődés már a beültetést követő percekben megindul. Kiváltó okai lehetnek a donor szöveteit, elsősorban azok szénhidrátantigénjeit felismerő természetes vagy korábbi immunizálás során képződött ellenanyagok (NAKANISHI és OTOTAKE 1999).

Korai akut reakció 2-5 nap elteltével alakul ki, hátterében elsősorban citotoxikus Tsejtek által közvetített másodlagos reakciók állnak. Az idegen szövet károsításához és kilökéséhez ellenanyagok által közvetített citotoxicitás is hozzájárulhat (GERGELY és ERDEI 2000).

A késői akut kilökődés átlagosan 7-21 nap elteltével, esetenként sokkal később, akár csak néhány hónap múltán következik be. A többszörös "érzékennyé" tevés felgyorsítja a kilökődési folyamatokat (NAKANISHI és OTOTAKE 1999).

Krónikus kilökődési folyamatok általában részben leküzdött akut reakciók, vagy az immunszupressziót követő fokozott reaktivitás következményeként alakulnak ki.

Halaknál a kilökődési folyamatok erősségét a környezeti tényezők, például a hőmérséklet (BLY és CLEM 1992), vagy a sötét és világos órák hossza (NEVID és MEYER 1993) is befolyásolják.

2.11 A zebradánió (Danio rerio)

2.11.1 A faj jellemzése

A trópusi akváriumokból is jól ismert hal háta olajbarna, az oldalak és a has alapszíne sárgásfehér. Törzsén a kopoltyúfedőtől a farokúszó végéig több sötét acélkék sáv húzódik. A csíkozottság a farok alatti úszóra is kiterjed. A hátúszó alapszíne sárgásbarna, kék szegéllyel, mely kívül fehéren szegélyezett. A kopoltyúfedő kék, fehér foltokkal tarkított. A nőstény sokkal teltebb, színei kevésbé élénkek. A hím karcsú, alapszíne aranysárga, csíkjai sötétebbek. Testhossza átlagosan 4,5 cm (HORN, 1983).

A zebradánió Dél-Ázsiában, India, Banglades, Nepál, Mianmar és Pakisztán területén őshonos. Erre a régióra monszun éghajlat a jellemző, a környezeti paramétereket az esős és a száraz időszakok váltakozása alakítja. A kisebb patakoktól az elárasztott rizsföldekig sokhelyen megtalálja az életfeltételeit, de előnyben részesíti a lassú folyású növényekkel dúsan benőtt helyeket, az ártereket. Mivel elsősorban a felszínközeli vízrétegekben él, az aljzattal szemben nem támaszt különösebb igényeket (RAHMAN 1989, BHAT 2003). Természetes élőhelyein a vizeket a közepes keménység, a 8 körüli pH, a 30 centiméternél nagyobb átláthatóság és a 20-30 °C közötti vízhőmérséklet jellemzi (MCLURE et al. 2006, SPENCE et al. 2006).

A zebradánió kisebb csoportokban él (5-20 egyed), mely állandó lassú mozgásban van (PRITCHARD et al. 2001). Laboratóriumi körülmények között bizonyították, hogy a csapat tagjai vizuálisan és szaglás útján képesek egymást azonosítani (GERLACH és LYSIAK 2006). Megfigyelték azt is, hogy az ivadékok és a fiatal egyedek előnyben részesítik a közeli rokonaik társaságát (ENGESZER et al. 2004). Ezek alapján valószínűsítik, hogy a természetben a fiatal egyedeket tartalmazó csoportok mind rokonok egymással, és ezek a csoportok az ivarérés elérésekor feloszlanak, és új csoportokhoz csatlakoznak (GERLACH és LYSIAK 2006).

A természetben a zebradániók előszeretettel fogyasztják a különböző planktonikus szervezeteket, rovarlárvákat (DUTTA 1993). Béltartalom-vizsgálatok kimutatták, hogy egyes területeken az étrendjük főleg apró, vízbehulló rovarokból áll, emiatt felmerült esetleges felhasználásuk a moszkitók (*Anopheles sp.*) elleni védekezésben is (SHRESTHA 1990).

A zebradánió petefejlődése aszinkronizált, kisebb csoportokban ívik, a lerakott ikrákat egyik szülő sem őrzi. Az ívási időszak kezdete a monszunesők kezdetével esik egybe (MUNRO 1990). A zebradánió ívását a száraz évszakban is megfigyelték, de az esős
IRODALMI ÁTTEKINTÉS

időszakban rendszeresebben és több ikrát adnak. A lerakott ikrák a fenékre süllyednek és természetes körülmények között, a környezeti hatásoktól függően 4-7 nap alatt kikelnek és elúsznak a lárvák (SPENCE et al. 2006). A hímeknél territoriális viselkedés is megfigyelhető az ivási időszak alatt (SPENCE és SMITH 2005).

A természetben a zebradániók élethossza körülbelül egy év, ez az adat azonban csak becsült, amit a természetes élőhelyről gyűjtött egyedek testméretei, a szaporodási stratégia, és pikkelyvizsgálatok alapján állapítottak meg (SPENCE et al. 2006). Laboratóriumi körülmények között, dokumentált adatok alapján, az élethosszuk meghaladhatja az öt évet (GERHARD et al. 2002).

2.11.2 A zebradánió, mint modellállat

A tudomány számára a magyar származású, de az Egyesült Államokban élő Streisinger György fedezte fel ezt a fajt, mely ugyan nem rendelkezik olyan tulajdonságokkal, ami egyedülállóvá tenné a több tízezer ismert halfaj között, mégis megkérdőjelezhetetlen érdemeket szerzett ezeknek a halaknak a tudományos életben. Rövid generációs intervallummal rendelkezik, hetente nagy mennyiségű ivartermék nyerhető tőlük, az embriók fejlődése *ex utero* zajlik, és jól nyomonkövethető az átlátszó ikrahéjon keresztül.

Ma már nem csak a fejlődésbiológiával fogalakozó tudósok figyelme fordul e halfaj felé. A biotechnológiai kutatásoknak köszönhetően elkészült a zebradánió teljes genomjának térképe, továbbá több ezer mutáns vonal létezik a különböző laborokban. A legtöbb emlősökön végezhető manipulációs eljárás is adaptálva van már rájuk, így megnyílt az út számos más tudományterület előtt is, hogy kísérleteinek alanyául ezt a halfajt válassza.

Széleskörben használják fejlődésbiológiai és genetikai (EISEN 1996; GRUNWALD és EISEN 2002), gerontológiai, (GERHARD és CHENG 2002), tumorbiológiai (LIESCHKE és CURRIE 2007), keringési- (NEMTSAS et al. 2010), illetve idegrendszeri betegség (KABASHI et al. 2010), viselkedésbiológiai, (ENGESZER et al. 2004; SPENCE és SMITH 2005), és ökotoxikológiai vizsgálatokhoz (ANKLEY és JOHNSON 2004; FENSKE et al. 2005; HILL et al. 2005; SANTOS et al. 2007). A zebradánión elért egyes kísérleti eredmények a gyakorlati haltenyésztés számára közvetlenül is hasznosíthatóak (SZŰCS et al. 2009; ROHNER et al. 2009)

35

2.11.3 A zebradánió laboratóriumi tartása

A világon jelenleg több mint 800 zebradániós laboratórium működik. A zebradánió modellállatként való elterjedése nagy üzleti lehetőségeket rejt magában, több cég is alakult, amelyik a hal tartásához szükséges recirkulációs rendszerek gyártásával és forgalmazásával foglalkozik. A rendszerekkel támasztott alapkövetelmény a könnyű kezelhetőség, az olcsó működtetés, valamint a megbízhatóság.

A legnagyobb költség a laborállatok tartása során, a labor fenntartási időszakában, az optimális környezeti tényezők biztosítása az állatok számára. Amennyiben nem a megfelelő körülmények között tartják őket, az életfolyamataik károsodnak, ezzel a kísérletek sikere is kétségessé válhat. Legelőször a szaporodásbiológiai paramétereik változnak kedvezőtlen irányába, hiszen az állatok az energiájuk nagy részét a kellemetlen környezeti hatások kompenzálására fordítják, és nem ivarsejttermelésre (WOOTON 1998). A vadonélő zebradániók vizsgálata nagyban hozzájárult a mesterséges körülmények közötti tartás optimális kialakításához.

2.11.3.1 A tartóvíz fizikai és kémiai tulajdonságaival támasztott követelmények

A hőmérséklet az egyik legfontosabb fizikai paraméter a halak nevelése és tartása során. Laboratóriumi vizsgálatok során bizonyították, hogy a zebradánió hőmérséklettel kapcsolatos tolerancia zónája 6,7- 47,7 °C között van (BENNETT és BEITENGER 1997). Mesterséges körülmények között többféle vízhőmérséklet mellett tartják a zebradániókat, amely az adott laboratórium fő kutatási területe szerint változhat. A legelterjedtebb a WESTERFIELD (1995) által közölt 28,5 °C, mely általánosan elfogadott, és használt értéknek tekinthető, azonban például toxikológiai vizsgálatokhoz ennél valamivel alacsonyabb, 24-25 °C-os hőmérsékletet ajánlanak (OECD 203. 1992). Magasabb hőmérsékleten az állomány ivararánya eltolódhat (UCHIDA et al. 2004), illetve nagyobb az esélye bizonyos betegségek előfordulásának (BASKA 2005).

A hőmérséklethez hasonlóan, a víz pH értéke a másik fontos tényező a halak optimális tartási körülményeinek, a stabil vízkémiai paraméterek, és a normális baktériumflóra kialakításában. Laboratóriumi körülmények között a zebradániók pH tolerancia tartományát nem tesztelték. A haltartó rendszerekben a víz pH értékét a természetes élőhelyükön mérhető értékekhez igazították. Az általánosan használt érték a 7-8 közötti pH (MASSER et al. 1999).

A víz oldott iontartalma és összetétele szintén fontos tényező a különböző életfolyamatok megfelelő működéséhez, többek között a petefészek megfelelő működéséhez, és az ivarsejtek termelődéséhez (WURTS 1993; BRAND et al. 2002). A megfelelő értéket nitrát és foszformentes tengeri só adagolásával érik el. A kívánatos érték 500-700 μS között van (SAWANT et al. 2001).

A zebradánió oxigénigényéről kevés adat áll rendelkezésre. A természetes élőhelyein az alacsony oxigéntartalmú élőhelyeken is megtalálható, laborkörülmények között a recirkulációs rendszerekben átfolyó víz mindig szállít elegendő oxigént a halak számára. Oxigénhiányos állapot csak kivételes esetekben, a rendszer hosszú ideig tartó leállásakor fordulhat elő, melyet megfelelő telepítési sűrűséggel el lehet kerülni (OBENSCHAIN és SILLITTI 2008).

2.11.3.2 Takarmányozás

Az etetés a tartási körülmények mellett a másik fontos paraméter, amely alapvetően befolyásolja a gamétaképződést, és hat az immunrendszer működésére is. A megfelelő mennyiségű és minőségű táplálék kompenzálni tudja a kisebb, az optimális körülményektől eltérő tartásmód okozta fejlődésbeli lemaradást is (LEE et al. 2000).

A különböző korosztályú halak eltérő mennyiségű és minőségű táplálékot igényelnek. Az takarmányozás alapja a jó minőségű haltáp, amelynek az adott korosztály számára megfelelő méretűnek és összetételűnek kell lennie (WATANABE 1982; TOCHER et al. 2001). A táp mellett rendszeres élőeleség kiegészítést is kell nyújtani a halak számára, amely tíz napos kortól frissen kelt sórák (*Artemia salina*) lárva, előtte papucsállatka (*Paramecium sp.*), vagy fonálféreg (*Turbatrix aceti, Panagrellus sp., Caenorhabditis elegans*) lehet.

A zebradániók etetése kétféle irányelv, egyfelől a jóllakatás szerinti "öt perces szabály", vagy a testtömeggel arányos etetési elv szerint történik, melyek közül az utóbbi az elterjedtebb laboratóriumi körülmények között, mivel a halak egyöntetűbben fejlődnek, és kevesebb a pazarlás (BRYANT és MATTY 1980; 1981). A már táplálkozó ivadékoknál a kezdeti időkben a testtömeg 50-300%-át kitevő tápot ajánlott napi több részletben a halak medencéjébe juttatni. A bejuttatott takarmánymennyiséget és az etetések számát a halak növekedése során folyamatosan csökkentik, a felnőtt halak a testtömeg 1-10%-át kapják tápból, napi kétszeri etetés mellett (PULLIN és LOWE-MCCONNELL 1982).

2.11.3.3 Szaporítás

A zebradániók laboratóriumi szaporítása a természetben élő egyedek ívási szokásainak megfigyelésén alapul.

A legtöbb zebradániós laborban speciális szaporítóedényekben történik az ívatás. Ezek az edények körülbelül 1 literes térfogattal rendelkeznek, és két egymásba illeszthető edényből állnak, melyből a belső edény alja lyuggatott. A belső edény szerepe az ikrák megóvásában van, mivel a zebradánió szülők az ívás után a lerakott ikrákat elfogyasztják.

A halakat párban (1 ikrás és 1 tejes), vagy kis csoportokban (2 ikrás és 3 tejes) rakják ki a tartóvizüket tartalmazó szaporítóedényekbe az ívást megelőző nap délutánján. A halak ívási kedve műnövény behelyezésével, vagy a szaporítóedény vizének desztillált vízzel történő hígításával fokozható.

A zebradániók ívását erősen befolyásolja a fotoperiódus. A természetben és laboratóriumi körülmények között is a napkelte/világítás bekapcsolása utáni első pár órában történik az ívás (SELMAN et al. 1993; SPENCE et al. 2006). Bár az ikrások képesek arra, hogy akár naponta adjanak kisebb mennyiségű ikrát, ugyanannak a csoportnak a szaporítása nagyjából heti rendszerességgel történik, egy-egy anyától 100-200 ikraszem leadása várható. A termékenyített ikrából standard körülmények között 3 nap alatt kelnek ki a lárvák, és további 2 nap szükséges az elúszásukhoz. A halak 3 hónapos korukban érik el az ivarérettségüket.

3.1 A kísérletek helyszínei

Kísérleteim helyszínei a gödöllői Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékének és Regionális Tudásközpontjának, valamint a Karlsruhe Institute of Technology, Institute of Toxciology and Genetics (KIT, ITG, korábbi nevén Forschungszentrum Karlsruhe, Németország) laboratóriumai voltak.

3.2 Kísérleti állatok tartása

Kísérleteimet zebradánió halfajon végeztem, kihasználva a faj kínálta nagyszámú mutáns és transzgenikus vonal nyújtotta lehetőséget. A halakat az alábbi körülmények között tartottam:

KIT: A kísérleti állomány tartása, külön haltartó szobákban, AquaSchwarz recirkulációs rendszerben, 10 literes medencékben történt. Egy-egy medencében 15 ikrás és 15 tejes ivarérett egyed került elhelyezésre, az állatokat hetenként szaporították.

A recirkulációs rendszer állandó 27,5 °C-os vízhőmérsékletet tartott fenn. A halak számára fényprogram biztosította a 14 órás nappali megvilágítást, és a 10 órás éjszakai időszakot.

A kifejlett állatokat naponta kétszer etették lemezes haltáppal (Tetra Min), és hetente kétszer kiegészítésként frissen kelt sórák lárvát kaptak. Az állatokat szakképzett technikusok gondozták. A kísérleteimhez felhasznált halakat párban (1 ikrás és 1 tejes) szaporítottam, speciális 1 literes szaporítóedényekben.

SzIE: A kísérleti állomány tartása, külön haltartó szobában, Tecniplast ZebTEC recirkulációs rendszerben, 3 literes medencékben történt. Egy-egy medencében 25 ivarérett egyed került elhelyezésre ivar szerint szétválogatva. Az állatokat hetenként szaporítottam.

A recirkulációs rendszer állandó 27,5°C-os vízhőmérsékletet tartott fenn. A halak számára fényprogram biztosította a 14 órás nappali megvilágítást, és a 10 órás éjszakai időszakot.

A kifejlett állatokat naponta kétszer etettem granulált haltáppal (SDS), amit hetenként kétszer frissen kelt sórák lárvával egészítettem ki. Az ivadékok az elúszásuk után napi

39

háromszor kaptak haltápot, majd a tizedik naptól naponta kaptak artémia kiegészítést. A halakat páronként szaporítottam (1 ikrás és 1 tejes) 1 literes szaporítóedényekben.

3.3 A kísérletekben használt zebradánió vonalak jellemzése

AB: Vad típusú, rövidúszójú vonal, az állomány a Streisinger György által használt halak utódaiból áll. A vonalat több különböző speciális keresztezési eljárás révén mentesítették a letális mutációktól, így kifejezetten alkalmassá vált a különböző laboratóriumi vizsgálatokhoz. A transzplantációs kísérletekben az ikrásokat minden esetben recipiensként, a szaporítási kísérletekben a tejeseket keresztezési partnerként használtam.

Gold (*gol^{b1}*): A zebradánió *gold* mutáns egyedeiben a melanofórák átlagban kisebbek, és halványabbak, illetve átlátszóak, kevesebb melanoszómát tartalmaznak a vad típusú egyedekhez képest (LAMASON et al. 2005). A mutáció miatt a bőr rózsaszínes, a fajra jellemző hosszanti csíkok halványak. Erős megvilágításban a belső szervek áttetszenek a hasfalon és a bőrön keresztül. A vonalat a transzplantációs kísérletekben minden esetben recipiensként használtam.

β-actin: YFP: Ezt a transzgenikus zebradánió vonalat az KIT, ITG bocsátotta rendelkezésemre és minden esetben donorként használtam a kísérletek során. A vonalat 4,7 kb ponty β-actin promóter régiójához (ALAM et al. 1996; HWANG et al. 2003) kapcsolt YFP gént kódoló fragment (β-actin: YFP) és a zebradánió acetilkolin-észteráztól downstream (5xuas:achE) elhelyezkedő 5 upstream élesztő aktivátor szekvenciát kódoló DNS fragment (BEHRA et al., 2002) koinjektálásával hozták létre. Az injektálóoldatban a fragmentek koncentrációja 50 ng/µl volt. Az injektált oldat mennyisége 2-5 nl volt embrióként.

A transzgenikus állatokban a transzgén aktivitása fluoreszcens mikroszkóp alatt könnyen megfigyelhető *in vivo* is. A transzgenikus lárváknál az YFP aktivitás elsősorban a vázizomban jelenik meg, de aktivitást mutat a bőrben és mozaikosan más szervekben is. Felnőtt állatokban ugyanezeken a területeken expresszál a transzgén, valamint a petesejtekben is megfigyelhető nagy mértékű aktivitása. Ez utóbbi tulajdonság tette kifejezetten alkalmassá a vonalat a markerként történő felhasználásra a transzplantációs kísérletek során.

A második transzgén aktivitását ebben a vonalban nem sikerült azonosítani.

Az AB és a β -actin:YFP vonal különböző fejlődési állapotú follikulusairól készült referencia-képeket az M2 melléklet tartalmazza.

3.4 Felhasznált anyagok

A kísérletekben szereplő oldatok és pufferek összetétele az M3 mellékletben található.

3.5 Petesejtek átmérőjének meghatározása

A petesejtek átmérőjének meghatározásához két módszert alkalmaztam. Az első módszernél a kiműtött petefészket 4%-os formalinban fixáltam. Ezt követően mikroszkópba szerelhető okulármikrométer segítségével meghatároztam a benne található follikulusok átmérőit.

A második módszernél az izolált follikulusokról fényképeket készítettem. A pontos méretet fényképről, Image J program segítségével határoztam meg (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, USA).

3.6 Oocyták gyűjtése

Az ivarérett donor anyákat (β -actin:yfp) MESAB oldattal túlaltattam, majd kiműtöttem a petefészküket. A kiműtött petefészkeket néhány percre mPBS oldatot tartalmazó Petri-csészébe helyeztem, majd egy műanyag Pasteur-pipetta segítségével szuszpendáltam addig, amíg a follikulusok elkülönültek egymástól. Okulármikrométerrel felszerelt sztereómikroszkóp alatt válogattam össze azokat a follikulusokat, amelyek átmérője 50 és 150 µm között volt. A megfelelő follikulusokat Holtfretter vagy Zebrafish Ringer oldatba helyeztem majd szobahőmérsékleten tartottam a transzplantálásig, illetve a mikroinjektálásig (maximum 30-60 percig).

3.7 A recipiens anyák előkészítése és a petesejtek átültetése

A recipiens (AB, vagy *gold*) anyákat a kísérlet napján szaporítottam. Csak azok az anyák vehettek részt a kísérletben, amelyek legalább 50 ikraszemet adtak. A szaporítás után az anyákat MESAB oldattal elaltattam, majd Holtfretter vagy Zebrafish Ringer oldattal kétszer kimostam a petefészküket. A transzplantáció előtt az ivarnyílás környékét 70%-os etil-alkohollal fertőtlenítettem.

A transzplantációhoz speciálisan módosított pipettahegyet használtam, melyet a következőképpen készítettem: egy 200 µl-es pipettahegyet visszavágtam és egy 7-8 cm

hosszú 1,2 mm külső, 0,65 mm belső átmérőjű, tompa végű üvegkapillárist helyeztem bele, majd láng felett a kapilláris köré olvasztottam a pipettahegyet (3. ábra).



3. ábra Az átültetéseknél használt módosított pipettahegyek

A follikulusokat automata pipetta segítségével a preparált pipettahegybe szívtam, majd a kapillárist óvatosan az anyák petefészkébe vezettem, az ivarnyíláson keresztül (4. ábra). Egyegy alkalommal, 25-30 µl oldattal 25-100 follikulust juttattam az anyák petefészkébe. A transzplantáció folyamata néhány másodpercet vett igénybe anyánként. Az anyák rögzítését kézzel oldottam meg nedves papírtörlőn, az állatokat finoman az ujjaim között tartva. A pipettahegyet minden transzplantálás előtt alkohollal fertőtlenítettem.

Az anyákat a beültetés után, miután magukhoz tértek az altatásból, egy napig egyesével különválasztva tartottam, majd közös medencébe helyeztem őket a következő vizsgálatig.



4. ábra. A beültetés folyamata.

Az anyák rögzítését kézzel oldottam meg nedves papírtörlőn, az állatokat finoman az ujjaim között tartva.

3.8 In situ hibridizációs vizsgálatok

Az *in situ* hibridizációs vizsgálatokat a HAUPTMANN (1999) által leírt standard protokoll szerint végeztem, a permeabilizációs lépés kihagyásával.

A recipiens anyákat MESAB oldattal túlaltattam, a petefészküket kiműtöttem és egy éjszakán keresztül BT-Fix oldatban 4 °C–on fixáltam, majd 100%-os metanolba helyeztem és -20 °C-on tároltam a felhasználásig.

A következő lépésként a petefészkeket leszálló metanol sorozatba raktam (75%, 50%, 25%) oldatonként öt percig 65 °C-os vízfürdőben, a metanolt PTW-vel hígítottam. A minták rehidratálása után a petefészkeket kétszer öt percig PTW-vel mostam át. A mosás után a mintákat 1:500 végkoncentrációjú RNS próbában inkubáltam 65 °C-on egy éjszakán keresztül. A YFP mRNS antiszensz próba létrehozása in vitro transzkripcióval történt pUT+ vektorba épített EYFP-t kódoló fragment reverz száláról.

A következő napon a mintákat 65 °C-on több lépésben átmostam. Első lépésként kétszer 30 percig 50% formamide 50% 2x SSC; 0,1% Tween 20 oldattal, egyszer 15 percig 2x SSC; 0,1% Tween 20 oldattal, majd kétszer, 30 percig 0,2x SSC; 0,1% Tween20 oldattal. Következő lépésként 5 perces blocking puffer-es mosás után az oldatot kicseréltem és a mintákat 3 órán keresztül szobahőmérsékleten tároltam. Utolsó lépésként a mintákat egy éjszakán keresztül 1:4000 végkoncentrációjú DIG ellenanyagoz konjugált alkálikus foszfatáz enzim oldatában inkubáltam 4 °C-on.

A harmadik napon a mintákat PTW oldattal átöblítettem, ezután PTW oldattal hatszor átmostam, mosásonként 15 percig, majd festő puffer-ben inkubáltam őket kétszer 5 percig. A festő puffer-ból festő oldatba helyeztem át a petefészkeket. A mintákat sűrű ellenőrzés mellett sötét helyen tartottam, a megfelelő mértékű festődés után a reakciót BT-fix oldattal állítottam le, majd a mintákat, 2-szeres és 10-szeres nagyításon lefényképeztem.

3.9 Mikroszatellit analízis

A feltételezhetően transzplantált follikulusból származó nemtáplálkozó lárvákból, illetve a féltestvéreikből a teljes egyedeket, a donor és a recipens anyából, valamint a szaporításnál használt tejesből vett úszómintát -20°C-on, 96%-os etanolban tároltam a felhasználásig.

A mintákat SET pufferben 0,5 µg/ml Proteinase K enzim (Sigma P-6556) hozzáadásával egy éjszakán keresztül 55°C-on rázatva emésztettem. A DNS-t fenolkloroformos tisztítási eljárással izoláltam (SAMBROOK et al. 1989), majd 1/10 térfogat Naacetátot (pH 7,2), és 2,5 térfogat -20°C-os 96%-os etanolt adtam hozzá. Ezt követően -20°Con egy éjszakán keresztül inkubáltam, majd 15 percig centrifugáltam (15000rpm). A csapadékot 1 ml 70%-os etanollal kétszer átmostam, szobahőmérsékleten kiszárítottam, majd 100 µl 1x TBE pufferben oldottam fel, és 10µl ribonukleáz-A oldat hozzáadása után 30 percig 37°C-on inkubáltam. Az izolált DNS koncentrációjának és tisztaságának meghatározásához fotométerrel 260 és 280 nm-en mértem az oldat abszorbanciáját (NanoPhotometer, IMPLEN, Germany). A mérések alapján a DNS koncentrációját 10ng/µl-re állítottam be.

Az analízishez kromoszómánként két (karonként egy) mikroszatellitet választottam ki (összesen 50db, a mikroszatellitek adatait az M4 melléklet tartalmazza) az Ensembl genom adatbázisból (http://www.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Index), amelyeket a szülő generációból származó egyedeken teszteltem. A tejes, a donor és a recipiens ikrás elkülönítésére alkalmas mintázatot mutató mikroszatellitekkel vizsgáltam a feltételezhetően transzplantált oocytából származó egyedeket és féltestvéreiket. Az utódok vizsgálatára használt mikroszatellitek adatai a 4. táblázat foglalja össze.

Marker	Pozíció a genomban			E primer	F	R primer	R	termék
neve	kr	СМ	bp	. p	hossz		hossz	
G41751	9	23,5	3189495	ATTGTGCCTTGAGTGAGGCT	20	GAGGTGACTGCAACCGATTT	20	117-251
G39758	9	80,7	49740810	TTGAGCTGTGAACAAGCCAC	20	CCTCTTCATCTGGCATCCAT	20	101-159
G40279	10	81,3	35313739	CCGCAGTGTCAGCAGAAAT	19	GCGCTCTTGTTTGACCTTTC	20	97-160
G41760	11	36,8	9285133	ACCAACCCTGAGGGAGTTTT	20	CCTTGCTACCGCTATGAATG	20	111-149
G41652	16	71,9	45196237	CTGGCACTGTGGTTACCATG	20	AGCTGTGCTTGTGATGAACG	20	131-173
G40108	17	40,9	23397277	CCTCTTCCCACAAGTCCATT	20	TTCCCAATTAAAGCAAACGC	20	91-207
G40542	18	64,2	43897912	GAAACCCGTGAAGGTTTGAA	20	CTTGAACAGAGCAGAGTTCAGA	22	153-217
G40446	21	123,7	43639841	TTACTCTGTCTGCGGACACC	20	GCCGTGGTGCAATAGGTAGT	20	80-148

4. táblázat A felhasznált, elkülönítésre alkalmas mikroszatellit primerek adatai

A PCR reakció összetétele a következő volt mintánként: 2,5 µl polimeráz reakció puffer, 1,5mmol MgCl₂, 800 nmol dezoxyribonucleotide trifoszfát (dNTP), 1 egység Ampli

Taq Gold DNS polymerase (Applied Biosystems, Foster City, California), 300 pmol forward (F) és reverse (R) oligo nukleotid, 40 ng templát DNS és ultratiszta víz, 25µl végtérfogatban.

A reakció körülményeit ABI 2720 thermal cycler (Applied Biosystems) biztosította. Az alkalmazott hőmérsékleti profil, az alábbi volt:

Elődenaturáció 94°C-on, 10 perc; 94°C, majd 15 másodperc; 57°C, 60 másodperc, 72°C, 120 másodperc, 3 ciklusban ismételve, utána 42 ciklus 94°C, 15 másodperc; 57°C, 20 másodperc; 72°C, 40 másodperc, majd végső lánchosszabítás 72°C, 5 perc. A mintákat etidium bromidot tartalmazó 4%-os agaróz gélen futtattam. A kapott fragmentmintázatot InGenius géldokumentációs rendszerrel dokumentáltam (Syngene, UK), majd elemeztem a mintázatot.

3.10 Az oocyta injektálásnál használt konstrukciók előállítása és az injektálás menete

A mikroinjektálás során *DsRed* mRNS-t, *pβ-actin:LacZ* és p*CMV:GFP* konstrukciókat juttattam *β-actin:YFP* és AB anyáktól származó oocytákba. A konstrukciókat a következőképpen állítottam elő:

A *DsRed* mRNS-t pCS2+ *DsRed* plazmidról Message Machine mRNS kit (Ambion, TX, USA) segítségével készült, 5 μl 10%-os fenolvörös hozzáadásával 10 μl végső mennyiségben a kitben szereplő protokoll alapján.

A p β -aktin:LacZ és a pCMV:GFP génkonstrukciókat tartalmazó kész injektáló-oldatokat Müller Ferenc (KIT, ITG) bocsátotta rendelkezésemre. Mindkét konstrukció bizonyítottan működöképes zebradánióban és a riporterfehérje az egyed összes sejtjében kifejeződik (WILLIAMS et al. 1996; MÜLLER et al. 2000). A *lacZ* gént tartalmazó konstrukciót kontroll konstrukciónak használtam, mivel az erről átíródó fehérje fluoreszcens mikroszkóp segítségével közvetlenül nem mutatható ki. A konstrukció használatával azt szerettem volna igazolni, hogy önmagában sem egy DNS konstrukció injektálása, sem maga az injektálási technika nem okoz fluoreszcens jelet a manipulált petesejtben.

Az injektálás során szükség volt a follikulusok helyzetének fixálására. Ennek eléréséhez 5 cm átmérőjű műanyag Petri-csészékbe 2%-os agaróz gélt öntöttem, majd egy szike segítségével 2 mm mély árkot metszettem bele úgy, hogy az árok egyik fala függőleges legyen, a másik fala pedig 25-30°-os szöget zárjon be vele. A Petri-csészét zebrafish Ringer oldattal töltöttem fel, majd belehelyeztem a follikulusokat. Az árokban a follikulusok egymás mellett, takarás nélkül, egy sorban helyezkedtek el az injektálás alatt.

45

Az injektálás mikroinjektor (Tritech Research, USA) és előre gyártott üvegkapilláris (Cat# 5242 952.008, Eppendorf Germany) segítségével, sztereómikroszkóp alatt, szabad kézzel történt. Ezzel a módszerrel percenként átlagosan 10 follikulust sikerült injektálni. Egy oocytába 1-2 nl injektáló oldat került.

A teljes folyamat az anyák altatásától a recipiens anyák tartómedencébe helyezéséig átlagosan 2-2,5 órát vett igénybe 20 anya transzplantálása esetén.

3.11 Alkalmazott statisztikai módszerek

A vizsgálatok eredményeit SPSS 13.0 for Windows programmal értékeltem ki. A petefejlődés dinamikájának vizsgálatakor ANOVA, (P<0,05), a Test of Homogeny eredményétől függően Tukey, illetve Dunnet's tesztet alkalmaztam (4.1-es fejezet). A follikulusok beépülésének vizsgálatakor (4.2-es és 4.3 –as fejezet) (P \leq 0.05) Kruskal-Wallis teszttel elemeztem az eredményeket.

3.12 Állatvédelem

Munkám során végig törekedtem arra, hogy a kísérletben résztvevő halak számát a minimálisra csökkentsem, illetve a beavatkozásokkal a lehető legkevesebb szenvedést okozzam az állatoknak. A halak számára végig biztosítottam az optimális tartási körülményeket.

A transzplantációs kísérletek végzésére a SzIE Halgazdálkodási Tanszéke 2013. április 2-ig érvényes hatósági engedéllyel rendelkezik (Iktatószám: 22.1/518/003/2008).

3.13 Tudományos kísérletek

3.13.1 A petesejtfejlődés dinamikájának vizsgálata

A vizsgálathoz 50 AB anyát szaporítottam és 10-es csoportokban visszahelyeztem őket a tartómedencékbe. A szaporítás után közvetlenül, és a következő négy hétben hetenként egy-egy csoport egyedeit túlaltattam. A halak testtömegét lemértem, ezután kiműtöttem a petefészküket. A petefészkek tömegét szintén lemértem, majd 4%-os formalin oldatban fixáltam őket. A fixált petefészkekben mikroszkóp alatt, okulármikrométer segítségével meghatároztam a petesejtek átmérőjét, majd ebből az egyes fejlődési stádiumok arányát a petefészkekben. A testtömegből és a petefészektömegből GSI% értéket számoltam.

3.13.2 Transzplantált follikulusok kimutatása és beépülésének vizsgálata a recipens petefészekből

A kísérletek során 5 AB és 5 gold anya petefészkébe transzplantáltam 20-25 transzgenikus follikulust.

A recipiens AB anyák petefészkét, a beültetést követő negyedik napon, a halak túlaltatása után kiműtöttem majd normál, illetve fluoreszcens mikroszkóp alatt felvételeket készítettem róluk. A petefészkeket BT-Fix-ben fixáltam, majd a fixált szövetben *in situ* hibridizációval (ISH) mutattam ki a transzgenikus follikulusokat. A festődött oocytákról sztereómikroszkóp alatt normál megvilágítás mellett fényképeket készítettem.

A recipiens *gold* ikrásokat a beültetést követő második napon MESAB oldattal elaltattam, majd a beültetett follikulusokról, az állatok felvágása nélkül, a hasfalon keresztül készítettem normál megvilágítású és fluoreszcens képeket.

3.13.3 A follikulus-beépülés hatékonyságának vizsgálata

A kísérlet során 100 AB anya petefészkébe egyedenként 20-40 transzgenikus follikulust ültettem be, majd az anyákat a transzplantátumok száma szerint csoportosítva visszahelyeztem a tartómedencékbe. A beültetést követő első hét minden napján, illetve a 14.

napon vizsgáltam fluoreszcens mikroszkóp alatt a kiműtött petefészkekben található transzgenikus follikulusok számát. Az egyes mintavételi időpontokban vizsgált anyák, illetve a petefészkükbe ültetett follikulusok számát az 5. táblázat tartalmazza.

A transzplantáció után	Vizsgált recipiens anyák száma /
eltelt napok száma	beültetett follikulusok száma
1	8x20
	8x25
2	8x25
	5x30
3	5x20
	5x25
	5x30
4	8x25
	5x30
5	4x25
	4x30
6	6x25
	3x30
7	5x30
	5x40
14	5x30
	5x40

5. táblázat A follikulus-beépülés hatékonyságvizsgálatánál használt kísérleti beállítás összefoglaló táblázata

3.13.4 Transzplantált follikulusok növekedésének kimutatása a recipiens petefészekből

20 recipiens anyába egy alkalommal átlagosan 50 db I-es stádiumú follikulust transzplantáltam. A transzplantáció előtt a follikulusokat lefényképeztem és Image J program segítségével meghatároztam a pontos méretüket. A manipulált petefészkeket 1-2 héttel a transzplantáció után fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltam, a transzgenikus follikulusokat izoláltam, fényképeket készítettem róluk és Image J program segítségével meghatároztam a pontos méretüket.

3.13.5 Szaporítási kísérletek

A kísérlet során 100 AB anya petefészkébe egyedenként átlagosan 100 transzgenikus follikulust ültettem be. A recipiens anyákat ezután egyesével visszahelyeztem a tartómedencékbe, majd 6 héten keresztül hetenként szaporítottam őket. A lerakott ikrákat a termékenyülést követő 24. és 48. órában fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltam, az UV fény alatt világító, feltehetően transzgenikus oocytából származó ivadékokat különválasztottam, majd tíz napos korban normál és fluoreszcens megvilágításban fényképeket készítettem róluk. A kísérletben résztvevő egyedekből a mikroszatellit analizísnél leírtam szerint mintát vettem a rokonsági fokok megállapítása érdekében.

3.13.6 Oocyta mikromanipuláció

Az mRNS injektálásához transzgenikus, a DNS konstrukciók injektálásához AB anyák petefészkéből gyűjtöttem I. és II. stádiumú follikulusokat. A follikulusokat zebrafish Ringer oldatban tartottam a manipulációk alatt.

A mikroinjektálás DsRedmRNS, p β -actin:LacZ és pCMV:GFP konstrukciókkal történt.

A *DsRed*mRNS-sel injektált oocytákat tartalmazó follikulusokat AB anyákba ültettem, és 24 órás inkubációs idő után a petefészküket kiműtöttem, majd fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltam a follikulusokat, és összegyűjtöttem a piros és a sárga fénnyel világítókat. A follikulusokról fényképeket készítettem.

A p β -actin:LacZ és pCMV:GFP-vel injektált oocytákat 24 órán keresztül 27,5 °C-on inkubáltam zebrafish Ringer oldatban. Az inkubációs idő leteltével a fluoreszcens fényben zölden izzó follikulusokról fényképfelvételek készültek.

49

EREDMÉNYEK

4 EREDMÉNYEK

4.1 A petesejtfejlődés-dinamika vizsgálatának eredményei

A transzplantációs kísérletek tervezéséhez szükséges alapinformációk megszerzése érdekében, meg kellett becsülnöm a petefészek follikulus tartalmát és a növekedési ütemüket. A kísérletben 50 ivarérett AB anya petefészkét vizsgáltam közvetlenül a szaporítás után, majd az azt követő 4 hétben (10-10 egyed/hét). Minden egyednél GSI értéket számoltam, és meghatároztam az adott időpontban a petefészekben megtalálható eltérő fejlettségi állapotú follikulusok egymáshoz viszonyított %-os arányát.

A GSI vizsgálat eredményeit az 5. ábra tartalmazza. Az ábrán jól látszik, hogy közvetlenül a szaporítás után (0. hét) a legkisebb a GSI értéke (6,8%), majd a második hétre, a kiindulási értékhez képest közel háromszorosára növekszik (18,4%). Statisztikailag igazolható különbséget (P<0,05) csak az első három mintavétel alkalmával számított GSI értékek között sikerült kimutatni. A második héttől kezdve eltérést, a harmadik héten tapasztalt enyhe csökkenés ellenére statisztikailag nem tudtam igazolni (P<0,05).



5. ábra GSI változása a szaporítás után. A különböző betűjelek statisztikailag igazolható különbséget jelölnek (n=10 hal/hét, one way ANOVA, P<0,05).

A petefészekmintákban számolt különböző fejlettségű follikulusok gyakoriságának összesített eredményeit az M5 és az M6 melléklet tartalmazza, a stádiumokra szétbontott részeredményeket a 6-10. ábra tartalmazza. Mivel a formalinos fixálás miatt az egyes fejlődési állapotokra jellemző vizuálisan megfigyelhető jelek eltűntek a follikulusokból, a különböző stádiumokba történő besorolást kizárólag a Selman-féle méretskála szerint végeztem (SELMAN et al. 1993).



6. ábra A petefészekmintákban (n=10 hal/hét) számolt I. fejlődési stádiumú follikulusok gyakorisága az idő függvényében (ANOVA, P>0,05).

A vizsgálatok során az elsődleges növekedés fázisában lévő follikulusok csoportjába a maximum 140 μm átmérőjű follikulusokat soroltam, a csoportot nem bontottam szét prefollikulus és follikulus fázisokra (6. ábra).

Az ábrán jól látszik, hogy az I. stádiumban lévő follikulusok százalékos aránya nagyon magas a petefészekben, a kísérlet ideje alatt végig 60% körüli értéket mutatott. A szaporítástól a második heti vizsgálatig a számuk enyhén emelkedett az összes follikulus számához képest, majd a negyedik hét végére a szaporítás után mért érték alá csökkent. Statisztikailag igazolható különbséget nem sikerült kimutatni az egyes hetek eredményei között (P<0,05).



7. ábra A petefészekmintákban (n=10 hal/hét) számolt II. fejlődési stádiumú follikulusok gyakorisága az idő függvényében (ANOVA, P>0,05).

A kortikális alveolus stádiumban lévő follikulusok csoportjában a 140-340 μ m átmérőjű follikulusokat soroltam (7. ábra). A II. stádiumú follikulusok részaránya 20-25% körül mozgott a vizsgálati idő alatt, közvetlenül a szaporítás után fordult elő legnagyobb mennyiségben (26,37%) a petefészkekben. Statisztikailag igazolható különbséget nem sikerült kimutatni az egyes mintavételi időpontok értékei között (P<0,05).



8. ábra A petefészekmintákban (n=10 hal/hét) számolt III. fejlődési stádiumú follikulusok gyakorisága az idő függvényében. A különböző betűjelek statisztikailag igazolható különbséget jelölnek (ANOVA, P<0,05)

A vitellogenezis stádiumában lévő follikulusok csoportjához a 340-690 μm átmérőjű follikulusokat soroltam (8. ábra). Annak ellenére, hogy ez a legnagyobb mérettartományú csoport, a petefészekben a részaránya az összes follikulushoz képest csak 10% körül mozgott. Statisztikailag igazolható különbséget csak a második és a negyedik héten vizsgált minták között tudtam kimutatni (P<0,05).



9. ábra A petefészekmintákban (n=10 hal/hét) számolt IV. fejlődési stádiumú follikulusok gyakorisága az idő függvényében. A különböző betűjelek statisztikailag igazolható különbséget jelölnek (ANOVA, P<0,05)

A IV (maturáció) stádiumában lévő follikulusokhoz soroltam az összes 690-730 μ m közötti follikulust (9. ábra). Ennek a csoportnak a részaránya a legkisebb a petefészekben az összes follikulushoz mérten (kevesebb, mint 1,5%). A IV. stádiumú follikulusok száma közvetlenül a szaporítás után volt a legkevesebb (0,3%), ez statisztikailag igazolhatóan eltért, a negyedik hét kivételével, a többi mintavételkor mért eredménytől (P<0,05). A második héttől statisztikailag igazolható különbséget nem sikerült kimutatni (P<0,05).



10. ábra A petefészekmintákban (n=10 hal/hét) számolt V. fejlődési stádiumú follikulusok gyakorisága az idő függvényében. A különböző betűjelek statisztikailag igazolható különbséget jelölnek (ANOVA, P<0,05)

Az V. stádiumú (érett ikra) csoportba soroltam az összes 730 μm-nél nagyobb follikulust függetlenül attól, hogy valóban ovulált ikraszemként volt-e jelen a petefészekben (10. ábra). A csoport aránya folyamatosan növekedett a petefészekben az idő előrehaladtával. Közvetlenül az ívás után lényegében az összes ikra kiürült a petefészkekből, így szinte nem is volt kimutatható mennyiség belőlük a mintákban (0,12%), a negyedik hét végére a számuk elérte az 5,7%-ot, ennek egy része valószínűleg atretizálódott ikraszem volt. A szaporítás utáni és a negyedik heti előfordulások statisztikailag igazolhatóan különböztek az elsőtől a harmadik hétig vizsgált időpontok értékeitől (P<0,05).

4.2 Transzplantált follikulusok kimutatása és beépülése, eredmények

A transzplantált AB anyák petefészkében a donor follikulusok kimutatására és életképességének igazolására normál és fluoreszcens mikroszkópos (YFP szűrő), illetve in situ hibridizációs vizsgálatokat végeztem a beültetést követő negyedik napon. Negatív

EREDMÉNYEK

kontrollnak normál AB anyák, pozitív kontrollnak β -actin: YFP transzgenikus anyák petefészkét használtam. A petefészkekről készült felvételeket a 11. ábra tartalmazza.

Normál megvilágítás mellett a petefészkek között nem figyelhető meg különbség. Fluoreszcens fényben, YFP szűrőt használva, a transzgenikus petefészek összes follikulusa sárgás-zöld fényben izzott, a recipiens petefészekben csak néhány, a transzplantáció során bejuttatott donor follikulus mutatta a markergén aktivitást. A transzgén mRNS-ének jelenléte is kimutatható volt mind a pozitív kontroll transzgenikus petefészekben, mind a recipiens petefészek donor follikulusaiban *in situ* hibridizáció segítségével.



11. ábra Transzplantált follikulusok kimutatása a recipiens petefészekből I.

A kísérletben a transzplantált I-es stádiumú follikulusok jelenlétét vizsgáltam a nem transzgenikus, recipiens petefészekben. Az ábra normál fényben (bal oldali oszlop), YFP szűrővel (középső oszlop) és az in situ hibridizáció után készült (jobb oldali oszlop) felvételeket tartalmazza. A transzgenikus donor follikulusok (alsó sor) sárgás-zölden világítanak a fluoreszcens felvételen, és sötétlilák az in situ hibridizáció után készült képen, hasonlóan a transzgenikus petefészek saját follikulusaihoz (középső sor). A negatív kontroll petefészekben (felső sor) ezek a markerek nem figyelhetőek meg. A nyilak a transzplantált follikulusokat jelölik. Méret skála = 300 µm.

A kísérlet második részében a beültetett follikulusok *in vivo* kimutatásának lehetőségét vizsgáltam melanofóra mutáns (*gold*) anyákon. A donor petesejtek egy részének fluoreszcens

izzását a *gold* anyák petefészkében is sikerült megfigyelni az állatok hasfalán keresztül (12. ábra).



12. ábra Transzplantált follikulusok kimutatása a recipiens petefészekből II.

A kísérletben a transzplantált follikulusok kimutatásának lehetőségét vizsgáltam élő, elaltatott állatokon a beültetést követő második napon. A bejuttatott transzgenikus petesejtek jól láthatóan fluoreszkálnak a recipiens *gold* anya hasfalán keresztül (alsó sor). A kontroll anya petefészkében (felső sor) nem figyelhető meg ilyen izzás. A sematikus ábra a látómezőt mutatja az állaton. Méret skála= 1 mm.

4.3 Eredmények a follikulus-beépülés hatékonyságáról

A beültetett petesejtek kimutatási lehetőségeinek vizsgálata után a donor follikulusok beépülésének hatékonyságát vizsgáltam. Az eredményeket a 6. táblázat foglalja össze.

A táblázatból jól látszik, hogy a recipiens petefészekben megtalálható donor follikulusok száma a transzplantáció utáni első napon átlagosan közel a felére esett vissza a kiindulási mennyiséghez képest (47,5±20,5%). A donor follikulusok számának csökkenése a kísérlet első hetének végéig folytatódott, a mértéke az egyes napokon, a negyedik és ötödik

nap kivételével, statisztikailag is igazolható volt ($P \le 0,05$), ugyanakkor túlélő, beépült follikulusokat a második hét végén is találtam a recipiens anyák petefészkében (2,6±2,6%).

A transzplantáció után eltelt napok száma	Vizsgált recipiens anyák száma / beültetett follikulusok száma	Beépült oocyták száma átlag ± szórás (%)	
1	8×20 8×25	47.5 ± 20.5 a	
2	8×25 5×30	38.1 ± 12.4 b	
3	5×20 5×25 5×30	20.6 ± 16.4 c	
4	8×25 5×30	12.3 ± 14.5 d	
5	4×25 4×30	11.9 ± 7.5 d	
6	6×25 3×30	5.4 ± 8.9 e	
7	5×30 5×40	2.3 ± 2.7 f	
14	5×30 5×40	2.6 ± 2.6 f	

6. táblázat A transzplantált follikulusok beépülési hatékonysága a recipiens petefészekbe. A különböző betűk a szignifikánsan eltérő értékeket jelölik (P≤0.05, Kruskal-Wallis test)

4.4 Transzplantált follikulusok növekedésének kimutatása, eredmények

A beépülés hatékonyságának vizsgálata után a következő vizsgálatom annak a kérdésnek a megválaszolására irányult, hogy a beépült túlélő follikulusok képesek-e fejlődni is a recipiens petefészekben. Ennek érdekében a beültetett follikulusok méretét összehasonlítottam azokéval, amelyeket egy, illetve két héttel a beültetés után a recipiens petefészekben találtam. A kapott eredményeket az 13. ábra tartalmazza.

Az ábrán jól látszik, hogy a beültetés után a donor follikulusok száma, az előző kísérletnél tapasztaltakhoz hasonlóan, jelentősen csökkent, azonban mindkét vizsgálati időpontban találtam beépült, túlélő petesejteket. A petesejtek egy része nem fejlődött tovább, néhány follikulus mérete azonban meghaladta a beültetés előtt mért legnagyobb follikulus átmérőjét, ezek közül háromnál statisztikailag is sikerült igazolni a növekedést (P \leq 0,05). A három legnagyobb donor follikulus közül egy az első hét végére elérte a Selman- féle

méretskála szerinti III. stádiumot (486μm), egy pedig a második hét végére megközelítette a IV. fejlődési stádium mérethatárát (680μm).



13. ábra A donor follikulusok méreteloszlása a transzplantáció előtt és után a recipiens petefészekben. A csillaggal jelölt értékek olyan follikulusokat jelölnek, amelyeknek mérete statisztikailag különbözik a beültetés előtt mért értékektől (Kruskal-Walis teszt, $P \le 0.05$).

A donor follikulusokról készült képeken (14. ábra) jól megfigyelhető, hogy a beépült és az oogenezisbe újra bekapcsolódó, továbbfejlődő follikulusok épnek, normál fejlődésűnek tűntek. A recipiens petefészekben csak a donor transzgenikus follikulusok izzanak a fluoreszcens megvilágításban, hasonlóan a kontroll follikulusokról készült felvételekhez. Megfigyelhető továbbá, hogy a fejlettebb follikulusok gyengébb fénnyel izzanak, mint a fiatalabb fejlődési stádiumban lévők (a felvételek ugyanazokkal a beállításokkal készültek).

Az egy héttel a beültetés után fényképezett donor follikulus átmérője 260 µm volt, amely a Selman féle méretskála szerint a II. stádiumú kortikális alveolus fejlődési fázisban lévő follikulus méretének felel meg. Erre a fejlődési állapotra az oocyta opálossága és a még megfigyelhető germinális vezikulum a jellemző, melyek a felvételen is jól megfigyelhetőek. A két hétig a recipiens petefészekben fejlődő follikulus mérete 680 µm, a germinális vezikulum már nem figyelhető meg, az oocytában lévő szikszemcsék kezdik elveszteni kristályos szerkezetüket, ezek alapján átmenetet képez a vitellogenezis (III. stádium) és a maturáció (IV. stádium) stádiuma között.



14. ábra Recipiens petefészekből származó, oogenezist folytató transzplantált follikulusok. A donor follikulusokról normál és fluoreszcens fényben készült felvételek láthatóak az ábra A részén. A felső sorban közvetlenül a transzplantáció előtt készült képek, alatta az egy (középső sor), illetve a két héttel (alsó sor) a beültetést követően a recipiens petefészekből izolált, méretükben növekedett follikulusok láthatóak nyíllal jelölve. Az ábra B részén a kontroll transzgenikus és normál follikulusokról készült felvételek láthatóak. Minden kép ugyanazzal a nagyítással, a fluoreszcens felvételek ugyanazzal a záridővel készültek. Méret skála= 300µm.

4.5 A szaporítási kísérletek eredményei

A munkám következő részében arra voltam kíváncsi, hogy a beültetett I.-II. stádiumú follikulusokból nyerhető-e érett, termékenyítésre alkalmas ikra, illetve életképes ivadék. A kísérletben 100 anya petefészkébe ültettem be anyánként 100 follikulust. A recipiens halakat hat héten keresztül hetente szaporítottam vad típusú tejesekkel, majd az utódokat fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltam. Az ellenőrzések során összesen négy YFP aktivitást mutató embriót találtam, amelyek két különböző recipiens anyától származtak. Az egyik recipiens anya utódai között két transzgenikus egyedet találtam a transzplantációt követő harmadik héten. A másik anya utódai közül szintén kettő mutatta a transzgén jelenlétét, viszont itt egy embrió a harmadik, egy a negyedik szaporításból származott. Az utódokról készült fényképeket a 15. ábra tartalmazza. A transzplantált follikulusból származó ivadék a kontrollként használt transzgenikus ivadékhoz hasonlóan sárgás-zöld fényben izzott fluoreszcens megvilágításban, azokon a területeken, amelyeken a transzgén megnyilvánult. Hasonló izzás a recipiens anya saját follikulusaiból származó utódjánál nem figyelhető meg.

Az összes donor follikulusból származó ivadék a korának megfelelő, normál fejlődést mutatott a vizsgálati idő alatt. A négy utódból hármat DNS vizsgálatokhoz használtam fel, egy egyedet pedig felneveltem. A felnevelt ivadék ikrás volt, ivarérése után szaporítottam, utódai normál fejlődést mutattak.



15. ábra Transzplantált follikulusból származó ivadék.

A recipiens ikrás és vad típusú tejes keresztezéséből származó nem transzgenikus ivadék. B transzgenikus (donor) ikrás és vad típusú tejes keresztezésből származó transzgenikus ivadék (pozitív kontroll). C recipiens ikrás és vad típusú tejes keresztezéséből származó, donor follikulusból fejlődött, transzgenikus ivadék. A transzgén (β -actin:yfp) aktivitása jól megfigyelhető a pozitív kontroll, és a donor follikulusból származó ivadék izomzatában, míg a recipiens anyától származó féltestvérében nem.

A képek 10 nappal a termékenyülés után készültek, a teljes ivadékokat a jobb alsó sarkokba beszúrt kis képek mutatják. A képeken szereplő ivadékok a fejlődési állapotuknak megfelelően fejlődtek, morfológiai elváltozások nem figyelhetőek meg rajtuk.

Annak bizonyítására, hogy a transzgenikus ivadék valóban a donor anyából izolált, majd a recipiens anya petefészkébe transzplantált follikulusból származik, mikroszatellit analízissel vizsgáltam a kísérletben résztvevő egyedeket. Összesen 50 az Ensembl zebrafish adatbázisából kiválasztott mikroszatellitet vizsgáltam a donor- és a recipiens ikrástól, a keresztezési partnerként használt tejestől, valamint a donor follikulusból (YFP pozitív) és a recipiens anya saját utódaiból (YFP negatív) származó DNS mintákon. A kiválasztott mikroszatellitek közül 8 marker volt alkalmas a kísérletben résztvevő szülők elkülönítésére és megbízható információt nyújtott az utódok származását illetően. A mikroszatellit vizsgálat eredménye egyértelműen bizonyítja, hogy a transzgenikus ivadék a donor anya és a szaporításnál használt tejes utódja, biztosan nem a recipiens anyától származik (16. ábra).



16. ábra Rokonsági fokok meghatározása mikroszatellit analízissel

A (d \uparrow) transzgenikus, donor ikrás, a (r \uparrow) recipiens, nem transzgenikus ikrás, (\circlearrowleft) a recipiens anya szaporításánál keresztezési partnerként használt tejes, (tr) a donor follikulusból származó, transzgenikus utód, és (ft) a recipiens anya saját follikulusából származó féltestvér utód rokonsági fokának megállapítására készült mikroszatellit analízis eredményeit tartalmazza az ábra. A nyolc, elkülönítésre alkalmas mintázatot adó mikroszatellit marker azonosítási száma a futtatások mellett, jobb oldalt található.

4.6 Az oocyta mikromanipuláció eredményei

A kísérletek során *DsRed* mRNS-t, p β -actin:LacZ és p*CMV:GFP* konstrukciókat jutattam az oocytákba, hogy vizsgáljam manipulálható-e a génmegnyilvánulás az I. és II. stádiumú follikulusokban mikromanipulációval.

A kísérlet első részében *in vitro* szintetizált *DsRed*mRNS injektálása történt meg, hat részletben, összesen 477 I. stádiumú β - *actin:YFP* oocyta citoplazmájába vagy germinális vezikulumába (7. táblázat). Az injektált follikulusokat egy napon át inkubáltam recipiens AB anyák petefészkében, majd a petefészek kiműtése után a donor follikulusokat fluoreszcens mikroszkóp alatt azonosítottam és izoláltam a petefészekből. Az injektált és *DsRed* aktivitást mutató oocytákat fluoreszcens mikroszkóp alatt RFP szűrő segítségével azonosítottam az YFP pozitív follikulusok közül. A nem injektált kontroll, transzplantált follikulusok csak YFP aktivitást mutattak. Az injektált follikulusok közül azok, amelyekben az mRNS-ről termelődött az RFP fehérje pirosan is izzottak a fluoreszcens mikroszkóp alatt (17. ábra). Normál megvilágításban mind az injektált, mind a kontrollként használt follikulusok épnek, a fejlettségi állapotuknak megfelelően néztek ki.



17. ábra mRNS-sel injektált, recipiens anyában (in vivo) inkubált follikulus

Transzgenikus YFP pozitív nem injektált (felső sor), és *DsRed*mRNS-sel injektált follikulusról (alsó sor) készült felvételek láthatók az ábrán. A normál és az YFP szűrővel készült felvételeken nincs különbség a follikulusok között, a RFP szűrővel készült képeken azonban csak az mRNS-sel injektált, az RFP fehérjét tartalmazó follikulus világít. Méret skála = 400µm, a nyilak a sejtmagokat jelölik.

A 477 injektált oocytát tartalmazó follikulusból 58-at sikerült izolálni a recipiens petefészkekből az inkubáció után, melyekből 6 (10,3%) mutatta egyszerre a kétféle markert. A hatékonyság szempontjából az ötödik sorozat bizonyult a legjobbnak, ahol a visszanyert follikulusok 21,4%-ában működött a bejuttatott konstrukció.

	A transzplantált	Visszanyert	RFP+	
Injektált konstrukció	follikulusok száma	YFP + donor follikulus	follikulusok száma	%
DsRed mRNS	81	7	1	14,3
DsRed mRNS	82	9	1	11,1
DsRed mRNS	108	15	0	0,0
DsRed mRNS	61	11	1	9,1
DsRed mRNS	84	14	3	21,4
DsRed mRNS	61	2	0	0,0
∑ <i>DsRed</i> mRNS	477	58	6	10,3

7.	táblázat Az RFI	P fehérje megy	nyílvánulása	az mRNS-sel	injektált i	follikulusokban
					J	

A kísérlet második részében DNS konstrukciók injektálására került sor. Konstrukciónként 60 II. stádiumú, nem transzgenikus oocyta manipulálása történt meg, melyek vizsgálatára egy napos zebrafish ringerben történt, *in vitro* inkubáció után került sor. A GFP-t tartalmazó konstrukcióval injektált follikulusok közül 4 (6,7%) világított fluoreszcens fényben. A nem injektált, és a *lacZ*-t tartalmazó konstrukcióval injektált follikulusok nem mutattak GFP aktivitást. A kísérlet eredményeinek összefoglalását a 8. táblázat, a follikulusokról készült felvételeket az 18. ábra tartalmazza. Normál megvilágításban mind az injektált, mind a kontrollként használt follikulusok épnek, a fejlettségi állapotuknak megfelelően néztek ki.



18. ábra DNS-sel injektált, zebrafish Ringer oldatban (in vitro) inkubált follikulus

A normál megvilágítás mellett készült képeken nem figyelhető meg különbség az egyes follikulusok között. Fluoreszcens megvilágítás mellett azonban csak azok a follikulusok izzanak zöld fénnyel, amelyekben az oocyták GFP-t tartalmazó konstrukcióval lettek injektálva. Méret skála = 500µm.

8. táblázat A	riportergének	GFP aktivitása a	DNS-sel	injektált	follikulusokban
	1 0			5	

Iniektált konstrukció	Oocvták száma	GFP+		
		Follikulus	%	
nem injektált	60	0	0,0	
β-actin:lacZ	60	0	0,0	
pCMV:GFP	60	4	6,7	

5 KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1 A petesejtfejlődés dinamikájának vizsgálatából levonható következtetések

A zebradánió follikulusok morfológiai és biokémiai vizsgálatával már több tanulmány is foglakozott (WALLACE et al. 1983; SELMAN et al. 1993; BALLY-CUIF et al. 1998), azonban irodalmi adatok még nem állnak rendelkezésre a follikulusok fejlődésének üteméről és az egyes fejlődési stádiumok egymáshoz viszonyított arányáról a petefészekben.

A vizsgálat során két kérdésre kerestem választ. Célom volt egyrészt megállapítani, hogy a transzplantációhoz szükséges I. fejlődési stádiumú follikulusok milyen arányban vannak jelen az ivarérett anyák petefészkében, azaz mikor érdemes kinyerni őket a petefészekből, másrészt információkat gyűjteni arról, hogy a korai fejlődési állapotban lévő follikulusokból mennyi idő alatt fejlődik érett ikra.

A kísérletben 50 zebradánió ikrás petefészkében lévő, eltérő fejlődési állapotú follikulusok egymáshoz viszonyított arányát vizsgáltam egyszeri szaporítás után, négy héten keresztül. A fejlettségi állapot meghatározásánál az abszolút kritérium a follikulusok ármérője volt.

Az eredmények alapján elmondható, hogy a zebradánióban több más trópusi halfajhoz hasonlóan az oogenezis folyamatos és gyors (SZABÓ 2000b). Az I. és II. stádiumú follikulusok részaránya a petefészken belül végig magas marad, azonban közöttük a mérsékeltövi hideg- és melegvízi halfajoknál tapasztalható korai fejlődési stádiumokra jellemző trendet nem lehet megfigyelni (LEFLER et al. 2008).

Laboratóriumi körülmények között, hetenként egyszeri szaporítással átlagosan 100-150 ikraszem nyerhető egy-egy zebradánió ikrástól. Ennél a mennyiségnél az ivarérett zebradánió petefészkében nagyságrendekkel több follikulus található egyszerre. A nagy mennyiségű follikulus a petefészekben arra enged következtetni, hogy a follikulusok egy része, fejlődési stádiumtól függetlenül, nyugalmi állapotban található a petefészekben, fejlődésük hosszabb-rövidebb ideig szünetel. Arra azonban, hogy a sokszor több száz hasonló fejlődési állapotú follikulus közül melyik és mi alapján kezd továbbfejlődni (újra bekapcsolódni a nyugalmi periódusból az oogenezis folyamatába), a szakirodalomban nincs fellelhető adat. A folyamat mélyebb megismerése újabb ismereteket adhat a gazdaságilag jelentős halfajok szaporításánál, nagyobb mennyiségű ikratételek nyerése érdekében. A természetben élő zebradánióknál az ívások zöme egy jól elkülöníthető szaporodási időszakban (esős évszak), előre nem meghatározott időközönként történik, ezt egy, az ívás szempontjából kevéssé aktív szakasz követi (száraz évszak) (MUNRO 1990). Ennél fogva a petefejlődés dinamikájának vizsgálatakor kapott eredmények valószínűleg csak a laboratóriumi körülmények között élő zebradániókra, azon belül is csak az AB vonal egyedeire érvényesek, ahol a sok generációs labortartás során feltehetően szelekciós nyomás érvényesült a kedvező szaporodásbiológiai tulajdonságokra. A rendszeres időközönként nagy mennyiségű ikrát adó egyedek továbbszaporításával a nyugalmi időszakra jellemző follikulus-fejlődési ütem eltűnhetett az ikrásokból.

A petesejtfejlődés dinamikájának vizsgálatából kapott eredmények alapján összességében elmondható, hogy az ivarérett ikrásoktól bármikor lehet nagyobb mennyiségű I. stádiumú follikulust nyerni (6. ábra), arra a kérdésre azonban, hogy az egyes fejlődési állapotból a következőbe mennyi idő alatt lép a follikulus, ez a kísérlet nem ad választ.

5.2 Transzplantált follikulusok kimutatásából és beépülésének vizsgálatából levonható következtetések

A kísérletek első részében transzgenikus zebradánió follikulusokat juttattam be vad típusú zebradánió anyák petefészkébe. A donor follikulusok kimutatására két módszert, fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokat és *in situ* hibridizációt használtam. A vizsgálatok minden esetben a recipiens állatok elpusztítása után, kiműtött petefészkeken történtek. A vizsgálatok során tett megfigyelések alapján elmondható, hogy fluoreszcens mikroszkóp segítségével a transzgenikus follikulusok vizuálisan könnyen elkülöníthetőek a recipiens anya sajátjaitól. A transzplantáció utáni negyedik napon minden esetben megfigyelhetőek voltak a transzgenikus markerrel jelölt follikulusok a recipiens petefészkekben.

A donor follikulusok életképességének bizonyítására azonban ez a módszer önmagában nem elégséges, hiszen a transzgenikus follikulusokban kifejeződő fluoreszcens fehérje (YFP), a GFP fehérjecsoport többi tagjához hasonlóan nagyon stabil molekula (PAKHOMOV és MARTINOV 2008), a sejt pusztulása után hosszú ideig nem bomlik le, és a megfelelő hullámhosszú fénnyel gerjesztve továbbra is sárgászöld fényt bocsát ki. A probléma megoldására *in situ* hibridizációs vizsgálatokat végeztem. Mivel mRNS csak az élő sejtekben termelődik, és kis stabilitása miatt gyorsan lebomlik, így a riportergénről átíródó mRNS kimutatására tervezett vizsgálat egyértelműen igazolja a donor follikulusok életképességét. Azokban a sejtekben, ahol a riportergén működött kék színreakció jelezte az mRNS termelődését. A recipiens petefészkekben négy nappal a beültetés után sikerült kimutatni, hogy nemcsak beépülnek a petefészekbe, hanem életben is maradnak.

Ha a recipiens petefészkekről készült fluoreszcens képeket és az *in situ* hibridizáció után készült felvételeket összevetjük, akkor megállapítható, hogy jóval kevesebb kéken festődő follikulust találunk, mint amennyi a fluoreszcens felvételeken világít (11. ábra). Ez alapján valószínűsíthető, hogy a transzplantáció után a donor follikulusok jelentős része elpusztult a recipiens petefészekben.

A transzplantációval kapcsolatos kísérletek első részének eredményeit összefoglalva elmondható, hogy a follikulus transzplantáció sikeresen végrehajtható, a bejuttatott follikulusok egy része beépül, és életben is marad a recipiens petefészekben.

Napjainkban a kísérleti állatokat felhasználó kutatásoknál nagy hangsúlyt kap a "3 R" stratégia alapján történő kísérlettervezés, amely magában foglalja a kísérleti állatok fájdalmának és szenvedésének csökkentését (refinement), a felhasznált állatok számának csökkentését (reduction) és az állati modellek helyettesítését más modellekkel (replacement). Mivel a kísérlet első felében a beültetett follikulusok kimutatását csak az állatok elpusztítását követően tudtam elvégezni, a kísérlet második részében olyan kimutatási lehetőséget kerestem, amely nem jár a recipiens anyák feláldozásával.

A vizsgálat második részében recipiensnek a zebradánió *gold* mutáns változatát használtam, majd négy nappal a beültetés után fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltam az altatásban lévő anyák petefészkét. A normálisnál kevesebb pigmentet kifejező *gold* anyák hasfalán keresztül megfigyelhetőek voltak a beültetett follikulusok, azonban ezek életképességére, illetve méretére a megfigyelés alapján nem lehetett következtetni (12. ábra). Annak ellenére, hogy a transzplantációs kísérletek egy részénél célszerű lett volna recipiensnek *gold* anyákat választani, a későbbiekben ezt a vonalat nem volt lehetőségem felhasználni.

5.3 A beépülés hatékonyságának vizsgálatából levonható következtetések

A beépüléssel kapcsolatos vizsgálatok során azt tapasztaltam, hogy a beültetett follikulusoknak csak egy része él túl a recipiens petefészekben. A következő lépésben arra kerestem a választ, hogy a donor follikulusok száma mennyi idő alatt és milyen ütemben csökken. A kísérletben meghatározott számú follikulust ültettem be AB anyák petefészkébe,

majd két héten keresztül vizsgáltam a kiműtött recipiens petefészkekben a donor follikulusok számát. A follikulusok jelenlétét csak fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltam.

A donor follikulusok száma az első hét végéig drasztikusan csökkent a beültetést követően, majd állandó szintre állt be, és a későbbiekben jelentősen már nem változott. Az eredmények alapján az első hét végén a petefészekben található beültetett follikulusok már beépültnek tekinthetők, jó eséllyel folytathatják az oogenezist.

A nagymértékű és hirtelen csökkenésnek több oka lehet. A legvalószínűbb, hogy az általam használt izolálási módszer nem volt optimális, a szuszpendálás során a follikulusok sérülhettek, az életképességük erősen csökkenhetett.

A kísérletben donorként használt transzgenikus vonalat ugyanabból a vonalból (AB) alakították ki, amelyet recipiensként használtam, így a két vonal genetikai szempontból homogénnek tekinthető, a kilökődési reakció esélye minimális. A vizsgált petefészkek szerkezetileg épnek, egészségesnek tűntek, nem figyeltem meg bennük akut vagy krónikus kilökődési folyamatokra utaló tüneteket (GERGELY és ERDEI 2000). A donor follikulusok túlélését, az esetleges kilökődési reakciók lassítását az optimális tartási körülmények is elősegíthették, mivel a halak immunfolyamatainak intenzitását a környezeti hatások nagymértékben befolyásolják (BLY és CLEM 1992; NEVID és MEYER 1993). Véleményem szerint így a follikulusok számának csökkenésénél a kilökődési reakciók nem játszottak lényeges szerepet, bár a kilökődési folyamatokat direkt módszerekkel nem vizsgáltam.

Az eredményeket összefoglalva elmondható, hogy a donor follikulusok egy része két héttel a beültetés után is túlélhet a petefészekben, heves kilökődési reakciók nem zajlanak le a recipiens anya szervezetében. A túlélő follikulusok jó eséllyel továbbfejlődhetnek a recipiens anya szervezetében.

5.4 A transzplantált follikulusok növekedésének vizsgálatából levonható következtetések

A transzplantációval kapcsolatos kísérletek további részében arra voltam kíváncsi, hogy a túlélő follikulusok képesek-e visszakapcsolódni az oogenezis folyamatába.

A kísérletben I-es fejlődési stádiumú follikusokat ültettem az anyákba, majd egy, illetve két héttel a beültetés után megvizsgáltam a petefészkeket és összegyűjtöttem a donor follikulusokat. A transzplantáció előtt és után azonos beállítások mellett fényképeket készítettem a donor follikulusokról, majd a méretüket összehasonlítottam.

A kísérlet segítségével sikerült bepillantást nyernem a zebradánió follikulus fejlődésének dinamikájába. Az eredmények segítségével meghatározhatóak voltak azok az időintervallumok, amelyek alatt a follikulusok az egyes fejlődési stádiumokból a következőkbe léphetnek. Az I-es stádiumú follikulusok egy hét alatt képesek III. stádiumú follikulussá, a következő hét végére IV. stádiumú follikulussá fejlődni. Az érett ikrává történő fejlődéshez szükséges időt ezzel a kísérlettel még nem sikerült meghatároznom.

A donor follikulusok egy része életben maradt a transzplantációt követően, de nem növekedett a recipiens petefészekben, illetve mindkét vizsgálati időpontban találtam azonos fejlődési állapotú, a kiindulási mérethez képest növekedett follikulusokat. Ezáltal részben sikerült alátámasztanom azt a korábbi felvetésemet is, hogy az oogenezis során a follikulusok bármely fejlődési szakaszban képesek hosszabb- rövidebb nyugalmi időt eltölteni.

A vizsgált donor follikulusok mindegyike normál fejlődést mutatott, bennük jól megfigyelhetőek voltak az adott fejlődési állapotra jellemző morfológiai bélyegek (14. ábra).

Összességében elmondható, hogy a transzplantált follikulusok a beépülés után képesek újra bekapcsolódni az oogenezis folyamatába, azokból jó eséllyel fejlődhet termékenyülésre alkalmas ikra.
5.5 A szaporítási kísérletekből levonható következtetések

Az előző eredmények alapján a továbbiakban azt kívántam bizonyítani, hogy a beépült és továbbfejlődő follikulusokból nyerhető ikra, majd azok termékenyülése után életképes embrió is, illetve meghatározva az ehhez szükséges időt, teljessé kívántam tenni a follikulusok fejlődési ütemének meghatározását.

A kísérletekben száz transzplantált AB anyát szaporítottam hat héten keresztül. Minden anyába száz I. fejlődési stádiumú follikulust ültettem, a szaporításból származó utódokat először fenotípusosan, majd a valószínűsíthetően donor follikulusból származó egyedeket genetikailag is vizsgáltam. Két anyától összesen három transzgenikus utódot sikerült nyernem, a beültetést követő harmadik, illetve negyedik héten. Ezzel sikerült kiegészítenem az előző kísérletsorozat follikulus-fejlődéssel kapcsolatos eredményeit.

A mikroszatellit vizsgálattal egyértelműen sikerült igazolnom, hogy a transzgenikus egyedek valóban a donor anyából izolált, majd transzplantált follikulusokból származtak (16. ábra).

Egyértelműen sikerült bizonyítanom azt, hogy a fajon belüli follikulus transzplantáció sikeresen végrehajtható, az általam kifejlesztett módszer alkalmas a fiatal fejlődési stádiumú follikulusok recipiens petefészekbe történő beültetésére.

Sikerült bizonyítanom, hogy a beültetett follikulusokból érett ikra fejlődik, amiből a termékenyülés után életképes lárva kel ki, amely megfelelő tartási körülmények között fertilis felnőtt egyeddé válik. Az általam felnevelt donor follikulusból származó embrióból ivarérett ikrás egyed fejlődött, majd tovább szaporítva szintén normál fejlődésű utódokat hozott létre. Ezek alapján elmondható, hogy a transzplantáció semmilyen káros változást nem okoz a donor follikulusból származó egyedek szervezetében.

Annak ellenére, hogy a transzplantáció hatékonysága viszonylag alacsony maradt (a transzplantált anyák 2%-ában fejlődött ikra a transzplantált follikulusból), a kapott eredmények alapján az eljárás alapját képezheti az anyai hatású gének vizsgálatának, mivel a transzplantáció előtt lehetőség nyílhat az oocyták közvetlen manipulációjára is.

A petesejt átültetés fejlődésbiológiai alkalmazásain túl (a lazacfélék primordiális őssejt transzplantációjához hasonlóan (KOBAYASHI et al. 2007; OKUTSU et al. 2006)) az állattenyésztés fejlődő eszköztárának is részévé válhat, pl. faj- vagy fajtamegőrzésben korai fejlődési stádiumú oocyták mélyhűtésével (TSAI et al. 2009), a halak *in vitro* termékenyítésénél pl. az európai angolna (*Anguilla anguilla*) esetén, amelynél az ikrások ivari érlelése problémákba ütközik (MÜLLER et al. 2003).

5.6 Az oocyták mikromanipulációjából levonható következtetések

A follikulus transzplantáció lehetséges fejlődésbiológiai felhasználását nagymértékben elősegíthetné az oocyták sikeres mikromanipulációja. Ezért a további vizsgálatokban kísérletet tettem az oocyták nukleinsavakkal történő mikroinjektálására, manipulációjára.

A kísérletek során *DsRed* mRNS-t, p β -actin:LacZ és pCMV:GFP konstrukciókat juttattam az oocytákba. A konstrukciók mindegyike működőképes volt.

A kísérlet első részében mRNS-t injektáltam β -actin: YFP oocyták citoplazmájába. A follikulusokat transzplantáltam és egy napos inkubáció után a recipiens petefészekből elkülönítve izoláltam a csak YFP és az YFP/DsRed fehérjét is tartalmazó, donor follikulusokat. Az eredmények alapján elmondható, hogy az oocyták sikeresen manipulálhatóak mRNS-sel történő mikroinjektálással, az egy napos inkubáció elegendő az mRNS-ről történő fehérje szintézisére. A mikroinjektálás hatékonysága azonban igen alacsony és függ az injektáló személyétől is (emberi tényező). Megállapítható továbbá, hogy az injektált follikulusok beépülésének hatékonysága jóval elmaradt a korábbi kísérletek eredményeitől, mivel az injektálás, nagy valószínűséggel a kapilláris okozta mechanikai sérülés miatt, csökkenti a follikulusok életképességét.

A kísérlet második részében DNS konstrukciókat injektáltam vad típusú anyáktól származó follikulusokba. Az injektálás után az inkubáció Petri-csészékben, inkubáló oldatban történt, majd fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltam a follikulusokat. A GFP-t tartalmazó konstrukcióval injektált follikulusok kis részében megfigyelhető volt a fluoreszcens fehérje aktivitása, bizonyítva ezzel a manipuláció sikerességét. Az egy napos *in vitro* inkubáció elegendő volt a riportergénről származó fehérje szintézisére. A *lacZ* riporterfehérje kimutatására a fluoreszcens vizsgálat közvetlenül nem alkalmas, ezzel egyértelműen sikerült bizonyítani azt is, hogy a fluoreszcens izzás nem az injektálásnak, mint eljárásnak vagy az injektáló oldat valamely összetevőjének a következménye (18. ábra).

Összességében megállapítható, hogy a fiatal fejlődési állapotú follikulusok genetikai anyaga közvetlenül manipulálható nukleinsavakkal történő mikroinjektálással, amely a kifejlesztett transzplantációs eljárással együtt alkalmazva új módszert jelenthet a fejlődésbiológiai és más, follikuluson alapuló kutatásokban.

5.7 A két módszer eredményeinek összegzése alapján levonható következtetések

Vizsgálataim során kidolgoztam a korai fejlődési stádiumú follikulusok átültetésének módszerét. Transzgén markerrel és mikroszatellit analízissel bizonyítottam, hogy ha az I. stádiumú follikulusokat az ivarnyíláson keresztül recipiens anyákba juttatása után a beültetett follikulusok beépültek, képesek voltak életképes és termékenyítésre alkalmas ikrává érni a recipiens petefészekben. A transzplantált follikulusokból ikra jött létre, amelyből normál fejlődésű lárva, majd ivarérett ikrás egyed fejlődött. Továbbá bizonyítást nyert, hogy az I-es és II. stádiumú follikulusokban a nukleinsav injektálással a bejuttatott konstrukciók működőképesek, ami lehetőséget teremthet a génaktivitás manipulálására. A két eljárás az anyai hatású gének manipulásásának alapját képezheti, így az oogenezisben és az azt követő embriófejlődésben nyomonkövethetővé válik a hatásuk.

A transzplantációs technika számos előnnyel rendelkezik az eddigi anyai hatást vizsgáló vagy manipuláló eljárásokkal szemben. A ma használt módszerek esetén az anyai gének manipulálása csak anyai mutánsok létrehozásával lehetséges PGC transzplantációval (TAKEUCHI et al. 2003), zigotikus mutáns szomatikus "kimentésével" vagy anyai mutációk 4 generációs vizsgálatával (DRIEVER et al. 1996), amelyekhez mindig szükség van a zigotikus mutáns meglétére. Az újonnan kifejlesztett follikulus transzplantációs technikánál azonban lehetőség nyílik a vad típusú oocyta direkt manipulálására reverz genetikai módszerekkel és nincs szükség zigotikus mutánsokra a funkcióvesztéses (loss-of-function) fenotípushoz. Ilyen manipulációs lehetőségek pl. a gént "csendesítő" (gene knock down) módszerek (mint az RNS interferencia, a domináns negatív fehérje variáns túltermeltetése, vagy a MO technikák). A jövőben szükség lehet a follikulusokra alapozott knock-down technikák kidolgozására.

Nyilvánvaló, hogy a petesejt átültetésnek a négygenerációs anyai mutáns vonalak előállításával szemben számos előnye van. Az előbbi klasszikus genetikai megközelítésen alapuló módszer csak olyan anyai hatású gének azonosítását teszi lehetővé, amelyek oocyta specifikusak, és nem rendelkeznek alapvető szomatikus funkciókkal. A reverz genetikai megközelítések ezzel szemben bármely, az oocytában aktív gén azonosítását és oocyta specifikus funkciójának tanulmányozását lehetővé teszik.

A reverz genetikai megközelítések valójában nem szolgáltatnak kellő elméleti alapot ahhoz, hogy az oocyta fejlődés során kifejeződő gének funkcióját megállapíthassuk. Így azok a technikák, amik lehetővé teszik, hogy a manipulált oocyta embrióvá fejlődjön, különösen

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

informatívak lehetnek számos embriógenezis során lezajló folyamat nyomonkövetésénél a megtermékenyítéstől az anyaiból a zigóta irányította embriógenezisbe történő átalakuláson át a szövet és sejt specifikációig (elköteleződésig) és differenciálódásig. A késői fejlődési stádiumú oocyták *in vitro* érésénél történt jelentős előrelépés (SEKI et al. 2008), de az anyai hatás kialakításban szerepet játszó géntermékek hatékony manipulálásához korai fejlődési stádiumú oocytákra van szükség, amelyeket eddig nem tudtak sikeresen *in vitro* inkubálni. Az új transzplantációs technika optimalizálást követően megfelelően kiegészítheti az anyai hatású gének tanulmányozása során alkalmazott klasszikus genetikai megközelítéseket.

Ezen felül a petesejt átültetés hatékony knock down technikákkal kombinálva azt is lehetővé teheti, hogy meghatározzuk, hogy a zigótában aktív, anyai hatású gének mRNS –ei vagy fehérjéi milyen szinten játszanak szerepet az egyedfejlődésben (embriogenezisben). Azon kevés gén esetében, amelyeknél zigotikus és anyai mutánsok is elérhetőek (pl. *one eyed pinhead* (egyszemű-tűfejű mutáns) vagy *dicer* (kis RNS képzésben sérült mutáns)) az anyai hatású gén funkcióvesztése a zigotikus mutáns egyébként meglehetősen gyenge fenotípusát drasztikusan felerősítette (GIRALDEZ et al. 2006; GRITSMAN et al. 1999). Egy nemrég készült tanulmány szerint a hólyagcsíra és a szedercsíra állapotban kifejeződő gének kb. 20%-a már anyai eredetű géntermékként jelen van (MATHAVAN et al. 2005). Ez alapján a zigótában kifejeződő gének ezrei már anyai mRNS-ként is jelen vannak, így a zigotikus mutánsok fenotípusa valószínűleg jelentősen felerősíthető az anyai hatás gátlásával a korai embriogenezis alatt. Az oocyta manipuláció jó eszköz lehet ennek igazolásához.

5.8 Javaslatok

5.8.1 Javaslatok a follikulus transzplantáció témakörében

- Annak ellenére, hogy a follikulus transzplantáció egy működő technika, a hatásfok növelése a későbbiekben szükséges lesz a módszer széleskörű elterjedéséhez. A transzplantációhoz szükséges eszközök és a follikulus izolálási módszer fejlesztésével, változtatásával már elfogadható hatékonyságúvá válhat az eljárás, ezért a későbbiekben javaslom ezeknek a fejlesztéseknek az elvégzését.
- A follikulusok petefészken belüli fennmaradásának vizsgálatát a későbbiekben, lehetőség szerint, felnőtt korban is félig, vagy teljesen átlátszó zebradánió vonalakon kellene vizsgálni. A transzplantált transzgén markerrel jelölt follikulusok sorsa így könnyen, a teljes vizsgálati időszak alatt nyomonkövethető lenne a recipiens petefészekben, ezáltal még több új információt nyerhetnénk a halak oogenezisével kapcsolatban. Javaslom ezért a későbbiekben a félig átlátszó vonalak közül a *gold* vagy a *nacre*, a felnőtt korban is transzparens vonalak közül a *casper* (WHITE et al. 2008) vonal használatát a transzplantációs vizsgálatokhoz.
- Javaslom továbbá interspecifikus, illetve mélyhűtött, majd felolvasztott follikulusokkal is transzplantációs kísérletek elvégzését.

5.8.2 Javaslatok az oocyta mikromanipuláció témakörében

- Az oocyták mikroinjektálással történő manipulációs módszerének a tökéletesítésére is szükség van. Az eljárás továbbfejleszthető például a célzott sejtmagba történő injektálással, az injektálás körülményeinek optimalizálásával, precíziós mikromanipulátor használatával és az oocyták helyzetének megtartásával/helyhez rögzítésével (immobilizálás) az injektálás folyamán.
- Valószínűleg az egér petesejtéhez hasonlóan (YU et al. 2004), a zebradánió oocytában is jelen van az RNS interferenciához szükséges molekuláris apparátus (GIRALDEZ et al. 2005; HOUWING et al. 2007). Kimutatták, hogy az antiszensz MO-k hatékonyan gátolják a génműködést egér és karmosbéka (*Xenopus sp.*) oocytákban, ezért várhatóan halakban is hasonlóan működhetnek (DUPRE et al. 2002; KANZLER et al.

2003; LEFEBRE et al. 2002). Ezek alapján javaslom a továbbiakban az oocyták MOval, illetve siRNS-sel történő injektálásával kapcsolatos kísérletek tervezését, elvégzését.

6 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- Zebradánió halfajon a világon elsőként dolgoztam ki a korai fejlődési stádiumú (I-II. stádium) follikulusok transzplantációjának egy módszerét. A kísérleteim során egyértelműen bizonyítottam, hogy a donor follikulusok beépülnek és túlélnek a recipiens petefészekben, visszakapcsolódnak az oogenezis folyamatába és belőlük érett ikra, majd életképes utód fejlődhet.
- A transzplantációs módszer segítségével elsőként sikerült meghatároznom a zebradánió follikulusainak az egyes fejlődési stádiumok eléréséhez szükséges minimális időket 27,5°C-os tartási hőmérséklet mellett.
- Sikerült igazolnom, hogy a zebradánió petefészkében az első négy fejlődési állapot bármelyikében hosszabb-rövidebb nyugalmi időszakot tölthetnek el a follikulusok és onnan bármikor visszakapcsolódhatnak az oogenezis folyamatába.
- 4. Munkám során meghatároztam a zebradánió petefészkében a follikulusok egymáshoz viszonyított arányát közvetlenül a szaporítás után, majd az azt követő négy hétben.
- Elsőként sikerült bizonyítanom, hogy lehetséges mRNS és DNS konstrukciók injektálásával befolyásolni a fiatal fejlődési állapotú follikulusok génmegnyilvánulását zebradánión.

7 ÖSSZEFOGLALÁS

A csontoshalak ivarsejtjeinek tanulmányozása hosszú múltra tekint vissza, ennek ellenére, elsősorban a petesejtfejlődéssel, petesejtmélyhűtéssel kapcsolatban számos olyan kérdés merül fel, melyek a megfelelő eljárások hiánya miatt, eddig nem kerültek megválaszolásra. Hasonló a helyzet az anyai hatású faktorok vizsgálatánál is, bár itt elsősorban nem a hiányzó technológiák, hanem a meglévők bonyolultsága és időigénye miatt van szükség új eljárások kidolgozására.

A dolgozatomban szereplő kutatások egy olyan új kísérleti módszer, a follikulus transzplantáció és oocyta mikromanipuláció kidolgozására irányultak, amely segítséget nyújthat az oogenezis folyamatának jobb megismeréséhez, az anyai eredetű ivarsejtek mélyhűtés utáni ikrává érleléséhez és az anyai hatású faktorok vizsgálatához.

A vizsgálatokat zebradánió halfajon végeztem, kihasználva a fajból leírt, illetve megalkotott nagy számú mutáns és transzgenikus vonal adta lehetőségeket. Donorként minden esetben β -actin: YFP jelölésű transzgenikus zebradánió anyákat, recipiensként AB vad típusú, vagy gold mutáns egyedeket használtam.

A kísérleteimben korai fejlődési állapotú follikulusokat transzplantáltam recipiens anyák petefészkébe, majd több lépésben bizonyítottam, hogy a módszer működőképes, a donor follikulusok képesek megtapadni és továbbfejlődni a recipiens petefészekben, illetve belőlük, ha kis mennyiségben is, de termékenyítésre alkalmas ikra, majd életképes embrió nyerhető. Ez utóbbi eredménnyel sikerült azt is bizonyítanom, hogy a transzplantálás semmilyen kárt nem okoz a donor follikulusból származó egyedekben.

A módszer segítségével felhasználva sikerült meghatároznom a zebradánió follikulusok különböző fejlődési stádiumainak eléréséhez szükséges időpontokat. Ezek alapján az I-es fejlődési stádiumú follikulusból egy hét alatt III., két hét alatt IV. stádiumú follikulus, három hét múlva érett ikra fejlődik. A munkám során meghatároztam a zebradánió petefészkében az eltérő fejlődési állapotban lévő follikulusok egymáshoz viszonyított arányát is a szaporítás után közvetlenül és az azt követő négy hétben.

Az oocyták mikromanipulációjával kapcsolatos vizsgálatok során *DsRed* mRNS-t, p β actin:LacZ és pCMV:GFP konstrukciókat juttattam az oocytákba. Egynapos inkubálási idő után mind az mRNS, mind a DNS konstrukciók működését sikerült megfigyelnem, ezzel egyértelműen sikerült bizonyítanom, hogy az oocyták közvetlen manipulálása megvalósítható. A kidolgozott follikulus transzplantációs technikával lehetővé válhat az oocyta mélyhűtés gyakorlati felhasználása a haltenyésztésben, illetve új információkat nyerhetünk a csontoshalak szaporodásbiológiájával kapcsolatban. A transzplantációs eljárás a mikromanipulációs technikával kiegészítve, az anyai faktorok hatékony befolyásolásán keresztül, segítséget nyújthat azoknak a géntermékeknek az azonosításában, melyek az oocytában aktiválódnak és így részt vesznek az oocyta-fejlődésben és az embriógenezisben.

8 SUMMARY

However, gametes of teleosts have long been studied, mainly due to the lack of adequate methods, many problems concerning oocyte development and cryopreservation still remain unsolved. The same is true for maternal factors, though instead of missing technologies, its the complexity and high time consumption that establish a claim for new methods.

My thesis mainly focuses on the development of new experimental methods, the follicle transplantation and oocyte micromanipulation that enable the better understanding of oogenesis and provide new information on the maturation process of the female gamete and maternal effect studies.

Based upon the possibilities arising from the huge amount of data and the availablity of several transgenic and mutant strains, for my studies the zebrafish was chosen as an experimental model. During the work the β -actin: YFP transgenic line was used as a donor, while recipients were always individuals of the *gold* mutant strain.

In my experiments I transplanted early stage follicles into the ovary of recipient females, then confirmed (in several steps) that donor follicles could indeed adhere and develop in the recipient ovary from which even in a small amount, fertile eggs and viable embryos were produced, that underlie the applicability of the method. The latter result also demonstrates that transplantation has no adverse effect on the individuals originating from the donor follicles.

The new method also offered the possibility to determine the length of follicle developmental stages. According to the results, primary follicles reach the tertiary stage in one week, the quaternary in two weeks and develop to mature eggs in three weeks. During the work I determined the intraovarian ratio of follicles in different developmental stages immediately after spawning and in the subsequent four weeks.

In order to study the possibility of oocyte micromanipulation, I introduced *DsRed* mRNA, p β -actin:LacZ and pCMV:GFP constructs into the oocytes. After one day incubation, the mRNA and the injected constructs were also expressed, indicating the feasibility of direct oocyte micromanipulation.

The newly developed follicle transplantation process could serve a basis for oocyte cryopreservation to be practically used in fisheries and provide new information on the reproductive biology of teleosts. The transplantation method, combined with

micromanipulation techniques (if affecting maternal factors) could help in the identification of gene products that activated in the oocyte, play a role in oocyte development and embryogenesis.

9 IRODALOMJEGYZÉK (1. számú melléklet)

AGCA Y. (2000) Cryopreservation of oocyte and ovarian tissue. *ILAR Journal* 41. 207–218.

ALAM, J., COOK, J.L. (1990): Reporter genes - application to the study of mammalian gene-transcription. *Analytical Biochemistry* 188. (2) 245-254.

ALAM, M.S., LAVENDER, F.L., IYENGAR, A., RAHMAN, M.A., AYAD, H.H., LATHE, R., MORLEY, S.D., MACLEAN, N. (1996): Comparison of the activity of carp and rat beta-actin gene regulatory sequences in tilapia and rainbow trout embryos. *Molecular reproduction and development* 45, 117-22.

AMSTERDAM, A., NISSEN, R. M., SUN, Z., SWINDELL, E. C., FARRINGTON, S., HOPKINS, N. (2004): Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 12792-12797.

ANDO, R., HAMA, H., YAMAMOTO-HINO, M., MIZUNO, H., MIYAWAKI, A. (2002): An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99. (20) 12651–12656.

ANKLEY, G.T., JOHNSON, R.D. (2004): Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 45. (4) 469–483.

BAIRD D.T., WEBB R., CAMPBELL B. K., HARKNESS L.M., GOSDEN R.G. (1999) Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196,8°C. *Endocrinology*,140(1), 462–71

BAKOS, K., KOVACS, B., CSENKI, ZS., KOVÁCS, R., KÁNAINÉ, 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, Karlsruhe, Németország, 2010. szeptember 10. (Poszter)

BALLY-CUIF, L., SCHATZ, W.J., HO, R.K. (1998): Characterization of the zebrafish Orb/CPEB-related RNA-binding protein and localization of maternal components in the zebrafish oocyte. *Mechanisms of Development* 77, 31–47.

BEHRA, M., COUSIN, X., BERTRAND, C., VONESCH, J.L., BIELLMANN, D., CHATONNET, A., STRAHLE, U. (2002). Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nature Neuroscience* 5: 111-118.

BASKA, F. (2005) Halbetegségek. Budapest SzIE- ÁOTK egyetemi jegyzet

BEGOVAC, P. C., WALLACE, R. A. (1988): Stages of oocyte development in the pipefish, *Syngnathus scovelli. Journal of Morphology* 197. (3) 353-369.

BENNETT, W.A., BEITENGER, T.L. (1997): Temperature tolerance of the sheepshead minnow Cyprinodon variegates. *Copeia* 77–87.

BERCSÉNYI M, MAGYARY I, URBÁNYI B, ORBÁN L, HORVÁTH L (1998) Hatching out goldfish from common carp eggs: interspecific androgenesis between two cyprinid species *Genome* 41 (4), 573-579

BHAT, A. (2003): Diversity and composition of freshwater fishes in streams of Central Western Ghats, India. *Environmental Biology of Fishes* 68, 25–38.

BLY, J.E., CLEM, W. (1992): Temperature and teleost immune functions *Fish and Shellfish Immunology* 2. (3) 159-171.

BLYTHE, B., HELFRICH, L. A., BEAL., W. E., BOSWORTH, B., LIBEY G. S. (1994): Determination of sex and maturational status of striped bass (*Morone saxatilis*) using ultrasonic imaging. *Aquaculture* 125, 175–184.

BOKOR, Z., HORVÁTH, Á., HORVÁTH, L., URBÁNYI, B. (2008): Cryopreservation of Pike Perch sperm in hatchery conditions. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh* 60. (3) 168-171.

BOKOR, Z., MÜLLER, T., BERCSÉNYI, M., HORVÁTH, L., URBÁNYI, B., HORVÁTH, Á. (2007): Cryopreservation of sperm of two European percid species, the pikeperch (*Sander lucioperca*) and the Volga perch (*S. volgensis*). *Acta Biologica Hungarica* 58. (2) 199-207.

BRAND, M., GRANATO, M., NÜSSLEIN-VOLHARD, C. (2002): Keeping and raising zebrafish. Nüsslein-Volhard, C., Dahm, R. (Szerk.), Zebrafish: A Practical Approach. Oxford University Press, Oxford, 7–37.

BROMAGE, N. R., CUMARANATUNGA, P. R. T. (1988): Egg production in rainbow trout. Muir J. F., Roberts R. J. (Szerk.) *Recent Advances in Aquaculture*. London és Sydney: Croom Helm, 65-138.

BRYANT, P.L., MATTY, A.J. (1980): Optimisation of Artemia feeding rate for carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture* 21, 203–212.

BRYANT, P.L., MATTY, A.J. (1981): Adaptation of carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae to artificial diets. Optimum feeding rate and adaptation age for commercial diet. *Aquaculture* 23, 275–286.

BUSSON-MABILLOT S. (1984): Endosomes transfer yolk proteins to lysosomes in the vitellogenic oocyte of the trout. *Biology of the Cell* 51. (11) 53-56.

CAFFEY, R.H., TIERSCH, T.R. (2000): Economics and marketing of cryopreserved fish sperm. Tiersh, T.R., Mazik, P.M. (Szerk.): *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, 388-408.

CASTANON, M.J., SPEVAK, W. (1994): Functional coupling of human adenosine receptors to a ligand-dependent reporter gene system. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 198. (2) 626-631.

CHUANG, K. H., CHENG, T. L. (2010): Noninvasive Imaging of Reporter Gene Expression and Distribution *In Vivo. Fooyin Journal of Health Sciences* 2. (1) 1–11.

CIRUNA, B., WEIDINGER, G., KNAUT, H., THISSE, B., THISSE, C., RAZ, E., SCHIER, A.F. (2002): Production of maternal-zygotic mutant zebrafish by germ-line replacement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 14919–14924.

COREY, D.R., ABRAMS, J.M. (2001): Morpholino antisense oligonucleotides: tools for investigating vertebrate development. *Genome Biology* 2. (5) 1015.1–1015.3.

DANILOVA, N., STEINER, L.A. (2002): B cells develop in the zebrafish pancreas. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99. (137) 11-16.

DEKENS M.P.S., PELEGRI F. J., MAISCHEIN H. M., NÜSSLEIN-VOLHARD C. (2003) The maternal-effect gene futile cycle is essential for pronuclear congression and mitotic spindle assembly in the zebrafish zygote *Development* 130, 3907-3916

DODD, J.M. (1977): The structure of the ovary of nonmammalian vertebrates. S. Zuckerman és B. Weir (Szerk.) *The Ovary* 2. (I) 219-263. General Aspects. New York: Academic Press.

DONG, Q., HUANG, C., EUDELINE, B., TIERSCH, T.R. (2007): Cryoprotectant optimization for sperm of diploid Pacific oysters by use of commercial dairy sperm freezing facilities. *Aquaculture* 271, 537-545.

DOSCH, R., WAGNER, D. S., MINTZER, K. A., RUNKE, G., WIEMELT, A. P., MULLINS, M. C. (2004): Maternal control of vertebrate development before the midblastula transition: mutants from the zebrafish. *Developmental Cell* 6, 771-80.

DRAPER, B. W.; MORCOS, P. A., KIMMEL, C. B. (2001): Inhibition of zebrafish fgf8 pre-mRNA splicing with morpholino oligos: A quantifiable method for gene knockdown. *Genesis* 30. (3) 154–6.

DRIEVER, W., SOLNICA-KREZEL, L., SCHIER, A. F., NEUHAUSS, S. C., MALICKI, J., STEMPLE, D. L., STAINIER, D. Y., ZWARTKRUIS, F., ABDELILAH, S., RANGINI, Z., BELAK, J., BOGGS, C. (1996): A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* 123, 37–46.

DUMONT, J. N., BRUMMET, A. R. (1980): The vitelline envelope, chorion, and micropyle of fundulus heteroclitus eggs. *Gamete Research* 3. (1) 25-44.

DUPRE, A., JESSUS, C., OZON, R., HACCARD, O. (2002): Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in Xenopus oocytes. *The EMBO journal* 21, 4026-36.

DUTTA, S. P. S. (1993): Food and feeding habits of *Danio rerio* (Ham. Buch.) inhabiting Gadigarh stream, Jammu. *Journal of Freshwater Biology* 5, 165–168.

EDGAR, B. A., SCHUBIGER, G. (1986): Parameters controlling transcriptional activation during early Drosophila development. *Cell* 44, 871-877

EDWARDS, S. V., HEDRICK, P. W. (1998): Evolution and ecology of MHC molecules: from genomics to sexual selection. *Trends in Ecology and Evolution* 13, 305–311.

EISEN, J.S. (1996): Zebrafish make a big splash. Cell 87. (6) 969.

ENGESZER, R. E., RYAN, M. J., PARICHY, D.M. (2004): Learned social preferences in zebrafish. *Current biology* 14, 881–884.

FENSKE, M., MAACK, G., SCHAFERS, C. (2005): An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 24. (5) 1088–1098.

FISH. ACUT TOXICITY TEST. (1992) Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidline for testing of chemicals (No. 203)

85

FLORES, M. V., LAM, E. Y., CROSIER, K. E., CROSIER, P. S. (2008): Osteogenic transcription factor Runx2 is a maternal determinant of dorsoventral patterning in zebrafish. *Nature cell biology* 10, 346-52.

FLÜGEL H. (1967): Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Oozyten und eiern einiger Knochenfische. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 83, 82-116.

GERGELY, J., ERDEI, A. (Szerk.) (2000): Immunbiológia, Medicina könyvkiadó Rt., Budapest, 358-368

GERHARD, G. S., CHENG, K. C. (2002): A call to fins! Zebrafish as a gerontological model. *Aging Cell* 1. (2) 104–111.

GERHARD, G. S., KAUFFMAN, E. J., WANG, X., STEWART, R., MOORE, J. L., KASALES, C. J., DEMIDENKO, E., CHENG, K. C. (2002): Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*). *Experimental gerontology* 37, 1055–1068.

GERHART, J. C. (1980): Mechanisms regulating pattern formation in the amphibian egg and early embryo. *Biological Regulation and Development* (ed. R. F. Goldberg), 133-150.

GERLACH, G., LYSIAK, N. (2006): Kin recognition in zebrafish based on phenotype matching. *Animal behaviour* 71, 1371–1377.

GILCHRIST, E. J., HAUGHN, G. W. (2005): TILLING without a plough: a new method with applications for reverse genetics. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 211–215.

GIRALDEZ, A. J., CINALLI, R. M., GLASNER, M. E., ENRIGHT, A. J., THOMSON, J. M., BASKERVILLE, S., HAMMOND, S. M., BARTEL, D. P., SCHIER, A. F. (2005): MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* 308, 833-8.

GIRALDEZ, A. J., MISHIMA, Y., RIHEL, J., GROCOCK, R. J., VAN DONGEN, S., INOUE, K., ENRIGHT, A. J., SCHIER, A. F. (2006): Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 312, 75-9.

GOOK D.A., MCCULLY B.A., EDGAR D.H., MCBAIN J.C. (2001) Development of antral follicles in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting. *Human Reproduction*, 16, 417–22.

GORE, A. V., MAEGAWA, S., CHEONG, A., GILLIGAN, P. C., WEINBERG, E. S., SAMPATH, K. (2005): The zebrafish dorsal axis is apparent at the four-cell stage. *Nature* 438, 1030-5.

GREELEY M. S., J. R. CALDER, D. R., WALLACE, R. A. (1986a): Changes in teleost yolk proteins during oocyte maturation - correlation of yolk proteolysis with oocyte hydration. *Comparative Biochemistry and Physiology* 84B, 1-9.

GREELEY, M. S., CALDER, D. R., TAYLOR, M. H., HOLS, H., WALLACE, R. A. (1986b): Oocyte maturation in the mummichog (fundulus-heteroclitus) - effects of steroids on germinal vesicle breakdown of intact follicles in vitro. *General and Comparative Endocrinology* 62. (281)

GRITSMAN, K., ZHANG, J., CHENG, S., HECKSCHER, E., TALBOT, W. S., SCHIER, A.F. (1999): The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling. *Cell* 97, 121-32.

GRUNWALD, D. J., EISEN, J. S. (2002): Timeline—Headwaters of the zebrafish emergence of a new model vertebrate. *Nature reviews. Genetics* 3. (9) 717–724.

GUAN, M., RAWSON, D. M., ZHANG, T. (2006): Effects of improved controlled slow cooling protocols on the survival of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes, *Cryobiology* 53, 377–378.

GUAN, M., RAWSON, D. M., ZHANG, T. (2008): Development of a new method for isolating zebrafish oocytes (*Danio rerio*) from ovary tissue masses. *Theriogenology* 69, 269–275.

HAFFTER, P., GRANATO, M., BRAND, M., MULLINS, M. C., HAMMERSCHMIDT, M., KANE, D. A., ODENTHAL, J., VAN EEDEN, F. J. M., JIANG, Y. J., HEISENBERG, C. P., KELSH, R. N., FURUTANI-SEIKI, M., VOGELSANG, E., BEUCHLE, D., SCHACH, U., FABIAN, C., NÜSSLEIN-VOLHARD, C. (1996): The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio. Development* 123, 1-36.

HANINGTON, P. C., TAM, J., KATZENBACK, B. A., HITCHEN, S. J., BARREDA, D. R., BELOSEVIC, M. (2009): Development of macrophages of cyprinid fish. *Developmental and Comparative Immunology* 33. (2009) 411–429.

HART, N. H. (1990): Fertilization in teleost fishes: mechanism of sperm-egg interactions. *International review of cytology* 121, 1-66.

HART, N. H., BECKER, K. A., WOLENSKI, J. S. (1992): The sperm entry site during fertilization of the zebrafish egg - localization of actin. *Molecular Reproduction and Development* 32. (217)

87

HART, N. H., YU, S. F. (1980): Cortical granule exocytosis and cell-surface reorganization in eggs of Brachydanio. *Journal Of Experimental Zoology* 213. (137)

HART, N. H., YU, S. F., GREENHUT, V. A. (1977): Observations on cortical reaction in eggs of brachydanio-rerio as seen with scanning electron-microscope. *Journal Of Experimental Zoology* 201. (2) 325-331.

HAUPTMANN, G. (1999): Two-color detection of mRNA transcript localizations in fish and fly embryos using alkaline phosphatase and beta-galactosidase conjugated antibodies. *Development genes and evolution* 209, 317-21.

HEDGER M. P. (2007): Immunologically privileged environments. *Cellular Transplantation* 567-590.

HEIM, R., PRASHER, D. C., TSIEN, R. Y. (1994): Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 12501–12504.

HEITZER, A., MALACHOWSKY, K., THONNARD, J. E., BIENKOWSKI, P. R., WHITE, D. C., SAYLER, G. S. (1994): Optical biosensor for environmental online monitoring of naphthalene and salicylate bioavailability with an immobilized bioluminescent catabolic reporter bacterium. *Applied And Environmental Microbiology* 60. (5) 1487-1494.

HILL, A. J., TERAOKA, H., HEIDEMAN, W., PETERSON, R. E. (2005): Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 86. (1) 6–19.

HISAOKA, K. K., FIRLIT, C. F. (1962): The localisation of nucleid acids during oogenesis in the zebrafish. *The American journal of anatomy* 110, 203-216.

HOLZSCHUH, J., RYU, S., ABERGER, F., DRIEVER, W. (2001): Dopamine transporter expression distinguishes dopaminergic neurons from other catecholaminergic neurons in the developing zebrafish embryo. *Mechanisms of development* 101. (1-2) 237-43.

HORN, P., ZSILINSZKY, S. (1983): Akvarisztika, Natura Kiadó, Budapest, 188-191.

HORVÁTH, Á. (2007): Cryobank of common carp sperm, a tool for the preservation of genetic resources. Workshop a ponty (*Cyprinus carpio*) genetikai erőforrásainak jellemzése és megőrzése. (előadás) HAKI, Szarvas, december, book of abstracts 8.

HORVÁTH, L. (1980): A ponty (*Cyprinus carpio* L.) petefejlődésének elemzése és szabályozása. *A halhústermelés fejlesztése* (9). Oláh J. (Szerk.) Haltenyésztési Kutató Intézet, Szarvas 6-21.

IRODALOMJEGYZÉK

HORVÁTH L., ORBÁN L. (1995) Genome and gene manipulation in the common carp *Aquaculture* 129, 157-181

HORVÁTH, L., URBÁNYI, B. (2000): Általános szaporodásbiológia. *Halbiológia és haltenyésztés* (egyetemi tankönyv) Horváth László (Szerk.) Mezőgazda kiadó, Budapest, 168-180.

HOUWING, S., KAMMINGA, L. M., BEREZIKOV, E., CRONEMBOLD, D., GIRARD, A., VAN DEN ELST, H., FILIPPOV, D. V., BLASER, H., RAZ, E., MOENS, C. B., PLASTERK, R. H., HANNON, G. J., DRAPER, B. W., KETTING, R. F. (2007): A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell* 129, 69-82.

HUSVÉTH, F. (Szerk.) (1994): A háziállatok élettana és anatómiája. Mezőgazda kiadó, Budapest, 263-271.

HWANG, G. L., AZIZUR RAHMAN, M., ABDUL RAZAK, S., SOHM, F., FARAHMAND, H., SMITH, A., BROOKS, C., MACLEAN, N. (2003): Isolation and characterisation of tilapia beta-actin promoter and comparison of its activity with carp beta-actin promoter. *Biochimica et biophysica acta* 1625, 11-8.

IWAMATSU, T., TAKAHASHI, S. Y., OHISHI, M., YOKOCHI, T., MAEDA, H. (1992): Changes in electrophoretic patterns of oocyte proteins during oocyte maturation in *Oryzias-latipes*. *Development Growth and Differentiation* 34. (2) 173-179.

JADUS, M. R., WEPSIC, H. T. (1992): The role of cytokines in graft-versus-host reactions and disease. *Bone marrow transplantation* 10, 1-14.

JIANG, Y. Q., ZHANG, T. T., YAN, W. X. (2010): Formation of zona radiata and ultrastructural analysis of egg envelope during oogenesis of Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) *Micron* 41, 7–14.

KABASHI, E., CHAMPAGNE, N., BRUSTEIN, E., DRAPEAU, P. (2010): In the swim of things: recent insights to neurogenetic disorders from zebrafish. *Trends in Genetics* 26. (8) 373-381.

KANE, D. A., KIMMEL, C. B. (1993): The zebrafish midblastula transition. Development 119, 447-56.

KANZLER, B., HAAS-ASSENBAUM, A., HAAS, I., MORAWIEC, L., HUBER, E., BOEHM, T. (2003): Morpholino oligonucleotide-triggered knockdown reveals a role for

maternal E-cadherin during early mouse development. *Mechanisms of development* 120, 1423-32.

KATASSONOV, V. J., TSVETKOVA, L. I., TITAREVA, L. N., KOCHETOV, A. A., MILENKO, V. A. (1995): Genetic cryobank: a genetic collection of cryopreserved fish sperm. (abstract). *Aquaculture*, 129 (216).

KESSEL, R. G., TUNG, H. N., ROBERTS, R., BEAMS, H. W. (1985): The presence and distribution of gap-junctions in the oocyte-follicle cell complex of the zebrafish, *Brachydanio-rerio. Journal Of Submicroscopic Cytology And Pathology* 17. (239)

KISS, I. (2000): Az ivarszervek felépítése. *Halbiológia és haltenyésztés* (egyetemi tankönyv) Horváth László (Szerk.) Mezőgazda kiadó, Budapest, 48-50.

KITAJIMA, K., KUROYANAGI, H., INOUE, S., YE, J., TROY, F. A., INOUE, Y. (1994): Discovery of a new type of sialidase kinase, which specifically hydrolyses deaminoneuaminyl (3-deoxy-d-glycero-d-galacto-2-o-nonulosonic acid) but not n-acylneuaminyl linkages. *Journal of Biological Chemistry* 269, 21415-21419.

KOBAYASHI, T., TAKEUCHI, Y., TAKEUCHI, T. AND YOSHIZAKI, G. (2007): Generation of viable fish from cryopreserved primordial germ cells. *Molecular reproduction and development* 74, 207-13.

KOTRIK, L., HETYEY, CS., HEGYI, Á., GÁL, J., URBÁNYI, B., LEFLER, K. K. (2008): Az ultrahang vizsgálat alkalmazása az afrikai harcsa ivari működésének jellemzésében. *Magyar Állatorvosok Lapja* 130. (8) 475.

LAHNSTEINER, F., BERGER, B., HORVÁTH, Á., URBÁNYI, B., WEISMANN, T. (2000): Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology* 54, 1477-1498.

LAM, S. H., CHUA, H. L., GONG, Z, LAM, T. J., SIN, Y. M. (2004): Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Developmental and comparative immunology* 28, 9-28.

LAMASON, R. L., MOHIDEEN MAPK MEST JR, WONG, A. C., NORTON, H. L., AROS, M. C., JURYNEC, M. J., MAO, X. Y., HUMPHREVILLE, V. R., HUMBERT, J. E., SINHA, S., MOORE, J. L., JAGADEESWARAN, P., ZHAO, W., NING, G., MAKALOWSKA, I., MCKEIGUE, P. M., O'DONNELL, D., KITTLES, R., PARRA, E. J., MANGINI, N. J., GRUNWALD, D. J., SHRIVER, M. D., CANFIELD, V. A., CHENG, K.

IRODALOMJEGYZÉK

C. (2005): SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science* 310. (5755) 1782-1786.

LAMBERT J.D.G. (1978): Steroidogenesis in the ovary of *Brachidanio rerio* (Teleostei). P.J. Gaillard és H.H. Boer (Szerk.): *Comparative Endocrinology*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 65-68.

LANGENAU, D. M., FERRANDO, A. A., TRAVER, D., KUTOK, J. L., HEZEL, J. P., KANKI, J. P., ZON, L. I., LOOK, A. T., TREDE, N. S. (2004): In vivo tracking of T cell development, ablation, and engraftment in transgenic zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101. (73) 69-74.

LEE, S. M., CHO, S. H., KIM, D. J. (2000): Effects of feeding frequency and dietary energy level on growth and body composition of juvenile flounder, Paralichthys olivaceus (Temminck & Schlegel). *Aquaculture Research* 31, 917–921.

LEFEBVRE, C., TERRET, M. E., DJIANE, A., RASSINIER, P., MARO, B., VERLHAC, M. H. (2002): Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. *The Journal of cell biology* 157, 603-13.

LEFLER KK, HEGYI A, BASKA F, GAL, J., HORVATH, A., URBANYI,B., SZABO, T. (2008): Comparison of ovarian cycles of Hungarian riverine fish species representing different spawning strategies. *Czech Journal of Animal Science* 53. (10) 441-452.

LIESCHKE, G. J., CURRIE, P. D. (2007): Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics* 8, 353-367.

LUBZENS, E., YOUNG, G., BOBE, J., CERDÁ, J. (2009): Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology* 165. (3) 367-389.

LUNDE, K., BELTING, H.G. AND DRIEVER, W. (2004): Zebrafish pou5f1/pou2, homolog of mammalian Oct4, functions in the endoderm specification cascade. *Current biology* 14, 48-55.

MAACK, G., SEGNER, H. (2003): Morphological development of the gonads in zebrafish. *Journal of Fish Biology* 62. (4) 895-906.

MALONE, T. E., HISAOKA, K. K. (1963): A histochemical study of the formation of deutoplasmic components in developing oocytes of the zebrafish, *Brachidanio rerio. Journal of Morphology* 112, 61-75.

MARIA, A. N., VIVEIROS, A. T. M., FREITAS, R. T. F., OLIVEIRA, A.V. (2006): Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture* 260, 298-306.

MASSER, M. P., RAKOCY, J., LOSORDO, T. (1999): Recirculating aquaculture tank production systems: management of recirculating systems. *Southern Regional Aquaculture Publication*, 452.

MATHAVAN, S., LEE, S. G., MAK, A., MILLER, L. D., MURTHY, K. R., GOVINDARAJAN, K. R., TONG, Y., WU, Y. L., LAM, S. H., YANG, H., RUAN, Y., KORZH, V., GONG, Z., LIU, E. T., LUFKIN, T. (2005): Transcriptome analysis of zebrafish embryogenesis using microarrays. *PLoS Genetics* 1, 260-76.

MÁTHÉ, Z. (2007): A pancreas szigetsejt transzplantáció korai eredményeit befolyásoló tényezők: az izolációs enzimek és a revascularisatio vizsgálata. *Doktori Értekezés*, Semmelweis Egyetem, 8-24.

MCCALLUM, C. M., COMAI, L., GREENE, E. A., HENIKOFF, S. (2000a): Targeted screening for induced mutations. *Nature biotechnology* 18. (4) 455-7.

MCCALLUM, C. M., COMAI, L., GREENE, E. A., HENIKOFF, S. (2000b): Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant physiology* 123. (2) 439-42.

MCCLURE, M. M., MCINTYRE, P. B., MCCUNE, A. R. (2006): Notes on the natural diet and habitat of eight danioin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology* 69, 553–570.

MIGAUD, H., MANDIKI, R., GARDEUR, J. N., FOSTIER, A., KESTEMONT, P., FONTAINE, P. (2003): Synthesis of sex steroids in final oocyte maturation and induced ovulation in female Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Aquatic Living Resources* 16, 380–388.

MITA, I., OBATA, C. (1984): Timing of morphogenetic events in tetraploid starfish embryos. *The Journal of experimental zoology* 229, 215-222.

MÜLLER, F., ALBERT, S., BLADER, P., FISCHER, N., HALLONET, M. STRAHLE, U. (2000): Direct action of the nodal-related signal cyclops in induction of sonic hedgehog in the ventral midline of the CNS. *Development* 127, 3889-97.

MUNRO, A.D. (1990): Tropical freshwater fishes. Munro, A.D., Scott, P., Lam, T.J. (Szerk.), *Reproductive Seasonality in Teleosts: Environmental Influences* CRC Press, Boca Raton, FL, 145–239.

IRODALOMJEGYZÉK

MÜLLER, F. (1996): Populációs génbeviteli eljárások fejlesztése és transzgének expressziójának vizsgálata halakban, *Kandidátusi értekezés*. Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ, Molekuláris Genetikai Intézet, Gödöllő.

MÜLLER, T., VÁRADI, B., HORN, P., BERCSÉNYI, M. (2003): Effects of various hormones on the sexual maturity of european eel (*Anguilla anguilla* L.) females. *Acta Biologica Hungarica* 54. (3–4) 313–322.

NAGY A. (szerk.) (2003) Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (third edition) 568-570

NAGY, A. CSÁNYI, V. (1984) A new breeding system using gynogenesis and sexreversal for fast inbreeding carp. *Theoretical and* Applied *Genetics*, 67: 485-490.

NAKANISHI, T., OTOTAKE, M. (1999): The graft-versus-host reaction (GVHR) in the ginbuna crucian carp (*Carassius auratus langsdorfi*). *Developmental and Comparative Immunology* 23, 15-26.

NASEVICIUS, A.; EKKER, S. C. (2000): Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nature Genetics* 26. (2) 216–20.

NAYLOR, L. H. (1999): Reporter Gene Technology: The Future Looks Bright. *Biochemical Pharmacology*, 58, 749–757.

NEMTSAS, P., WETTWER, E., CHRIST, T., WEIDINGER, G., RAVENS, U. (2010): Adult zebrafish heart as a model for human heart? An electrophysiological study. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48. (1) 161-171.

NEVID, N. J., MEIER, A. H. (1993): A Day-Night rhythm of immune activity during scale allograft rejection in the Gulf killifish *Fundulus grandis*. *Developmental and Comparative Immunology* 17. (3) 221-228.

NEWPORT, J., KIRSCHNER, M. (1982): A major developmental transition in early Xenopus embryos: II. Control of the onset of transcription. *Cell* 30, 687-96.

NEWTON H., AUBARD Y., RUTHERFORD A., SHARMA V., GOSDEN R. (1996) Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Human Reproduction* 11, 1487–91.

OBENSCHAIN, C., SILLITTI J. (2008): Zebrafish maintenance in Tecniplast system, Tecniplast 3rd Aquatic Specialist course Milano, Italy, Book of Abstracts: 4. OKUTSU, T., YANO, A., NAGASAWA, K., SHIKINA, S., KOBAYASHI, T., TAKEUCHI, Y., YOSHIZAKI, G. (2006): Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation. *The Journal of Reproduction and Development* 52, 685-93.

ORMO, M., CUBITT, A. B., KALLIO, K., GROSS, L. A., TSIEN, R. Y., REMINGTON, S. J. (1996): Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science* 273, 1392–1395.

PAKHOMOV, A. A., MARTINOV V. I. (2008): GFP Family: Structural Insights into Spectral Tuning. *Chemistry & Biology* 15, 755-764.

PATTERSON, G., DAY, R. N., PISTON, D. (2001): Fluorescent protein spectra. Journal of cell science 114, 837–838.

PELEGRI, F. (2003): Maternal factors in zebrafish development. Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists 228, 535-54.

PELEGRI, F., DEKENS, M. P., SCHULTE-MERKER, S., MAISCHEIN, H. M., WEILER, C., NUSSLEIN-VOLHARD, C. (2004): Identification of recessive maternal-effect mutations in the zebrafish using a gynogenesis-based method. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 231, 324-35.

PETRÁNYI, GY. (1986): Az immungenetika alapjai. Medicina könyvkiadó Budapest 1-385.

PULLIN, R. S. V., LOWE-MCCONNELL, R. H. (1982): The biology and culture of tilapias. *The International Center for Living Aquatic Resources Management (ICLARM) Conference Proceedings*, 7. ICLARM, Manila, Philippines.

PRITCHARD V.L., LAWRENCE J., BUTLIN R.K., KRAUSE J. (2001) Shoal choice in zebrafish, Danio rerio: the influence of shoal size and activity. *Animal Behavior* 62, 1085–1088.

RAHMAN, A.K.A. (1989): Freshwater fishes of Bangladesh. Zoological Society of Bangladesh, Department of Zoology, University of Dhaka, 364.

RANA, K.L. (1995): Preservation of Gametes. Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Szerk.) Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Stirling, *Blackwell Science*, 53-75.

RAYFIELD, L. S., BRENT, L., SAMUEL, K. (1988): Tolerance to minor histocompatibility antigens. *Immunology Letters* 17. (3) 253-259.

ROHNER N., BERCSÉNYI M., ORBÁN L., KOLANCZYK E. M., LINKE D., BRAND M., NÜSSLEIN-VOLHARD C., HARRIS M. P. (2009) Duplication of fgfr1 Permits Fgf Signaling to Serve as a Target for Selection during Domestication. *Current Biology* 19, 1642–1647.

ROMANO, N., TAVERNE-THIELE, A. J., FANELLI, M., ROSARIA-BALDASSINI, M., ABELLI, L., MASTROLIA, L. (1999): Ontogeny of the thymus in a teleost fish, *Cyprinus carpio* L.: developing thymocytes in the epithelial microenvironment. *Developmental and comparative immunology* 23, 123-137.

ROY, S. K., GREENWALD, G. S. (1985): An enzymatic method for dissociation of intact follicles from the hamster ovary: histological and quantitative aspects. *Biology of reproduction* 32, 203–15.

ROY, S. K., TREACY, B. J. (1993): Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertility and sterility* 59, 783–90.

RUGGERI, B.,. UBALDI, M., LOURDUSAMY, A., SOVERCHIA, L., CICCOCIOPPO, R., HARDIMAN, G., BAKER, M. E., PALERMO, F., POLZONETTI-MAGNI, A. M. (2008): Variation of the genetic expression pattern after exposure to estradiol-17b and 4-nonylphenol in male zebrafish (*Danio rerio*). *General and Comparative Endocrinology* 158, 138–144.

RYU, S., HOLZSCHUH, J., ERHARDT, S., ETTL, A. K., DRIEVER, W. (2005): Depletion of minichromosome maintenance protein 5 in the zebrafish retina causes cell-cycle defect and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 18467-72.

SAHA, S., SHIMIZU, M., GESHI, M., IZAIKE, Y. (2000): In vitro culture of bovine preantral follicles. *Animal reproduction science* 63, 27–39.

SAITO, T., FUJIMOTO, T., MAEGAWA, S., INOUE, K., TANAKA, M., ARAI, K., YAMAHA, E. (2006): Visualization of primordial germ cells in vivo using GFP-nos1 3'UTR mRNA. *International Journal of Developmental Biology* 50, 691-700.

SAITO, T., GOTO-KAZETO, R., ARAI, K., YAMAHA, E. (2008): Xenogenesis in Teleost Fish Through Generation of Germ-Line Chimeras by Single Primordial Germ Cell Transplantation. *Biology of Reproduction* 78, 159–166.

SAKAI, M. (1995): MHC genes in fish. Fish Patology 30. (2) 159-166.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989): Molecular cloning *Cold Spring Harbor, NY, USA: CSH Laboratory Press*

SANTOS, E. M., PAULL, G. C., VAN LOOK, K. J., WORKMAN, V. L., HOLT, W. V., VAN AERLE, R., KILLE, P., TYLER, C. R. (2007): Gonadal transcriptome responses and physiological consequences of exposure to oestrogen in breeding zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 83. (2) 134.

SATO, Y., MIYASAKA, N., YOSHIHARA, Y. (2005): Mutually exclusive glomerular innervation by two distinct types of olfactory sensory neurons revealed in transgenic zebrafish. *The Journal of neuroscience* 25. (20) 4889-97.

SAWANT, M. S., ZHANG, S., LI, L. (2001): Effect of salinity on the development of zebrafish *Brachydanio rerio*. *Current Science India* 81, 1347–1350.

SCHIER, A. F. (2007): The maternal-zygotic transition: death and birth of RNAs. *Science* 316, 406-7.

SEKI, S., KOUYA, T., TSUCHIYA, R., VALDEZ, D. M., JR., JIN, B., HARA, T., SAIDA, N., KASAI, M., EDASHIGE, K. (2008): Development of a reliable in vitro maturation system for zebrafish oocytes. *Reproduction* 135, 285-92.

SELMAN K., WALLACE R. A. (1982): Oocyte growth in the sheepshead minnow: Uptake of exogenous proteins by vitellogenic oocytes. *Tissue and Cell*, 14 (3): 555-571. p.

SELMAN, K., WALLACE, R. A. (1986): Gametogenesis in fundulus-heteroclitus. American Zoologist 26. (1) 173-192.

SELMAN, K., WALLACE, R. A. (1989): Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zoological Science* 6. (2) 211-231.

SELMAN, K., WALLACE, R. A., BARR, V. (1988): Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. V. The relationship of the yolk vesicles and cortical alveoli. *Journal of Experimental Zoology* 246. (1) 42-56.

SELMAN, K., WALLACE, R. A., SARKA, A., QI, X. (1993): Stages of oocyte development in zebrafish, *Brachidanio rerio. Journal of Morphology* 218, 203-224.

SERGANOVA, I., PONOMAREV, V., BLASBERG, R. (2007): Human reporter genes: potential use in clinical studies. *Nuclear Medicine and Biology* 34, 791–807.

SHAW JM, NAKAGATA Y. (2002) Cryopreservation of transgenic mouse lines. *Methods in Molecular Biology* 180, 207–228 SHRESTHA, T.K. (1990): Resource ecology of the Himalayan waters. Curriculum Development Centre, Tribhuvan University, Kathmandu, Nepal. 645.

SIMPSON E., ROOPENIAN D. (1997): Minor histocompatibility antigens. *Current Opinion in Immunology* 9, 655-661.

SON, O. L., KIM, H.T., JI, M. H., YOO, K.W., RHEE, M., KIM, C. H. (2003): Cloning and expression analysis of a Parkinson's disease gene, uch-L1, and its promoter in zebrafish. *Biochemical and biophysical research communications* 312. (3) 601-7.

SOOD, R., ENGLISH, M. A., JONES, M., MULLIKIN, J., WANG, D. M., ANDERSON, M., WU, D., CHANDRASEKHARAPPA, S. C., YU, J., ZHANG, J., PAUL LIU, P. (2006): Methods for reverse genetic screening in zebrafish by resequencing and TILLING. *Methods* 39, 220–227.

SPENCE, R., RUNA, K. F., REICHARD, M., HUQ, K. A., WAHAB, M. A., AHMED, Z. F., SMITH, C. (2006): The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology* 69, 1435–1448.

SPENCE, R., SMITH, C. (2005): Male territoriality mediates density and sex ratio effects on oviposition in the zebrafish, *Danio rerio. Animal behaviour* 69, 1317–1323.

SUMMERTONTON, J.; WELLER, D. (1997): Morpholino Antisense Oligomers: Design, Preparation and Properties. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* 7*, 187–95.

SZABÓ, T. (2000a): A valódi csontoshalak ikrájának morfológiája, élettana és megtermékenyülése. *Halbiológia és haltenyésztés (egyetemi tankönyv)* Horváth László (Szerk.) Mezőgazda Kiadó, Budapest, 185-194.

SZABÓ, T. (2000b): A szaporodás neuroendokrin szabályozása. Halbiológia és haltenyésztés (egyetemi tankönyv) Horváth László (Szerk.) Mezőgazda Kiadó, Budapest, 194-205.

SZTEIN J, SWEET H, FARLEY J, MOBRAATEN L. (1998) Cryopreservation and orthotopic transplantation of mouse ovaries: new approach in gamete banking. *Biology of Reproduction* 58, 1071–1074.

SZÜCS R., MERTH J., BUDAHÁZI A., GORZÁS A., ORBÁN L., JENEY ZS., BERCSÉNYI M. (2009) A ponty pikkelymintázat öröklődése, és az abból következő néhány gyakorlati következmény újragondolása. (előadás) *HAKI, Szarvas*, book of abstracts 1256

TAKEUCHI, Y., YOSHIZAKI, G., TAKEUCHI, T. (2003): Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. *Biology of reproduction* 69, 1142–1149

TATNER, M. F. (1986): The ontogeny of humoral immunity in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Veterinary immunology and immunopathology* 12, 93-105.

TIERSCH, T. R. (2000): Introduction. Tiersh, T.R., Mazik, P.M. (Szerk.): *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.

TOCHER, D. R., AGABA, M., HASTINGS, N., BELL, J. G., DICK, J. R., TEALE, A. J. (2001): Nutritional regulation of hepatocyte fatty acid desaturation and polyunsaturated fatty acid composition in zebrafish (*Danio rerio*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 24, 309–320

TOKUMOTO, T., TOKUMOTO, M., NAGAHAMA, Y. (2005): Induction and inhibition of oocyte maturation by EDCs in zebrafish. *Reproductive Biology and Endocrinology* 3, 69.

TREDE, N. S., ZAPATA, A., ZON, L. I. (2001): Fishing for lymphoid genes. *Trends in immunology* 22, 302-307.

TSAI, S., RAWSON, D. M., ZHANG, T. (2009): Development of cryopreservation protocols for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles using controlled slow cooling. *Theriogenology* 71, 1226–1233.

TYLER, C. R., SUMPTER, J. P. (1996): Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fishers* 6. (3) 287-318.

UCHIDA, D., YAMASHITA, M., KITANO, T., IGUCHI, T. (2004): An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 137, 11–20.

VAN DYK, T. K., MAJARIAN, W. R., KONSTANTINOV, K. B., YOUNG, R. M., DHURPATI, P. S., LAROSSA, R. A. (1994): Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat shock gene-bioluminescence gene fusions. *Applied and environmental microbiology* 60, 1414–1420.

VAN ROOD, J. J. (2002): On the Clinical Importance of Privileged Sites. *Human Immunology* 63, 799–804.

IRODALOMJEGYZÉK

VÁRADI, L., HORVÁTH, L. (1997): Production of fish chimeras from embryonic cells. *Acta Biologica Hungarica* 48. (1) 95-104.

WAGNER, D. S., DOSCH, R., MINTZER, K. A., WIEMELT, A. P., MULLINS, M. C. (2004): Maternal control of development at the midblastula transition and beyond: mutants from the zebrafish II. *Developmental cell* 6, 781-90.

WALL, D. A., MELEKA, I. (1985): An unusual lysosome compartment involved in vitellogenin endocytosis by Xenopus oocytes. *Journal of Cell Biology* 101. (5) 1651-1664.

WALLACE, R. A. (1985): Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. L. W. Browder (Szerk.) *Developmental Biology*, 1, Oogenesis. New York: Plenum Press, 127-177.

WALLACE, R. A., BEGOVAC, P. C. (1985): Phosvitins in *Fundulus* oocytes and eggs. Preliminary chromatographic and electrophoretic analyses together with biological considerations. *Journal of Biological Chemistry* 260, 11268-11274.

WALLACE, R. A., OPRESKO, L., WILEY, H. S., SELMAN, K. (1983): The oocyte as an endocytic cell. *CIBA Foundation Symposia* 98, 228-240.

WALLACE, R. A., SELMAN, K. (1978): Oogenesis in Fundulus-Heteroclitus .1. Preliminary-observations on oocyte maturation in vivo and in vitro. *Developmental Biology* 62, 354 1978

WALLACE, R. A., SELMAN, K. (1985): Major protein-changes during vitellogenesis and maturation of fundulus oocytes. *Developmental Biology* 110, 492 1985

WAN, H., HE, J., JU, B., YAN, T., LAM, T. J., GONG, Z. (2002): Generation of twocolor transgenic zebrafish using the green and red fluorescent protein reporter genes gfp and rfp. *Marine Biotechnology* 4. (2) 146-54.

WANG, H., TAN, J. T. T., EMELYANOV, A., KORZH, V., GONG, Z. (2005): Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio*. *Gene* 356, 91–100.

WATANABE, T. (1982): Lipid nutrition in fish. Comparative *Biochemistry and Physiology* 73B, 3–15.

WELSH, S., KAY S. A. (1997): Reporter gene expression for monitoring gene transfer. *Current opinion in biotechnology* 8, 617–622.

WESTERFIELD, M. (1995): The Zebrafish Book: a Guide for the laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)., Univ. of Oregon Press, Eugene, OR.

WHITE, R. M., SESSA, A., BURKE, C., BOWMAN, T., LEBLANC, J., CEOL, C., BOURQUE, C., DOVEY, M., GOESSLING, W., BURNS, C. E., ZON, L. I. (2008): Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell Stem Cell* 2. (2) 183–189.

WIENHOLDS, E., SCHULTE-MERKER, S., WALDERICH, B., PLASTERK, R. H. A. (2002): Target-Selected Inactivation of the Zebrafish *rag1* Gene. *Science* 297. (5) 99-102.

WIENHOLDS, E., VAN EEDEN, F., KOSTERS, M., MUDDE, J., PLASTERK, R. H., CUPPEN, E. (2003): Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish. *Genome Research* 13, 2700–2707.

WILDT D.E. (2000) Genome resource banking for wildlife research, management, and conservation. *ILAR Journal* 41, 228–234

WILLETT, C.E., CORTES, A., ZUASTI, A., ZAPATA, A. G. (1999): Early hematopoiesis and developing lymphoid organs in the zebrafish. *Developmental dynamics* 214, 323-336.

WILLIAMS, D. W., MULLER, F., LAVENDER, F. L., ORBAN, L., MACLEAN, N. (1996) High transgene activity in the yolk syncytial layer affects quantitative transient expression assays in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Transgenic Research* 5. (6) 433-442.

WOOD, K. V. (1995): Marker proteins for gene expression. *Current opinion in biotechnology* 6, 50–58.

WOOTON, R.J. (1998): The Ecology of Teleost Fishes, 2nd edition. Chapman and Hall, London. 404.

WURTS, W.A. (1993): Understanding water hardness. World Aquaculture 24, 1-18.

YAMAMOTO, K., ONOZATO H. (1968): Steroid-producing cells in the ovary of the zebrafish *Brachidanio rerio. Annotationes Zoologicae Japonenses* 41: 119-128

YAMAMOTO, K., OOTA, I. (1967): Fine structure of yolk globules in the oocyte of the zebrafish, *Brachidanio rerio. Annotationes Zoologicae Japonenses* 40: 20-27.

YOSHIZAKI, G., TAKEUCHI, Y., KOBAYASHI, T., TAKEUCHI, T. (2004): Primordial germ cells: a novel tool for fish bioengineering. *Fish physiology and biochemistry* 28, 453–457.

IRODALOMJEGYZÉK

YU, J., DENG, M., MEDVEDEV, S., YANG, J., HECHT, N. B., SCHULTZ, R. M. (2004): Transgenic RNAi-mediated reduction of MSY2 in mouse oocytes results in reduced fertility. *Developmental biology* 268, 195-206.

ZAPATA, A., CHIBA, A., VARAS, A. (1996): Cells and tissues of the immune system of fish. Iwama Q, Nakanishi T. (Szerk.) *The fish immune system: Organism, pathogen and environment* San Diego: Academic Press; 1996. p. 1-62.

ZAPATA, A., DIEZ, B., CEJALVO, T., GUTIÉRREZ-DE FRÍAS, C., CORTE A. (2006): Ontogeny of the immune system of fish. *Fish and Shellfish Immunology* 20, 126-136.

10 MELLÉKLETEK

M2 A kísérleteknél használt különböző fejlődési állapotú β-actin:yfp és AB follikulusokról készült referenciaképek

β -actin:YFP follikulusok (6,3xzoom)				AB follikulusok (6,3xzoom)		
1,/ms	11,7 <i>m</i> s afn	32,6 <i>ms</i>	red	1,7ms bf	32,6MS	100 ms
DI	ур	ур	100	DI .	уiр	reu
)		•				
-				-		
0		•		0		
30						
	۲	•				
0				0		
				-		
O e						
1						
		· · · ·				

M3 A felhasznált pufferek és oldatok

Blocking puffer:	10 ml 10x PBS, 1 ml 10% Tween 20, 2ml BSA (100mg/l), 1 ml DMSO(100%), 86ml dH ₂ O
BT-Fix:	220 mM szaharóz, 77 mM Na ₂ HPO ₄ , 23 mM NaH ₂ PO ₄ , 0,12 mM CaCl ₂ , 1,3 M paraformaldehid
Festő oldat:	5 ml Tris (pH 9,5), 2,5 ml 1M MgCl ₂ , 1 ml 5M NaCl, 0,5 ml 10% Tween 20, 41 ml dH ₂ O
Festő puffer:	10 ml festő oldat, 37,5 µl NBT, 50 µl BCIP
Holtfretter oldat:	3,5g NaCl, 0,2g NaHCO ₃ , 0,1g CaCl ₂ x2H ₂ O, 0,05g KCl, 11 dH ₂ O
MESAB:	0,2g Tricaine, 0,5g Na ₂ HPO ₄ (2H ₂ O), 50ml ddH ₂ O, (pH 7.0- 7.5)
mPBS:	2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 1mM NaH ₂ PO ₄ , 3,2 mM Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O
PBS:	0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,02 M PO ₄ , (pH 7,3)
PTW	500 ml 1x PBS, 5ml Tween 20 (10%)
SET pufferben	10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 50 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0,5% SDS
20x SSC;	3M NaCl, 300 mM Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇
TBE:	90 mM Tris, 90mM bórsav, 5mM EDTA (pH 8)
Zebrafish Ringer:	116 mM NaCl, 2,9 mM KCl, 1,8 mM CaCl ₂ , 5 mM HEPES, (pH 7)

M4 A mikroszatellit vizsgálatoknál felhasznált primerek listája

Kr		pozíció a	pozíció a		R primer	
	Marker	genomban	genomban	F primer		
	neve	(bp)	(CM)			
	G40488	15282682	32,5	GCCACAGCCAATCAGATTTT	AGGCATGTTTATTTGGCGAC	
	G41332	49759012	62,5	CAACAGTGATCACACCGACC	CTGCCCTTCTCTGAATCAGG	
2	G40775	17381172	43,1	GCTGAGCACTTTCAACACCA	TGCTGGACAAGATTCTTTGG	
	G41496	53289899	71,0	TGATACCTGTCAGCGAGTGG	CTGAGCAAAACACTGTCCACA	
3	G39857	23241535	50,4	GTGCCGCTTGGTAGAGAGAG	AGATTTAGGGAGCTCTCGGC	
	G40167	60654078	90,7	GACTCTGAGAACCAGCGGAG	TTTCATTGATTGAGCGCTTG	
	G39757	10304493	50,8	ATTAAAACCCACACACGCAA	GTCCCGCTCATTGTTTGTTT	
4	z1416	40822257	69,9	GGACACATGTTGAAACTCTACAGG	ACCTGCCCTACCCACTCC	
E	G40104	17815251	46,8	CTGTAGCCTGCAGTGTTGGA	CACCAGAGGGTCGTTTGTTT	
5	G41500	61802351	83,1	AGGAATGCGCTATGGGACGA	CACATCTGCCACTGAACCGG	
	G39512	10895396	39,5	TCAAACGCATCAGACTGGTC	ACAGACGATCAGATCAGGGG	
ь	G40164	39974714	81,0	CGCACATACATGCATCCAAT	GAAACAGCCTTGGAGGAGTG	
7	G40502	19370452	36,7	CGCCAAATCAAGATACTGCA	CGGAAATCGTAATATTGTAAAATGC	
(G40001	68265897	91,4	GCGAAATGCCAAAAATGATT	GGCGCCAAACTGTCAAATAA	
	G40019	11105304	43,3	TGGTAAGGGAAGGAATGACG	GCCTGTCATACCGCTCTGAT	
8	G39845	55016548	98,4	GCACACCATCATGATTGAGG	TGTGTTTCATCACGGTTTGC	
	G41751	3189495	23,5	ATTGTGCCTTGAGTGAGGCT	GAGGTGACTGCAACCGATTT	
9	G39758	49740810	80,7	TTGAGCTGTGAACAAGCCAC	CCTCTTCATCTGGCATCCAT	
	G40082	3057532	12.2	CTCCCAAGAGCCGTACACTC	CAGCCTTTAATGGACACCGT	
10	G40279	35313739	81,3	CCGCAGTGTCAGCAGAAAT	GCGCTCTTGTTTGACCTTTC	
	G41760	9285133	36.8	ACCAACCCTGAGGGAGTTTT	CCTTGCTACCGCTATGAATG	
11	G40527	43641910	72.9	TAGAGTCCCTCAACCCCACA	CAGCGGCCACACCCTTAC	
	G40496	17381044	22.3	CTGCCCTCTAGAGGTGATGC	GCCGACAGCAATATCTGAATG	
12	G40703	45821675	74.9	CTGCAGCCCTTGTCTAGACC	GGGTCTTTACACACTGGCAGA	
	G40404	3069721	25.2	GGCTTTTCTCCAGTGAGTGC	CATGTGCCTATTGCCAACTG	
13	G39785	51871254	76.0	GGTGACCTCATGGAAGCATT	AGCTACTGAAACCCTTTGGC	
	G41497	3829648	40.5	CGTCTTTTGCTCCTCTGGAC	CGAGCAGCATCACCTACAGA	
14	G39173	55436152	91.9	TCTGGAGCTGAGAGTGCTGA	TGTCTGAACACTGACGCACA	
	G40280	4700272	34.1	TGGAAAAACATGAATGCTGC	AACACCTGCTGGGTAAGTGC	
15	G40517	43709842	87.5	CACTGAAGCCTGTGAGGACA	TCTTGAAGATTGGCATGGCT	
	G40423	7188219	24.2	AAACACAATGCCTCTCCCAG	TCCAAAAACCACACGTAGCA	
16	G41652	45196237	71.9	CTGGCACTGTGGTTACCATG	AGCTGTGCTTGTGATGAACG	
	G40108	23397277	40.9	CCTCTTCCCACAAGTCCATT	TTCCCAATTAAAGCAAACGC	
17	G39892	50474095	81.0	ATCCAGCAGAACACCAAACC	TGAAACACTCCTGTGGGACA	
	G40750	25833116	23.2	GCGCTTGAAATTACAGCTCC	AGAGGCCAGTCTGTGGAGAA	
18	G40542	43897912	64.2	GAAACCCGTGAAGGTTTGAA	CTTGAACAGAGCAGAGTTCAGA	
	G41745	4215034	22.0	GCCTCAGTITCTGCAGATACTIT	AGGAAAAGCGTGAAAGCTGA	
19	G41144	40571840	68.4	GCAGCAACTAATTTGCATTTAA	GGTCTCAAGTGTCCCCAGAA	
	G41671	2628585	31.7	TTCTCTAAACCGCTGCAGGT	TCTCCTGAGAACCGAATCGT	
20	G40286	46273714	86.5	CAAACACCGAAATACATGCA	GCGGAAGACGGTTATTGAAA	
21	G40807	1545809	20.5	CACAGAAGGGCTGTGTGAGA	TGCGAGTTGACAGCCTGTAC	
	G40446	43639841	123,3	TTACTCTGTCTGCGGACACC	GCCGTGGTGCAATAGGTAGT	
22	G40445	3796209	17.2	GCGTAGACCACTCTGCCTTC	GGATTIGTAATACAATGTIGCIGC	
	G40844	35684788	61.6	AATCAGGTCAAAATCTGTCAGG	GTAACGCTGTACAGACCCCC	
23	G40342	1296612	47	TGCTGTTTCCCTGAGACAGTGG	AACACGAGATCGGCCTGTTTG	
	G40689	39676026	53.2	CAATGCGCTTATTTCACACG	ATGCGGTTAAAAGGATTGCA	
	G41661	10470817	37.0		GTGCCTTCCAATAAAGCCAA	
24	G40669	39337905	76.9		ATGATGAGCGGAGGAAAATG	
	G40538	1565164	21.9	TGCAGGTAAAAGCAAACCAA	AATCCCTGCTGAATCCTCAG	
25	G40040	32086008	57.1	TGGAGGTCAAATTCACTCAGG	TCAGTICITACICACCOGGG	
	10,0040	02000000				

	0.hét	1. hét	2. hét	3. hét	4. hét			
	gyakoriság (%)							
I. stádium	60,9±6,4	67,3 ± 12,3	$68,0 \pm 10,0$	63,3±6,6	55,9 ± 15,8			
II. stádium	26,4 ± 2,9	$19,9 \pm 6,1$	19,5±5,5	19,5 ± 3,0	22,8±9,0			
III. stádium	12,3 ± 3,8 ^{ac}	9,3±4,5ª°	8,3±4,2ª	12,8±3,8ªc	14,4 ± 6,9 ^{bc}			
IV. stádium	0,3±0,2ª	1,2 ± 0,8 ^{bc}	1,4 ± 0,6 ^{bc}	1,2 ± 0,6 ^{bc}	1,2±0,9 ^{ac}			
V. stádium	0,1±0,1ª	2,4 ± 2,0 ^b	2,8 ± 1,4 ^b	3,1 ± 1,2 ^b	5,7 ± 1,8 °			

M5 A petefészekmintákban számolt eltérő fejlődési stádiumú follikulusok gyakorisága az idő függvényében (összefoglaló táblázat)

A petefészekmintákban (n=10 hal/hét) számolt különböző fejlettségű follikulusok gyakorisága az idő függvényében. A különböző betűjelek statisztikailag igazolható különbséget jelölnek (ANOVA, P<0,05; Test of Homogeny eredményétől függően az I, II, III stádiumoknák Tukey teszt, IV., V. stádiumoknál Dunnet's teszt).




11 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, aki hozzájárult a vizsgálataim kivitelezéséhez és a dolgozatom elkészítéséhez. Sajnos nem áll módomban mindenkit név szerint megemlíteni, így a következőkben a legfontosabb személyeket, intézeteket emelném ki.

Témavezetők, Szakmai vezetők

Köszönettel tartozom szakmai vezetőmnek **Dr. Váradi Lászlónak**, hogy ennek a témának a kidolgozását rám bízta, szakmai előmenetelemet segítette.

Köszönetet szeretnék mondani **Dr. Müller Ferenc** társtémavezetőmnek, aki ha kellett kifogyhatatlan türelemmel és jószándékkal, ha kellett kíméletlen kritikával, gyakran pedig saját két kezével segítette munkámat, fejlődésemet.

Hálával tartozom a Halgazdálkodási Tanszék tanszékvezetőjének, **Dr. Urbányi Bélá**nak, aki a doktori tanulmányaim során mindig önzetlenül támogatott. Számára nem létezett lehetetlen, ha egy szakmai vagy magánéleti problémám megoldásra várt.

Úgy érzem személyükben nemcsak kiváló szakmai vezetőkre, hanem barátokra is találtam.

<u>Kollégák</u>

Sokat köszönhetek a **Halgazdálkodási Tanszék** minden munkatársának, akikkel az évek során együtt dolgoztam, külön szeretném kiemelni a következő személyeket:

Köszönöm **Dr. Horváth Lászlónak**, hogy halgazdálkodási tanulmányaim elméleti és gyakorlati megkezdésére lehetőséget biztosított és példaértékű életútján elsajátított szakmai tudását önzetlenül megosztotta velem.

Köszönetet szeretnék mondani **Dr. Hegyi Árpádnak**, hogy egyetemi éveimtől fogva mindig számíthattam rá, ha egy kis segítségre volt szükségem az élet bármely területén.

Köszönettel tartozom **Dr. Horváth Ákos**nak, **Dr. Kovács Balázs**nak, **Dr. Müller Tamás**nak és **Dr. Szabó Tamás**nak az önzetlen szakmai segítségükért.

Sokat köszönhetek egykori diáktársaimnak, illetve hallgatóimnak is. Névszerint Bencsik Dórának, Dr. Bokor Zoltánnak, Csorbai Balázsnak, Gazsi Gyöngyinek, Kotrik Lászlónak, Kovács Évának, Kovács Róbertnek, Dr. Lefler Kinga Katalinnak, Dr. Müllerné Trenovszki Magdolnának és Staszny Ádámnak.

Köszönetet szeretnék mondani továbbá **Béres Tibor**nak, valamit **Makádiné Farkas Anasztáziá**nak is a segítségükért.

Sokat köszönhetek a Karlsruhe Institute of Technology, Institute of Toxciology and Genetics dolgozóinak, név szerint Andreas Zauckernek, Yavor Hadzhievnek, Simona Schindlernek és Kalmár Évának. A segítségük nélkül nem valósulhatott volna meg ez a munka. Köszönettel tartozom nekik azért is, hogy feledhetetlen pillanatokat szereztek nekem a kinntartózkodásom alatt.

<u>Barátok</u>

Köszönettel tartozom **Czimmerer Zsolt**nak és **Hunyor Csabá**nak, hogy az elmúlt években jóban-rosszban mellettem voltak.

Család

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni Családomnak, hogy eljuthattam idáig. Köszönöm édesanyámnak **Szabó Ferencné**nek, édesapámnak **Csenki Imré**nek, a testvéreimnek **Csenki Csabá**nak és **Csenki Csillá**nak, nagyszüleimnek **Fekete Balázs**nak és **Fekete Balázsné**nak, valamint unokatestvéremnek **Fekete Balázs**nak hogy hittek bennem. Szívből köszönöm **Csenki Julianna Katalin**nak, **Szaulits Attilá**nak és **Szaulits Anná**nak azt, hogy mindvégig önzetlenül támogattak és nem hagytak elveszni az élet rengetegében. Köszönettel tartozom menyasszonyomnak **Bakos Katalin**nak az önzetlen segítségéért és türelméért, amellyel igazi társként mellettem állt a sokszor embert próbáló kihívások idején.