



Genetikai modellrendszerek

EGYETEMI JEGYZET, ELTE TTK, BIOLÓGIAI INTÉZET

SZERZŐK: DR. HOTZI BERNADETTE, DR. KOVÁCS TIBOR

SZAKMAI LEKTOR: KOVÁCSNÉ DR. SIGMOND TÍMEA ILONA

Cím: Genetikai modellrendszerek

Megjelenés éve: 2024

Támogatás: Eötvös Loránd Tudományegyetem, TTK Jegyzettámogatási Pályázat 2023

Munkaszám: K15301/16

Szerzők: Dr. Hotzi Bernadette, Dr. Kovács Tibor

Szakmai lektor: Kovácsné Dr. Sigmond Tímea Ilona

ISBN: 978-963-489-723-1

Tartalomjegyzék

GENETIKAI MODELLRENDSZEREK.....	3
ÁLTALÁNOS MEGFONTOLÁSOK	3
KLASSZIKUS GENETIKAI MODELLEK.....	15
BAKTÉRIUMOK.....	15
NÖVÉNYEK A GENETIKAI KUTATÁSOKBAN.....	26
<i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i>	35
ECETMUSLICA.....	47
ZEBRADÁNIÓ	57
HÁZIEGÉR	66
HUMÁN SEJTES RENDSZEREK (2D SEJTENYÉSZETEK)	73
HÁROMDIMENZIÓS SEJTKULTÚRÁK - ORGANOIDOK	83
SPECIÁLIS CÉLLAL VIZSGÁLAT MODELLEK.....	89
HÁZITYÚK	89
KUTYÁK.....	97
ÚJ GENETIKAI MODELLEK LÉTREHOZÁSA ÉS RELEVÁNCIÁJA.....	105

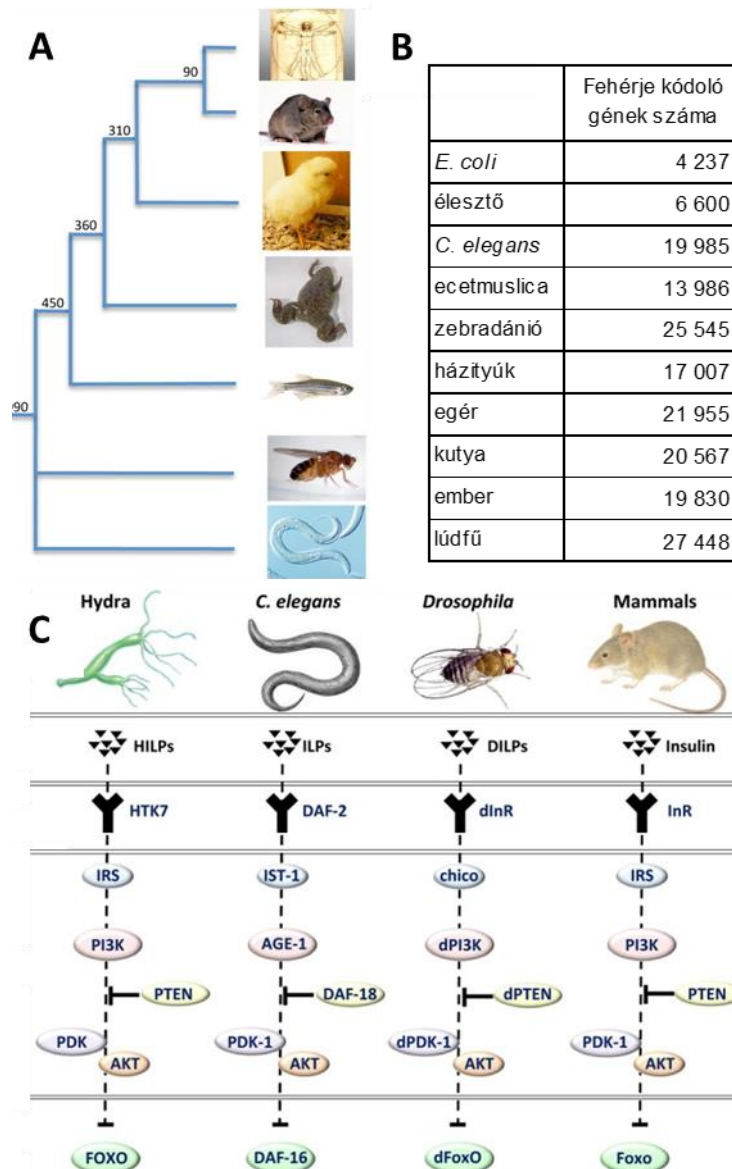
Genetikai modellrendszerek –

Általános megfontolások

A tudomány megközelítése szerint a modell egy egyszerűsített rendszer, ami hatékonyan kezelhető, vizsgálható, manipulálható. A modellélőlények olyan szervezetek, melyekben könnyen (könnyebben) lehet vizsgálni egyes biológiai folyamatokat, de a feltárt ismeretek más élőlényekben is igazak, vagy igazak lehetnek.¹ Az ember a maga anatómiájával, biológiai folyamataival, viselkedésével, pszichés működésével, szociális kapcsolatrendszerével egy igen komplex, nehezen vizsgálható élőlény, nem is beszélve az etikai megfontolásokról. Ezért modellélőlényeket alkalmazhatunk például az emberi betegségek okainak feltárására és a potenciális terápiás lehetőségek felderítésére is. Miért lehet alkalmazni az egyik élőlényben tett megfigyeléseket egy másik élőlényben? Az ok az élőlények közös evolúciós leszármazása. Minden élőlény bizonyos mértékű rokonságban áll egymással és hasonlóságot mutat a közös ősök miatt (1. ábra A). A genetikai kód, a metabolikus és genetikai útvonalak (1. ábra C), illetve a sejtek felépítése és működése alapvetően megegyezik a legtöbb élőlényben. Természetesen az hasonlóság annál nagyobb, minél közelebbi rokonokról van szó.¹⁻⁵

Korábban azt hitték a komplexebb élőlények jóval több génnel rendelkeznek, mint a kevésbé komplexek. Mára a genom projektek ezt megcáfolták. Például az 1 mm-es, első ránézésre csak egy csőnek látszó *C. elegans* közelítőleg hasonló számú fehérje kódoló génnel rendelkezik, mint a jóval komplexebb ember (1. ábra B). Az emberi gének körülbelül 70%-nak van *C. elegans* ortológja. A különbség inkább a gének kifejeződésének finomszabályozásában, illetve a géntermékek közötti kapcsolati hálózat komplexitásában van. Azonban az alapvető genetikai útvonalak igen konzerváltak az élővilágban. Természetesen kisebb-nagyobb eltérések vannak, minél távolabbi rokonról van szó, de ami genetikailag igaz a modell élőlényekre az nagy eséllyel igaz lehet a többi élőlényre, beleértve az embert is (1. ábra C). Ezért használhatóak ezek a modellrendszerek a genetikai kutatásokban.¹⁻⁷

Számos élőlényt vizsgáltak a tudomány története során, de viszonylag keveset alkalmaztak végül széles körben, mint modell élőlény. Felvetülhet a kérdés, hogy a Földön élő, feltehetően 10 milliónál is több szervezetből miért csak néhány, és mi alapján lett kiválasztva. Ahhoz, hogy egy fajból jó modellszervezet váljon számos kritériumnak kell megfelelnie.



1. ábra: A genetikai útvonalak konzerváltak. A közös evolúciós leszármazás miatt a genetikai kód, a metabolikus és genetikai útvonalak, illetve a sejtek felépítése és működése hasonló az élőlényekben. **A:** A filogenetikai fa néhány állatmodell és az ember evolúciós kapcsolatát mutatja. Az ágak hossza nem arányos az idővel, a számok mutatják hány millió évvel ezelőtt élt a legutolsó közös ő. (Módosított ábra)⁹ **B:** A legtöbb élőlény esetében a fehérjekódoló gének számában aránylag kicsi a különbség.⁶ **C:** A legfontosabb genetikai útvonalak igen konzerváltak az élővilágban. Az ábrán négy élőlény inzulin/IGF útvonala látható. (Módosított ábra)¹⁰

A kritériumok tudományterületenként kissé eltérhetnek, így mások lehetnek a legkedveltebb modellek is. Ebben a jegyzetben csak a genetikai modellrendszerekkel foglalkozunk. A genetikai kutatásokban a legismertebb modellszervezetek az *E. coli*, az élesztőgomba (*Saccharomyces cerevisiae*), a lúdfű (*Arabidopsis thaliana*), a *C. elegans*, az ecetmuslica

(*Drosophila melanogaster*), a zebradánió (*Danio rerio*), a házityúk (*Gallus gallus domesticus*) és az egér (*Mus musculus*) (2. ábra).^{1-5,8}

Mik a genetikai modellszervezetekkel szemben támasztott általános kritériumok? (2. ábra B) Először is könnyen fenntarthatónak kell lenniük (laboratóriumi körülmények között). Ezt több tulajdonság is befolyásolja. Általában kis méretű élőlényeket használnak modellként, például az 1 mm nagyságú *C. elegans*-okból egy 6 cm átmérőjű lemezen több ezer állat élhet, de még az egerek is csak 7-10 cm-esek. Fontos szempont, hogy olcsó legyen a fenntartásuk. Ez általánosságban a kisebb méretű élőlények esetén teljesül. Azonban előfordulhat, hogy egy kis méretű élőlénynek nagyon speciális igényei vannak, pl. nehezen beszerezhető táplálék, vagy csak speciális körülmények között élet- és szaporodóképes, ami jelentősen megnövelheti a költségeket. Előnyben vannak azok a szervezetek, amelyek nem túl érzékenyek a tartási körülményekre és nincsenek nagyon speciális betegségei (legalábbis a vad egyedeknek). A legtöbb modell olyan élőlények közül került ki, amik már alapvetően is az ember környezetében éltek, így ezek az életkörülmények tökéletesen megfelelnek számukra.^{1,4,5}

Érdeemes külön pontban kiemelni, hogy a modellélőlényeknek könnyen szaporíthatónak kell lenniük és megfelelően nagy utódszámmal kell rendelkezniük. A genetikai kutatásokban ez elengedhetetlen az öröklődés, a gének közötti kölcsönhatások vizsgálatához és a megfelelő kontrollszám eléréséhez, pl. egy hatóanyag vizsgálata során. Összehasonlításképp: egyetlen *C. elegans* hermafroditának 200-300 utódja lehet, melyek körülbelül 3 nap alatt nőnek fel, míg például egy afrikai elefánt közel kétéves vemhesség után 1 borjat hoz világra, ami körülbelül 14 év alatt lesz ivarérett.^{1,4,5,7}

A fejlődést, öregedést irányító genetikai útvonalak vagy egy betegség genetikai hátterének felderítéséhez egyértelműen előnyös a gyors életciklus, így minden (természetes) folyamatot rövid idő alatt megfigyelhető. Ezt a szempontot tovább erősíti, hogy egy-egy pályázat csak néhány évre biztosítja a kutatás anyagi hátterét. Sokkal könnyebb és gyorsabb egy pár nap/hét alatt felnövő és pár hétig/hónapig élő élőlényvel elvégezni a vizsgálatokat, mint egy évekig-évtizedekig fejlődő/öregedő élőlényvel.^{1,4,5}

A modellrendszereknek viszonylag egyszerűeknek kell lenniük. Erre jó példa a *C. elegans* és az *ecetmuslica*, melyek rendelkeznek már jellegzetes viselkedési mintázatokkal, tanulási képességekkel és idegrendszerrel, de ezek vizsgálata sokkal könnyebb, mint pl. az ember komplex idegi és viselkedési hálózatának feltérképezése. Ezekkel a modellekkel a viselkedés hátterében álló molekuláris faktorok sokkal egyszerűbben feltárhatóak.^{1,4,5,7,11}

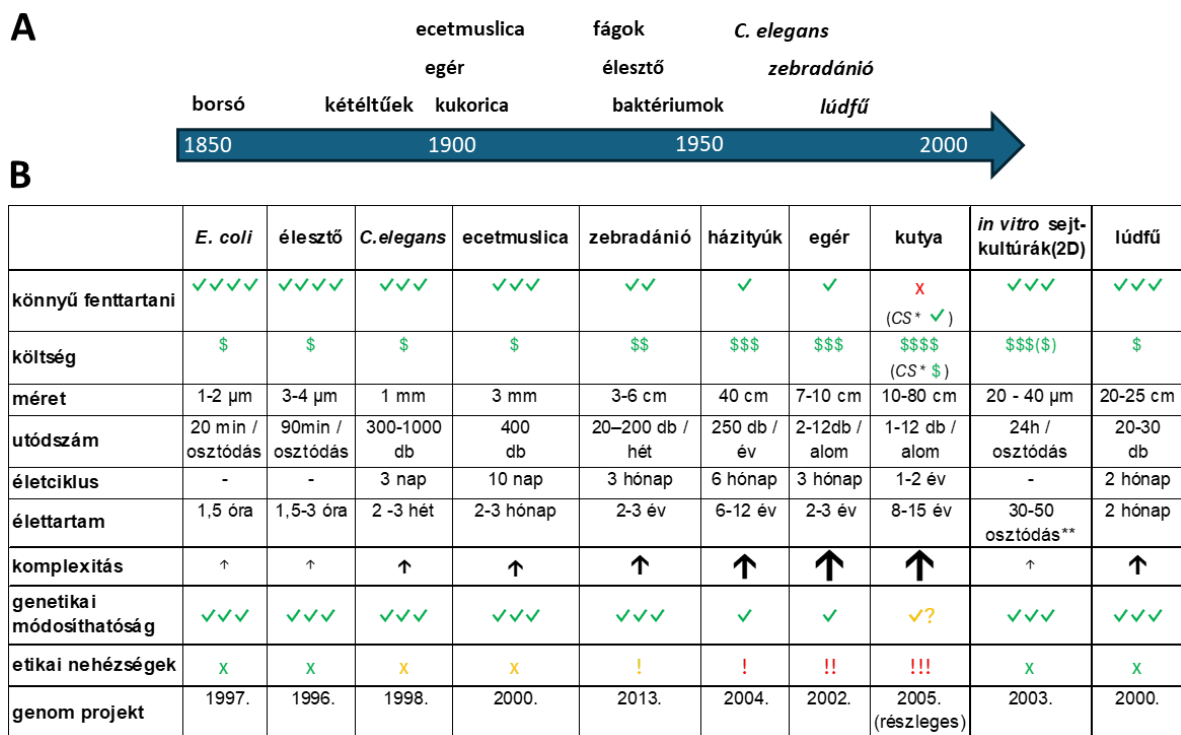
A genetikai modellrendszereknek genetikailag könnyen módosíthatónak kell lenniük, hiszen akkor lehet igazán jól megvizsgálni egy–egy folyamatot, ha tervezetten be lehet avatkozni, például létre lehet hozni a szükséges mutánsokat, betegségmodelleket, könnyen meg lehet figyelni a gének kifejeződését különböző markerekkel.^{1,4,5} A genetikai módosításhoz szükséges első lépés az külső örökítőanyag (DNS vagy RNS) bejuttatása a célsejtekbe. Baktériumok esetén ez történhet transzformációval, amikor az örökítőanyagot a környezetből veszik fel a sejtek. Laboratóriumi körülmények között fizikai vagy kémiai eljárásokkal teszik kompetensé a baktériumokat, hogy a megfelelő hatásra (pl. hőstressz) legyenek erre képesek. Ugyancsak baktériumok esetében működik a konjugáció, amikor két baktériumsejt közötti közvetlen, specifikus kontaktus során kerül át örökítőanyag a donorból a fogadó sejtbe. Transzdukciónak nevezzük, amikor vírus vagy vírus vektor közvetítésével jut örökítőanyag a baktérium vagy eukarióta sejtekbe. Baktériumok esetén jellemzően bakteriofágokat, míg például emlős sejtek esetén jellemzően retro- vagy adenovírusokat használnak erre a célra. Transzfekciónak pedig összeségében azokat a kémiai vagy fizikai módszereket nevezzük, amikkel laboratóriumi körülmények között génbevitel lehetséges eukarióta sejtekbe. (Meg kell jegyezni, hogy van, amikor egyes eukariótáknál is használják általánosságban a “transzformáció” elnevezést a külső örökítőanyag bevitelére.) A génbevitel “után” egy igen változatos és folyamatosan fejlődő eszköztár áll a kutatók rendelkezésére, ami lehetővé teszi a molekuláris szintű genetikai manipulációt. A különböző módszerek eltérnek hatékonyságukban, specifitásukban és modellszervezetekre jellemző tulajdonságaikban. Ezen jegyzet keretei között nincs mód átfogó és részletes képet adni az összes módszerről (genetikai alap és mesterkurzus, illetve géntechnológia témájú kurzusok tananyagában szerepelnek), de az egyes modellszervezeteknél kitérünk a bennük jelenleg használt legelterjedtebb módszerekre.^{1,4,5}

Bár a genetikai kutatások kezdeti időszakában ez nem volt kritérium, ma már egyértelmű előny, ha ismert az élőlény genomja. A fentebb említett modellszervezetek voltak azok is, amelyek segítségével kifejlesztették a genomok megismerésének módszereit is. Ennek köszönhetően mára sokkal egyszerűbbé vált a genomok megismerésének folyamat, ami lehetőséget ad új modellszervezetek bevezetésére is.^{1,4,5,12}

Egy inkább gyakorlati, de ugyanakkor fontos szempont, hogy a genetikai modellrendszereken végzett beavatkozások minél kevesebb etikai problémát hordozzanak magukban. Bár az *in silico* és *in vivo* vizsgálati módszerek fejlődésével egyre több tulajdonság prediktálható, egyszerűen elkerülhetetlen, hogy végül komplett élőlényeken is teszteljék a

hipotéziseket vagy kipróbáljanak új terápiákat, mert csak ezek vizsgálatával ismerhetők meg a valós biológiai folyamatok. Ez természetesen nem azt jelenti, hogy a modellélőlényekkel bármit meg lehet tenni, szigorúan szabályozott az élőlények tartása és vizsgálata is. (lásd a fejezet későbbi része).^{1,4,5,13,14}

Nem tartozik a „kritériumok” közé, de azokból az élőlényekből lettek érthető módon igazán jó modellek, melyek köré egy kutatói közösség szerveződött, akik standardizálták a tartási körülményeket, a módszereket, folyamatosan megosztották egymással és vitára bocsátották eredményeiket. Ezek a közösségek folyamatosan frissülő adatbázisokat és törzsbankokat tartanak fenn, hogy megkönnyítsék a közös munkát. Elképzelhetetlen lenne ezek nélkül hatékonyan és kellő mértékben megismerni és valóban hasznossá tenni egy-egy modellt.^{1,2,4,12}



2. ábra: Legismertebb genetikai modellrendszerek jellemzői. A: Az 1850-as évektől beszélhetünk érdemben genetikai modellrendszerek használatáról. Az évtizedek alatt számos modellszervezet került bevezetésre és a folyamat még nem állt meg. (Módosított ábra)⁴ B: A jelenleg legszélesebb körben alkalmazott genetikai modellrendszerek tulajdonságai. CS*: „*Citizen science*”- kutatók és kedvenceiknek bevonása a kutatásba, **: egészséges sejtvonalakra igaz, az immortalizált és/vagy rákos sejtvonalakra nem.

A fentiek tekintetében az már érthető miért nem alkalmazható bármelyik élőlény, mint genetikai modellrendszer. Azonban miért nem volt elég csak egyet, a legjobbat kiválasztani? Minél közelebbi rokonságban van egy élőlény az emberrel, annál több az ortológ gén és a

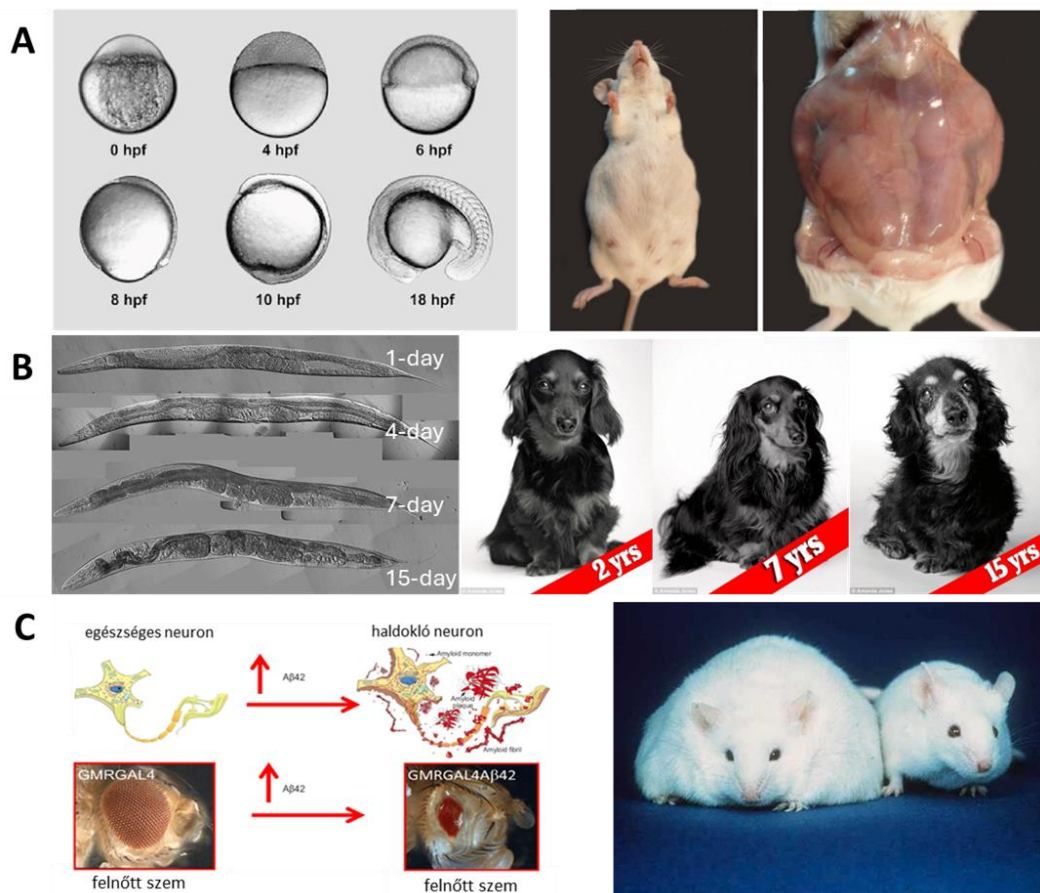
hasonlóság ezek kapcsolataiban, a rendszer komplexitásában, ugyanakkor annál bonyolultabb és drágább a vizsgálatuk. Ezeket tekintetbe véve a feltett kérdéstől függ melyik élőlényt érdemes használni a vizsgálatához. Például, amikor még a legalapvetőbb ismeretek sem álltak rendelkezésre a sejtciklusról, a DNS másolásáról, a hibajavításáról vagy a molekuláris kapcsolati hálózatokról, sokkal egyszerűbb és célravezetőbb volt egysejtű élőlények (pl. *E. coli*, élesztő) vizsgálatával kezdeni és nem komplex „sejttömeg”-ekével, mint például az egér. Természetesen az ismeretek bővülésével már érdemes lett (és könnyebb) komplexebb élőlényeket is bevonni ezekbe a vizsgálatokba, hogy az egyre bonyolultabb és specifikusabb finomszabályozást is fel lehessen deríteni.^{1,3-5}

Ugyanakkor például az egyedfejlődést nem lehet egysejtűekben vizsgálni, de nem volt érdemes azonnal az emlősökkel sem kezdeni, ahol az utódok az anya testén belül, rejtetten fejlődnek. Az alapvető, konzervált genetikai szabályozás vizsgálatánál sokkal könnyebb és egyszerűbb egy *C. elegans* vagy egy zebradánió korai egyedfejlődésének vizsgálatával kezdeni, hiszen mindkettő egyedfejlődése az anya testén kívül történik és az egész fejlődési folyamat alatt áttetszőek, így a sejtek és különböző fejlődési események, vagy az azoktól való eltérés könnyen nyomon követhető. Természetesen később ezekbe a vizsgálatokba is be kell vonni a komplexebb szervezeteket, hiszen például a placenta és magzat kapcsolata nem vizsgálható esetükben (3. ábra A).^{4,7,15,16}

Az öregedési folyamat vizsgálata során egy kezelés vagy mutáció hatását jóval gyorsabb első körben egy két-három hétig élő *C. elegans*-on vagy egy pár hónapig élő ecetmuslicán tesztelni, mint a 2 évig élő egereken. A komplexebb, esetleg emberhez közelebb álló szervezetekben érdemes csak a már előszűrt, potenciálisan fontos mutációkat, ágenseket vagy az öregedéshez köthető emlősspecifikus folyamatokat vizsgálni (3. ábra B).^{1,4,17,18}

Ha egy konkrét emberi betegség megismerése vagy terápia kidolgozása a cél, többféle megközelítés létezik és többféle betegségmodellt különböztethetünk meg ezzel összefüggésben. Ha a betegség komplex lefolyásának, a szervek közti kölcsönhatásoknak, az idegrendszer és immunrendszer hatásának vizsgálata fontos tényezők, akkor az emberi komplexitáshoz közelebb álló modell (pl. egér) választása a megfelelő. Ebben az esetben inkább homológ betegségmodelleket használunk, ahol ugyanazok az okok, a tünetek és a kezelési lehetőségek. Sok tekintetben ezek a legjobb betegségmodellek, de néha még ez a modell is túl komplexnek bizonyul, ami akadályozza a hatékony és gyors megismerést, főleg, ha még kevés az ismeret a témában. Izomorf betegségmodellekről beszélünk, ha a tünetek és a kezelés hasonló, de az okok már különböznek és prediktív betegségmodellekről, amikor csak

néhány jellemző azonos. Első megközelítésben az utóbbi tűnik a legkevésbé jónak a három modell közül, de komplex betegség egy-egy fontos komponensét, például a betegség hátterében álló molekuláris/sejtszintű változásokat sokszor könnyebb megérteni egy egyszerűbb rendszerben, ahol a folyamatnak csak egy-egy része van jelen. Sok ilyen betegségmodell található az egyszerűbb modellszervezetek (például *C. elegans*, *ecetmuslica*, zebrahal) között. A modellszervezetek akkor is hasznosak lehetnek, ha nincs és nem is lehet létrehozni egy betegség elég jó analógiáját. Az emberi vizsgálatokhoz szükséges eszközök-technikák kifejlesztésében, finomításában is jelentős szerepet tölthetnek be (3. ábra C).^{1,4,19,25}



3. ábra: A feltett kérdéstől függ melyik modellélőnyt érdemes használni. A: egyedfejlődést gyorsabb és könnyebb a külső megtermékenyítésű, áttetsző embriókkal rendelkező zebra-dánióban²⁰ vizsgálni, mint például a belső megtermékenyítésű egérben¹⁶, kivéve, ha például a tüdő kifejlődése a kérdés, hiszen az nincs zebra-dánióban. (*hpf*: hour post fertilisation, *dpf*: day post fertilisation) **B:** Az öregedés vizsgálata gyorsabb és egyszerűbb a 2-3 hétig élő *C. elegans*-ban, mint például 15-18 évig élő kutyákban, kivéve például, ha az öregkori demencia szociális kapcsolatokra gyakorolt hatása a kérdés, amihez már a kutyák komplex viselkedése a megfelelő modell.^{21,22} **C:** Az emlősök között sokszor jobbák a betegségmodellek (pl. genetikai alapú elhízás modellezése egerekben), mint a kevésbé komplex szervezetekben, ugyanakkor egy komplex betegség egy-egy molekuláris részletét könnyebb megérteni egyszerűbb modellekben (pl. neurodegeneratív *ecetmuslica* modellek).^{23,24} (Módosított ábrák)

Minden modellnél figyelembe kell venni az általános korlátokat is. Bár nagyfokú a konzerváltság az élővilágban, de az eredményeket automatikusan általánosnak tekinteni veszélyes. Bármilyen jónak is tűnik egy modell, lehetnek fajspecifikus eltérések, akár molekuláris szinten, akár például az immunrendszer különbségei miatt. Ezért is fontos minden vizsgálatnál, kezelésnél és gyógyszerfejlesztésnél több modellszervezeten is elvégezni a tesztek, majd a klinikai fázisban embereken is. A kutatások során nem csak az egy-egy modellszervezet köré szerveződő közösségekre van szükség, hanem ezek, illetve az összehasonlító vizsgálatokat végző kutatói közösségek együttműködésére is.^{1,2,26–29}

A modell élőlények mellett léteznek más genetikai modellrendszerek is, ilyenek az *in vitro* rendszerek, sejt kultúrák, 3D sejttenyészet és organoidok. Ezek használatát több dolog is indokolhatja. A modell élőlényekkel kapcsolatban felmerülő etikai problémákra-megfontolásokra jó alternatívát nyújtanak. Sok esetben olcsóbbak, mint egy modell élőlény. Lehetnek fajspecifikus eltérések is a modell élőlények és az ember között, míg ezek az *in vitro* modellek humán mintákból származ(hat)nak. Azonban a sejt kultúráknak, 3D rendszereknek is vannak korlátai. Bár egy humán sejttenyészet a legmegfelelőbb vizsgálati objektumnak tűnik, valójában nehéz biztosítani a valós élettani körülményeket, amelyek közt tényleg ugyanúgy működnek a sejtek, mint az élő szervezetben. Csak az genetikailag módosult immortalis sejt kultúrák vizsgálhatóak hosszú távon. Emellett ezek a rendszerek nem helyettesítik a betegség patológiájának vagy kezelésének komplex kölcsönhatásait, ami egy teljes, számos szervvel és szövetel rendelkező szervezetben megjelenik. Ilyen szempontból egy modell élőlény, az eltérések ellenére is, sokkal hasonlóbb eredményeket adhat.^{26–29}

A jegyzet eddig eléggé emberközpontúan beszélt a modell élőlényekről, mintha az lenne csak az értelmük, hogy segítségükkel az ember életműködéseit és betegségeit vizsgáljuk és gyógymódokat találjunk rájuk. Bár ez a cél rendkívül fontos és központi, nem szabad elfelejtkezni két másik nagy területről. Az egyik terület még mindig eléggé emberközpontú. Számos élőlényt használnak az iparban és a mezőgazdaságban gyógyszerek és élelmiszerek előállítására. A termelés minőségének és hatékonyságának javításához szükséges ezen élőlények alapvető megismerése és a módszerek fejlesztése. Ezen a területen is alapvető jelentőségük van az eddig felsorolt modellszervezeteknek, de a mezőgazdaság kapcsán külön is kiemelendő a jelentősége a növénygenetikai kutatásoknak. Ez a terület nem csak az élelmiszer előállításban fontos, de olyan kérdésekre is keresik a megoldásokat, hogy lehet nehézfémekkel szennyezett területeket megtisztítani vagy például az egyre nagyobb aszályoknak ellenálló növényeket tenyészteni.^{30–32}

A másik fontos terület az alap kutatás, melynek számos esetben nem az ember vagy az ember közvetlen szükségletei a központi kérdése. Sok alap kutatási projekt első körben értelmetlennek tűnhet egy kevésbé tájékozott laikus számára. Azonban ezek a kutatások teszik lehetővé, hogy valójában és előítéletek nélkül jobban megismerhessük hogyan is működik az élet, a genetika és akár végső soron az ember is. Ezen, viszonylag „nagyobb kockázatot” vállaló vagy akár apróbb kutatásokból születhetnek meg azok az eredmények, amik végül világrengető felfedezésekhez vezethetnek. A teljesség igénye nélkül álljon itt csak két példa. Barbara McClintock 1940-es években kezdte vizsgálni a kukoricaszemek színét, az abba megjelenő időnként szabálytalan, mozaikos mintázatot. Eredményei évtizedekig feküdtek a fiók mélyén, de ez a kutatás vezette őt el a mobilis genetikai elemek leírásához, melyeknek az utóbbi évtizedekben kezdik fölfedezni igazi jelentőségét számos területen pl. az öregedés szabályozásában is.³³⁻³⁶ Hasonló a helyzet a CRISPR/Cas9 rendszerrel, ami napjaink legígéretesebb génszabályozási eljárása és számos potenciális terápiás lehetőség alapja. Ennek a módszernek a mára világhódító útja azzal kezdődött, hogy kutatók figyelmesek lettek egy érdekes jelenségre a baktériumokban, és elkezdtek vizsgálni az úgynevezett “bakteriális immunrendszert”.³⁷ Elsőre se a kukoricaszemek, se a baktériumok vizsgálata nem látszik igazán fontosnak, de mára olyan eredmények születtek ezekből a vizsgálatokból, melyek az egész emberiségre kihathatnak.

Az állatkísérletek etikai szabályozása tekintélyes múltra tekint vissza. A brit parlament 1822-ben fogadta el az első állatvédelmi törvényt. Ez a szabályrendszer folyamatosan fejlődik, finomodik világszerte. Manapság az állatkísérleteket engedélyeztetni kell és már a tervezésnél úgy kell alakítani a kísérletet, hogy minél kevesebb állatot igényeljen, a legkevesebb érzékeny állatokat használja, melyeket a lehető legkevesebb fájdalom érjen csak, és ne legyenek olyan kísérletek, melyekben valóban potenciális hasznos eredmény nélkül használnának fel állatokat. Manapság a 3R (*replacement, reduction, refinement*) elv alapján történik a kísérletek tervezése és engedélyeztetése. A kísérletekben résztvevő kutatóknak, munkatársaknak rendszeres továbbképzéseken kell részt venniük mielőtt állatokkal dolgoznának. A jegyzetnek nem célja részletesen bemutatni a törvényi szabályozást és a 3R elvet, de néhány példán át szükségesnek tartjuk az alapelvek ismertetését.^{13,14}

Replacment, vagyis helyettesítés: az állatok mellőzése/helyettesítése minden lépésben, ahol lehet. Ehhez tartozik például, az *in vitro* és *in silico* módszerek alkalmazása, vagy az, hogy kísérletet végzők speciális eszközökön (pl. műanyag bábukon vagy másféle ok miatt már

elaltatásra került állattetemen) gyakorolnak be eljárásokat, mielőtt a valódi kísérleti állatok közelébe kerülnének. A helyettesítés elvébe beletartozik, hogy ahol, és amikor lehet, az alacsonyabb rendű fajokat használják a komplexebb élőlények helyett. A jelenleg szabályozás sokkal szigorúbb a „jogi értelemben vett állatokkal”, melybe a gerinchúrral rendelkező élőlények tartoznak. Az egysejtűek, *C. elegans*, *Drosophila* és a zebraadániók 5 napos korukig (utána szigorúbb szabályok!) nem sorolhatóak ide. (Természetesen a kevésbé komplex élőlényekkel való munkának is vannak szabályai és pénzügyi támogatást sem kaphat olyan kutatás, ami bár ilyen értelemben „nem állatokat” használ, de felesleges és nem megfelelően megtervezett. A kutatói és törvényhozói közösség időről időre felülvizsgálja ezeket a szabályozásokat is, így ezek a jövőben változhatnak.).^{13,14}

Reduction, vagyis csökkentés: minél kevesebb állat felhasználása a kísérletekben. Egy jól megtervezett kísérletben kevesebb állat kerül felhasználásra, mert nincs szükség felesleges ismétlésekre. Az adatok megosztása a kutatók közt (cikkek, adatbázisok, együttműködések) ugyanancsak csökkentik a kísérletek számát. Az is ide tartozik, ha egy kísérleti állat különböző szerveit közösen használják fel több különböző munkában, például, ha az adott vizsgálatban csak a májra van szükség, össze lehet fogni egy olyan kutatócsoporttal, akik egy másik szervet vizsgálnak, egy kezdő állatorvostan hallgató pedig még nyugodtan gyakorolhatja pl. a seböltést ugyanazon az állattetemen (tervezés, együttműködések).^{13,14}

Refinement, vagyis finomítás, tökéletesítés. Ide tartoznak a jól képzett munkatársak, akik nem vétnek olyan hibát az állatok tartásában, kezelésében, ami szükségessé tenné a kísérlet felesleges ismétlését. A megfelelő statisztikai módszerek ismerete, hogy már előre meg lehessen tervezni mennyi a szükséges, de minimális állatszám, amivel megbízható eredmények produkálhatóak. Ehhez a ponthoz tartozik például a kísérleti állatok megfelelő és szabályozott tartása vagy a kísérleti körülményekhez való akklimatizálása, amivel csökkenteni lehet a stresszből adódó nagy szórást és így kevesebb állatra lesz szükség a megfelelő statisztikai bizonyosság eléréséhez.^{13,14}

Az általános bevezető után a jegyzetben bemutatunk néhány konkrét genetikai modellrendszert, előnyeit, hátrányait és legfontosabb felhasználási területeit. Elsősorban a legismertebb, legszélesebb körben alkalmazott modellszervezetekre koncentrálnak, de néhány kevésbé ismert genetikai modellszervezetet is szeretnénk bemutatni.

Felhasznált irodalom:

1. Ankeny, R. & Leonelli, S. *Model Organisms. Model Organisms* (Cambridge University Press, 2020). doi:10.1017/9781108593014.
2. Fields, S. & Johnston, M. Whither Model Organism Research? *Science* vol. 307 Preprint at <https://doi.org/10.1126/science.1110247> (2005).
3. Davis, R. H. *The Age of Model Organisms*. *Nature reviews | Genetics* vol. 5 www.nature.com/reviews/genetics (2004).
4. Müller, B. & Grossniklaus, U. Model organisms - A historical perspective. *Journal of Proteomics* vol. 73 2054–2063 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.08.002> (2010).
5. Leonelli, S. & Ankeny, R. A. What makes a model organism? *Endeavour* vol. 37 209–212 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.endeavour.2013.06.001> (2013).
6. Ensembl genome browser 111. <http://www.ensembl.org/index.html>.(2024.03.01.)
7. Corsi, A. K., Wightman, B. & Chalfie, M. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *WormBook : the online review of C. elegans biology* 1–31 Preprint at <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.177.1> (2015).
8. Matthews, B. J. & Vosshall, L. B. How to turn an organism into a model organism in 10 ‘easy’ steps. *J Exp Biol* 223, (2020).
9. Wheeler, G. N. & Brändli, A. W. Simple vertebrate models for chemical genetics and drug discovery screens: Lessons from zebrafish and *Xenopus*. *Developmental Dynamics* 238, 1287–1308 (2009).
10. Martins, R., Lithgow, G. J. & Link, W. Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. *Aging Cell* 15, 196 (2016).
11. Rooke, R., Rasool, A., Schneider, J. & Levine, J. D. *Drosophila melanogaster* behaviour changes in different social environments based on group size and density. *Communications Biology* 2020 3:1 3, 1–6 (2020).
12. Tang, B., Wang, Y., Zhu, J. & Zhao, W. Web resources for model organism studies. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* vol. 13 64–68 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.01.003> (2015).
13. Prescott, M. J. & Lidster, K. Improving quality of science through better animal welfare: the NC3Rs strategy. *Nature Publishing Group* (2017) doi:10.1038/labam.1217.
14. The 3Rs | NC3Rs. <https://nc3rs.org.uk/who-we-are/3rs>.(2024.03.01.)
15. Avdesh, A. *et al.* Regular care and maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: An introduction. *Journal of Visualized Experiments* (2012) doi:10.3791/4196.
16. Pang, S. C., Janzen-Pang, J., Tse, M. Y., Croy, B. A. & Lima, P. D. A. The Cycling and Pregnant Mouse: Gross Anatomy. in *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy* 3–19 (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-394445-0.00001-1.
17. Taormina, G. *et al.* Longevity: Lesson from Model Organisms. *Genes (Basel)* 10, (2019).
18. Shukla, A. K., Scott, A. & Giniger, E. Invertebrate model organisms for aging research. *Anti-Aging Drug Discovery on the Basis of Hallmarks of Aging* 353–382 (2022) doi:10.1016/B978-0-323-90235-9.00004-5.
19. Simmons, D. The use of animal models in studying genetic disease: transgenesis and induced mutation. *Nature Education* 1(1):70 (2008).
20. Glass, A. S. & Dahm, R. The Zebrafish as a Model Organism for Eye Development. *Ophthalmic Res* 36, 4–24 (2004).
21. Herndon, L. A., Wolkow, C. & Hall, D. H. WormAtlas Aging Handbook - Introduction to Aging in *C. elegans*. *WormAtlas* (2018) doi:10.3908/wormatlas.8.4.
22. Dog Years features images of dogs from tiny puppies to ‘wise old souls’ | Daily Mail Online. <https://www.dailymail.co.uk/femail/article-3196698/Photographer-captures-heart-melting-images-dogs-tiny-puppies-wise-old-souls.html> (2015).
23. Sarkar, A., Irwin, M., Singh, A., Riccetti, M. & Singh, A. Alzheimer’s disease: The silver tsunami of the 21st century. *Neural Regen Res* 11, 693–697 (2016).
24. Nichols, T. W. Mitochondria of mice and men: Moderate magnetic fields in obesity and fatty liver. *Med Hypotheses* 79, 287–293 (2012).
25. Tkacs, N. C. & Thompson, H. J. From Bedside to Bench and Back Again: Research Issues in Animal Models of Human Disease. *Biol Res Nurs* 8, 78 (2006).
26. Introduction to Cell Culture. <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html>.(2024.03.01.)
27. Cell Culture Environment. <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-environment.html>.(2024.03.01.)

28. Segeritz, C. P. & Vallier, L. Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. *Basic Science Methods for Clinical Researchers* 151 (2017) doi:10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6.
29. Cell Lines. <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-lines.html> (2024.03.01.).
30. Yan, A. *et al.* Phytoremediation: A Promising Approach for Revegetation of Heavy Metal-Polluted Land. *Frontiers in Plant Science* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00359> (2020).
31. Mahmud, K., Makaju, S., Ibrahim, R. & Missaoui, A. Current progress in nitrogen fixing plants and microbiome research. *Plants* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3390/plants9010097> (2020).
32. Agricultural genetics - Latest research and news | Nature.(2024.március)
<https://www.nature.com/subjects/agricultural-genetics>.
33. Ravindran, S. Barbara McClintock and the discovery of jumping genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 20198–20199 (2012).
34. Sturm, Á. *et al.* Downregulation of transposable elements extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Communications* 2023 14:1 14, 1–18 (2023).
35. Gorbunova, V. *et al.* The role of retrotransposable elements in ageing and age-associated diseases. *Nature* 2021 596:7870 596, 43–53 (2021).
36. Ayarpadikannan, S. & Kim, H.-S. The Impact of Transposable Elements in Genome Evolution and Genetic Instability and Their Implications in Various Diseases. *Genomics Inform* 12, 98 (2014).
37. Gostinskaya, I. CRISPR–Cas9: A History of Its Discovery and Ethical Considerations of Its Use in Genome Editing. *Biochemistry (Mosc)* 87, 777 (2022).

Klasszikus genetikai modellek

Baktériumok

Bevezetés

Ebben a fejezetben nem egy faj, hanem a prokarióták, azon belül is a baktériumok, egy divergens, ősi csoport, kerülnek bemutatásra. A prokarióták nagyon meghatározóak a földi élet szempontjából. Ők voltak az első, élő szervezetek, amelyek megjelentek a bolygón és azóta benépesítették a teljes Földet. Rendkívüli változatosságra tettek szert, nagyon széles körben specializálódtak különböző metabolikus útvonalakra, rengetegféle energiaforrást, szénforrást képesek hasznosítani és éppen ezért olyan helyen is meg tudnak telepedni és túl tudnak élni, ahol az eukarióta sejteknek esélyük sincs. Maguknak az eukarióta sejteknek a létrejötte is annak köszönhető, hogy különböző prokarióta szervezetek szimbiózisba léptek egymással. Gyakorlatilag az eukariótákat a prokarióták a leszármazottjainak lehet tekinteni. A prokarióták életünk mindennapjait is meghatározzák. Ha a baktériumokra gondolunk sokszor a patogéneket értjük alattuk (amelyek betegségeket okoznak), azonban a saját testünkben is nagy tömegben élnek baktériumok. A baktériumok a béltraktusunkban, illetve különböző felületeinken védnek minket, ellátnak tápanyaggal. Életünk tehát elképzelhetetlen ezen szimbióták nélkül. A szabadon élő fajták általában nagyon jól összeegyeztethetőek a laboratóriumi körülményekkel, tehát könnyű és olcsó őket fenntartani.

A prokariótákról általánosságban elmondható, hogy haploid genomjuk van, amely egy darab cirkuláris DNS-en helyezkedik el. Sejtjeikben a genom nincs elhatárolva sejtmaggal a citoplazmától. Ez egészen különleges szabályozási lehetőségeket biztosít a gének kifejeződése szempontjából. A prokariótákra kis méret és gyors reprodukció a jellemző. A szaporodásuk idejét teljes mértékben meghatározza a genom méretük. Minél kisebb egy prokarióta genomja, annál gyorsabban képes osztódni. Gyakori jelenség ezekben az élőlényekben a horizontális géntranszfer, azaz folyamatosan géneket gyűjtenek környezetükből, ami lehetőséget biztosít számukra a gyors adaptációra. Ahhoz, hogy minimalizálni tudják a a genomjuk méretét és génexpressziós aktivitásukat, folyamatosan pontmutációkkal, elsősorban deléciókkal inaktíválják az éppen felesleges géneket. Ezen szekvenciákat gyakorta el is tüntetik a genomjukból, tehát egy folyamatos genomcsökkentés zajlik bennük. A genomcsökkentés még intenzívebbé válik éhezés vagy szélsőséges körülmények között. Ennek eredményeképpen Tehát a prokarióta genomról összességében elmondható, hogy rendkívül kompakt. Egy bakteriális genomnak körülbelül a 95%-a tartalmaz kódoló szekvenciákat, tehát tényleg rendkívül kompaktak. A génekben nincsenek intronok, ami szintén meggyorsítja a génexpressziós válaszidőt, melynek köszönhetően gyorsan képesek reagálni a megváltozott környezeti tényezőkre. A géneket operonokba tömörítik. Több azonos tulajdonságban szerepet játszó gén egyetlen promóter mögött található és egyetlen mRNS íródik át róla. Az operonos átíródásnak köszönhetően a szabályzó régiók

száma is csökken a genomban, hiszen nem kell azt génenként új szabályzó régiót kialakítani. A prokariótákra jellemző továbbá, hogy extra kromoszomális elemeket, plazmidokat is tartalmaznak. Az *Escherichia coli* volt az első olyan szervezet, amit a genom projekt keretében megszekvenáltak.¹ Azóta számtalan további prokarióta genomot szekvenciája vált ismertté, amelynek köszönhetően több ezer genom tölthető le az adatbázisokból megkönnyítve ezzel a bioinformatikusok munkáját.

A prokarióták laboratóriumi vizsgálata 1928-ig nyúlik vissza. Ez volt az az időszak, amikor megállapították, hogy a baktériumok képesek transzformációra, tehát szekvenciákat, genetikai anyagot tudnak felvenni a környezetükből, akár élettelen baktériumokból is. 1946-ban figyelték meg a rekombináció jelenségét. Ekkor írták le, hogy két különböző genetikai háttérrel rendelkező rokon baktériumtörzs hogyan tudja újra kombinálni a genetikai információját (megelőzve ezzel a jelenség leírását az eukariótákban). 1952-ben a baktériumoknak és a bakteriofágoknak köszönhetően tudták azonosítani, hogy az örökítőanyag a DNS. Szintén baktériumokban tudták kimutatni, hogy a DNS replikációja konzervatív módon történik. 1961 az Operon-modell leírásának éve. Az Operon-modell a sejtek génexpresszió szabályozásának egyik modellje. Történetileg a *lac* operon az egyik legérdekesebb, leírásával sokat meg lehetett tudni a transzkripció szabályozásáról.

A baktériumok kutatást segítő munkája a laboratóriumokban

A prokarióták, mint modellszervezetek viszonylag speciálisak, az eukarióta sejtek működésére vonatkozó információkat nem lehet kinyerni belőlük. Manapság a prokarióták vizsgálata egészen más szempontok miatt fontos, mint a múlt században folyó kutatások sorában. A molekuláris laboratóriumokban a baktériumok a mindennapi munka alapköveinek számítanak. Baktériumokat használunk különböző rekombináns DNS-ek felszaporításához, baktériumokból nyerünk különböző enzimeket, amelyekkel molekuláris biológiai munkákat tudunk végezni, általuk tudunk nagy mennyiségben előállítani kutatásokhoz szükséges enzimeket, fehérjéket. A prokariótákat ipari méretekben is hasznosítják. Fermentorokban állítanak elő különböző enzimeket vagy fehérjéket. A géntechnológia számos, bakteriális eredetű enzimet használ fel. Az endonukleáz enzimek a baktériumok számára védelmi mechanizmust biztosítanak, szekvenspecifikusan képesek hasítani a DNS-t, reverzibilis módon. Ez tette lehetővé a kutatók számára, hogy a kromoszomális DNS-t irányítottan, kezelhető méretű darabokra vágassák, a különböző darabokat rekombináns DNS formájában összeillesszék. A Taq polimerázt extrémofil, gejzirekben élő baktériumból nyerték ki. A hőrezisztens Taq polimeráz biztosítja azt, hogy egy laboratóriumban PCR-el in vitro körülmények között lehetséges nagy mennyiségben DNS-t felszaporítani.² A hagyományos klónozási folyamatban szintén baktériumokat használnak a kutatók, de restriktív enzimeket felváltó klónozási technikákat szintén baktériumoktól tanultuk. A helyi specifikus rekombinációt kiaknázó Gateway klónozás is ilyen. A baktériumokban a rekombinációt kihasználó technika a Gibson klónozás is. 2014-ben felfedezték a CRISPR/Cas9 technológiát³, amely leírásáért és alkalmazásáért 2020-ban adták Nobel-díjat.

A baktériumok genetikai módosítása egyszerűen kivitelezhető. A folyamatot megkönnyíti, hogy sok baktériumtörzs természetes módon transzformálható vagy kezeléssel kompetensé tehető, ezenfelül könnyen elektropolálhatóak. További DNS-bejuttatási lehetőséget kínál a módosított fágok és a konjugatív plazmidok használata. Korábban a transzpozábilis Mu fág segítségével végeztek random mutagenézist. Előnye, hogy a DNS bevitelét a fágfertőzés biztosítja, hátránya, hogy az integrálódott elem mozgása instabillá teszi a vonalakat. Manapság a stabilabb vonalak létrehozására módosított Tn5 transzpozont használnak, ami az integráció után további áthelyeződésekre nem képes, így stabil mutánsokra szelektálhatunk. Az inszerció helye belső primerekkel könnyen térképezhető. Irányított deléciókat, inszerciókat (pl.: fluoreszcens jelölések, tag-ek) rekombinációs módszerekkel, például a lambdafág eredetű λ Red rekombináz segítségével hozhatunk létre. Plazmidok segítségével könnyen termeltethetünk rekombináns gyógyszereket, mint protein-hormonok, vakcina-antigének, antitestek, citokinek, növekedési faktorok vagy véralvadási faktorok. Ahogy számos más modellnél tapasztaljuk, a bakteriális kutatások terén is előtérbe kerül a CRISPR/Cas9 rendszer használata, amely egyaránt hatékony irányított és random mutagenézis, illetve inszerciók létrehozása során.⁴

A baktériumok kutatásának napjainkban is van relevanciája. Manapság már nem egyedi baktériumok vizsgálatát végzik, hanem a metagenomikai kutatásokon van a hangsúly. A metagenomikai vizsgálatok alapja, hogy környezeti és humán mintákban nem egy-egy izolált baktériumot lehet találni, hanem egész közösségek élnek együtt. Azonban ezek a közösségek törékenyek, a mintavétel során elveszhetnek a különböző törzsek belőle és fenntartásuk is nehézségekbe ütközne laboratóriumi körülmények között (Részben azért, mert sok baktériumtörzsnek speciális körülményekre van szüksége a fenntartásához, izolálásához, az oxigén némelyikre káros lehet, bizonyos törzsek különleges tápanyagforrást igényelhetnek.) A baktériumtenyésztés helyét ezért a szekvenálási módszerek veszik át. A szekvenálási eredményeket részben genomikai, részben proteomikai szempontból vizsgálják. Köszönhetően több ezer rendelkezésre álló genomnak, rengeteg bioinformatikai információ van, ahol már azonosították az egyes törzsek specifikus működését. Ezért azonosítani lehet a környezeti mintákból a már ismert baktériumokat, illetve lehetőség van arra, hogy a még nem ismert baktériumokat jellemezzék. Az új fajok szekvenciáját rokonszekvenciákhoz illesztve össze lehet építeni egy teljes genomot anélkül, hogy látnák azt a törzset, amivel dolgoznak. Az összeállított szekvencia alapján meg tudják határozni, hogy milyen metabolizmussal rendelkezik az újonnan felfedezett baktérium, *Archea*, vagy más prokarióta.

A prokarióta közösségeket számos releváns szempontból lehet vizsgálni: Tanulmányozni lehet, hogy az azonos helyen előforduló baktériumok között milyen interakciók vannak? Hogyan képesek szabályozni a biofilmképzést? A prokariótákról nyert információknak orvosbiológiai felhasználása is van. Egészségünk szempontjából lényeges kérdés az, hogy bennünk milyen összetételű mikrobiom található. Az emésztőrendszerrel kezdve egészen az agyműködéséig számos szerv működéséről tudjuk,

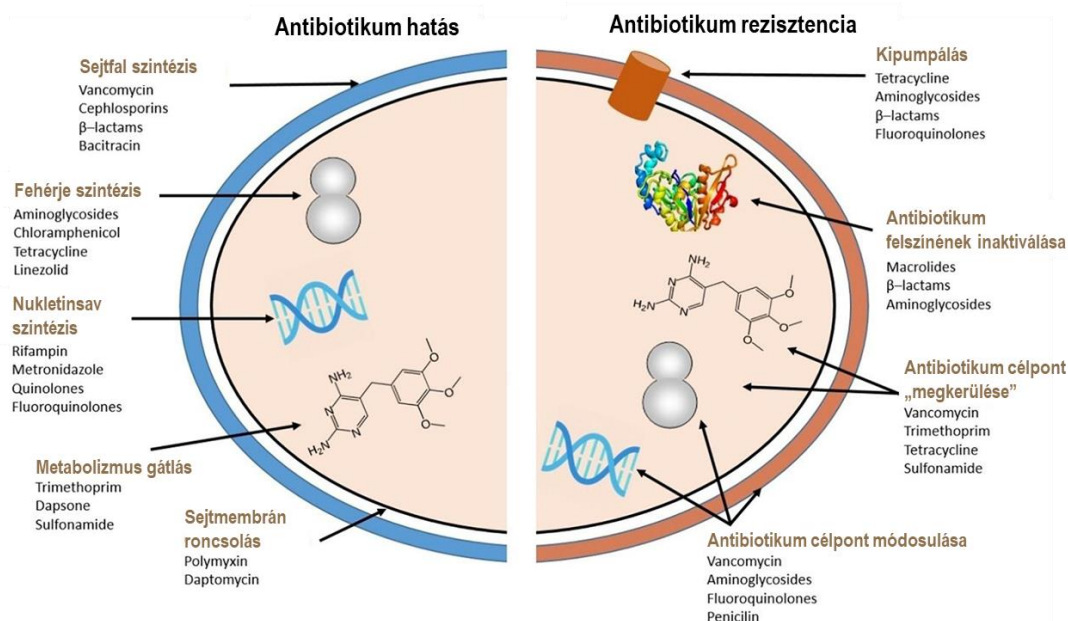
hogy működésükre és fiziológias állapotukra hatással vannak a velünk - bennünk élő prokarióták. Bár már számtalan ismeret áll rendelkezésünkre, ami segíti a prokarióta világ megértését, mégis egyre nagyobb kihívást jelent az orvostudomány számára a patogén baktériumok növekvő multidrogrezisztenciájának kérdése.

Az antibiotikum-rezisztencia

Egyes elképzelések szerint Nostradamus „égetett parfümököt, fűszeres és gyantás növényeket, babért, ciprust, borókát, balzsamot, tömjént, mirhát, rozmaringot. Ezt az eljárást a tudomány ma tökéletesen igazolta. Bizonyos parfümök és a boróka bogyójának elégetése folytán mikróbaölő aldehidek keletkeznek. Ma is fertőtlenítenek aldehidekkel, csak egyszerűbb és olcsóbb módon állítják őket elő.”* Az antibiotikumok közül elsőként 1928-ban Alexander Fleming azonosította a penicillint, ezek után kerültek be az antibiotikumok az orvosbiológia fókuszába. Rengeteg bakteriális betegséget nem tudtak az antibiotikumok felfedezése előtt gyógyítani. Ilyen volt például tüdőgyulladás vagy a pestis. Érdemes megjegyezni, hogy nem tudatosan, de a népgyógyászatnak köszönhetően, Fleming előtt is használtak már antibiotikumokat betegségek kezelésére. Maguk az antibiotikumok egyébként nem mérgek, de a baktériumoknak bizonyos metabolikus útvonalaival interferálnak. Az antibiotikumokat a természetben általában talajlakó mikroorganizmusok termelik azért, hogy megvédjék magukat az egyéb mikroorganizmusoktól (különösen fontos ez akkor, amikor szaporodási vagy növekedési állapotban vannak). Jellemzően kis molekulák, különféle metabolikus útvonalak közttermékei.⁵

Az antibiotikumok alkalmazásuk első évtizedeiben valóságos csodaszernek számítottak. A rezisztens törzsek megjelenésével azonban az antibiotikumok egyre hatástalanabbá váltak. Kezdetben a rezisztens törzsek megjelenése körülbelül 15 évet vett igénybe. Mára ez a folyamat rendkívül felgyorsult, akár egy évvel az új antibiotikum használata után már rezisztens törzseket lehet felfedezni.⁶ Az antibiotikumokat hatásmechanizmusuk alapján lehet csoportosítani. Képesek gátolni a sejtfallszintézist, metabolizmust, sejtmembránszintézist, fehérjeszintézist, DNS replikációt stb. Ezen folyamatok gátlása gyakran vezet a mikroorganizmusok pusztulásához (1. ábra).⁷ Egy baktériumtörzs, amely rendelkezik rezisztenciával egyfajta mechanizmussal „támadó” antibiotikummal szemben, könnyen lesz rezisztens egy másik, ugyanabba a csoportba tartozó antibiotikummal szemben is. Ezt a jelenséget keresztrezisztenciának nevezzük.

Az antibiotikumra sok baktériumfaj természetes módon rezisztens. Hiányozhat belőlük a célmolekula, például nincsen sejtfaluk és így a sejtfallszintézis gátlása hatástalan náluk, vagy olyan mutációt hordoznak, amely miatt védettséggel rendelkeznek bizonyos antibiotikumokkal szemben. Az ilyenfajta rezisztenciát általában a kromoszómájukon kódolják a prokarióták. A termelő sejtek is védettek az adott kismolekula ellen.⁸



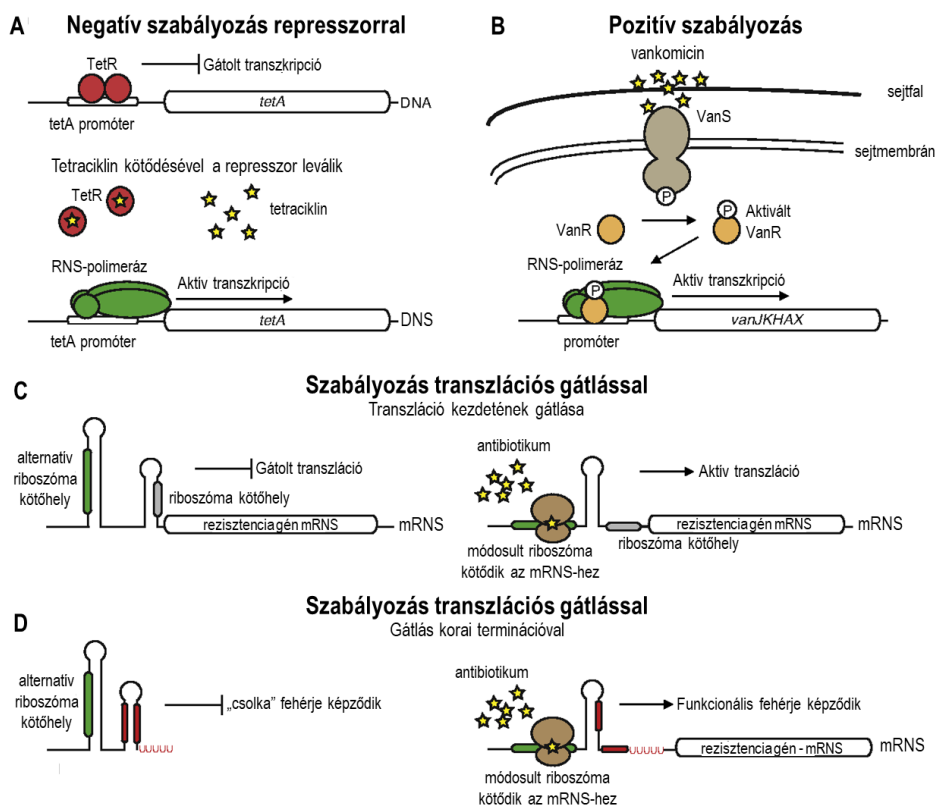
1. ábra: Az antibiotikumok hatás mechanizmusai és velük szembeni rezisztencia. Bal oldalt az antibiotikumok hatásmechanizmusai alapján vannak csoportosítva. Jobb oldalt a különböző antibiotikumokkal szembeni rezisztencia típusok láthatóak. Az ábra az alábbi tudományos közlemény módosításával készült.⁷

A baktériumok is szerezhetnek rezisztenciát, ennek kétféle mechanizmusa ismert. Abban az esetben, ha az antibiotikum nem elég nagy dózisban érintkezik a patogénnel, előfordulhat, hogy szaporodásuk közben előnyös mutációk zajlanak le bennük. 10^{-9} eséllyel megjelenhetnek olyan mutánsok, amelyek rezisztenssé válnak az antibiotikummal szemben. Ezt a folyamatot vertikális géntranszfernek hívják. Ez esetben *de novo* mutáció fog elterjedni a populációban. A mutáns sejt utódai is rezisztensek lesznek az adott antibiotikumra. Horizontális géntranszfer esetén az elpusztult, rezisztenciát hordozó baktériumsejtek maradványaiból, vagy vírus transzdukció következtében, vagy konjugációval nyerhetnek antibiotikum-rezisztencia tulajdonságot a sejtek. Horizontális géntranszfergéntanszfer ennek esélye 10^{-3} - 10^{-6} között lehet. Ez a kis szám azonban egészen máshogyan értelmezhető, ha számításba vesszük a baktériumok gyors szaporodó képességét. Ha a mikrobiomban jelen van egy antibiotikum-rezisztens baktérium (amelynek nem kell patogénnek lennie) nagy valószínűséggel válhat a minket megtámadó patogén is rezisztenssé az antibiotikummal szemben.

Rezisztencia gének szabályozása a baktériumokban

A rezisztenssé válásnak több útvonala lehetséges: megjelenhet egy transzporter, amely lebontja az antibiotikumot a sejtben, illetve a rezisztens sejtnek köszönhetően módosulhat a célmolekula is. Például egy riboszómát támadó antibiotikum esetén a riboszómán történhet olyan módosulás, amely miatt nem tud hatni az antibiotikum. Az antibiotikum elleni védekezés viszont a baktérium számára minden esetben hátránnyal jár. A baktériumnak egy olyan génkészletet kell kialakítania, amely

biztosítja, hogy egy adott közegben életben maradjon. Minden egyes új gén létrehozása és bekapcsolása energiaigényes folyamat, aminosavat és ATP-t fogyaszt. Ezért a baktériumok törekednek arra, hogy a lehető legkevesebb funkciót (aktív gént) használják egy időben. Antibiotikum-rezisztenciát kifejezni tehát nem érdemes antibiotikum jelenléte nélkül. A prokarióták génszabályozására leggyakrabban negatív szabályozás jellemző. Ilyen esetben a promóterhez egy represszor is tartozik, ami normál (antibiotikum mentes) körülmények között megakadályozza a védekezésre szolgáló gének átírását. Ezek a represszorok gyakran képesek kötődni egy típusú antibiotikumhoz. Az antibiotikum jelenlétében leválnak a promóterről, és aktiválódik a rezisztenciát biztosító gén átíródása. Létezik pozitív szabályozás is, ebben az esetben alaphelyzetben gátolt a rezisztencia gén átírása, viszont amikor megjelenik az antibiotikum, érzékelné fogja a baktérium (pl.: membránfelszíni receptorokkal) és aktiválni fogja a rezisztencia génátírást. További baktériumokra jellemző folyamatok is megfigyelhetők antibiotikum-rezisztencia esetén. Az attenuáció folyamata arra a jelenségre épül, hogy a prokariótáknak nincsen sejtmaghártya. A transzkripció és a transzláció egy időben és egy térben zajlik. Ezt kihasználva még az átíródó mRNS-en is történhetnek változások. Az mRNS is képes másodlagos szerkezettel rendelkezni, különböző hajtűkanyarok (loop-ok) jelenhetnek meg rajta. Az egyik fajta szabályozási mód, ami az mRNS-ek módosításra épül, amikor magát a transzlációt gátolják a kialakult hajtűkanyarok. Ez a jelenség főleg a riboszómára ható antibiotikumokkal szembeni rezisztencia génekre jellemző. Az mRNS tehát jelen lesz a sejtben, de a riboszóma nem tud rákötni, nem történik transzláció. Abban az esetben, ha megjelenik az antibiotikum és kötődik a riboszómához, a riboszóma szerkezete megváltozik. A riboszóma képessé válik egy alternatív helyen kötődni az mRNS-hez. A riboszóma - mRNS kötésnek köszönhetően másféle hajtű szerkezet jön létre az mRNS-en. Az mRNS térszerkezet változásával szabadabbá válik a riboszóma tényleges kötőhelye és elindul a rezisztenciát kódoló gén mRNS transzlációja. A másik lehetőség az antibiotikum rezisztencia gén szabályozására a transzkripció terminációs gátlása. Az éppen expresszázó mRNS ismételt hajtű szerkezetet hoz létre, amelyről csonka, használhatatlan mRNS fog létrejönni. Ismételt a riboszómához kötődő antibiotikum lesz az, ami megváltoztatja a riboszóma és közvetetten az mRNS konformációját. Ennek köszönhetően a teljes mRNS átíródik és elindulhat a rezisztenciáért felelős fehérjék átírása (2. ábra).⁹



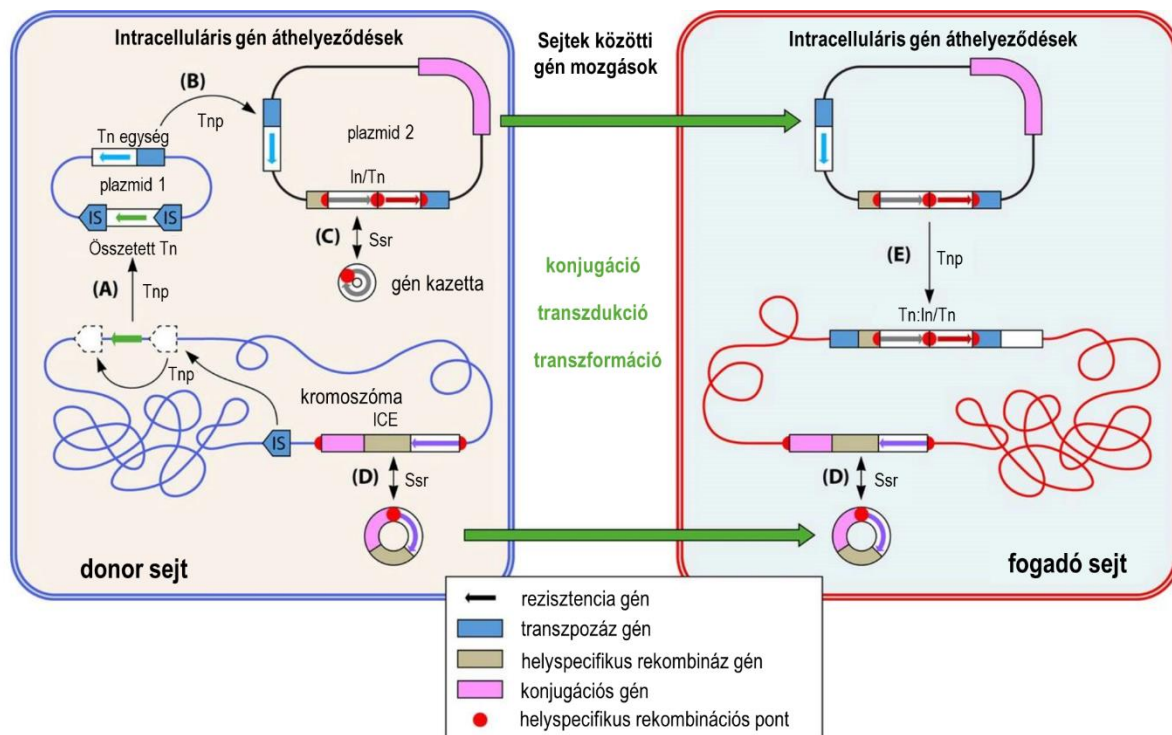
2. ábra: Az antibiotikum-rezisztencia gének szabályozása. A baktériumokban a rezisztencia gének aktivitása csak a baktériumra nézve káros ágensek jelenlétében hasznos. A rezisztenciát biztosító gének aktivációja antibiotikum jelenlétében több módon is megvalósulhat. **A)** Az tetraciklin elleni rezisztencia gén (*tetA*) átíródása egy represszorral gátolt (TetR). A tetraciklin képes kötődni a represszorhoz, így felszabadul a *tetA* promótere a gátlás alól és megindul a génátíródás. **B)** A VanS membránfehérje érzékeli a vankomicint és aktiválja a VanR szabályozó fehérjét. Az aktivált VanR katalizálja a vankomicin elleni rezisztencia gén (*vanJKHAX*) átíródását. **C-D)** Az antibiotikum rezisztencia gén szabályozása poszttranszkripcionálisan is történhet. Ilyen esetekben képződik mRNS, amelynek a transzlációja gátolt, vagy nem teljes. **C)** Az antibiotikum jelenlétében a riboszómák egy alternatív kötőhelyhez kapcsolódnak az mRNS-en, amelynek ettől megváltozik a térszerkezete és szabaddá válik a transzlációhoz szükséges riboszóma kötőhely. **D)** Antibiotikum jelenléte nélkül csonka fehérje képződik. A transzláció aktiválódása hasonlóképpen történik, mint az előző esetben. Antibiotikum jelenlétében az RNS-en olyan alakváltozások (hajtűkanyarok átrendeződése) zajlanak le, amivel lehetőség nyílik a teljes fehérje átíródására. Az ábra a Dar és Sorek 2017-es összefoglalója módosításával készült.⁹

Az antibiotikum-rezisztencia gének terjedésének mechanizmusai a mikrobiomban

A szakirodalomból ismert egy érdekes mechanizmus a rezisztencia gének szabályozására. Az antibiotikum rezisztenciáért felelős gének általában operonokba szerveződnek, és a transzpozonok részeit képezik. A kutatók találtak olyan transzpozont, amiben a *tetracyclin* rezisztencia gén található meg. Egy operonban a transzpozon mobilizációjáért felelős génekkel. Az operon promótere az előbb bemutatott negatív szabályozás alatt áll. Akkor válik aktívvá, ha tetraciklin jelenlétében megszűnik a

génátírás gátlása. Tehát a baktérium számára a tetraciklin megjelenése egyszerre fogja a rezisztenciát és a transzpozon mobilizációját is aktiválni.

Az antibiotikum vagy akár nehézfém rezisztencia géneket baktériumokban különféle mobilis elemek hordozhatják, a transzpozonok mellett génkazetták is kódolhatnak ilyen szekvenciákat. A bakteriális transzpozonok lehetnek összetett (két inszerciós elem határolja a rezisztenciagéneket) és egyszerű transzpozonok. A génkazetták kódoló szekvenciákat tartalmaznak, de nincsen promoterük. A baktériumsejtekben található integron típusú transzpozonok képesek összegyűjteni a génkazettákat helyspecifikus rekombinációval, ez a szekvencia promótert is tartalmaz. Tehát az integronok képesek a génkazettákban lévő géneket kifejeztetni, integrálódhatnak a genomba. Ezek az elemek rezisztencia plazmidokon tudnak átjutni egyik sejtől a másikba. Ez biztosítja az egész mikrobiom rezisztenciáját, amelyet egy elhalt baktériumból is fel lehet venni transzformációval, illetve ez a rezisztencia plazmid még konjugációra is képes lehet (3. ábra). Az inszerciós konjugatív elemek (ICE) is képesek a génkazettákat összegyűjteni. Ezek az elemek képesek szabad cirkuláris formában más sejtekbe konjugálódni vagy a genomba integrálódni, ugyanakkor nem képesek önmállóan replikálódni a sejtben.¹⁰ Előző példákban láttuk, hogy a rezisztenciáért felelős gének több módon átkerülhetnek mobilis elemekbe. Ezt követően pedig a kromoszóma és a különböző plazmidok között képesek a sejtben belül mobilizálódni, beépülhetnek a kromoszómába (integrálódni). A transzpozonoknak köszönhetően a rezisztenciagének könnyen terjedhetnek baktériumok között, azonban ezek energiaigényes folyamatok és normál körülmények között a transzpozonok felvétele és kifejeztetése hátrányt jelent a sejtek számára (3. ábra).¹¹



3. ábra: Antibiotikum-rezisztencia gének intracelluláris és sejtek közötti mobilizációs folyamatai. Az ábrán két különböző törzsből vagy fajból származó sejt látható, amelyek közül az egyik donorként (kékkel van jelölve a sejtmembránja, a kromoszómája és a benne található plazmid), a másik pedig recipiensként (piros színnel) funkcionál. A mobilis genetikai elemekhez (MGE-khez) kapcsolódó rezisztenciagéneket különböző színű vastagabb nyilak jelölik. A vékony fekete nyilak az intracelluláris MGE mozgás folyamatokat mutatják, a transzpozáz fehérje által közvetített folyamatok Tnp-vel, a helyspecifikus rekombinázoók által irányított folyamatok Ssr-rel lettek jelölve. A vastag zöld nyilak a sejtek közötti (horizontális) géntranszfert jelölik. **A)** Egy rezisztenciagént mindkét oldalán inszercióselemek határolják (IS-ek), amely gén helyspecifikus rekombinációval átkerülhet egy másik DNS-szekvenciába (pl.: a kromoszómáról egy plazmidra). **B)** A rezisztenciagént hordozó transzpozon (Tn) mozoghat plazmidok között, vagy plazmidokról a kromoszómára vagy fordítva. **C)** A plazmidokba és integronokba további génkazetták is beépülhetnek. **D)** Az ICE emelek integrálódhatnak a kromoszómába vagy kivágódhatnak onnan cirkuláris elemként, amely aztán konjugálódhat egy felvevő sejtbe és specifikus rekombinációval integrálódhat (reverzibilisen) a kromoszómába. **E)** Konjugációval a plazmidok képesek lehetnek sejtek közötti gén transzfert közvetíteni, vagy ha nincs konjugációs régiójuk, akkor egy másik plazmiddal fuzionálva mobilizálódhatnak (vagy alternatívaként horizontálisan mozoghat fág transzdukción vagy transzformáción révén is). A plazmidokon kódolt rezisztenciagének transzpozáz vagy helyspecifikus rekombinációval épülhetnek be a kromoszómába, vagy más plazmid(ok)ba a befogadó sejtben. Az ábra az alábbi publikáció ábrájának módosításával készült.¹¹

Antibiotikum-rezisztencia terjedésének összefüggései az emberi civilizációval

Egy 2018-as kutatás vizsgálta, hogy milyen koncentráció szükséges antibiotikumokból vagy nehézfémekből, amely képes fenntartani a rezisztenciát hordozó plazmidot a baktériumokban. A szükséges mennyiség körülbelül kétszázad része annak a koncentrációnak, amely az urbanizált környezetben előfordul. Az emberi tevékenység telítette a környezetet antibiotikumokkal, így a prokarióták arra szelektálódnak, hogy antibiotikum-rezisztencia géneket hordozzanak és terjesszenek. Számos olyan tevékenységet folytatunk, amely elősegíti ezt a jelenséget: Betegség esetén gyakran antibiotikumot szedünk, amelyet a szennyvízzel a környezetbe juttatunk. Nagyüzemű állattenyésztésben, növénytermesztésben mindennapos az antibiotikus kezelés. Az antibiotikum sósvízi terjesztésnek tipikus forrásai a halfarmok. A szárazföldi növénytermesztéssel, vagy állattenyésztéssel „csak” lokálisan, egy adott földterületet és annak a közvetlen környezetét szennyezzük antibiotikummal. A túlhalászás miatt halakat is tenyésztik. Ez a tenyésztés akkor kifizetődőbb gazdaságilag, hogyha medencék helyett tengervízben, körülhatárolt területeken hoznak létre haltenyészteteket. Ezek a halak ugyanúgy nagy tömegben fordulnak elő, mint ahogy a csirkék is a csirkefarmokon. Ugyanúgy nagyon könnyen adnak át egymásnak betegségeket, így antibiotikummal kell kezelni őket ahhoz, hogy megfelelő mennyiségű halat tudjanak kitermelni a folyamat végén. Ezekben a tenyésztetekben folyamatosan friss tengervíz érkezik az elkerített területre és kimossa az antibiotikumot. Tehát még nagyobb mennyiségben kell antibiotikumot felhasználni. A tengerek és

óceánok össze vannak kötve egymással a világon, így olyan helyen is felléphet antibiotikus szennyezés, ahol egyébként nincs mezőgazdasági tevékenység.¹²

Az antibiotikum-rezisztencia komoly egészségügyi és gazdasági probléma. Újabb antibiotikumok izolálása orvosbiológia jelentőséggel bír. Amint korábban már írtuk, az antibiotikumok metabolikus útvonalak közti termékei. Az *Actinomyces* törzsek jelentős antibiotikum termelőnek számítanak, belőlük számos antibiotikum típust lehet izolálni. Laboratóriumban fenntartva, sztenderd körülmények között meghatározott antibiotikumokat termelnek, viszont olyan metabolikus útvonalakkal is rendelkeznek, amelyek sztenderd körülmények között inaktívak.¹³ Egy tanulmányban CRISPR/Cas9 rendszerrel elronották az *Actinomyces*ek legfontosabb metabolikus útvonalait. Ezzel rávették őket, hogy alternatív metabolikus utakat kezdjenek használni. Az előidézett változásoknak köszönhetően 2 új potenciális antibiotikumot sikerült izolálniuk, amelyek ellen kevésbé tudnak gyorsan rezisztenciagének kialakulni a baktériumokban.¹³ 2013-ban szegedi kutatók egy, a rákos sejteknél is megfigyelhető jelenséget mutattak ki. Azon baktérium sejtek, amelyek valamelyike egy hatóanyag ellen rezisztenciát tud kialakítani, más hatóanyagokra túlérzékenységet mutathatnak. Ez a kollaterális szenzitivizáció. Hipotézisük szerint, ha a sejt egyfajta védekezésre „összpontosít”, akkor egy másik fajta hatással szemben gyengébbé válhat. Különböző antibiotikum-csoportokra rezisztens törzseket kezdtek el más csoportból származó antibiotikumokkal kezelni alacsony és magasabb koncentrációban. Kimutatták, hogy vannak olyan antibiotikum-rezisztens törzsek, amelyek más antibiotikumokra különösen érzékenyek. Multidrogrezisztens törzsek esetén ki lehet zárni, hogy mely antibiotikumokkal nem érdemes kezelni a beteget (mert nem várható javulás), de egyúttal az is megállapítható, hogy melyik másik csoportba tartozó antibiotikum lesz, amire a szervezetben lévő multidrogrezisztens baktériumok különösen érzékenyek lehetnek.⁸ A jelenségre magyarázat lehet, hogy amikor egy adott génkészletet használ a sejt, akkor az összes többi génje deléciós hatásoknak van kitéve, mutációkkal elveszthetnek génfunkciók. Ezek a mutációk fogják őt képtelenné tenni arra, hogy az újabb antibiotikumnak ellenálljon. Az elméletet egy másik kutatócsoport igazolta, akik antibiotikumra szélsőségesen rezisztens baktériumokat hoztak létre. Megállapították, hogy abban az esetben, ha glükóz szénforráson tartották az extrém magas antibiotikum koncentrációnak kitett baktériumokat, azok jobban tudtak alkalmazkodni az antibiotikum koncentrációhoz, mint más szénforrás esetén. Megvizsgálták ezen baktériumok metabolikus útvonalait, vizsgálták a glükózfogyasztást, oxigénfelhasználást és egyéb jellemzőiket. A vizsgált három antibiotikumból kettő esetében nagyon eltolódott metabolizmust találtak a sejtekben. A sejtekről szekvenálás után (nagy mennyiségű - 190 vonalat vizsgáltak) megállapították, hogy a metabolikus útvonalak génjei nagyobb arányban hordoztak mutációkat, mint a kontroll (magas antibiotikumkezelésnek nem kitett) sejtek. A szegedi kutatócsoportéhoz hasonlóan ők is azt találták, hogy az extrém magas antibiotikum koncentrációnak ellenálló sejtek, más típusú antibiotikum kezeléseknél kevésbé tudnak ellenállni.¹⁴ Ilyen jellegű kutatások a jövőben újraértelmezhetik az

antibiotikum kezeléseket és csökkenthetik a kockázatát az antibiotikum-rezisztens baktérium fertőzéseknek.

Összefoglalás

A prokarióta genetikai kutatások számos innovatívnak számító módszertani praktikát adtak a kutatók kezébe. A bioinformatika valamint a szekvenálási technikák fejlődésével a mikrobiomokról szerzett tudásunk az elmúlt időkben rohamosan gyarapszik, az új módszerekkel kapott adatok elemzésével gazdasági és egészségügyi szempontokból is releváns információkat kaphatunk a jelen és a jövő emberiségének számára egyaránt.

Köszönetnyilvánítás

A fejezetben leírtak alapjául Dr. Sigmond Tímea előadása szolgált. Köszönjük, hogy évente színvonalas és naprakész tudásanyaggal járul hozzá a kurzusunkhoz! Továbbá köszönjük neki a fejezet tartalmával kapcsolatos szakmai konzultációt!

Felhasznált irodalom:

1. Blattner, F. R. *et al.* The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453–1462 (1997).
 2. Saiki, R. K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487–491 (1988).
 3. Doudna, J. A. & Charpentier, E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**, 1258096 (2014).
 4. Sheridan, P. O., Odat, M. Al & Scott, K. P. Establishing genetic manipulation for novel strains of human gut bacteria. *Microbiome Res. reports* **2**, 1 (2023).
 5. Stokes, J. M., Lopatkin, A. J., Lobritz, M. A. & Collins, J. J. Bacterial Metabolism and Antibiotic Efficacy. *Cell Metab.* **30**, 251–259 (2019).
 6. Ventola, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T* **40**, 277–283 (2015).
 7. Uluseker, C. *et al.* A Review on Occurrence and Spread of Antibiotic Resistance in Wastewaters and in Wastewater Treatment Plants: Mechanisms and Perspectives. *Front. Microbiol.* **12**, 717809 (2021).
 8. Lázár, V. *et al.* Bacterial evolution of antibiotic hypersensitivity. *Mol. Syst. Biol.* **9**, 700 (2013).
 9. Dar, D. & Sorek, R. Regulation of antibiotic-resistance by non-coding RNAs in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **36**, 111–117 (2017).
 10. Bhat, B. A. *et al.* Integrons in the development of antimicrobial resistance: critical review and perspectives. *Front. Microbiol.* **14**, 1231938 (2023).
 11. Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N. & Jensen, S. O. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **31**, (2018).
 12. Watts, J. E. M., Schreier, H. J., Lanska, L. & Hale, M. S. The Rising Tide of Antimicrobial Resistance in Aquaculture: Sources, Sinks and Solutions. *Mar. Drugs* **15**, (2017).
 13. Culp, E. J. *et al.* Hidden antibiotics in actinomycetes can be identified by inactivation of gene clusters for common antibiotics. *Nat. Biotechnol.* **37**, 1149–1154 (2019).
 14. Zampieri, M. *et al.* Metabolic constraints on the evolution of antibiotic resistance. *Mol. Syst. Biol.* **13**, 917 (2017).
- * Vághidi Ferenc. Nostradamus élete és jövője a XX. századra. cserépfalvy, 1940. Budapest. 14. oldal <https://mek.oszk.hu/15200/15294/15294.pdf>

Növények a genetikai kutatásokban

Bár a növényeken végzett genetikai kutatásoknak nem célja az emberi szervezet működésének és betegségeinek megértése, vétek lenne azt hinnünk, hogy kevésbé fontosak. A növények vizsgálata központi szerepet töltött be a genetikai kutatások múltjában és elvitathatatlan szerepük a jelenünk és a jövőnk alakításában. Jelenlegi tudásunk szerint 13 000-11 000 évvel ezelőtt kezdődött meg a növények házasítása, és már a „genetika előtti időkben” a növénynevelés szolgált az első és legalapvetőbb ismeretekkel az öröklődéssel, keresztezésekkel kapcsolatban.¹ A „genetika atya”, Mendel is borsókkal végezte kísérleteit és ezen kutatások alapján alkotta meg máig elvitathatatlan (bár azóta kiegészített) törvényeit.² A későbbiekben is számos alapvető fogalmat növényekkel foglalkozó kutatók vezettek be a genetika, a populációgenetika és evolúcióbiológia tudományába. Több, ma használatos molekuláris genetikai módszer alapjait növényekben fedezték fel, gondoljunk csak az ugráló genetikai elemekre vagy az RNS interferencia első megfigyelésére.^{3,4} Számos növényeken végzett alapkutatás olyan folyamatokat, módszereket vizsgál, amelyek más élőlényekben is hasznosak lehetnek, hiszen eukariótaként az alapvető sejtszintű, molekuláris működésük nagyon hasonló. Azonban vannak csak/elsősorban növényekben vizsgálható jelenségek is, mint a kloroplasztisz genetikai állománya, bizonyos másodlagos anyagcseretermékek, vagy a növények között sokkal elterjedtebb poliploidia. Táplálkozásunk alapját képezik a növényi élelmiszerek, így a kutatások alapvető fontosságúak a mezőgazdaság számára. Számos kutatás foglalkozik azzal, hogy lehetne jobb minőségű vagy éppen a szélsőséges körülményekhez jobban alkalmazkodó növényeket termesztetni. Emellett olyan környezetvédelem és agrikulúra szempontjából fontos, kérdésekkel is foglalkoznak, mint például hogyan javítható segítségükkel egyes területek talaja.^{5,6} Így elvitathatatlan ezen kutatások gazdasági haszna. Ennek ellenére, mivel Magyarországon (is) az alapkutatást végző laborok közt kissé alulreprezentált a növényi modellszerkezetet használó laborok száma, ebben az egyetemi jegyzetben is csak egy fejezetet tudunk szentelni a növényi modelleknek összefoglalóan.

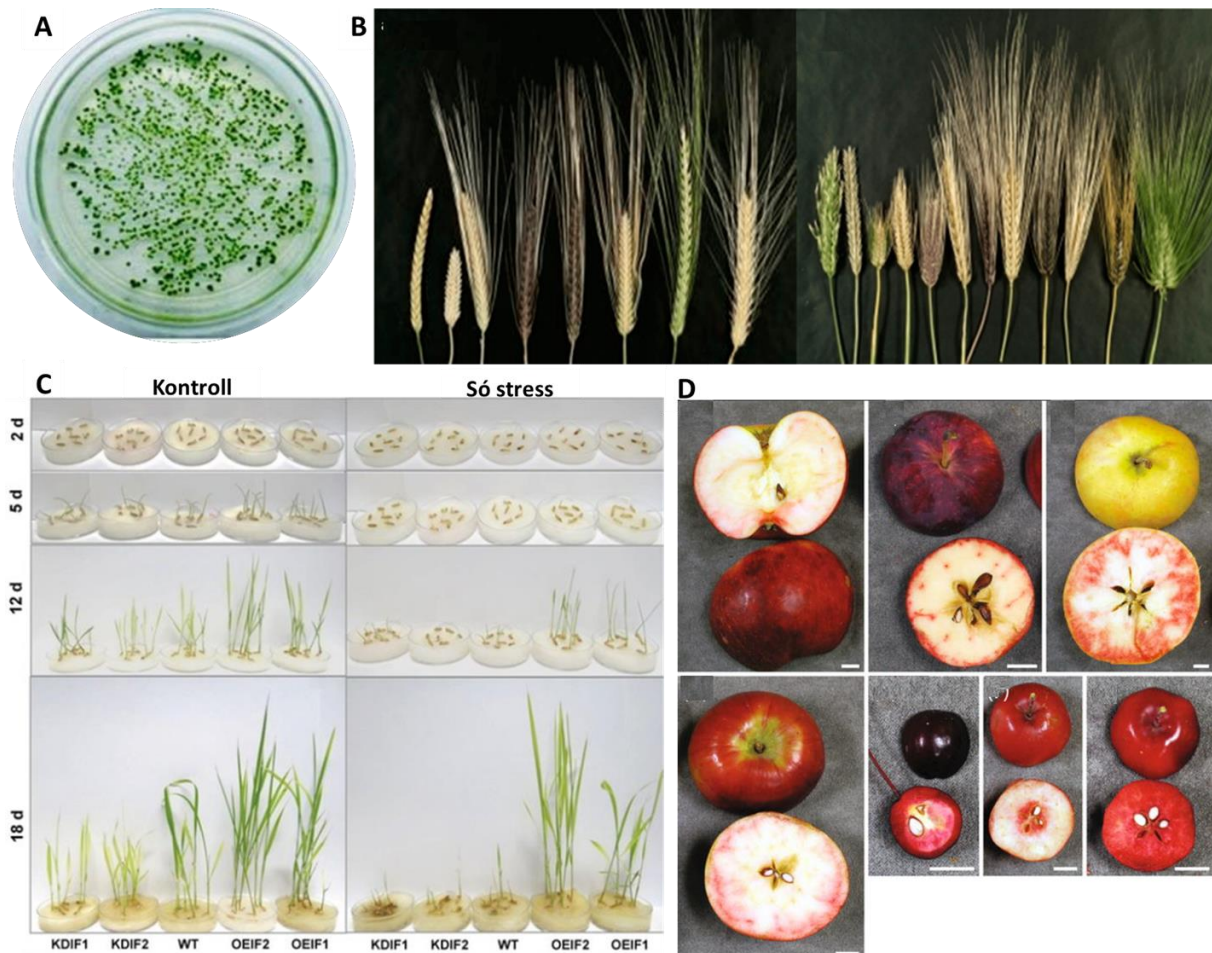
Számos előnye van a növényi modellszerkezetekkel végzett kutatásoknak. Többségében egyszerűen fenntartható, olcsó és minimális gondozást igénylő élőlények. Kevésbé munkaigényesek, mint sok állati szervezet, gondoljunk csak arra, hogy a legtöbb állat gyakori (akár mindennapos) etetést, tisztán tartást igényel még az ünnepek alatt is. Magjaik hosszan és egyszerűen eltarthatóak genetikai módosítások nélkül, nem szükséges folyamatosan fenntartani a törzseket. Molekuláris szinten alapvetően nagyon hasonlóak más

szervezetekhez, így más modelleken alkalmazott technikák nagy része növényeken is jól alkalmazható. Jó regenerációs képességgel rendelkeznek, így sokkal „rugalmasabbak” sok állati modellhez képest. Kevesebb a megfontolandó etikai kérdés is, ami megkönnyíti a velük való munkát. Mivel nem annyira népszerűek, mint az állati szervezetek, még rengeteg alapvető jelentőségű téma vár megfejtésre. A legtöbbet vizsgált témák közelebb állnak a gyakorlati alkalmazhatóságához is, sokszor jelentős potenciál van az eredmények felhasználhatóságában.

Mint minden modellszerzet használatának, a növényekkel való munkának is megvannak a hátulütői. Általában időigényesebbek, hiszen sok állati modellszerzethez képest hosszabb a növények életciklusa. Ezen felül kevésbé divatos és megértett ez a tudományterület, kisebb a politikai és társadalmi megbecsültsége és ezzel együtt a finanszírozása is alacsonyabb. Az elmúlt időszakban az Európai Unió, illetve egyes országspecifikus szabályozások megnehezítették, hogy a területen zajló modern kutatások valóban hasznosuljanak, így a gyakorlati alkalmazás sokszor csak potenciális maradt. A legfőbb etikai kérdés a növényekkel végzett kutatások kapcsán a GMO növények létrehozása és/vagy alkalmazása a laboratóriumokon kívül. Ez egy intenzív vitákat kiváltó terület mind a tudomány, mind a közélet területén, számos pro- és kontra érveléssel, amik átgondolásra érdemesek és egyre bonyolultabbak, ahogy a különböző szinteket és a különböző módszereket összehasonlítjuk. A hátrányok közé tartozik, hogy az előbb felvázolt okok miatt kevesebb kutatót is vonzanak a növényekkel végzett kutatások, a kisebb kutatói közösség miatt pedig általánosságban rosszabb minőségűek az adatbázisok, nehezebben hozzáférhetőek az ismeretanyagok és a növény-specifikus módszerek.

Sokféle növényt alkalmaznak a kutatások során, mint modellszerzetet. Az egysejtűek közül az egyik legszélesebb körben használt szervezet a zöld alga (*Chlamydomonas reinhardtii*) (1. ábra A), melynek egyszerű a fenntartása, gyors az életciklusa és minden általános, ősi folyamat (pl.: autofágia, transzkripció, transzláció stb.) jól vizsgálható benne. Egyszikűek közül a mezőgazdaság számára fontos árpát (*Hordeum vulgare*) (1. ábra B) és búzát (*Triticum*) szokták legszélesebb körben alkalmazni a kutatómunka során. Elsősorban a terméshozamot befolyásoló genetikai tényezők, illetve a biotikus és abiotikus stresszre adott válaszreakciók molekuláris hátterének feltárása áll az érdeklődés középpontjában. Ugyanakkor az egyszikűek közül a rizsszel (*Oryza sativa*) (1. ábra C) és kukoricával (*Zea mays*) végzett kutatások se elhanyagolandók, utóbbi növény vizsgálata során írták le először a transzpozonokat. A fás szárú, gyümölcsstermő növények közül legszélesebb körben az alma fajokat (*Malus spp.*) (1. ábra D) használják modellnek, de ezeket a vizsgálatokat nehezíti, hogy

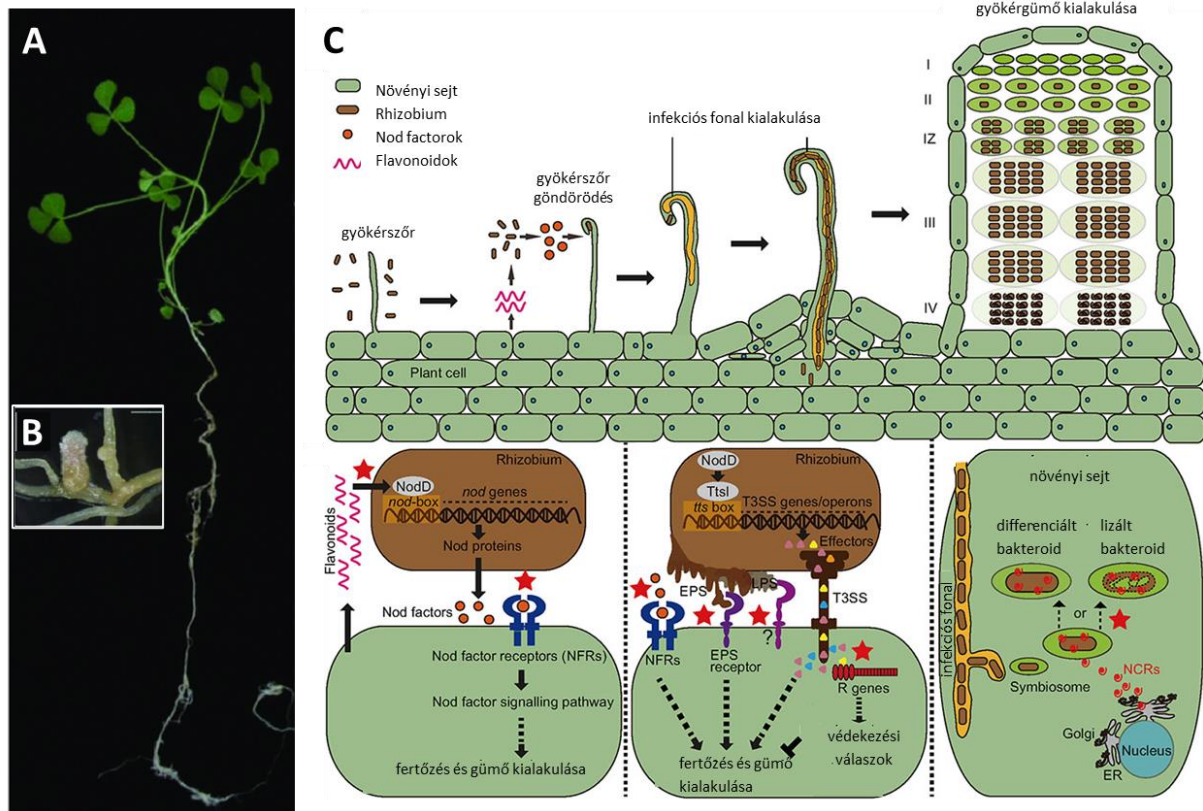
nagyobb a helyigényük és igen hosszú az életciklusuk, nehéz új mutánsokat létrehozni, felnevelni a termő formáig. A kutatások során elsősorban a termések közti különbségeket okozó genetikai hátteret és a biotikus stresszekre, fertőzésekre adott stresszválaszokat vizsgálják.⁷⁻¹²



1. ábra: Genetikai kutatásokban gyakran használt növényi modellszervezetek (példák). **A:** Petri csészében nevelt *C. reinhardtii*⁹ **B:** Árpa genetikai variánsainak kalász fenotípusa.¹⁰ **C:** Sóstressz hatásának vizsgálata különböző rizs mutánsok esetében (WT: vad típus).¹¹ **D:** Alma különböző genetikai variánsainak termés fenotípusa.¹²

Jelentős modellszervezet a pillangósvirágúak közé tartozó lucerna (*Medicago truncatula*) (2. ábra A). Elsősorban a szimbiotikus nitrogén kötés genetikai szabályozásának vizsgálatát végzik a segítségével. A pillangósvirágúak gyökérgümőkben (2. ábra B, C) olyan talajlakó baktériumokkal alakítanak ki szimbiotikus kapcsolatot, melyek képesek a levegő N₂ tartalmát megkötni és N₂ tartalmú szerves anyagot létrehozni. Erre csak a prokarióták néhány csoportja képes az egész élővilágban, és a velük szimbiotikus kapcsolatot kialakító növényekkel együtt ezt nagyobb hatékonysággal végzik. A többi növényvel ellentétben ezek a növények jelentős

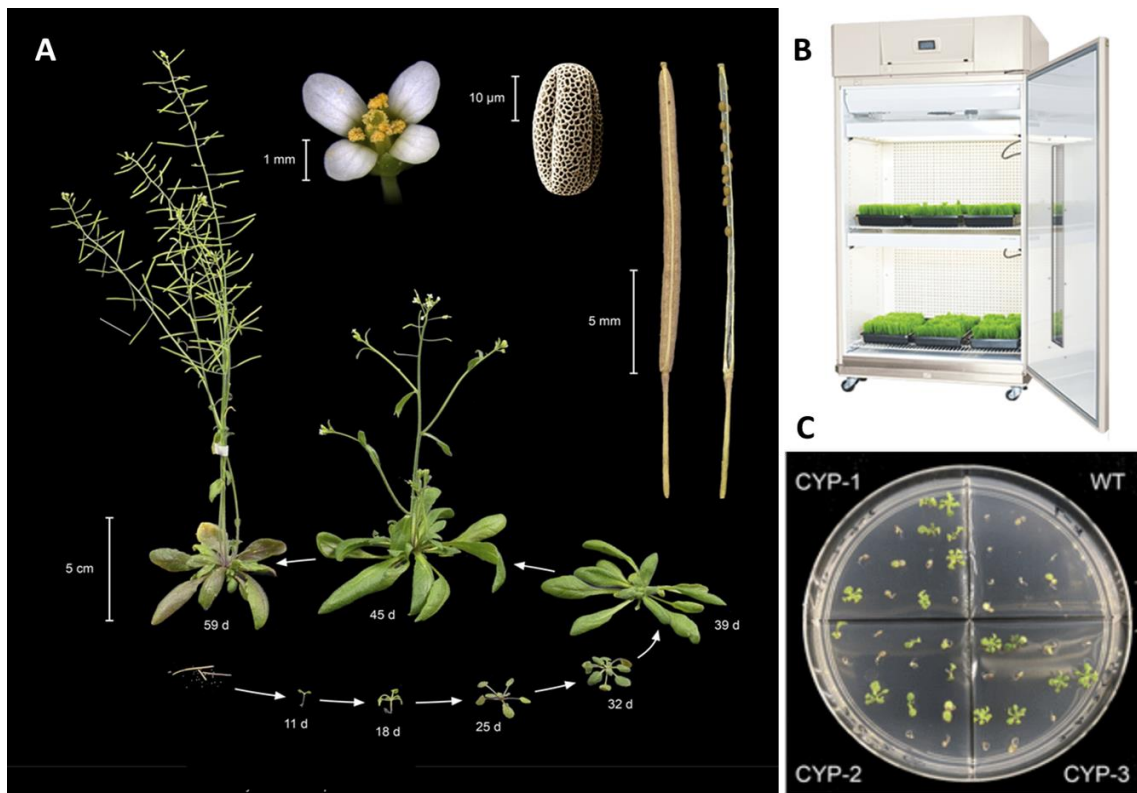
fehérje forrást jelentenek. Fontos szerepet töltenek be tápanyagforrásként, de lebomlásuk után a talaj természetes és környezetbarát javításában is, ellentétben a műtrágyákkal. A lucerna kiváló modellszervezet, mivel kisméretű, laboratóriumban könnyen fenntartható, rövid életsiklusú és önmegtermékenyítéssel szaporodik, így könnyű fenntartani homozigóta vonalakat. Genomja diploid és ismert.⁹



2. ábra: Lucerna szimbiotikus gyökérgümőjének kialakulása. A: Kifejlett növény¹⁰ **B:** Gyökérgümő¹⁰ **C:** A növény gyökérszöreiből felszabaduló flavonoidokat a talajban élő *Rhizobiumok* érzékelik és Nod faktort bocsátanak ki, melynek hatására a gyökérször körülveszi a baktériumokat. Egy úgynevezett infekciós fonalon át a baktériumok egy, a növény által kialakított zárt térbe jutnak és számos osztódáson mennek keresztül, létrehozva a gyökérgümőt. A baktériumok ebben a zárt térben bakteriodokká alakulnak, amik nagyon hatékonyan tudják a légköri N₂-t kötni. A növény hasznosítja a megkötött N₂-t, a bakteriofágok pedig a növény különböző anyagcsere termékeit. A gümőképződés genetikai háttere intenzíven kutatott, de mivel komplex folyamat, még igen keveset tudni róla. (A C ábra alsó része csak szemléltető jellegű.)¹¹ (Módosított ábrák)

A genetikai alap kutatások fő növényi modellszervezete azonban a lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) (3. ábra A), mely szinte minden növényekkel kapcsolatos vizsgálatra alkalmas. Zárwatermő, kétszikű, a káposztafélek közé tartozik, így a kapott eredményeket étkezési növényekben (pl.: retek, káposzta, mustár) is fel lehet használni. Diploid, haploid genomjának kromoszómaszáma 5. Kis méretű tömör genomja van, körülbelül 114,5 megabázis nagyságú, ami 25 500 gént és 3500 fehérjét kódol.^{12,13} Összehasonlításképp, a kukoricának 10 a haploid

kromoszómaszáma és 2,5 gigabázis nagyságú a genomja, de hasonló számú fehérjét kódol. A kukoricában a gének közötti nem kódoló állomány nagysága okozza a sokkal nagyobb genomméretet.¹⁴



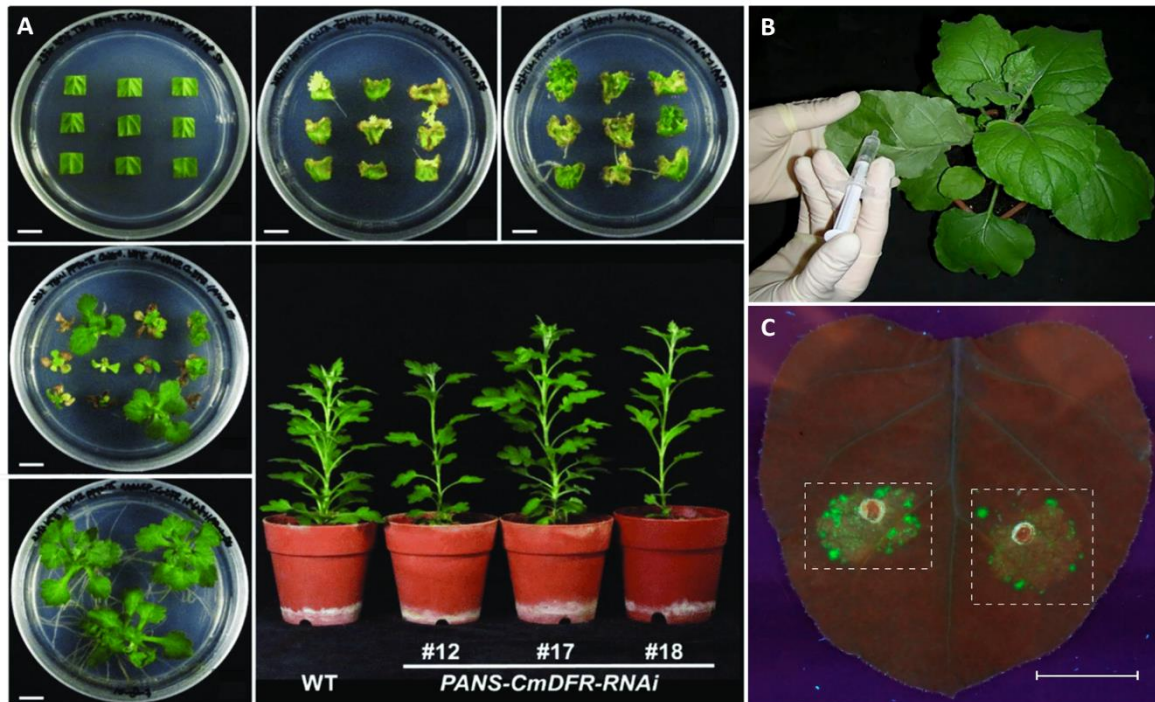
3. ábra: Lúdfű életciklusa és nevelése laboratóriumban. A: *Arabidopsis thaliana* életciklusa. (d:day) (Módosított ábra)¹⁵ **B:** Fényszekrény (Labconsult, A1000-AR *Arabidopsis* chamber) **C:** Herbicid tartalmú táptalajon nevelt vad (WT) és mutáns csíranövények.¹⁶

Számos előnyös tulajdonsága teszi kiváló modellszervezetté a lúdfűvet. Laboratóriumi körülmények között könnyen nevelhető, igénytelen, kis méretű lágyszárú növény. Viszonylag rövid az életciklusa, körülbelül 1 hónap alatt fejlődik ki, majd még 1-2 hét amíg a virágai is megjelennek és kinyílnak. Vernalizációval (alacsony hőmérséklet) indukálható a növények generatív (szaporodáshoz szükséges) szerveinek kifejlődése. Önbeporzó, így a tiszta genetikai vonalak könnyen fenntarthatóak. A virágban négy szíromlevél öleli körül a 6 porzót és a közepén elhelyezkedő bibét.¹² Ha különböző mutánsokat akarnak keresztezni, akkor fénymikroszkóp alatt kis csipesz segítségével az egyik mutáns növény még bimbós virágairól el lehet távolítani a csésze és szíromleveleket, valamint a porzókat és az ott maradt bibét utána meg lehet termékenyíteni a másik mutáns vonal már kinyílt virágaiból származó érett porzók segítségével. Ezután körülbelül egy hét amíg a becők is kezdenek beérni, termésében körülbelül 25 mag található sorban állva, így, ha zigóta formában letális mutánsok vannak,

azok azonnal észrevehetőek a magorban megjelenő hiány alapján. A csírázás szinkronizálásához 1-2 napot vízben és hidegben tartják a magokat. A csíranövények nevelése során biztosítani kell a megfelelő hőmérsékletet (18-23 °C), páratartalmat, víz és tápanyag ellátottságot, adott idejű és intenzitású megvilágítást. Fényszekrények (3. ábra B) vagy fényszoba segítségével biztosítják a megfelelő fényellátást. A sztenderd vagy speciális tápanyagellátás, illetve kezelés miatt sokszor különböző táptalajokon nevelik a csíranövényeket. (3. ábra C) A fejlődési szakasszal összehasonlítva a felnőtt növények már jobban bírják a szélsőségeket. Az lúdfűnek több mint 750 ökotípusa, variációja van, amik különböző környezethez adaptálódtak, így kissé különböznek egymástól. Az ökotípusok genomjának összehasonlításával jól vizsgálható, hogy mi állhat például a jobb szárazságtűrés vagy vírusokkal szembeni nagyobb ellenállóképesség hátterében.¹⁷ Sok vizsgálat irányul a lúdfűben is az abiotikus (sókoncentráció, hőmérséklet, vízhiány, fényintenzitás, UV) és biotikus (vírus/baktérium fertőzés) stresszre adott válaszreakciók genetikai hátterére, de a növények fejlődését irányító genetikai útvonalaknak vagy a csak növényekben található kloroplasztisz genetikai állományának feltárására is remek modellszervezet.¹² Mivel az *Arabidopsis thaliana* a legszélesebb körben alkalmazott növényi modell, a hozzá kapcsolódó adatbázis (www.arabidopsis.org) a leginkább kidolgozott, de más növényi kutatási eredményeket tartalmazó adatbázisok is vannak (pl.: plants.ensembl.org).

Az előnyök közé tartozik, hogy a lúdfű genetikailag könnyen módosítható, egyszerűen előállíthatóak mutáns és transzgenikus vonalak. A növényekre általánosságban jellemző, hogy stabil, illetve tranziens transzformánsokat is létre lehet hozni (4. ábra). Előbbinél öröklődő módon megváltozik a genom, ezek a vonalak alkalmasak a hosszú távú kísérletekre, viszont körülményesebb és hosszabb előállításuk. A tranziens transzformánsok esetében a transzgenek nem integrálódnak a genomba, nem örökíthetők tovább, viszont sokkal gyorsabban előállíthatóak. Általában a transzgen csak a növény egy részében, és csak korlátozott ideig fejeződik ki. Ez a módszer nagyon hatékony a gének expressziójának vagy épp csendesítésének (RNS interferencia) vizsgálatára. A növényekben a sejtfal miatt körülményesebb a transzgenek bevitele, de több hatékony módszer is létezik megoldására (itt csak a legfontosabbakat említjük meg). A kémiai eljárásokhoz és az elektroporációhoz először létre kell hozni protoplasztot (sejtfaltól „megszabadított” növényi sejt kultúra) és a transzformáció után ebből lehet újra regeneráltatni a növényt. A biológiai transzformáció (génpuska) igen széles körben elterjedt módszer, előnye, hogy minden növényen alkalmazható és igen hatékony. Használható

protoplaszt, kallusz és szövetek esetében is, hátránya, hogy fizikai sérülést okoz a növénynek és méretbeli korlátai is vannak.



4. ábra: Példák *Agrobacterium* közvetített transzformációs folyamatokra. A: A levél darabok transzformáns *Agrobacterium*-al lettek beoltva, majd a megfelelő szelektív lemezen csak a transzformált növényi sejtek maradtak életben és ezután indukálták a növény regenerálódását, így stabil transzformált vonalakat hoztak létre (több mint 6 hónap) (WT-vad típus, #12,17,18: különböző transzformáns vonalak)¹⁸ **B:** Levelek epidermiszében történő agroinfiltráció¹⁹ és **C:**(négy nappal később) megfigyelhető fluoreszcens jel (transziens transzformáció)¹⁹

Vírus közvetítette transzformációs eljárások is léteznek, de növényeknél a legelterjedtebb az *Agrobacterium* transzformáló ágens használata (4. ábra). Az *Agrobacterium tumefaciens* egy talajlakó növényi parazita, mely sérült növényi részeket tud fertőzni. Rendelkezik egy úgynevezett tumor indukáló plazmiddal (Ti plazmid), melynek egy adott, határszekvenciákkal rendelkező szakasza, a T-DNS (transzfer DNS) kivágódik és bejutva a megfertőzött növény sejt magjába a DNS-be integrálódik. A megfertőzött növényi sejtet tumoros sejtburjánzásra készíteti és bizonyos anyagok termelésére, melyeket a baktérium tápanyagforrásként használ. Az *Agrobacterium* közvetítette transzformációs eljárások alapja, hogy módosított Ti-vektort használnak, melyben a határszekvenciák közti T-DNS szakasz helyére a bejuttatni kívánt DNS szakaszt klónozzák. Hátránya, hogy nem minden növényfajnál használható, fajoként eltérő, hogy mely szövetek fertőzhetőek (például *Arabidopsis* esetében a virág bemelegítése szükséges, míg sok növényenél a kallusz transzformálható) és nagy mennyiségű *Agrobacteriumra* van szükség.²⁰

A mutáns vonalak létrehozásában még mindig elterjedt a random mutagenézis (kémiai, besugárzás) alkalmazása a növények körében, de használják a genetikai kutatások egyéb, elterjedt modern technikáit is. Ahogy minden területen, a növények esetében is egyre inkább vezető szerepet kezd betölteni a célzott genomszerkesztést lehetővé tevő CRISPR/Cas9 rendszer. Legtöbbször *Agrobacterium* közvetítette géntranszfert használnak a szükséges elemek beviteléhez. Utólag a bevitt transzgén elemek kikeresztezhetőek, mivel a beépülés helyétől függetlenül, más pozícióban módosul a genom (transzaktivitás), így létrehozhatóak a transzgént nem tartalmazó mutáns növény vonalak.²¹

A növényi modellszervezetek az általános genetikai alap kutatásban is jól használható modellek, de jelentős gazdasági szerepük van az agrikultúra fejlesztésében is. Az éghajlati változásokhoz, új fertőzésekhez alkalmazkodó élelmiszertermelésben központi szerepet tölthetnek be a növényi szervezetekkel végzett kutatások. Mivel a növények vizsgálata kisebb intenzitással zajlott, összehasonlítva az állati modellel, még nagy lehetőségeket tartogat ez a tudományterület.

Köszönetnyilvánítás

A növényekkel, mint genetikai modellélőlényekkel foglalkozó fejezet Bíró János Barnabás és Szaker Henrik előadásain alapszik. Köszönjük, hogy évente színvonalas előadással ismertetik meg a hallgatókkal az növényi modelleket!

Felhasznált irodalom:

1. Allard, R. W. History of plant population genetics www.annualreviews.org (1999).
2. Mendel, G. Experiments in plant hybridization (1865). <http://www.netspace.org/~MendelWeb/> (1996).
3. Ravindran, S. Barbara McClintock and the discovery of jumping genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 20198–20199 (2012).
4. Lindbo, J. A. A historical overview of RNAi in plants. *Methods in Molecular Biology* vol. 894 1–16 Preprint at https://doi.org/10.1007/978-1-61779-882-5_1 (2012).
5. Yan, A. *et al.* Phytoremediation: A Promising Approach for Revegetation of Heavy Metal-Polluted Land. *Frontiers in Plant Science* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00359> (2020).
6. Mahmud, K., Makaju, S., Ibrahim, R. & Missaoui, A. Current progress in nitrogen fixing plants and microbiome research. *Plants* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3390/plants9010097> (2020).
7. Salomé, P. A. & Merchant, S. S. A series of fortunate events: Introducing chlamydomonas as a reference organism. *Plant Cell* vol. 31 1682–1707 Preprint at <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00952> (2019).
8. Ji, Q., Xu, X. & Wang, K. Genetic transformation of major cereal crops. *International Journal of Developmental Biology* 57, 495–508 (2013).
9. Roy, S. *et al.* Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation[OPEN]. *Plant Cell* vol. 32 15–41 Preprint at <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279> (2020).

10. Walton, J. H. *et al.* The *Medicago truncatula* Vacuolar iron Transporter-Like proteins VTL4 and VTL8 deliver iron to symbiotic bacteria at different stages of the infection process. *New Phytologist* 228, 651–666 (2020).
11. Wang, Q., Liu, J. & Zhu, H. Genetic and molecular mechanisms underlying symbiotic specificity in legume-rhizobium interactions. *Frontiers in Plant Science* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00313> (2018).
12. Woodward, A. W. & Bartel, B. Biology in bloom: A primer on the *Arabidopsis thaliana* model system. *Genetics* 208, 1337–1349 (2018).
13. The Arabidopsis Genome Initiative. *Analysis of the Genome Sequence of the Flowering Plant Arabidopsis Thaliana*. www.nature.com (2000).
14. Haberer, G. *et al.* Structure and architecture of the maize genome. *Plant Physiol* 139, 1612–1624 (2005).
15. Jasinski, S., Chardon, F., Nesi, N., Lécureuil, A. & Guerche, P. Improving seed oil and protein content in Brassicaceae: Some new genetic insights from *Arabidopsis thaliana*. *OCL - Oilseeds and fats, Crops and Lipids* 25, (2018).
16. Zhao, N., Yan, Y., Liu, W. & Wang, J. Cytochrome P450 CYP709C56 metabolizing mesosulfuron-methyl confers herbicide resistance in *Alopecurus aequalis*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 79, (2022).
17. Choi, W. G., Barker, R. J., Kim, S. H., Swanson, S. J. & Gilroy, S. Variation in the transcriptome of different ecotypes of *Arabidopsis thaliana* reveals signatures of oxidative stress in plant responses to spaceflight. *Am J Bot* 106, 123–136 (2019).
18. Lim, S. H. *et al.* Silencing of Dihydroflavonol 4-reductase in *Chrysanthemum* Ray Florets Enhances Flavonoid Biosynthesis and Antioxidant Capacity. *Plants* 11, (2022).
19. Berestovoy, M. *et al.* Transient Gene Expression for the Characteristic Signal Sequences and the Estimation of the Localization of Target Protein in Plant Cell. *Bio Protoc* 8, (2018).
20. Su, W., Xu, M., Radani, Y. & Yang, L. Technological Development and Application of Plant Genetic Transformation. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 24 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms241310646> (2023).
21. Zhang, Y. & Qi, Y. CRISPR enables directed evolution in plants. *Genome Biol* 20, (2019).

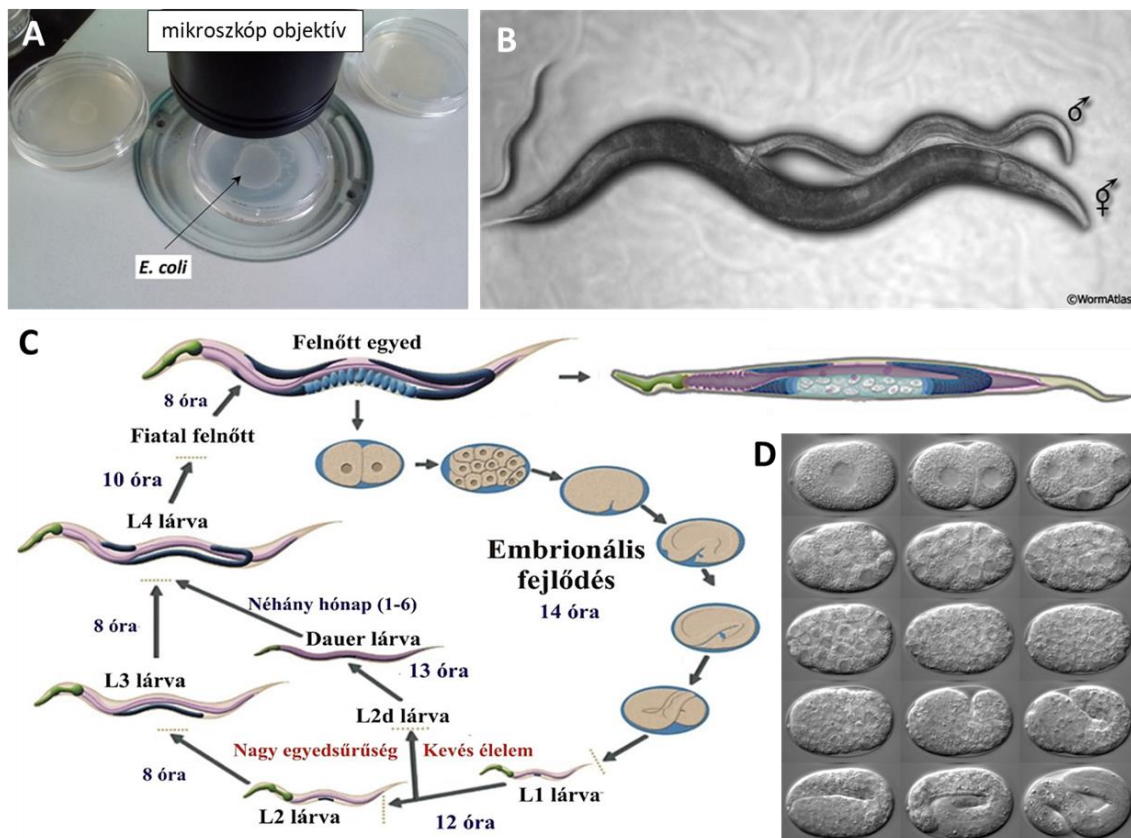
Caenorhabditis elegans

A *C. elegans* a mérsékelt égövön széles körben elterjedt, szabadon élő talajlakó fonálféreg (Nematoda), mely elhalt növényi részek közt megtalálható baktériumokkal táplálkozik. Sidney Brenner 1963-ben vezette be a genetikai kutatásokba, mint modellrendszer. Brenner elsősorban a fejlődéstani és idegrendszer kutatásokban látta nagy potenciálját, de mára az egyik legszélesebb körben alkalmazott modellrendszeré vált a világon. Laboratóriumi körülmények között fenttartásuk közelítőleg olyan egyszerű, mint a baktériumoké, ugyanakkor egy eukarióta többsejtű szervezet, melynek már összetett szervrendszerei és viselkedése van. Számos, más élőlényekben is kulcsszerepet betöltő gént írtak le *C. elegans* vizsgálatok során, például az apoptózis kulcsgénjeit és útvonalát (2002-es orvosi Nobel díj), a Ras és Notch genetikai útvonalat, a szinaptikus funkciókat, az axon növekedést és az élethossz szabályozás fontos génjeit, valamint heterokromatikus géneket. Olyan technikákat fedeztek és fejlesztettek ki bennük, amiket azóta elterjedtek a genetikai kutatásokban más élőlényekben is. Bár növényekben figyelték meg az először a géncsendesítéssel kapcsolatos jelenségeket, de *C. elegans* kutatók fedezték fel jelentőségét és vezették be az RNS interferencia módszerét a tudományos technológiák közé (2006-os orvosi Nobel díj). Először *C. elegans*-ban alkalmazták a zöld fluoreszcens fehérjét (*GFP- green fluoreszcens protein*) biológiai markerként génexpresszió vizsgálatára (2008-as kémiai Nobel díj). De a genom szekvenáláshoz szükséges technikák kifejlesztésében is központi szerepet töltött be.¹⁻⁶

Számos előnyös tulajdonsága teszi kiváló modellszervezetté a *C. elegans*-t. Kis méretű, a felnőtt állatok nagysága körülbelül 1 mm. Laboratóriumban könnyen fenttartható agar-tartalmú műanyag Petri-csészékben (1. ábra A), *E. coli* baktériumpázsitot használva, mint táplálék. Ha nagyon nagy mennyiségű állatra van szükség folyadékkultúrában is nevelhetőek és automata gépekkel szelektálhatóak. 15-20°C az ideális hőmérséklet számukra, de 12-25°C közt is közel teljesen normálisak az életfolyamataik, 25°C felett már nem szaporodnak, 37°C-on pedig csak pár óráig életképesek. Nem paraziták és nem váltanak ki allergiás reakciót. Mivel nem képesek keresztfertőzni az emberrel, nem szükséges azt a mértékű sterilitást fenntartani, mint egy emlős laborban. Az állatok -80°C-on vagy folyékony N₂-ben lefagyaszthatók és évtizedekig tárolhatók, így aktív fenttartási munkák nélkül megőrizhetők a törzsek és háttérmutációk sem jelennek meg a tiszta vonalakban.^{1,2,6}

A *C. elegans* teste egész életében áttetsző, így fénymikroszkóppal egyedi sejt-szinten vizsgálható az állat egyedfejlődése és anatómiája (1. ábra B, D). Mikroszkóppal az élő, akár

mozgó állaton belül könnyen vizsgálhatóak a fluoreszcens markerek. *C. elegans*-ban a sejtek leszármazása egyedülként a ma ismert modellrendszerek között invariáns és az egyetlen Metazoa aminek teljes sejtleszármazását (sejtek osztódása, vándorlása, differenciálódása, programozott sejthalála) egysejtes állapottól meghatározták a fejlődés befejezéséig. Az invariáns sejtvonaltól azonnal jól látható bármilyen eltérés a normál fejlődéstől. A fejlődés során programozott sejthalállal (apoptózis) elpusztuló sejtek vizsgálata tette lehetővé, hogy könnyen meghatározzák az apoptotikus útvonalat.^{2,3,7-9}

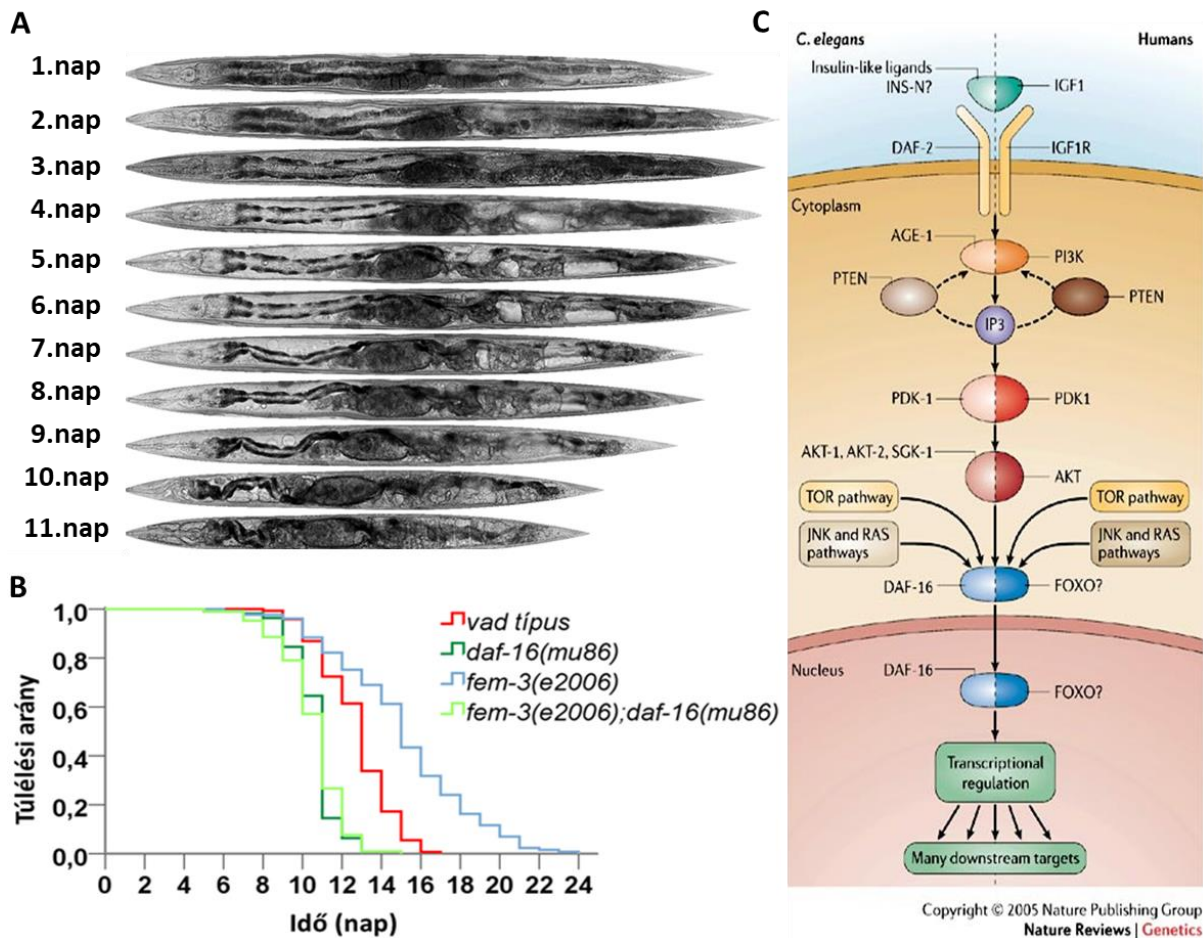


1. ábra: A *C. elegans* modellszervezet számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik. **A:** *C. elegans* laboratóriumban könnyen fenntartható, kis méretű agar-tartalmú Petri-csészében és egyszerű fénymikroszkóppal is vizsgálható. (Módosított ábra.)² **B:** Speciális ivari dimorfizmussal rendelkezik, a populáció zömét önmegtermékenyítő hermaphroditák alkotják és csak kis százalékban vannak hímek. Az állatok teste egész életükben átlátszó.⁶ **C:** Gyors az életciklusa, a petéből körülbelül 3,5 nap alatt fejlődik ki négy lárvastádiumon (L1-L4) át, de rossz körülmények közt alternatív fejlődési útvonalra lép és hónapokig képes öregedés nélkül un. dauer lárvaként élni. A felnőtt állatok pár napig raknak petét, majd ezután még körülbelül két hétig élnek. Akár fénymikroszkóppal is jól megfigyelhető az öregedés során a szövetek leépülése. Az ábrán a fejlődési idők 22°C-ra vannak feltüntetve (Módosított ábra.)^{6,10,11} **D:** A fejlődéstani vizsgálatoknak is remek modellje, mert az embriók is áttetszőek és a hermaphrodita testén kívül fejlődnek. A teljes sejtleszármazási sora ismert és invariáns.¹²

Speciális ivari dimorfizmus jellemzi, a populáció zömét önmegtermékenyítő hermafroditák alkotják és csak 0,2% a hímek aránya (1. ábra B). A hermafroditák az 5 pár autoszóma mellett két X kromoszómával (XX kariotípus), míg a hímek csak egyetlen X kromoszómával (X0 kariotípus) rendelkeznek, ami önmegtermékenyítés esetén a meiozis folyamata során ritkán, véletlenszerűen bekövetkező X kromoszóma szét nem válás következtében jön létre. A hermafroditák abban különböznek csak a nőstényektől, hogy ovotestiszük van. Először (L4 lárvastádiumban) spermiumokat termelnek, melyek elraktározódnak a spermatékában, majd felnőtt korra az ivarmirigy abbahagyja a spermium termelést és elkezdi petesejteket termelni. Önmegtermékenyítés során a petesejtek a spermatékában elraktározott spermiumokkal termékenyülnek meg, így körülbelül 300 utód létrehozására képes. A saját spermium raktárak kimerülése után azonban még megtermékenyíthetők a hermafroditák. Hímekkel való pározás eredményeként akár 1000 embriót is képesek lerakni. A hermafroditák önmegtermékenyítése lehetővé teszi a tiszta genetikai vonalak fenttartását, a hímekkel való keresztezés pedig a különböző mutáns vonalak kombinálását. A homozigóta hermafroditák gyakorlatilag saját klónjaikat hozzák létre, mely megkönnyíti a megfelelő mintaszámok elérését a vizsgálatokban. Az önmegtermékenyítő rendszernek köszönhetően egy egyszerűbb *screen* során a mutagenézis után akár a második generációban meg lehet találni a homozigóta mutáns állatokat.^{1,2,13,14}

Életciklusok gyors, embriogenezisük körülbelül 16 óra 20°C-on és összesen 3,5 nap alatt érik el a termékeny felnőtt életkort. Körülbelül 3-5 napig tart az önmegtermékenyítés után a peterakási időszak, majd még körülbelül 2 hét telik el, míg a természetes öregedés következtében elpusztulnak az állatok (1. ábra C). A peteburok lehetővé teszi, hogy az embriók az anya testén kívül fejlődjenek (bár természetes körülmények közt pár óráig még nem kerül sor a peterakásra a megtermékenyítést követően). (1. ábra D) Négy lárvastádiumon át fejlődnek (L1, L2, L3, L4) melyeket nyugalmi időszakokkal összekötött vedlések választanak el egymástól. Ha rosszak a körülmények (pl. tápanyaghiány, magas hőmérséklet, túl nagy egyedsűrűség) akkor L1/L2 után egy alternatív fejlődési program indul be és úgynevezett dauer lárvává alakul az állat, mely egy kitartó lárvastádium. Ebben az állapotban nem táplálkozik, nem mozog, teste kissé átalakul, ellenállóbb lesz, életfolyamati lelassulnak. Ebben az állapotban akár hónapokig is életképes az állat, és ha újra kedvező körülmények közé kerül folytatni tudja életciklusát L4 lárvává alakulva (1. ábra C).^{1,2,9,15}

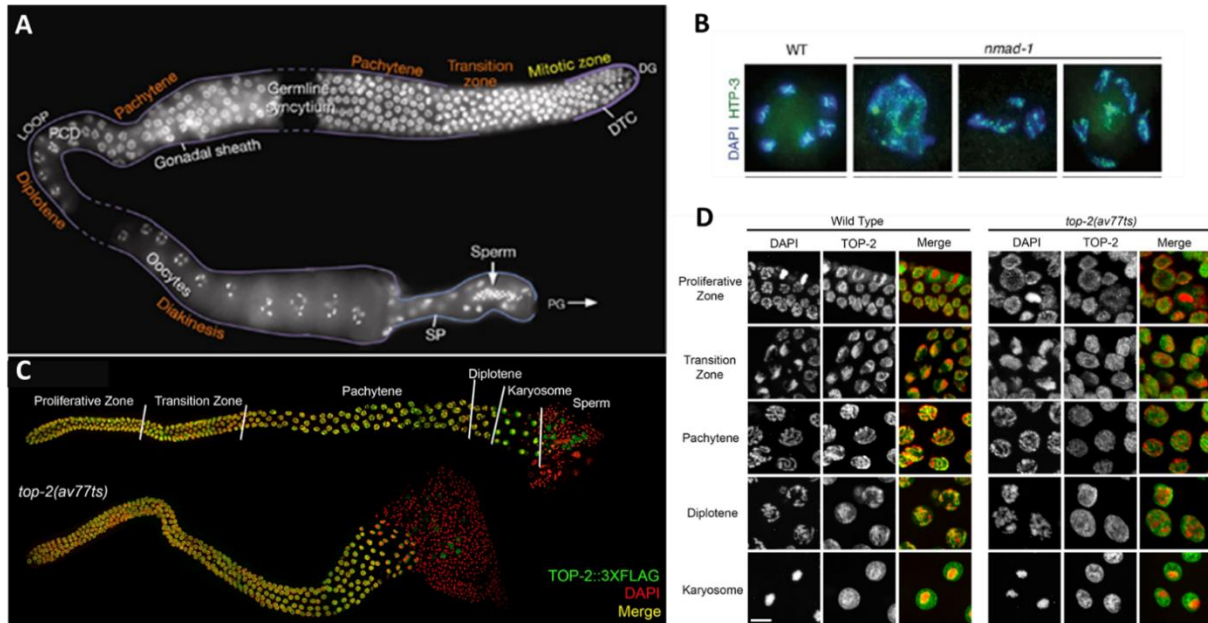
Bár alig néhány hét az élettartamuk, már remekül megfigyelhető rajtuk az öregedéssel járó anatómiai és funkcionális leépülés (2. ábra A, B), mind a szövetek és a viselkedés, mind a



2. ábra: Az öregedési vizsgálatok kedvelt modellje. A: Akár egyszerű fénymikroszkóppal is vizsgálható az öregedéssel járó jellegzetes változások egy része. Az ábrán egyetlen egyedről naponta készített fényképek láthatóak L4/ fiatal felnőtt korától a haláláig.^{15,16} B: Rövid életciklusa lehetővé teszi, hogy csupán 2-3 hét alatt meg lehessen vizsgálni mutációk hatását az öregedésre és egyszerű episztázis elemzésekkel az öregedésre ható genetikai útvonalak és génkölsönhatások könnyen meghatározhatóak.¹⁷ C: Az öregedést szabályozó genetikai útvonalak rendkívül konzerváltak. Az ábrán az inzulin/IGF útvonal látható (bal oldalt: *C. elegans*, jobb oldalt: ember).¹⁸

sejtek szintjén. Az öregedési vizsgálatok egyik legkedveltebb modellrendszere. Sok élettartamot befolyásoló rendkívül konzervált gént és útvonalat *C. elegans*-ban írtak le (2. ábra C). Kiemeli a többi modellszervezethez képest, hogy nagyon nagy áteresztőképességű szűrésekre (*screen*) alkalmas. Bár hasonlók vizsgálatokat ecetmuslicával és a zebradánióval is lehet végezni, de azok mértéke összehasonlíthatatlan a *C. elegans* módszerekével, hiszen méreténél és egyszerű fenttarthatóságánál fogva sokkal nagyobb mennyiségű állat/klón egyidejű megfigyelésére van lehetőség, akár agar lemezeken, akár 96 lyukú lemezekon folyadékkultúrában. Az élettartamra ható gének azonosításához (mutáns és RNSi *screenek*) is gyakran használják, de az öregedésre ható gyógyszerek/kismolekulák nagy áteresztőképességű

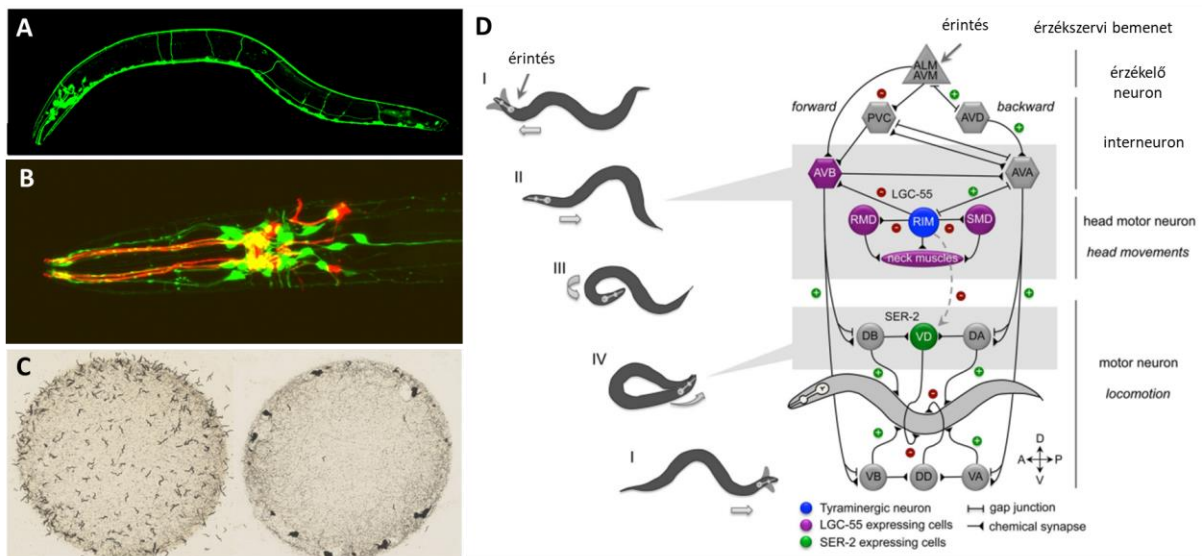
szűrésénél is nagy a jelentősége. Bár az alap kutatásban még nem annyira elterjedt módszer, de a vizsgálatokat automatizálni is lehet, folyamatosan fejlesztik a gépeket, melyek méret vagy fluoreszcens markerek alapján szelektálják az állatokat, majd mozgás vagy az autofluoreszcencia változás alapján képesek az élettartamot is mérni.^{1,2,15,16,19–22}



3. ábra: A *C. elegans* ivarmirigyén belül egyszerre vizsgálható a meiózis összes szakasza. A csírvonal disztális végén van a mitotikusan osztódó csírasejtek populációja, majd az átmeneti zóna után a fejlődő ivarsejtek belépnek a meiotikus profázis I-be. Az meiózis különböző fázisaira jellemző DNS szerkezet jól látszik az ivarmirigyben proximális irányba haladva (az ábrán az angol nevek szerepelnek). A női csírvonalban az oociták a spermatékán való áthaladáskor termékenyülnek meg és meiotikus osztódás az egysejtű embrióban következik be. A hím proximális csírvonalakban a spermaticiták diakinézisbe lépnek, és két meiotikus osztódáson mennek keresztül. **A:** Kimetszett női ivarmirigy, a DNS festve (fehér) van.² **B:** Vad típusban jól látszik a 6 pár kromoszóma, míg az *nmad-1* mutáns hermafroditák abnormalis kromoszóma számmal és alakkal rendelkeznek a diakinézis stádiumában. (A DNS DAPI-val van festve (kék), a meiotikus kromoszómák tengelyéhez HTP-3 fehérje (zöld) lokalizálódik.)²³ **C:** Kimetszett hím ivarmirigy vad és *top-2(lf)* mutáns háttérén. **D:** Az egyes szakaszokon nagyobb nagyítással jól látszik a DNS szerkezete **C-D:** CRISPR/Cas9 rendszerrel FLAG tag szekvenciát illesztettek az állatok endogén *top-2* génjének 3' végéhez, és a kifejeződő fúziós fehérjét anti-FLAG ellenanyaggal jelölték immunfestésben (zöld), a DNS-t DAPI-val festették (piros). A *top-2* gén a topoizomeráz II-t kódolja és ennek profázis I-ben betöltött szerepét vizsgálták ebben a kísérletben. A *top-2(it7)* csírvonalak vizsgálata azt mutatja, hogy a spermium DNS-ének nem sikerül megfelelően elkülönülnie a meiózis I. anafázisában. A TOP-2 a meiotikus profázisban lévő kromoszómákhoz kapcsolódik vad típusban, de a kromoszóma-asszociáció megszakad a *top-2(it7)* mutánsok csírvonalalaiban.

A felnőtt állat testfelépítése viszonylag egyszerű, közel 1000 szomatikus sejtből áll (hermafroditák: 959, hímek: 1031), de már kifejlett szervrendszerei vannak. Ez a viszonylagos egyszerűség kiváló modellt teszi a szervfejlődést és a különböző élettani folyamatokat

szabályozó genetikai útvonalak feltárása során. Vizsgálható segítségével az extracelluláris mátrix létrejötte, a sejtfúzió folyamata, a sebgyógyulás (epidermisz), az izomkontrakció és az izom-ideg kapcsolatok (izomzat), a patogenezis folyamata (bélrendszer), szervfejlődés (bélrendszer, reproduktív szervek, idegrendszer) és az ivar specifikus jellegek kialakulása. A *C. elegans* csíravonal különlegessége, hogy a meiózis összes szakasza egyszerre megfigyelhető egyetlen, még akár élő állatban. Tanulmányozása modellként szolgál a meiózis, az ivarsejtek fejlődésének, a megtermékenyítésnek, az össejtbiológiának, a DNS hibajavítás folyamatának és daganatképződésnek a jobb megértéséhez (3. ábra).^{2,3,7-9}



4. ábra: A *C. elegans* kiváló modell az idegrendszer és a viselkedések mögött álló sejt és molekuláris szintű szabályozás vizsgálatára. **A:** GFP riporterrel jelölt *C. elegans* idegrendszer² **B:** *C. elegans* feji régiója: piros fluoreszcens fehérjével jelölték a dopamin termelő idegsejteket és zöld fluoreszcens fehérjével a dopamin receptort kifejező idegsejteket.²⁴ **C:** Egy példa jól megfigyelhető, viszonylag egyszerű viselkedésre: a vad típusú egyedek egyenletesen eloszlanak a baktériumpázsiton táplálkozás közben, míg a mutánsok csoportosulnak.² **D:** A viszonylag egyszerű viselkedési mintázat és az ismert idegrendszer lehetővé teszi, hogy egyedülálló módon lehessen vizsgálni az érzékelés/viselkedés/tanulás háttérében álló sejtes kapcsolati hálózatot és genetikai szabályozást. Ha a *C. elegans* feji régióját óvatosan megérintik, akkor megfordul és az ellenkező irányba indul el. Bár egy nagyon egyszerű jelenségről van szó, igazából egy komplex viselkedési folyamat, több neuron vesz rész az egyes lépések (pl.: érzékelés, döntéshozatal, mozgás) és azok összehangolásának (pl. az előre mozgásért felelős neuronok gátlása és a megfordulásért felelős neuronok aktiválása) szabályozásában. (Az ábra csak szemléltető jellegű. Módosított ábra.)²⁵

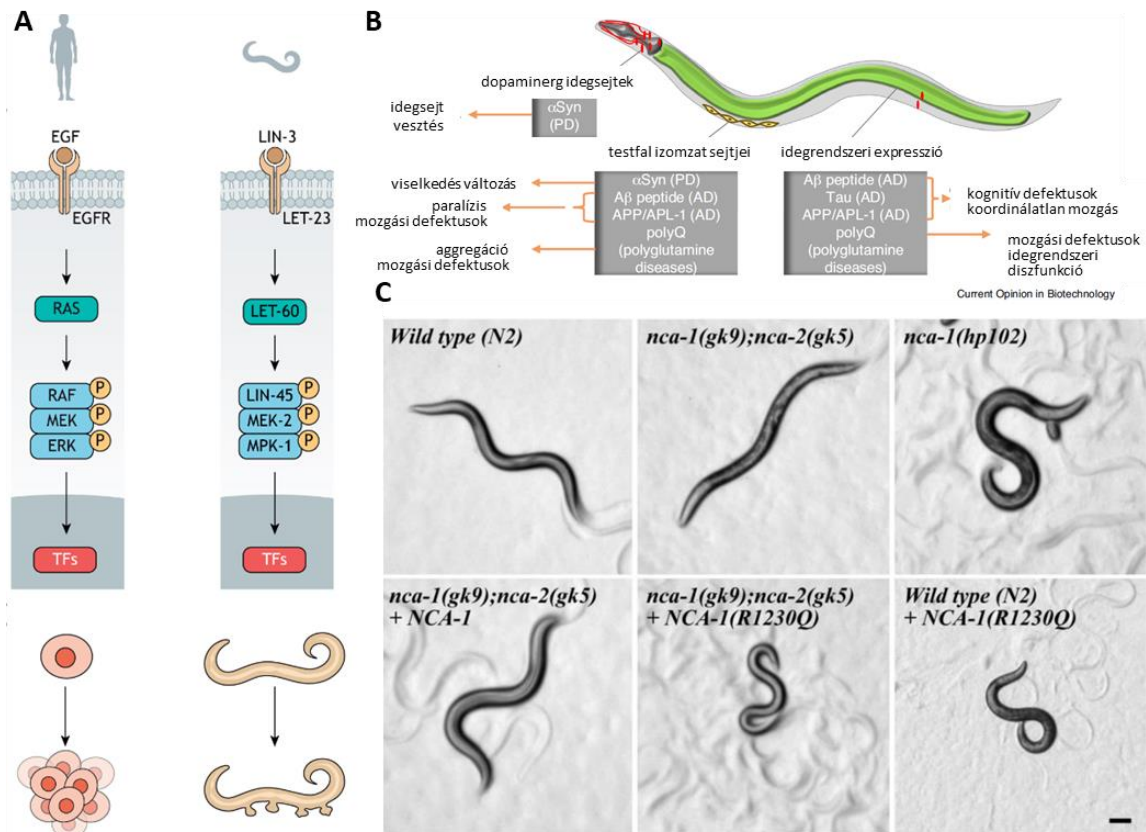
A *C. elegans* viszonylag kis számú neuronja remek modellként szolgál az idegrendszer fejlődésének, kapcsolatainak és működésének genetikai vizsgálatára (4. ábra). A hermafrodita idegrendszer 302, a hímeké 385 idegsejtet tartalmaz. Egyedülálló módon, csak a *C. elegans*-

oknál (mindkét nemnél) meghatározták az összes idegsejt pozícióját és kapcsolati hálózatát. Jól definiálható viselkedési mintázatai vannak (pl. *chemo-*, *mechano-* és *thermotaxis*, különböző mozgási mintázatok, párzási viselkedés) és képes egyszerűbb nem-asszociatív és asszociatív tanulásra, rendelkezik rövid és hosszú távú memóriával. Így az ezek mögött álló genetikai és idegrendszeri faktorok jól vizsgálhatóak. Specifikus promótereket használva könnyen létre lehet hozni olyan transzgenikus állatokat, amikben akár idegsejt specifikusan lehet kifejeztetni géneket/markereket, az egyedi idegsejtek lézerrel is eltávolíthatóak és optogenetika módszerek is alkalmazhatóak.^{2,26,27}

A *C. elegans* volt az első többsejtű élőlény, amelynek teljes genomját megszekvenálták és elérhetővé tették. A kifejlesztett módszerek nagyban segítették a humán genomprogram kezdeti időszakát. Az állatnak kb. 20 000 fehérje-kódoló génje van, és a humán gének 60-80%-nak van *C. elegans* ortológja. A legtöbb *C. elegans* gén esetében elérhetőek mutáns allélok, melyek szabadon hozzáférhetők a törzsközpontban (*Caenorhabditis Genetics Center*). Mára több rokon *Caenorhabditis* faj genomját is meghatározták, mely lehetővé teszi az összehasonlító evolúciós vizsgálatokat. Mivel több rokon faj is parazita, így a *C. elegans* jól használható modellként az ellenük alkalmazható gyógyszerek tesztelésére is.^{2,28,29}

Anatómiaiailag és fiziológiailag egyértelműen különbözik a *C. elegans* az embertől, de molekuláris szinten sok a hasonlóság. *C. elegans*-ban természetes módon sok emberi betegség nem jelenik meg, például a szomatikus sejteknél nem alakulnak ki rákos elváltozások, nem hízik el, nincsenek neurodegeneratív betegségei. Ennek ellenére a *C. elegans* jól használható modellrendszer a neurodegeneratív betegségek, az idegrendszeri fejlődési rendelleneségek (pl.: autizmus spektrumzavar), a metabolikus betegségek (pl.: elhízás, inzulin rezisztencia), a vesebetegségek és különböző ciliopátiák, valamint a rák esetén, de lehet vizsgálni bennük a veleszületett immunitás működését, vagy a gazda-patogén kapcsolatokat is. Természetesen ezek a modellek nem fedik le a humán betegség teljes komplexitását és nagyon sok aspektusa a betegségnek hiányzik, de a sejt szintű változások nagyon konzerváltak és sokszor könnyebb ebben az egyszerű rendszerben megvizsgálni bizonyos aspektusokat. Nagyon sok betegségben érintett gén ortológja megtalálható *C. elegans*-ban így sokszor azok mutációival modellezhető az állapot. Ha ez nem lehetséges, a humán fehérjét és annak elrontott változatát kifejeztetve hozzák létre egyes betegségek modelljét. A *C. elegans* lehetőséget biztosít a gyors, egyszerű vizsgálatokra, amik akár a személyre szabott orvoslás felé is mutathatnak, de a nagy áteresztőképességű gyógyszerjelölt/kismolekula szűrésekre is kiválóan alkalmas a modell. A *C. elegans* betegségmodellek korlátai miatt a vizsgálatokat általában először komplexebb

modellszervezeteken is meg szokták ismételni, de nagyban könnyíti és gyorsítja a folyamatot, ha egy több ezer tagból álló kismolekula könyvtárat először pár nap alatt szűrni lehet *C. elegans*-ok segítségével és már csak néhány potenciális jelöltet kell például egerekben vizsgálni (5.ábra).^{30–37}



5. ábra: A *C. elegans*-ok használhatók humán betegségmodellnek (példák). **A:** Az RTK-RAS/MAPK útvonal igen konzervált az állatvilágban. Aktivitása fokozza a sejtproliferációt az emberi sejtekben, míg *C. elegans*-ban *Multivulva* fenotípust okoz. Bár *C. elegans*-ban nem alakul ki rákos elváltozás, de ebben az esetben is a normálistól eltérő sejtosztódás történik. A konzervált útvonalak vizsgálatával kapott eredmények alapján számos terápiás sikert értek már el.³⁵ **B:** Neurodegeneratív betegségek modellezéséhez a betegségben szerepet játszó humán géneket fejeztetik ki *C. elegans*-ban. Sejt/szövet specifikus expresszióval jól vizsgálhatóak ebben az egyszerű rendszerben a betegségek jellegzetes aspektusai. Parkinson-kór (PD), Alzheimer-kór (AD) és a poliglutamin betegség, Ab: β -amiloid; APP: amiloid-prekursor fehérje; α Syn: α -synuclein; polyQ: poliglutamin ismétlődések. (Módosított ábra)³⁰ **C:** A személyre szabott orvoslásban is szerepe lehet a modellnek. Egy paciensenél, akinél értelmi fogyatékosságot, ataxiát (izommozgások koordinációjának zavarából adódó ügyetlen mozgás) és születési arthrogyposist (végtagzsugorodás, ízületek hajlított helyzetű merevsége) állapítottak meg, az *NALC* génben találtak egy addig nem ismert heterozigóta mutációt. Az *NALCN* egy ioncsatornát kódol. Recesszív funkcióvesztéses mutáció esetén már ismert volt, hogy fejlődési elmaradást, hipotóniát okoz gyerekekben. *C. elegans*-ban két funkcionálisan redundáns ortológja van az *NALC*-nek: *nca-1* és *nca-2*. Míg a vad típusú *C. elegans*-ok úgynevezett szinusoid mozgással haladnak (szinuszgörbét rajzolnak ki a mozgásukkal), addig az *nca-1(-);nca-2(-)* kettősmutánsok a csökkent izomösszehúzódások miatt nem képesek így mozogni,

sokkal kisebb a testük meghajlása. A funkcióyeréses mutánsok (pl. *nca-1(hp102)*) a megnövekedett izomösszehúzódások miatt túlzottan meghajlanak mozgás közben. A paciensnél talált mutáció a fehérje egy rendkívül konzervált doménjében volt. Vad és *nca-1(-);nca-2(-)* kettős mutáns *C. elegans*-ban kifejeztették a vad és a betegre jellemző mutációt tartalmazó *NCA-1* fehérjét. A vad transzgén menekítette a kettős mutáns mozgását, és újra szinuszoid mozgása lett. A mutáns transzgén vad és *nca-1(-);nca-2(-)* kettős mutánsban is a funkcióyeréses mutánsokra jellemző begömbült mozgási mintázatot mutatta. Ezzel bizonyították, hogy egy domináns funkcióyeréses mutáció történt a paciensben. További *C. elegans*-ban végzett vizsgálatokkal azt is megállapították, hogy a Ca^{2+} felszabadulás nem zajlik normálisan ezekben a mutánsokban így lehetséges, hogy a betegnél is tudnának javulást elérni egy erre ható gyógyszerrel.^{32,37}

A *C. elegans* genetikailag könnyen manipulálható. Kezdetben főleg a „forward” genetikai megközelítést alkalmazták: valamilyen mutagén alkalmazása után egy szűrést (*screen*) végeztek, melyben különféle fenotípusokat kerestek, majd keresztezésekkel és klasszikus genetikai eszközökkel térképezték fel, mely génekben történt mutáció. Egy „millió mutációs projektnek” nevezett projektben EMS-sel és ENU-val nagyléptékű mutáns *screen*-t végeztek, melynek eredményeként olyan mutáns parkot hoztak létre, mely génenként átlagosan 8 mutációt tartalmaz. Az eredmények és a törzsek is hozzáférhetőek az egész kutatói közösség számára. Ma is alkalmaznak még mutáns *screen*-eket, például, ha olyan mutációkat keresnek, amik módosítják egy másik mutáns fenotípusát (elnyomják vagy fokozzák), de ma már elsősorban szekvenálással azonosítják a pontos mutációt.^{2,38}

A „*revers*” genetikai megközelítés egyik nagyon hatékony eszköze *C. elegans*-ban az RNS interferenciával kiváltott géncsendesítés. Bár más élőlényekben is elterjedt a módszer, *C. elegans*-ban kimondottan egyszerű, úgynevezett etetéses RNS interferenciát lehet alkalmazni. A csendesítendő génre specifikus szekvenciát egy úgynevezett *feeding* vektorba klónozzák be, melyet utána egyszerűen transzformálnak egy speciális *E. coli* törzsben, amiben a plazmidról duplaszálú RNS képződik. A *C. elegans*-okat ezekkel a baktériumokkal etetve az állat összes sejtjébe tovább terjed az RNS interferencia, köszönhetően egy speciális receptorfehérjének. Vad típusú állatokban az idegsejtek nem fejezik ki ezt a receptort, így az idegrendszerben nem működik az *RNSi*. Már létrehoztak transzgenikus törzseket, amikben az idegrendszerben is lehetővé tették a duplaszálú RNS felvételt. Nagy átérésztőképességű szűrésekhez *RNSi* könyvtárak állnak rendelkezésre, ahonnan a szükséges konstrukciók megrendelhetőek.^{2,5}

A csíravonal prekurzor sejtjeit célzó mikroinjektorral vagy biológiai transzformációval (génpuska) könnyen transzformálhatók a *C. elegans*-ok. A bejuttatott plazmidok maradhatnak extrakromoszómálisak vagy integrálódhatnak a genomba. Az

extrakromoszómális elem nem minden sejtbe és nem minden utódba jut át, eltérő lehet az öröklődés hatékonysága, de nagyon sok extrakromoszómális elemet tartalmazó törzs hosszan fenttartható. A bejuttatott plazmid spontán integrálódhat is a genomba random, de különböző módszereket alkalmazva megoldható, hogy csak a szükséges szekvencia és irányítottan integrálódjon. A célzott genom-szerkesztési eljárásokat (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9) megvalósították a *C. elegans* esetében is. A CRISPR/CAS9 rendszer egyszerűségénél és gyorsaságánál fogva kezdi kiszorítani a többi módszert. Más szervezetekhez hasonlóan a CRISPR/CAS9 rendszer állandó fejlesztés alatt áll, és ötvözve más módszerekkel, nemcsak mutációk létrehozására alkalmas, de számos egyéb manipulációra is (pl. endogén fehérjék jelölésére (fluoreszcens marker, tag), fehérjék térben és időben szabályozott degradálására vagy túltermelésére stb.).^{2,39-44}

A *C. elegans* kutatói közösség igen aktív, a kutatások eredményeit állandóan frissülő, interneten könnyen elérhető adatbázisok foglalják össze. Ezek közül a három legjelentősebb a főleg genetikai információkat összefoglaló WormBase (wormbase.org), a féreg anatómiájával kapcsolatos ismereteket összegyűjtő WORMATLAS (wormatlas.org), és a fejlődéstani és sejtbiológiai vizsgálatok eredményeit összefoglaló cikket tartalmazó WormBook (wormbook.org).²

A legegyszerűbb többsejtű modellszervezetként a *C. elegans*-nak megvannak a korlátai, azonban a génekölcsönhatások és genetikai útvonalak egyszerű, gyors feltérképezésére továbbra is az egyik legkompetensebb modell. Specifikus tulajdonságai révén ez különösen igaz az öregedés és az idegrendszer vizsgálatában, de a kivételesen nagy és gyors *screenekben* történő alkalmazhatósága révén fontos szerepe van a gyógyszerjelölt molekulák szűrésében is.

Köszönetnyilvánítás

A *C. elegans* fejezet Prof. Vellai Tibor (és Dr. Hotzi Bernadette) előadásain alapszik. Köszönjük, hogy évente színvonalas előadással ismerteti meg a hallgatókat a *C. elegans*-ok genetikai kutatásokban betöltött jelentőségével!

Felhasznált irodalom:

1. Brenner, S. *Foreword. The Nematode Caenorhabditis Elegans.* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY., 1988).
2. Corsi, A. K., Wightman, B. & Chalfie, M. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *WormBook : the online review of C. elegans biology* 1–31 Preprint at <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.177.1> (2015).
3. Ellis, H. M. & Horvitz, H. R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44, 817–829 (1986).
4. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science* (1979) 52, 1766–1767 (1994).
5. Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998 391:6669 391, 806–811 (1998).
6. Altun, Z. F. & Hall, D. H. *WormAtlas Hermaphrodite Handbook - Introduction.* *WormAtlas* (2006) doi:10.3908/wormatlas.1.1.
7. Sulston, J. E. & Horvitz, H. R. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56, 110–156 (1977).
8. Sulston, J. E., Albertson, D. G. & Thomson, J. N. The *Caenorhabditis elegans* male: Postembryonic development of nongonadal structures. *Dev Biol* 78, 542–576 (1980).
9. Riddle, D. L., Blumenthal, T., Meyer, B. J. & Priess, J. R. *Introduction to C. Elegans. C. elegans II* (1997).
10. Herndon, L. A., Wolkow, C., Hall, D. H. & Driscoll, M. *WormAtlas Aging Handbook - Introduction to Aging in C. elegans.* *WormAtlas* (2018) doi:10.3908/wormatlas.8.4.
11. Barna, J. A sejtés stressz-választ szabályozó genetikai útvonalak integrációja *Caenorhabditis elegans*ban. (2012).
12. Bob Goldstein. Embryonic development. https://en.wikipedia.org/wiki/File:C._elegans_embryo_development.tif (2021).
13. Ellis, R. & Schedl, T. Sex determination in the germ line. *WormBook* 1–13 (2007).
14. Emmons, S. W. The development of sexual dimorphism: studies of the *C. elegans* male. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* July, 239–262 (2014).
15. Herndon, L. A., Wolkow, C. & Hall, D. H. *WormAtlas Aging Handbook - Introduction to Aging in C. elegans.* *WormAtlas* (2018) doi:10.3908/wormatlas.8.4.
16. Zhang, W. B. *et al.* Extended Twilight among Isogenic *C. elegans* Causes a Disproportionate Scaling between Lifespan and Health. *Cell Syst* 3, 333-345.e4 (2016).
17. Hotzi, B. *et al.* Sex-specific regulation of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 17, e12724 (2018).
18. Christensen, K., Johnson, T. E. & Vaupel, J. W. The quest for genetic determinants of human longevity: challenges and insights. *Nature Reviews Genetics* 2006 7:6 7, 436–448 (2006).
19. Zhang, S., Li, F., Zhou, T., Wang, G. & Li, Z. *Caenorhabditis elegans* as a Useful Model for Studying Aging Mutations. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11, 554994 (2020).
20. Lionaki, E. & Tavernarakis, N. Assessing aging and senescent decline in *Caenorhabditis elegans* : Cohort survival analysis. *Methods in Molecular Biology* 965, 473–484 (2013).
21. Felker, D. P., Robbins, C. E. & McCormick, M. A. Automation of *C. elegans* lifespan measurement. *Transl Med Aging* 4, 1–10 (2020).
22. O'Reilly, L. P., Luke, C. J., Perlmutter, D. H., Silverman, G. A. & Pak, S. C. *C. elegans* in high-throughput drug discovery. *Adv Drug Deliv Rev* 0, 247 (2014).
23. Wang, S. Y. *et al.* The demethylase NMAD-1 regulates DNA replication and repair in the *Caenorhabditis elegans* germline. *PLoS Genet* 15, e1008252 (2019).
24. Credit: Image courtesy Niels Ringstad/MIT. Researchers find new actions of neurochemicals | MIT News | Massachusetts Institute of Technology. <https://news.mit.edu/2009/neurochemicals-0702> (2009).
25. Donnelly, J. L., Clark, C. M., Leifer, A. M., Pirri, J. K. & Haburcak, M. Monoaminergic Orchestration of Motor Programs in a Complex *C. elegans* Behavior. *PLoS Biol* 11, 1001529 (2013).
26. Altun, Z. F. & Hall, D. H. *WormAtlas Hermaphrodite Handbook - Nervous System - General Description.* *WormAtlas* (2005) doi:10.3908/wormatlas.1.18.
27. Hart, A. Behavior. *WormBook* (2006) doi:10.1895/wormbook.1.87.1.
28. *C. elegans* Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282, 2012–8 (1998).

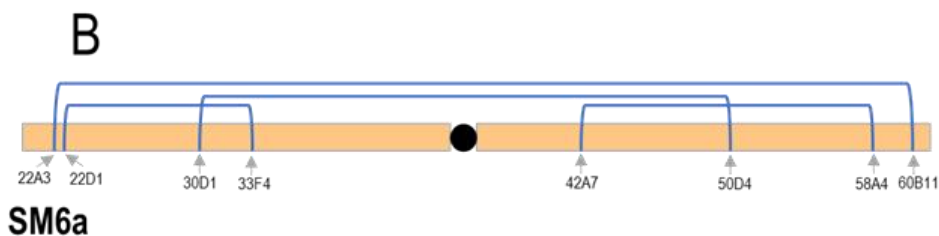
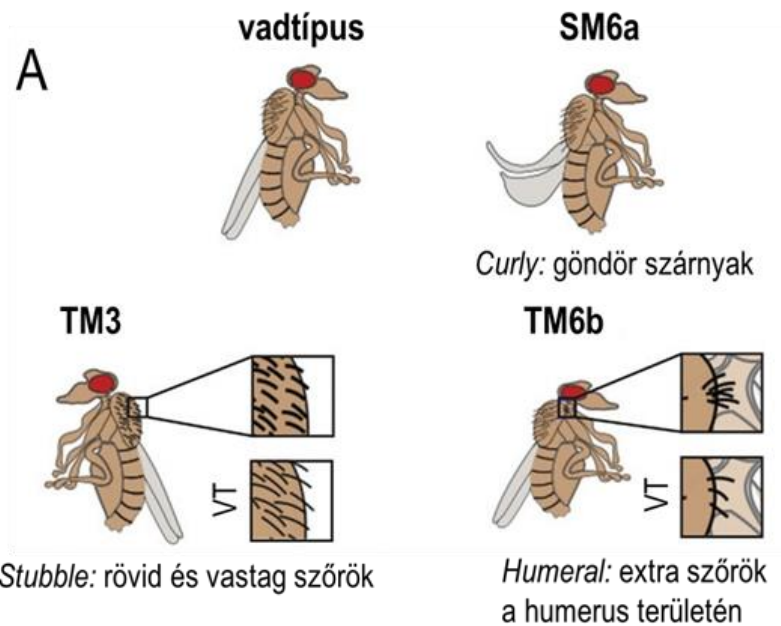
29. Coghlan, A. Nematode genome evolution *. (2005) doi:10.1895/wormbook.1.15.1.
30. Markaki, M. & Tavernarakis, N. *Caenorhabditis elegans* as a model system for human diseases. *Current Opinion in Biotechnology* vol. 63 118–125 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.011> (2020).
31. Kepler, L. D., McDiarmid, T. A. & Rankin, C. H. Rapid assessment of the temporal function and phenotypic reversibility of neurodevelopmental disorder risk genes in *Caenorhabditis elegans*. *DMM Disease Models and Mechanisms* 15, (2022).
32. Kropp, P. A., Bauer, R., Zafra, I., Graham, C. & Golden, A. *Caenorhabditis elegans* for rare disease modeling and drug discovery: strategies and strengths. *DMM Disease Models and Mechanisms* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.1242/DMM.049010> (2021).
33. Mondal, S. *et al.* Large-scale microfluidics providing high-resolution and high-throughput screening of *Caenorhabditis elegans* poly-glutamine aggregation model. *Nat Commun* 7, (2016).
34. Lemieux, G. A. & Ashrafi, K. Insights and challenges in using *C. elegans* for investigation of fat metabolism. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* vol. 50 69–84 Preprint at <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.959890> (2015).
35. Cerón, J. *Caenorhabditis elegans* for research on cancer hallmarks. *DMM Disease Models and Mechanisms* vol. 16 Preprint at <https://doi.org/10.1242/dmm.050079> (2023).
36. Silverman, G. A. *et al.* *Developmental Biology: Model Systems-A Series of Reviews Modeling Molecular and Cellular Aspects of Human Disease Using the Nematode Caenorhabditis Elegans*. www.pedresearch.org (2008).
37. Aoyagi, K. *et al.* A Gain-of-Function Mutation in NALCN in a Child with Intellectual Disability, Ataxia, and Arthrogyrosis. *Hum Mutat* 36, 753–757 (2015).
38. Thompson, O. *et al.* The million mutation project: A new approach to genetics in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res* 23, 1749–1762 (2013).
39. Zhang, L., Ward, J. D., Cheng, Z. & Dernburg, A. F. The auxin-inducible degradation (AID) system enables versatile conditional protein depletion in *C. elegans*. *Development (Cambridge)* 142, 4374–4384 (2015).
40. Luo, Z. *et al.* Gene activation in *Caenorhabditis elegans* using the *Campylobacter jejuni* CRISPR-Cas9 feeding system. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 12, (2022).
41. Fischer, F. *et al.* Ingestion of single guide RNAs induces gene overexpression and extends lifespan in *Caenorhabditis elegans* via CRISPR activation. *Journal of Biological Chemistry* 298, (2022).
42. Dickinson, D. J. & Goldstein, B. CRISPR-based methods for *caenorhabditis elegans* genome engineering. *Genetics* 202, 885–901 (2016).
43. Fischer, F. *et al.* Ingestion of single guide RNAs induces gene overexpression and extends lifespan in *Caenorhabditis elegans* via CRISPR activation. *Journal of Biological Chemistry* 298, (2022).
44. Frøkjær-Jensen, C. Exciting Prospects for Precise Engineering of *Caenorhabditis elegans* Genomes with CRISPR/Cas9. *Genetics* 195, 635–642 (2013).

Ecetmuslica

Bevezetés

A *Drosophila melanogaster*, vagy más néven ecetmuslica már több mint 100 éve áll a kutatók szolgálatában. Ez idő alatt a módszertan széles skálája, jól kezelhető adatbázis és több tízezer, világszerte elérhető törzs segíti a kutatók munkáját. A modell használata 6 Nobel-díjjal jutalmazott felfedezést segített.

Az ecetmuslica embrióból szobahőmérsékleten 10 nap alatt (3 lárva és egy bábállapoton keresztül) holometamorfózissal alakul át imágóvá. A felnőtt állatokra jól megkülönböztethető ivari dimorfizmus jellemző, amely nagyban segíti a kutatókat a keresztezések kivitelezésében. Az állatok kis mérete, szaporasága (1 nőstény akár 100 petét is lerakhat naponta), könnyű fenntartása és viszonylag olcsó beszerzése, mind olyan tulajdonságok, amelyek előnyösek egy modell élőlény esetén. Négypár kromoszómáján (egy ivari és három szomatikus) mindösszesen 13.500 gén található, amely kisméretű – kompakt genomnak számít. Ennek köszönhetően egy gén meghibásodása nagyobb valószínűséggel vezethet fenotípushoz, mint az egyedfejlődésileg komplexebbnek számító élőlényekben, melyekben több redundáns funkcióval rendelkező gén is előfordulhat. A redundancia hiányában a látható fenotíusból következtethetünk a gén által kódolt fehérje funkciójára, amely más, nagyobb génkészlettel rendelkező élőlényekben rejtve maradna.¹ A mutáns törzsek fenntartását és a keresztezéseket, olyan balanszer kromoszómák segítik, amelyek látványos, domináns (homozigóta formában letális) markermutációkat hordoznak. Például a második kromoszóma SM6a nevű balanszer a *Duox* (*dual oxidase*) nevű gén domináns *Curly* nevű allélját kódolja, amely mutáció tor felé visszagöndörödő szárnyakat okoz.^{2,3} A TM3 pedig olyan domináns allélekkel rendelkezik, amelyek vastag, de rövidebb szőr és csipkézett szárny fenotípusokat okoznak. A TM3 recesszív mutációkat is kódol, mint például a sötét testszín okozó *ebony* mutáció (1. árba). Korábbi kromoszóma töréseknek köszönhetően a balanszer kromoszómák inverziós és transzlokációs régiókat tartalmaznak, amelyek kizárják a rekombinációt vad típusú homológ kromoszómákkal. Példaként maradva az SM6a balanszernél, a második kromoszóma jobb karjának 22A3 és bal karjának 60C citológiai régiói között 8 kromoszóma törés zajlott le, a 22A3 és 60C közötti gének sorrendje pedig drasztikusan átrendeződött (1. ábra).⁴



1.) és a harmadik- (TM3 és TM6b) balanszer kromoszómáinak jellegzetes fenotípusai vannak a vadtípusú (VT) állatokkal összehasonlítva. (B) Az SM6a balanszer kromoszóma törései láthatóak. A kromoszóma állomány a töréspontok között inverziókkal és transzlokációkkal újra rendeződött. A nyilak alatt lévő számok a 2. kromoszóma citológiai régióit jelölik. A narancs színű téglalapok a kromoszóma jobb és bal karját, a fekete kör a centromert szimbolizálja. Az ábra az alábbi publikációk ábráinak módosításával készült ^{4,5}.

***Drosophila melanogaster*, mint betegségmodell**

Az *ecetmuslica* betegségmodellként kiválóan alkalmazható. Az emberi betegségekhez köthető gének mintegy 70% százalékának ismert *Drosophila* megfelelője. *Ecetmuslicában* létrehozott modellek leginkább prediktívnek tekinthetők, gyakran a folyamatnak csak egyes részei vannak jelen. Például az *ecetmuslica* is rendelkezik az Alzheimer-kórban fontos *APP* gén ortológjával (*App1*). Jelentős konzerváltságot mutat az γ -szekretáz proteolitikus aktivitása is. A *muslica* γ -szekretáz enzime képes hasítani a humán *APP* fehérjét. Számottevő különbség, hogy a vad típusú *muslicában* nincs béta-amiloid képződés, ugyanis a *Drosophila App1* szekvenciája eltér az *APP*-től azon a területen, ami a béta-amiloid fehérjét kódolja, továbbá a β -szekretáznak megfelelő enzim is hiányzik.⁶ Tehát az Alzheimer-kórban érintett fehérjék egy

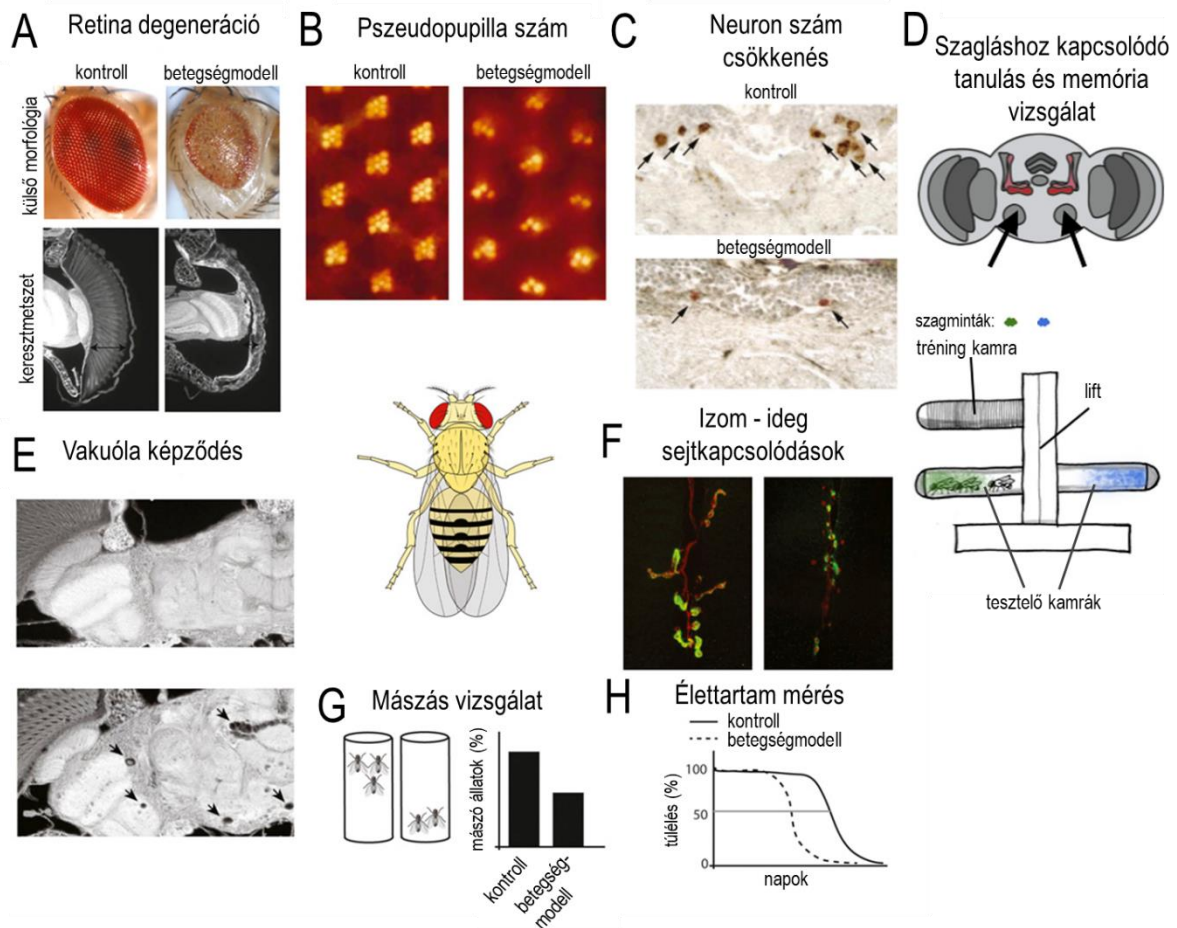
része jelen van ecetmuslicában, de a betegséget kiváltó hiba endogén módon már nem tud kialakulni.

Hátrányokat is fontos számba venni, mielőtt *Drosophilaban* kezdünk humán betegségeket modellezni. Szembetűnő hátrány, hogy hiányoznak belőle az emberi szervezetre jellemző komplexebb folyamatok, anatómiailag jelentősen eltér (például eltér a vér-agy gát membránjának felépítése). A nyitott keringési rendszer hátránya, hogy benne vérnyirok/hemolimfa található és nem vér. Emberben gyakoribbak a mikroszatellita mutációk, muslicában pedig jellemzőbbek a nukleotidokat érintő pontmutációk. Illetve mindig szem előtt kell tartani, hogy a patológiás okok lehetnek gerincesekre specifikusak és gerinctelen modellbe át nem ültethetők.⁷

Az ecetmuslica mint neurodegenerációs betegségmodell

A *Drosophila* neurodegenerációs modellként is használható. Előnye, hogy az idegrendszerét szintén neuron és glia sejtek alkotják. A muslicák agya egy vér-agy gát szerű határfelülettel van körül határolva, amely egy sejtornyos glia sejtől épül fel. Az idegsejtek közötti kommunikáció is hasonló az emlősökben ismertekhez, a legtöbb neurotranszmitter az ecetmuslicában is megtalálható. A *Drosophila* is rendelkezik dopamint, szerotonint, hisztamint, GABA-t, glutamátot és acetylcholin kifejező sejtekkel, de hiányoznak az adrenalin és noradrenalin szintézisre képes sejtek.⁸ A vér-agy gát szerű gliából álló határfelület hasznos lehet mindazoknak, akik hatóanyagok tesztelését tervezik *Drosophila* modellel, hiszen egy központiidegrendszerre ható molekulának fontos kritériuma, hogy áthaladjon a vér-agy gáton.⁹ Az idegrendszeri hasonlóságokon túl több, korral leromló képesség is mérhető a muslicákban, amely képességek kapcsolódnak az idegrendszer állapotához. Az állatok élettartama rövid, 25°C-on átlagosan 90, míg 29°C-on 60 napig élnek. A mozgásképeség vizsgálatok szintén előszeretettel alkalmazott mérések, melyek során az előzetesen elaltatott muslicákat hosszú, vékony csövekbe helyezik és hagynak 1,5 – 2 órát a széndioxidos altatás utáni regenerációra. A vizsgálat a negatív geotaxis nevű viselkedésen alapul, amely szerint, ha az állatokat leütik a cső aljára, azok felfelé kezdenek menekülni. A csövek keresztmetszete kellően szűk, ahhoz, hogy megakadályozza az állatok repülését, így a sokkal egyenletesebb és könnyebben számolható mászást lehet tanulmányozni. Megkülönböztethető rövidtávú és hosszútávú mászás. Előbbinél főleg az állatok ingerfelfogó képességét, míg utóbbinál az inger megtartó (memóriával összefüggésbe hozható) képességet lehet vizsgálni. A mászásképeség az élettartam során fokozatosan csökken, 29°C-on tartott állatoknál a bábból való kikelést követő

30. napig lehet vizsgálni (2. ábra).¹⁰ Szintén korfüggő képességeket lehet tanulmányozni a memória és tanulási esszékkel, melyeknek különböző fajtái ismertek ecetmuslicában. A módszertanból attól függően lehet választani, hogy mely idegrendszeri területet szeretnénk



2. ábra: Ecetmuslica neurodegeneratív betegségmódellek tanulmányozásának módszertana. A) Az összetett szem fotoreceptor sejtjei idegeredetűek. Pusztulásuk jól tanulmányozható és nem vezet az állatok pusztulásához. (B) Megvilágítva a fotoreceptor sejt pseudopupilla részei könnyen számolhatóvá válnak. Vad típusú állatok omatídium egységeiben 7 pseudopupilla számolható. (C) A neurodegeneratív (ND) betegségek specifikus idegsejtcsoportok pusztulását okozhatják. Ezen idegsejtek jelölésével, információt kaphatunk az idegsejt pusztulás mértékéről. (D) A szaglászán alapuló memória és tanulás vizsgálatoknál a nyilakkal jelölt antenna lóbusz és a gombatestek (színekkal jelölt) területinek állapotáról kaphatunk információt. A tréning kamrában pozitív- (cukoroldat) vagy negatív- (elektrosokk) ingernek tesszük ki az állatokat, majd egy lifttel a vizsgálati szintre mozgatójuk őket. Itt kell az állatoknak különbséget tenniük 2 szag közül, amelyből az egyiket a pozitív vagy negatív ingerhez társították. (E) Az idegsejtek pusztulásával lyukak is keletkezhetnek az agyban. A keletkezett vakuólák számolásával mérhetővé válik a neurodegeneráció mértéke. (F) Egyes ND betegségek jellemző az izom – ideg sejt kapcsolatok meghibásodása, amely aberráció mérése szintén informatív adatokkal szolgálhat a kutatók számára. (G) A mászásesszé során egy vékony hosszú csőben lehet vizsgálni leütés után az állatok ingerfelfogó képességét, azaz adott idő alatt mennyi állat mászik fel egy meghatározott magasságba. A mászásesszé a muslicákra jellemző negatív geotaxis (felfelé menekülnek stressz esetén) nevű viselkedésen alapul.

(H) Számos ND betegség együtt jár a várható élettartam lecsökkenésével. Ilyen vizsgálatok nagyszámú egyeddel végezhetőek, viszonylag rövid idő alatt (50-60 nap 29°C-on) ecetmuslicában. Az ábra az alábbi publikációk ábráinak módosításával készült ^{10,12}.

vizsgálni. Vannak vizuális és kémiai (főleg szaglason) ingereken alapuló vizsgálatok. A legelterjedtebb módszernél a muslicáknak 2 szagminta között kell különbséget tenniük, miután az egyik szagmintát áramütéshez társították. Maga a tanítás és a vizsgálat időben elválaszthatóak egymástól. 6 óra elteltével mérve a szagpreferenciát, már középtávú memória vizsgálatról beszélhetünk muslicák esetén (2. ábra). ¹¹

Maga a neurodegeneráció gyakran tetten érhető az idegsejtek pusztulásával. Az elhalt agyterületeken lyukak képződhetnek, illetve a specifikus idegsejtek csökkenő száma is vizsgálható ellenanyag vagy transzgenikus markerek segítségével. Például a Parkinson-kór modellekben definiálva van, hogy mely dopaminerg neuron csoportok számában várható csökkenés. ¹³ Az idegrendszeri betegségek jó modellje ecetmuslicában az összetettszem is, amelynek fotoreceptor sejtjei idegi eredetűek. A szem morfológiai változása vagy az ommatidium egységekben található fotoreceptor sejtekhez tartozó rabdomerek száma könnyebben meghatározható, mint az idegrendszer pusztulásának mértéke (2. ábra). ¹⁰

Hogyan hozzuk létre betegségmodellt ecetmuslicában?

Fenti módszertani példák szemléltetik, hogy egy embertől nagyban különböző élőlényt hányféleképpen lehet használni betegségek tanulmányozására. Hogyan hozható létre egy neurodegeneratív betegségmodell *Drosophila*-ban? Először ki kell választani, hogy milyen betegséget vizsgálunk és mi okozza a betegséget. Gyakran egy gén hiánya felelős a tünetekért, vagy valamilyen mutáns fehérjéből képződik toxikus forma. Poligénes betegségnél, mint amilyen a Parkinson-kór, találhatunk mindkettőre példát: A Parkin egy E3 típusú ubikvitin konjugációs enzim, hiánya felelős leggyakrabban a dopaminerg neuronok pusztulásáért. Parkin nélkül a sérült mitokondriumok nem tudnak lizoszomálisan lebomlani, így belőlük a sejtet pusztító reaktív oxigénradikálok (ROS) fognak kiáramlani a citoplazmába. ¹⁴ Az α -szinuklein szintén összekapcsolható a Parkinson-kórral, mutációja leggyakrabban dominánsan öröklődik. Az α -szinuklein gén legismertebb domináns allélje az *A53T*, amelyből a sejtek számára káros oligomereket és aggregátumokat képző fehérje íródik át. ¹⁵ Fenti példa mutatja, hogy egy poligénes betegség esetén egymástól látszólag független funkciójú gének mutációja is vezethet ugyanazon betegséghez. Érdeemes kihangsúlyozni, hogy a Parkin és az α -szinuklein fehérjék meghibásodásai különböző életkorú embereknél okozhatnak tüneteket. A kór progressziójában

is fellelhetünk különbségeket. A patológiás bélyegek között is található eltérés: a Lewy-testek megjelenése az α -szinuklein mutációira jellemzőbb, a Parkinra kevésbé.¹⁶ Egy poligénes kór vizsgálatánál először el kell döntenünk, hogy a betegség mely érintett génhez kapcsolódó típust szeretnénk vizsgálni.

Miután kiválasztottuk a vizsgálandó neurodegenerációt (ND) muslicában és megterveztük, hogyan kívánjuk azt előidézni modellünkben, meg kell terveznünk a kísérletes eszköztárunkat is, azaz milyen fenotípusos és fenokópiás jellegeket fogunk tanulmányozni. Leggyakrabban az ND-t a humán mutáció túltermeltetésével szokás létrehozni, amely kifejeződését elegendő csak a vizsgálandó célterületre korlátozni. Például, ha csak az összetett szem fejlődését befolyásoljuk, azzal nagyobb valószínűséggel kapunk életképes állatot, mintha a citotoxikus fehérje más szerveket is befolyásolna. Ennek köszönhetően a kísérletben kevesebb egyed pusztul el a vizsgálat előtt és a kívánt mérést nagyobb egyedszámmal végezhetjük. Egy csak idegrendszerben kifejeződő ND-nek az is előnye lehet, hogy a gyakorta alkalmazott mozgásvizsgálatoknál, az izom nincs befolyásolva és a kapott eredményekből egyértelműbb következtetések szülehetnek. A szerv- vagy akár sejttípus specifikus génkifejeződés szabályozására az ecetmuslicában az élesztőből származó UAS-Gal4 rendszer kínál megoldást. A rendszer működése 2 transzgénen alapul. Az UAS-gén önmagában „néma”, expressziója a Gal4 transzkripció faktor jelenlététől függ. Ha Gal4 kötődik az UAS-*enhancer* elemhez a génátíródás aktiválódik. Az UAS-régió által szabályozott transzgén okozhatja fehérjék túltermelődését, RNS interferenciával való csendesítést, fluoreszcens markerek sejt-specifikus kifejeződését stb. Tehát az UAS rész lesz felelős azért, hogy mi fog történni a sejtben. A hol kérdésre viszont a *Gal4* gén *enhancer* régiója fog választ adni. Hiszen a Gal4 génkifejeződési mintázat lesz az, amitől függ az UAS-gén expressziója. Csak azon sejtekben fog hiányozni, vagy túltermelődni az általunk kívánt fehérje, ahol a Gal4 is jelen van. Az UAS-Gal4 rendszerrel tehát egyszerre tudjuk megszabni, hogy hol és mi fog történni a génátíródással az ecetmuslicában.¹⁷ A rendszer további transzgenikus elemekkel fejleszthető tovább, így lehetőség nyílik a génszabályozás idejét is szabályozni. A Gal80 fehérjekomplexet képes alkotni a Gal4-el és a Gal4 Gal80-kötött formában nem képes az UAS-gének kifejeződését elősegíteni. A Gal80 termoszenzitív formája magas hőmérsékleten nem képes a Gal4-hez kapcsolódni, így aktiválódhat az UAS-Gal4 rendszer. Alacsonyabb permisszív hőmérsékleten a Gal80 és Gal4 fehérjék ismételten komplexet alkotnak majd és az UAS-transzgén megint elnémul.¹⁷ A módszernek köszönhetően egy mutáció akkor is vizsgálható lesz az általunk kiválasztott kísérleti rendszerben (mondjuk felnőtt élettartam mérésében),

ha az a Gal80 nélkül korai embrió letalitást okozna. Az UAS-Gal4 rendszer időbeli szabályozása (melyre más bevált hőmérséklettől független rendszerek is léteznek) periodikus ki- és bekapcsolásos” génszabályozás is megoldható, amellyel gyógyszer adagoláshoz hasonló kezelések is kivitelezhetőek.

A modell alapos karakterizálása és a betegséggel való összehasonlítása is szükséges. A létrehozott ND modell használható a betegség alaposabb megismerésére, új komponensek felfedezésére, funkciók azonosítására és gyógymódok keresésére is.

Kutatási irányok neurodegeneratív betegséggmodellek használatával

A *forward* genetika segítségével olyan genetikai *screeneket* végezhetünk, amelyeknek célja valamilyen új, eddig ismeretlen komponens azonosítása. A betegséggmodellekre jellemző fenotípus lesz a vizsgálati szempontunk (pl.: összetettszem abberáció, rosszabb mászási képesség, rövidebb élettartam stb.) amelyre szűrhetünk. A *forward* genetika előnye, hogy olyan gén mutációk érintettségét találhatjuk meg betegségekben, amelyekre magunktól (bioinformatikai eszközökkel sem) nem következtethetnénk. Hátránya, hogy a random létrehozott mutációkat azonosítani kell és csak nagyszámú egyedből lehet eredményt várni. Munka-igényesebb és kevésbé direkt megközelítés, mint a *reverse* genetikai megközelítés. A *Drosophilában* végzett *forward* genetikai vizsgálatoknak eddig számos neurodegenerációban érintett gén leírását köszönhetjük. Ilyenek például az *drd* (*drop dead*), *sws* (*swiss cheese*), vagy a *bgm* (*bubblegum*), melyeknek humán ortológja (VLCFAs) az amiotrófiás laterálszklerózisban (ALS-ben) érintett.¹⁸ A *forward* genetikai módszereket könnyíti ecetmuslicában, hogy gyakran gén inszercióval hoznak létre funkcióvesztéses vagy hipomorf alléleket. Ilyenkor a bejuttatott transzgén (mely szelekciós markert is kódol) szekvenciája ismert és meghatározható az inszerció pontos helye (pl.: inverz PCR-t követő génszekvenálással). Tehát a modern genetikai eszköztárnak (ismert a teljes genom, elérhető és viszonylag olcsó a szekvenálás) köszönhetően a *forward* genetikai kutatások ideje is jelentősen lecsökkent.

A *reverse* genetikával célzott géneket ronthatunk el és direkt vizsgálhatjuk a gén funkcióját általunk megadott szempontok alapján. Ebben az esetben a mutációk létrehozását általában ismeretanyag gyűjtés előzi meg, amellyel valószínűsíthetjük, hogy mely gének érintettek a számunkra érdekes betegségben. Gyakorta rokonfajokban ismert funkció konzerváltságát vizsgálják vagy bioinformatikai módszerekkel valószínűsíthető a gén érintettsége. Az amiotrófiás laterálszklerózis (ALS) egy a motor neuronokat érintő gyógyíthatatlan neurodegeneratív betegség. A betegség poligénes, eddig több mint 20 gént

azonosítottak, amely hibája érintett az ALS-ben. Örökletes formáját főleg dominánsan öröklődő allélek okozzák.¹⁹ A *C9orf72* gén mutációja felelős az örökletes ALS 30-50%-ért, melynek *Drosophila* megfelelője nem létezik. Az első gént, amely érintettségét leírták az ALS-ben a *SOD1* volt. Reverse genetikával összehasonlították a dSOD1 (*Drosophila* SOD1) és az emberi megfelelőjének a hSOD1-nek a funkcióját. Mindkettő fehérje hasonló sejten belüli elhelyezkedéssel rendelkezik és mindkettőnek szuperoxid-dizmutáz aktivitása van.²⁰ Érdekes különbség, hogy a dSOD1 aminosav szekvenciája pont azon a régióon tér el a hSOD1-től, amely leggyakrabban az emberi betegségért felelős. A hSOD1 kifejeződése (vad típusú és mutáns is) progresszív mászáskéesség romlást eredményez muslicában.²⁰ A Huntington-kórban érintett *Huntingtin* (*Htt*) génnek szintén van *Drosophila* ortológja, mindkettő fehérje részt vesz a szelektív autofágiában. Funkcionális hasonlóságukat jól példázza, hogy *dHtt* mutáns muslicák leromlott mozgási és túlélési képességét is részben helyreállítja (menekíti) az emberi *Htt* túltermeltetése.²¹ A direkt, *reverse* genetika tehát gyorsabb és kevésbé energiaigényes, mint a *forward* megközelítés. Hátránya, hogy azon gének rejtve maradnak előlünk, amelyek funkciójára előzetes ismeretekből nem tudunk következtetni.

Ha rendelkezünk egy jól karakterizált betegségmodellel, kereshetünk gyógymódot a modellünk használatával. A muslica jól használható genetikai és farmakológiai *screenek*-hez egyaránt. A *Drosophila* szaporaságának és viszonylag olcsó használatának köszönhetően, egyszerre sok gén vagy hatóanyag tesztelése megoldható. Az ELTE Genetikai Tanszékének *Drosophila* kutatócsoportja kimutatta, hogy az MTMR14 (ecetmuslicában EDTP) egy olyan autofágiát gátló fehérje, amely a Vps34 komplex antagonistájaként a vezikula nukleációs lépését gátolja az autofágiának.²² Az MTMR14 ortológjának csendesítésével sikerült autofágiát aktiválni, megnövelni az élettartamot és javítani az idős állatok mozgási képességét. Az autofágia szabályozása a fehérje gátlásával konzervált folyamat. A *reverse* genetikai módszerekkel kapott eredményeket felhasználva olyan autofágia aktiváló kismolekulák *screen*-jét tervezték (kismolekula könyvtárakból származó molekulákon), amelyekkel az MTRM14 gátlásán keresztül aktiválható az autofágia. A kezelt állatokban tanulmányozták az autofágiát, élettartamot és mozgási képességet. Két MTMR14- gátló molekula lett kiválasztva további vizsgálatokra (AUTEN-67 és -99), amelyek meghosszabbították az állatok várható élettartamát és javították mozgási képességüket. Ezen hatóanyagokat később olyan ND modellekben tesztelték, ahol a betegség kiváltó oka egy toxikus fehérje formájához volt köthető (A53T mutáns α -szinuklein, és 128 glutamint kódoló *Htt*). Az AUTEN kezeléseket ND modellekben is jótékony hatásúak voltak, segítették a toxikus fehérjék lebontását, ezáltal

gátolva a neuronok pusztulását, kóros fehérje aggregátumok felhalmozódását és javították mozgási képességet.^{23,24}

Fenti példa alapján látható, hogy egy genetikai kutatás, ugyanazon modellben folytatható farmakológiai vizsgálattal. Azonban érdemes megjegyezni, hogy az ecetmuslicán végzett kutatásokat célszerű emlős vagy humán sejtes kutatásokkal kiegészíteni. A kutatás orvosi relevanciája is csak abban az esetben vehető figyelembe, ha a muslicán végzett kísérletekhez hasonló eredményeket kapunk törzsfejlődéstanilag fejlettebb modellekben.

Felhasznált irodalom:

1. Tan, F. H. P. & Azzam, G. Drosophila melanogaster: Deciphering Alzheimer's Disease. *Malays. J. Med. Sci.* **24**, 6–20 (2017).
2. Ward, L. The Genetics of Curly Wing in Drosophila. Another Case of Balanced Lethal Factors. *Genetics* **8**, 276–300 (1923).
3. Hurd, T. R., Liang, F.-X. & Lehmann, R. Curly Encodes Dual Oxidase, Which Acts with Heme Peroxidase Curly Su to Shape the Adult Drosophila Wing. *PLoS Genet.* **11**, e1005625 (2015).
4. Miller, D. E. *et al.* The Molecular and Genetic Characterization of Second Chromosome Balancers in Drosophila melanogaster. *G3 (Bethesda)*. **8**, 1161–1171 (2018).
5. Canales Coutiño, B., Szamek, E., Markus, Z. & Georgiou, M. Generation and live imaging of tumors with specific genotypes in the living fly pupa. *STAR Protoc.* **2**, 100672 (2021).
6. Moloney, A., Sattelle, D. B., Lomas, D. A. & Crowther, D. C. Alzheimer's disease: insights from Drosophila melanogaster models. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 228–235 (2009).
7. Florence, H., T. P. & Ghows, A. Drosophila melanogaster: Deciphering Alzheimer's Disease. **23**, 6–20 (2017).
8. Kasture, A. S., Hummel, T., Sucic, S. & Freissmuth, M. Big Lessons from Tiny Flies: Drosophila melanogaster as a Model to Explore Dysfunction of Dopaminergic and Serotonergic Neurotransmitter Systems. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
9. Hindle, S. J. & Bainton, R. J. Barrier mechanisms in the Drosophila blood-brain barrier. *Front. Neurosci.* **8**, 414 (2014).
10. McGurk, L., Berson, a. & Bonini, N. M. Drosophila as an In Vivo Model for Human Neurodegenerative Disease. *Genetics* **201**, 377–402 (2015).
11. Malik, B. R. & Hodge, J. J. L. Drosophila adult olfactory shock learning. *J. Vis. Exp.* e50107 (2014) doi:10.3791/50107.
12. Kottler, B. & van Swinderen, B. Taking a new look at how flies learn. *Elife* **3**, e03978 (2014).
13. Wang, C. *et al.* Drosophila overexpressing parkin R275W mutant exhibits dopaminergic neuron degeneration and mitochondrial abnormalities. *J. Neurosci.* **27**, 8563–70 (2007).
14. Ashrafi, G., Schlehe, J. S., LaVoie, M. J. & Schwarz, T. L. Mitophagy of damaged mitochondria occurs locally in distal neuronal axons and requires PINK1 and Parkin. *J. Cell Biol.* **206**, 655–670 (2014).
15. Stefanis, L., Larsen, K. E., Rideout, H. J., Sulzer, D. & Greene, L. a. Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *J. Neurosci.* **21**, 9549–60 (2001).
16. Shimura, H. *et al.* Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* **25**, 302–305 (2000).
17. Barwell, T. *et al.* Regulating the UAS/GAL4 system in adult Drosophila with Tet-off GAL80 transgenes. *PeerJ* **5**, e4167 (2017).
18. Min, K. T. & Benzer, S. Preventing neurodegeneration in the Drosophila mutant bubblegum. *Science* **284**, 1985–1988 (1999).
19. Masrori, P. & Van Damme, P. Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. *Eur. J. Neurol.* **27**, 1918–1929 (2020).
20. Watson, M. R., Lagow, R. D., Xu, K., Zhang, B. & Bonini, N. M. A drosophila model for amyotrophic lateral sclerosis reveals motor neuron damage by human SOD1. *J. Biol. Chem.* **283**, 24972–24981 (2008).
21. Rui, Y.-N. *et al.* Huntingtin functions as a scaffold for selective macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* **17**, 262–275 (2015).
22. Manzéger, A. *et al.* Condition-dependent functional shift of two Drosophila Mtmr lipid phosphatases in

- autophagy control. *Autophagy* **00**, 1–19 (2021).
23. Billes, V. *et al.* AUTEN-67 (Autophagy Enhancer-67) Hampers the Progression of Neurodegenerative Symptoms in a *Drosophila* model of Huntington's Disease. *J. Huntingtons. Dis.* **5**, 133–147 (2016).
 24. Kovács, T. *et al.* The small molecule AUTEN-99 (autophagy enhancer-99) prevents the progression of neurodegenerative symptoms. *Sci. Rep.* **7**, 42014 (2017).

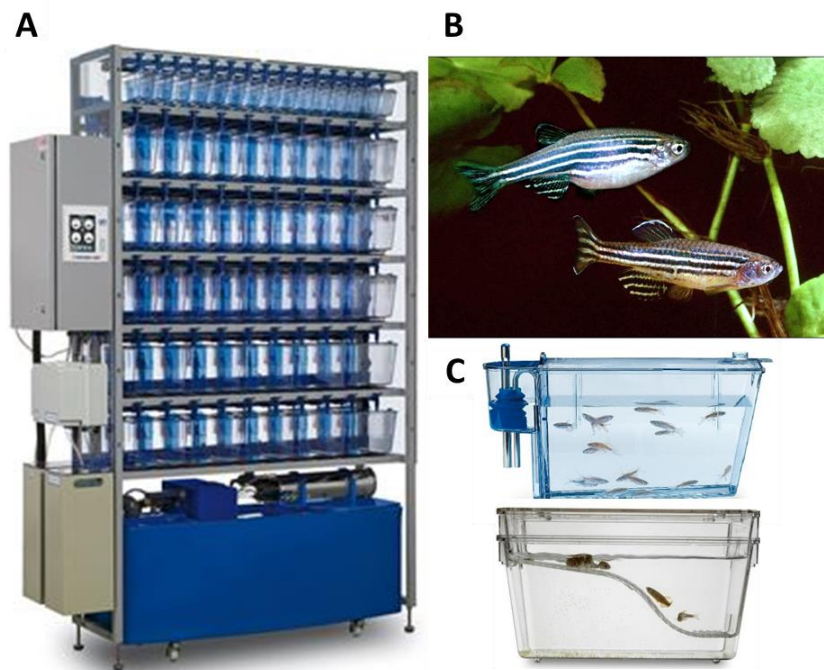
Zebradánió

A zebradánió (más néven zebrahal) (*Danio rerio*) egy dél-Ázsiában őshonos, édesvízi hal, mely a pontyfélék családjába tartozik. Nevét a test hosszában végighúzódnó vízszintes pigment csíkokról kapta. Ezek a néhány centiméter nagyságú halak általában kisebb rajokban mozognak, nem agresszívek csoporton belül és más fajokkal szemben sem, jellemzően 2-3 évig élnek (fogságban) és mindenevők (zooplankton, fitoplankton, rovarok, rovarlárvák, férgek). Könnyű fenntarthatóságuk és szaporíthatóságuk miatt az akvarisztikában is igen kedveltek.^{1,2} George Streisinger nevéhez fűződik a zebradánió bevezetése a genetikai modellrendszerek közé (1981). Streisinger korábban ecetmuslicákkal és vírusokkal foglalkozott, de úgy gondolta jó lenne egy egyszerű gerinces modell a kutatásokhoz. A zebradánió ekkor már elterjedt volt az állatkereskedésekben és számos előnyös tulajdonsága remek jelölté tette: „Generációs ideje mindössze 3-4 hónap, a felnőtt nőstények hetente több száz ikrát raknak, melyek gyorsan és szinkronban fejlődnek az anya testén kívül. Méretük kicsi (3cm), viszonylag igénytelenek és könnyen fenntarthatóak. A 7 napos halak már szabadon úsznak és a kifejlett egyedek számos morfológiai és viselkedési bélyegét mutatják, de mindössze pár milliméteresek, így nagy léptékű szűrésekre (mutációk) alkalmasak. 25-31°C között normálisan fejlődik, így könnyen lehet hőmérséklet érzékeny mutánsokat is izolálni.”³ Mára igen elterjedt gerinces modellszervezetté vált a zebradánió, aktív kutatói közösséggel és jó minőségű, egyre bővülő adatbázisokkal.

Laboratóriumi körülmények között a zebradániókat már nem az asztalokon tartják kis különálló akváriumokban, hanem speciális szobákban, polcrendszereken vannak elhelyezve az automatizált szűrő és monitorozó rendszerrel felszerelt akváriumok (1. ábra A, C). Ez a rendszer biztosítja az állandó, ideális hőmérsékletet (28°C), a megfelelő pH-t (~pH7) és vízkeménységet (laboronként eltérő lehet), a szükséges megvilágítást, só és oxigénkoncentrációt, továbbá kiszűr számos fertőző ágenszt is. Természetesen emellett szükséges az akváriumok rendszeres tisztítása és az állatok megfelelő etetése (halpehely, garnélarák, egysejtűek).⁴

A hímek és a nőstények (kicsit gyakorlottabb szemmel) jól elkülöníthetőek (1. ábra B). A nőstények (főleg, ha tele vannak ikrával) kicsit dundibbak, torpedó alakúak és felismerhető a tojócsövük is szabad szemmel. A hímek áramvonalasabbak, pirosasabb színezetűek és sokszor aktívabban mozognak. (Érdekes módon keveset tudunk a nemi fejlődésük molekuláris hátteréről, mivel elvesztették az ivari kromoszómájukat, bonyolult az ivarmeghatározás, a

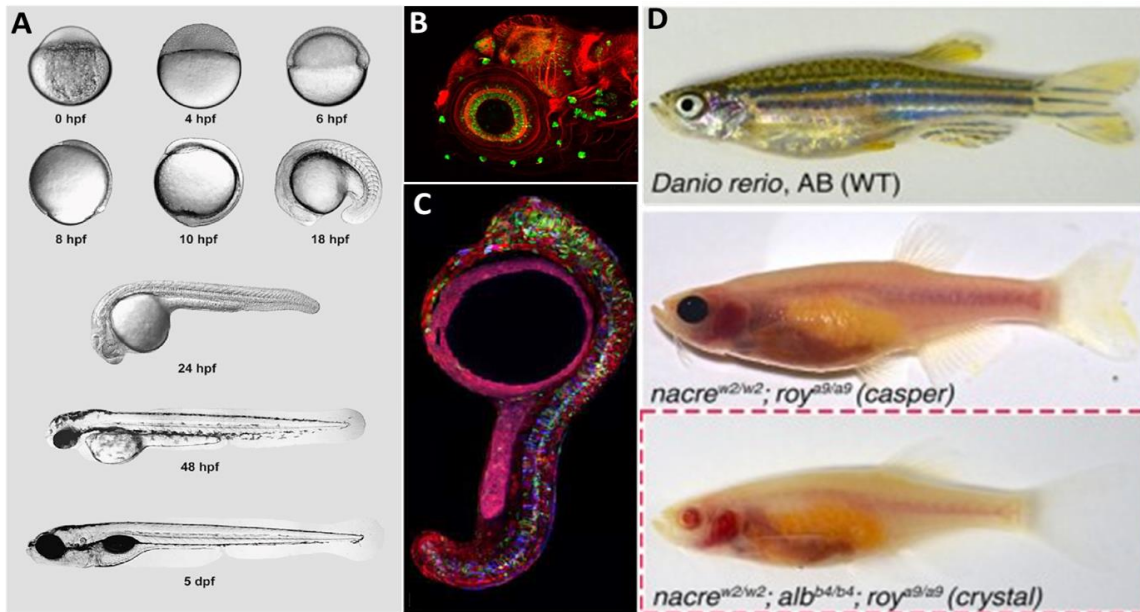
környezeti tényezők is jelentősen befolyásolják.) A nemek jól elkülöníthetősége megkönnyíti a keresztezéseket. Külső megtermékenyítésűek, de szükségük van a nemek fizikai kontaktusára az ivarsejtek kiürítéshez, így időszakos elválasztással, majd a megfelelő időpontban való összeengedéssel szinkron populációk könnyen létrehozhatóak. Az ívatást olyan akváriumban szokták végezni (1. ábra C), amibe behelyeznek egy, a partvonalat imitáló műanyag betétet, amin akkora méretű lyukak vannak, hogy az ikrák átférjenek rajta, de a felnőtt halak ne, így ívás során az ikrák (20-200 darab) lesüllyedhetnek az akvárium aljára és a kicsit hosszabb ívás során sem eszik meg őket a szülők. (A természetes környezetben az ikrák a folyó kavicsokkal borított aljzában lelnek menedéket.)^{1,4}



1. ábra: Zebradánió tartása A: automatizált akváriumtartó polcrendszer (vízáramoltatással, szűrőkkel, monitorozó rendszerrel) (ZebTEC) B: Hím (alul) és nőstény (felül) zebradánió ⁵ C: akvárium (felül) és a partvonalat imitáló ívató akvárium (alul) (ZebTEC)

Az embriók az anya szervezetén kívül fejlődnek és 24 órán át kezelés nélkül is áttetszőek (2. ábra A), így a fejlődési folyamat könnyen nyomon követhető akár egy egyszerűbb mikroszkóp segítségével is, de a festési eljárások és fluoreszcens jelölések is vizsgálhatóak (2. ábra B, C). (Ellentétben például az ugyancsak széles körben használt gerinces modell egerekkel.) Ezalatt a 24 órás periódus alatt már egy elég komplex fejlődési stádiumig eljutnak az állatok, már kezdik felvenni a halakra jellemző külalakot, kialakulnak a főbb szervrendszerek. (Összehasonlításképpen az egér embriók napokkal később tartanak ebben a

fejlődési stádiumban.) 33 órásan már olyan fokú az állatok pigmentáltsága, hogy kényelmesen nem lehet belelátni az állatok testébe. Ennek kiküszöbölésére több lehetőség is van. Néhány napot késleltetni lehet a pigmentáció kialakulását PTU-val (*Phenylthiourea*), de ez nagy mennyiségben toxikus.⁶ Ezért létrehoztak olyan mutáns vonalakat (a *Casper* többszörös mutáns vonal köztakarója, míg a *Crystal* többszörös mutáns vonalnál már a retina sem pigmentált), amiknek egész életében átlátszó a teste, így ezeknél akár a felnőtt vonalak is könnyen vizsgálhatóak mikroszkóppal (2.ábra D).^{7,8}



2. ábra: A modell egyik nagy előnye az átlátszóság A: Zebradánió fejlődése (h: hour, d: day, pf: post fertilisation)⁹ B: Az embriók átlátszósága nagy előny a mikroszkópos vizsgálatoknál. Az ábrán a feji régió fluoreszcens immunfestése látható.¹⁰ C: UAS-Gal4 rendszer használatával létrehozott fluoreszcensen jelölt Zebrabow embrió (kivételesen függőleges állásban). Ezek az embriók olyan transzgen kazettákat tartalmaznak, amelyekben egymás után többféle fluoreszcens fehérje van kódolva. El lehet érni, hogy egyes rekombinációs események csak egyes sejtekben következzenek be, aminek eredményeként véletlenszerűen kivágódnak bizonyos fluoreszcens fehérjéket kódoló szekvenciák, így a sejtek (és utódsejtjeik) különböző színben fognak fluoreszkálni. Ezzel a módszerrel jól vizsgálhatók a sejtleszármazások vagy például idegrendszerben alkalmazva könnyen láthatóvá válik mely idegsejt testekhez tartoznak az egyes nyúlványok.¹¹ D: Vad típusú *Danio rerio* pigmentáltsága és a két mutáns vonal (*Casper*, *Crystal*), melyek felnőtt korban is átlátszóak.⁸

Az állatok az 5. naptól táplálkoznak önállóan, addig az ikra nagy mennyiségű szikanyaga látja el őket. (A jelenlegi törvényi szabályozás szerint, amíg az embriók nem táplálkoznak önállóan, addig enyhébb szabályok vonatkoznak a velük folytatott kísérletekre, kevesebb engedély beszerzésére van szükség, ami ugyancsak előnye ennek a modellnek a komplexebb gerinces modellekkel szemben.) A nagy mennyiségű szikanyag miatt az embriók

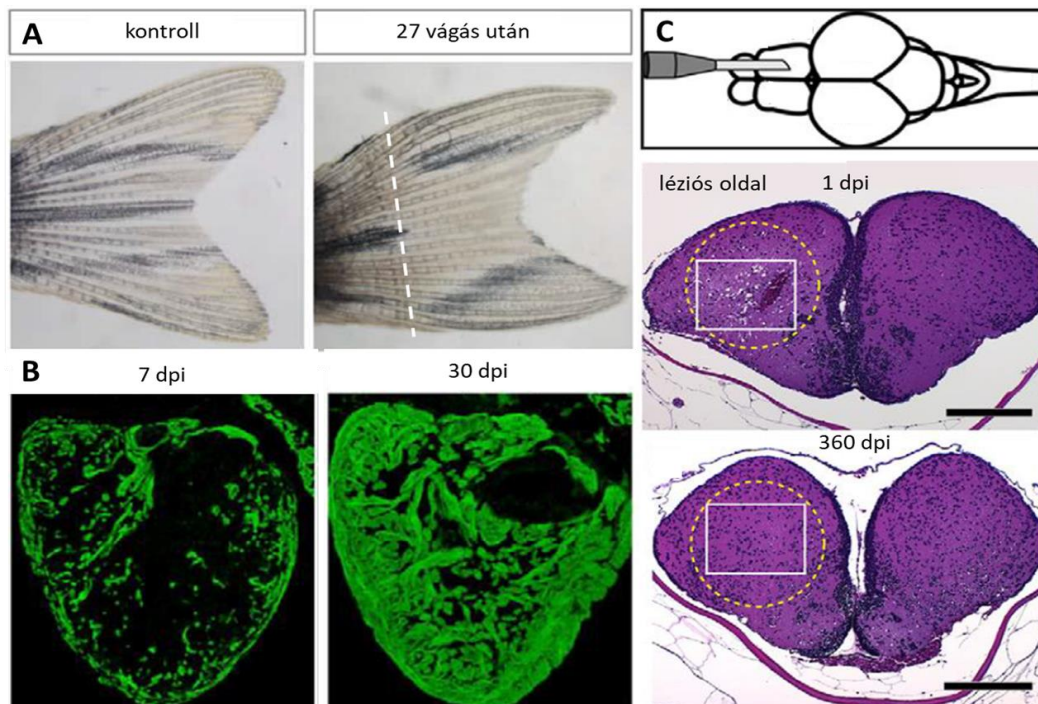
viszonylag nagy méretűek. A méretük és az anya testén kívüli fejlődésük nagyban megkönnyíti az embriók manipulálhatóságát, akár már néhány sejtes állapotban is. Ezért már a kezdetektől kedvelt modellje a fejlődéstani vizsgálatoknak, régen sok sejtttranszplantációs kísérletet is végeztek rajtuk. Ezek a tulajdonságai teszik lehetővé azt is, hogy viszonylag könnyen és hatékonyan lehet alkalmazni esetükben a mikroinjektálást.⁴

Számos jól működő módszert fejlesztettek ki a zebradániók genetikai manipulálására. Az egyik igen elterjedt módszer a Tol2 transzpozon alapú rendszer. A Tol2 a japán rizshalban (medaca, *Oryzias latipes*) őshonos transzpozon család. Az eljárás során együtt injektálják a zebradániókban a Tol2 transzpozáz mRNS-ét és egy plazmidot, amiben a Tol2 specifikus ismétlődő szakaszok közé van beépítve a bevinni kívánt DNS szekvencia. A Tol2 ismétlődések közti régiót a Tol2 transzpozon kihatolja és beépíti a genomba (random helyre). Az eljárás nagy hatékonyságú (50-70%), tranziens és stabil vonalak is létrehozhatóak néhány hónap alatt.¹² Ezzel a módszerrel nagyon sok *enhancer*- és géncsapatát juttattak a zebradánió genomjába. A zebradániókban is jól működő Gal4 rendszer elemeinek használata pedig már nem csak expressziós vizsgálatokat, de sejtekre specifikus manipulációt is lehetővé tett (pl. bizonyos típusú sejtekben citotoxikus molekula kifejeztetése; *in vivo* idegsejtaktiváció vizualizálás kalcium érzékeny genetikai szenzorokkal; sejtleszármazás vizsgálatok Zebrabow rendszer segítségével stb.). (2. ábra C) ^{11,13-15}

Korábban széles körben alkalmazták zebradániókban a morfolinokat. A morfolinok szintetikus antiszensz oligonukleotid analógok, melyek képesek szekvencia specifikusan hozzátapadni pre- és érett mRNS-khez és gátolni más molekulákkal való kapcsolódásukat, így gátolják a *splicingot* vagy a translációt. Ennek eredményeként *knockdown* (csökkent gén kifejeződés) morfánsokat (nincs génmódosítás, így nem nevezhetjük mutánsnak) kapunk. Mivel a fenotípus a genotípus manifestációja, így a morfánsoknál megfigyelhető megváltozott tulajdonságokat fenokópiának nevezzük. A morfolinok hátránya, hogy dózisfüggő a hatásuk és ha anyai hatású termékeket célszünk és nagyon korai embriókat injektálunk, akkor erőteljesebb fenokópiát is okozhat, mintha csak maga az utód lenne mutáns.¹⁶ Érdekes módon az RNS interferencia módszere nem terjedt el zebradániókban. Bár megvannak bennük is az RNS interferenciához szükséges fehérjék, de nem sikerült optimalizálni a módszert.¹⁷ A régebbi fehérje alapú genomszerkesztési technikákat (ZFN, TALEN) alkalmazták zebradániókban, de mivel ezekhez mindig új fehérjét kellett szintetizálni, így költségesek és bonyolultak voltak. Mára használatuk háttérbe szorult CRISPR/CAS9 rendszer megjelenésével. A többi modell

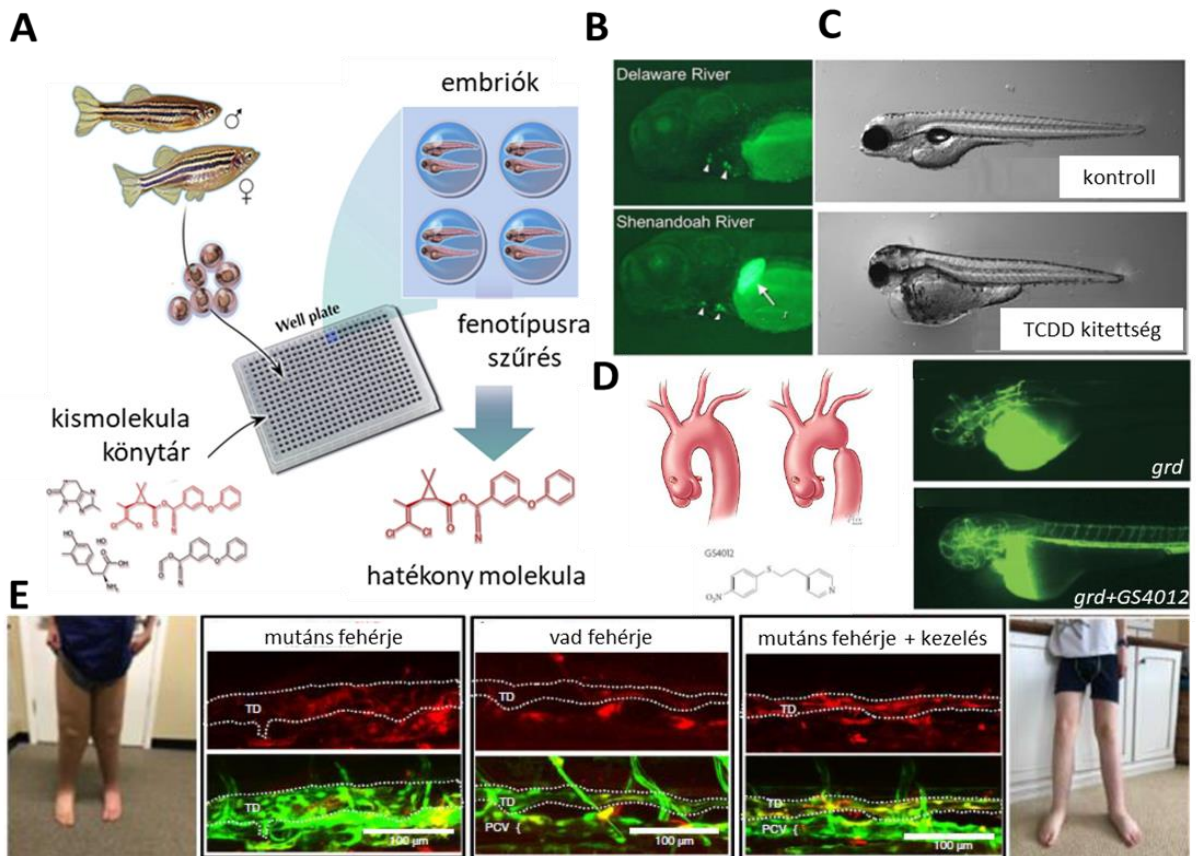
élőlényben tapasztaltakhoz hasonlóan ez a módszer kezd a legelterjedtebb lenni zebraadánióban is, specifikuságának, hatékonyságának és egyszerűségének hála.¹⁸

Zebraadánióknak főleg a többi gerinceshez képest különlegesen jó a regenerációs képességük (3 ábra): jelentős idegszövet (agy, gerincvelő), szívizomszövetet és farokúszó sérülés után is képesek regenerálni ezeket a szöveteket felnőtt korban is. A regeneráció bizonyos esetekben összejt, más esetekben dedifferenciáció alapú, de pontos molekuláris háttere jelenleg is intenzíven kutatott.^{19–22}



3 ábra: A zebraadániók jelentős regenerációs képességgel rendelkeznek. A: A farokúszó 27-szeri levágás után is tud funkcionálisan regenerálódni (dedifferenciálódás alapú).¹⁹ **B:** A kamrai szívizomzat 60%-ának előlése után is képes regenerálódni (dedifferenciálódás alapú).²⁰ **C:** Az agyszövet jelentős lézió után is helyreáll (összejt alapú).²¹ (*dpi: day post injury, dpl: day post lesio*) (Módosított ábrák)

A zebraadánió genomja ismert, érdekessége, hogy az evolúciója során történt egy genom duplikáció, így a mutánsokat használó vizsgálatoknál érdemes figyelembe venni mi történt a duplikálódott génpár két tagjával (pl. pszedudogén lett az egyik, vagy ma már eltérő funkciót töltenek be, esetleg továbbra is párhuzamosan töltenek be szerepet ugyan abban a folyamatban). Az összes humán gén körülbelül 70%-ának van zebraadánió homológja, a betegségekkel kapcsolatba hozott humán géneknél ez a szám 84%.²³



4. A zebradániók fontos humán betegségmodellek és kiválóan alkalmasak hatóanyag vizsgálatokra (példák)

A: Hatóanyag szűrések sematikus rajza. (Módosított ábra)²⁹ **B:** Megfelelő markert tartalmazó zebradániókkal kimutatható, ha a folyókból vett mintákban normális/magas a hormonszint. (Módosított ábra)²⁵ **C:** Toxikológiai *screen*-ekben könnyen azonosítható, ha a környezeti mintában a fejlődést befolyásoló anyagok találhatóak. (Módosított ábra)³⁰ **D:** Emberben előforduló fejlődési rendellenesség az aorta szűkülete, melynek pontos molekuláris háttere nem ismert. Fenotípus alapú megközelítést alkalmaztak: a *gridlock* (*grd*) mutáns zebradánióknak nagyon hasonló fenotípusa volt. Kis molekula könyvtárral szűrést végeztek és megállapították mely útvonal érintett, és milyen kismolekulák (pl.: GS4012) képesek *gridlock* mutánsokban szupresszálni a fenotípust. Ezeket a molekulákat érdemes tovább vizsgálni, mert nagy eséllyel emberben is hatásosak lesznek. (Módosított ábra)²⁶ **E:** A képen látható betegnek keringési problémái voltak és emiatt ödéma alakult ki a lábán. Zebradániókban kifejeztették a vad és mutáns típusú humán fehérjét, létrehozva a betegség modelljét, ami hasonló tüneteket mutatott a keringési rendszerében (középső képek). Majd ezeken az állatokon kis molekula könyvtárral szűrést végeztek. A fenotípust szupresszááló egyik kismolekulát ki tudták próbálni az adott betegen, és ahogy a képen látszik valóban hatásos volt emberben is. (Módosított ábra)²⁷

Manapság a zebradániót elsősorban mint gerinces betegségmodell használják. Mivel kisméretű, viszonylag szapora és az embriók is gyorsan és szabadon növekednek, kiválóan használható különböző szűrésekre (*screen*) (4. ábra A).²⁴ 96 lyukú lemezekben szét lehet osztani az embriókat akár egyesével is és különböző anyagok hatását lehet rajtuk tesztelni. Ismert, hogy normálisan hogyan és milyen ütemben szoktak fejlődni, így, ha a fejlődési

közegükbe különböző környezetből (pl. különböző folyók vize) származó mintákat juttatunk, akkor az embriók esetleges eltérő fejlődése alapján könnyen megállapítható, hogy káros/toxikus anyagokat tartalmaz-e a minta (toxikológiai *screenek*). Ha megfelelő riporter gént kifejező transzgenikus embriókat alkalmaznak akkor akár a magas hormonszintek is vizsgálhatóak (4. ábra B, C).²⁵ Ugyanígy tesztelhetők különböző kis molekula könyvtárak/gyógyszerjelölt molekulák hatása a fejlődésre, a regenerációra vagy betegségek lefolyására.²⁶ Ha nincs még használható betegségmodell egy adott esetben, akkor az emberi mutáns fehérje kifejeztetésével²⁷ vagy a CRISPR/Cas9 rendszerrel létrehozva a pontos mutációt, gyorsan megalkotható. Viselkedésre (pl. alvás-ébrenlét ciklus, szorongás modell) ható molekulákkal is számos tesztet végeznek zebradániókban.²⁸ A gyors és személyre szabott gyógykezeléshez is alkalmas lehet ez a modellrendszer. Még nem alapértelmezett az ilyen irányú felhasználása, de egyre több a pozitív precedens. Például egy keringési problémákkal küzdő beteg esetében, akinél bár ismert volt a betegséget okozó pontos mutáció, de nem volt egyértelmű kezelés, zebradánió betegségmodell segítségével gyorsan találtak megoldást. Zebradániókban kifejeztették a vad és a betegre specifikus mutáns típusú humán fehérjét, létrehozva a betegség modelljét. A mutáns fehérjével rendelkező halak keringési rendszerében hasonló problémák alakultak ki, mint a betegnél. Ezekben az állatokon kis molekula könyvtárral szűrést végeztek és találtak olyan molekulát, ami szupresszálta a fenotípust. Mivel a molekula már más kapcsán forgalomba volt, gyorsan ki tudták próbálni a betegen is, és valóban hatásos volt. A zebrahal modell nélkül a megfelelő gyógyszer megtalálása egy sokkal hosszadalmasabb és a beteg számára megterhelőbb /kockázatosabb folyamat lett volna (4. ábra E).²⁷

A zebradániók a daganatos megbetegedések kutatásában is fontos szerepet töltenek be. Egyes mutánsok hajlamosabbak daganatos betegségek kialakulására, de emberi betegekből származó tumoros sejteket is lehet injektálni a zebradánió embriókba és lárvákba. A korai embriókba ültetett daganatos sejtek egy idő után elcsendesednek, de addig is jól vizsgálható bennük, hogy milyen útvonalakat aktiválnak. Idősebb embriókba ültetve a daganatos sejteket kialakulhatnak bennük a tumorok. A rákos betegségek esetében különösen fontos az időfaktor, a kezeléseket felgyorsíthatja a gyógyszerjelöltek tesztelése zebradánió modelleken. De az automatizált rendszerekben akár a ráktípusok metasztatizáló kapacitása is hatékonyan és gyorsan vizsgálható. A személyre szabott orvoslás felé visznek azok a kísérletek, amikben egy adott betegnél személyre szabottan végzik a szűrővizsgálatot. Egy konkrét beteg daganatos sejtjeit megjelölve és több lárvába átültetve hatékonyan és gyorsan lehet szűrést végezni, mely anyagok hatnak a legjobban pontosan arra az adott daganatra. Természetesen azért ennek a

rendszernek is vannak megkötései, hiszen a zebradánió nem emlős, ideális testhőmérséklet optimuma (28,5°C) nagyban különbözik az emberi testhőmérséklettől és bizonyos szervek hiánya miatt nem minden ráktípus vizsgálható bennük egyértelműen. Így bár egy az egyben nem vihetők át a kapott eredmények feltétlen az emberre, de mindenképpen egy nagyon hatékony és akár személyre szabott előszűrést tesz lehetővé.^{28,31–34}

A zebradániókat közel olyan egyszerű fenttartani és vizsgálni, mint az egyszerűbb modellszervezeteket, de azokkal ellentétben már egy gerinces modell, ami anatómiailag és élettanilag is sokkal közelebb áll az emberhez. Az egyik legjobb fejlődésgenetikai modell, de az idegrendszer vagy a regeneráció vizsgálatában is nagy a jelentősége. A gerinces modellek közül egyedül a zebradániók alkalmasak a humán betegségekkel összefüggő nagy áteresztőképességű *screen*-ekre, de számos jól működő betegségmodellt is létrehoztak.

Köszönetnyilvánítás

A zebradánióval, mint genetikai modellélőlényrel foglalkozó fejezet Dr. Varga Máté és a csoportjában dolgozó Dr. Annus Tamás előadásain alapszik. Köszönjük, hogy évente színvonalas előadással ismertetik meg a hallgatókkal a zebradánió modellt!

Felhasznált irodalom:

1. Whiteley, A. R. *et al.* Population genomics of wild and laboratory zebrafish (*Danio rerio*). *Mol Ecol* **20**, 4259–4276 (2011).
2. Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C. & Smith, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews* **83**, 13–34 (2008).
3. Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D. & Singer, F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* **191**, 293–296 (1981).
4. Avdesh, A. *et al.* Regular care and maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: An introduction. *Journal of Visualized Experiments* (2012) doi:10.3791/4196.
5. Braunbeck, T. *Detailed Review Paper "fish Embryo Toxicity Assays"*. <https://www.researchgate.net/publication/304791642> (2006).
6. Li, Z. *et al.* Phenylthiourea Specifically Reduces Zebrafish Eye Size. *PLoS One* **7**, 40132 (2012).
7. White, R. M. *et al.* Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell Stem Cell* **2**, 183 (2008).
8. Antinucci, P. & Hindges, R. A crystal-clear zebrafish for in vivo imaging. *Sci Rep* **6**, (2016).
9. Glass, A. S. & Dahm, R. The Zebrafish as a Model Organism for Eye Development. *Ophthalmic Res* **36**, 4–24 (2004).
10. Kate Turner & Dr Steve Wilson. Zebrafish sensory neuromasts. *Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)*. Source: Wellcome Collection. <https://wellcomecollection.org/works/dr2hyej7>.
11. Albert Pan, Y. *et al.* Zebrow: multispectral cell labeling for cell tracing and lineage analysis in zebrafish. *Development* **140**, 2835–2846 (2013).
12. Kawakami, K. Tol2: A versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biol* **8**, 1–10 (2007).
13. Kawakami, K. *et al.* ZTrap: Zebrafish gene trap and enhancer trap database. *BMC Dev Biol* **10**, (2010).
14. Kawakami, K. *et al.* Gal4 Driver Transgenic Zebrafish: Powerful Tools to Study Developmental Biology, Organogenesis, and Neuroscience. *Adv Genet* **95**, 65–87 (2016).
15. Muto, A., Ohkura, M., Abe, G., Nakai, J. & Kawakami, K. Real-time visualization of neuronal activity during perception. *Current Biology* **23**, 307–311 (2013).

16. Stainier, D. Y. R. *et al.* Guidelines for morpholino use in zebrafish. *PLoS Genet* **13**, e1007000 (2017).
17. Kelly, A. & Hurlstone, A. F. The use of RNAi technologies for gene knockdown in zebrafish. *Brief Funct Genomics* **10**, 189–196 (2011).
18. Li, M., Zhao, L., Page-McCaw, P. S. & Chen, W. Zebrafish genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Trends Genet* **32**, 815 (2016).
19. Azevedo, A. S., Grotek, B., Jacinto, A., Weidinger, G. & Saude, L. The regenerative capacity of the zebrafish caudal fin is not affected by repeated amputations. *PLoS One* **6**, (2011).
20. Wang, J. *et al.* The regenerative capacity of zebrafish reverses cardiac failure caused by genetic cardiomyocyte depletion. *Development* **138**, 3421–3430 (2011).
21. Kroehne, V., Freudenreich, D., Hans, S., Kaslin, J. & Brand, M. Regeneration of the adult zebrafish brain from neurogenic radial glia-type progenitors. *Development* **138**, 4831–4841 (2011).
22. Mokalled, M. H. *et al.* Injury-induced *ctgfa* directs glial bridging and spinal cord regeneration in zebrafish. *Science (1979)* **354**, 630–634 (2016).
23. Howe, K. *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* **2013** 496:7446 **496**, 498–503 (2013).
24. Lieschke, G. J. & Currie, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* **8**, 353–367 (2007).
25. Gorelick, D. A. & Halpern, M. E. Visualization of estrogen receptor transcriptional activation in zebrafish. *Endocrinology* **152**, 2690–2703 (2011).
26. Peterson, R. T. *et al.* Chemical suppression of a genetic mutation in a zebrafish model of aortic coarctation. *Nat Biotechnol* **22**, 595–599 (2004).
27. Li, D. *et al.* ARAF recurrent mutation causes central conducting lymphatic anomaly treatable with a MEK inhibitor. *Nature Medicine* **2019** 25:7 **25**, 1116–1122 (2019).
28. Kalueff, A. V., Stewart, A. M. & Gerlai, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol Sci* **35**, 63 (2014).
29. Kithcart, A. & MacRae, C. A. Using Zebrafish for High-Throughput Screening of Novel Cardiovascular Drugs. *JACC Basic Transl Sci* **2**, 1–12 (2017).
30. Lanham, K. A., Peterson, R. E. & Heideman, W. Sensitivity to Dioxin Decreases as Zebrafish Mature. *Toxicological Sciences* **127**, 360–370 (2012).
31. Ghotra, V. P. S. *et al.* Automated Whole Animal Bio-Imaging Assay for Human Cancer Dissemination. *PLoS One* **7**, e31281 (2012).
32. Hendrix, M. J. C. *et al.* Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. *Nat Rev Cancer* **7**, 246–255 (2007).
33. White, R., Rose, K. & Zon, L. Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward. *Nature Reviews Cancer* **2013** 13:9 **13**, 624–636 (2013).
34. Al-Hamaly, M. A., Turner, L. T., Rivera-Martinez, A., Rodriguez, A. & Blackburn, J. S. Zebrafish Cancer Avatars: A Translational Platform for Analyzing Tumor Heterogeneity and Predicting Patient Outcomes. *Int J Mol Sci* **24**, (2023).

Háziegér

Bevezetés

A házi egér, *Mus musculus*, egy kis mérettelű, de nagyon népszerű, széles körben használt emlős genetikai modell. A felnőtt egyedek tömege 20 és 40 gramm közzé tehető, a hímek általában nagyobbak a nőstényeknél, helyigényük kicsi. Laboratóriumi körülmények között 2 év a várható élettartamuk, de egyes egyedek ennél lényegesen hosszabb ideig is élhetnek. Vemhességi idejük 21 nap, egy alomba 2-12 kissegér születik. Az anya a szoptatás ideje alatt újra megtermékenyülhet. Az utódok 3 hetesen önállóak, az anyától leválaszthatóak és 8-10 hetes korukra már ivarérettek. Az egerek az emberhez hasonlóan társas élőlények, többféleviselkedési mintázat is tanulmányozható ehhez kapcsolódóan. Viselkedésükben lényeges eltérés az embertől, hogy az egerek éjszakai életmódot folytatnak.

Az egerekkel végzett kísérletek tervezése során fontos szempont, hogy kis méretük miatt az állatoknak körülbelül 2 ml vére van, amelyből vizsgálatokhoz maximum 100–200 µl-t lehet kinyerni úgy, hogy az állat túlélje. Az egyedpusztulása mellett ez a mennyiség 1 ml-re növelhető. Anatómiai szempontból szerveiket azonos szövetek építik fel, mint a mieinket, azok hasonló funkcióval rendelkeznek. Az egerek hallása a magas tartományban jobb az emberénél, de a látásuk rosszabb, különösen az albínó egerek látása gyenge. A szemük anatómiája eltér az emberétől, hiányzik belőle az éleslátásért felelős terület, a makula. További fontos anatómiai különbség, hogy a testméretükhöz képest sokkal nagyobb féregnyúlvánnyal rendelkeznek. A bélbaktériumaik jelentős része ebben a szervben található, ami az emésztés szempontjából fontossá teszi a féregnyúlványt (vakbelet). Az egerek más mikrobiommal és patogénnel rendelkeznek, mint az ember. Például a COVID-19-et okozó SARS-CoV-2 nem fertőzi meg az egereket, mert a vírust felismerő Ace2 receptor jelentősen eltér az egérben. Már léteznek hAce2 TG mutáns egér törzsek, amelyek epitél sejtei megfertőzhetőek SARS-CoV-2-vel.¹

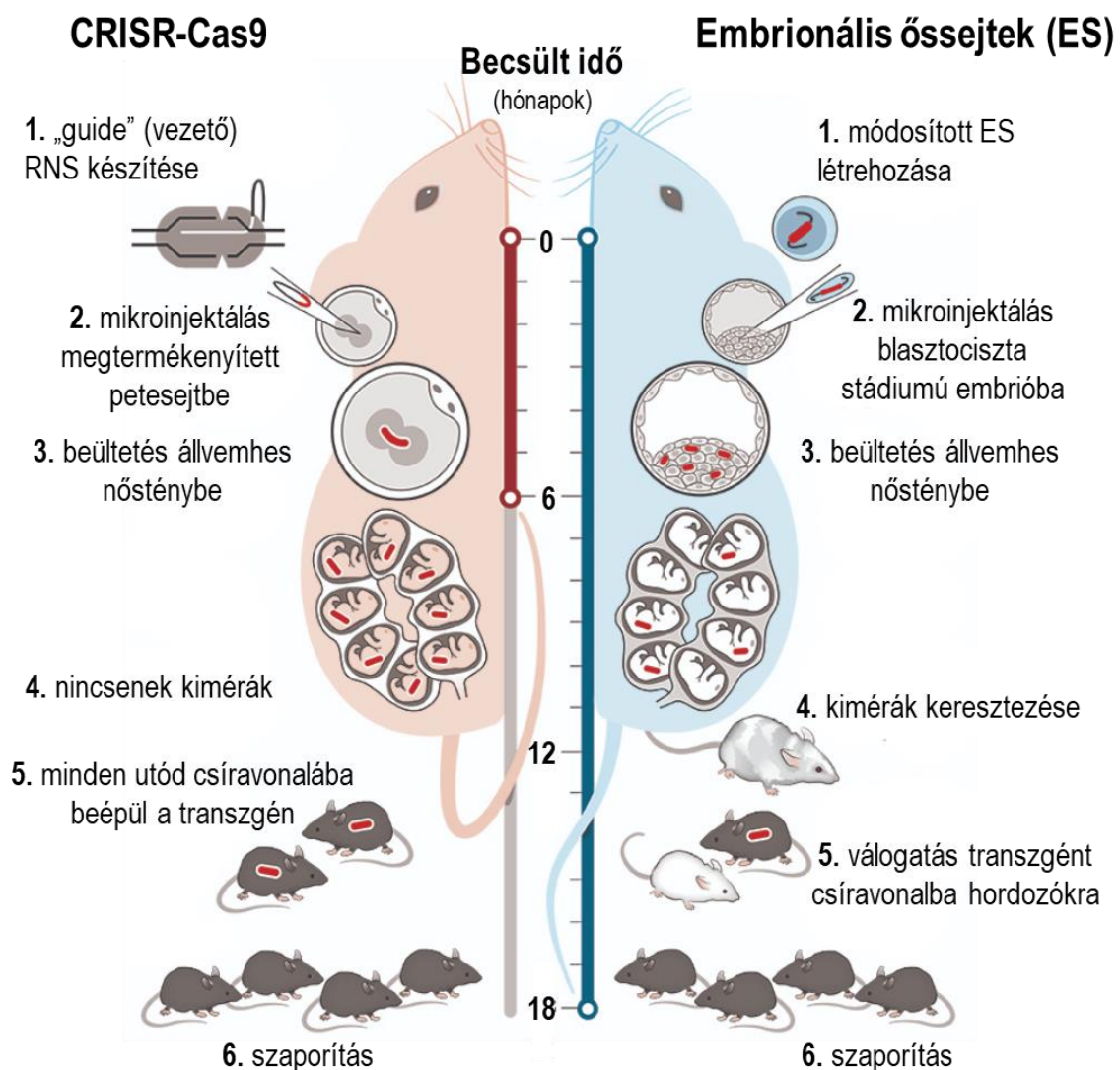
Az egerek testsúlya egy jó marker a betegség monitorozására. Egészséges egerekben ez az érték viszonylag állandó, súlyos betegség esetén azonban látványosan csökkenhet a testsúlyuk (ez észlelhető volt a SARS-CoV-2 fertőzött Ace2 receptor mutánsoknál is. A xenobiotikumok metabolizmusa is lényeges eltérést mutat az emberétől. Az egerek vércukra lényegesen magasabb lehet, így egy emberre gyártott vércukormérővel egy „cukorbeteg” egér vércukorszintje gyakran már nem mérhető. A gyulladási citokinek szintje is többszörösére tud növekedni az emberben mérhető maximumnál.

Az egérmodell genetikai alapjai

Az egérnek az emberhez hasonló genom mérete van, amely 2x20 kromoszómán oszlik el. Beltenyésztésnek köszönhetően az egyes törzsek lényegesen különbözhetnek egymástól. Elképzelhető, hogy egy újonnan jellemzett mutáció fenotípusa, egy másik beltenyésztett törzsből kiindulva lényegesen más lenne. Megkülönböztethetünk spontán és tervezetten létrehozott mutációkat. Az egerekben létre lehet hozni szövetspecifikus vagy térben és időben indukálható mutációkat. A génmódosítások alapját régebben a blasztociszták vagy más néven hólyagcsírák képezték, amelyekből embrionális őssejtek (ES) nyerhetőek ki. Az ES-eket *in vitro* körülmények között lehet genetikailag módosítani. A célzott mutációt például homológ rekombinációval lehet létrehozni, a tervezett mutáns szekvencia helyére egy rezisztencia gén (gyakran neomicyn rezisztencia) fog beépülni. A rekombinációhoz használt szekvencia a rezisztencia mellett egy érzékenyítő gént is tartalmaz, amely a tervezett homológ rekombináció esetén már nem épül be a mutáció helyére (1. ábra).² Homológrekombinációt követően a sejtek két fajta szelekciónak lesznek kitéve: a tervezett helyen létrejött mutációt hordozó sejtek ellenállóak lesznek a szelekciós környezetre (pl.: neomycinre) és nem lesznek érzékenyek arra a tényezőre amire csak az érzékenyítő génnel tudnának reagálni (pl.: herpesz fertőzés). A rezisztencia faktorokkal szelektált mutáns embrionális őssejteket, blasztocisztákba kell vissza injektálni és visszahelyezni állvemhes nőstényekbe. Az F1 utódok mozaikos – kiméra egyedek lesznek, melyek sejtjeinek csak egy része fog az injektált mutáns őssejtekből származni. Az F2 nemzedékben fog kiderülni, hogy mely egyedek csíravonala fejlődött a mutáns sejtéből. A kiméra és az F2 generációban is fenotípusosan látható markerekre, például szőrzetre lehet szelektálni. A mutáns F2 generáció heterozigóta egyedekből fog állni, mivel a kimérákat (más testszínű) vad típusú egerekkel kell keresztezni. Tehát további egy generációra van szükség a homozigóta mutánsok létrehozásához. Az előbb leírt hagyományos módon történő transzgenikus állatok előállításához körülbelül 1,5 - 2 évre van szükség. A CRISPR/Cas9 technikának köszönhetően ez a folyamat lényegesen lerövidíthető. Ebben az esetben lehetőség van a megtermékenyített petesejtet módosítani, így a kiméra generáció kimarad. Minden utód a csíravonalában is hordozni fogja a mutációt, így ennek szelekciós lépése sem jelentkezik többlet időben.² (1.ábra). Ez a módszer a gyorsasága miatt már jóval elterjedtebb, mint a hagyományos ES-ből kiinduló módszer.

Az egerekkel való munka és a szaporításuk is engedélyköteles. Egyes mutáns vonalakat lehet homozigóta formában tenyészteni, ha a túlélésre és szaporodásra nincs jelentős hatással a mutáció. Letalítás vagy alacsonyabb fertilitás esetén heterozigóta formában is fenntartható

egy mutáns vonal. A mutációk korai fejlődési rendellenességeket és letalitást is okozhatnak. A Cre-lox technológia lehetőséget kínál szövetspecifikus mutációkat létrehozni. Erre akkor lehet szükség, ha egy gén funkcióját csak adott szervekben tervezzük tanulmányozni, de tudjuk, hogy a gén hiánya olyan súlyos zavarokat okoz más szerveiben vagy egyedfejlődésében az állatnak, hogy az megghiúsítaná a kísérletünket. A Cre-lox rendszer alkalmazásakor a Cre rekombináza fogja felismerni a loxP helyeket a genomban és homológ rekombinációval deléción (génkivágódás) jön létre a 2 loxP közötti szakaszon. A *cre* rekombináza expresszióját szövetspecifikus promóter irányítja (pl.: albumin specifikus promóter – májspecifikus expresszió), így csak az általunk vizsgált célszervben aktiválódik rekombináció a közeli loxP szekvenciák között.³



1. ábra: Transzgenikus egér törzsek létrehozásának módszerei. Hagyományosan a transzgenikus egereket embrionális őssejtek (ES) módosításával hozták létre. Ezt a módszert mára leváltotta a CRISPR/Cas9 technika, amellyel több generáció szelekcióját lehet megspórolni. Az ábra a 2 módszert hasonlítja össze a transzgenikus

egér vonal létrehozásához szükséges idő szempontjából. Az ábra Science összefoglalója alapjának módosításával készült: <https://n9.cl/tc32v>

Betegségmodellezés egérben (kísérletes módszertan ismertetése példákon keresztül)

Egy modell létrehozásának feltétele, hogy a vizsgált gén emberben és a modellszervezetbenegérben is megtalálható legyen, és azonos funkciót töltsönnek be. Egérben és a gén hibájánakhiányának hasonló tünetek megjelenését kell eredményeznie. Az egérben fenti feltételek sok esetben teljesülnek és a kísérleti eredményekből számos esetben lehet emberre vetítve releváns következtetéseket levonni. Azonban, mint minden modell az egér sem meggyőző önmagában, mindig várhatóak eltérések az egér és az ember között. Ezért a kapott eredményeket helyén kell kezelni. Van, hogy egy betegség hátterében nem csak egy mutáció áll, hanem annak valamilyen életmódbeli tényezővel vagy tényezőkkel is párosulnia kell. Ezek az életmódbeli sajátosságok néha az egérben nehezen idézhetőek elő. Továbbá vannak olyan betegségek, amelyeket nem lehet modellezni egérben. Ilyenek például a makula degeneráció (AMD) vagy a II-es típusú cukorbetegség. Az egereknek nincs makulája, így esetükben a degeneráció sem tanulmányozható. A II-típusú diabétesznél a sejtek inzulin érzékenysége csökken le, ami korrall összefüggő tünet. Az egerek viszonylag rövid laboratóriumi élettartama nem teszi lehetővé az inzulin rezisztencia kialakulását. I-es típusú cukorbetegségekre viszont léteznek egérmodellek.⁴

Egerekben ritka genetikai betegségeket is tanulmányozni. Professzor Váradi András csoportjában kettő ilyen betegséget is vizsgálnak, amelyeken keresztül megismerhetjük hogyan alkalmazható az egér betegségek modellezésére. A *Pseudoxanthoma Elasticum* (PXE) egy recesszíven öröklődő ritka anyagcsere betegség (1:25000-hez az előfordulása), amely főleg fiatal felnőttekben okoz tüneteket. A fragmentáció következtében erek türemkednek be a szembe, bevérzéseket és a retina összetöredezetttségét váltva ki, a betegek elveszítik éleslátásukat. Újabb tünet a sétáláskor jelentkező lábfájdalom, ami az artériák falának meszesedésének következménye (rugalmatlan és rossz keringésű erek a lábokban).⁵ A *Generalized Arterial Calcification of Infancy* (GACI) a PXE-hez hasonló, de jóval korábban, már magzati korban tünetekkel járó betegség. A betegségben szenvedőknél az erek falának középső, tunica media rétege meszesedik el, melynek következtében extrém magas vérnyomás alakul ki.⁶

A betegek jelentős része (30%-a) a születéstől számított pár hónapon belül meghal. A PXE-nek (*Abcc6*^{-/-} KO) és a GACI-nak (*Enpp1*^{-/-} KO) is van egér betegségmodellje.^{7,8} Az *Abcc6* KO egerekben is megfigyelhető meszesedés, de ez elsőként a bajusz szőrtüszők kötőszövetes tokjában jelentkezik, később a meszesedés a szemben és az érfalakban is kialakul. Az *Enpp1* KO egerek másik neve a „*tiptoe walking*” (*ttw*), amelyet a mutánsok jellegzetes lábujjhegyen járó fenotípusára utal. A mutánsokban a meszesedés legelőször az ízületekben jelenik meg. A bajusz szőrtüszők tokjában, a szemekben és az artériák falának elasztikus rostjaiban szintén bekövetkezik az elváltozás.⁸ A PXE és GACI hasonló tüneteinek magyarázata az, hogy a betegséget okozó gének egyazon útvonalban játszanak szerepet. Az ABCC6 transzporter fehérje a májsejtekben fejeződik ki és feltehetően a májsejtekből a keringésbe való ATP felszabadulásért felelős. Hiányában a keringésben lecsökken az ATP szintje. Az ENPP1 az ATP hasításáért (AMP-re és pirofoszfátra - PP_i). A PP_i gátolja a meszesedést (hidoxiapatit lerakódás gátló). Az *Abcc6*^{-/-} mutáns egerek homozigótán is életképesek, tudnak egymással szaporodni és élettartamuk a vad típuséhoz hasonló.⁹

Egerekben az emberhez hasonlóan később (egerekben hónapok) jelennek meg a tünetek, de a tünetek indukálhatóak is, ekkor a fenotípusok már pár nap elteltével jelentkeznek. Emberben gyakran az *abcc6* hipomorf csökkent funkciót eredményező allélja okozza a betegséget, ehhez képest egerekben a *Abcc6*^{-/-} mutánsban egyáltalán nincs jelen az ABCC6 transzporter. PXE-betegséghez hasonló rendszert lehet létrehozni, ha *abcc6*KO egerekbe pLIVE vektorral (albumin promótert tartalmaz) májspecifikusan kifejeztetjük az emberi *abcc6* hipomorf allélt. HTVI (*Hydrodynamic Tail Vein Injection*) módszerrel az egér oldalsó fark vénájába juttatják be a kutatók nagy térfogatú oldatban a DNS-t, a hirtelen megnövekedett nyomást a keringésben a máj próbálja kompenzálni. A májban a nyomásnövekedéssel meggyengül a hepatocita sejtek plazmamebránjának integritása, átmenti pórusok keletkeznek rajta, amin a DNS be tud jutni a sejtekbe. A módszerrel a májsejteknek 10-15%-át lehet transzgenikussá tenni (fluoreszcens transzgen expresszióval lehet a kontroll sejtektől elkülöníteni őket). Gyors meszesedés kiváltásra egy szívfagyasztáson alapuló (*Cryoinjury*) módszert lehet alkalmazni (lehűtött acél pálcával megérintik a szívizmot), amellyel egy kiterjedt infarktushoz hasonló sérülést lehet létrehozni. A máj ABCC6 hiányos egerek fagyási sérülése (nekrotikus terület) 3 nap alatt elmeszesedik. A kiboncolt szívből készített mintán klorometriával lehet a meszesedés mértékét meghatározni.¹⁰

A *ttw* egerek egy spontán kialakult mutáció eredményei, melyről kiderítették a kutatók, hogy az *Enpp1* génben eredményez korai stop mutációt. Homozigóta formában a törzs nem

szaporítható. A vizsgált homozigóták minden esetben heterozigóta szülőktől származnak, az F1 generáció 1/4 része lesz homozigóta mutáns. Az átíródó csonka fehérje nem képes az ATP hasítására.¹¹ A mutánsokra jellemző ujjhegyen mozgást a végtagok ízületeinek összemeresedése eredményezi. A lágyszövetek meszesedése mellett, rövidebb élettartam és testsúlyvesztés is megfigyelhető. Fiatal állatoknál (ahol gyulladt az ízület, de még nem történt meg a csontosodás) kifüggesztett kötélén való mászást (csüngést) lehet használni a végtagok funkciójának tesztelésére.

A fent ismertetett tüneteket vizsgálva a PXE és GACI betegségmodelleken segíthet megérteni, hogy mely faktorok azok, amelyekkel a beteg tünetei enyhíthetőek. Farmakológiai kezelésekre ivóvízzel, táppal vagy injekcióval adott hatóanyagokkal is van lehetőség. A súlyosabb tüneteket produkáló GACI modelleknél a mutáns fenotípusok már 21 napos kórtól jelentkeznek. Ekkor megkezdhető a kezelés és egy hónapos állatoknál már eldönthető, hogy hatásos volt-e. Pirofoszfát etetéssel kezelés például akkor a leghatásosabb, ha az egerek már születésük előtt is kezelve vannak (a vemhes anya is kezelt). Ekkor a kontrollhoz képest jelentősen lecsökken a szórtüszők és erek meszesedése. Felnőtt egerekben, ahol a mészlerakódás már jelentős, a pirofoszfát kezelésnek nincs szignifikáns hatása. Tehát a megemelkedett pirofoszfát a mészlerakódást tudja megelőzni, az elmeszesedett lágyszövetre már nincs pozitív hatása.¹²

Összefoglalás

Összefoglalásul elmondható, hogy az egér anatómiája sok hasonlóságot mutat az emberhez viszonyítva. Ugyanakkor szaporák és kicsi a helyigényük. Viszonylag egyszerű genetikai manipulációkat végezni rajtuk. A testméretük elegendően nagy ahhoz, hogy műtéteket végezhesse nek rajtuk a kutatók. Azonban a hasonlóságok az emberhez viszonyítva korlátozottak, a kapott eredmények egy az egyben nem értelmezhetőek emberre és bizonyos betegségekre nem létezik megfelelő egérmódel. Az egerekkel végzett kísérletek engedélykötelesek, a velük való munkához szakképesítésre van szükség (évente újítandó vizsga). Minden új tervezett kísérlet szintén engedélyköteles, amelyet egy szakmai bizottság véleményez és kérhet módosításokat. Az egér ezek ellenére az egyik legismertebb és legáltalánosabban alkalmazott emlős genetikai modell, amellyel folytatott kísérletek számos betegség megértését és gyógyszer kifejlesztését tették lehetővé a múltban és napjainkban egyaránt.

Köszönetnyilvánítás

Az egérrel, mint modellélőlényel foglalkozó fejezet Dr. Kozák Eszter és professzor Váradi András csoportja segítségével készült. Köszönjük, hogy évente színvonalas előadással ismertetik meg a hallgatókkal az egérmodellt!

Felhasznált irodalom:

1. Li, W. *et al.* High Potency of a Bivalent Human V(H) Domain in SARS-CoV-2 Animal Models. *Cell* **183**, 429-441.e16 (2020).
2. Doudna, J. A. & Charpentier, E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**, 1258096 (2014).
3. Kos, C. H. Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models. *Nutr. Rev.* **62**, 243–246 (2004).
4. King, A. J. F. The use of animal models in diabetes research. *Br. J. Pharmacol.* **166**, 877–894 (2012).
5. Germain, D. P. Pseudoxanthoma elasticum. *Orphanet J. Rare Dis.* **12**, 85 (2017).
6. Kawai, K. *et al.* Generalized Arterial Calcification of Infancy (GACI): Optimizing Care with a Multidisciplinary Approach. *J. Multidiscip. Healthc.* **15**, 1261–1276 (2022).
7. Borst, P., Váradi, A. & van de Wetering, K. PXE, a Mysterious Inborn Error Clarified. *Trends Biochem. Sci.* **44**, 125–140 (2019).
8. Shimada, B. K. *et al.* ABCC6, Pyrophosphate and Ectopic Calcification: Therapeutic Solutions. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
9. Khan, T. *et al.* ENPP1 enzyme replacement therapy improves blood pressure and cardiovascular function in a mouse model of generalized arterial calcification of infancy. *Dis. Model. Mech.* **11**, (2018).
10. Le Saux, O. *et al.* Expression and in vivo rescue of human ABCC6 disease-causing mutants in mouse liver. *PLoS One* **6**, e24738 (2011).
11. Roberts, F., Zhu, D., Farquharson, C. & Macrae, V. E. ENPP1 in the Regulation of Mineralization and Beyond. *Trends Biochem. Sci.* **44**, 616–628 (2019).
12. Pomozi, V. *et al.* Dietary Pyrophosphate Modulates Calcification in a Mouse Model of Pseudoxanthoma Elasticum: Implication for Treatment of Patients. *J. Invest. Dermatol.* **139**, 1082–1088 (2019).

Humán sejtes rendszerek (2D sejtenyészetek)

Már az 1800-as évek végén megfigyelték, hogy bizonyos sejtek életben maradnak egy ideig az élőlény halála után megfelelő tápközegben. Csirke embrionális, és béka idegsejteket tartottak fent, kezdetben sóoldatban, majd nyirokfolyadékban. Később elkezdtek különböző médiumokkal próbálkozni, melyeket egyre jobban specializáltak. A szigorú aszeptikus körülmények bevezetése lehetővé tette a sejtek hosszú távú tenyésztetőségét. Az évek alatt a médiumok összetétele, a használt eszközök és módszerek is sokat fejlődtek. Az 1950-as évek elején izolálták a máig legszélesebb körben használt és legismertebb humán sejtvonalat humán méhnyak karcinómából, a HELA sejteket. Mára a sejtenyészet az egyik legfontosabb modellé vált.¹

Sejtenyészetek létrehozhatóak sejtek izolálásával egy élőlényből, majd azok *in vitro* fenntartásával mesterséges környezetben, mely a sejtek természetes környezetét szimulálja. Többféle fajból származó izolátumot is használnak a kutatásban és a biotechnológiában, de talán a humán sejtenyészetek a legnagyobb jelentőségűek. Használatuk elterjedt az alapkutatásban (pl.: rák, őssejtek stb.), vakcinák és rekombináns fehérjék termeltetése során, gyógyszerfejlesztésben, génterápiás módszerek fejlesztésében, monoklonális antitestek és hormonok előállításában, *in vitro* fertilizációs technikák és *cryo* tárolási technikák fejlesztésében.^{2,3} Bár a különböző fajokból származó sejtek fenntartásában, előnyeiben és hátrányaiban sok a közös vonás, sok fajspecifikus eltérés is előfordul. Ebben a fejezetben a humán sejtenyészetekkel és az alapkutatási aspektusokkal fogunk foglalkozni.

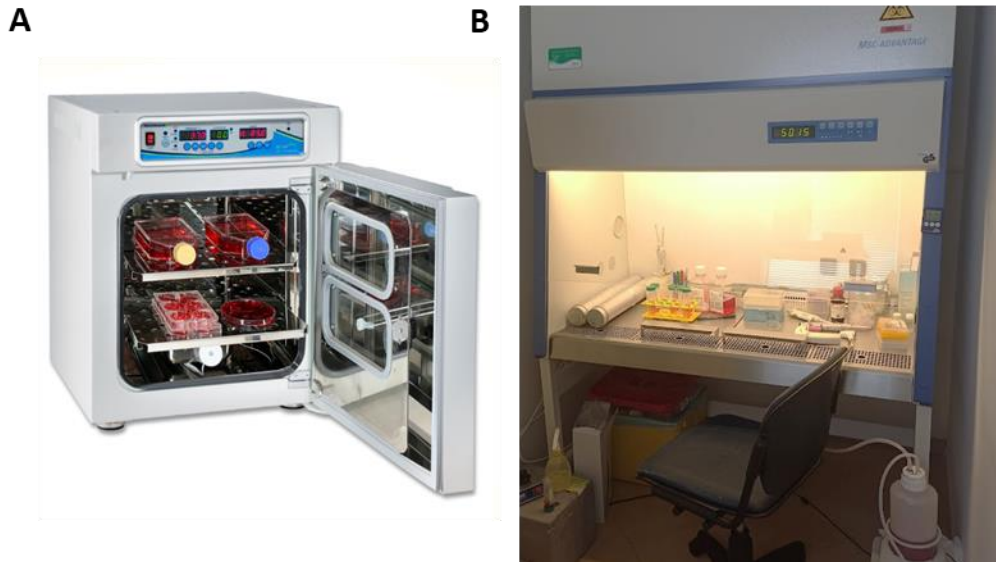
A modellélőlényekkel szemben a sejtenyészetek előnye, hogy sokkal egyszerűbbek, nem kell olyan sok változóval számolni, mintha egy teljes élőlényt vizsgálnánk. A sejtek növekedése általában gyors, így gyorsabb velük a munka is, összehasonlítva a komplexebb állati modellszervezetekkel. Nagy a vizsgálatok áteresztőképessége, sok mintával és párhuzamossal lehet dolgozni minden kísérletben, így statisztikailag is jól értékelhetőek az eredmények. Széles módszertani repertoár áll rendelkezésre, világszerte számos laborban dolgoznak sejtes modellel és kiváló adatbázisok biztosítják a kutatómunka támogatását. A sejtek tartási és kísérleti körülményei jól standardizálhatók. A nem használt sejtvonalak folyékony nitrogénben lefagyaszthatók, nem igényelnek állandó fenntartást. Jobban megértett és megbecsült ez a terület a közvélemény szemében, mint például az egyszerűbb modellszervezetek vizsgálata, mely kis mértékben a pályázati lehetőségekben is megmutatkozik. Alapvetően nem merülnek fel etikai problémák a sejtenyészetek vizsgálata

során, hiszen nem okoznak élőlénynek szenvedést ezek a kísérletek. (Etikai problémák főleg akkor merülhetnek fel, amikor a mintaadó nem adta engedélyét a vizsgálatokhoz. Például a HELA sejtvonal egy Henrietta Lacks nevű beteg méhnyakrák sejtjeiből származik, akitől nem kértek engedélyt sejtjei (saját orvos diagnosztikáján túli) használatához. Évtizedekkel később nagy port kavart, mikor családja rájött, hogy engedélyük és tudtuk nélkül sejtjeit fenntartják és a legszélesebb körben hasznosítják a kísérletes munkában.)

Vannak hátrányai is a sejtenyészetekkel végzett vizsgálatoknak. Bár próbálják biztosítani az *in vivo* körülményekhez hasonló környezetet a sejteknek, azonban az *in vitro* környezetet ettől erősen eltérhet. A sejtenyészetekben nincs idegrendszeri szabályozás, nincs immunrendszer, kevés a sejt-sejt kapcsolat, legtöbbször egyféle sejttypusból állnak ezek a tenyészetek. A körülmények reprodukálhatóságát nehezíti, hogy nem is feltétlen ismert minden *in vivo* komponens. Az elsődleges sejtvonalakat csak korlátozottan fenntarthatóak, szemben a tumoros (és a mesterségesen immortalizált) sejtvonalakkal. Viszont utóbbiak genetikai állománya már eltér az eredeti (vagy bármelyik) egészséges sejt genetikai állományától és másképp működhet az anyagcseréjük. Előfordulhat, hogy különböző sejtvonalak eltérő eredményeket adnak ugyanabban a kísérletben. Így, bár humán sejteket használunk, körültekintően kell kiválasztani a megfelelő vonalat a vizsgálatához, és az eredményeket is a fentiek fényében kell értékelni. Másik jelentős hátrány, hogy egy sejtes labor elindítása különösen nagy anyagi befektetés igényel, de később is szükséges lehet speciális, drága anyagok beszerzésére.^{2,4-9}

A sejtes labor szükséges felszerelése közé tartozik egy sejtenyésztésre alkalmas inkubátor, steril fülke, folyékony nitrogéntároló, inverz mikroszkóp, centrifuga, különböző méretű lemezek és flakonok a sejtek növesztéséhez és vizsgálatához, pipetták és pipettor, megfelelő pipettahegyek, sejtvonalaknak megfelelő médiumok és védőeszközök (1. ábra). Ez a legalapvetőbb felszerelése a legegyszerűbb sejtlabornak. Ezen kívül számos specifikus eszköz, anyag lehet szükséges a sejtvonaltól és a vizsgálatától függően. A sejteknek biztosítani kell a szükséges tápanyagokat, növekedési faktorokat, hormonokat, vitaminokat, megfelelő hőmérsékletet (37°C), pH értéket (általában pH 7,4 körül) és széndioxid koncentrációt (5%). Nagyon fontos a kellően steril munkakörnyezet és munkafolyamat, mert a sejtvonalak könnyen befertőződhetnek különböző vírusokkal, baktériumokkal, gombákkal és egyes sejtvonalak (pl. HELA) is könnyen befertőzhetnek más sejtvonalakat. (Ráadásul bizonyos fertőzéseket, például a *Mycoplasma* fertőzést nehéz észrevenni, csak a szokatlan eredmények vagy a sejtek váratlan halála hívja fel rá a figyelmet). A steril munka nem csak a sejtenyészeteket védi, de a velük

dolgozókat is, hiszen sejtenyészeteket fertőző ágensek az emberre is veszélyesek lehetnek, valamint a kísérletek során sokszor kell emberi szöveteket károsító anyagokkal dolgozni. Különböző biztonsági szintű laborokat különböztethetünk meg aszerint, hogy mekkora a fertőzésveszély.^{2, 4-9}

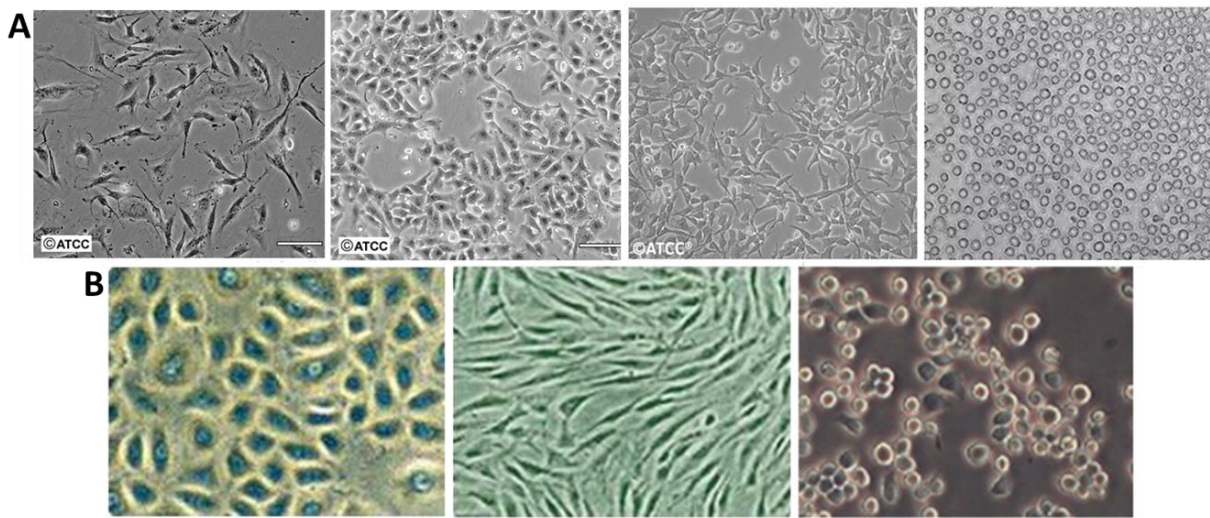


1. ábra: Munka a szövetlaborban **A:** Megfelelő hőmérsékletet, pH-t, CO₂ koncentrációt biztosító inkubátor különböző típusú sejtenyésztő lemezekkel/flakonokkal (ST-45 Plus CO₂ Incubator from Benchmark Scientific).¹⁰ **B:** Steril fülke munka közben különböző pipettákkal, pipettorral, médiumokkal.

A megfelelő sejtvonal kiválasztásával kapcsolatban felmerülő legfontosabb kérdések, hogy milyen eredetűek a sejtek (melyik élőlény melyik szövetéből származnak); primer izolátum vagy immortalizált vonal (utóbbi esetén természetes vagy mesterséges és milyen módszerrel); a kísérlet egész ideje alatt hozzáférhető lesz az eredeti vonal, vagy csak egyszeri alkalommal; jó modellje lehet-e a vizsgálandó folyamatnak; van-e már tapasztalat vele; milyen irodalmi adatok állnak rendelkezésre; tenyésztése egyszerű vagy körülményes illetve ha genetikai módosításra van szükség, egyszerűen transzfektálhatóak-e, és minden eszköz rendelkezésre áll vagy beszerezhető-e ehhez és milyen a fertőzési kockázata (más vonalakat/kutatást végző személyt)?

A sejtvonalakat többféleképpen lehet csoportosítani. Osztódási képesség alapján megkülönböztethetjük a primer (pl. HUVEC-*primary Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) és az immortalizált sejtvonalakat (2. ábra A). A primer sejtek közvetlenül a donorból származnak, korlátozott ideig élet- és osztódóképesek, viszont a legközelebb áll a genetikai állományuk és életműködésük az *in vivo* sejtekéhez. Az immortalizált sejtvonalak lehetnek tumoros eredetűek (pl. HELA-*human cervical cancer*) vagy mesterségesen immortalizált (pl. a

HEK-295- *human embryonic kidney*- immortalizálása adenovírus vektorral történt) (2. ábra A). Ezeknek a sejtvonalaknak nem korlátozott az osztódása, végtelen ideig fenntarthatóak, viszont akár nagyobb eltérések is lehetnek a genetikai állományukban és működésükben az *in vivo* sejtekhez képest. Folyékony nitrogénből való kiolvasztás után csak bizonyos passzálási számig szokták kísérletes munkában használni őket. Csoportosíthatjuk a sejtvonalakat aszerint is, hogy a tenyésztő edény aljára letapadó (adherens) (pl. fibroblastok, HEK293, HELA) vagy nem letapadó (szuszpenziós) (pl. őssejtek, limfoid sejtek) típusúak. Morfológia alapján megkülönböztetjük (2. ábra B) az epitél sejteket, amik nagyjából meghatározott méretűek, sokszög alakúak és különálló foltokban letapadva nőnek, a fibroblaszt típusú sejteket, amik hosszúkásak, bipoláris vagy multipoláris alakúak, letapadva nőnek, a Lymphoblaszt-szerű sejteket, melyek gömb alakúak és általában nem tapadnak le.^{2,8,9,11-13}



2. ábra: Sejtvonalak és csoportosításuk **A:** Példák széles körben használt sejtvonalakra: HUVEC, HELA, HEK-293 (ATCC), hematopoetikus őssejtek (SigmaAldrich). **B:** epitél típusú, fibroblaszt típusú és lymphoblaszt-szerű sejtek morfológia megjelenése (ThermoFisher). (A képek különböző nagyításúak)

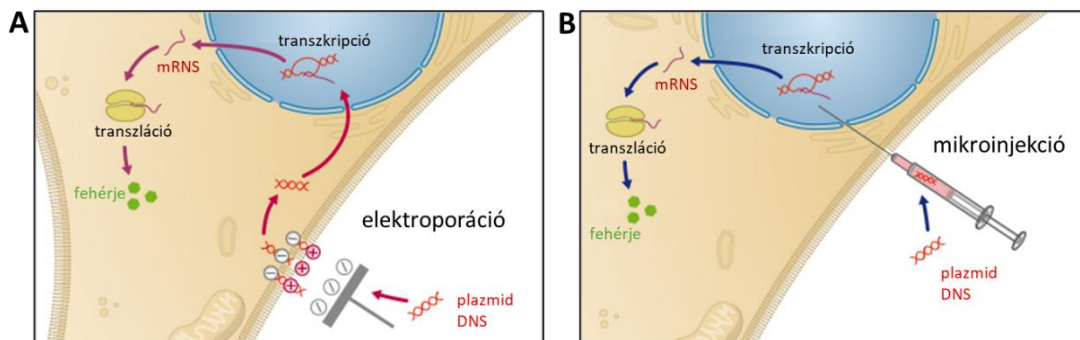
A sejtek genetikailag könnyen módosíthatók, bár ennek hatékonysága és pontos módszere sejttípusonként eltérő lehet. Ha egy adott fehérje működését szeretnék vizsgálni, akkor szükség lehet a fehérje túltermelésére, vagy éppen csendesítésére/kiütésére, esetleg speciális módosítására (pl. csak bizonyos komponens elrontására). Ha a fehérje lokalizációját akarják meghatározni, az egyik legjobb módszer, ha fluoreszcens fehérjével (pl.: GFP, mCherry) fuzionált változatát termeltetik és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálják. A fehérje új kötőpartnereinek azonosításához vagy a fehérje izolálásához a fehérjét egy címkével (pl.: hemagglutinin (HA), FLAG, *myc* címke) fuzionáltatják. Fontos megválasztani a kísérletnek

megfelelő speciális vektort, amibe beleklónozzák a vizsgálni kívánt fehérjét kódoló DNS szakaszt. Egyik szempont, hogy milyen promoterről történjen az expresszió, vannak erős (pl: *Cytomegalovirus* (CMV)) promoterek, amik a túltermeléshez jók és gyenge promoterek (pl: humán ubikvitin (UbC)), de van, amikor a fehérje saját promóterét használják. Nagyon sok vektor már tartalmazza a szükséges fluoreszcens fehérjét vagy címkét kódoló szekvenciát, melyek lehetnek a klónozó helytől C terminális vagy N terminális irányba is. A klónozás folyamata során legtöbbször baktériumokban szaporítjuk fel a plazmidokat, így a plazmidokban általában van valamilyen baktériumok esetében használható antibiotikum rezisztencia gén, de például a stabil sejtvonalak létrehozása ugyancsak antibiotikum szelektálással történik, így szükség van ehhez megfelelő antibiotikum rezisztencia génre is.

Transzfecció (fizikai és kémiai alapú) és transzdukción (vírus alapú) módszerekkel lehet a plazmidokat, vagy más oligonukleotidokat (pl. mRNA, siRNA) bejuttatni a sejtekbe. A különböző eljárásoknak különbözik az eszköz/anyag igénye, bonyolultsága, hatékonysága, biztonságossága, toxicitása vagy sejtsejt sérülés okozási képessége, valamint, hogy milyen típusú sejteknél alkalmazható. További különbség, hogy alkalmas-e stabil sejtvonalak kialakítására, vagy csak átmeneti génbevitelre. Többféle módszerrel is létre lehet hozni transziens és stabil sejtvonalakat is. A transziens (átmeneti) sejtvonalak esetében a bevitt genetikai anyag nem épül be a sejt genomjába így az expresszió gyorsan lecseng. Ez egy gyors eljárás, de csak pár napig vizsgálható és kis mennyiségű fehérje termelésére alkalmas a létrehozott sejtvonal. Stabil sejtvonalak létrehozása jóval hosszabb és munkaigényesebb (nem minden beviteli eljárás/plazmid alkalmas ehhez és hosszú szelekciós időszakot igényel), de a bevitt genetikai anyag beépül a sejt genomjába és hosszú távú vizsgálatokra vagy fehérjetermelésre lesz képes a sejtvonal.¹⁴⁻²²

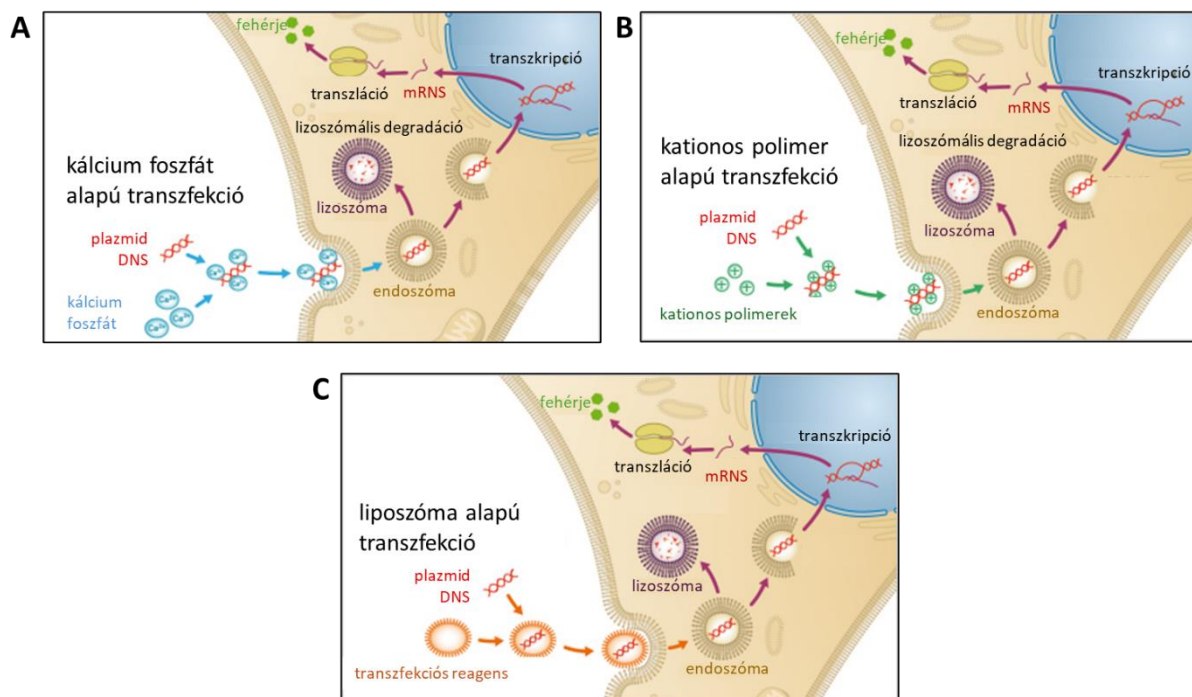
A fizikai alapú transzfecció módszerek közé tartozik a széles körben alkalmazott elektroporáció (3. ábra A), melynek során az elektromos tér hatására a membránban mikropórusok képződnek és ezeken át jut be a plazmid. Sokféle sejt típuson alkalmazható, hatékony módszer, viszont károsítja a sejteket (érzékeny sejteknél nem alkalmazható) és speciális eszközt igényel. A mikroporáció és a nukleofekció speciális elektroporációs eljárások. Előbbinél csak egyetlen sejtet kezelnek, utóbbinál közvetlen a sejtmagba juttatják be a külső genetikai anyagot. Szonotranszfecció során ultrahanggal, a lézer-közvetített transzfecció során impulzuslézer segítségével teszik ideiglenesen átjárhatóvá a sejtmembránt. A mágneses transzfecció mágneses részecskéket használ a DNS sejtekbe viteléhez mágneses tér segítségével, míg bioliztikus transzfecció során DNS-el bevont kis méretű aranyrészecskéket

lőnek be nagy be nagy nyomással a sejtekbe génpisztolyt alkalmazva. Mikroinjekció (3. ábra B), során a nukleotid oldatot egy nagyon finom tű segítségével juttatják a citoplazmába vagy a sejtmagba.¹⁴⁻²²



3. ábra: Fizika transzfekciós módszerekre példák A: elektroporáció B: mikroinjekció^{17,18} (Ábrák módosítva)

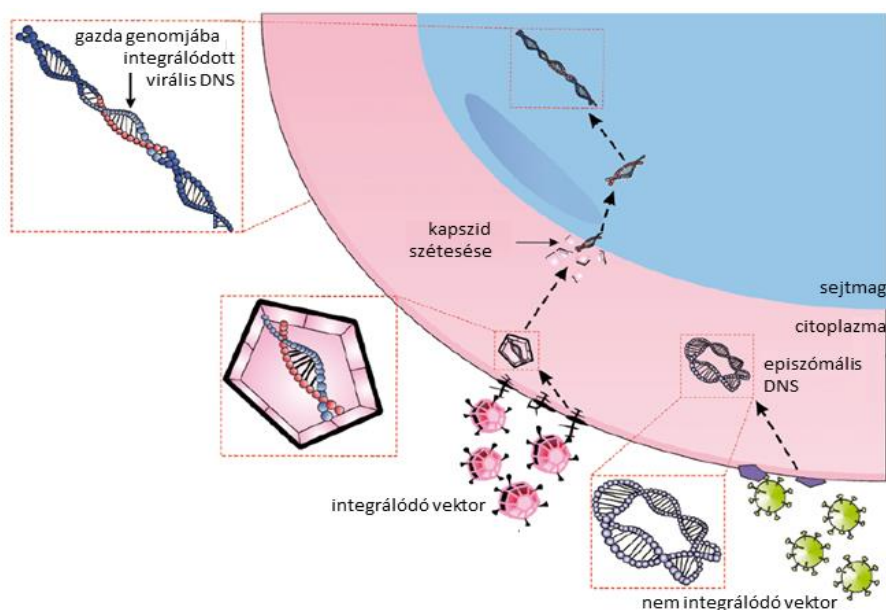
Kémiai alapú transzfekció egyik típusában a negatív töltésű DNS-hez pozitív kalcium-foszfát kapcsolódik és ennek segítségével jut be a sejtbe. Olcsó és egyszerű módszer, azonban bizonyos sejt típusokban toxicitást okoz (4. ábra A). Ugyancsak kémiai alapú transzfekciós módszer, amikor kationos polimerekkel veszik körül a DNS-t (pl.: *polyethylenimine* (PEI) és azok segítségével juttatják be a sejtbe (4. ábra B). Egyre elterjedtebb módszer a liposzóma alapú lipofekció (pl.: Lipofectamine 2000, Turbofect, Fugene), amikor kettős lipid réteggel



4. ábra: Kémiai alapú transzfekciós módszerek A Kalcium-foszfát alapú B: kationos polimer alapú C: liposzóma alapú^{17,18} (Ábrák módosítva)

veszik körül a bejuttatni kívánt genetikai anyagot (4. ábra C). Ez a módszer nagy hatékonyságú, a legtöbb sejttípus esetén használható és alacsony a toxicitása. Az mRNA alapú vakcináknál (pl.: Pfizer) ilyen lipid nanorészecskékbe csomagolt mRNA-t juttattak be. (Karikó Katalin és Drew Weissman az mRNA-alapú orvoslás alapjainak megteremtéséért - ami az koronavírus elleni védőoltások gyors kifejlesztését is lehetővé tette - nyerte el 2023-ban az orvosi és élettani Nobel-díjat.)¹⁴⁻²²

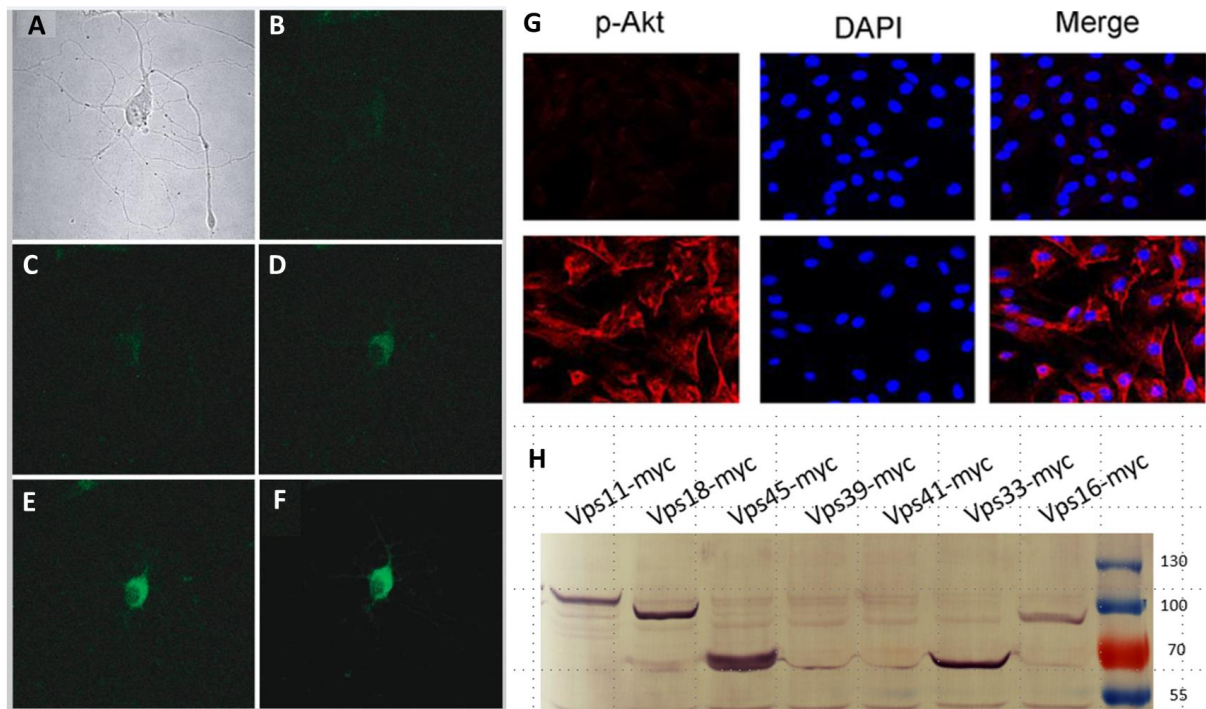
Transzdukciós módszerek során vírusok segítségével juttatják be a DNS-t a sejtekbe (5. ábra). Két nagy csoportot különböztetünk meg. A retrovírus (pl. Lentivírus) és adeno-asszociált vírus (AVV) alapú transzdukció esetén a vírusvektor integrálódik a genomba. A lentivírus dsRNA örökítőanyaga kapszidba csomagolt. A sejtbe juttatás után a vírus RNA-ét a reverz transzkriptáz átírja dsDNA-é, és azt az integráz enzim random helyre integrálja a genomba. Az adeno-asszociált vírusok előnye az előzőekkel szemben, hogy örökítőanyaguk nem random integrálódik. A transzdukció másik fajtája az adenovírus alapúak, amelyeknél a vírusvektor (dsDNA) nem integrálódik a genomba, episzómális marad. Ilyen adenovírus alapú vektorvakcinákat is használtak a COVID-19 vakcináknál (pl. Sputnik)¹⁴⁻²²



5. ábra: Transzdukció két típusa. Az retrovírus alapúaknál a bevitt örökítőanyag integrálódik a genomba, míg az adenovírus alapúaknál episzómális marad.²¹ (Módosított ábra)

Ha a kifejezteni kívánt fehérje fluoreszcens markerrel fuzionáltatott, akkor könnyen tesztelhető a transzfekció/transzdukció hatékonysága fluoreszcens mikroszkóppal (6. ábra A) vagy áramlási citometriával, mely automatizálva szétválasztja a sejteket fluoreszcens fehérje

expressziója alapján. Másik elterjedt módszer az ellenőrzésre a Western blot módszer (6. ábra C), melynek során a sejtizátum komponenseit SDS elektroforézissel szétválasztják, majd nitrocellulózra történő transzfer után (fehérjére vagy a vele fuzionált markerre) specifikus antitesttel vizsgálják egy adott fehérje jelenlétét. A sejtek festése (immunfluoreszcencia) is lehetséges az expresszált fehérje elleni, jelölt antitesttel (6. ábra B). Túltermelés esetén *quantitative* PCR-rel is ellenőrizhető a transzfekció sikeressége.^{14–22}



6. ábra: Példák sejtvonalak ellenőrzési módszereire. A-F: Gria4-GFP mRNS-sel lipotranszfektált neuron. (A) idegsejt (B) fluoreszcencia kép a transzfekció előtt. C, D, E és F fluoreszcencia képek 2, 4, 6 és 8 órával a transzfekció után.²⁰ **G:** Immunfluoreszcencia: a pAKT-1 fehérjére specifikus, piros fluoreszcens fehérjével kapcsolt antitestet alkalmazva jól látszik, hogy a felső sejtvonalba nem, az alsóban kifejeződik a sejtekben az pAKT-1 fehérje. A DAPI egy általános sejtanyag festék. (egyszerűsítve magyarázott kísérleti felállítás)²³ **H:** Western blott: HEK293 sejtekbe különböző Vps fehérjéket kódoló, *myc*-tag-gel ellátott cDNS-eket transzfektáltak TransIT transzfekciós reagens használatával. A Western blot végén *myc* specifikus antitestet használva jól látszanak a különböző Vps fehérje specifikus csíkok. (Simon-Vecsei Zsófia képe)

Humán sejtekben elterjedt géncsendesítési technika az RNS interferencia. A sejtekben normálisan is termelődnek miRNS-k és rendelkezésre áll a RNS interferenciához szükséges összes molekuláris komponens, így a kívánt géncsendesítés beindításához egyszerűen csak a megfelelő szekvenciára specifikus duplaszálú siRNS-t kell bejuttatni a sejtekbe.²⁴

A genomszerkesztési eljárások közül humán sejteknél is használták a cinkujj nukleázokat (ZFN- *zinc finger nuclease*) és TALEN (*transcription activator-like effector*

nuclease) technikát. Mindkét esetben a hasítást a FokI restrikciós endonukleáz végezte (dimerizált állapotba), ami egy cinkujj vagy egy TALEN DNS kötő doménnel volt fuzionáltatva. Mivel a DNS kötés biztosítja a helyspecifikus hasítást, így minden genomi pozícióhoz új fehérjét kellett szintetizálni, ami hosszadalmassá és költségessé tette ezeket a módszereket. Ma már ezen a területen is sokkal elterjedtebb a CRISPR/Cas9 rendszer használata. Ebben az esetben is két fő komponens van, a DNS hasítást végző Cas9 fehérje és a specifikitást adó *guideRNS*. Viszont ebből fakadóan sokkal gyorsabb és olcsóbb a módszer, mivel csak egy új *guideRNS*-t és nem egy fehérjét kell legyártani egy új kísérlethez. A módszer folyamatos fejlesztés alatt áll, egyre hatékonyabb, specifikusabb és egyre szélesebb a felhasználási területe. ^{1,2}

A modellszervezetekkel ellentétben a humán sejt kultúrákkal már közvetlenül a humán genetikai állományt vizsgálhatjuk, annak minden specifikus tulajdonságával együtt, így sok tekintetben a legjobb modellek. A modellszervezetekkel szemben felmerülő etikai problémákra is jó alternatívát jelentenek. Ugyanakkor nem tükrözik a betegségek patológiájának vagy kezelésének komplex, szervezetszintű kölcsönhatásait. De a limitációkat is figyelembe véve mára talán a legfontosabb modellekké váltak a genetikai kutatásokba.

Köszönetnyilvánítás

A humán sejt rendszer (2D sejtenyészetek) -kel foglalkozó fejezet Dr. Simon-Vecsei Zsófia előadásain alapszik. Köszönjük, hogy évente színvonalas előadással ismerteti meg a hallgatókkal a humán sejt rendszerét!

Felhasznált irodalom:

1. Yao & Asayama Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues *Reprod Med Biol.* 16(2): 99–117.(2017) doi: 10.1002/rmb2.12024
2. Segeritz, C. P. & Vallier, L. Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. *Basic Science Methods for Clinical Researchers* 151 (2017) doi:10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6.
3. Jiang, S. & Shen, Q. W. Principles of gene editing techniques and applications in animal husbandry. *3 Biotech* 9, 28 (2019).
4. Cell Culture Contamination. (2024.március) <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/biological-contamination.html>.
5. Cell Culture Laboratory Safety. (2024.március) <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-laboratory-safety.html>.
6. Cell Culture Environment. (2024.március) <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-environment.html>.
7. Cell Culture Equipment. (2024.március) <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-equipment.html>.

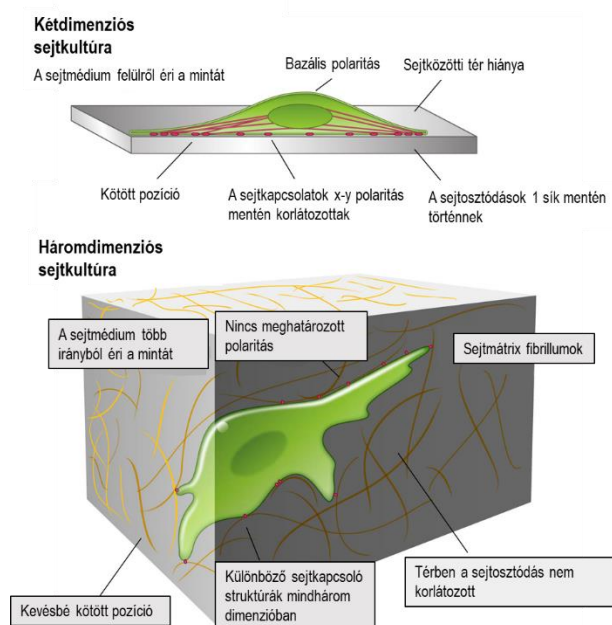
8. Introduction to Cell Culture. (2024.március)
<https://www.thermofisher.com/uk/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html>.
9. Cell culture basics Handbook Cell Culture Basics Cell Culture Basics Cell Culture Basics | © 2020 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. COL011985 0820
10. ST-45 PLUS CO2 Incubator from Benchmark Scientific | Lab.Equipment. (2024.március)
<https://lab.equipment/st-45-plus-co2-incubator-from-benchmark-scientific>.
11. Cell Lines. (2024.március) <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-lines.html>.
12. Adherent Cell Culture vs. Suspension Cell Culture. (2024.március)
<https://www.thermofisher.com/uk/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-lines/adherent-vs-suspension-culture.html>.
13. Richter, M. *et al.* From Donor to the Lab: A Fascinating Journey of Primary Cell Lines. *Front Cell Dev Biol* 9, (2021).
14. Transfection Techniques and Basics | Thermo Fisher Scientific - HU. (2024.március)
<https://www.thermofisher.com/hu/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics.html>
15. Transzfekció – meghatározás, típusok, alapelvek, alkalmazások. (2024.március)
https://microbiologynote.com/hu/transfection-definition-types-principle-applications/#2_Lentiviral_Transduction.
16. Kim, T. K. & Eberwine, J. H. Mammalian cell transfection: The present and the future. *Anal Bioanal Chem* 397, 3173–3178 (2010).
17. Transfection Methods | Chemical, Physical & Viral | ibidi. (2024.március) <https://ibidi.com/content/260-transfection-methods>
18. Transfection | Principle & Application | ibidi. (2024.március) <https://ibidi.com/content/262-the-principle-of-transfection>.
19. Kim, T. K. & Eberwine, J. H. Mammalian cell transfection: The present and the future. *Anal Bioanal Chem* 397, 3173–3178 (2010).
20. Kim, T. K. & Eberwine, J. H. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem* 397, 3173 (2010).
21. Nowakowski, A., Andrzejewska, A., Janowski, M., Walczak, P. & Lukomska, B. Genetic engineering of stem cells for enhanced therapy. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 73, 1–18 (2013).
22. Chong, Z. X., Yeap, S. K. & Ho, W. Y. Transfection types, methods and strategies: A technical review. *PeerJ* 9, (2021).
23. Liu, L. lin *et al.* Ferric Ion Induction of Triggering Receptor Expressed in Myeloid Cells-2 Expression and PI3K/Akt Signaling Pathway in Preosteoclast Cells to Promote Osteoclast Differentiation. *Orthop Surg* 12, 1304–1312 (2020).
24. Chiu, Y. L. & Rana, T. M. RNAi in Human Cells: Basic Structural and Functional Features of Small Interfering RNA. *Mol Cell* 10, 549–561 (2002).

Háromdimenziós sejt kultúrák - Organoidok

Bevezetés

A háromdimenziós sejt kultúrák legfőbb jellemzője, hogy a sejtek nemcsak egy sík mentén érintkezhetnek egymással, hanem egymás fölött, alatt is elhelyezkedhetnek. Az ilyen elrendeződés nem idéz elő olyan mesterséges polaritást, ami a kétdimenziós, homogén, letapadó sejt kultúrákra jellemző. A háromdimenziós kultúrák esetén a sejteket érő kezelés sem egy adott oldalról érkezik (nem polarizált). A sejtek közötti kapcsolatok és a sejt közötti tér is jóval valóságosabban tükrözi egy szerv felépülését, mint a hagyományos, „homogén” sejt kultúrákra. A sejtek térbeli elhelyezkedése és a közöttük kialakuló kapcsolatok, sejt közötti terek együttesen a sejtek heterogenitását eredményezik. Fentiek eredményeként egy, a valódi szervezetre jobban hasonlító modell válik tanulmányozhatóvá.

Az előnyökkel megoldandó problémák is járnak. A sejtek heterogenitása gyakran sejt kultúránként változik, így az elvégzett kísérletek nehezen reprodukálhatóak. Ha egy konkrét sejt típust akarunk tanulmányozni, több zavaró tényezővel kell számolnunk, mint a homogén sejt vonalaknál. A mutáns sejtek válogatása is bonyolultabb, mint a kétdimenziós modellekben. A háromdimenziós kultúrák használata költségesebb. ¹ (1. ábra).



1. Kétdimenziós- és háromdimenziós-sejt kultúrák összehasonlítása. Az ábra felső részén kétdimenziós, letapadó sejtek jellemzői láthatóak. Az alsó képen egy sejt jellemzői láthatóak háromdimenziós környezetben. Az ábra az alábbi közlemény módosításával készült. ¹

A háromdimenziós sejt kultúrák pluripotens őssejtekből hozhatóak létre. Ezen sejt kultúrákat különböző típusokba lehet sorolni, mint például teratoma, embrioid testek és organoidok. A

teratóma esetén az őssejt (újraprogramozott vagy embrionális őssejtek) szuszpenziót leggyakrabban egerek bőre alá (szubkután) ültetik be és 8-10 hetet hagyják növekedni. Ez idő alatt a teratóma mindhárom csíralemezre jellemző sejteket képez. A differenciációs idő után a teratómát eltávolítják, jellemzik a szövetsomó heterogenitását, majd metszeteken és sejt homogenizátumokon folytatják a minták tanulmányozását. A háromdimenziós sejt kultúrák közül a legmodernebbnek az organoidok számítanak, amelyeknél az őssejtek differenciációja gazdaszervezetek nélkül, irányított *in vitro* környezetben zajlik. A módszernek köszönhetően az embrionális fejlődés jobban reprodukálható. A teratómákkal ellentétben az organoidokban nem keverednek a különböző csírvonal eredetű sejtek. Azonban, amint később írjuk az organoidok mérete a vérkeringés hiánya miatt korlátozott. A teratómák ezzel szemben, az egér keringésének köszönhetően rendelkeznek oxigén ellátással, így a növekedésük nem korlátozott.²

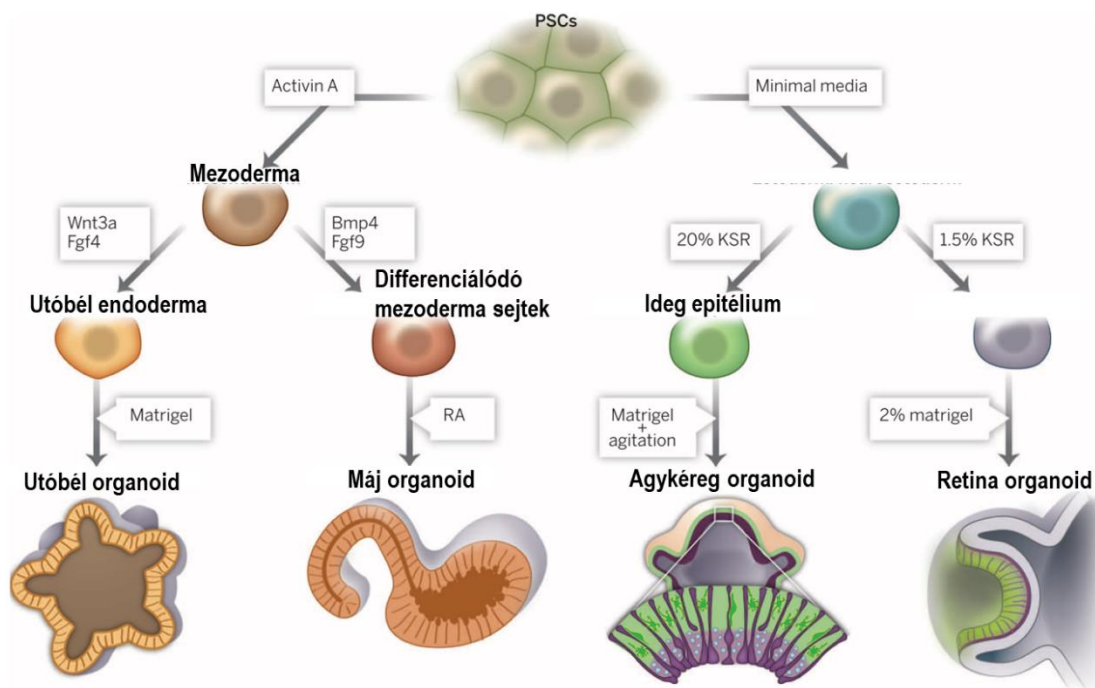
Az organoidok jellemzése

Az organoidok őssejtekből vagy szerv-progenitorokból önszerveződő sejtek, amelyek egy adott szervhez hasonló szerveződési változásokon mennek keresztül. A teratómáktól eltérően bennük nem alakul ki mindhárom csíralemezre jellemző sejt, hanem egy differenciációs lépéssorozatnak köszönhetően egy bizonyos szervre jellemző differenciált háromdimenziós sejthalmaz fejlődik. Az organoidok létrehozásához kiindulásként pluripotens embrionális vagy újraprogramozott őssejtek (iPSC-k) használhatóak, amelyekből mindhárom csírvonal típus kialakulhat. Az iPSC-k szomatikus sejtekből hozhatóak létre mindösszesen négy gén (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* és *c-Myc* -Yamanaka faktorok) ektopikus túltermeltetésével³ A sejtek újraprogramozását és a Yamanaka faktorok leírását 2012-ben orvosi Nobel-díjjal jutalmazták.

A megfelelő organoid létrehozásához alapvető szöveti differenciációs ismeretekre van szükség. Háromdimenzióban a sejtek különböző sejtkapcsoló struktúrákkal kapcsolódnak egymáshoz, amely nagymértékben befolyásolja a további osztódás és dedifferenciálódás irányát. Tehát a sejt differenciációját és környezeti identitását is meghatározza, hogy milyen adhéziós molekulákat fejez ki.⁴ Az organoidoknak az alábbi kritériumoknak kell megfelelniük: 1. Egynél több modellezendő szervre specifikus sejttípussal kell rendelkezniük. 2. Rendelkezniük kell a modellezendő sejtre specifikus tulajdonsággal. 3. A modellnek a szervhez hasonló szöveti rendeződésűnek kell lennie.

Hogyan készítsünk organoidot?

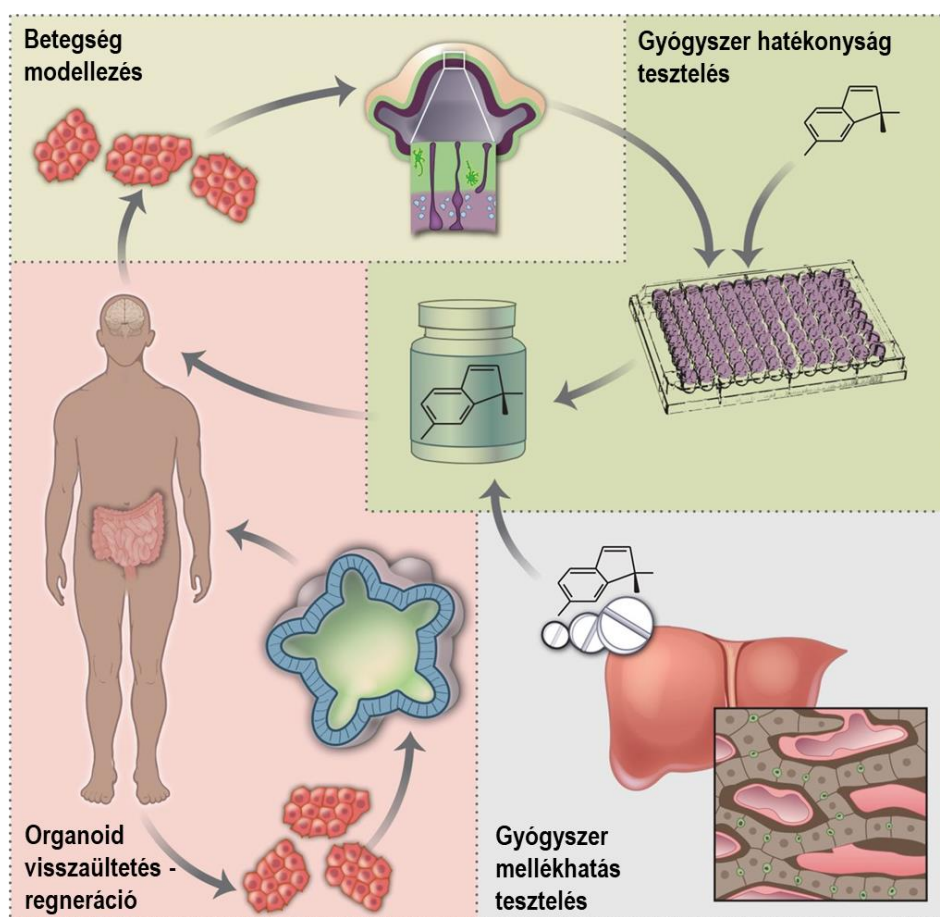
Az őssejtek organoidokká fejlesztése speciális tenyésztési gélekbe ágyazva, bioreaktorokban történik. Ezen környezetben a növekedési faktorok szabályozott cseréjével irányítható az organoidok fejlődése. Például Activin A (TGF- β szupercsalád tagja – multifunkciós citokin) jelenlétében mesoderma, míg hiányában ektoderma fejlődik. A kialakult mesoderma kezdemény Bmp4-gyel (TGF- β szupercsalád tagja – dorzoventrális differenciációt indukál) és Fgf9-el kezelve köztes mezoderma alakítható ki, amely RA (Retioninsav - A-vitamin metabolit) hozzáadásával vese organoiddá differenciálható.⁴ Érdeemes megjegyezni, hogy más eljárásokkal is elérhető hasonló organoidok keletkezése. Jelenleg számos eljárás létezik vese organoid „nevelésére” (más szervek modellezésére is), amelyek nem csak módszertanukban, hanem a létrejött organoid sejtes összetételében is különbözhetnek egymástól (2. ábra).



2. **ábra: Organoidok készítése pluripotens őssejtekből.** Különböző növekedési faktorokat tartalmazó sejtmediumok (négyzettel határolt területekben) hozzáadásával eltérő csíralemezek differenciáltathatóak, amelyekből további specifikus sejtközeg biztosításával más-más organoidok formálhatóak. A nyilak a differenciáció irányát jelölik pluripotens őssejtekből (PSCs) kiindulva. Az ábra az alábbi publikáció ábrájának módosításával készült.⁴

Az organoidok felhasználása

Az organoidok felhasználása nagyon sokrétű lehet. Óriási potenciál van abban a tényben, hogy emberi, differenciált, szomatikus sejtekből újraprogramozással állíthatunk elő őssejteket. Ez esetben egy betegség modellezésénél nem kell számolnunk evolúciós különbségekkel, amelyek emlős modellek esetén is fennállnak. A modell egyaránt alkalmas lesz fejlődésbiológiai és gyógyászati kérdések megválaszolására. Lehetőség nyílik specifikus, személyre szabott kezelések kidolgozására is. Hiszen az organoid kiindulását képző őssejt közvetlenül a beteg (mutáns) sejteket hordozó szervből származhat. Betegből származtatható organoidok létrehozásával olyan gyógyszer *screen* végezhető, amellyel megtalálható a beteg számára leghatékonyabb kezelés vagy elkerülhetőek azon szerek, amelyekre érzékenyen reagálna az alany. Tehát az egyes organoidok „válaszait” vizsgálva a tesztek során kiszűrhetőek a gyógyszerérzékenységet okozó hatóanyagok (3. ábra).



3. ábra: Az organoidok orvosbiológiai felhasználhatósága. Az organoidoknak és a sejtek újra programozásnak köszönhetően lehetőségünk van a betegekből származó sejteket őssejteké visszaalakítani, majd belőlük szervspecifikus organoidot létrehozni. A létrehozott organoid egyaránt felhasználható egyénre szabható terápiák kidolgozásában és károsodott szervek pótlására is. Az ábra az alábbi publikáció ábrájának módosításával készült.⁴

Az organoidok orvosbiológiai relevanciája a regenerációt célzó beavatkozások esetén is elvitathatatlan, hiszen a betegből származó mintákból létrehozott organoidok visszaültetésénél nem kell számolni sem kilökéssel, sem káros mértékű immunválasszal. Más őssejt terápiához képest a tumor képződése is jelentősen kisebb, hiszen ilyenkor már a pótlandó szervezdeménnyé differenciált szövet kerül beültetésre. A megkérdőjelezhetetlen gyógyászati perspektívákon túl az organoidok lehetőséget biztosítanak evolúciós, egyedfejlődési összehasonlításokra is rokon fajok között (3. ábra).^{4,5}

A „miniagy” orvosbiológiai relevanciája

A „miniagy” modellek már gyakorlatban is bizonyítottak, mint betegségmodellek. A kortex organoid fejlettsége megfeleltethető az embrionális agykéreg fejlettségi szintjének. Funkcionális serkentő és gátló neuronokból épül fel, melyek mérhető membránpotenciállal, amplitúdóval, frekvenciával és ellenállással rendelkeznek (ahogyan a valódi idegsejtek). Létrehozásukat követően akár egy évig is fenntarthatóak, bár méretük 5-6 hónap után csökkenni kezd. A miniagyaknak nincs vérellátásuk, így a belső részükben oxigéntől elzárt közeg alakul ki, ahol a sejtek nekrozissal pusztulnak. A nekrotikus sejtekből felszabaduló toxikus anyagok károsítják a környező sejteket, amely tovább növeli a nekrotikus szövetet. Az oxigéntől elzárt résznek köszönhetően az organoidok növekedése erősen korlátozott.⁶ Az agykéreg organoidokon kívül léteznek hippokampusz, középagy, hipotalamusz, kisagy, hipofízis és retina modellek is.⁶

A miniagyak betegségek tanulmányozására is használhatóak. A Zika-vírus felnőtteknél lázzal, enyhe tünetekkel járó betegség, amely újszülötteknél „kisfejséget” (mikrocephaliát) okozhat. A születendő gyermek ez esetben magzatként fertőződik meg az anyán keresztül a szűnyog félek (pl.: Ázsiai tigrisszűnyog) által terjesztett vírussal. A Zika-vírus által okozott kisfejség biológiai hátterét „miniagyakon” vizsgálták. Újra programozott őssejteket fertőztek Zika-vírussal, majd megkezdték az agy organoidok nevelését. Kísérletekből megállapították, hogy a Zika-fertőzött „miniagyakban” a neuronális progenitor sejtek (NPC-k) gyorsabban differenciálódtak idegsejtekké. Az NPC-k nem tudtak időben elegendő számú további progenitor sejtet képezni, így a neurogenesis károsodott. A Zika megzavarta az NPC-k osztódását is, a centroszóma rendelleneségek okozásával. A hibás NPC osztódások megzavarták a progenitor sejtek eloszlását is az organoidokon belül. A Zika-vírus fertőzés tehát az NPC populáció idő előtti kimerülését, az idegrendszer fejlődési zavarát és az organoidok szerkezeti deformitását okozta.⁷

Az organoid kutatás etikai dilemmái

Etikai szempontokból az organoidok használata mellett lehet érvelni azzal, hogy így csökkenteni lehet az elvégzendő állatkísérletek számát és valódi humán eredetű szervezdeményekkel dolgozhatunk. Azonban az egyre komplexebb organoid modellek megalkotásával is etikai problémák felmerülnek. Számos országban, amelyben engedélyezett a humán embriókkal való kísérletezés a vizsgálatokat a 14. napon kell befejezni, azaz a csíralemezek elkülönülése lett végpontként meghatározva. 14 napos miniagyak már teljesen kifejlődnek, méretük megközelítőleg (4 cm³) eléri egy kifejlett egér agyának méretét, szerveződése egy embrionális agyhoz hasonló és képes ingereket érzékelni a külvilágból. Az egyre komplexebb organoidok létrehozásával egyre közelebb jutunk emberi eredetű, emberben található szervekhez hasonlító organoidok létrejöttéhez. Elképzelhető, hogy a jövőben az organoid kutatásnak is lesznek jogi korlátozásai. Jelenleg a vérellátás hiányából fakadó méretkorlátok határt szabnak az organoidok további fejlődésének.⁸

Összefoglalás

Összefoglalva az organoidok rövid idő alatt nagy potenciállal rendelkező modelleké fejlődtek, melyeket tanulmányozva közelebb kerülhetünk emberi betegségek megértéséhez, mint más modellek vizsgálatával. Lecsökkenthetjük vele az állat kísérleteknek áldozatul eső alanyok számát. Azonban nem feledkezhetünk meg arról, hogy teljes szervezet vizsgálatára nem alkalmasak. Így a sejt nem autonóm hatásai esetében vagy a komplexebb élettartam, kognitív funkciók, viselkedés és tanulás méréseknél továbbra is szükség lesz modellélőlények alkalmazására

Felhasznált irodalom:

1. Duval, K. *et al.* Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)*. **32**, 266–277 (2017).
2. McDonald, D. *et al.* Defining the Teratoma as a Model for Multi-lineage Human Development. *Cell* **183**, 1402-1419.e18 (2020).
3. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **2**, 663–676 (2006).
4. Lancaster, M. A. & Knoblich, J. A. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science (80-.)*. **345**, (2014).
5. Ader, M. & Tanaka, E. M. Modeling human development in 3D culture. *Curr. Opin. Cell Biol.* **31**, 23–28 (2014).
6. Qian, X., Song, H. & Ming, G. L. Brain organoids: Advances, applications and challenges. *Dev.* **146**, (2019).
7. Gabriel, E. *et al.* Recent Zika Virus Isolates Induce Premature Differentiation of Neural Progenitors in Human Brain Organoids. *Cell Stem Cell* **20**, 397-406.e5 (2017).
8. Mollaki, V. Ethical Challenges in Organoid Use. *Biotech (Basel (Switzerland))* **10**, (2021).

Speciális céllal vizsgálat modellek

Házityúk

Bevezetés

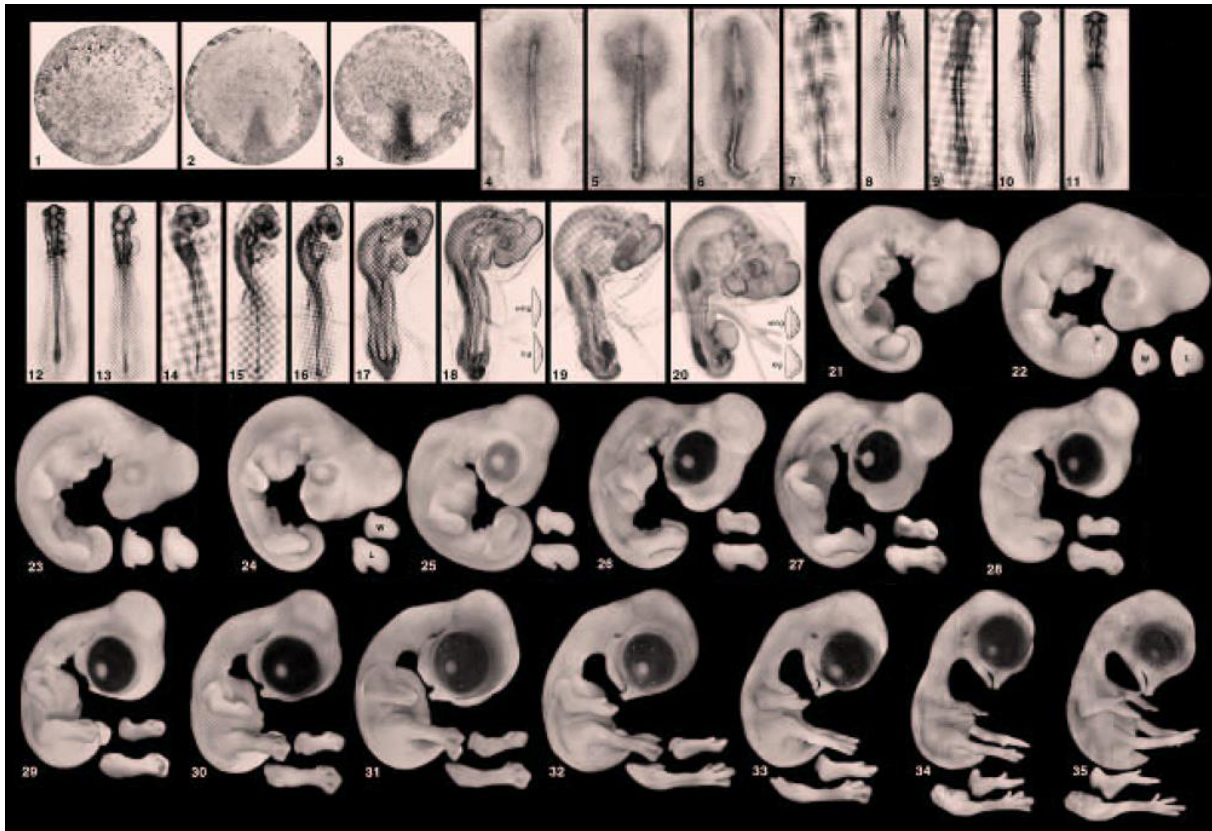
Mivel nem tudunk kiválasztani egy olyan modellszervezet, amely minden biológiai kérdés megválaszolására alkalmas lehet. Mindig a vizsgálandó kérdés fogja megszabni azt, hogy melyik szervezetet használjuk. Vannak azonban olyan kritériumok, amelyeknek mindig meg kell felelni. Fontos az olcsó fenntarthatóság, a könnyű mikrosebészeti manipulálhatóság, illetve az ellenállóképesség a különböző kísérletes beavatkozásokkal szemben.

A megfelelő fejlődésbiológiai modell kiválasztásánál előny lehet többek között a gyors embrionális fejlődés, amellyel könnyen lehet monitorozni a különböző fejlődéstani stádiumokat. Madárembriókra kifejezetten nagy az embriómanipulációs technikák tárháza, valamint könnyen manipulálható szervezetről beszélünk, amely jól tűri a mikrosebészeti beavatkozásokat. A házi tyúknak, mint az összes többi madárfajnak, *in ovo* - tojáson belül, de az anyaállaton kívül zajlik a fejlődése.

A madár modellekkel folytatott kutatások nagy múltra tekintenek vissza. Az 1600-as években az artériák és a vénák funkciójára, valamint a kapillárisok összekötő szerepére madárembriók vizsgálatával derítettek fényt. Nagyon fontos Nobel-díjat érő felfedezés volt a Rous szarkóma vírus felfedezése (1911), ami először bizonyította, hogy tumoros elváltozás a szervezetben vírusfertőzést követően is kialakulhat.¹ Ugyancsak Nobel-díjas felfedezés volt a *reverse* transzkriptáz leírása, mellyel megfejtették az RNS vírusok gazdaséjbe történő bejutásának módját (1973). Immunológiai szempontból kulcsfontosságú feltárás volt a B-limfociták és a T-limfociták funkciójának elkülönítése. A B-limfociták nevében a *B* a *bursa Fabricii*-ből ered, amely a madarak egy speciális, vastagbélhez asszociált nyirokszerve. Általa sikerült a timuszban lévő sejtek és a bursa sejtek funkcióját elkülöníteni. Gazdasági és egészségügyi szempontból is fontos a tojásokban lévő vírusok tenyésztése. Rutinszerűen alkalmazott módszer a különböző influenzavírus típusok tojásban történő tenyésztése, izolálása, majd gyengítése és ezáltal vakcinák kialakítása. A fejlődésbiológiában az egyik legfontosabb felfedezés a növekedési faktorok leírása is a madaraknak köszönhető. Az első leírt növekedési faktor az EGF (*Epidermal Growth Factor*) volt, amely az axonok növekedését

irányítja különböző testtájakra. Ezt egy kísérletben sikerült igazolnia a kutatóknak, ahol megfigyelték, hogy ha eltávolítják a végtagkezdeményt az embrionális fejlődés során, akkor a motoneuronok axonjai nem képesek benőni a csonkolt régióba. Azonban, ha egy másik embrióból izolált végtagbimbóját odaillesztették az eltávolított végtagbimbó helyére, akkor az axonok képesek voltak beidegezni a fejlődő végtagot. Ezt követően, megpróbálták megkeresni azt a faktort, ami irányítja az axonokat. Végso soron leírták az első növekedési faktort és ezt követően robbanásszerű fejlődésnek indult a növekedési faktorok kutatása a fejlődésbiológiában és a genetikában.²

A madarak fejlődésbiológiai, sejtbiológiai, tumorbiológiai, neuroanatómiai és más immunológiai kutatások terén is nagyon gyakran használt modellszervezetek. Előnyük, hogy a tojások könnyen beszerezhetőek, és a keltetés is egyszerű: keltetőgépben, megfelelően magas a páratartalom (90-95%) és állandó 37°C fok van. Ebben a környezetben tudnak fejlődésnek indulni a megtermékenyített tojások. Az embrió a csirke esetében 21 nap alatt képes teljesen kifejlődni. A fűj embriók rövidebb idő alatt fejlődnek ki a tojásban, mint a csirke, csak 16-18 napra van szükségük. A gyöngytyúk esetében pedig a másik két madár modellnél hosszabb, 26-28 napos inkubációs idővel kell számolni. Az emlősökhöz közelebb állnak törzsfjlődéstani szempontból, mint más gerinces (nem emlős) modellek. A tojásban lévő embrió majdnem minden része tanulmányozható és szinte a fejlődés teljes időtartama alatt hozzáférhető a kutatók számára. Emiatt korai és késői fejlődéstani betegségeket, vagy különböző fejlődéstani periódusokat jól lehet modellezni madarakban. A csirke embrionális fejlődés első 21 napja egy viszonylag gyors folyamat, így az események napoknál pontosabb időbeli leírására volt szükség. Az első kilenc nap fejlődését az úgynevezett Hamburger - Hamilton stádiumokkal osztották több lényeges pontra, amely stádiumok a nulladik pillanattól egészen a kilencedik napig jelölik a főbb lépéseket (ez idő alatt lezajlik a szívfejlődésben a szívcső-görcbület kialakulása, a végtagbimbók fejlődése és az agyhólyagok stb. fejlődése is).³ A leggyakoribb stádium, amivel laboratóriumban dolgoznak a 10-es, 11-es, 12-es vagy a 28-as Hamburger - Hamilton stádiumok. (1. ábra).



1. ábra: Hamburger-Hamilton csirke embrió stádiumok. Az ábrán a csirke embrió fejlődési szakaszai láthatóak. Az ábra az alábbi tanulmány alapján készült.³

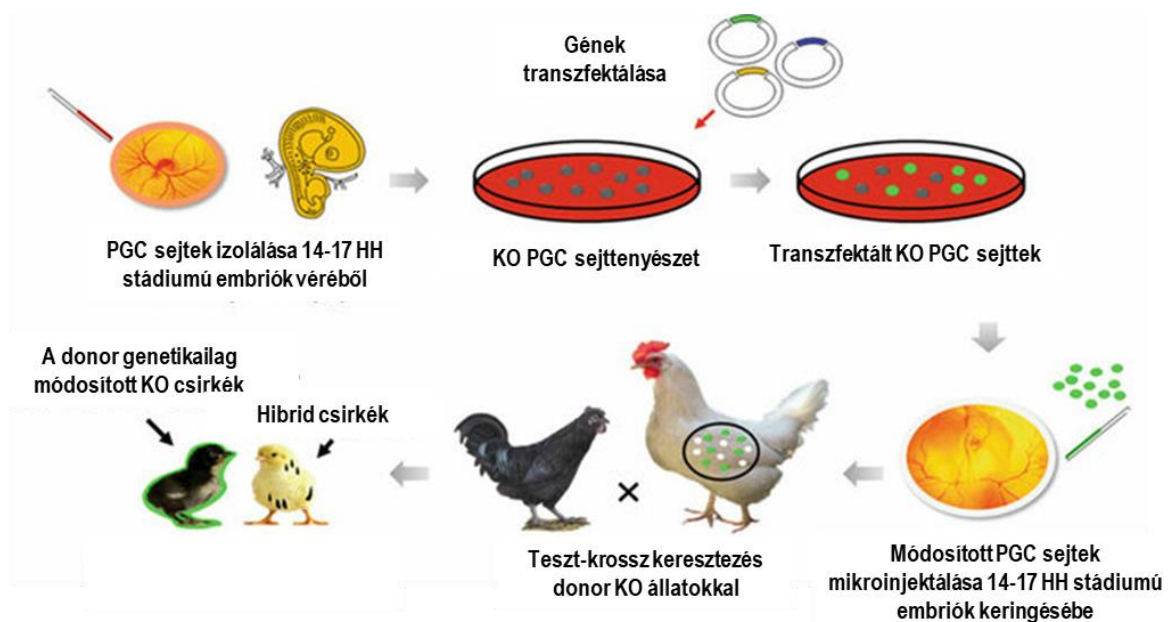
Molekulárisgenetikai technikák madár modellekben

A háztyúk 78 kromoszómával rendelkeznek, ami 8 pár makrokromoszómából és 30 pár mikrokromoszómából, illetve ivari kromoszómakészletből (Z, illetve W) áll össze. A hímeknek ZZ, a tojóknak pedig ZW ivari kromoszóma készletük van.

A csirke teljes genomszekvenciáját 2004 óta ismerjük. Ekkor valójában a háziasított csirke (*Gallus gallus domesticus*) őse, a *Gallus gallus* (bankivatyúk) került megszekvenálásra.⁴ Tehát a csirke esetén egy genetikailag is jól jellemzett modellről beszélhetünk. A madár modellekre jellemző az úgynevezett retrovírus technika, amelynél „kazettába” bármilyen gént be lehet ültetni a csirkébe. Injektálva az embriót ezzel a vírussal különböző ektropikus génkifejeződések lehet elérni és ezáltal szabályozhatóak a különböző szervezdemények fejlődése. A technika hátránya, hogy nem hozható létre vele stabil transzgenikus vonal és a módosított állat is mozaikos lesz.⁵

A közelmúltig a legnagyobb hátránya az volt a madár embriókkal való kísérletezésnek, hogy a genetikai módosítások nagyon nehezen megvalósíthatóak. A petesejtek nagyon nehezen

izolálhatóak (a hosszú petevezetőnek köszönhetően) és nagy mennyiségű szikanyagot tartalmaznak. A fertilizáció általában a petevezetőben megtörténik, tehát az embrionális fejlődés már elkezdődik ebben a stádiumban az innen izolált embriók már túl fejlettek a genetikai módosításhoz. Ezért a kutatóknak más megoldást kellett keresniük, amihez az ősvarsejtek (PGC – *Primordial Germline Cells*) izolálása jelentette az áttörést. Ellentétben az emlősökkel, az ősvarsejtek a madarak esetében a keringésben jutnak el fejlődési helyükre. Ezeket a keringő ősvarsejteket lehet izolálni, majd *in vitro* sejt kultúrákban fenntartani és genetikailag módosítani (génkiütést vagy transzgén bevitelt lehet létrehozni), majd ezeket a módosított PGC-eket vissza lehet injektálni egy fogadó embrió véráramba. Ezzel a módszerrel kiméra egyedek foghatnak keletkezni, amelyekből további keresztezésekkel lehet transzgenikus vagy génmódosított vonalakat létrehozni (2. ábra).⁶



2. ábra: Genetikailag módosított csirkék létrehozása primordiális csíravonalsejtek mikroinjektálásával.

Transzgenikus vagy mutáns madarak létrehozásához primordiális csíravonalsejtekre van szükség, amelyek izolálhatóak 14-17. Hamburger – Hamilton (HH) stádiumú embriók keringéséből. Az izolált PGC sejtek transzfektálása *in vitro* sejt kultúrákban történik. A transzgenikus állatokra való szelekció érdekében jól látható marker mutációt (KO) hordozó egyedekből származnak a PGC-k. A transzfektált PGC-eket szintén 14-17 HH stádiumú embriók keringésébe juttatják vissza. A módosított PGC-ekkel mikroinjektált embriókból felnőtt állatokat recesszív KO egyedekkel keresztezik. Az utód generációban a homozigóta KO állatok fogják hordozni minden sejtjükben a genetikai módosítást heterozigóta formában. Tiszta vonalak előállításához további keresztezésre (beltenyésztésre) van szükség. Az ábra az alábbi tanulmány alapján készült.⁶

A madarak fehérje és gén expressziós vizsgálatai könnyen kivitelezhetőek, köszönhetően az immunhisztokémiai kutatások fejlettségének. Csirkére, fűjre, sőt a gyöngytyúkra is számos olyan monoklonális ellenanyag érhető el, amellyel különböző

molekulákat nagyon specifikusan meg tudunk jelölni. A madarakban *in situ* hibridizációs technikák is elérhetőek. Az ellenanyagokkal szemben ezzel a módszerrel nem fehérjéket, hanem mRNS-eket lehet jelölni.

A madár kimérák létrehozása és relevanciája

A csirke embriók manipulálásának egyszerű eszköztára van: hegyes csipeszekre, éles ollókra, embriókanálra, szilikon aljú petricsészékre, steril oldatokra és egy megfelelő nagyítású mikroszkópra van szükség. A manipuláció kezdetén a tojáshéjra egy kamrát nyitnak a kutatók, melyen keresztül megfigyelhető az embrió. A mikromanipuláció egy üvegkapillárison keresztül végezhető, például egy speciális régió retrovírusos injektálásával befolyásolni lehet az embrionális fejlődés lépéseit.

A kiméra az egy olyan egyedre jelent, amelynek szerveinek és szöveteinek felépítésében két különböző fajból származó sejtek vesznek részt. A szövettani metszeten ellenanyag jelöléssel, vagy fluoreszcens riporter fehérjékkel lehet elkülöníteni a két faj szöveteit egymástól. Madaraknál gyakran csirke-fürj kimérákat hoznak létre, amely kimérában tanulmányozható, hogy milyen irányba differenciálódnak a különböző csíralemez eredetű sejtek, milyen más sejtekkel állnak kapcsolatban, milyen molekulákat termelnek és milyen funkciókat látnak el a szövetben. A kiméra előállításához egy előinkubált tojásra van szükség, amelyet gyakran fektetve inkubálnak (ezáltal könnyebben lehet pozicionálni az embriót a tojásban). Az alkohollal sterilizált tojáson kis ablakot vágnak. Az embriót többféle módon lehetséges kiméra állapotba hozni. Az egyik mód az úgynevezett *chorioallantoic* membrán kiméra technika. A *chorioallantoic* membrán (CAM) egy gazdagon erezett membrán a tojáshéj alatt, amelyre különböző szerveket lehet „kiültetni”. A CAM angiogénikus faktorokat termel, amelyek elősegítik az erek benövését a beültetett szervbe. Ilyen körülmények között a kimérában 9 napig lehet inkubálni és megfigyelni a legkülönbözőbb szervek fejlődését. A módszerrel többek között megvizsgálható, hogy a különböző csíralemezek sejtjei milyen későbbi szervek kialakulásához járulnak hozzá, vagy, hogy a fejlődésnek indult beültetett szervtelepet milyen sejtek kolonizálják. Továbbá az is nyomonkövethető, hogy a szervtelep milyen más szerveknek ad sejteket a későbbiekben.⁷

A CAM kiméra mellett a másik típusú, amivel a madár modellekben dolgoznak az a testüreg kiméra. Utóbbi esetben három és fél napos embriónak a görbülő szívcsőve mögötti üregbe transzplantálnak szerveket. A beültetett szerv az integrálódás során a hátsó testfalhoz fog hozzáőnni, és itt folytatódik a fejlődése. Általában szénszemcsével vagy más vitális

festékekkel jelölik a beültetésre szánt szerveket. A testüreg kiméra módszerrel hosszabb periódusban, akár 13 napig is vizsgálható a beültetett képlet.

Ritka betegségek kutatása madár kimérákkal

A madár embriókban lehetséges velőcső transzplantációt is kivitelezni. A fejlődő velőcső dorzális részéről dúcléc sejtek fognak kivándorolni, amelyek a legkülönbözőbb funkciókat látják el később a fejlődő embrióban. Fejlődésbiológiai szempontból releváns kérdés, hogy a különböző velőcsői szakaszokról származó dúcléc sejtek milyen más struktúrákat hoznak létre. A kérdés megválaszolásához a velőcsőnek egy szakaszát eltávolították a kutatók (lehetséges csak a féloldali velőcsőszakaszt eltávolítani), majd átültették egy transzgenikus, zöld fluoreszcens fehérjét (GFP-t) kifejező embrióból a megfelelő velőcsőszakaszt. A tojásokat tovább inkubálták és megfigyelték, hogy mely kialakult szervek tartalmaztak GFP-t és milyen sejttypusokká differenciálódhatnak. Professzor Nagy Nándor és munkatársai a csirke bélidegrendszerének fejlődését kutatják. Érdekes módon a csirke bélidegrendszere több hasonlóságot mutat az emberi bélidegrendszer felépítésével, mint az egéré (a csirkében is jól elkülönül a *plexus submucosus* és a *plexus myentericus* ganglionjai).

A Hirschsprung-kór esetén a dúclécsejtek hiányában, nem történik meg a bélben az ideg progenitorok kolonizációja. A Hirschsprung-kór egy ritka veleszületett betegség, 1:5000-hez az esély a kialakulására. A kórban szenvedő újszülötteknél a vastagbél utolsó része állandó összehúzódásban van, az előtte levő régiók pedig nagyon megduzzadnak, komoly gyulladásos folyamatok lépnek fel. Beavatkozás nélkül a gyulladásos folyamatok és az emésztő rendszer hibás működése 2-3 napon belül a beteg halálához vezet. Egyetlen megoldást a bélszakasz sebészi eltávolítása jelenti, ami azt eredményezi, hogy a betegnek egész életében sztómával kell élnie. A betegség patológiás oka, hogy a vastagbél disztális régiójából hiányoznak a ganglionok (de azt megelőző szakaszokon még találhatóak). A betegség kezelésében alternatív terápiás módszert az őssejtterápia jelentheti. Amikor az őssejtek belépnek a bélcsőbe, folyamatosan osztódnak és migrációjuk révén teljesen kolonizálják a bélszakaszt, neuronokká és gliasejteké differenciálódnak. Az idegrendszert kialakító régiót a bélben végfrontnak nevezik, ezek a sejtek „húzzák” maguk után a többi dúcléc sejtet. A végfront sejtjei végig vándorolnak a bélidegrendszeren miközben folyamatosan osztódnak. Emlősökben, egérben, emberben és disznóban mindösszesen 20 őssejt elegendő ahhoz, hogy bejutva a bélcsőbe létrehozza a teljes bélidegrendszert. Csirke esetén egyetlen sejt elegendő ugyanehhez a folyamathoz. Tehát, néhány őssejt bélcsőbe jutása elegendő az egész funkcionális bél

létrehozásához. A kutatók hipotézise szerint, ha egy olyan bélszakaszt találnak, ahol még vannak ganglionok, akkor belőle felszaporíthatják az ideg progenitor sejteket (szükség esetén vissza differenciálthatják őket), amelyeket később transzplantálhatnak a betegbe. A transzplantált sejtek a bélben elkezdnek migrálni, osztódni és kolonizálhatják az egész szervezetet. Így kialakulhat a beteg működőképes bélidegrendszere. A hipotézis teszteléséhez a csirkéből izolált neuronális progenitorokat 7-10 napos tenyésztés után transzplantálták. Ezt az eljárást nevezik neuroszver technikának. A neuroszferek létrehozásához különböző modellállatokban más mennyiségű progenitor sejtre van szükség: egér esetében körülbelül 50000 sejt elég, míg csirkénél 600000 sejt szükséges. Érdekes, hogy a neuroszver sejtei már a tenyésztés során képesek egymással kommunikálni axon és dendrit nyúlványokkal. A kutatások során a neuroszverekből kimérákat hoztak létre, fürjbe (amely bélszakaszában hiányoztak az ideg progenitorok) transzplantálták a jelölt csirke neuroszfereket. A fürj bélbe transzplantált csirke neuroszver mindkettő plexust létrehozta, így a bélszakasz funkcióképessé vált. A neuroszverek transzplantációja egerekben elősegítette a bél idegrendszerének fejlődését.^{8,9}

Összefoglalás

Összefoglalásul elmondható, hogy a madár modellek egy viszonylag olcsón fenntartható gerinces modellek, előnyei elsősorban a fejlődésbiológiai és fejlődésgenetikai kutatásokban jelentkeznek. Az embriók anyaszervezeten kívüli fejlődése és jó ellenállása a mikrosebészeti beavatkozásokkal szemben számos más modellben nehezen kivitelezhető kérdés megválaszolására biztosít lehetőséget.

Köszönet nyilvánítás

Köszönjük professzor Nagy Nándornak és munkatársainak: Kovács Tamásnak, Szöcs Emőkének és Sóos Ádámnak az előadásaikért, amelyek alapjául szolgáltak a madár modelleket bemutató fejezetnek.

Felhasznált irodalom:

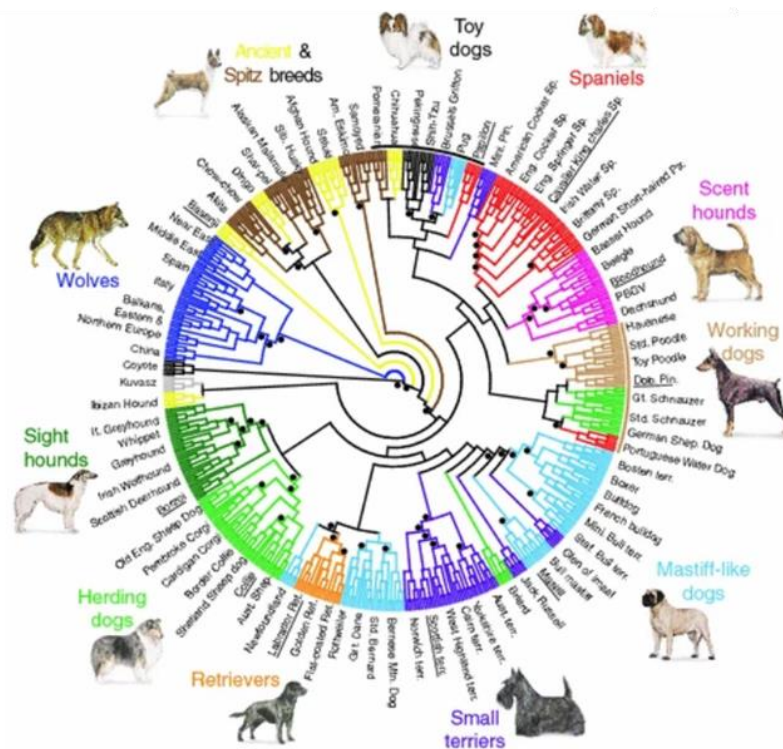
1. Dolberg, D. S. & Bissell, M. J. Inability of Rous sarcoma virus to cause sarcomas in the avian embryo. *Nature* **309**, 552–556 (1984).
2. Carpenter, G. & Cohen, S. Epidermal growth factor. *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 193–216 (1979).
3. Hamburger, V. & Hamilton, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **195**, 231–272 (1992).
4. Wallis, J. W. *et al.* A physical map of the chicken genome. *Nature* **432**, 761–764 (2004).
5. de la Pompa, J. L. & Zeller, R. Ectopic expression of genes during chicken limb pattern formation using replication defective retroviral vectors. *Mech. Dev.* **43**, 187–198 (1993).
6. Han, J. Y. & Lee, B. R. Isolation and Characterization of Chicken Primordial Germ Cells and Their Application in Transgenesis. *Methods Mol. Biol.* **1650**, 229–242 (2017).

7. Nowak-Sliwinska, P., Segura, T. & Iruela-Arispe, M. L. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis* **17**, 779–804 (2014).
8. Nagy, N. & Goldstein, A. M. Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon. *Semin. Cell Dev. Biol.* **66**, 94–106 (2017).
9. Hotta, R. *et al.* Isogenic enteric neural progenitor cells can replace missing neurons and glia in mice with Hirschsprung disease. *Neurogastroenterol. Motil.* **28**, 498–512 (2016).

Kutyák

Bár a genetikai nézőpont már régóta szerepel a kutyafajták (*Canis familiaris*) tenyésztésében, a kutyák nem tartoznak a klasszikus genetikai modellszervezetek közé, a legtöbb „kritériumnak” nem, vagy csak részlegesen felelnek meg. Mégis, a modern genetikai kutatásokban már, mint fontos modellek szerepelnek, melyhez a molekuláris technikák fejlődésére és egy kis nézőpont váltásra volt szükség. Laboratóriumi vizsgálatokra továbbra sem ideálisak, de az évszázados tenyésztésnek köszönhetően változatos genetikájú és fenotípusú fajták alakultak ki, ami a genomikai vizsgálatok fejlődésével kiválóan használható a kutatások során. A kutyáknál előforduló körülbelül 450 fajta genetikai betegségből körülbelül 360 párhuzamba hozható emberi betegséggel, így remek betegségmodellek. Mivel a kutyák nagyon nagy hányada házikedvenc, így gyakorlatilag ugyan azok között a körülmények között élnek, mint az ember és nagyon hasonló öregedési tüneteket, betegségeket mutatnak, így kiváló öregedési modellek is.¹⁻⁵

Kevés kutyafajta tartható könnyen laboratóriumi körülmények között (pl.: beagle), így ezek nem fedik le a kutyák természetes genetikai változatosságát. Még ezt a néhány fajt sem olyan egyszerű laboratóriumban tartani és tenyészteni, mint a klasszikus genetikai modelleket. A kutyáknak jóval hosszabb a generációs idejük, az élettartamuk. Bár érdekes vizsgálatokra ad lehetőséget, hogy jelentős, (testmérettel összefüggő) különbség van a fajták élettartamában, a kisebb testű kutyák élettartama általában 6-8 év, míg a nagyobb testűek akár több mint 14-16 évet is élhetnek. Kevésbé szaporák. Összetettebb környezeti és szociális igényeik vannak. Emberhez hasonló komplexitásuk, szociális képességeik, fiziológiájuk izgalmas modellté teszi őket, de vizsgálatukat is nehezíti. Sok az egyedi variancia, nincsenek teljesen homogén populációk. Bár lehetséges genetikailag módosítani a kutyákat, ezek az eljárások és sok molekuláris vizsgálat technikai és engedélyeztetési szempontból is bonyolultabb, mint egyszerűbb modellszervezeteknél. Törvényileg igen szigorúan szabályozott a kutyák vizsgálata, még laborkutyák esetében is csak nagyon indokolt esetben lehet invazív módszereket használni. Pont ezért jó modellek az embereknél is használható, nem invazív módszerek kifejlesztéséhez. Elsősorban spontán kialakult betegségeket szoktak vizsgálni esetükben és ritkán hoznak létre mesterségesen betegségmodelleket, nem végeznek velük mutáns *screeneket*.¹⁻⁶



1. ábra: A kutyák régóta tartó és intenzív tenyésztésének köszönhetően a legváltozatosabb tulajdonságú fajták alakultak ki.⁸

A kutyák házasítása több mint 14 000 évvel ezelőtt kezdődött. Az eltelt több ezer évben a számos szerepkörnek (vadász, terelő, őrző, rendőr, vakvezető, kedvenc stb.) megfelelően a kívánt tulajdonságok eléréséért intenzív szelekció történt, melynek eredményeként a legváltozatosabb külalakú és viselkedésű fajták alakultak ki (1. ábra). Az emberekkel együtt élő kutyák gyakorlatilag egy nagy, természetes „mutáns”-gyűjteményt alkotnak. Ennek felismerése tette lehetővé, hogy a modern módszerekkel ötvözve a kutya kiváló genetikai modell lehessen a kutatásokban. A tenyésztés során a mutációk spontán történtek és a megjelenő előnyös fenotípusokra szelektáltak, azonban a háttérben nagyon sok semleges vagy éppen káros mutáció is felhalmozódott az egyes fajtákban. Ez nehézséget is jelent, mert nem lehet azonnal egyértelműen meghatározni, hogy melyik fenotípust melyik mutáció okozza. Ugyanakkor fajtára jellemző örökletes betegségek alakultak ki (pl.: bizonyos rákfajták, szívbetegségek, vakság, szürkehályog, sükettség, csípőízületi diszplázia stb.), melyek nagy része hasonló az emberi betegségekhez. A kutyákban a daganatos megbetegedések spontán módon és körülbelül olyan arányban jelennek meg, mint emberben, és a lefolyásuk is sok tekintetben hasonló. Emellett az emberek és a kutyák ugyanabban a környezetben élnek, így sok környezeti faktor is azonos, ami befolyásolhatja a betegség kialakulását vagy

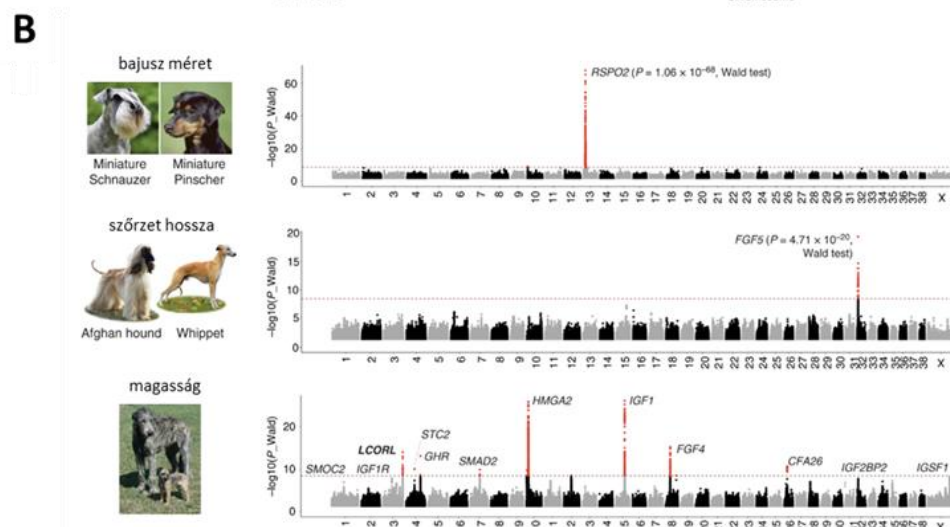
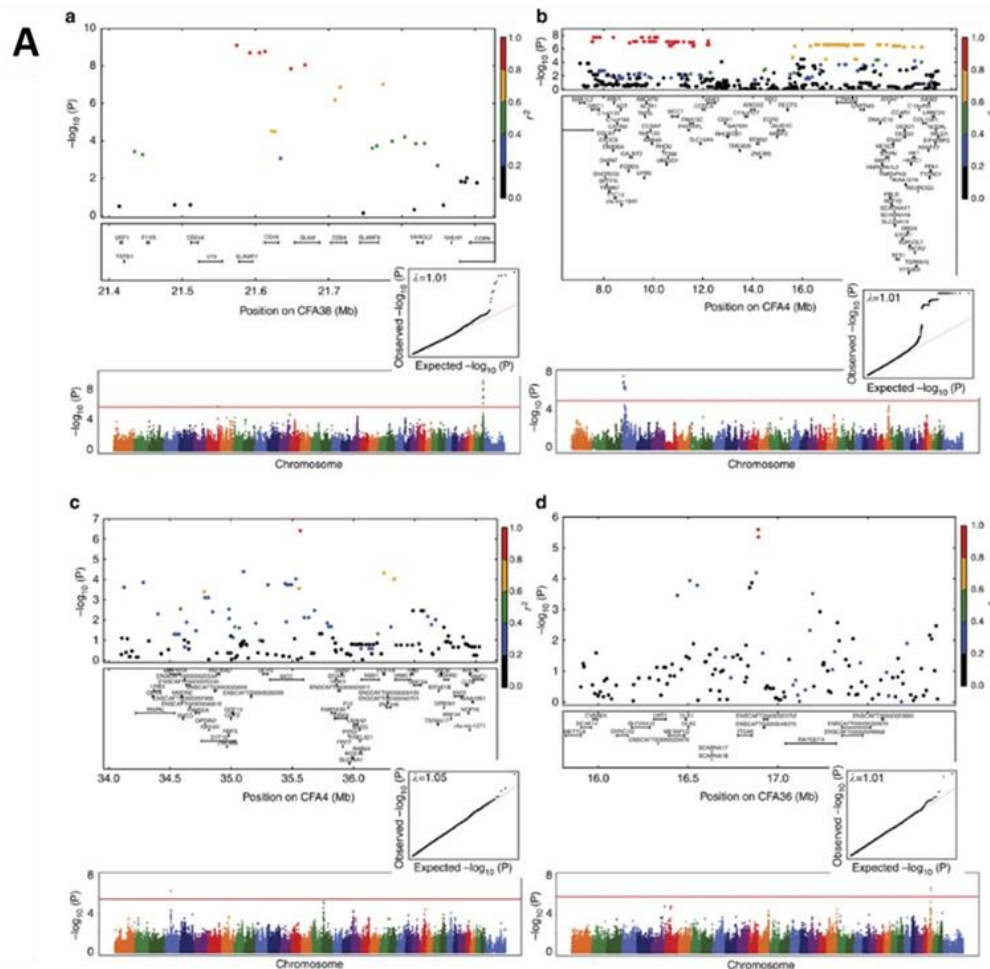
progresszióját. A kutyák kiváló modellek, mind a betegségek genetikai hátterének felderítéséhez, mind a lefolyásának vagy kezelési módjának vizsgálatára.^{1-5,7}

Mivel a kutyafajták általában csak néhány alapító egyedtől származnak, így zárt populációt alkotnak, korlátozott lókus- és betegség heterogenitással, mely a genetikai vizsgálatokat egyszerűbbé teszi. A különböző kutyafajták kiváló lehetőséget adnak a betegségek modellezésére és genetikai hátterének felderítésére. A genomszekvenálások előtt különböző fajtájú kutya állományokat tartottak fenn kutatási célra, hogy teszt párosításokat lehessen velük végezni. A klasszikus genetikai térképezésen alapuló módszer segítségével sikerült például felfedezni egy olyan mutációt (*hypcretin (orexin) receptor 2* génben), mely a narkolepszia kialakulásáért felelős a kutyáknál. De ez a módszer elég bonyolult és időigényes volt.^{1-5,9}

A kutyagenom megszekvenálása (elsőként egy szuka boxer) hatalmas lépés volt a genetikai térképezés elősegítésében. A kutya genomja sok tekintetben valamivel jobban hasonlít az emberi genomra, mint az egéré. Más fajtájú kutyáktól is elemezték genomi régiókat, és elkészítették az első haplotípus-elemzéseket. Kiderült, hogy a kutyafajtákon belül igen kiterjedtek az LD (*linkage disequilibrium*) régiók. (Az LD régiókat az egymással kapcsoltan öröklődő genetikai markerek jelölik ki. Az LD régió és a haplotípus nem teljesen ugyanaz, de közelítőleg szinonim fogalom). Azóta több egyed (pl. uszkár, németjuhász, német dog, baseni) genomját is megszekvenálták, várhatóan idővel elkészül egy kiátlagolt kutya-genomtérkép.^{1,10-13}

A kiterjedt LD régióknak köszönhetően a kutyafajtákon belül sokkal hatékonyabban lehet GWAS (*genome wide association study*) alapú genetikai térképezést végezni, mint humán populációkban. A GWAS fő eszköze az SNP-chip, melynek minden pontja egy-egy SNP-t (genetikai térképpont) vizsgál. Kutyáknál egy-egy térképpont kiterjedtebb genomi régiót jelez. Az SNP-chip több tízezer SNP esetén vizsgálja az allélokot, így minden egyedre más mintázatot ad. A GWAS vizsgálat komplex betegségek elemzésére alkalmas módszer, mely során egy populáción belül összehasonlítják egymással az adott fenotípust mutató és nem mutató egyedeket. Az egyedek összességéből kijön egy statisztikai mintázat, melyből látszani fog, hogy melyik az a néhány SNP, mely az átlagnál jóval gyakrabban fordul elő az adott fenotípust mutató egyedekben. Az ilyen SNP elég nagy eséllyel egy olyan genomi régióba helyezkedik el, mely tartalmazza a fenotípusért felelős mutációt is, ami ezek után könnyebben beazonosítható. Amikor betegségekkel kapcsolatos genetikai hátteret vizsgálnak, akkor többnyire egy-egy fajtán belül keresik a statisztikailag szignifikánsan gyakoribb SNP-ket (2.

ábra A), melyek a betegséggel asszociálódnak. Fajtán belül, ha a beteg egyedek nem rokonai egymásnak, kisebb az esélye, hogy véletlenül kapcsolódik egy-egy SNP gyakorisága a betegséghez, ráadásul fajtán belül az LD régiók is kiterjedtebbek.^{1,10,11}



2. ábra: Példák GWAS vizsgálatokra. A-D: Fajtán belüli vizsgálatokkal keresik a betegségekkel szignifikánsan asszociált SNP-eket. Francia bulldogokban és amerikai bulldogokban a CFA38 régió szignifikánsan asszociált a granulomatózus vastagbélgyulladásal. Ez a régió emberben is asszociált gyulladásoos bélbetegségekkel, valamint

az ebben a régióban lévő egyik génnek egérben is szerepe van a baktériumfertőzések során. Ír farkaskutyában a CFA4 haplotípus asszociált az idiopátiás epilepsziával. Mivel több gén is van a régióban részletesebb vizsgálat is szükséges. Golden retrieverekben ugyancsak több gént tartalmazó régió asszociált limfómával, míg labradorokban egy olyan régiót asszociáltak hízósejtes daganattal, mely egyetlen gént tartalmaz. A piros vonalak jelölik a szignifikancia küszöbértékeit.¹⁰ E: Morfológiai tulajdonságok vizsgálata során fajták összevetése. A kísérletben azt vizsgálták milyen génlókuszokkal asszociált a bajusz és a szemöldök megléte vagy hiánya, a szőrzet hossza és az állatok magassága.¹⁴

A különböző küllemi jellegek (pl. lógó fül, rövid láb stb.) (2. ábra B) esetében általában fajták közti különbségeket néznek. A fajták közt véletlenszerűen sok SNP mutathat gyakoriságbeli különbséget, nem csak fenotípusért felelős genomi régió elhelyezkedő SNP-k. Ennek kiküszöbölésére sok, az adott fenotípusra nézve azonos, illetve különböző (pl. rövidlábú és hosszúlábú) fajtát hasonlítanak össze, mert akkor az egyes fajták közti véletlenszerű különbségek „kiegyenlítődnek”, és jobban kiemelkedik ebből a zajból a keresett SNP-csoport.^{1,10,11,14}

Számos érdekes eredmény született a genetikai vizsgálatok során. Például a WBSCR17 genetikai régió számos pontban különbözik a kutyák és a farkasok között. A WBSCR17 gén mutációja embereknél Williams-Beuren szindrómát okoz, mely többek közt extrém barátságos jellemet eredményez. Ez felveti a lehetőségét, hogy ez is egy olyan genetikai változás a kutyákban, mely lehetővé tette az emberekkel való barátságos együttélést.¹⁵ Vagy például a német dog esetében a jellegzetes fehér alapon foltos „harlekin” szín kialakulásával asszociálódó mutációt a proteaszóma egyik alegységének génjében azonosították. A proteaszóma mutációiról korábban nem volt ismert, hogy emlősöknél látható fenotípust befolyásolnának^{15,16}.

A fajták rokonsági viszonyainak megismerése is lehetővé vált a genomikai módszerek segítségével, de a tenyésztést is hatékonyabbá teszik ezek a módszerek. A beltenyésztés eredményeként mára magas a betegségekkel terhelt egyedek aránya számos fajtatiszta állományban, aminek komoly állatjóléti vonatkozásai vannak. Ezt a helyzetet orvosolhatja a genetikai vizsgálatok térnyerése a tenyésztésben.^{1,8}

A komplex jelenségek, pl. az öregedés vizsgálatában is egyre nagyobb szerepet nyernek a kutyák. Az öregedés jellegzetes változásokat okoz az egyszerűbb modellszervezeteknél is (pl. fonálféreg, *Caenorhabditis elegans*) és számtalan öregedési mechanizmust, molekuláris útvonalat tártak fel a segítségükkel. Az ilyen egyszerűbb modellszervezetekkel is érdemes az öregedés kutatást folytatni, hiszen ahogy korábbi fejezetekből is látszik, sokoldalúak és még rengeteg

megválaszolatlan kérdésben a legjobb modellek lehetnek. Azonban nem lehet a vizsgálatokat az emberi öregedés minden aspektusára kiterjeszteni. Például korfüggő gerincproblémákat egyértelműen nem lehet rajtuk vizsgálni és az öregedéssel összefüggő viselkedésváltozások megfigyelhetősége is korlátozott. (Bár vannak olyan esetek, amikor ez az egyszerűség éppen előnyére válik ezeknek a modelleknek.) A gerinces modellszervezetek (pl. zebradánió, afrikai türkiz killi, egér) már komplexebb megközelítésre adnak lehetőséget, például vizsgálható a bélflóra és az öregedés kapcsolata; lehetőség van a gerinc változásainak megfigyelésére; összetettebb viselkedési paraméterek vizsgálhatóak. ^{1,17-21}

A kutyák évtizedek óta az emberrel együtt élnek, rengeteg olyan változáson (genetikai, fiziológia és kognitív) mentek keresztül melynek eredményeként jobban alkalmazkodtak ehhez az együttéléshez. Mivel emlősök, anatómiailag és fiziológiailag is jobban hasonlítanak az emberre, mint az egyszerűbb modellszervezetek, de például az agyuk az egerekhez képest is nagyobb hasonlóságot mutat. Mivel a társállatként tartott kutyák együtt élnek az emberrel, étletterét, táplálkozását (annak változatosságát), a környezeti stresszorokat tekintve is nagy a hasonlóság az emberrel. A farkashoz képest sokkal hatékonyabban képesek emészteni a keményítőt, mivel az amilázt kódoló génjei duplikálódtak. Az emberi öregedést szintén befolyásoló szocio-kognitív tényezők is nagy szerepet játszhatnak az kutyák öregedési folyamatában. Így gyakorlatilag az emberhez legközelebb álló modellek. Ugyanakkor mivel az emberhez képest jóval rövidebb az élettartamuk annak mérése, az utánkövetési lehetőségek sokkal könnyebben megoldhatók. A kutyák tanulási és szociális képességei, emberekkel való együttműködési igénye ugyancsak nagyban megkönnyíti a vizsgálatukat. Talán az egyetlen nehézség, hogy még mindig kevés konkrét ismeret áll rendelkezésre a molekuláris szintű változásokról a kutyák öregedése során. Az öregedést irányító genetikai útvonalak nagyrészt konzerváltak, azonban lehetnek fajspecifikus eltérések. A hiány pótlására egyre nagyobb szövetbankok és molekuláris adatbázisok készülnek világszerte, vagy nem invazív mintavételezés eredményeként vagy olyan kutyák mintáinak felhasználásával (gazdák engedélyével), akiket orvosi okok miatt el kellett altatni. ^{1,17-21}

Az egyik legfontosabb tulajdonsága az öregedéskutatás szempontjából a kutyáknak, hogy az idős kutyák jelentős arányánál fordul elő természetesen időskori demencia (pl.: térbeli dezorientáció, szociális viselkedési zavarok, ismétlődő viselkedés, apátia, fokozott ingerlékenység, alvás-ébrenlét ciklus megszakadása stb), így a legjobb modellek a demencia vizsgálatára. Emellett sokféle, az öregedéssel is összefüggő ráktípus és neurodegeneratív betegségek is megjelenik náluk. Ezek komplexebb vizsgálatában is kiemelkedően fontosak. A

kutya bél mikrobiom összetétele sok hasonlóságot mutat az emberével, egyes kutatások szerint jobban hasonlít, mint az egér vagy akár a sertés mikrobiom összetétele. Egy kis mintaszámú kísérletben kapcsolatot találtunk az életkor és a bél-mikrobiom, illetve az időskori memóriateljesítmény és a bél-mikrobiom között is.^{1,17-21}

A társként tartott kutyák genetikai vizsgálatait nagyban elősegíthetik az ún. „*Citizen science*” megközelítés, melynek során aktívan bevonják az adatgyűjtésbe a nem szakember kutyatartókat is. A gazdák ismerik a kutyák élettörténetét, közreműködhetnek a laboratóriumi vizsgálatokban, de rengeteg fontos információt szolgáltathatnak a kutyák otthoni környezetben való viselkedéséről is. Ezzel a megközelítéssel kevés költséggel ki lehet használni a különböző kutyafajtákban rejlő genetikai sokféleséget és nagy adatt mennyiség gyűjthető be. Ebben a fajta adatgyűjtési felállásban kutatói részről is kiemelten fontos az interdiszciplináris megközelítés, tehát a különböző szakterületek képviselőinek együttműködése (állatorvos, genetikus, etológus stb.). Társadalmi szempontból is sokkal érthetőbbé és támogatottabbá válnak az (öregedés)kutatások a tájékoztatás és részvétel következtében.^{1,19,22}

Bár a kutyák nem tartoznak a klasszikus genetikai modellek közé jól példázzák, hogy a genetikai eszköztár fejlődésével és a kritériumok újragondolásával hogyan válhatnak újabb szervezetek is modellé speciális kérdések vizsgálatára. Bár megvannak a korlátai ennek a modellnek a laboratóriumi vizsgálatok során, de letagadhatatlan jelentősége az öregedés és különböző betegségek komplex genetikai hátterének felderítésében.

Köszönetnyilvánítás

A kutyák genetikai modellként való felhasználásáról szóló fejezet Dr. Sándor Sára előadásai alapján készült. Köszönjük, hogy évente színvonalas előadással ismerteti meg a hallgatókat a kutyák genetikai kutatásokban betöltött jelentőségével!

Felhasznált irodalom:

1. Sándor, S. & Kubinyi, E. Genetic Pathways of Aging and Their Relevance in the Dog as a Natural Model of Human Aging. *Front Genet* 10, 464268 (2019).
2. van Steenbeek, F. G., Hytönen, M. K., Leegwater, P. A. J. & Lohi, H. The canine era: the rise of a biomedical model. *Anim Genet* 47, 519–527 (2016).
3. Switonski, M. Dog as a model in studies on human hereditary diseases and their gene therapy. *Reprod Biol* 14, 44–50 (2014).
4. Shaffer, L. G. Special issue on canine genetics: animal models for human disease and gene therapies, new discoveries for canine inherited diseases, and standards and guidelines for clinical genetic testing for domestic dogs. 138, 437–440 (2025).

5. Shearin, A. L. & Ostrander, E. A. Leading the way: canine models of genomics and disease. *Dis Model Mech* 3, 27 (2010).
6. Kim, M. J. *et al.* Generation of transgenic dogs that conditionally express green fluorescent protein. *Genesis* 49, 472–478 (2011).
7. Janssens, L. *et al.* A new look at an old dog: Bonn-Oberkassel reconsidered. *J Archaeol Sci* 92, 126–138 (2018).
8. Wayne, R. K. & Vonholdt, B. M. Evolutionary genomics of dog domestication. *Mamm Genome* 23, 3–18 (2012).
9. Lin, L. *et al.* The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 98, 365–376 (1999).
10. Hayward, J. J. *et al.* Complex disease and phenotype mapping in the domestic dog. *Nature Communications* 2016 7:1 7, 1–11 (2016).
11. Vaysse, A. *et al.* Identification of genomic regions associated with phenotypic variation between dog breeds using selection mapping. *PLoS Genet* 7, (2011).
12. Karlsson, E. K. & Lindblad-Toh, K. Leader of the pack: Gene mapping in dogs and other model organisms. *Nature Reviews Genetics* vol. 9 713–725 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrg2382> (2008).
13. Jagannathan, V. *et al.* Dog10K_Boxer_Tasha_1.0: A Long-Read Assembly of the Dog Reference Genome. *Genes (Basel)* 12, (2021).
14. Plassais, J. *et al.* Whole genome sequencing of canids reveals genomic regions under selection and variants influencing morphology. *Nature Communications* 2019 10:1 10, 1–14 (2019).
15. VonHoldt, B. M. *et al.* Activity of Genes with Functions in Human Williams–Beuren Syndrome Is Impacted by Mobile Element Insertions in the Gray Wolf Genome. *Genome Biol Evol* 10, 1546–1553 (2018).
16. Tsai, K. L. *et al.* Genome-wide association studies for multiple diseases of the German Shepherd Dog. *Mamm Genome* 23, 203–211 (2012).
17. Szabó, D., Miklósi, Á. & Kubinyi, E. Owner reported sensory impairments affect behavioural signs associated with cognitive decline in dogs. *Behavioural processes* 157, 354–360 (2018).
18. Axelsson, E. *et al.* The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. *Nature* 495, 360–364 (2013).
19. Sándor, S., Urfer, S. & Kubinyi, E. Toward establishing a worldwide net of canine biobanks. *Aging (Albany NY)* 14, 2436 (2022).
20. Kubinyi, E., Bel Rhali, S., Sándor, S., Szabó, A. & Felföldi, T. Gut Microbiome Composition is Associated with Age and Memory Performance in Pet Dogs. *Animals (Basel)* 10, 1–10 (2020).
21. Coelho, L. P. *et al.* Similarity of the dog and human gut microbiomes in gene content and response to diet. *Microbiome* 6, 72 (2018).
22. Stewart, L. *et al.* Citizen Science as a New Tool in Dog Cognition Research. *PLoS One* 10, e0135176 (2015).

Új genetikaimodellek létrehozása és relevanciája

A kísérleti biológia tudományág fejlődését az elvégzendő munka igénye vezérli. A modellorganizmusok lehetőséget nyújtanak komplex modellezésére például az emberi egészség szempontjából releváns folyamatok, betegségek modellezésére. A modellorganizmusok könnyen és olcsón tenyészthetők laboratóriumi körülmények között, gyors generációs idővel rendelkeznek és genetikailag könnyen manipulálhatóak. Napjainkban számos nagy múltú modellélőlény elérhető a kutatók számára, amelyek mind más és más nézőpontból számítanak sikeres modellnek. Egy kérdés megválaszolásánál szempont lehet a gyorsaság, a mintaelemszám, a reprodukálhatóság, költségek és természetesen a modell hasonlósága az adott tényezővel (pl.: emberi betegség). Egy laboratórium működésében a 2 legfontosabb meghatározó tényező a kísérletes érdeklődés (mit kutatnak) és a modellorganizmus (mivel kutatnak). Elképzelhető, hogy a laboratórium által vizsgált élőlénynek korlátai vannak egy kérdés megválaszolásában, vagy ráébredünk, hogy egy másik élőlény sokkal ideálisabb számunkra.

Ebben a fejezeten egy kutatócsoport 2009-ben megkezdett munkáján keresztül szeretnénk megmutatni, hogy mi kell ahhoz, hogy egy kiválasztott faj, esetükben az egyiptomi csípőszúnyog (*Aedes aegypti*) genetikai modell váljon. A kutatócsoportnak évtizedes tapasztalatai voltak rovarokkal, korábban *Drosophila melanogaster*-rel dolgoztak, így munkájuk során is ez a modell volt az összehasonlítási alap, illetve a technikai inspirációt is sok esetben ez a faj jelentette. Becslések szerint 260 millió évnyi evolúció választja el a szúnyogokat a *Drosophilától*¹, számos fontos génnek nincs közös funkcióval rendelkező ortológja mindkettő fajban, ezért sok módszer nem volt adaptálható a szúnyog modellben. Matthews és Vosshall 10 egymást követő lépésben határozta meg, hogy mi kell egy új modellélőlény „születéséhez”.² Érdeemes megjegyezni, hogy a közlemény szerzői is hangsúlyozzák, hogy nem minden pont örökérvényű és bizonyos esetekben egyes lépések mellőzhetőek.

1. Érdekes és releváns organizmus kiválasztása

Először is ki kell választani egy olyan fajt, amely megéri az energiabefektetést. Ezt a választást az alábbi szempontok is vezérelhetik: segíthet-e a modell jobban megismerni bolygónk sokféleségét, vizsgálata hosszútávon fejlesztheti az egészségügyet, vagy segít

fedezni a mezőgazdasági szükségleteket. A választás etikai és gyakorlati szempontok mentén is megközelíthető. Nem megfelelő választás, ha olyan fajokkal akarunk kísérletezni, amelyek veszélyeztetettek vagy észszerűen nem tarthatók fenn laboratóriumban. A szúnyog modellek fejlesztésének elsősorban orvosbiológiai relevanciája van. Egyes szúnyogfajok tekinthetőek a leghalálosabb állatoknak a bolygón, amelyek csípés által olyan kórokozókkal fertőzhetik meg a gerinces „prédáikat”, mint a Plasmodium malária, sárgaláz, vagy a Zika vírus. A szúnyogok egyedülálló anatómiai felépítéssel rendelkeznek, amely lehetővé teszi számukra a bőr átszúrását, a vérszívást, továbbá kidolgozott érzékelőrendszerük van a gerinces gazdaszervezetek felkutatására is. Ezen speciális tulajdonságaik más rovar modellekben nem tanulmányozhatóak. Fenti okok miatt egy szúnyog modell fejlesztése indokolt volt.

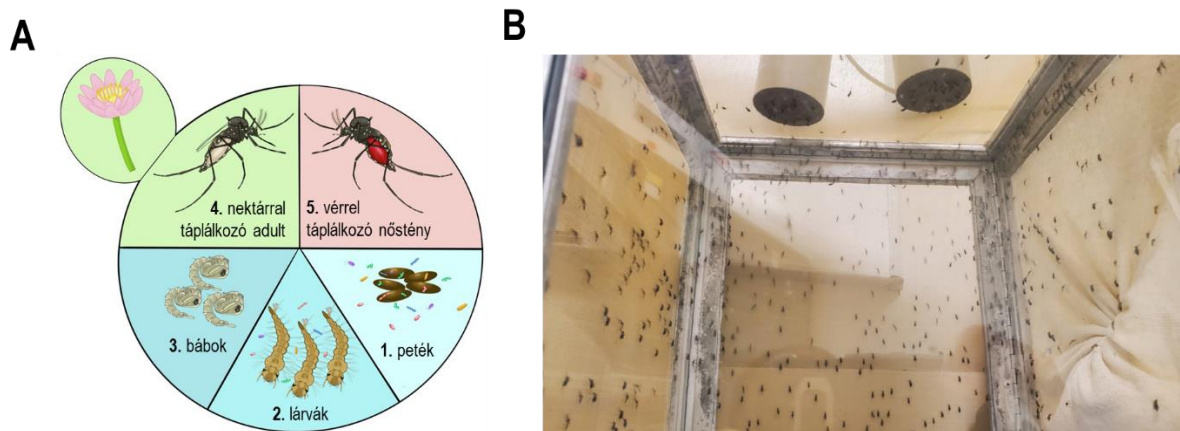
A szúnyogok az Antarktist leszámítva minden kontinensen megtalálhatóak. A több mint 3500 szúnyogfaj két alcsaládba és 113 nemzetségbe sorolható. Modell választásnál Matthews és munkatársai két faj, az *Anopheles gambiae* és az *Ae. aegypti* szúnyog közül próbáltak dönteni. Közegészségügyi szempontból az *An. gambiae* volt a relevánsabb. Ehhez a fajhoz több halálos kór terjesztése köthető, azonban a fajt nehezebb volt laboratóriumban fenntartani, és nehézkes volt benne genetikai manipulációt végezni. Az *Ae. aegypti* elsősorban a sárgaláz vírus vektora, évente körülbelül 200.000 embert fertőz meg vele, közülük 30.000-nek okozza halálát.³

2. Megtanulni, hogyan kell a kiválasztott fajjal laboratóriumi körülmények között dolgozni

A modell kiválasztásánál olyan gyakorlati megfontolásokat kell figyelembe venni, mint például a hőmérséklet és páratartalom, helyigény, etetés módja és hogyan lehet biztosítani a párzáshoz szükséges felételeket. Egyes fajoknak egzotikus táplálkozási vagy környezeti igényeik vannak, amelyek ellehetetlenítik a laboratóriumi tenyésztést. A szezonális pázás vagy a diapauza szintén gátat szab a folyamatos munkának. Ha a kiválasztott faj nem tud laboratóriumi körülmények között szaporodni, akkor a genetikai manipulációk sem megoldhatóak.

Az *Ae. aegypti* a világ legtöbb trópusi és szubtrópusi országában megtalálható faj. Olyan, emberközeli környezetet kedvel, ahol állóvizek találhatóak. Kinézetre hasonló az ázsiai tigrisszúnyoghoz, 4-7 mm hosszú, tora dorzális, felületén fehér csíkok húzódnak, a lábak ízesüléseinél is fehér sávok láthatóak. A hímek és a nőtények növényi nektárral táplálkoznak, de a peteéréshez a nőtényeknek gerincesek vérére van szüksége (az egyiptomi csípőszúnyogok esetén ez főleg emberi gazdatesteket jelent). A kifejlett nőténynek élete során 5 alkalommal

van peteérése és alkalmanként 100-200 petét rak le. A petecsomók lerakását elsősorban nedves környezetben végzi, de a peték képesek hónapokig túlélni a kiszáradást. A peték mennyisége az elfogyasztott vér mennyiségétől is függ. Az egyedfejlődés körülbelül 8 napot vesz igénybe, a stádiumok közül a 4 lárvastádiumnak és a bábnak vízhez kötött környezetre van szüksége. A mozgékony, de nem táplálkozó bábnak körülbelül 2 nap szükséges a metamorfózishoz. Ezt követően a szabadban az imágók 2 hét és 1 hónap közötti az élettartamuk (1. ábra). Az *Ae. aegypti* laboratóriumi fenntartása viszonylag egyszerű más szúnyogfajokhoz képest. Ennek oka, hogy az egyiptomi csípőszúnyogok petéiket nem közvetlenül a víz felszínére rakják, hanem attól távolabb, a peték pedig tolerálják a kiszáradást. Így a peték gyűjthetőek és laboratóriumi körülmények között 6 hónapig tárolhatóak. A kísérletek így szinkronizálhatóvá és tervezhetővé válnak. A peték oxigénmentes vízben kelnek ki.³ A felnőtt állatok 10% szaharózos desztillált vízzel, a lárvák pedig örölt hal és sertésmáj pehellyel táplálkoznak. A kifejlett állatok egy hálós ketrecben laknak és párzanak (1. ábra). A nőstények 5 napos koruktól 37°C-ra melegített juh vért kapnak egy adagoló készülék segítségével. A vérrel táplálást követő napon a ketrecbe speciális, nedves szűrőpapírt helyeznek, a nőstények ezekre fogják helyezni a petecsomókat. A papírt ezt követően ki lehet szárítani és tárolni a rajta levő petéket a következő kísérletig.³



1. ábra: Az egyiptomi csípőszúnyog egyedfejlődése és laboratóriumi tartása. A) Az egyiptomi csípőszúnyog négy fejlődési állapotban megy keresztül a teljes átalakulás során. A lárva egymást követő 4 stádiumon keresztül jut el a mozgó, de nem táplálkozó bábig. Mindkét nemű adult állatnak nektárra van szüksége táplálékként, de a peteéréshez a nőstényeknek gerinces állatok vérrére van szükségük. B) Laboratóriumi körülmények között a felnőtt szúnyogokat hálós ketrecekben tartják, ahol cukrozott vízzel táplálják őket. A peterakáshoz a nőstények melegített alvadásgátlós (citrátos) juh vért kapnak. Az ábra az alábbi tanulmányok ábráinak módosításával készültek.^{3,4}

3. A genom és a génexpressziós profil megismerése

A modern genetika eszköztára a genetikai modell genomjának ismerete nélkül nem létezhet. Egy jól összeállított genom a gének és izoformáik teljes listáját tartalmazza. Ismert a

kódoló szakaszok kromoszómákon való elhelyezkedése is, amely tudás szükséges a célzott genetikai manipulációkhoz. Az elmúlt két évtizedben rohamosan fejlődtek a szekvenálási és informatikai technikák, amelyeknek köszönhetően manapság viszonylag olcsón és gyorsan lehet új fajok teljes genomját feltárni és kezelhető adatbázisok formájában mindenki számára elérhetővé tenni. Az *Ae. aegypti* genomját 2007-ben tették közzé⁵, amely viszonylag nagynak (>1,2 Gb) és repetitívnek (>65% repetitív szekvencia) tekinthető. Ez a genom közel 10-szer nagyobb, mint a *D. melanogaster* genomja.

4. Kidolgozni a genetikai anyag bejuttatásának módszertanát

A genetikai módosítás olyan reagensek bejuttatását igényli, amelyek megváltoztatják a géneket vagy módosíthatják a génexpressziót az adott fajban. Ha a célunk, hogy öröklődjön az előidézett génexpressziós változás, a reagenseket be kell juttatni a csíravonalsejtek DNS-ébe. Ehhez számos módszer létezik, de rovarokban a transzgenézist leggyakrabban DNS mikroinjektálással végzik. Ezzel a módszerrel juttatnak be DNS-t az embriókba. Néhány esetben a peték túl törékenyek vagy túl kemények a fizikai injekciózáshoz, és más módszerekkel kell próbálkozni. A reagensek ballisztikusan vagy elektroporációval is bejuttathatók az embrióba vagy a petesejtbe. Kutatóink szerencséjére *Ae. aegypti* transzformációjára már az 1980-as évek óta léteznek protokollok.

5. Transzgénikus állatok előállítása

A precíziós genomszerkesztés megjelenése előtt a genetikai módosítások az idegen DNS beépítésére és újramobilizálására korlátozódtak. A technológia előnye, hogy rendkívül hatékony és megfizethető. A transzpozonok speciális ismétlődő szekvenciákat és a transzpozáz nevű enzimet használnak, amely segítségével a genom közeli, véletlenszerű helyein integrálódhatnak. A módszerrel inszerciós mutációk hozhatóak létre, amelyeket a transzpozáz újraaktiválásával lehet remobilizálni (pl.: hősokk-promóterrel szabályozott transzpozáz átíródás). A transzpozon kivágódása gyakorta pontatlanul történik, a mobilis elemmel kivágódhat a gén egy része is. Ekkor a korábbi inszerciós mutánsból deléciós törzs készülhet. A *Drosophila* P-elemek olyan transzpozonok, amelyek nagy gyakorisággal épülnek be gének 5'UTR régiójába, felhasználásukkal könnyen lehet funkcióvesztéses alléleket létrehozni.⁶ A mobilizálandó transzpozon és a rá specifikus transzpozáz kódoló szekvenciái különválaszthatóak egymástól. Integrációt követően a transzpozázt keresztezéssel el lehet távolítani a genomból (vagy eleve csak plazmidként kerül injektálásra és nem épül be a csíravonalba) és ezzel stabilizálható a transzpozon. A transzpozon ismétlődő szakaszai közé

szelekciós gének is beilleszthetőek, így könnyen nyomon követhető a transzpozon integrálódása és generációnkénti öröklődése. Általánosában elmondható a transzpozon-mediált transzgenézisről, hogy nagyon hatékony módszer, ennek köszönhetően lecsökkenti az injektálásra szánt embriók számát. Az integráció azonban lényegében véletlenszerű, bár egyes transzpozon - transzpozáz rendszerek előnyben részesítik a genom bizonyos rájuk jellemző "forró pontjait". Az egyik lehetséges megoldás erre a problémára a helyspecifikus integrázok adaptációja.⁷ Ilyen esetben a transzgenhez specifikus promóter/*enhancer* szekvenciákra is szükség van, hogy a kívánt szövetben kifejeződhessenek. Egy új modellorganizmusban, különösen egy nagy és ismétlődő genommal rendelkező fajban problémát okozhat az ilyen szabályozóelemek *de novo* azonosítása, a távoli fajokból származó promóterek/*enhancerek* pedig nem fognak megbízhatóan kifejeződni. A hatékony és robusztus szabályozó elemek azonosítása és hasznosítása az új modellorganizmusokban ezért fontos kihívást jelent a kutatók számára.

6. *Knock-down* és *knock-out* rendszerek kidolgozása

Mielőtt a helyspecifikus genomszerkesztés forradalmasította a modern biológiát, az RNS interferenciát (RNSi) széles körben használták a gének poszttranszkripcionális csendesítésére. Ez a technika azzal az előnnyel jár, hogy szekvencia specifikusan lehet RNS-ek lebontását előidézni. Ha a csendesítendő génnek alternatív splice variánsai vannak, célzottan lehetséges őket külön-külön lebontani. Fontos, hogy az RNSi korlátozható egy az adott szövetre vagy fejlődési időszakra. A *D. melanogaster*-ben RNSi segítségével bármely gén csendesíthető, bármely szövetben.⁷ A *Drosophila* és *C. elegans* esetén transzgenikus és plazmid könyvtárak állnak a kutatók szolgálatában, amelyek több ezer gén csendesítésére kínálnak egyszerű megoldást. Más modelleknél a felhasználói közösség túlságosan kicsi ahhoz, hogy támogassa könyvtárak (törzsbankok) létrehozásának költségeit. Transzgenikus törzsek ezreinek fenntartása is kivitelezhetetlen sok esetben. Ezért új, kevesebb kutatólabor érintettségével járó modelleknél valószínűbb, hogy az RNSi módszer helyét még inkább átveszik a CRISPR/Cas9 általi célzott génszerkesztési technikák. Utóbbira már ismert *Ae. aegypti*-ben is protokoll.⁸

7. Precíz mutagenézis kidolgozása

A homológ DNS hibajavítási és rekombinációs mechanizmusokról szerzett tudás rugalmas és pontos genomszerkesztést tesz lehetővé a kutatók számára. Ezzel a módszerrel, olyan mutációk hozhatóak létre a gén kódoló szekvenciájában, ami funkcióvesztéses mutációk

eredményez. Ezenkívül rövid szekvenciákat használnak donorként, például olyan kazetták bevitelére, amelyek a genotipizálás megkönnyítése érdekében tartalmaznak stopkódonokat és restriktív enzimek helyeit is. Az ilyen módon beépült *attP* szekvenciákat később további célzott módosításokra lehet használni homológ rekombináció segítségével (további funkcionális egységek inszertálására, vagy kivágására, cseréjére).⁹ A homológ DNS javítás felhasználható exogén szekvenciák *in-frame* bevitelére, akár egykódoló szekvencia közepére is. A módszerrel fokozhatjuk egy gén kifejeződését, plusz exonként funkcionális endogén módon expresszáló reporter rendszert hozhatunk létre, vagy akár termoszenzitív allélek létrehozása is megoldható.¹⁰ Számos szűnyog modellel foglalkozó laboratórium célja az ilyen típusú rendszerek fejlesztése.

8. Bináris effektorrendszerek kifejlesztése (Gal4, Q)

A *Drosophila melanogaster* az idegtudományok kedvelt gerinctelen modellje, elsősorban a genetikai eszközök és reagensek miatt, amelyeket több mint egy évszázad alatt fejlesztettek ki és használnak a mai napig.¹¹ Ezen eszközök lehetővé tesznek nemcsak molekuláris és sejtbiológiai, de viselkedés, fitness és memória vizsgálatokat is. A *Drosophila*-t bemutató fejezetben részletesebben szó esik az UAS-Gal4 rendszer használatáról, mellyel gének csendesítése, túltermeltetése, jelölése stb. szövet és idő specifikusan meghatározható módon történik. Biológiai jelenségek tanulmányozására hasonló eszközök kifejlesztése szűnyogokban és más nem hagyományos rovar modellekben is cél. Az *Ae. aegypti* genomja azonban lényegesen nagyobb, mint a *Drosophila* genomja, így a megbízható szabályozó elemek azonosítása és alkalmazása nagyobb kihívás a kutatók számára. Továbbá, az integrációs hely jelentős hatással lehet a transzgén kifejeződésére is. A random integrációval bejuttatott transzgén gént kódoló szakaszba is kerülhet, ahol inszerciós mutációt okozhat, vagy epigenetikailag le vagy túlszabályozódhat a kifejeződése. Megoldást a 7. pontban bemutatott *attP* (vagy FRT-FLP) homológ rekombinációs rendszerek jelenthetnek. Ekkor először inszerciós helyeket kell létrehozni a genom olyan részein, amelyek nem, vagy kevésbé befolyásolják más gének kifejeződését és nem a heterokromatikus régióban helyezkednek el.¹² Az ezt követő második lépésben történhet a transzgén elhelyezése a genom immár meghatározott pozíciójára. Az UAS-Gal4 rendszer korlátja, hogy több UAS-gén esetén a promóterek kompetálnak a Gal4 fehérje forrásért és a gének kifejeződés módosulni fog ahhoz képest, mintha csak külön-külön lenne a két UAS-gén kifejeztetve. A Q-rendszer (vagy QUAS), az UAS-Gal4 rendszerhez hasonló bináris rendszer, mely szintén egy transzkripció

faktoron és egy általa kifejeztetett transzgénen alapul. A módszer előnye, hogy más bináris rendszerektől függetlenül lehet vele egyidejűleg folyamatokat szabályozni. Például: egyszerre lehet a Q- és UAS-Gal4- rendszerekkel genetikai módosításokat végezni, úgy, hogy egymás működését nem befolyásolják. A QUAS rendszer másik előnye, hogy többször be és ki „kapcsolható” általa egy transzgén kifejeződése, így lehetőség van gyógyszer kezeléshez hasonló periodikus szabályozásra is.¹³ Bináris rendszereket szúnyog modellel foglalkozó kutatók is kifejlesztettek, ma már elérhetőek ebben a modellben is például az UAS-Gal4- és a Q- rendszerek.

9. Effektorok létrehozása bináris rendszerekhez

A bináris rendszerek kifejlesztése megnyitja az utat a szövet vagy sejt specifikus elemzésekhez. Létrehozhatóak markerek, vagy túltermelő és gátló faktorok, amelyek segítségével specifikusan tehetünk fel kérdéseket. Például lehetőségünk van neuronális aktivitás manipulálására térbeli, molekuláris, időbeli, optikai vagy kémiai ingerek segítségével.¹⁴ A bináris rendszer szépsége a kombinatorikus jellegben rejlik, amely rugalmas és kreatív felhasználást kínál a kutatók számára. Új riporter törzsek viszonylag könnyen létrehozhatóak transzpozon-mediált transzgenézissel, vagy szekvencia szinten pontos lokuszokban a CRISPR/Cas9 segítségével. A létrehozott új transzgenikus törzs kombinálható lesz a korábban létrehozottakkal és így egy új törzs beillesztésével újabb kombinációkra, számos megvizsgálható kérdésre nyílik lehetőségünk.

10. A létrehozott rendszer alkalmazása és további szükséges modellek fejlesztése

A modellorganizmusok fontos és pótolhatatlan szerepet játszanak a biológiai tudományokban, azonban ezen rendszereknek előnyei és korlátai is vannak. Krogh elve szerint minden biológiai problémára van egy a tanulmányozására leginkább alkalmas faj. Tehát szükségünk lehet a jövőben is új szervezetekre. Új modellek reményében a tudományos közösség kiaknázhathatja a viselkedés sokféleségét az állatvilágban. Az új modellek által közelebb kerülhetünk például az evolúció vagy az agyműködés alapelveinek megértéséhez. A kutatók számára számos izgalmas kérdés még feltárára vár. Új modellek segítségével a jövőben megérthető lesz a denevérek echolokációja, a méhek szociális kommunikálójá vagy a nagy távolságokra navigáló trágyabogarak és a galambok is. A szúnyogok veszélyes betegségek terjesztői, így a modellben feltehető kérdések relevanciája is a betegségek terjesztése köré csoportosul. Hogyan képesek észrevenni a gazdaszervezetet, milyen módon marad fenn a kórokozó a szúnyogban, mi kell a terjesztéshez?

Új genetikai modellorganizmus létrehozása az ELTÉ-n

A kínai paradicsomhallal már az 1970-es évektől kezdve számos viselkedésbiológiai tanulmányt végeztek az Eötvös Loránd Tudományegyetem, Etológia Tanszékén dr. Csányi Vilmos és kollégái. Azonban a paradicsomhal molekuláris biológiai aspektusai felderítetlenül maradtak. Dr. Varga Máté témavezetésével négy éve kezdődött újra a paradicsomhallal való kutatások egyetemünkön. A cél egy potenciális új genetikai modellszervezet létrehozása volt. A kínai paradicsomhal a labirintkopolytús halak családjába tartozik, Dél-kelet Ázsiában őshonos, ahol alacsony oxigénkoncentrációjú édesvizekben él. A faj előnye a zebra-dánióval szemben a jóval komplexebb viselkedésében és a speciális légzőszervében, a labirintusszervben, mutatkozik meg. Előbbi komplexebb ideg és viselkedés tudományi kérdésekre adhat választ, míg a labirintusszerv egyedfejlődés és adaptív evolúció szempontjából érdekes.¹⁵ A paradicsomhal laboratóriumi körülmények között fenntartható és szaporítható, bár a kutatók munkáját nehezíti, hogy az ívás a hajnali órákban (4 óra körül) történik. 2023 óta ismert a paradicsomhal teljes genomja, amely szintén Dr. Varga Mátéék halcsoportjának munkája.¹⁶ Jelenleg a kutatók a genetikai módosításhoz szükséges injektálás jelentette kihívásokkal küzdenek. A fenti 10 pontos lista alapján tehát a kínai paradicsomhal a modellé válás útjának 4. állomásán áll.

Köszönet nyilvánítás

Köszönjük Dr. Varga Máténak és Varga Nórának, hogy a fejezethez tartozó ismeretanyaggal saját kutatási példák bemutatásán keresztül részt vesznek tárgyunk oktatásában.

Felhasznált irodalom:

1. Arensburger, P. *et al.* Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics. *Science* **330**, 86–88 (2010).
2. Matthews, B. J. & Vosshall, L. B. How to turn an organism into a model organism in 10 ‘easy’ steps. *J. Exp. Biol.* **223**, (2020).
3. Clemons, A. *et al.* *Aedes aegypti*: an emerging model for vector mosquito development. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2010**, pdb.emo141 (2010).
4. Steven, B., Hyde, J., LaReau, J. C. & Brackney, D. E. The Axenic and Gnotobiotic Mosquito: Emerging Models for Microbiome Host Interactions. *Front. Microbiol.* **12**, 714222 (2021).
5. Nene, V. *et al.* Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* **316**, 1718–1723 (2007).
6. Ghanim, G. E., Rio, D. C. & Teixeira, F. K. Mechanism and regulation of P element transposition. *Open Biol.* **10**, 200244 (2020).
7. Labbé, G. M. C., Nimmo, D. D. & Alphey, L. piggybac- and PhiC31-mediated genetic transformation of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse). *PLoS Negl. Trop. Dis.*

- 4, e788 (2010).
8. Basu, S. *et al.* Silencing of end-joining repair for efficient site-specific gene insertion after TALEN/CRISPR mutagenesis in *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 4038–4043 (2015).
 9. Raji, J. I. *et al.* *Aedes aegypti* Mosquitoes Detect Acidic Volatiles Found in Human Odor Using the IR8a Pathway. *Curr. Biol.* **29**, 1253-1262.e7 (2019).
 10. Matthews, B. J., McBride, C. S., DeGennaro, M., Despo, O. & Vosshall, L. B. The neurotranscriptome of the *Aedes aegypti* mosquito. *BMC Genomics* **17**, 32 (2016).
 11. Hales, K. G., Korey, C. A., Larracuente, A. M. & Roberts, D. M. Genetics on the Fly: A Primer on the *Drosophila* Model System. *Genetics* **201**, 815–842 (2015).
 12. Bateman, J. R., Lee, A. M. & Wu, C. Site-specific transformation of *Drosophila* via phiC31 integrase-mediated cassette exchange. *Genetics* **173**, 769–777 (2006).
 13. Potter, C. J. & Luo, L. Using the Q system in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Protoc.* **6**, 1105–1120 (2011).
 14. Bernstein, J. G., Garrity, P. A. & Boyden, E. S. Optogenetics and thermogenetics: technologies for controlling the activity of targeted cells within intact neural circuits. *Curr. Opin. Neurobiol.* **22**, 61–71 (2012).
 15. Szabó, N. *et al.* The paradise fish, an advanced animal model for behavioral genetics and evolutionary developmental biology. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* (2023) doi:10.1002/jez.b.23223.
 16. Fodor, E. *et al.* The reference genome of the paradise fish (*Macropodus opercularis*). *bioRxiv : the preprint server for biology* (2023) doi:10.1101/2023.08.10.552018.