

Halgenomika

Dr. Balázs Kovács



Halak genetikai háttere

- A gerincesek leg változatosabb csoportja
- ~ 30,000 különböző faj.
- Evolúciósan 3 különböző csoport

•*Agnatha* (nyálkahalak, ingolák)

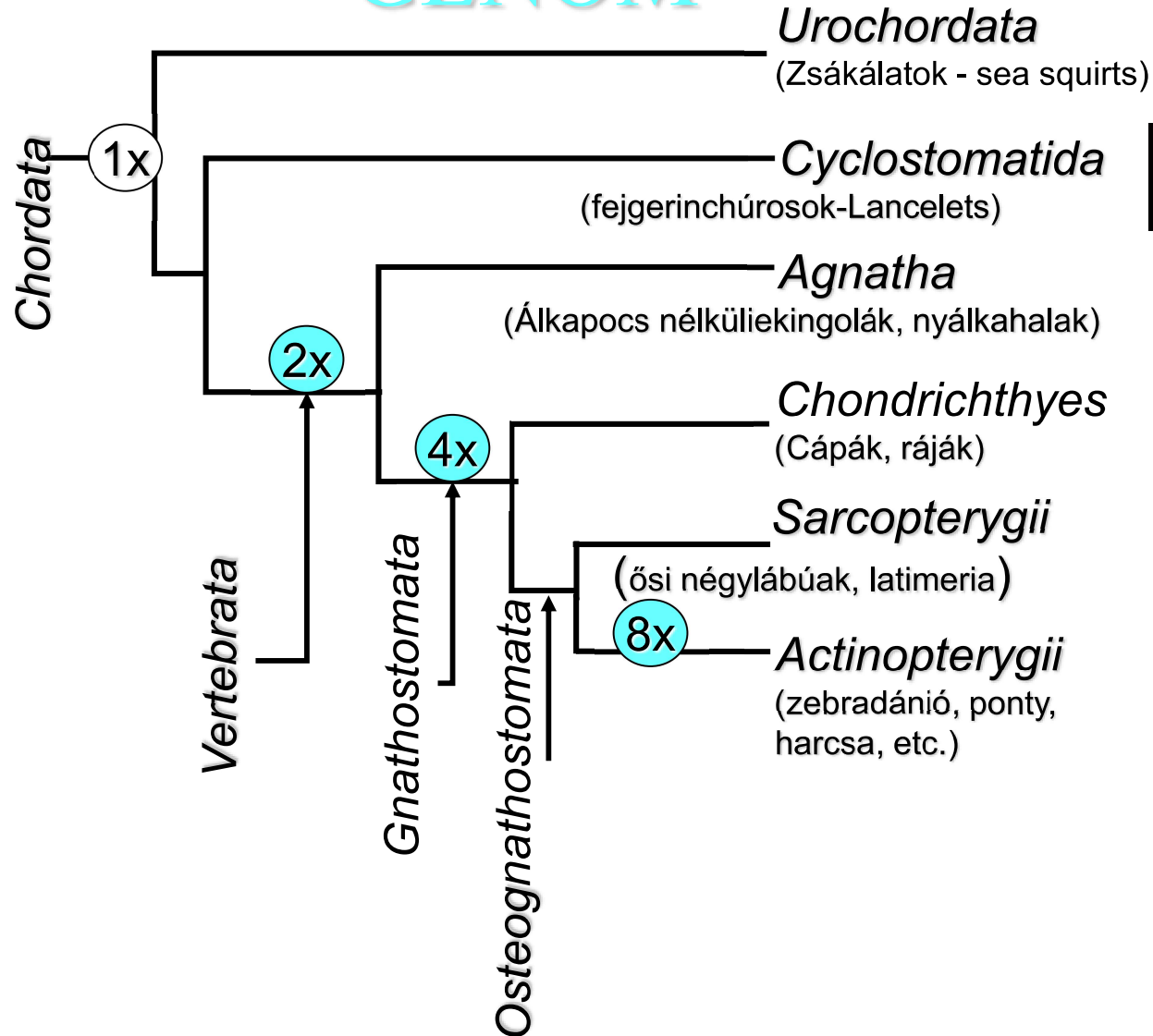
•*Chondrichthyes* (porcos halak– cápák, ráják)

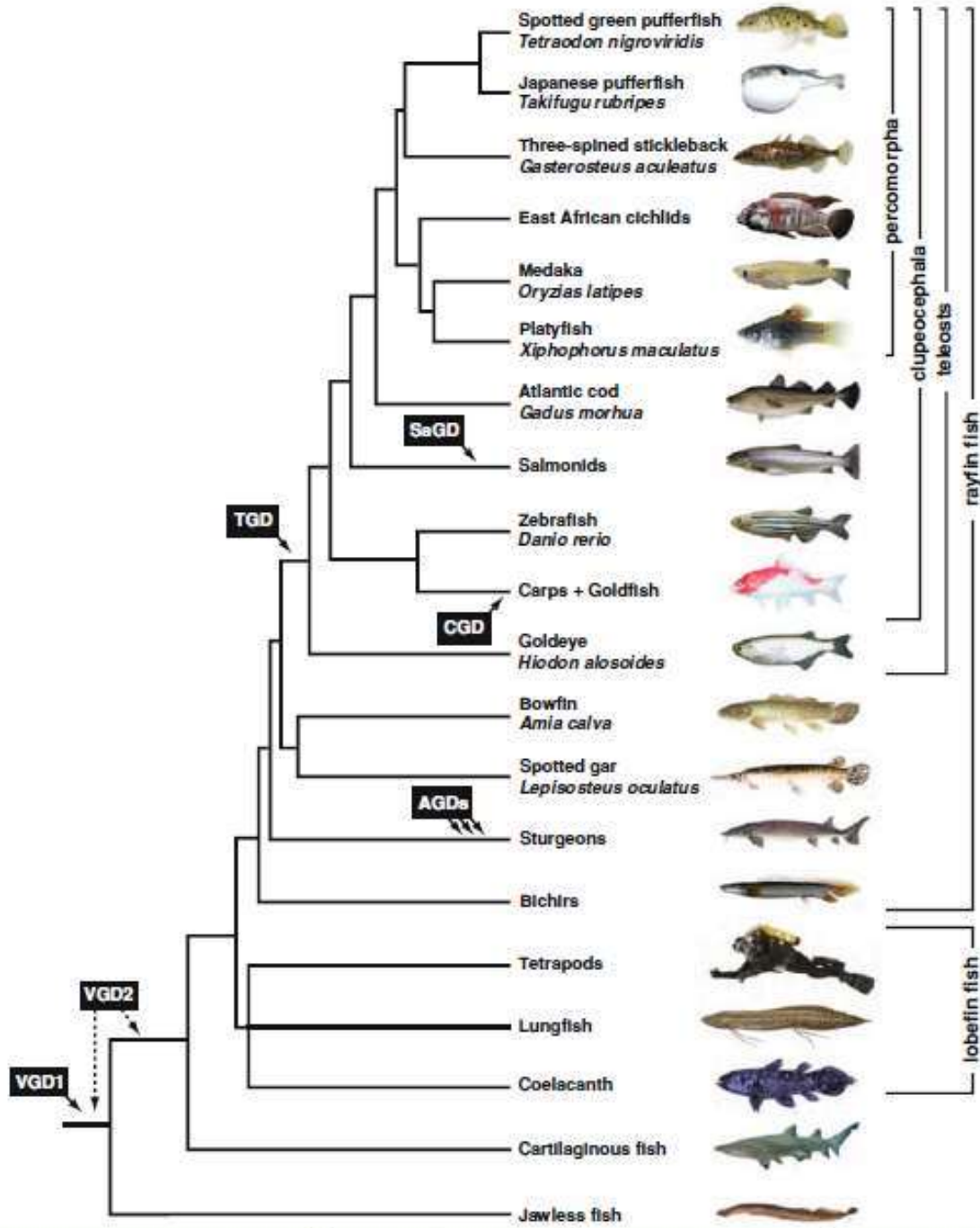
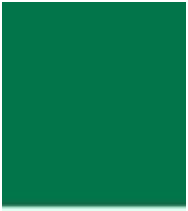
•*Osteichthyes* (csontos halak- ponty, zebra-dánió)



Genom duplikációk halaknál

GENOM

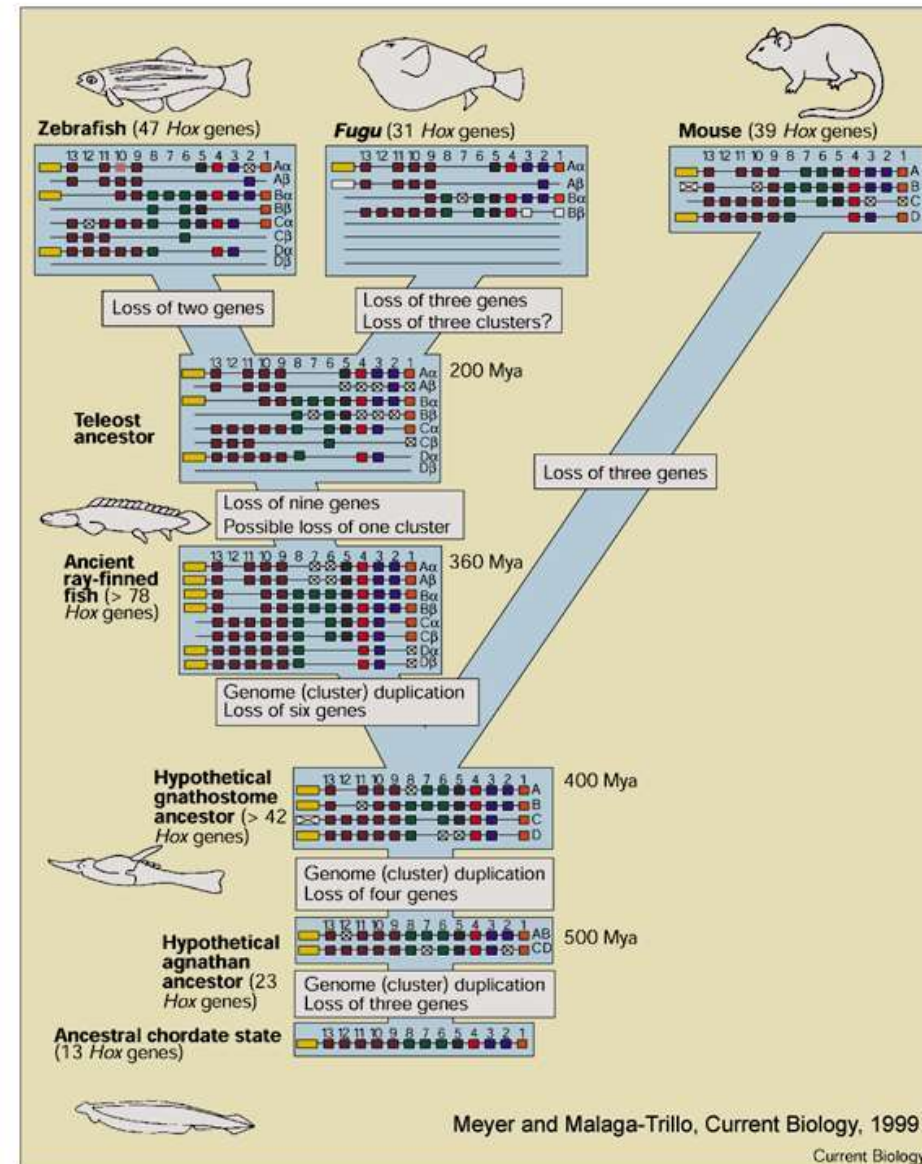




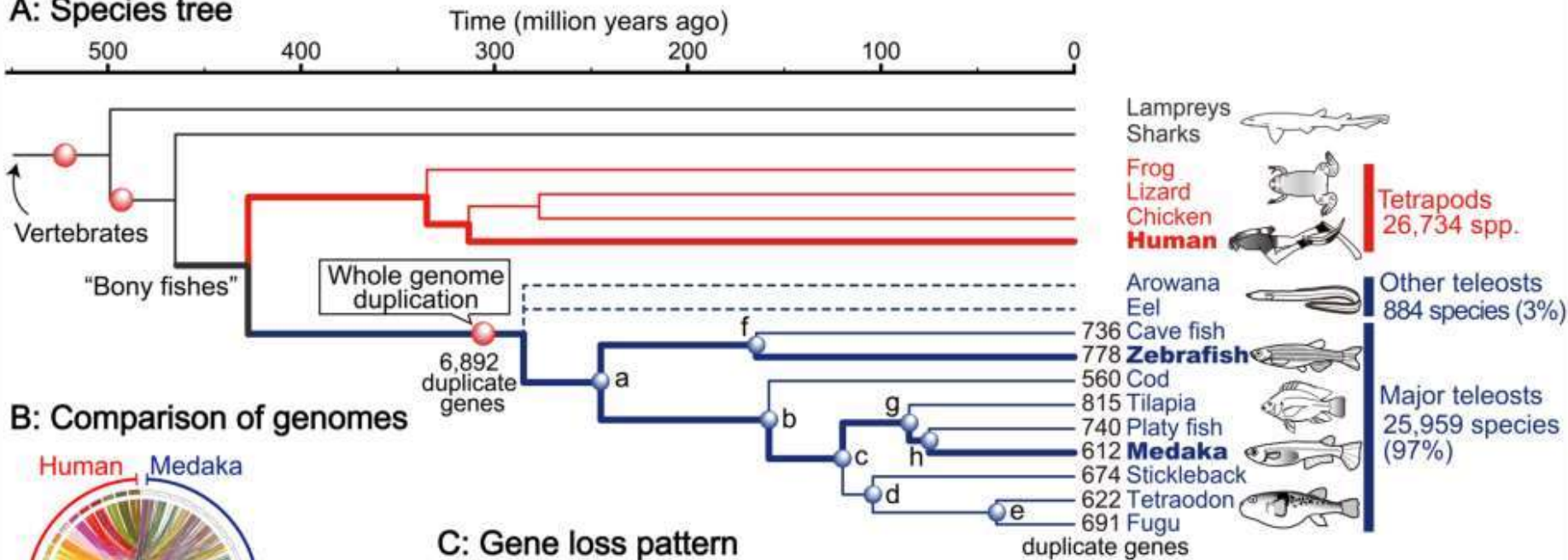
Halak genetikai háttere

A halaknak több génje van?

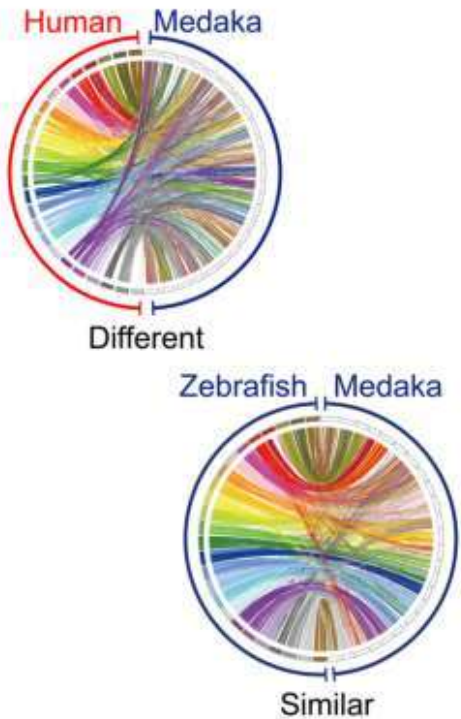
A HOX gének és klaszterek változása az evolúció során



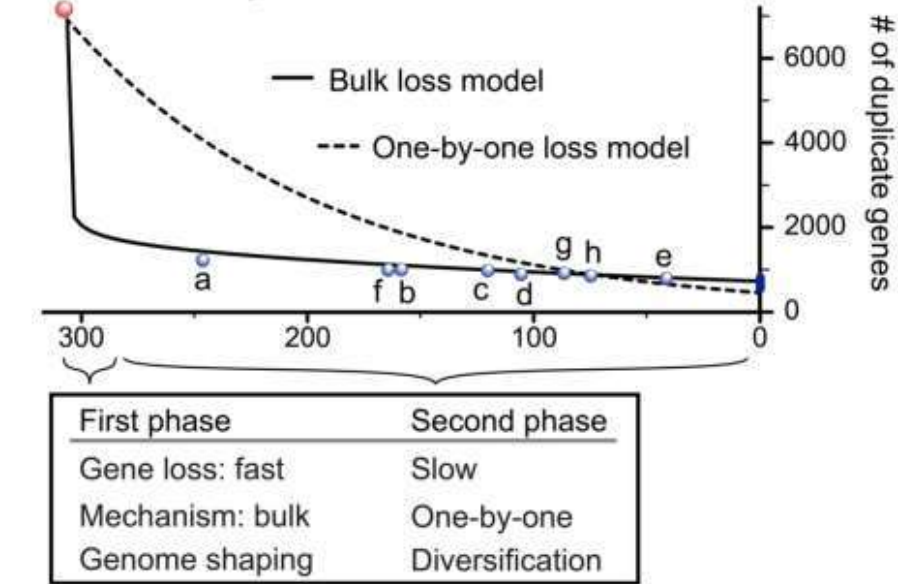
A: Species tree



B: Comparison of genomes



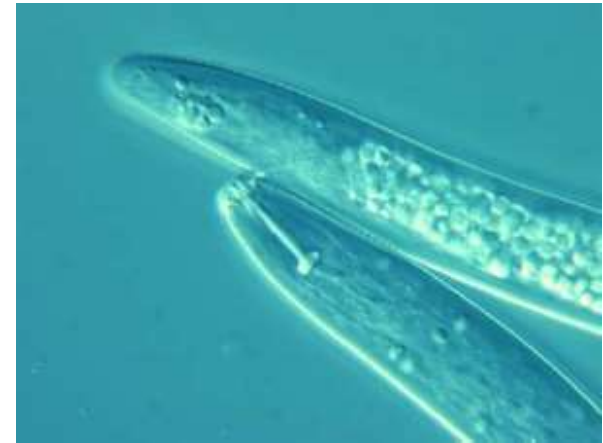
C: Gene loss pattern



Genomok mérete 1.

A legkisebb állati genom mérete :0.02pg

Növényi parazita nemtóda
(*Pratylenchus coffeae*),



Az emberi genom mérete: 3.5pg

(*Homo sapiens*)



Genomok mérete 2.

A legkisebb gerinces és hal genom mérete: 0.35pg

Zöld pöttyös bőröndhal
(*Tetraodon fluviatilis*)

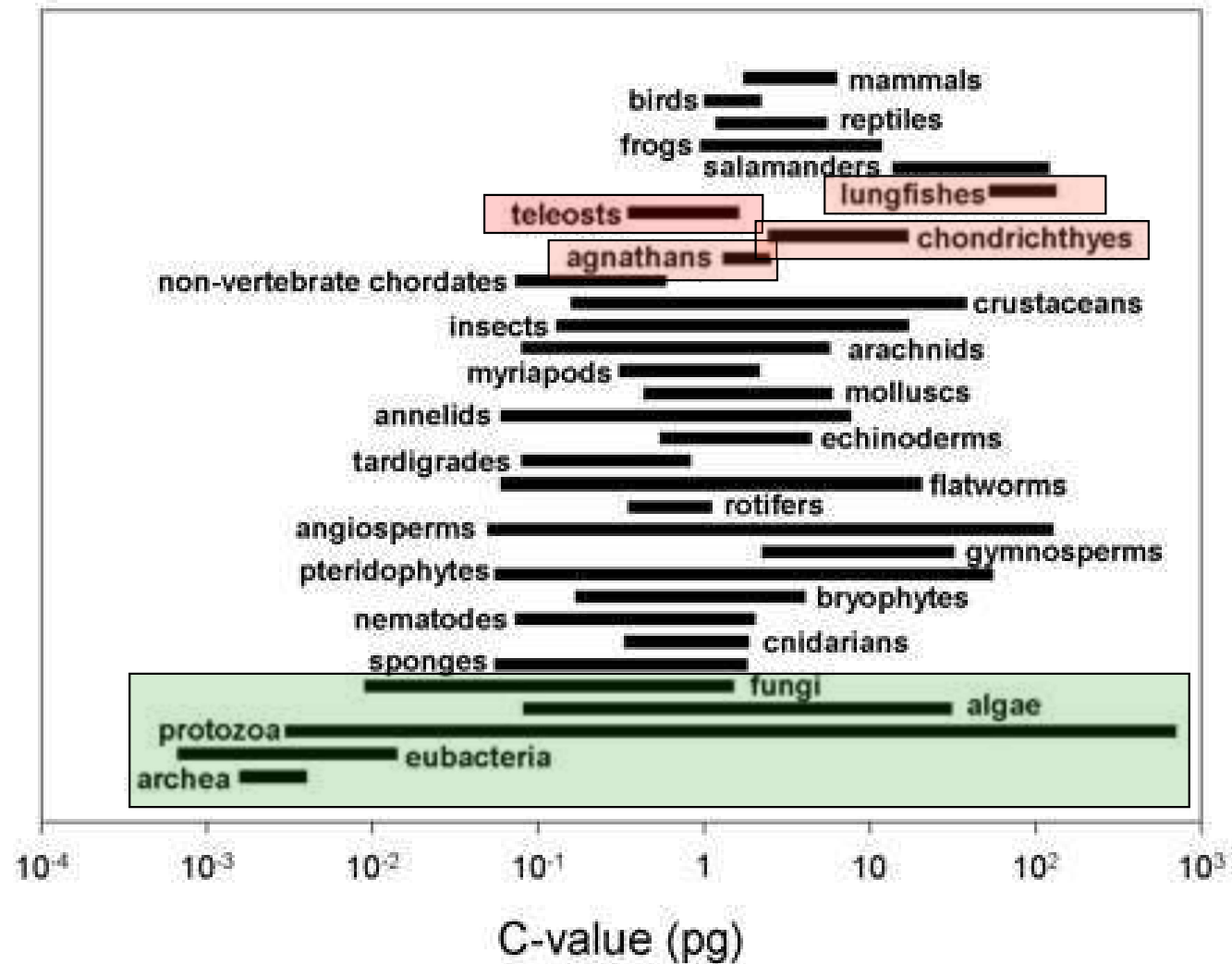


A legnagyobb állati genom és hal genom mérete: 132.83pg

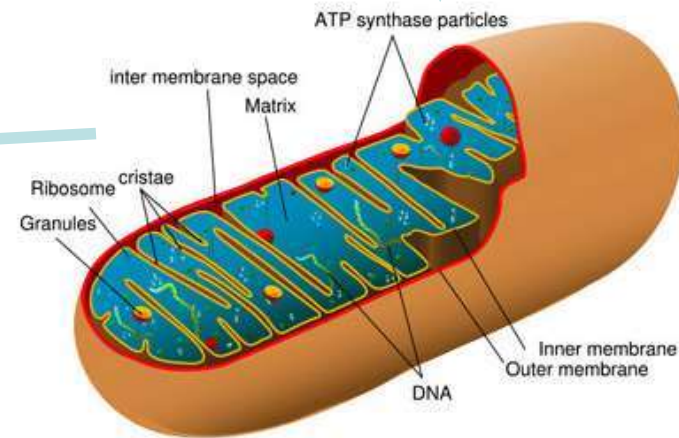
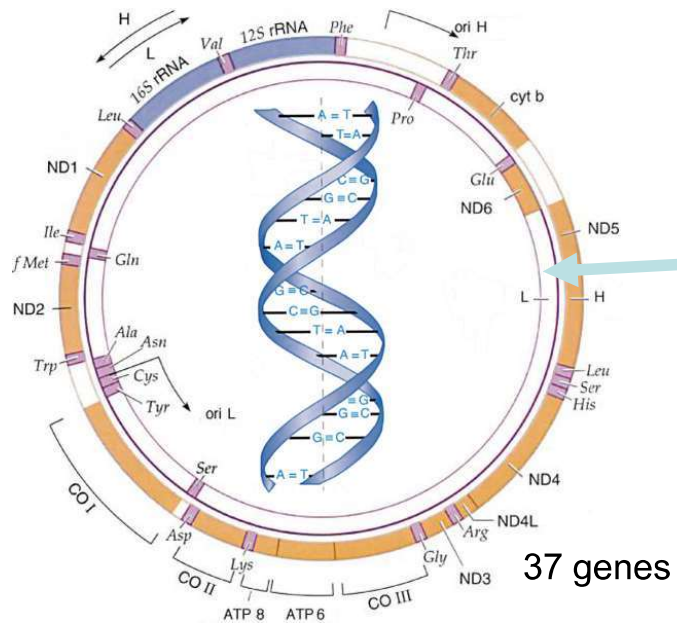
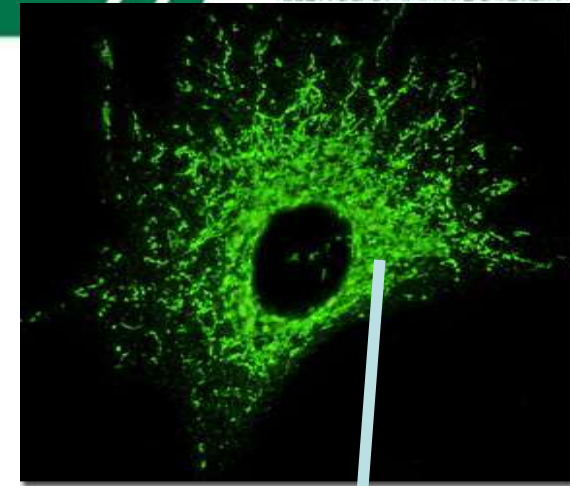
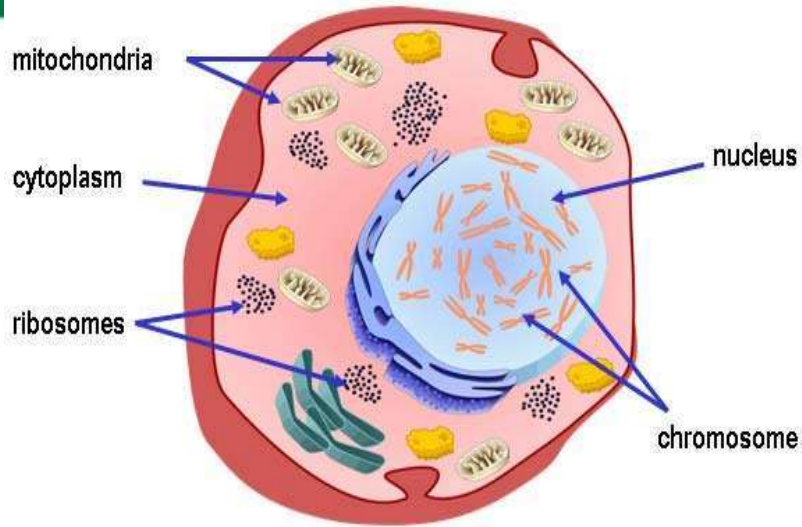
Márványos tüdőshal
(*Protopterus aethiopicus*)



Genomok mérete 3.



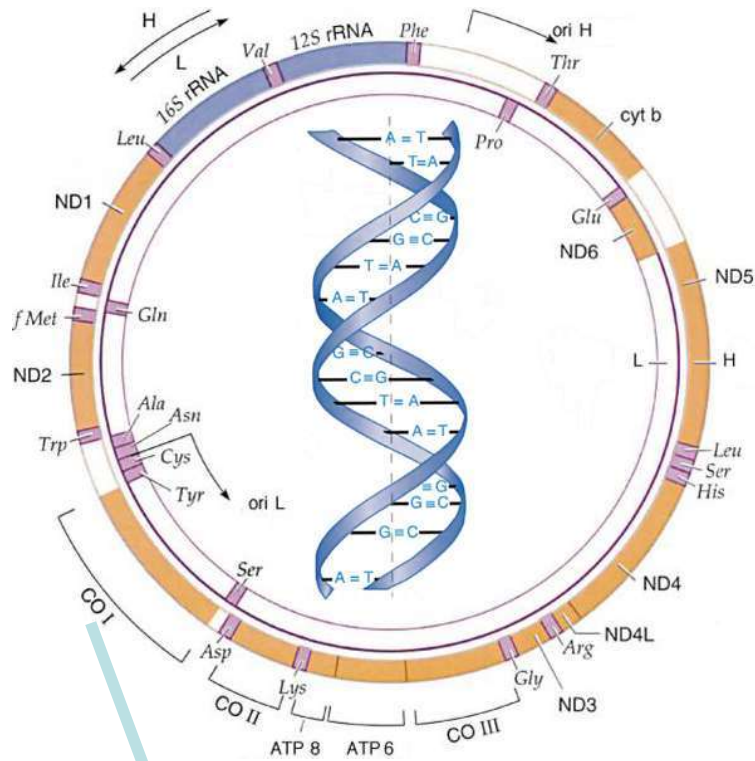
Mitokondriális DNS 1.



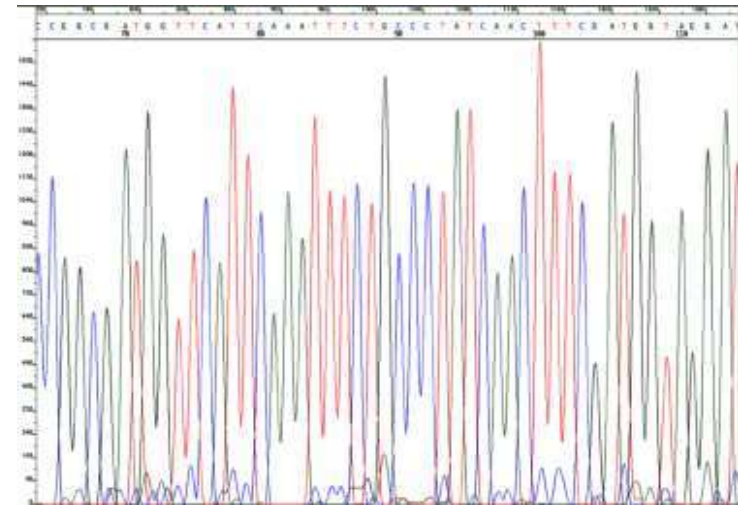
Mitokondriális DNS 2.

- Több ezer mitokondrium per sejt
- Sejtmagtól független másolás
- Kör alakú molekula
- Anyai öröklődés menet
- Nincs rekombináció
- Kis méret/16-17 ezer bp (egy bakteriális genom1%-a)
- 37 db gén

Bárkódolás 1.



Szekvenálás



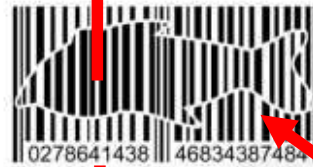
Faj azonosítás



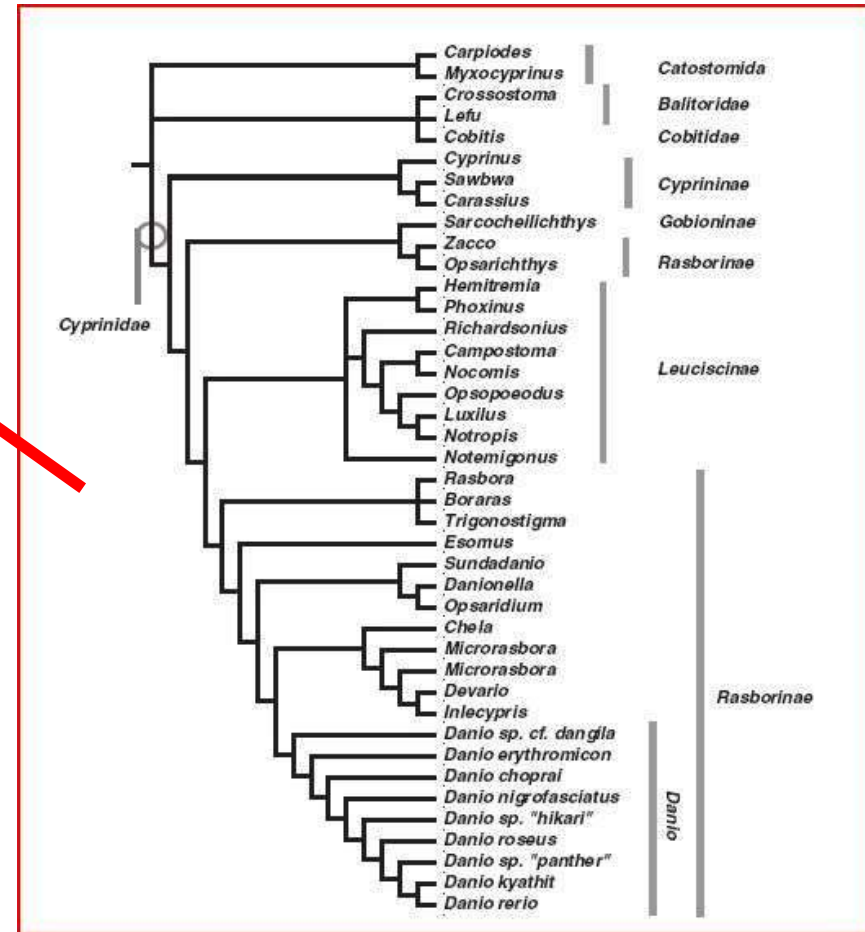
Cytochrome oxidase I

Bárkódolás 2.

Faj azonosítás



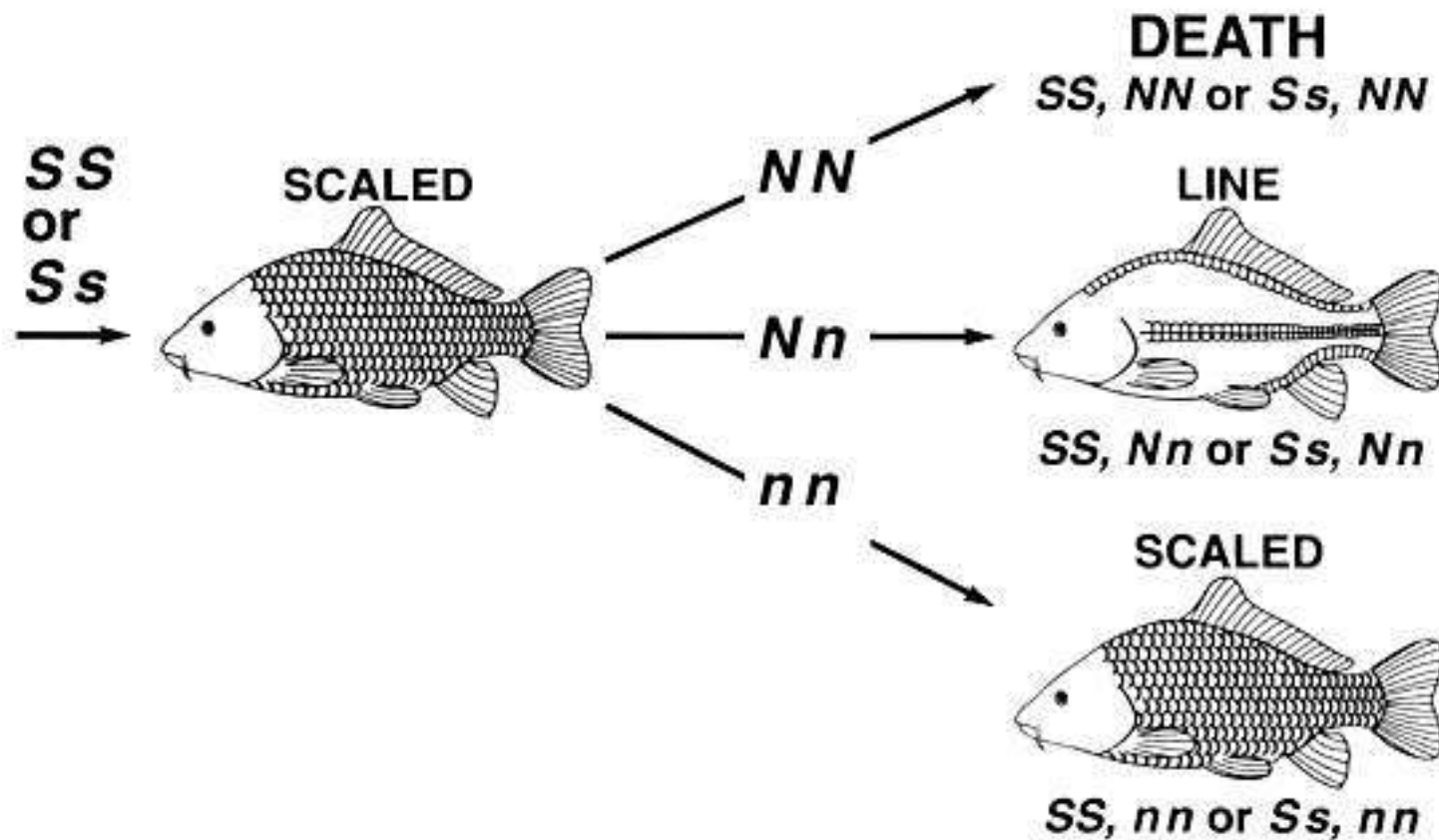
Szekvencia adatbázis
5403 faj bárkódja
elérhető



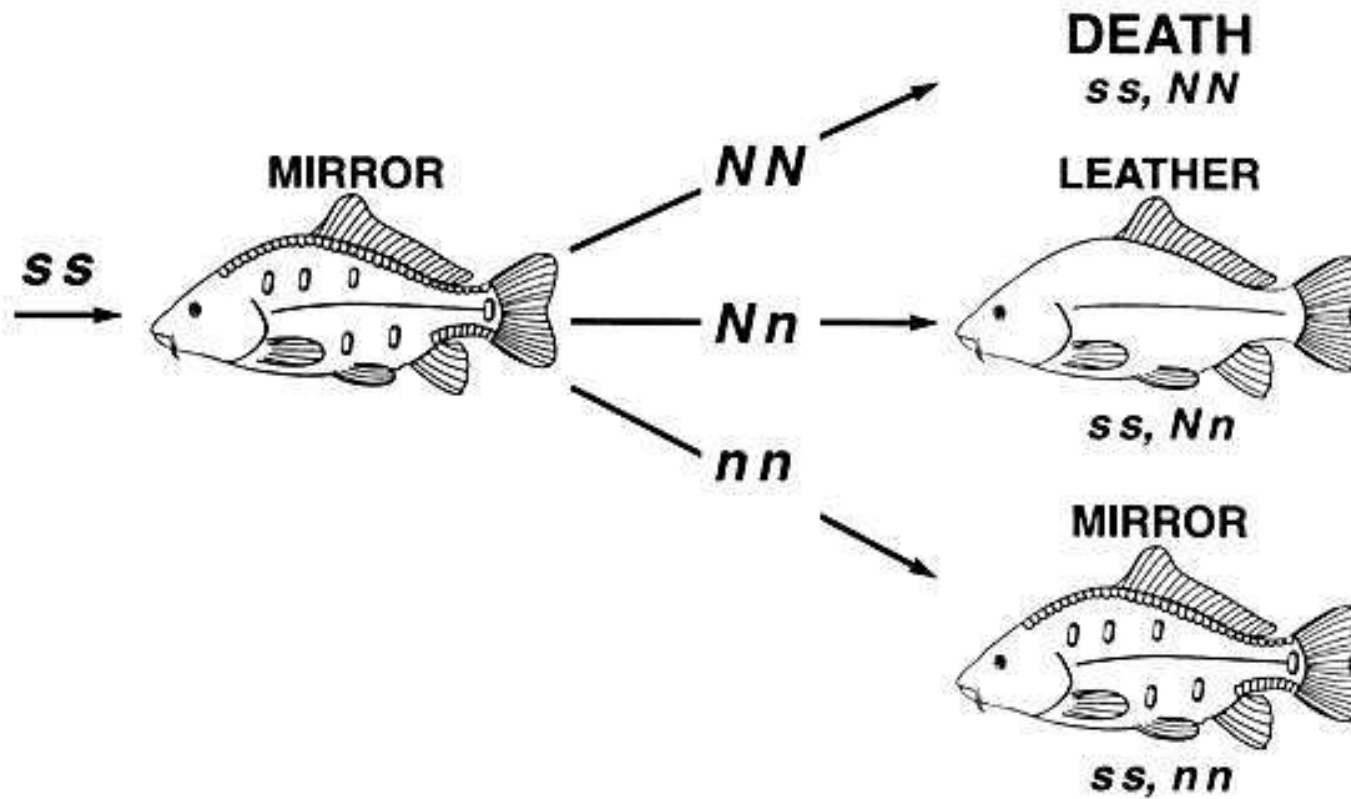
Taxonomy

<http://www.fishbol.org/>

Kumulatív, Episztatikus, Pleiotrop gén hatás



Kumulatív, Episztatikus, Pleiotropil gén hatás

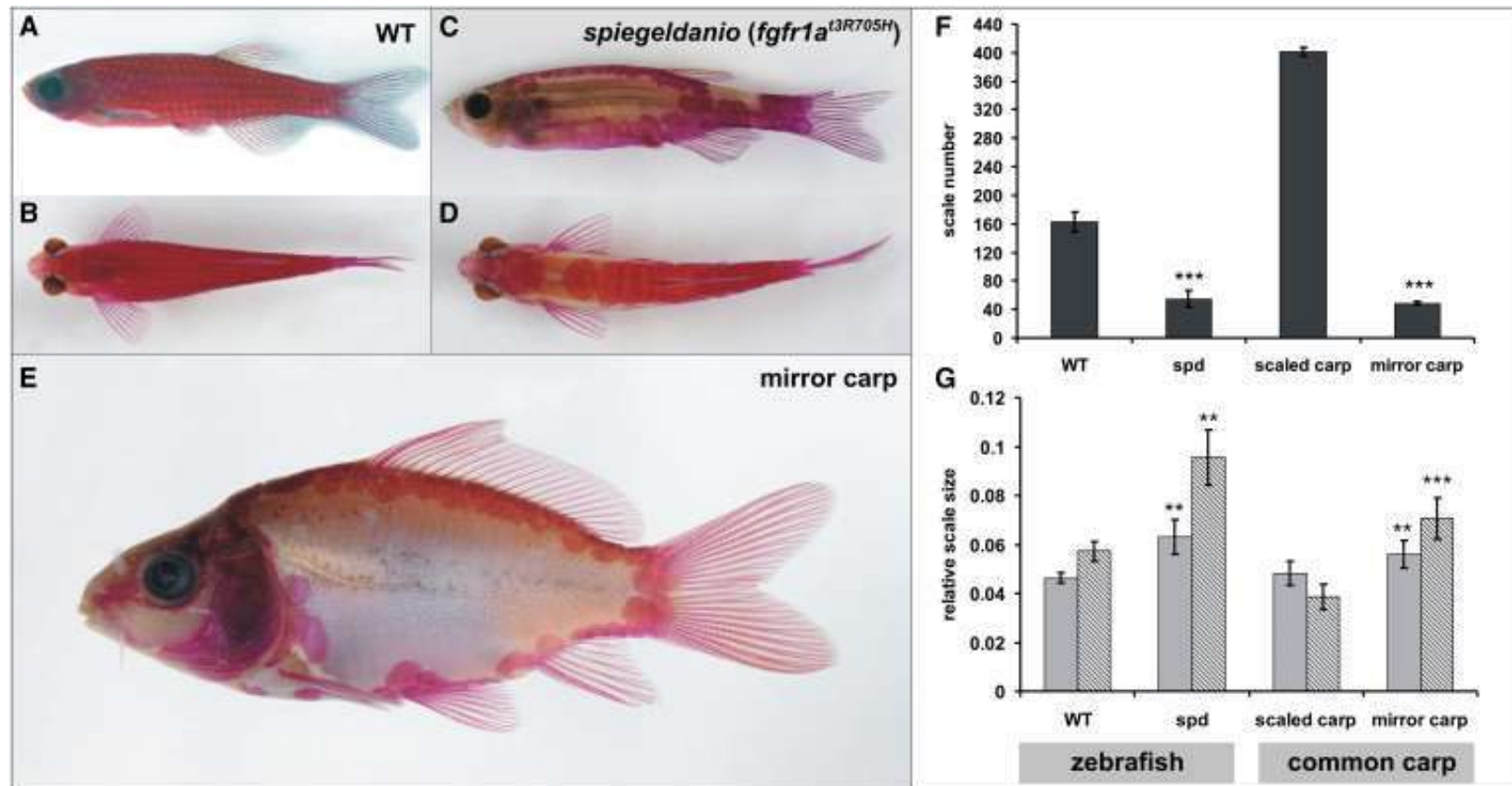


Duplication of *fgfr1* Permits Fgf Signaling to Serve as a Target for Selection during Domestication

Nicolas Rohner, Miklós Bercsényi, László Orbán,

Maria E. Kolanczyk, Dirk Linke, Michael Brand, Christiane Nüsslein-Volhard,

Fibroblast growth factor receptor 1



Duplication of *fgfr1* Permits Fgf Signaling to Serve as a Target for Selection during Domestication

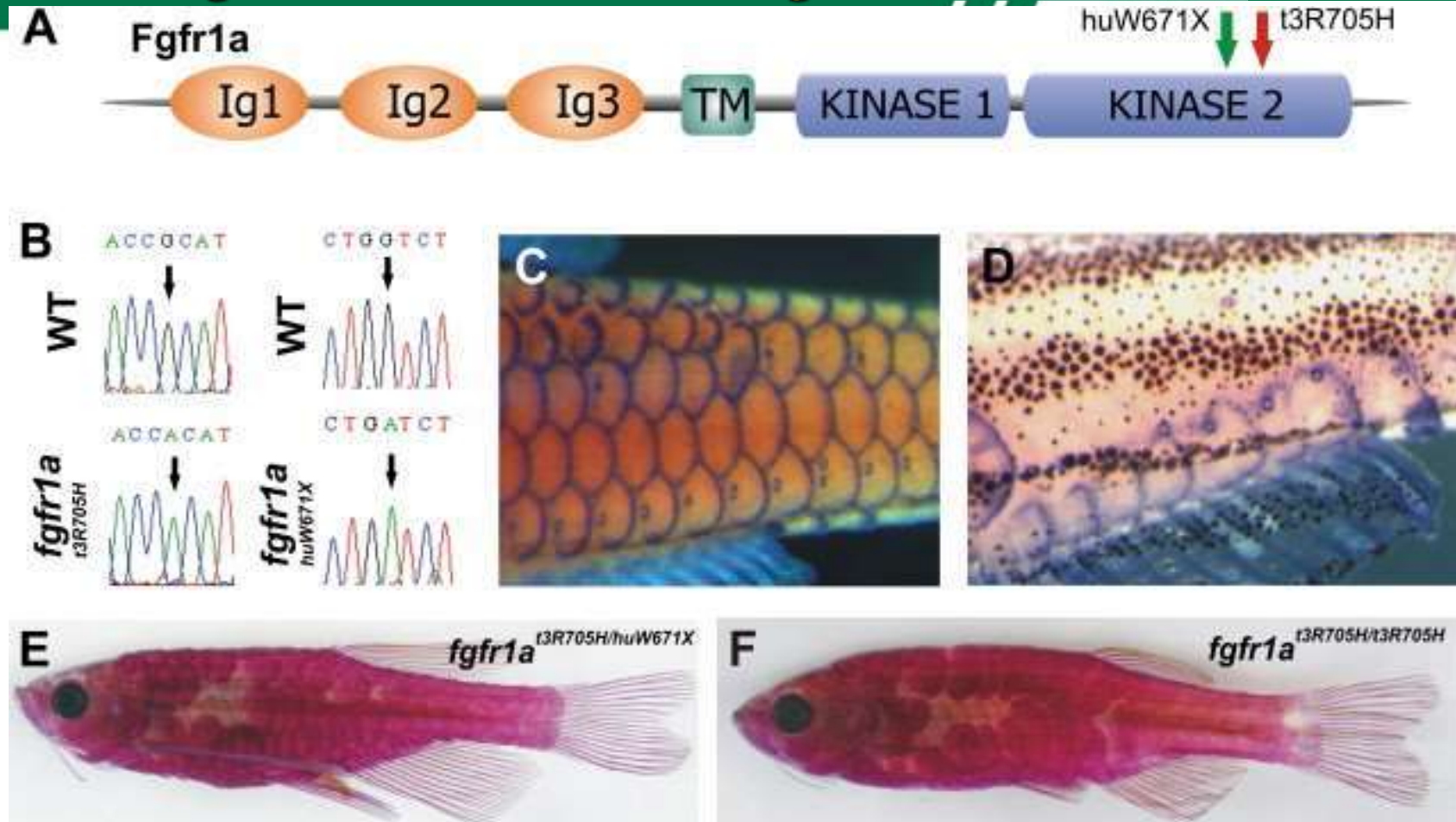
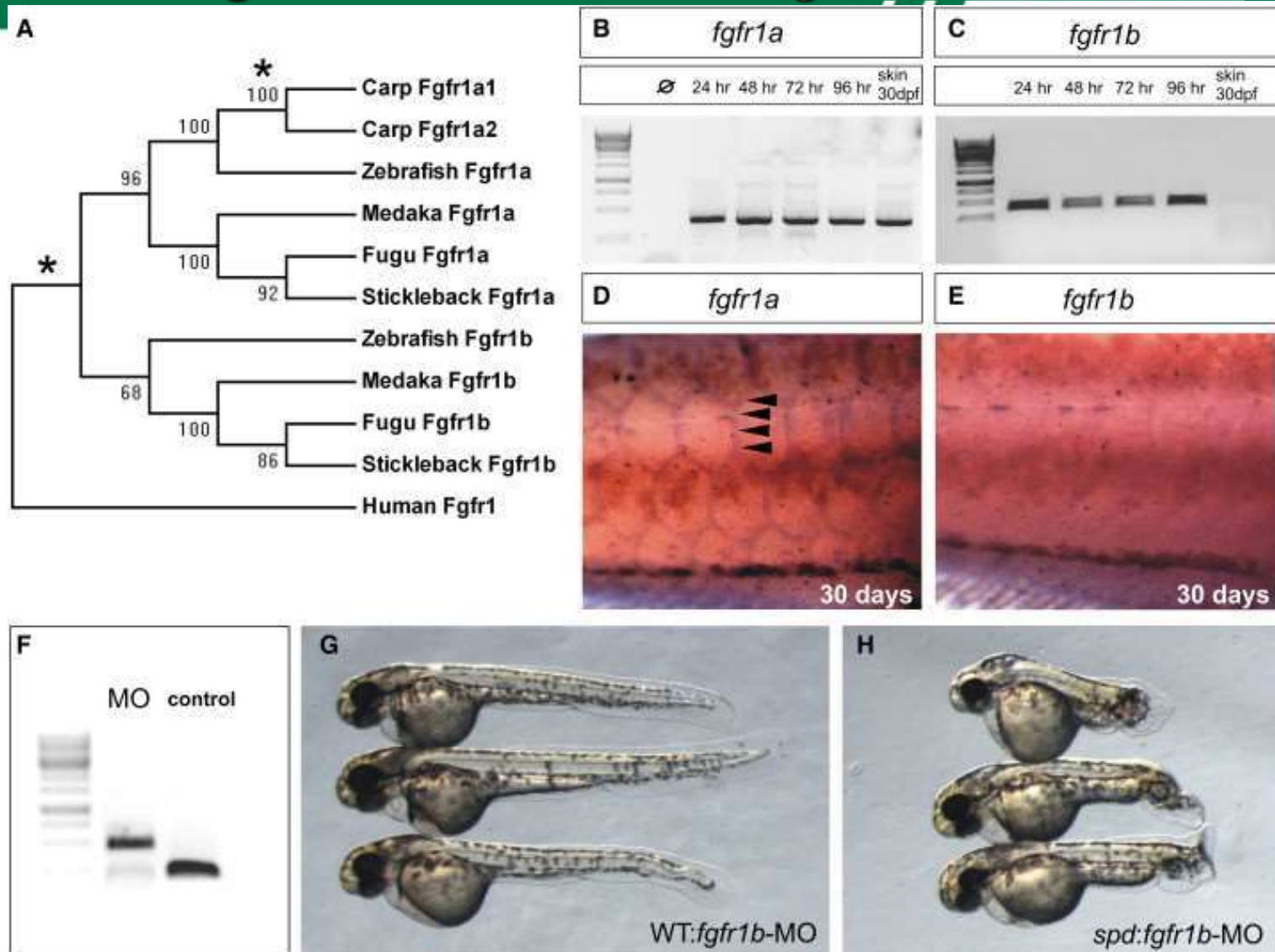


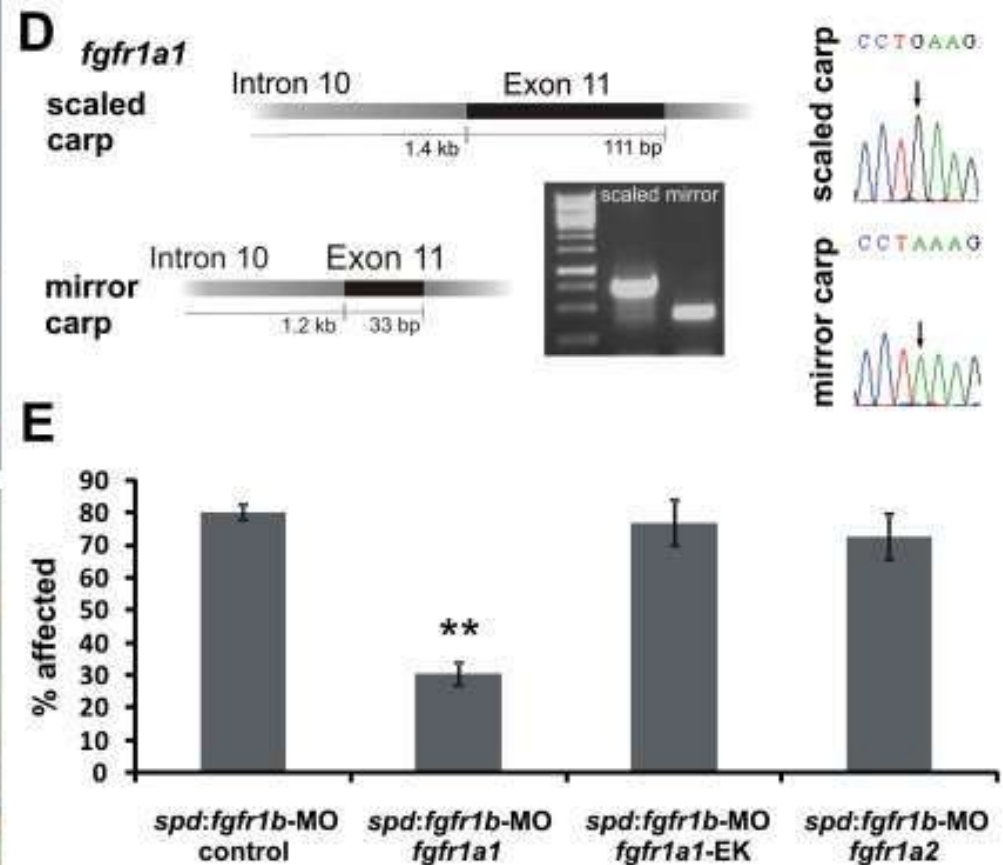
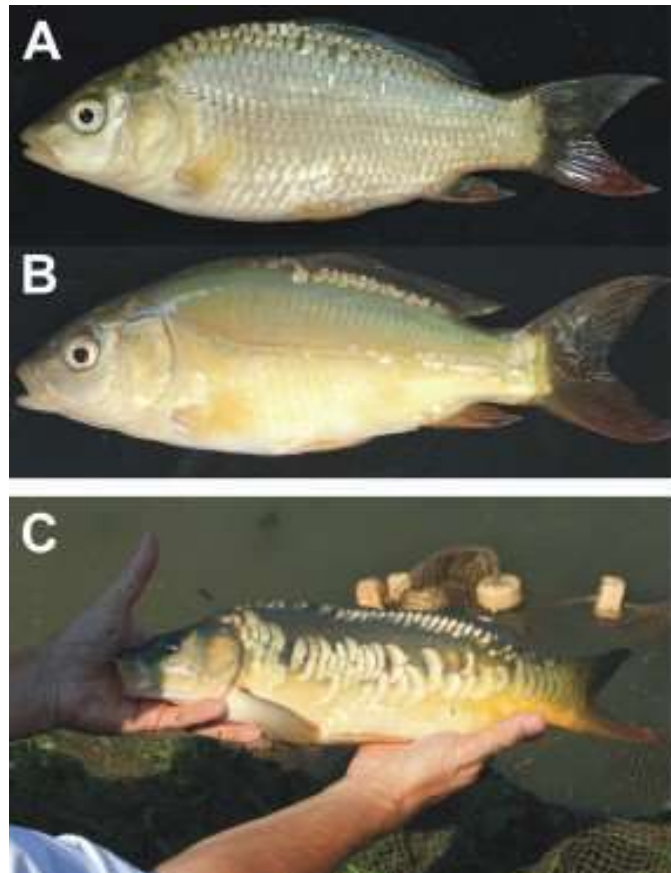
Figure 2. A Mutation in *fgfr1a* Causes the *spd* Phenotype (A) Schematic view of predicted *fgfr1a* structure and site of zebrafish mutations. (B) Nucleotide alteration in *fgfr1a*^{t3R705H} and *fgfr1a*^{huW671X}. (C and D) *fgfr1a* expression in the developing scales and lateral-line organs in wild-type fish (C) and in remaining scales of *spd* fish (D) (both 10 mm standard length). (E and F) Phenotype of transheterozygous

Duplication of *fgfr1* Permits Fgf Signaling to Serve as a Target for Selection during Domestication



20% of zebrafish genes that exist as a single copy in mammals

Duplication of *fgfr1* Permits Fgf Signaling to Serve as a Target for Selection during Domestication





Halak ivardeterminációja 1.

Hermafroditizmus

Protandrous

Először hím ivarúvá fejlődik, majd nőivarúvá alakul át,

Protogynous

Először nőivarúvá fejlődik, majd hím ivarúvá alakul át,

Szinkronizált

A két ivarszerv egyszerre működik egy egyedben



Premnas biaculeatus



Centropyge loriculus



Fundulus diaphanus

Szekvenciális
hermafroditizmus

Halak ivardeterminációja 2.

gonochorisztikus (Hímnős)

Az egyedek egy ivarral rendelkeznek életük során.

Az ivar kialakulást meghatározó faktorok:

Szociális tényezők

- kapcsolat domináns ivarú egyeddel

Környezeti tényezők

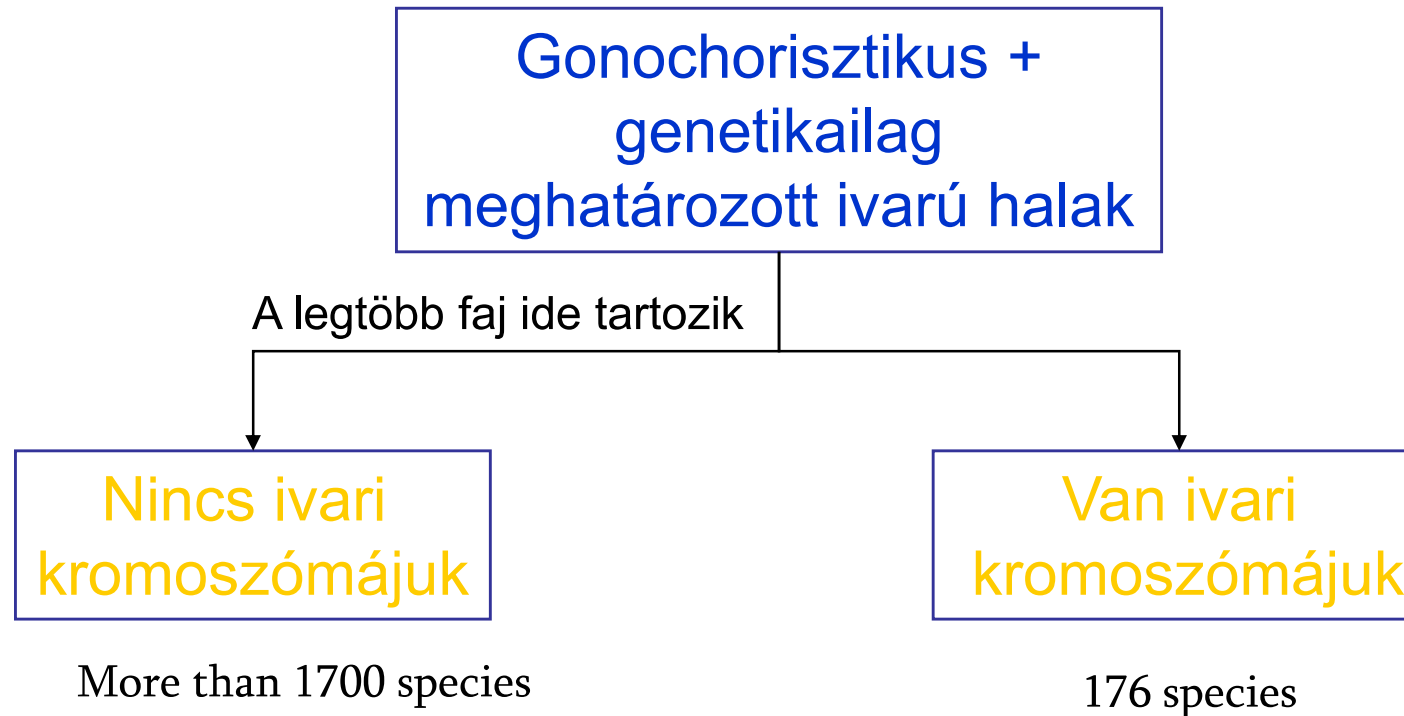
- Hőmérséklet (magasabb hőmérséklet több hím)
- pH (alacsonyabb pH több hím)

Genetikai tényezők (A legtöbb fajnál ez a döntő)



Mélytengeri
horgászhalak
(Anglerfish)

Halak ivardeterminációja 3.

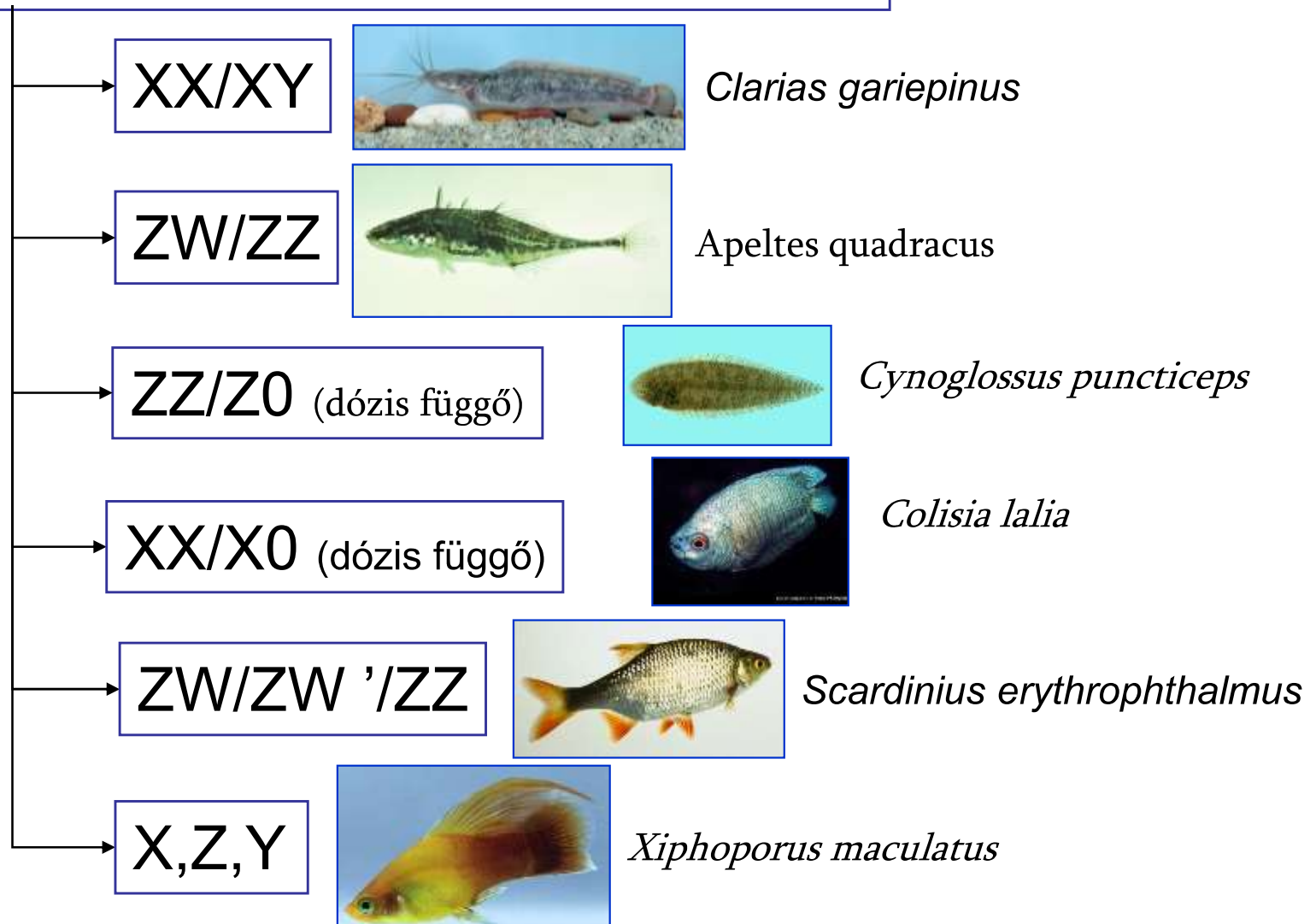


•(Devlin és Nagahama, 2002)

Sex determination of fish 4.

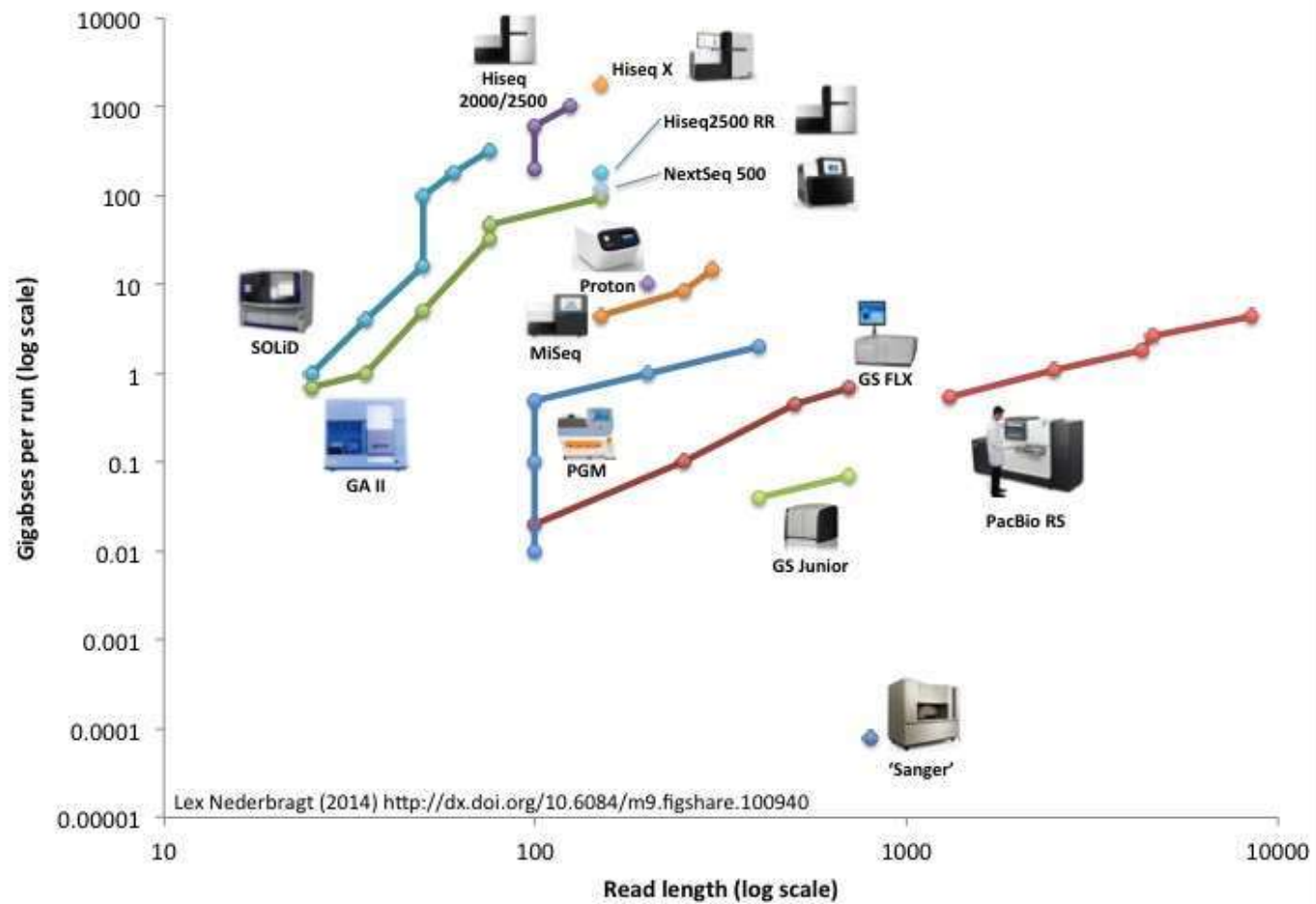
(Devlin és Nagahama, 2002)

Ivari kromoszóma rendszerek típusai





Developments in High Throughput Sequencing



Genome Analysis

de novo sequencing
resequencing
ChIP sequencing
metagenome sequencing

Targeted Analysis

exome sequencing
custom targeted sequencing
sequencing of amplicons and
genomic fragments

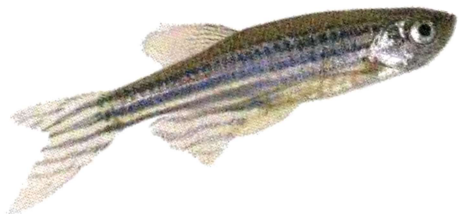
Transcriptome Analysis

mRNA sequencing: poly-A selection
RNA sequencing: rRNA depletion
strand specific RNA seq
miRNA & small RNA sequencing
deepCAGE / NanoCAGE sequencing



Fugu (*Takifugu rubripes*) 2002

Green Spotted pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*) 2004



Zebrafish (*Danio rerio*) 2005

Medaka (*Oryzias latipes*) 2007





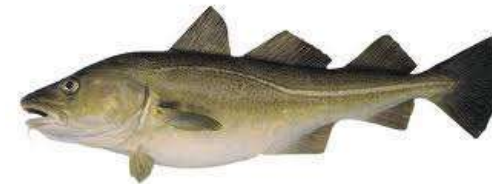
Strickleback (*Gasterosteus aculeatus*)

Lamprey (*Petromyzon marinus*)



Coelacanth (*Latimeria chalumnae*)

Atlantic cod (*Gadus morhua*),



Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Spotted gar (*Lepisosteus oculatus*)

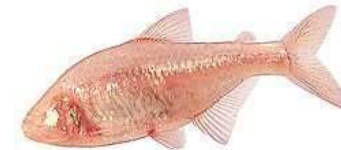


Amazon molly (*Poecilia formosa*)



Platyfish (*Xiphophorus maculatus*)

Cave fish (*Astyanax mexicanus*)



Ponty (*Cyprinus carpio*)

Szivárványos pisztráng
(*Oncorhynchus mykiss*)



Fish Genom programs 2.



Genome Browser.

www.ensembl.org

	Zebrafish	FUGU	Medaka	Stickleback	Tetraodon
Gene build:	2007	2005	2005	2006	2007
protein-coding genes:	17 330	133	509	71	99
Projected protein-coding genes:	1 627	13762	13 893	15 143	13 772
Novel protein-coding genes:	2 365	3 728	5 284	5 573	5 731
Pseudo-genes:	98	162	1	52	147
RNA genes:	4 126	571	512	1 468	498
Genscan gene predictions:	45 287	29 699	123 380	44 884	23 832
Gene exons:	232 290	321 943	220 743	245 824	220 724
Gene transcripts:	31 841	48 027	24 662	27 629	23 289
Base Pairs:	1 527 000 581	393 312 790	700 369 883	446 627 861	342 419 788

1-3% coding region

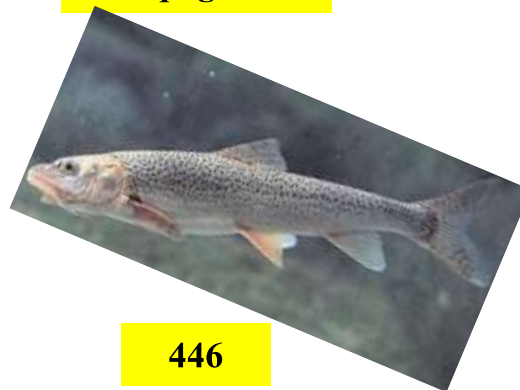
K value padoxes

*Acipenser
brevirostrum*



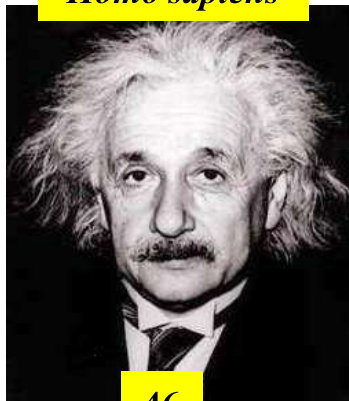
362
to
372

*Ptychobarbus
dipogon*



446

Homo sapiens



46

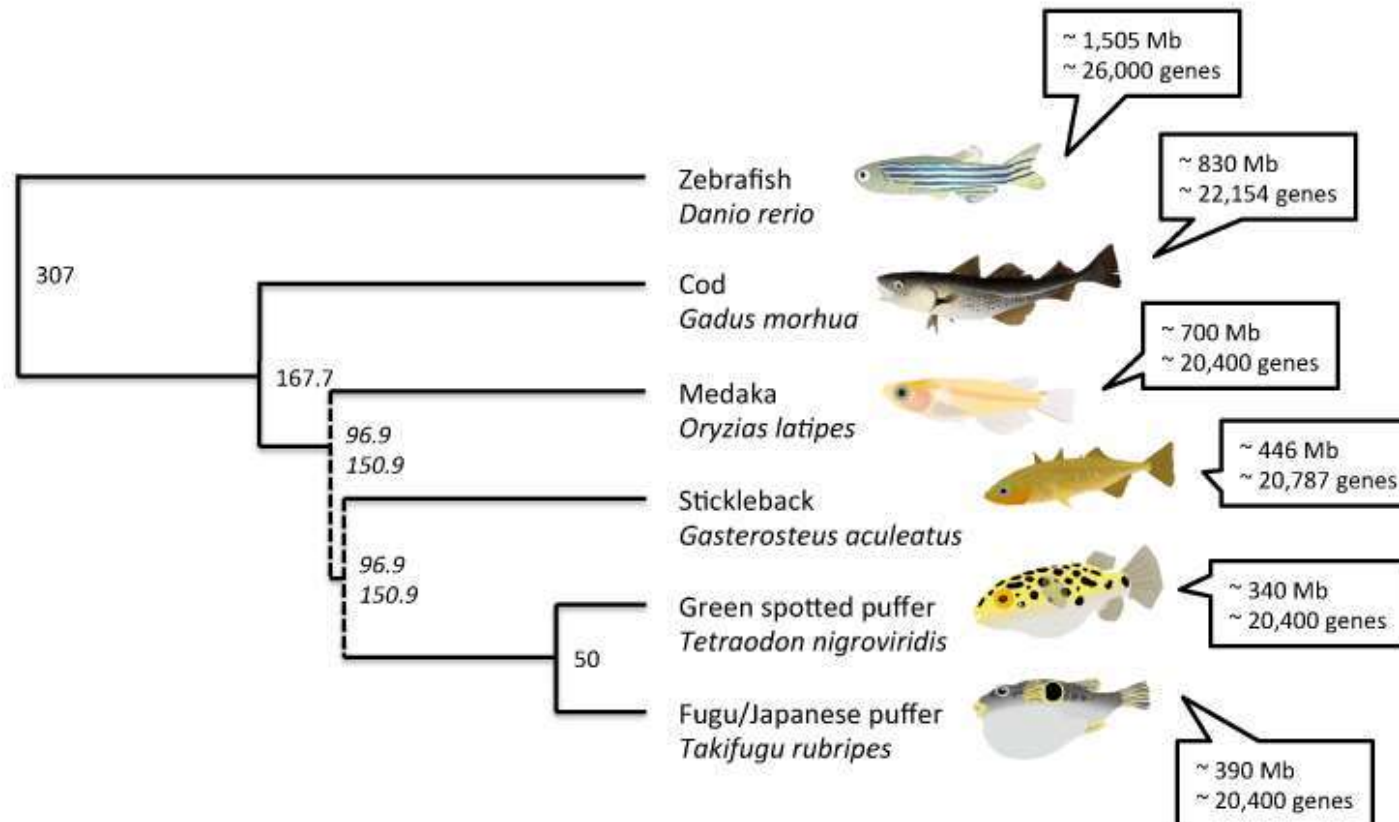
*Notothenia
neglecta*



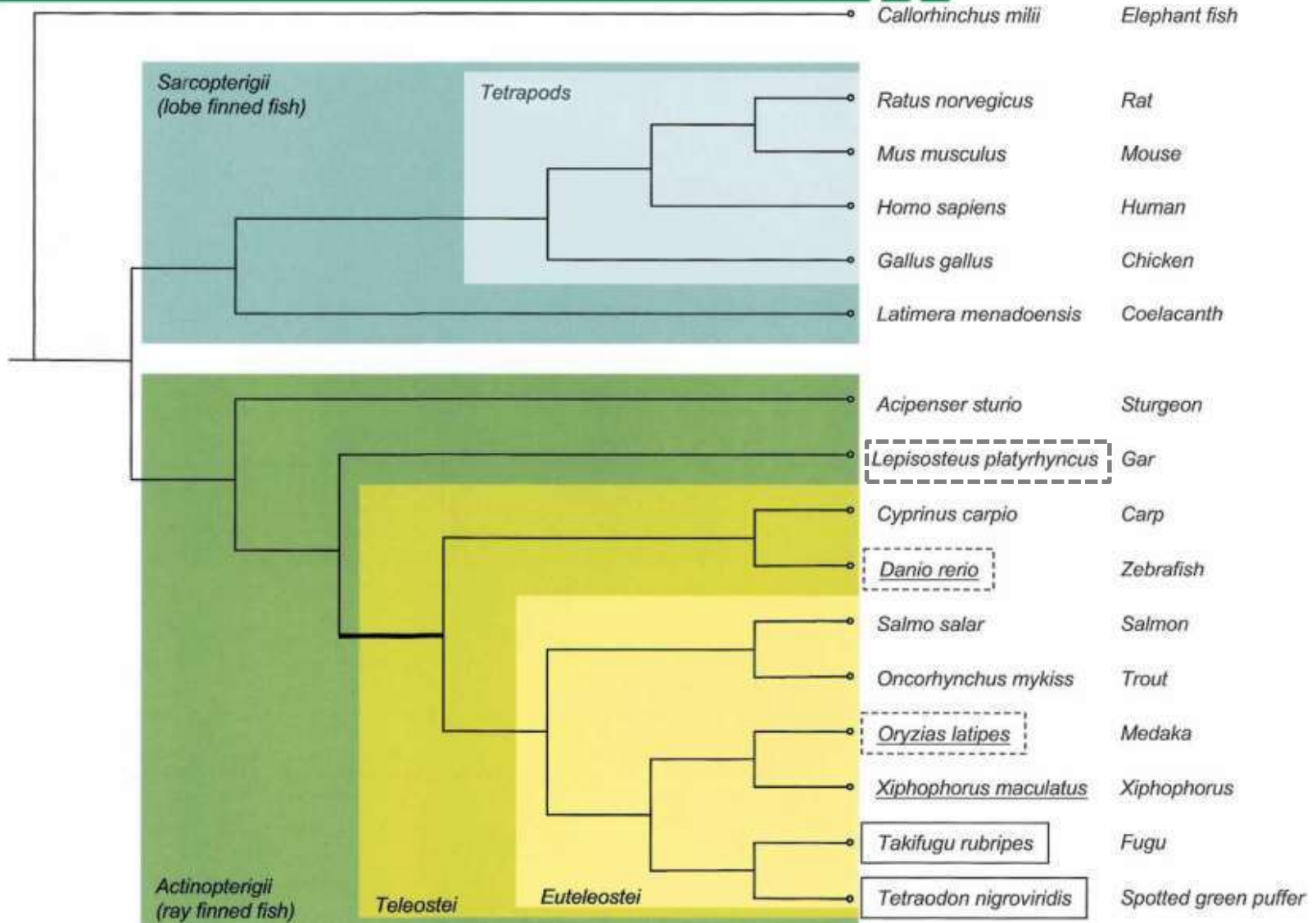
22

g value paradoxes

The number of the genes are not correlate with the complexity level (number of the cells and cell types) of the species



Aquatic Genome programs 4.



2017 ELÉRHETŐ HAL GENOMOK

1 Cyprinus carpio	27 <i>Lethenteron camtschaticum</i>	52 <i>Notothenia coriiceps</i>
2 <i>Cyprinodon nevadensis</i>	28 <i>Xiphophorus couchianus</i>	53 <i>Morone saxatilis</i>
4 <i>Callorhinchus milii</i>	29 <i>Clupea harengus</i>	54 <i>Lepisosteus oculatus</i>
5 <i>Miichthys miiuy</i>	30 <i>Xiphophorus hellerii</i>	55 <i>Pygocentrus nattereri</i>
6 <i>Sebastes nigrocinctus</i>	31 <i>Leuciscus waleckii</i>	56 <i>Sinocyclocheilus grahami</i>
7 <i>Sebastes rubrivinctus</i>	32 <i>Labrus bergylta</i>	57 <i>Scleropages formosus</i>
8 <i>Melanochromis auratus</i>	33 <i>Poecilia mexicana</i>	58 <i>Mola mola</i>
9 <i>Labeotropheus fuelleborni</i>	34 <i>Takifugu flavidus</i>	59 <i>Pundamilia nyererei</i>
10 <i>Mchenga conophoros</i>	35 Lates calcarifer	60 <i>Neolamprologus brichardi</i>
11 <i>Tetraodon nigroviridis</i>	36 <i>Scartelaos histophorus</i>	61 <i>Haplochromis burtoni</i>
12 <i>Cottus rhenanus</i>	37 Anguilla japonica	62 <i>Latimeria chalumnae</i>
13 <i>Squalius pyrenaicus</i>	38 <i>Thunnus orientalis</i>	63 Gadus morhua
14 <i>Sinocyclocheilus rhinoceros</i>	39 <i>Pimephales promelas</i>	64 <i>Nothobranchius kuhntae</i>
15 <i>Sinocyclocheilus anshuiensis</i>	40 <i>Austrofundulus limnaeus</i>	65 <i>Nothobranchius furzeri</i>
16 <i>Periophthalmodon schlosseri</i>	41 <i>Cyprinodon variegatus</i>	66 <i>Rhamphochromis esox</i>
17 <i>Periophthalmus magnuspinnatus</i>	42 <i>Stegastes partitus</i>	67 <i>Maylandia zebra</i>
18 <i>Pseudopleuronectes yokohamae</i>	43 <i>Astyanax mexicanus</i>	68 <i>Fundulus heteroclitus</i>
19 <i>Amphilophus citrinellus</i>	44 <i>Poecilia formosa</i>	69 <i>Oryzias latipes</i>
20 <i>Rhincodon typus</i>	45 <i>Anoplopoma fimbria</i>	70 Salmo salar
21 <i>Anguilla rostrata</i>	46 <i>Larimichthys crocea</i>	71 <i>Petromyzon marinus</i>
22 <i>Pampus argenteus</i>	47 <i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	72 Ictalurus punctatus
23 <i>Poecilia reticulata</i>	48 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	73 Oreochromis niloticus
24 <i>Kryptolebias marmoratus</i>	49 <i>Leucoraja erinacea</i>	74 <i>Gasterosteus aculeatus</i>
25 Esox lucius	50 <i>Anguilla anguilla</i>	75 Takifugu rubripes
26 <i>Poecilia latipinna</i>	51 Xiphophorus maculatus	76 Danio rerio

Species	Order	DNA/TcMar-Tc1	Microsatellites
<i>Esox lucius</i>	Esociformes	35.9%	4.8%
<i>Fundulus heteroclitus</i>	Cyprinodontiformes	22.6%	4.6%
<i>Xiphophorus hellerii</i>	Cyprinodontiformes	22.7%	5.1%
<i>Xiphophorus couchianus</i>	Cyprinodontiformes	22.3%	5.1%
<i>Amphilophus citrinellus</i>	Perciformes	23.0%	6.2%
<i>Xiphophorus maculatus</i>	Cyprinodontiformes	22.0%	6.2%
<i>Lepisosteus oculatus</i>	Lepisosteiformes	10.5%	3.0%
<i>Pundamilia nyererei</i>	Perciformes	18.7%	5.8%
<i>Haplochromis burtoni</i>	Perciformes	19.6%	6.1%
<i>Maylandia zebra</i>	Perciformes	16.8%	5.3%
<i>Neolamprologus brichardi</i>	Perciformes	20.9%	6.7%
<i>Cyprinodon nevadensis</i>	Cyprinodontiformes	7.6%	2.5%
<i>Poecilia formosa</i>	Cyprinodontiformes	19.3%	6.5%
<i>Oreochromis niloticus</i>	Perciformes	15.9%	5.4%
<i>Poecilia reticulata</i>	Cyprinodontiformes	17.8%	6.1%
<i>Poecilia mexicana</i>	Cyprinodontiformes	18.9%	6.7%
<i>Astyanax mexicanus</i>	Characiformes	21.8%	8.0%
<i>Poecilia latipinna</i>	Cyprinodontiformes	19.5%	7.4%
<i>Cyprinodon variegatus</i>	Cyprinodontiformes	8.2%	3.4%
<i>Oryzias latipes</i>	Beloniformes	5.0%	2.6%
<i>Ictalurus punctatus</i>	Siluriformes	19.9%	14.1%
<i>Danio rerio</i>	Cypriniformes	6.1%	5.9%
<i>Cyprinus carpio</i>	Cypriniformes	6.4%	7.1%
<i>Sinocyclocheilus grahami</i>	Cypriniformes	4.7%	5.7%
<i>Sinocyclocheilus rhinoceros</i>	Cypriniformes	3.4%	6.0%
<i>Sinocyclocheilus anshuiensis</i>	Cypriniformes	3.2%	6.2%
<i>Pimephales promelas</i>	Cypriniformes	3.1%	6.7%
<i>Cottus rhenanus</i>	Scorpaeniformes	0.9%	17.8%
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Tetraodontiformes	1.3%	31.1%

Freshwater species

Species	Order	DNA/TcMar-Tc1	Microsatellites
<i>Salmo salar</i>	Salmoniformes	23.6%	7.5%
<i>Anguilla anguilla</i>	Anguilliformes	11.9%	11.4%
<i>Anguilla rostrata</i>	Anguilliformes	11.8%	13.9%
<i>Thunnus orientalis</i>	Perciformes	3.6%	9.3%
<i>Pampus argenteus</i>	Perciformes	5.6%	15.2%
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Gasterosteiformes	4.1%	12.8%
<i>Miichthys miiuy</i>	Perciformes	4.0%	14.7%
<i>Notothenia coriiceps</i>	Perciformes	2.3%	9.5%
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Perciformes	2.4%	11.9%
<i>Larimichthys crocea</i>	Perciformes	3.4%	17.7%
<i>Takifugu rubripes</i>	Tetraodontiformes	3.3%	19.9%
<i>Sebastes nigrocinctus</i>	Scorpaeniformes	1.1%	8.9%
<i>Cynoglossus semilaevis</i>	Pleuronectiformes	2.7%	23.1%
<i>Takifugu flavidus</i>	Tetraodontiformes	2.4%	21.8%
<i>Sebastes rubrivinctus</i>	Scorpaeniformes	1.0%	9.1%
<i>Clupea harengus</i>	Clupeiformes	3.0%	29.8%
<i>Latimeria chalumnae</i>	Coelacanthiformes	0.0%	1.7%
<i>Gadus morhua</i>	Gadiformes	0.4%	31.4%

Diadromous species

Marine species

Cyprinodon nevadensis



Miichthys miiuy



Melanochromis auratus



Sebastes nigrocinctus



Sebastes rubrivinctus



Labetroncheus fuellborni



Cottus rhenanus



Squalius pyrenaicus



Sinocyclocheilus rhinoceros



Sinocyclocheilus anshuiensis





Astatotilapia burtoni

Tilapia Cichlid



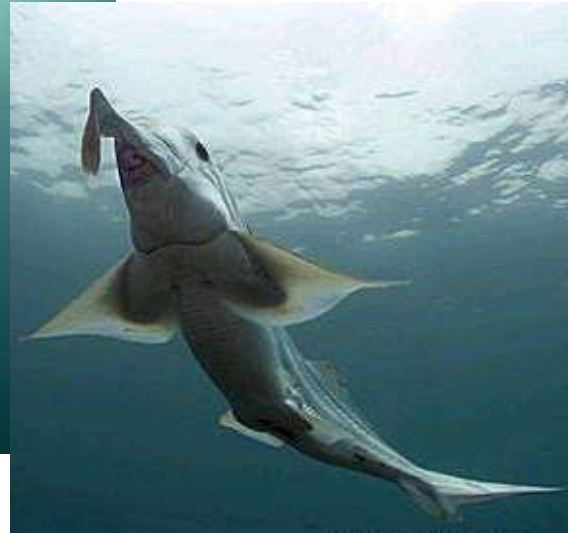
Zebra mbuna
(*Maylandia zebra*)



Mchenga conophoros



Pundamila nyererei



(Callorhinchus milii)

Venkatesh et al. 2005. *Curr. Biol.* 15: R82-R83

<http://esharkgenome.imcb.a-star.edu.sg/>





Atlanti lazac
(*Salmo salar*)





Pettyes (csatorna) harcsa
(*Ictalurus punctatus*)





Little skate
(*Leucoraja erinacea*)



Aquatic Genome programs 5.



2009

Cél: 10 000 gerinces genom

4000 hal genom

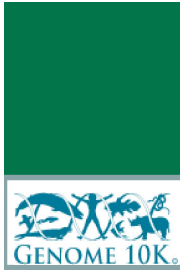
•Bernardia et. al.: **The fishes of Genome 10K** Mar.Genomics,

Genome 10K 2010 Vol. 75 No. 2



Aquatic Genome programs 5.

1	<i>Carcharodon carcharias</i>	Great white shark	Alopiidae	Lamniformes
2	<i>Polypterus senegalus</i>	Bichir	Polypteridae	Polypteriformes
3	<i>Acipenser sinensis</i>	Chinese sturgeon	Acipenseridae	Acipenseriformes
4	<i>Amia calva</i>	Bowfin	Amiidae	Amiiformes
5	<i>Scleropages formosus</i>	Golden arowana	Osteoglossidae	Osteoglossiformes
6	<i>Anguilla anguilla</i>	European freshwater eel	Anguillidae	Anguilliformes
7	<i>Aristichthys nobilis</i>	Bighead carp	Cyprinidae	Cypriniformes
8	<i>Megalobrama amblycephala</i>	Wuchang bream	Cyprinidae	Cypriniformes
9	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Silver carp	Cyprinidae	Cypriniformes
10	<i>Gobiocypris rarus</i>	Rare gudgeon	Cyprinidae	Cypriniformes
11	<i>Astyanax mexicanus</i>	Blind cave fish	Characidae	Characiformes
12	<i>Diaphus dumerilii</i>	Lanternfish	Myctophidae	Myctophiformes
13	<i>Hoplostethus atlanticus</i>	Orange roughy	Trachichthyidae	Beryciformes
14	<i>Hippocampus comes</i>	Tiger tail seahorse	Syngnathidae	Gasterosteiformes
15	<i>Monopterus albus</i>	Finless eel	Synbranchidae	Synbranchiformes
16	<i>Lateolabrax japonicus</i>	Japanese seabass	Moronidae	Perciformes
17	<i>Epinephelus coioides</i>	Grouper	Serranidae	Perciformes
18	<i>Sparus aurata</i>	Gilthead sea bream	Sparidae	Perciformes
19	<i>Pseudosciaena crocea</i>	Large yellow croaker	Sciaenidae	Perciformes
20	<i>Eleginops maclovinus</i>	Patagonian blenny	Eleginopidae	Perciformes
21	<i>Dissostichus mawsoni</i>	Antarctic toothfish	Nototheniidae	Perciformes
22	<i>Chaneocephalus aceratus</i>	Blackfin icefish	Channichthyidae	Perciformes
23	<i>Periophthalmodon schlosseri</i>	Giant mudskipper	Gobiidae	Perciformes
24	<i>Thunnus albacares</i>	Yellowfin tuna	Scombridae	Perciformes
25	<i>Pampus argenteus</i>	Pomfret	Stromateidae	Perciformes
26	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Bastard halibut	Paralichthyidae	Pleuronectiformes
27	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	Tongue sole	Cynoglossidae	Pleuronectiformes
28	<i>Mola mola</i>	Sunfish	Molidae	Tetraodontiformes



1. *Hydrolagus colliei*
2. *Sphyrna* sp.
3. *Pristis* sp.
4. *Torpedo californica*
5. *Erpetoichthys calabaricus*
6. *Polyodon spatula*
7. *Hiodon alosoides*
8. *Pantodon buchholzi*
9. *Notopterus notopterus*
10. *Megalops atlanticus*
11. *Albula vulpes*
12. *Gymnothorax mordax*
13. *Anchoa* sp.
14. *Sardinella* sp.
15. *Chanos chanos*
16. *Paedocypris progenetica*
17. *Cyprinus carpio*
18. *Catla catla*
19. *Botia kubotai*
20. *Serrasalmus*
21. *maculatus*
22. *armatus*
23. *trimaculatus*
24. *maculatus*
25. *armatus*
26. *trimaculatus*
27. *maculatus*
28. *armatus*
29. *Oncorhynchus tshawytscha*
30. *Coregonus clupeaformis*
31. *Esox lucius*
32. *Chauliodus* sp.
33. *Synodus*
34. *Benthoosema pterotum*
35. *Lampris guttatus*
36. *Aphredoderus sayanus*
37. *Chilara taylori*
38. *Porichthys notatus*
39. *Lophius* sp.
40. *Thymichthys* sp.
41. *Ceratias* sp.
42. *Mugil cephalus*
43. *Odontesthes bonariensis*
44. *Exocoetus* sp.
45. *Hemiramphus* sp.
46. *Strongylura marina*
47. *Krytolebias*
48. *armatus*
49. *trimaculatus*
50. *maculatus*
51. *armatus*
52. *trimaculatus*
53. *maculatus*
54. *armatus*
55. *Dactylopterus* sp.
56. *Sebastes chrysomelas*
57. *Pterois radiata*
58. *Platycephalus bassensis*
59. *Clinocottus analis*
60. *Aspidophoroides*
61. *Cyclopterus lumpus*
62. *Morone saxatilis*
63. *Pseudanthias squamipinnis*
64. *Micropterus salmoides*
65. *Sander vitreus*
66. *Sillago ciliata*
67. *Coryphaena hippurus*
68. *Caranx* sp.
69. *Lutjanus campechanus*
70. *Anisotremus virginicus*
71. *Polydactylus* sp.
72. *maculatus*
73. *armatus*
74. *trimaculatus*
75. *maculatus*
76. *armatus*
77. *trimaculatus*
78. *maculatus*
79. *Hypsypops rubicundus*
80. *Semicossyphus pulcher*
81. *Halichoeres hortulanus*
82. *Scarus ghobban*
83. *Zoarcetes* sp.
84. *Thermarces cerberus*
85. *Dissostichus eleginoides*
86. *Ammodytes americanus*
87. *Gibbonsia montereyensis*
88. *Gobiesox maendricus*
89. *Bostrychus sinensis*
90. *Dormitator latifrons*
91. *Gillichthys mirabilis*
92. *Siganus luridus*
93. *Zanclus cornuta*
94. *Naso elegans*

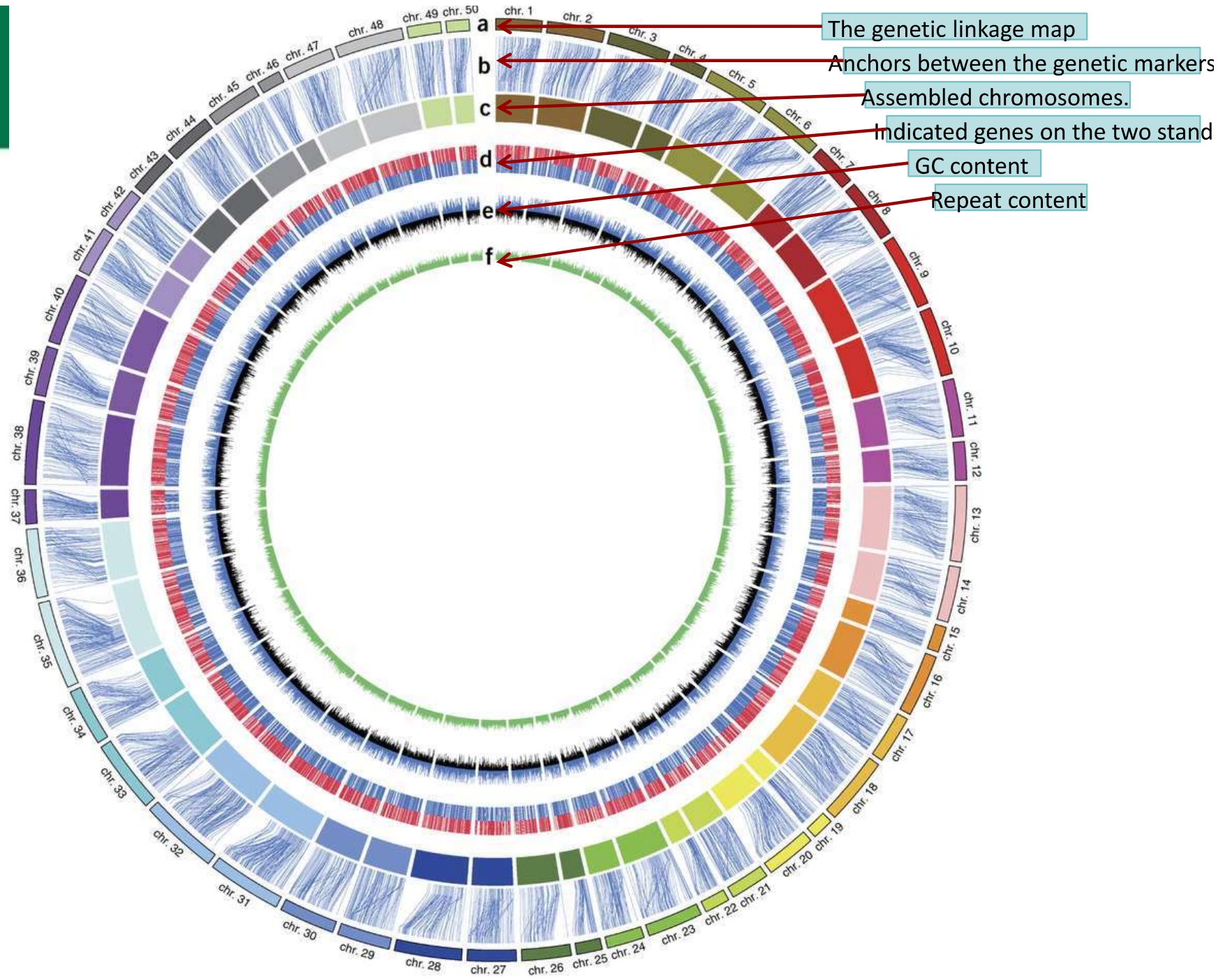


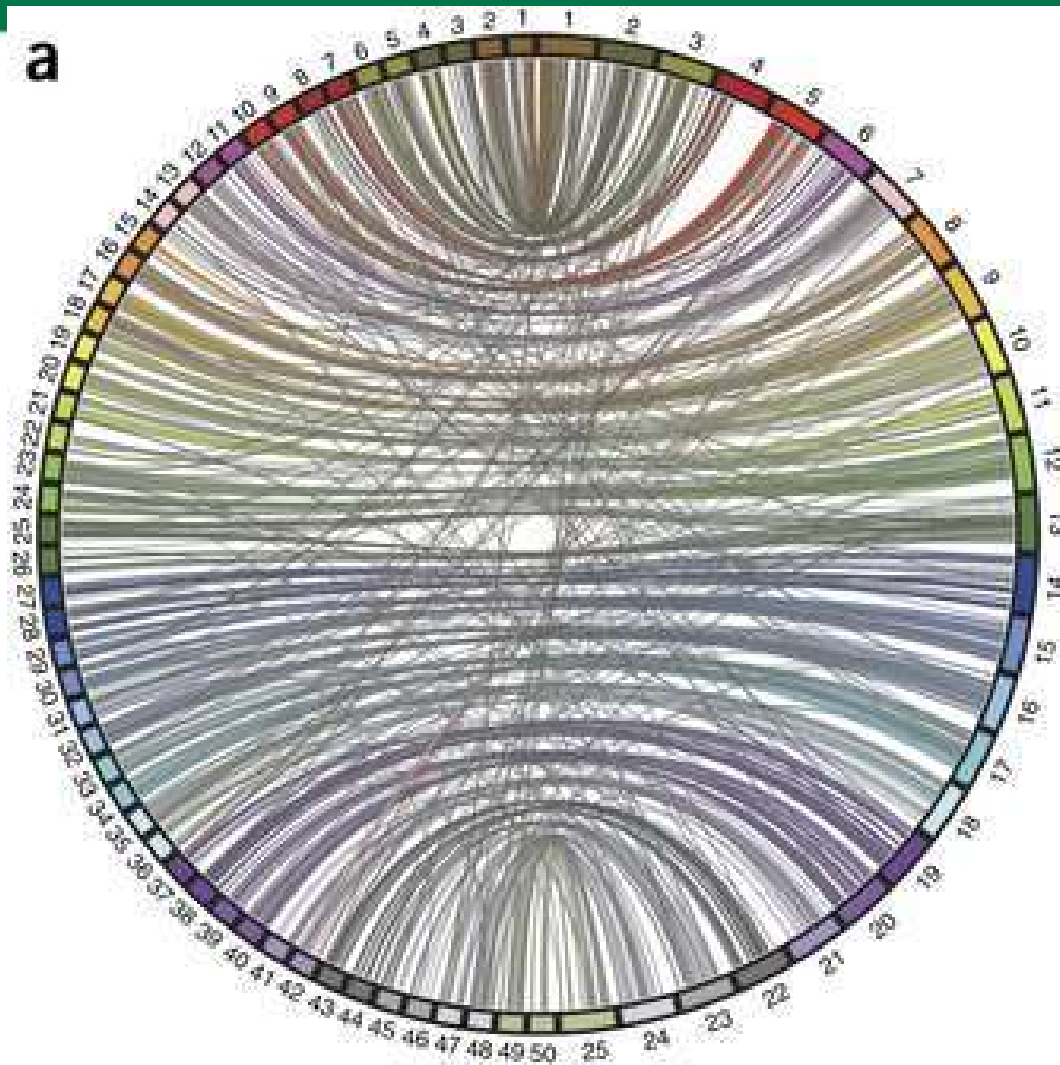
Beijing Institute of Genomics,
Chinese Academy of Sciences

Ponty (*Ciprinus carpio*)

Sequencing project 2009 - 2014

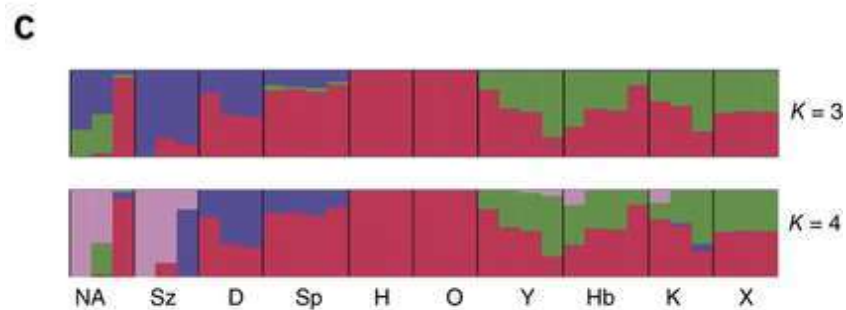
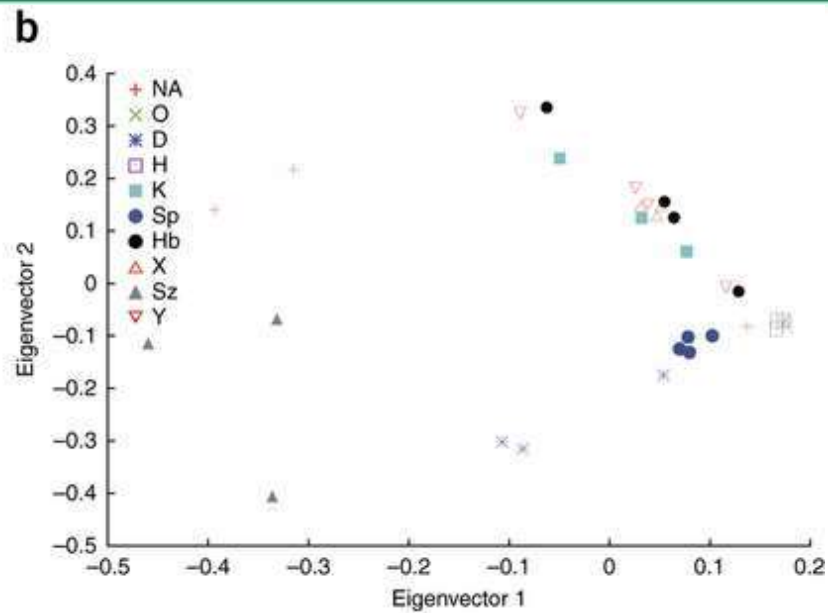




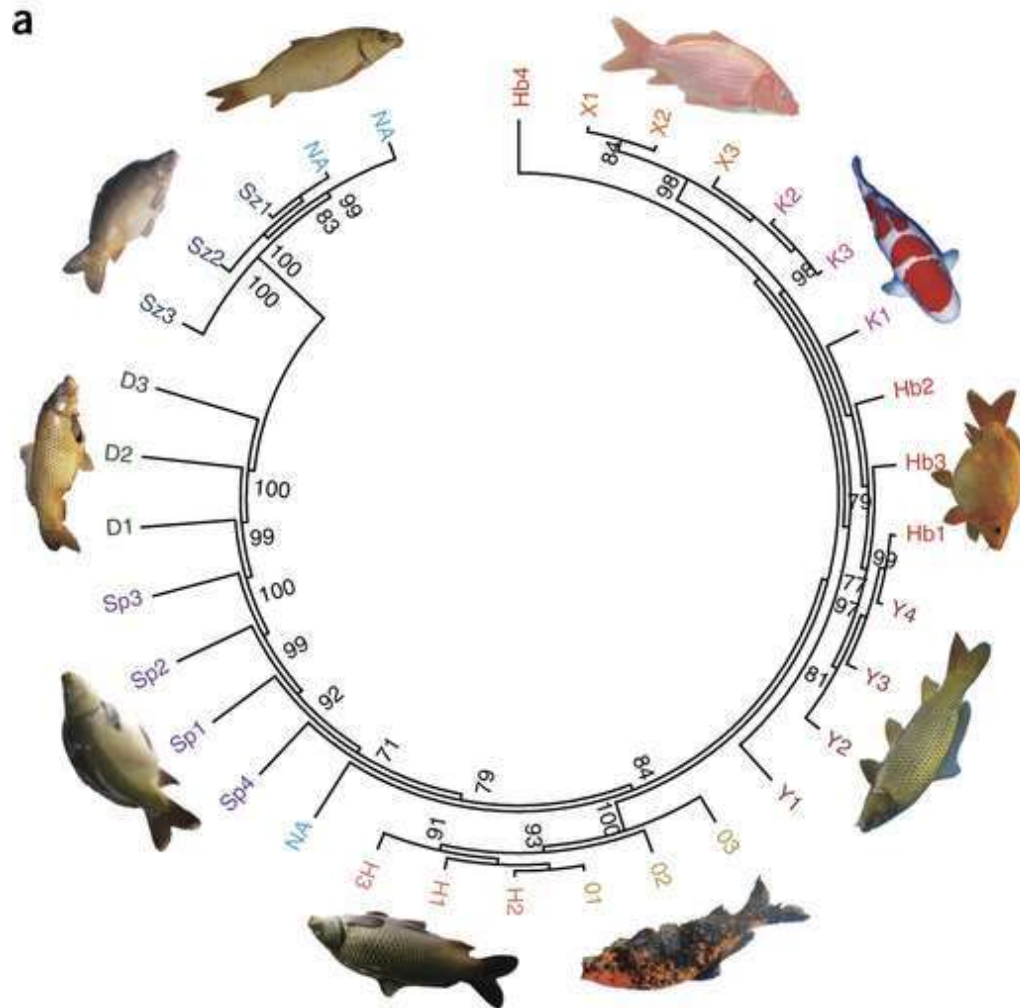


A Ponty 50 kromoszómájának és a zebradánió 25 kromoszómájának összehasonlító térképe. Az egymással rokon szakaszokat kötik össze a vonalak .

Nature Genetics 46, 1212–1219
(2014)



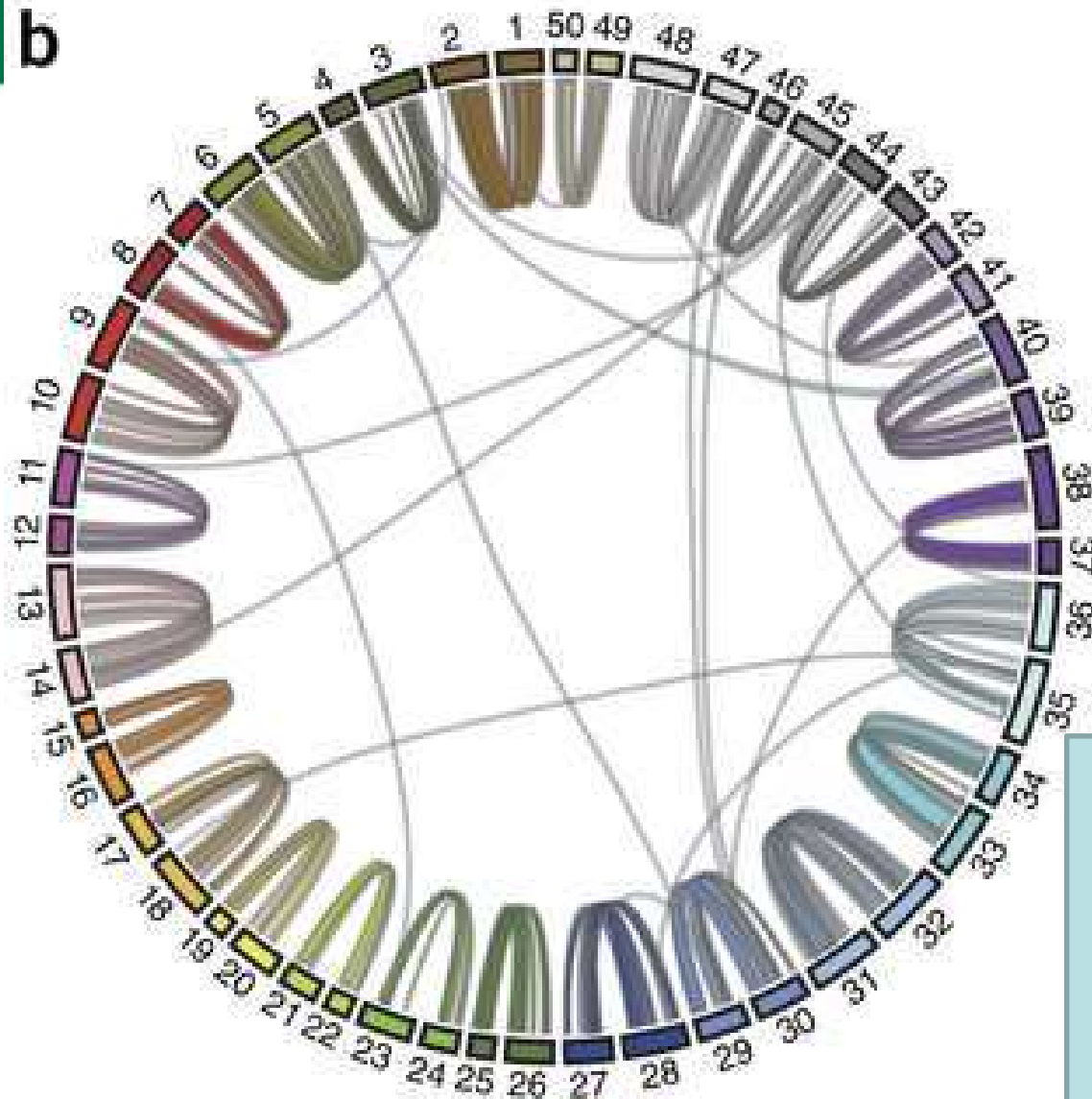
Sp, Songpu;
 D, Danube;
 Sz, Szarvas;
 NA, North America;
 Y, Yellow River;
 H, Heilongjiang;
 O, Oujiang color;
 Hb, Hebao;
 X, Xingguo;
 K, koi.



Sp, Songpu;
D, Danube;
Sz, Szarvas;
NA, North America;
Y, Yellow River;
H, Heilongjiang (A
O, Oujiang color;
Hb, Hebao;
X, Xingguo;
K, koi.

Nature Genetics 46, 1212–1219
(2014)

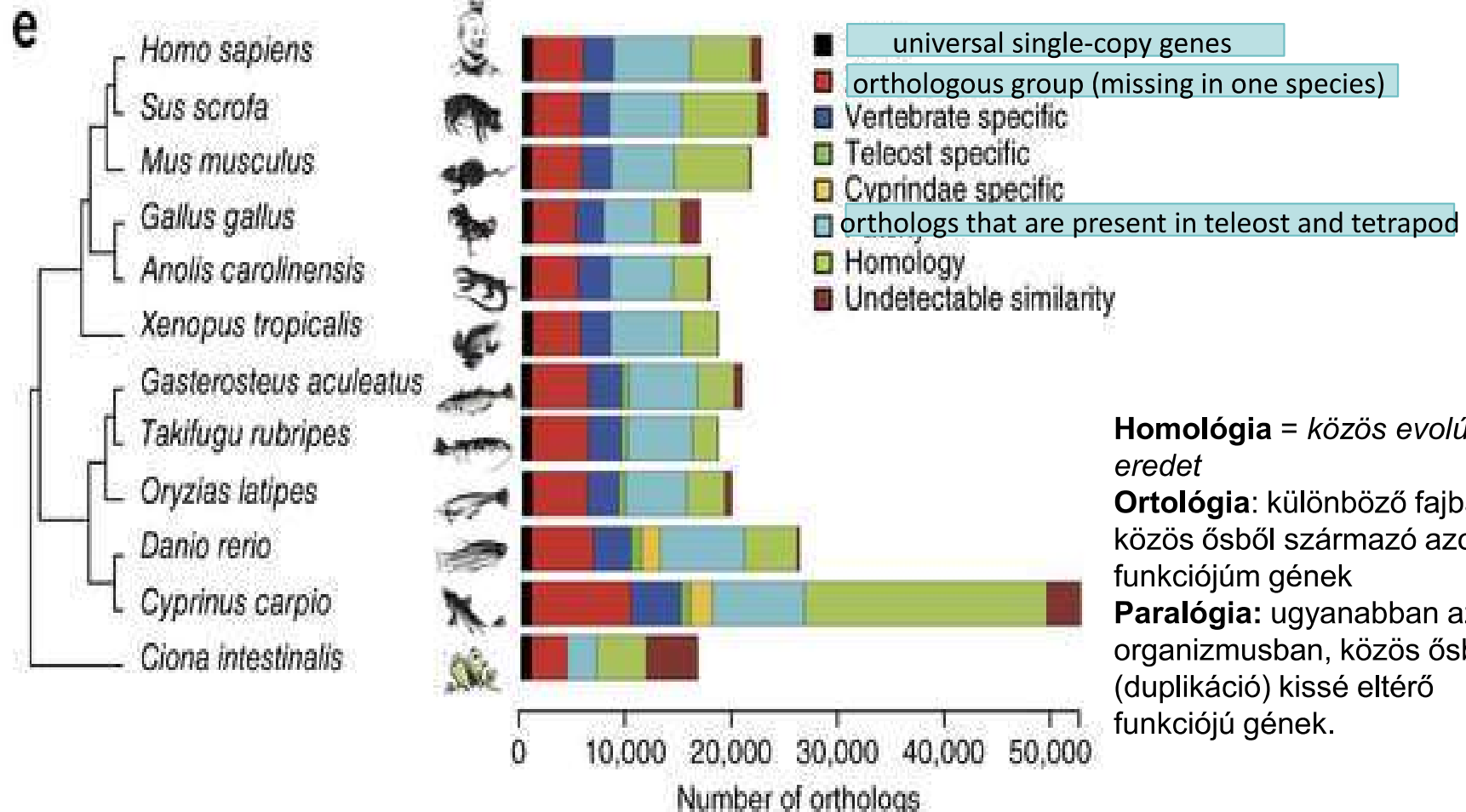
b



A Ponty kromoszómák egymáshoz viszonyított rokonságának sematikus ábrája. A duplikálódott géneket kötik össze a vonalak az egyes kromoszómákat jelképező téglalapok között

Nature Genetics 46, 1212–1219
(2014)

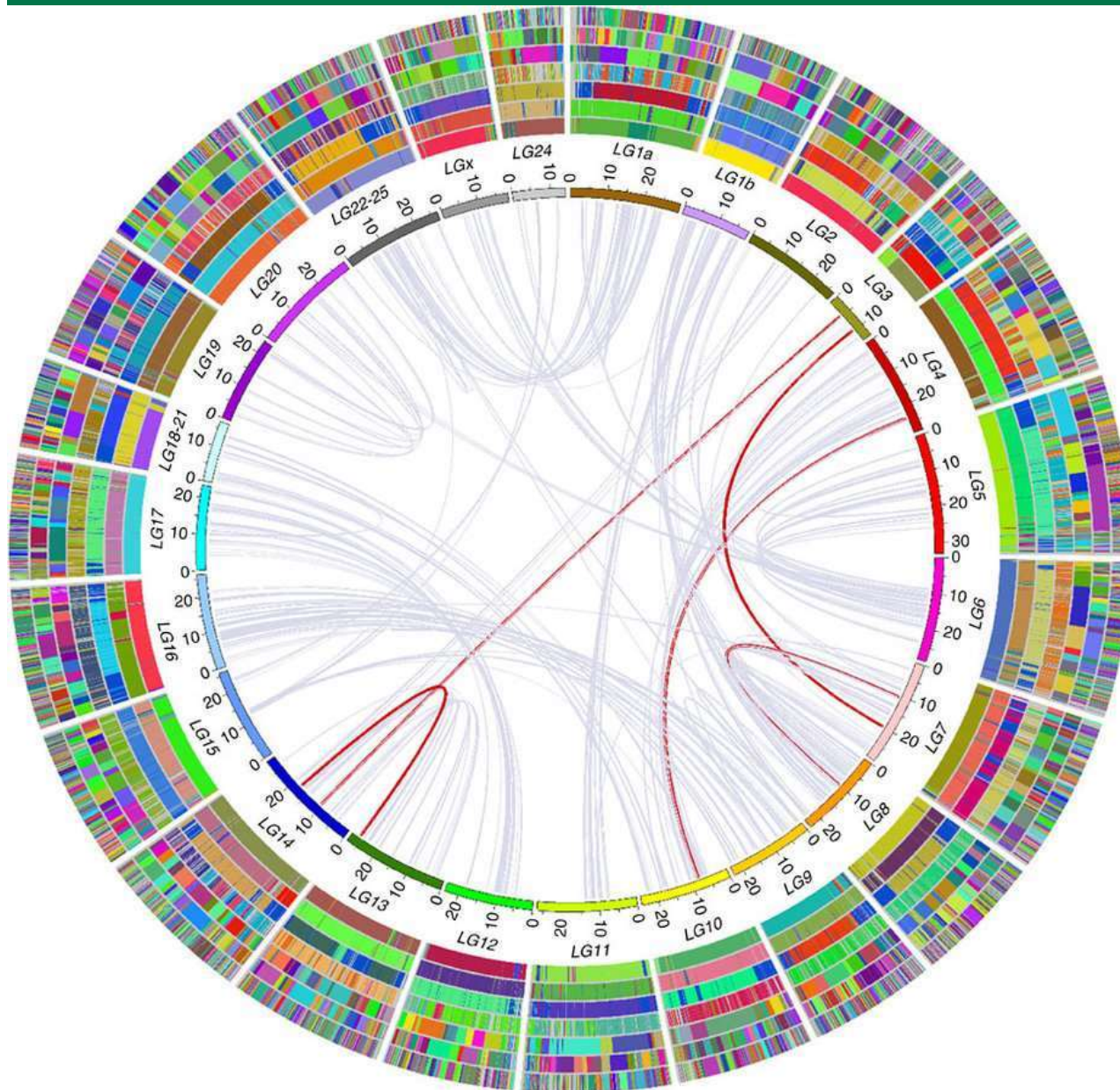
Genomok gén összetételének összehasonlítás



Homológia = közös evolúciós eredet

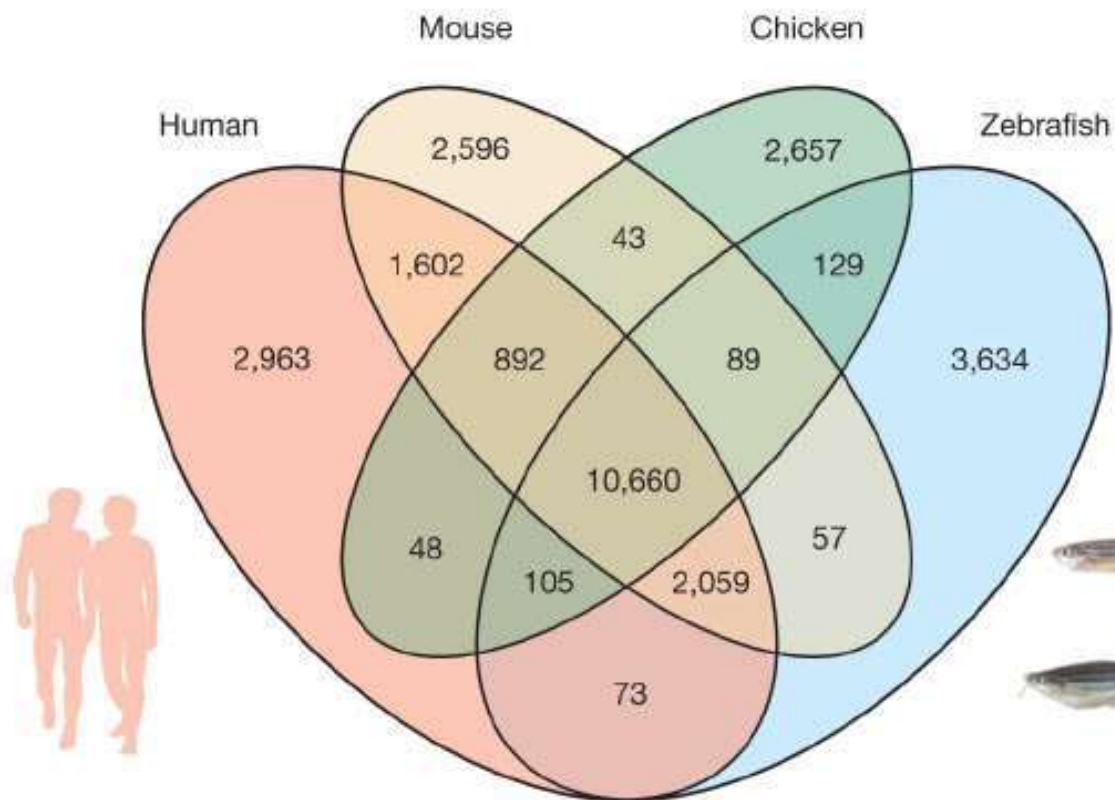
Ortológia: különböző fajban, közös ősből származó azonos funkciójú gének

Paralógia: ugyanabban az organizmusban, közös ősből (duplikáció) kissé eltérő funkciójú gének.



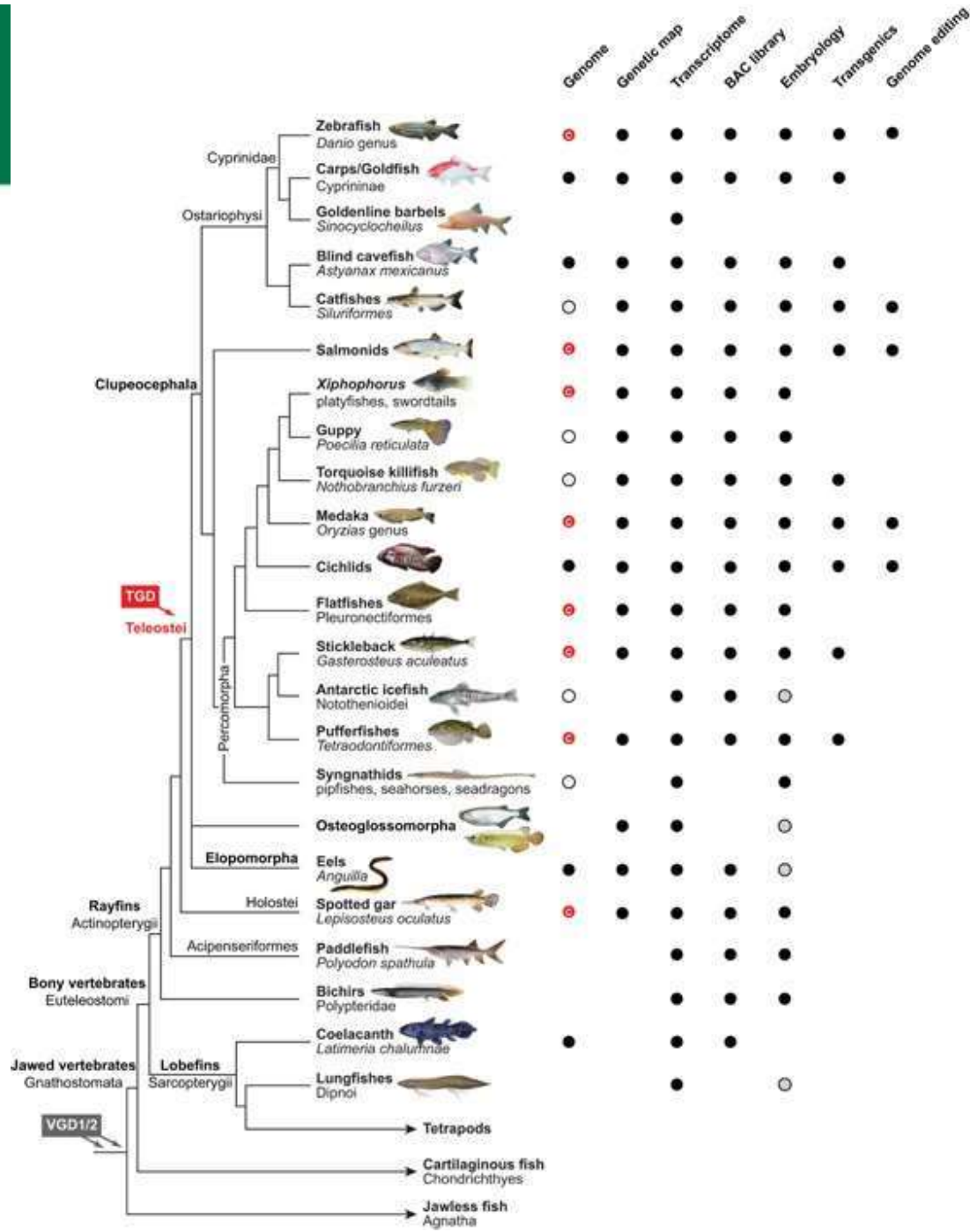
From the inner to the outer layer: *G. aculeatus*, *O. latipes*, *T. nigroviridis*, *D. rerio*, *O. niloticus*, *T. rubripes* and *G. morhua*. Sea bass chromosomes (LGN) show conserved synteny with the assemblies of *G. aculeatus*, *O. latipes*, *T. nigroviridis* and *D. rerio*, while *O. niloticus*, *T. rubripes* and *G. morhua* are still scattered into many ungrouped scaffolds as reflected by tracks of different colours along the chromosomes. The colour code is species-specific. Blocks of collinearity between sea bass chromosomes are represented by grey inner links. Red inner links represent blocks of collinearity containing claudin genes

Orthologue genes shared between the zebrafish, human, mouse and chicken genome (Kerstin Howe et al)

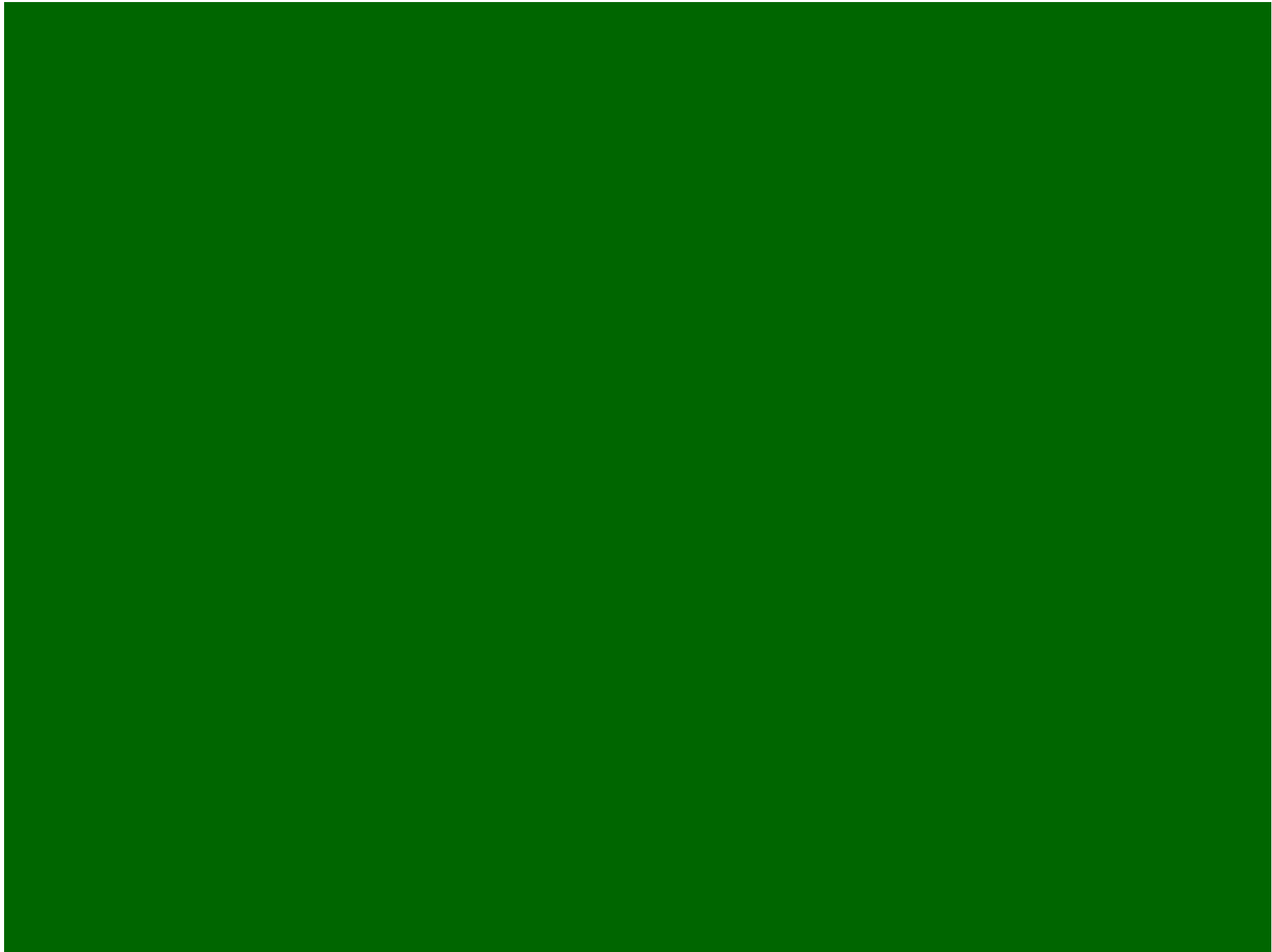


According to a [paper published in Nature](#), 70 per cent of protein-coding human genes are related to genes found in the [zebrafish \(*Danio rerio*\)](#), and 84 per cent of genes known to be associated with human disease have a zebrafish counterpart.

Nature 496, 498–503;



J. Exp. Zool.
 (Mol. Dev.
 Evol.)
 9999B:1–26,
 2014



Transzgenikus hal



- Genomjában idegen eredetű gént, vagy géneket hordoz.
- Egy, vagy több kromoszómájába beépülve mesterségesen kialakított és bejuttatott génkonstrukciót (transzgént) tartalmaz és a transzgén kifejeződik, fehérje termelődik róla, amely megváltoztatja az élőlény valamely tulajdonságát.

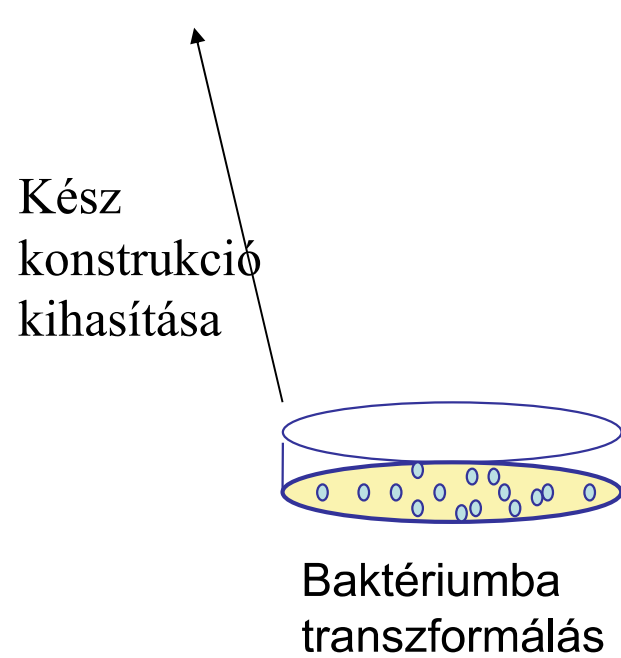
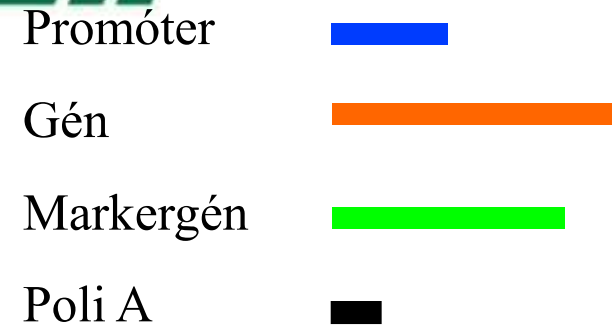
- A 80-as években kezdődik meg a transzgénikus kutatás emlősökön.
 - Mikromanipuláció lehetősége
 - Biotechnológia fejlettsége
- Néhány évvel később halakon.
 - Első kísérletek Xiphophorus-okon telje genom beinjektálásával
 - Humán GH gént tartalmazó konstrukcióval 1985-ben (Kína)
 - A 90-es években az első áttörő eredmények (lazac)

Miért előnyös a hal?

- Nagyszámú ikra
- Nagyméretű petesejt
- Több fajból egész évben nyerhető ivartermék
- Külső megtermékenyítés
- Külső egyedfejlődés

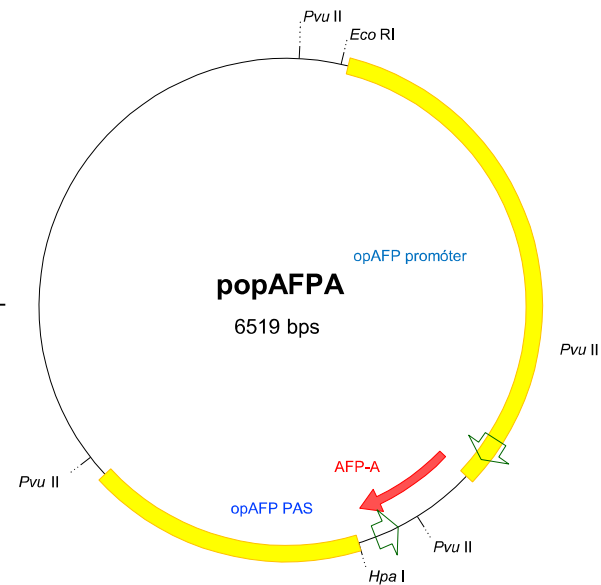
- Génszétszerelési eljárásokkal darabokból rakják össze
- Elemei:
 - GÉN (a változást előidéző fehérjét kódolja)
 - Szabályzó elemek (a gén működését irányítják)
 - Markergének (a transzgen nyomkövetését segítik)

Génkonstrukció



Plazmid(10kb)
 λ -fág
YAC
BAC
MAC

Klónozás



Promóterek típusai

- Konstitutív
- Szövetspecifikus
- fejlődési stádium specifikus
- Indukálható

Egyéb szabályzó elemek

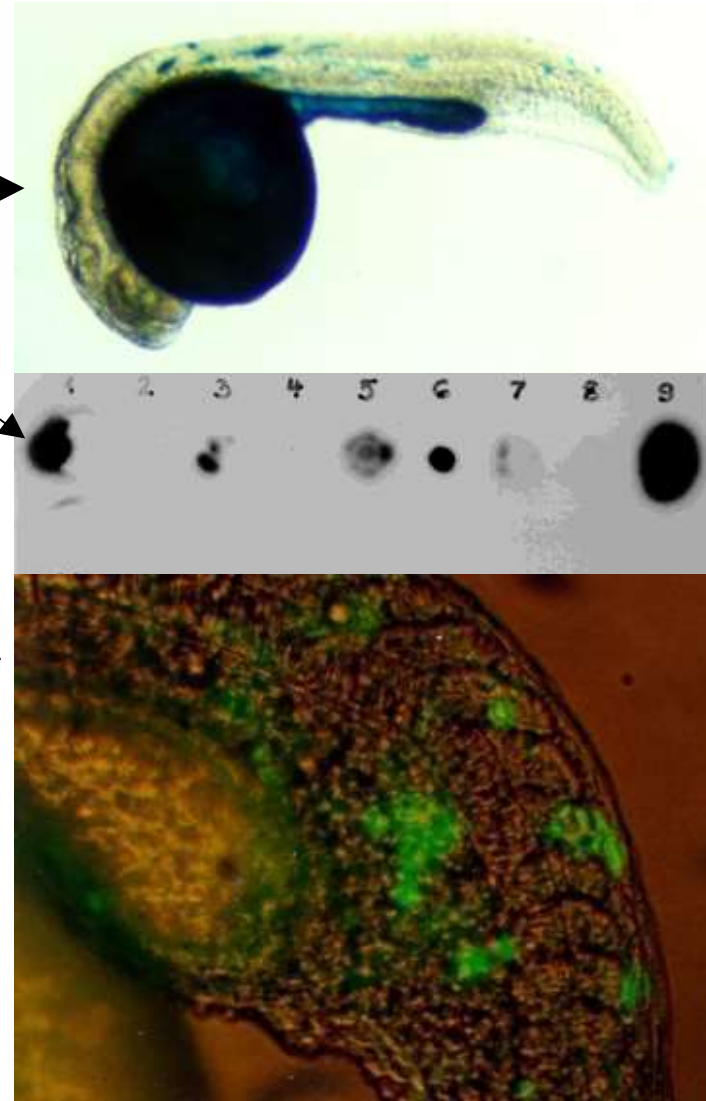
- enhancer-ek
 - silencer-ek
- Nagyobb (200 kb) távolságra
Konstitutívak
szövetspecifikusak

- Bármely fajból származhatnak
 - Növekedési hormon gén (GH)
 - Fagyásgátló fehérje gén (AFP)
 - Tápanyag metabolizmust / anyagcserét befolyásoló gének
 - Gyógyászatiilag fontos fehérjék (pl.: Inzulin)
 - Rezisztenciák

- Rezisztencia gének (bakteriális eredetűek)
 - szövettenyészetekben
 - génkonstrukciók előállításakor (vektorok is tartalmazzák)
- Szubsztráttal kimutatható fehérje gének
- Fluorescens fehérjék

Alkalmazott riporter gének

- lacZ (E. coli)
- luc (P. pyralis)
- lux (V. harveyi)
- gfp (A. victoria)



Riporter gének felhasználása

	érzékenység	Kvantitatív meghatározás	In vivo szelekció	Szöveti eloszlás
CAT	+++	++	.	.
Luciferase	+++	++	+	.
LacZ	++	+	+	+
GFP	+	+	++	+

Poly- A szignál

- Nagyon konzervált régió
- Gyakran virális eredetű

Konstrukciók története

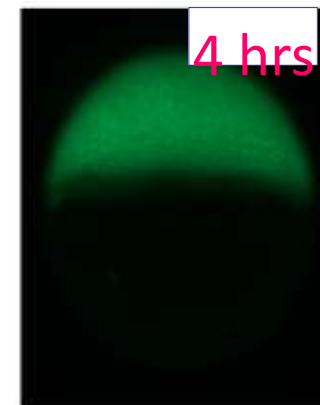
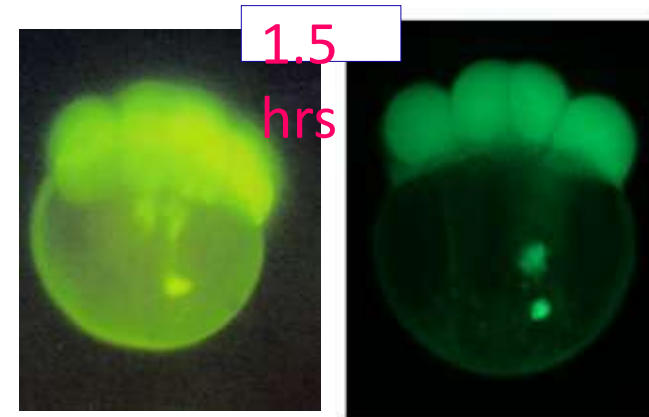
- Kezdetben főleg virális eredetű szekvenciák
- később virális és emlős/gerinces keverék
- Minél közelebbi rokon

- Mikroinjektálás
 - egérnél a pronukleuszba (>25%)
 - halaknál citoplazmába (3-5%)
- DNS spermium sejtekhez kötése a megtermékenyítés előtt
- Embriók elektroporációja
- Spermium sejtek elektroporációja
- Liposzóma-mediált génbeviteli rendszer
- Génpuska
- Retrovírus (hatékonyabb, de nem expresszál)
- Transzpozonok

Mikroinjektálás, az ikra szikállományában zajló anyagáramlások vizsgálata



Könnyen kivitelezhető több ezer embrión naponta



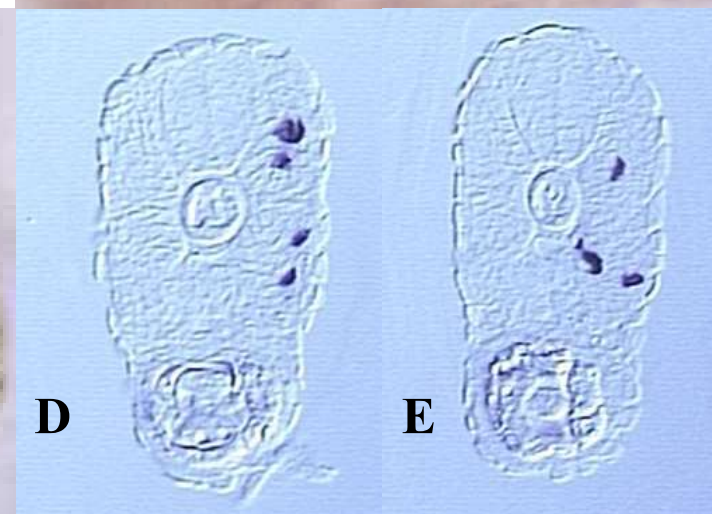
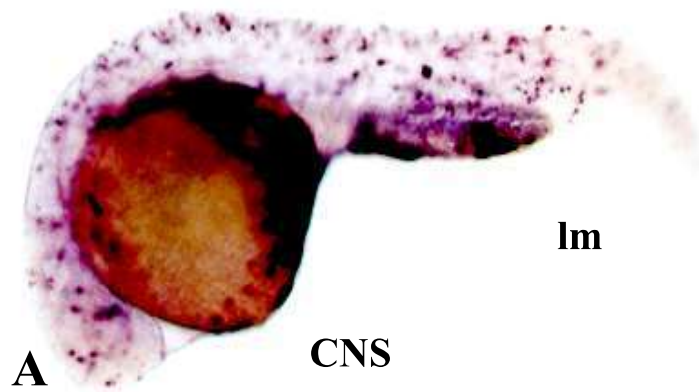
Transzgén sorsa

- Replikáció
- Megsemmisülés
- Körré záródás
- Konkatamer képződés
- Beépülés (illegitim rekombináció)
 - genetikai mozaikok
 - extrakromoszómális transzgén- tranziens expresszió
- Stabil transzgénikusok csak az F1 generációban
 - Végső bizonyíték a mendeli öröklődés

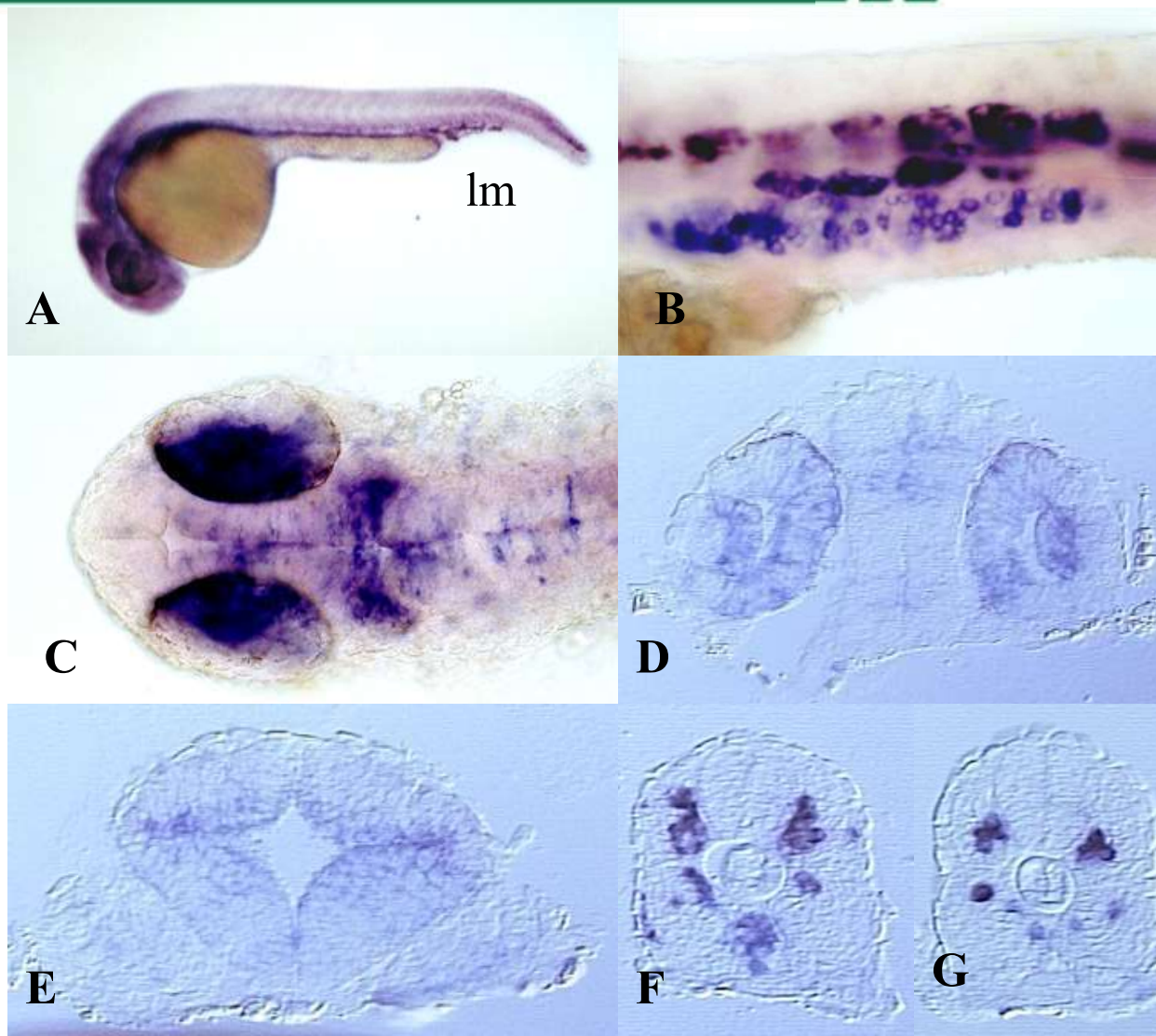
Expresszió a sziket körülvevő szinticiális rétegben (YSL)



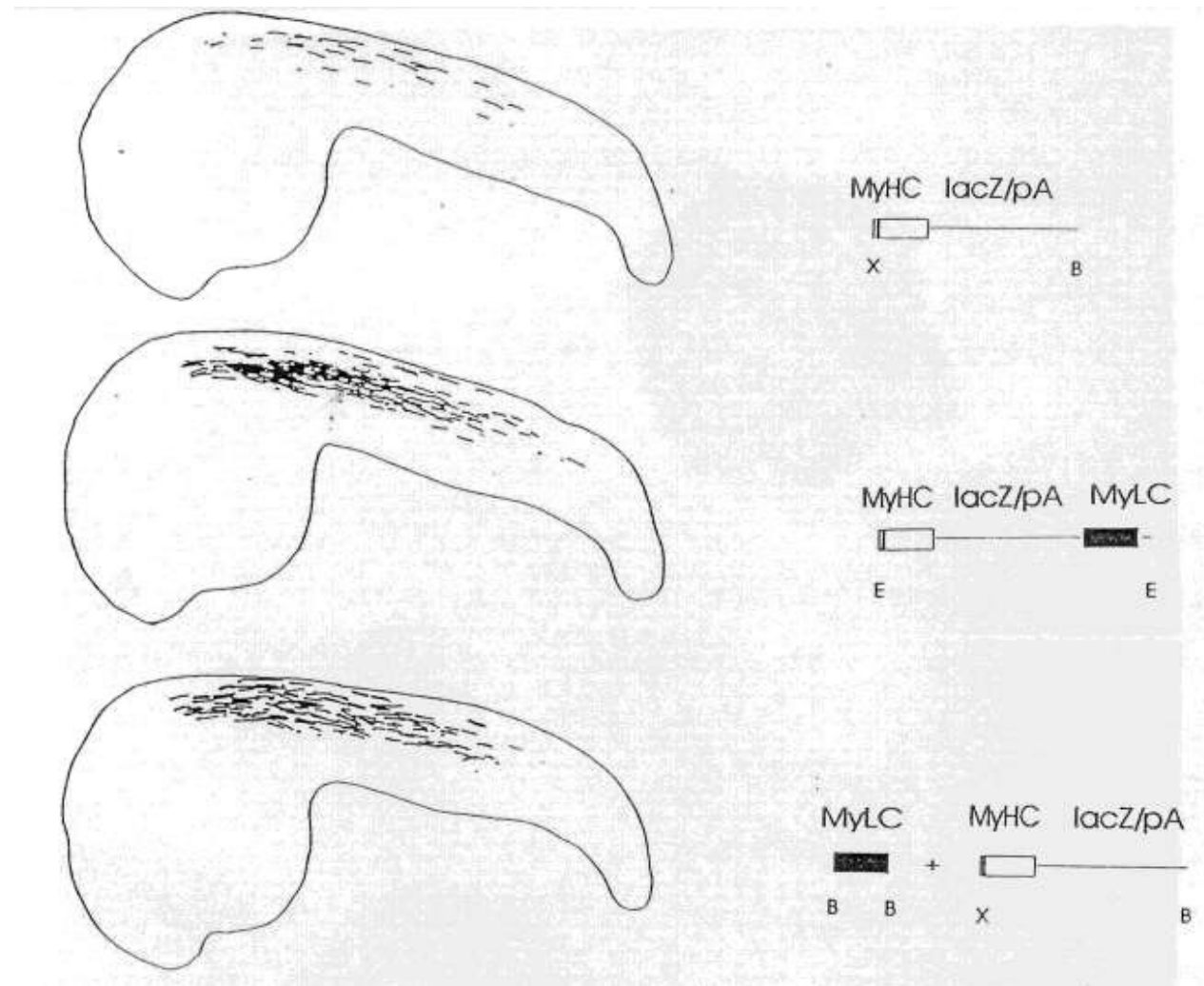
Indukálható génexpresszió vizsgálata hősokk promóterekkel



Indukálható génexpresszió vizsgálata hősokk promóterekkel



Enhancerek hatásának vizsgálata az izomspecifikus expresszióra



Nem integrálódott transzgen öröklődése

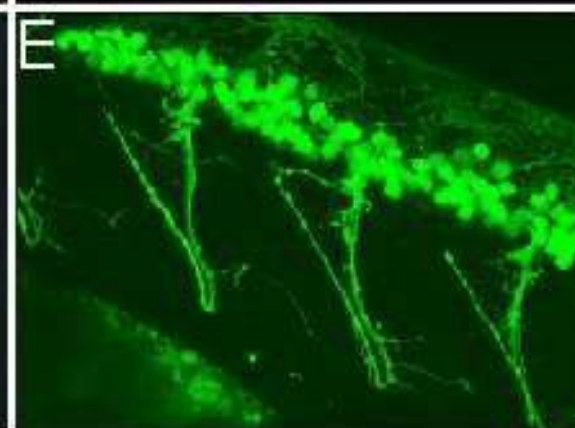
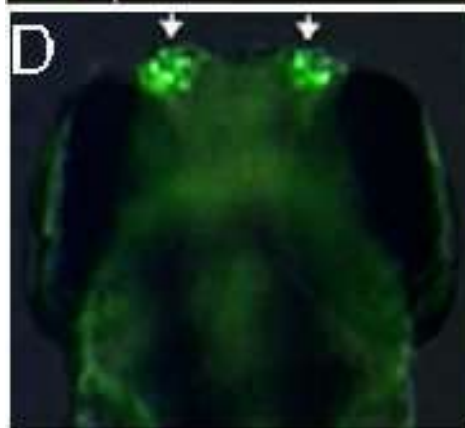
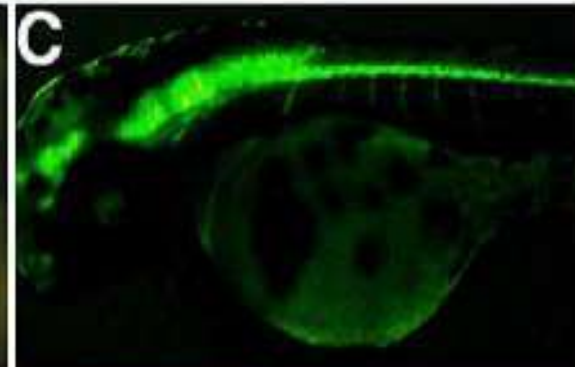
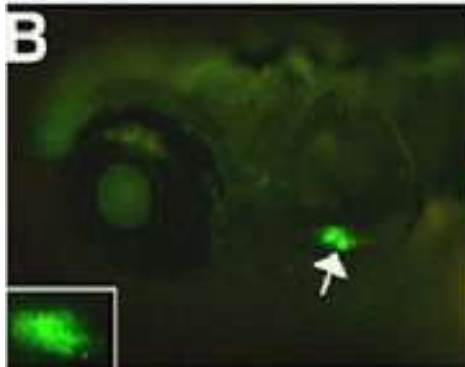
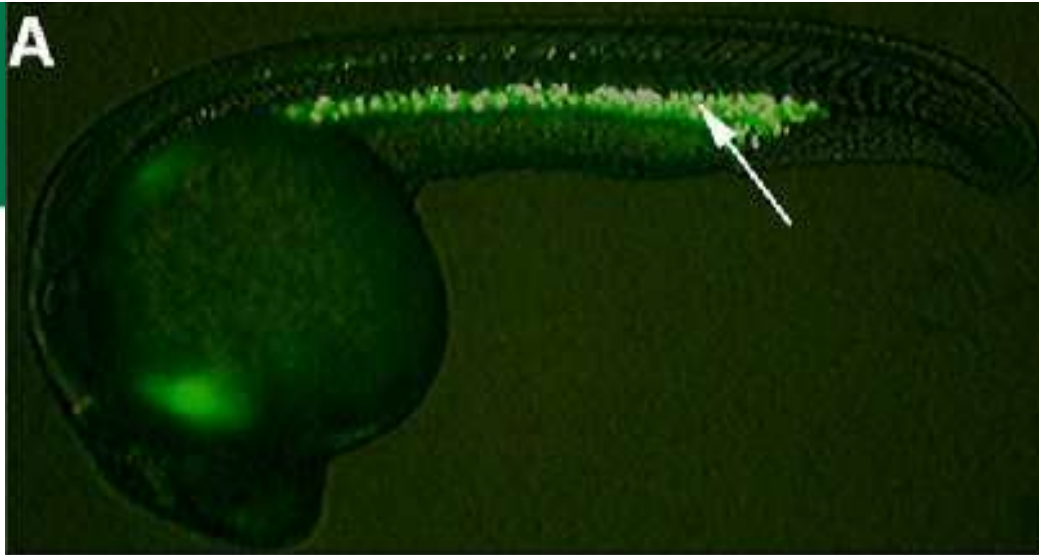
	agy	bajusz	bőr	farok	izom	kopoltyú	máj	szív	vese	gonád	utód
F0 19 egyed	44%	36%	47%	31%	6%	14%	7%	31%	14%	29%	76%
F1 34 egyed	50%	47%	37%	30%	6%	28%	29%	68%	23%	52%	
F2 8 egyed	75%	50%	25%	13%	25%	25%	0%	75%	63%	75%	100%

HA2837/1	non tested
HA2837/2	45,5%
HA2837/3	22,7%
HA2837/4	non tested
HA2837/5	non tested
HA2837/6	11,4%
HA2837/7	non tested
HA2837/8	9,7%

Tudományos vizsgálatok 1.



Tudományos vizsgálatok 2.



A. Vér

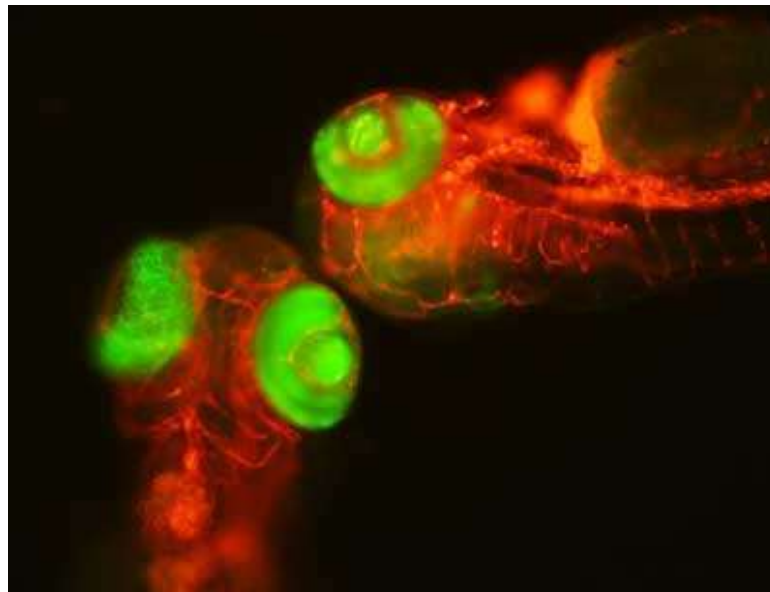
B. pajzsmirigy

C. Központi idegrendszer

D. Szagló neuronok

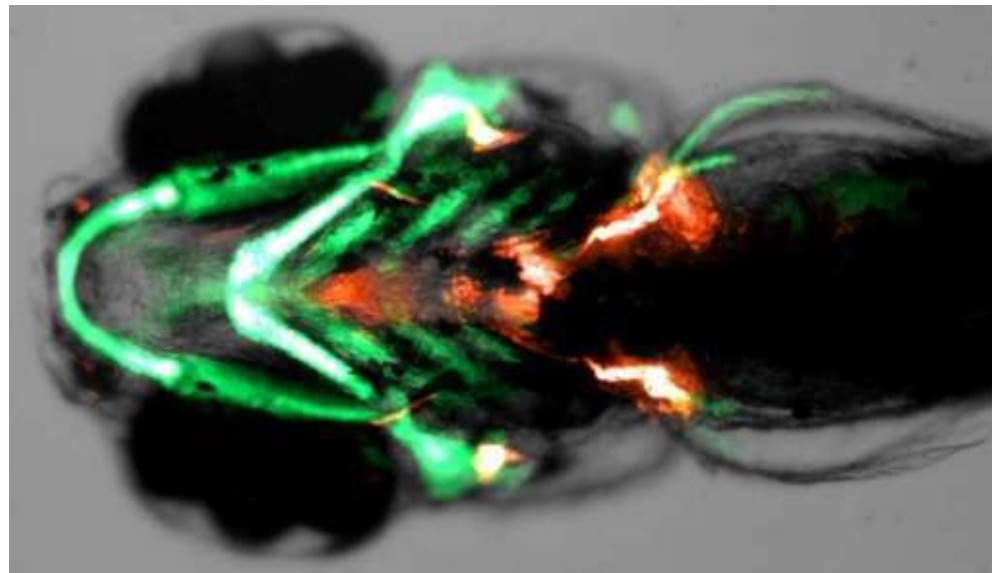
E. Motoros Neuronok

Tudományos vizsgálatok 3.



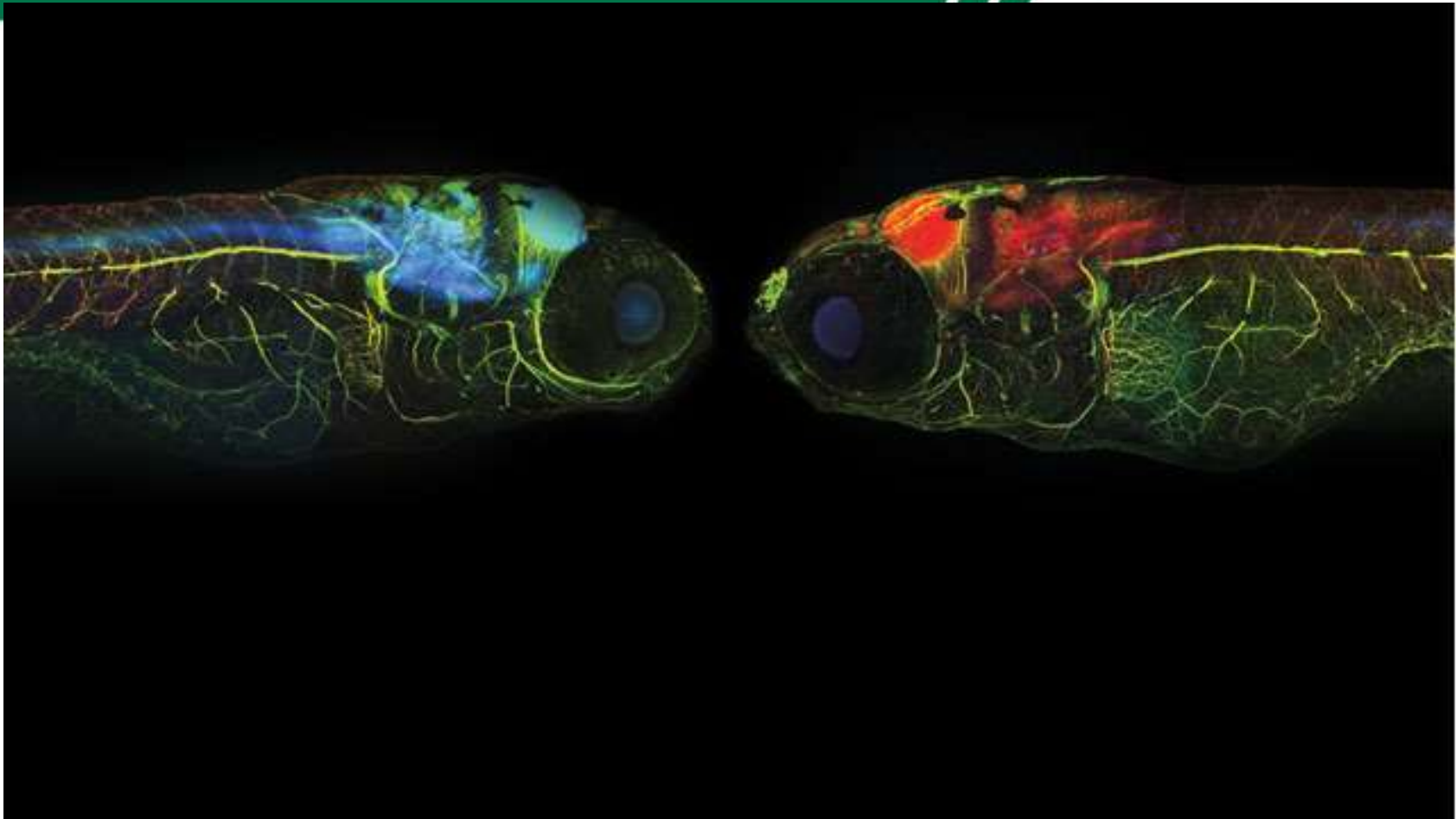
Fluorescens kép LMO2:dsRED transzgénikus zebradánió embrióban. A transzgén vörösre festi a fejlődő ereket. A zöld szín autofluoreszencia a szemben. (48 órás embrió).

Tudományos vizsgálatok 4.



Expresszó dupla transzgénikus embrióban : eGFP porc szövetben és RFP a csontban.

Tudományos vizsgálatok 5.



LOOKING INSIDE DISEASE: The wild-type zebrafish larva on the left is stained for the two neuronal proteins (green) and membrane-trafficking proteins expressed near synapses (blue). On the right, the neurons of a transgenic zebrafish larva produce the dementia-associated Tau protein (red), a disease-specific form of which is stained in

Transzgénikus Bio-monitor halak

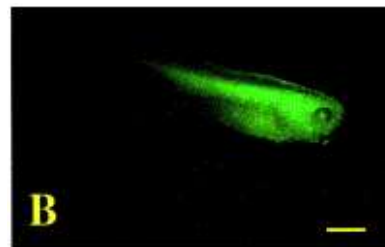
Environmental pollution detection:

Hormonal effects
Stress factors
Toxins
Heavy metals



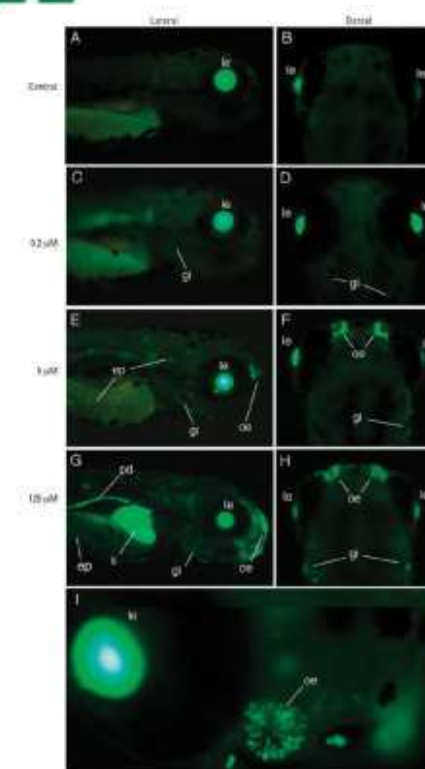
(Kurauchi et al. 2008)

Tranzsgénikus Medaka
in vivo ösztrogén hatás
choriogenin H + GFP



(Oofusa et al. 2003)

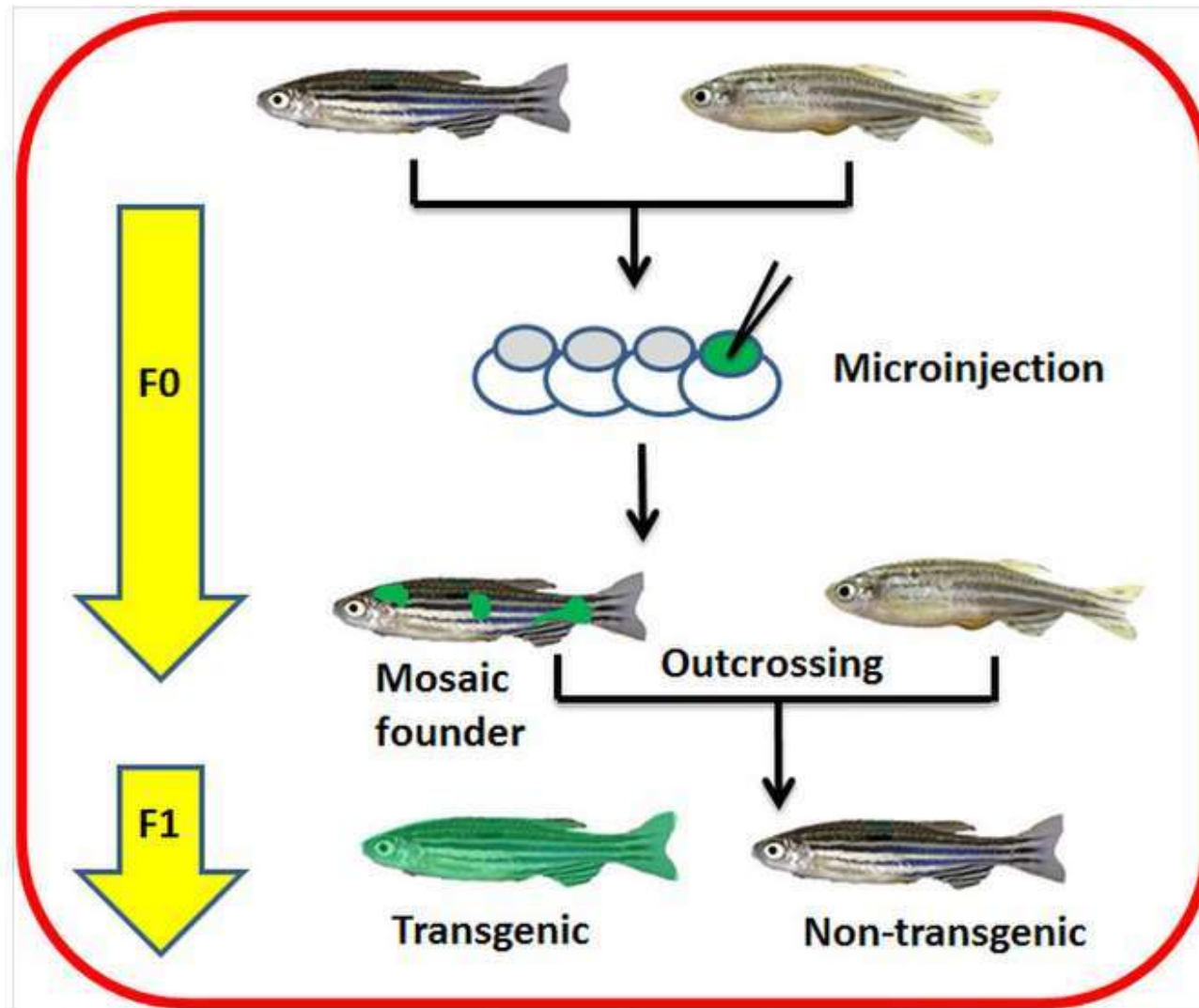
Transzgénikus Xenopus
Nehézfém kimutatás
egér metallothionein-1 +
EGFP



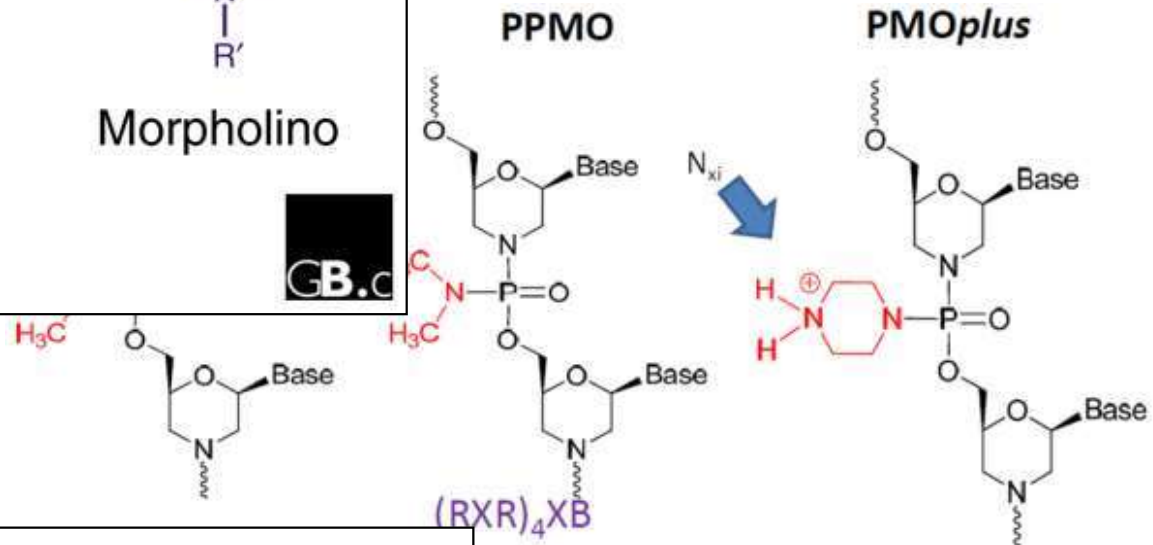
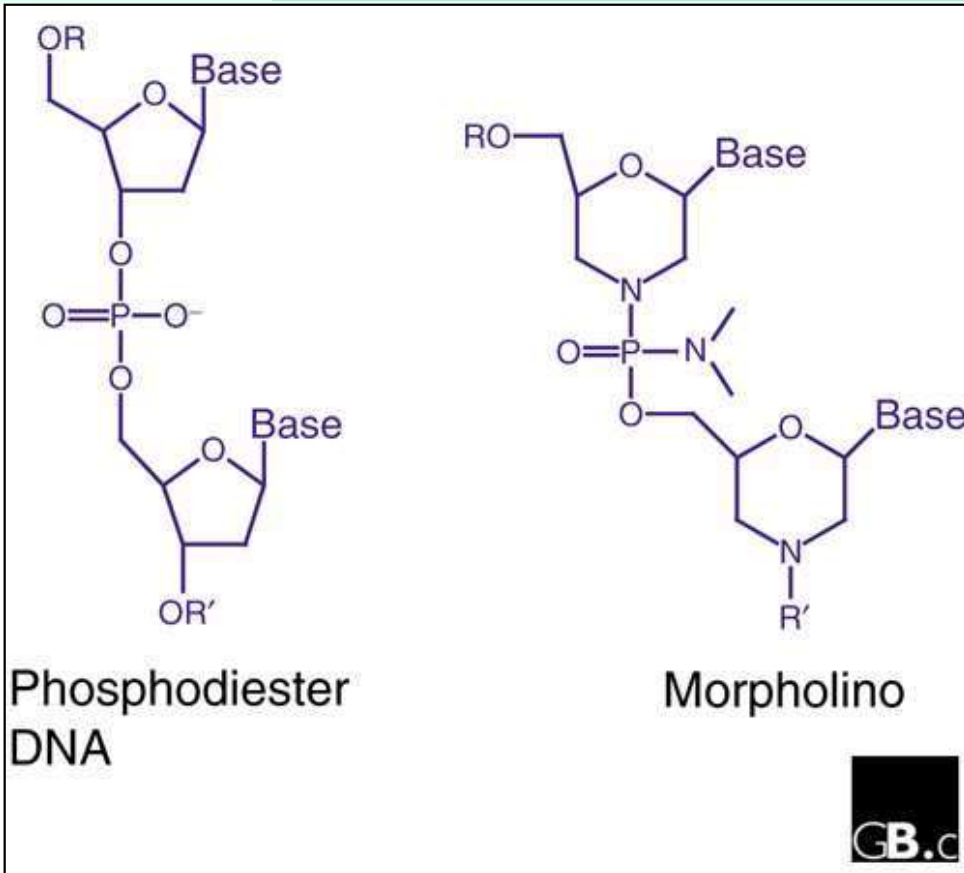
(Blechinger et al. 2002)

Transzgénikus zebradánió
Kadmium vizsgálat
Hsp70 + EGFP

ZGENEBIO Transgenic Fish service SOP



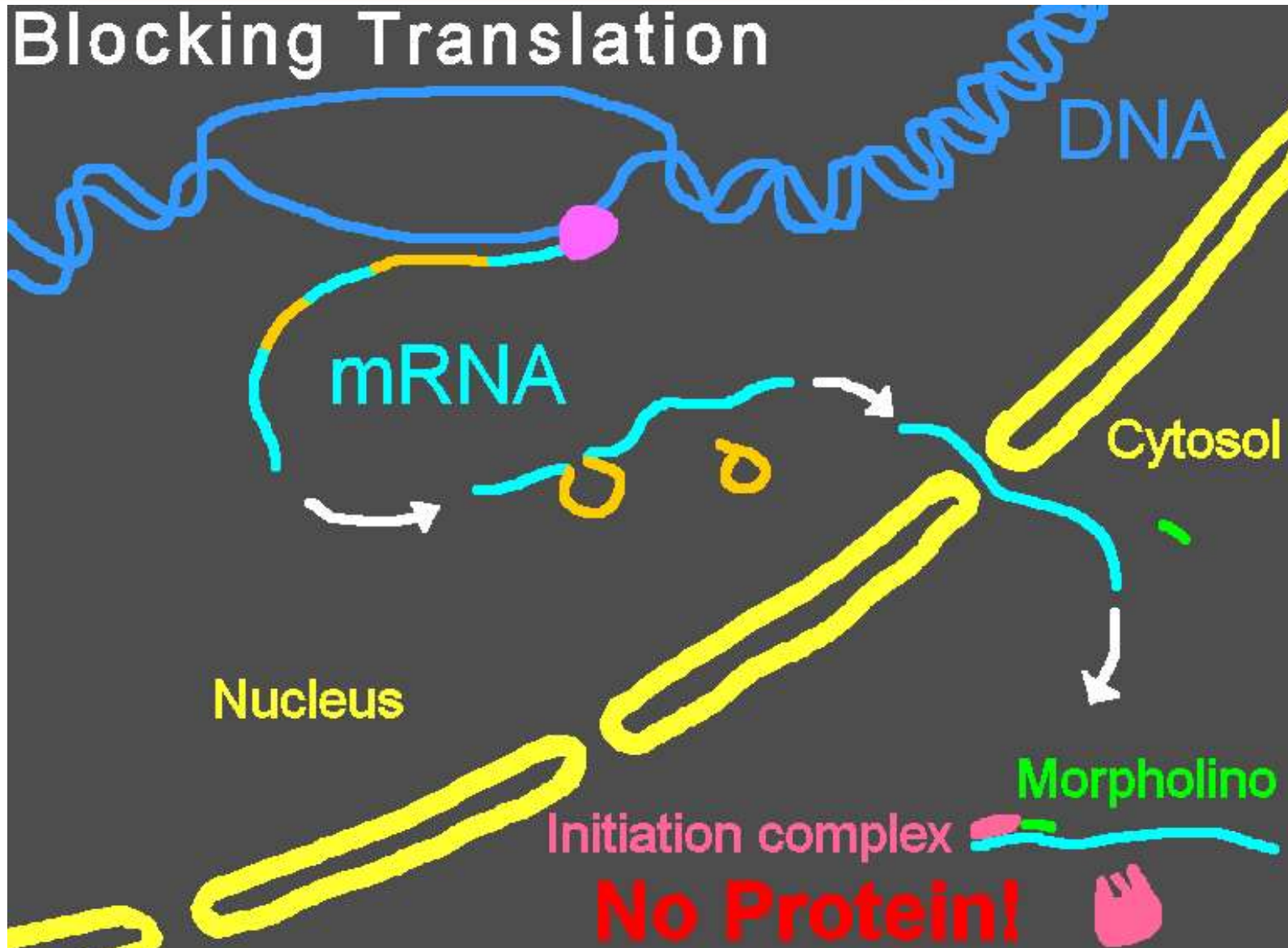
Morpholino



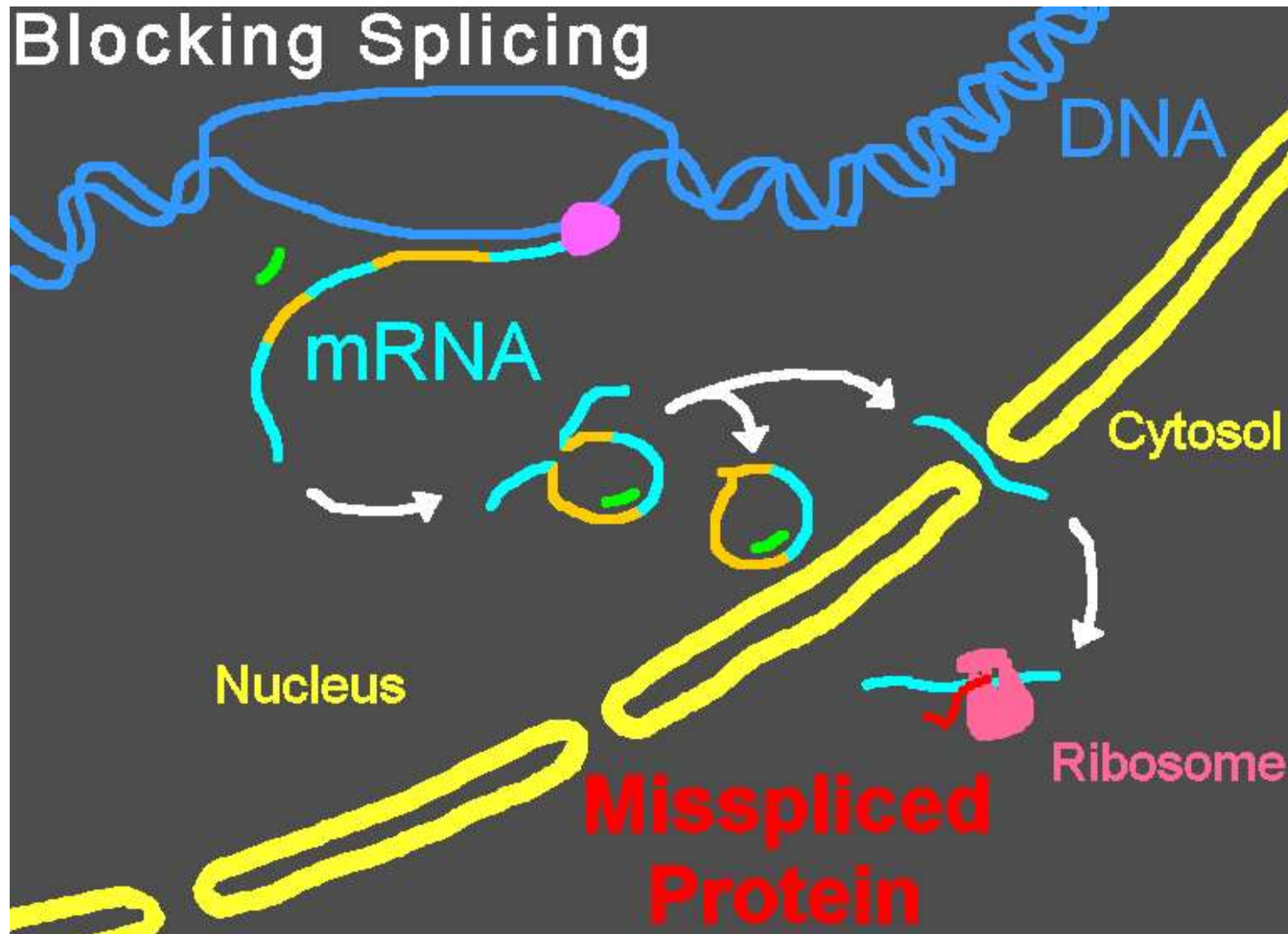
MOs are resistant to nucleases and are therefore remarkably stable

5'-NNN_{xi}NN_{xi}NNN-3'

Morpholino 1



Morpholino 2



Antiszensz transzgenikus(knock down) halak

sGnRH-antiszensz transzgenikus szivárványos pisztráng

cél: lassú ivarérés vagy sterilitás

eredmény:

- csökkent GnRH szint
- nincs hatás az ivarérésre

(Uzbekova et al. 2000)

sGnRH-antiszensz transzgenikus pontyp

eredmény:

- csökkent GnRH szint
- NÉHÁNY HAL STERIL

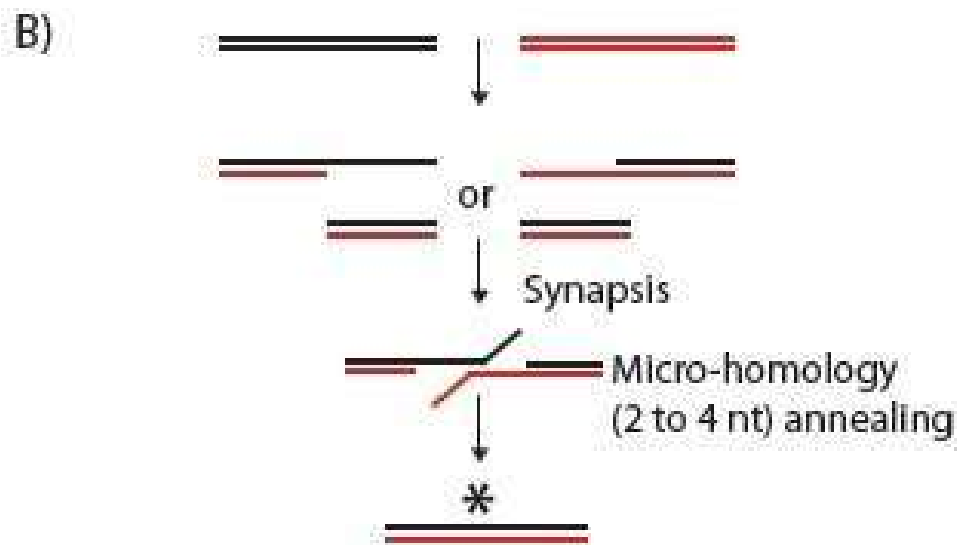
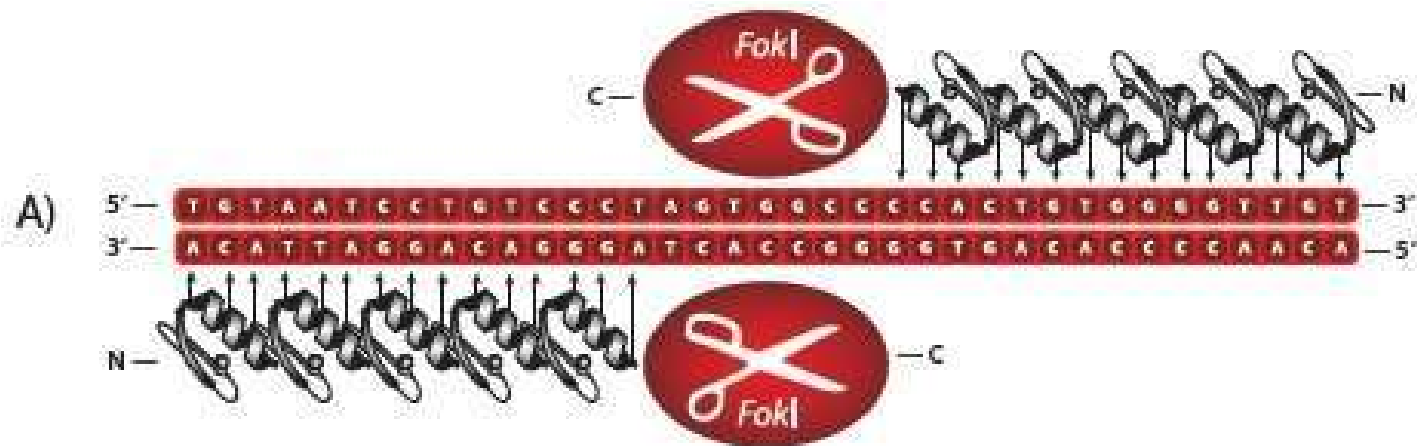
(Hu et al. 2007)

Myostatin-antiszensz transzgenikus szivárványos pisztráng

- 20-25%-os izomtömeg növekedés

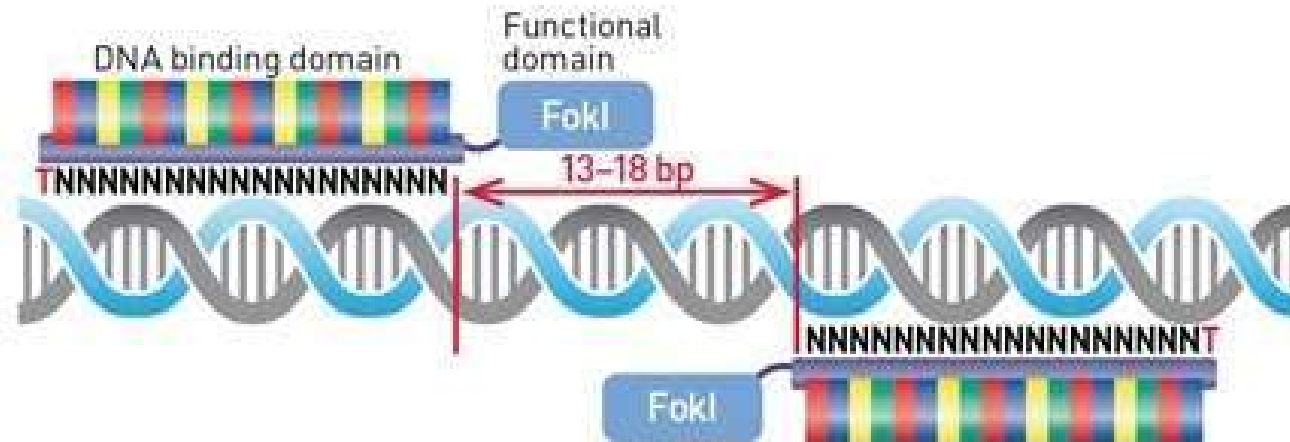


Zinc fingers

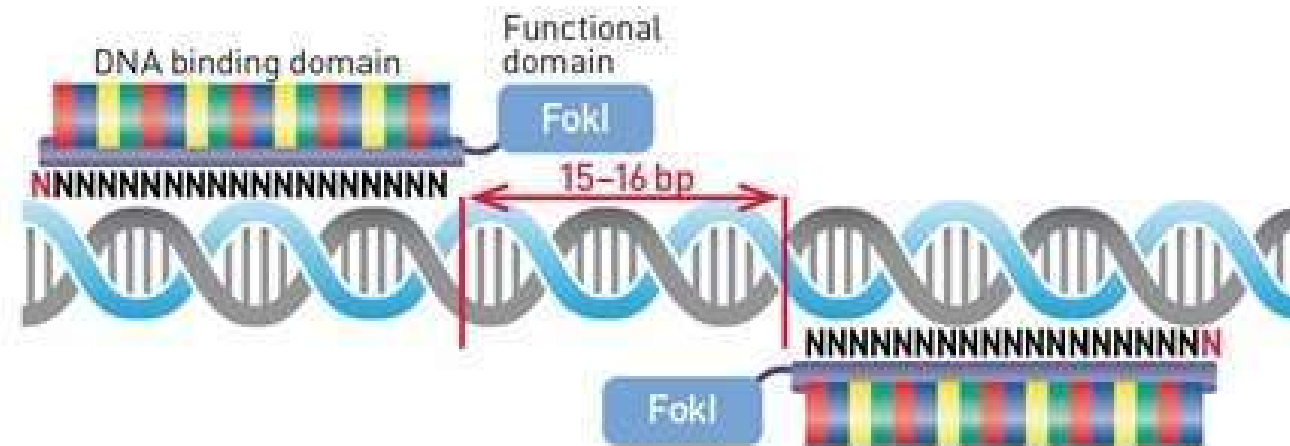


TALEN

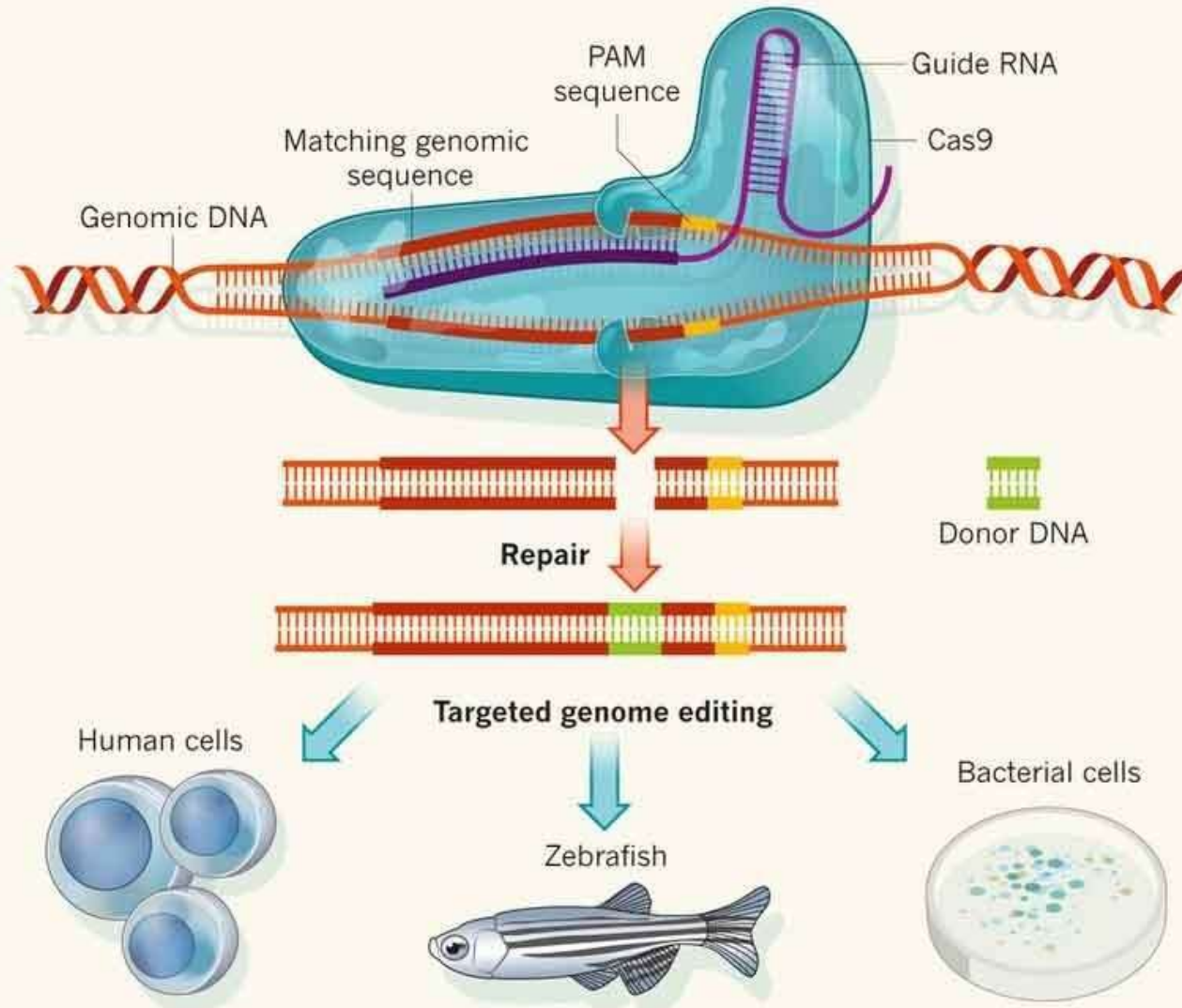
A



B



CRISPR



Lehetséges alkalmazások

- Nagyobb testtömeg
 - Növekedés felgyorsítása
 - Tápanyag értékesítés javítása
 - Zsírtartalom csökkentés
 - Fagytűrés növelése
 - Hidegtolerancia növelése
 - Gyorsabb tenyésztés
 - Lassabb tenyésztés
 - Rezisztencia
 - Biomonitor halak
 - Bioreaktor
 - Anyagcsere átalakítás
- GH
- AFP
- GnRH
- Rezisztenciát biztosító gének
- Stressz feh. Szabályzó + riporter gén
- Gyógyászati, ipari fehérjék
- Metabolizmus kulcs enzimek

Genetikailag módosított vízi állatok

- Zebrafish
- Goldfish
- Common Carp
- Grass carp
- Rohu
- Mrigal
- Ayu

- Atlantic Salmon
- Chinook Salmon
- Coho Salmon
- Cutthroat Trout
- Rainbow Trout
- Arctic Char
- Amago salmon
- Rainbow trout

- Nile Tilapia
- Tilapia zillii
- Green sunfish
- Bluegill
- Northern pike
- Walleye check
- Loach
- Japanese Medaka

- Chanal Catfish
- Indian catfish
- African catfish
- South-American catfish

- Striped Bass
- Sea bream
- Japanese flounder
- Turbot
- Halibut

- Shrimp
- Abalone
- Lobster
- Crayfish
- Clam
- Common scallop

Résztevő országok

United States

Canada

New-Zealand

United Kingdom

Cuba

China

Korea Rep.

India

Germany

Israel

Hungary

Norway

Finland

Brasil

Japan



From the report - GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS AND FISHERIES,
by - Jacques Diouf, FAO Director-General 7 March 2000

Species	Foreign gene	Desired effect and comments	Country
Atlantic salmon	AFP AFP salmon GH	Cold tolerance Increased growth and feed efficiency	United States, Canada
Coho salmon	Chinook salmon GH + AFP	After 1 year, 10- to 30-fold growth increase	Canada
Chinook salmon	AFP salmon GH	Increased growth and feed efficiency	New Zealand
Rainbow trout	AFP salmon GH	Increased growth and feed efficiency	USA, Canada
Cutthroat trout	Chinook salmon GH + AFP	Increased growth	Canada
Tilapia	AFP salmon GH	Increased growth and feed efficiency; stable inheritance	Canada, United Kingdom
Tilapia	Tilapia GH	Increased growth and stable inheritance	Cuba
Tilapia	Modified tilapia insulin-producing gene	Production of human insulin for diabetics	Canada
Salmon	Rainbow trout lysosome gene and flounder pleurocidin gene	Disease resistance, still in development	USA, Canada
Striped bass	Insect genes	Disease resistance, still in early stages of research	USA
Mud loach	Mud loach GH + mud loach and mouse promoter genes	Increased growth and feed efficiency; 2- to 30-fold increase in growth; inheritable transgene	China, Korea, Rep.
Channel catfish	GH	33% growth improvement in culture conditions	USA
Common carp	Salmon and human GH	150% growth improvement in culture conditions; improved disease resistance; tolerance of low oxygen level	China, USA
Indian Major carps	Human GH	Increased growth	India
Goldfish	GH AFP	Increased growth	China
Abalone	Coho salmon GH + various promoters	Increased growth	USA
Oysters	Coho salmon GH + various promoters	Increased growth	USA

AFP = anti-freeze protein gene (Arctic flatfish).
GH = growth hormone gene.

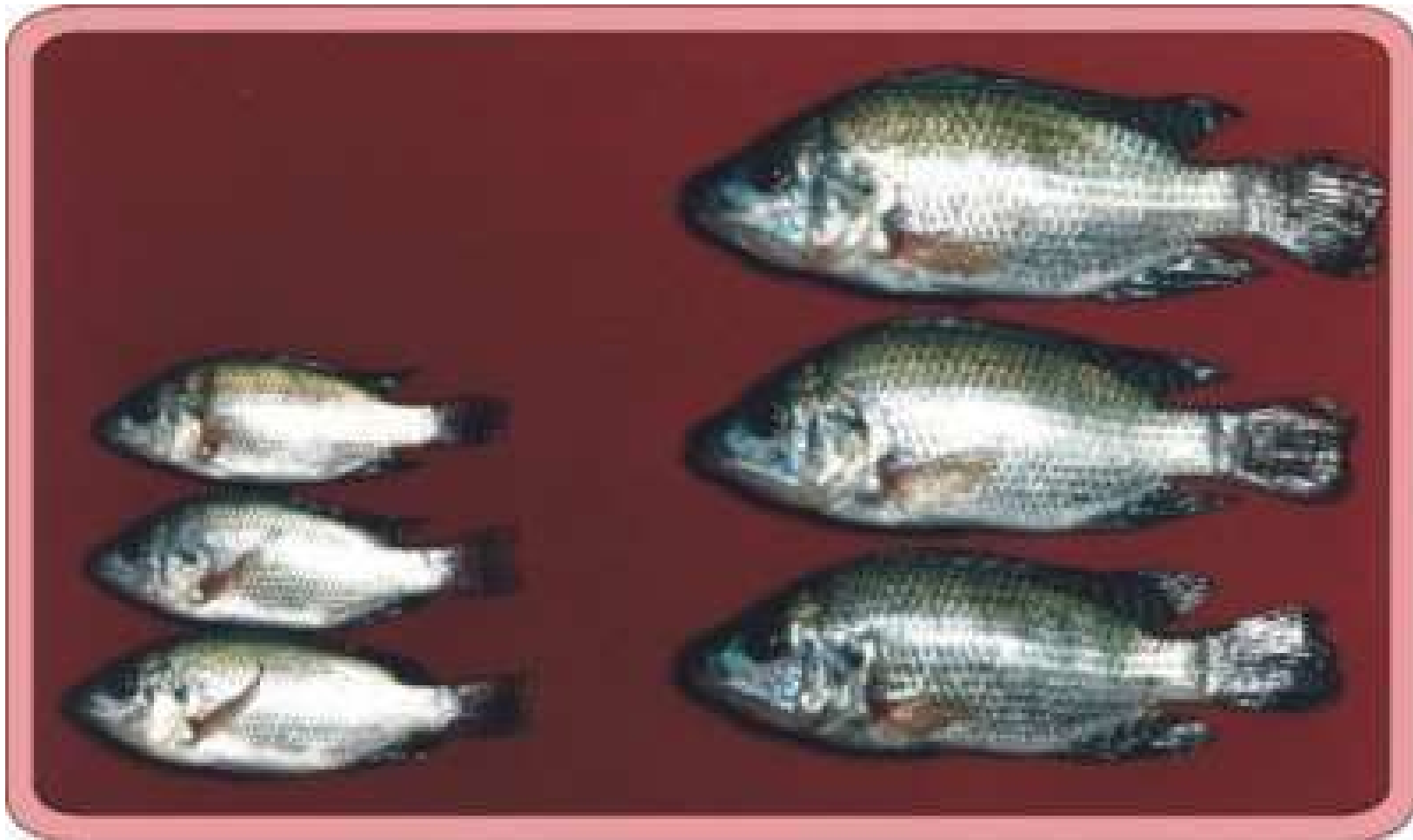
From the report - GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS AND FISHERIES,
by - Jacques Diouf, FAO Director-General 7 March 2000

Genes from Fish to Other Life Forms

Species	Foreign gene	Desired effect and comments	Country
Rabbit	Salmon calcitonin-producing gene	Calcitonin production to control calcium loss from bones	United Kingdom
Strawberry and potatoes	AFP	Increased cold tolerance	United Kingdom, Canada

From the report - GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS AND FISHERIES,
by - Jacques Diouf, FAO Director-General 7 March 2000

GH transzgenikus Tilapia



Maclean, N., Rahman, M.A., Sohm, F., Hwang, G-L., Iyengar, A., Smith, A., Ayad, H. and Farahmand, H. (2002).
Transgenic tilapia and the tilapia genome. *Gene*. 295, 265-277

GH transzgenikus Mud loach

- β -actin promoter GH gennel kapcsolva.
- >30 – szoros növekedés.



6 hónapos egyedek

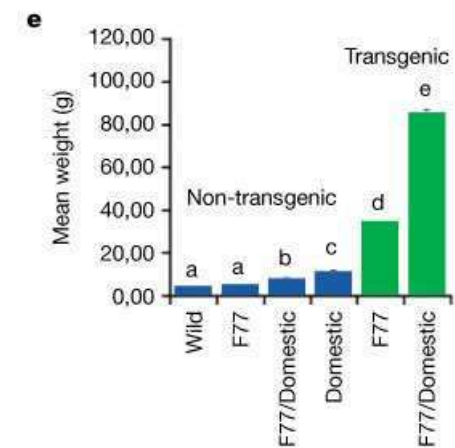
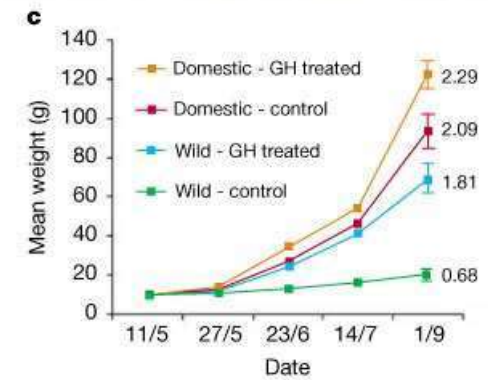
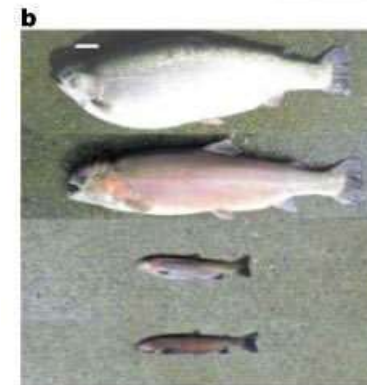
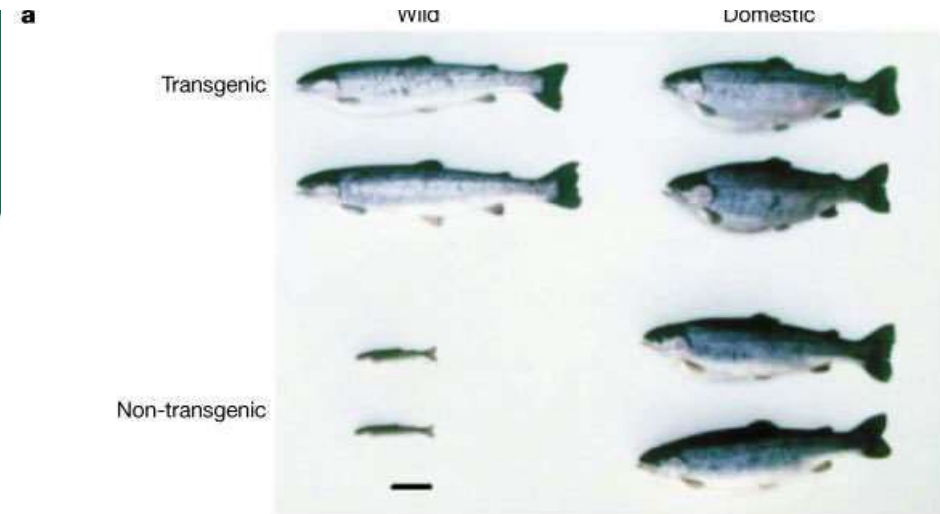
(Nam et al., 2001 Transgenic Res. 10(4):62.)

GH transzgenikus Rohu

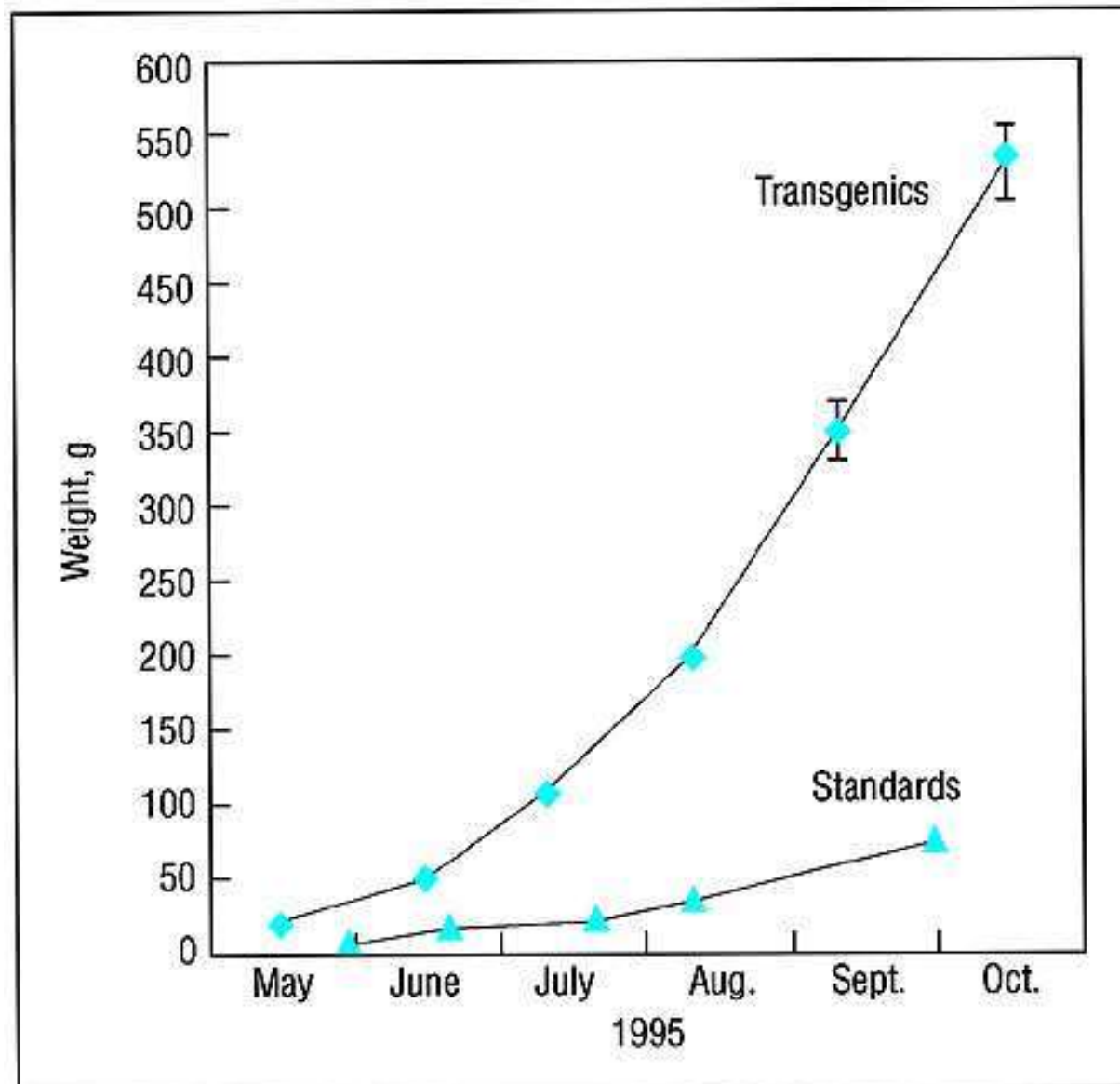


Rohu (Labeo rohita)—a leginkább tenyésztett és a széleskörben fogyasztott halak között van Indiában.
(Venugopal et al., 2004)

GH transzgenikus Atlanti lazac 1.

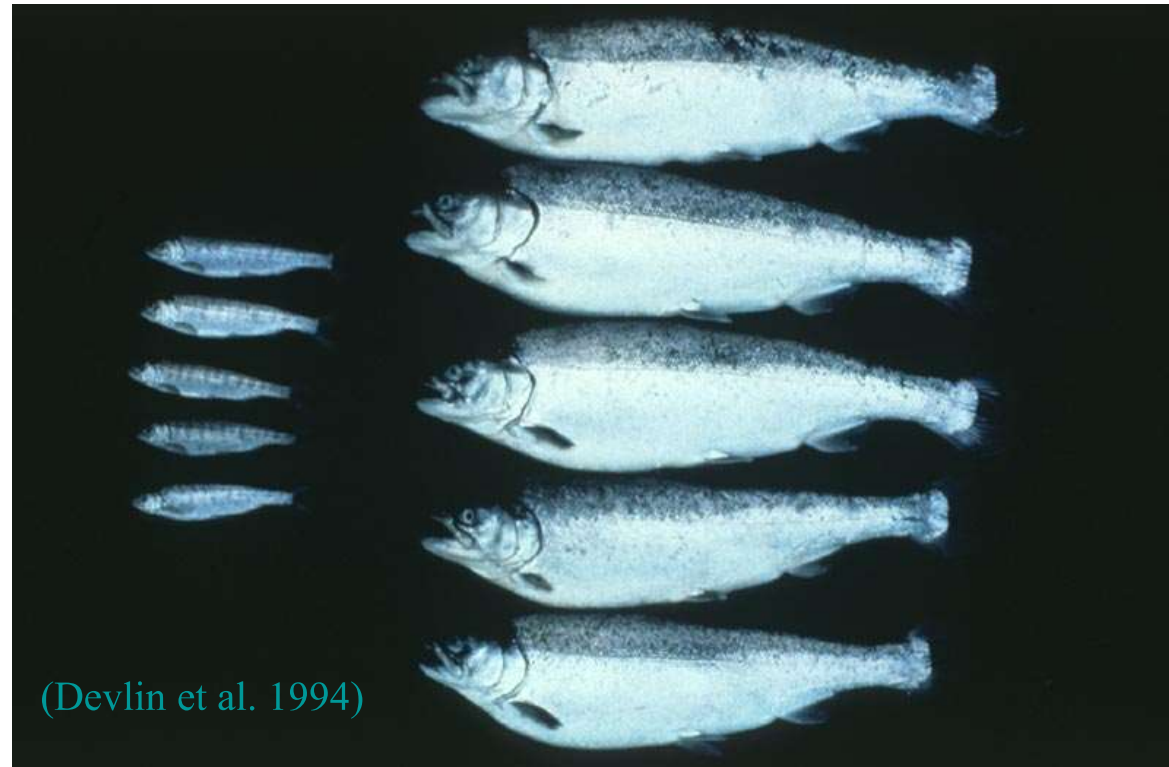


GH + AFP transzgenikus Atlanti lazac



GH transzgenikus Coho Salmon

Uj génkonstrukció:
Erős promóter (sockeye
MT) + extra növekedési
hormon gén
(sockeye GH).



A növekedési hormon hideg vízben is termelődik.

GH transzgenikus Coho Salmon



Coho siblings born at the same time in Bob Devlin's laboratory



A genetically engineered salmon (above) will grow ten to eleven times faster than normal fish (below).

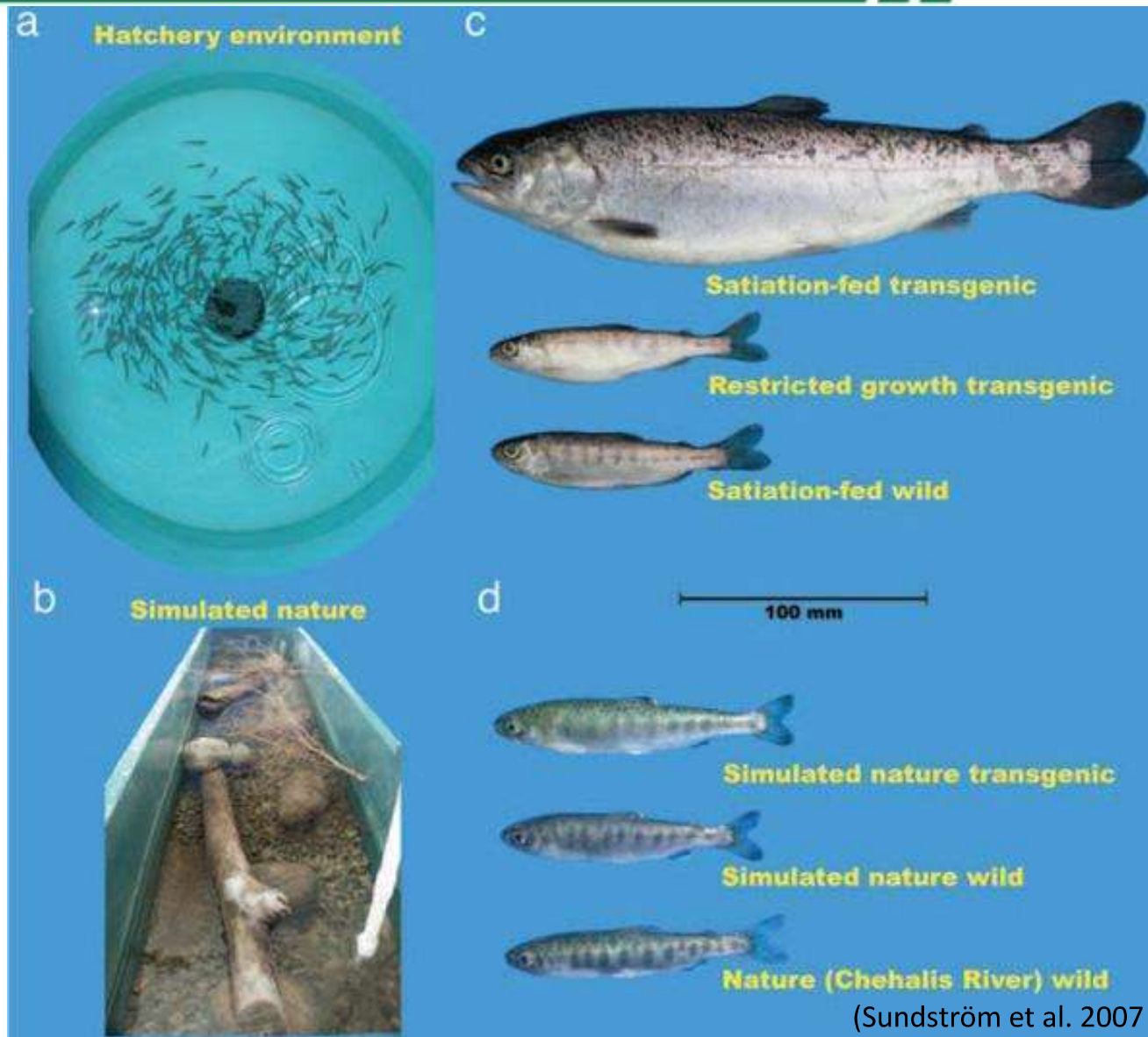
GH transzgenikus Atlanti lazac 2.

**Ocean pout antifreeze gén promóter +
chinook salmon növekedési hormon gén**

**1.2 kg vs. 200 g
7.5 hónapos halak**



Környezeti interakció



(Sundström et al. 2007),

Transzgénikus „coho salmon” fejlődési rendellenességek

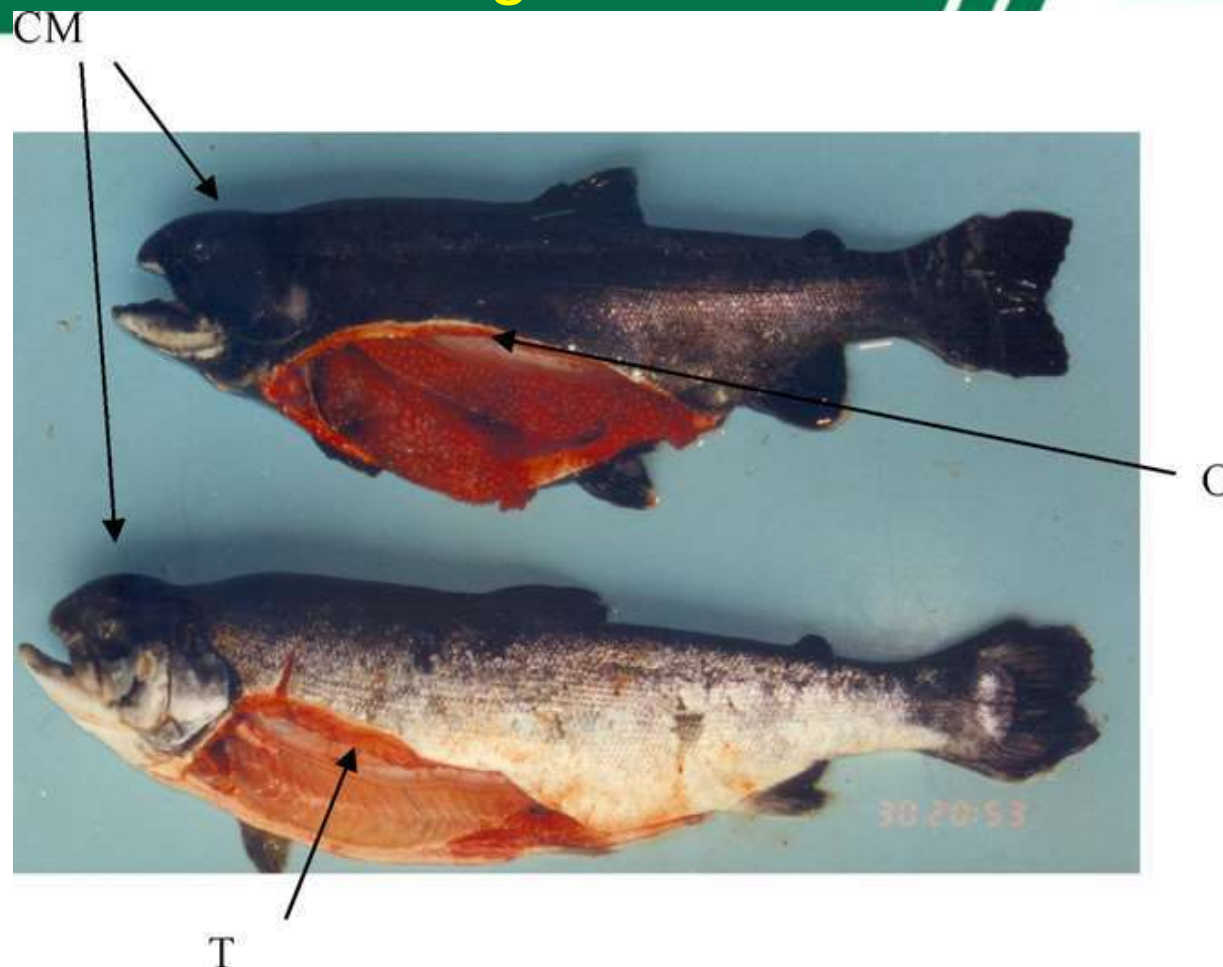
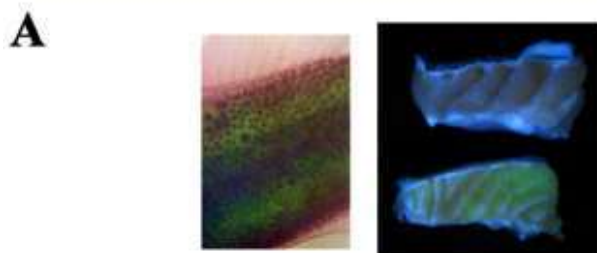


Fig. 1. Transzgéniku OnMT-GH1 ikrás (fent) és tejes „coho salmon” egyedeken kifejeződő koponya elváltozás (CM) és ivarérési dimorfizmus. Az ikrás jól fejlett ováriummal rendelkezik (O), míg a tejes heréje gyengén fejlett (T).

Overexpression of follistatin in trout stimulates increased muscling

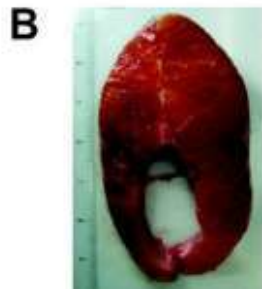
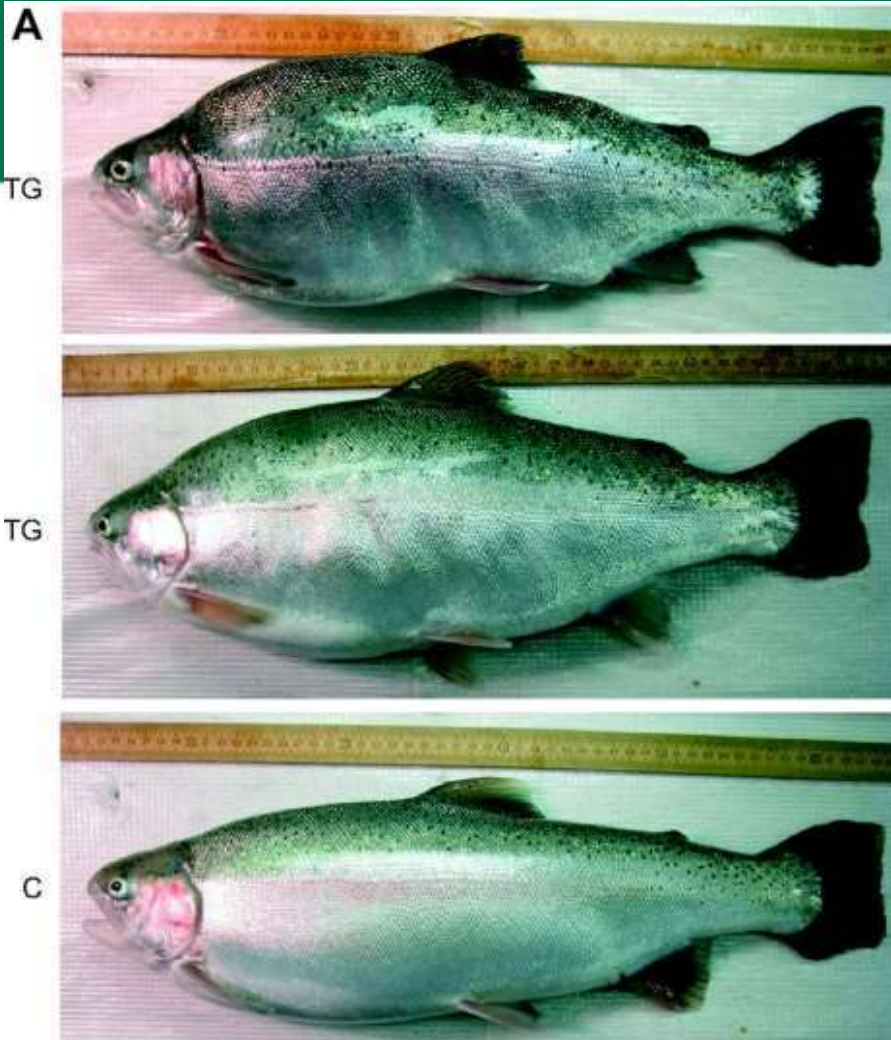


B: control (bottom) and transgenic trout overexpressing follistatin (top and middle). The whole body cross sections are from the respective individuals and were excised immediately anterior to the dorsal fin. All images were captured at an identical distance and camera settings.



A: green fluorescent protein (GFP) larval muscle (left) and hypaxial muscle tissue from 2-yr-old control (top) and GFP transgenic trout photographed under 365 nm light

Activin II B receptor transgenic rainbow trout



Localized muscling exhibited by the P1 founder generation of rainbow trout. P1 transgenic individuals exhibit localized muscling in both the abdominal and epaxial regions of the musculature.

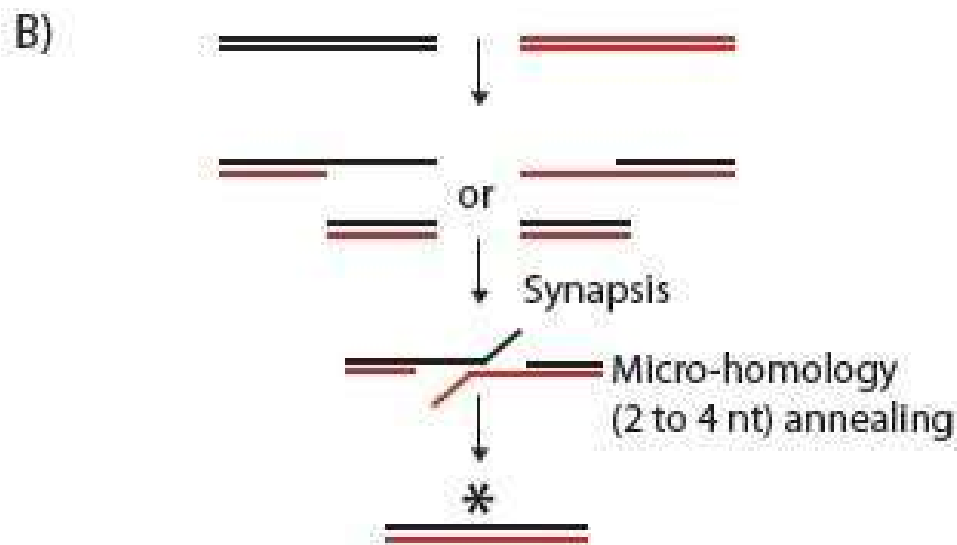
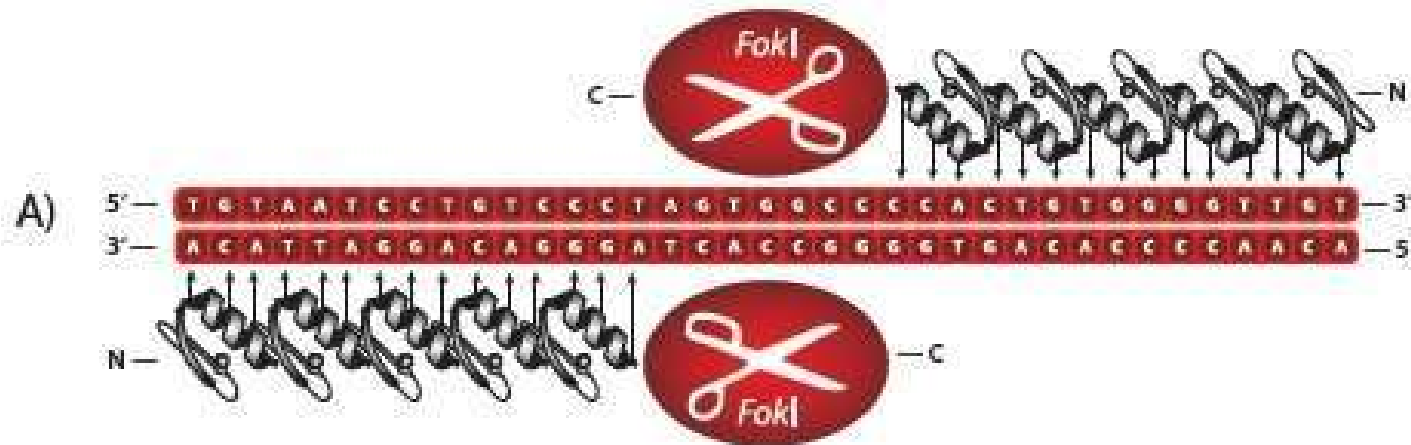
A:

TG - Morphology of 2-year-old *acvr2b*⁺ transgenic

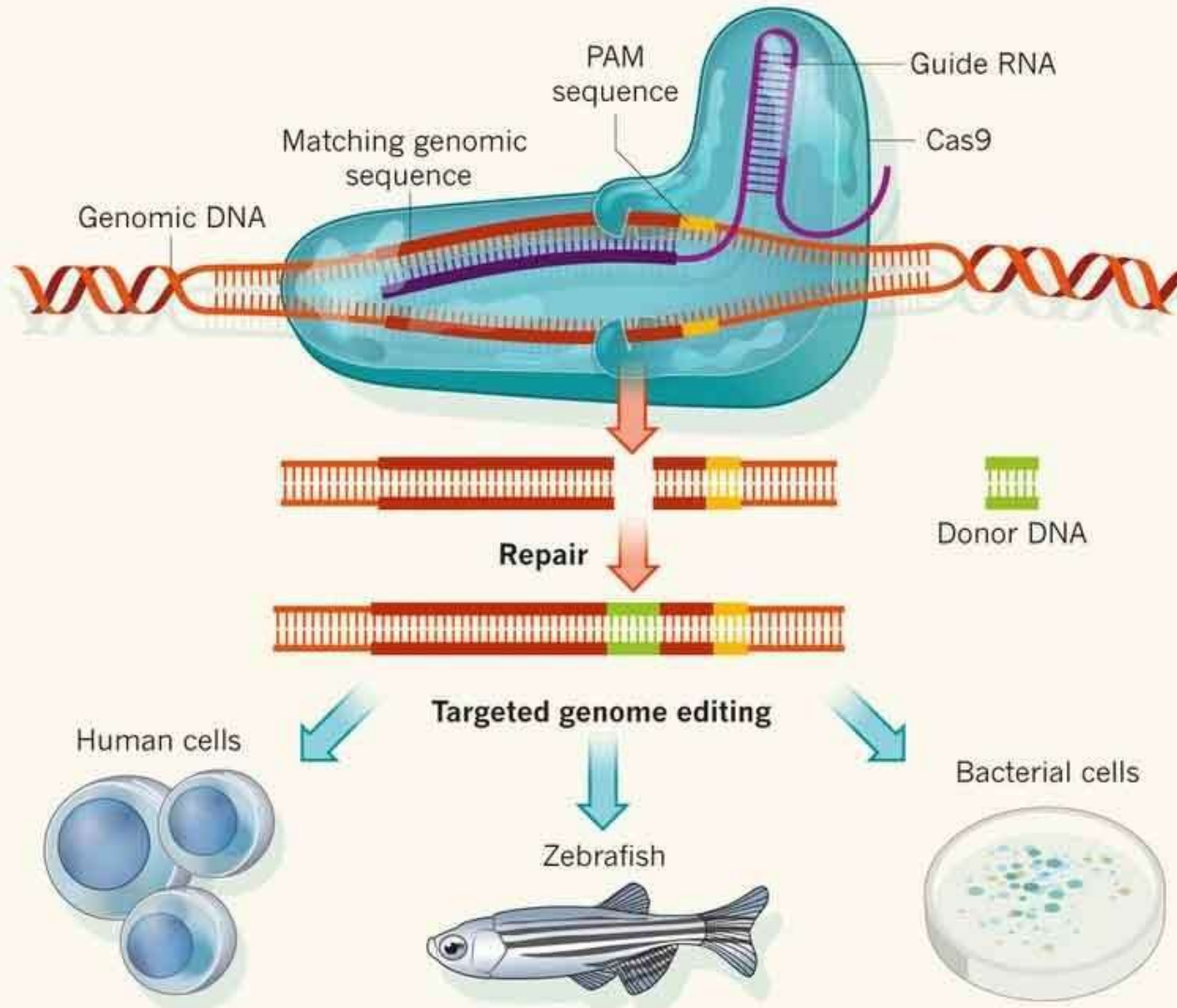
C - Control

B: Cross-section of a P1 transgenic fish reveals asymmetrical skeletal muscle growth.

Zinc fingers

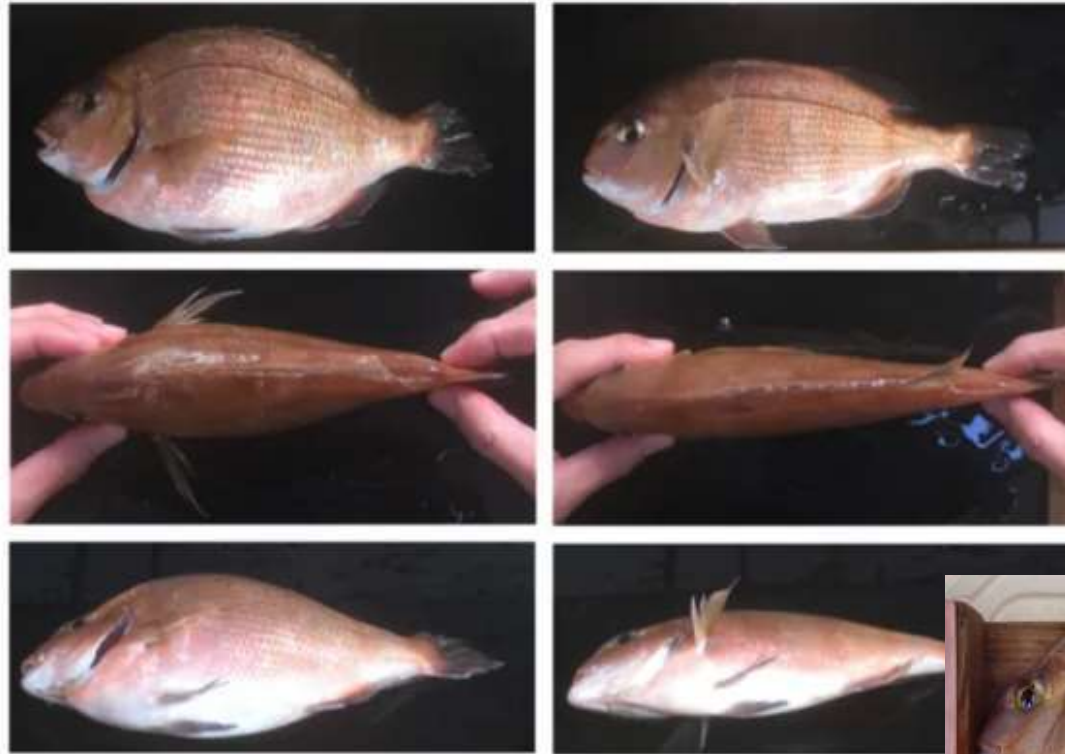


CRISPR



Production of a breed of red sea bream *Pagrus major* with an increase of skeletal muscle mass and reduced body length by genome editing with CRISPR/Cas9

(Aquaculture, Volume 495, 1 October 2018, Pages 415-42)

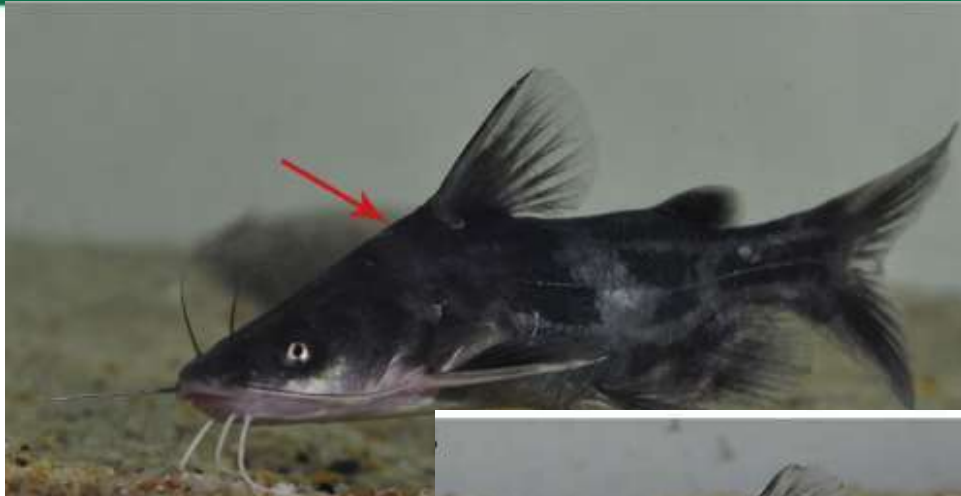


Myostatin (Pm-mstn) complete knockout

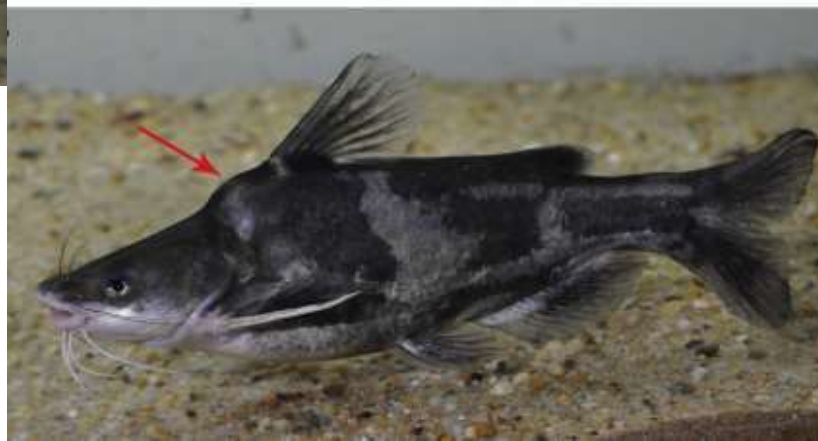
16% increas



The genome- edited-*mstna* yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)



The **myostatin** knockout yellow catfish had increasing muscle fiber number but decreasing muscle fiber size in the skeletal muscle.



grew and bred normally,
37% gain

Kyoto firm puts genome-edited tiger puffer on the table



In the genome-edited fish strain, a **leptin receptor** reducing appetite was removed, leading to growth at double speed and improved feed utilization efficiency. 1.9 times larger on average and 2.4 times larger than wild-type

Production of Transgenic Crayfish



Procambarus clarkii



Transgenerational Infection



Pantropic Retroviral Vector



Mating/Spawning



Hatching/Larvae

Produce Transgenic Clam

Spawning Induction



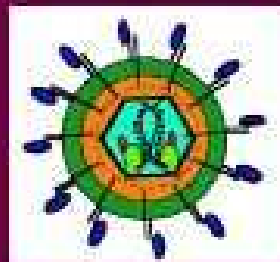
Fertilized Egg



Vitelline Layer



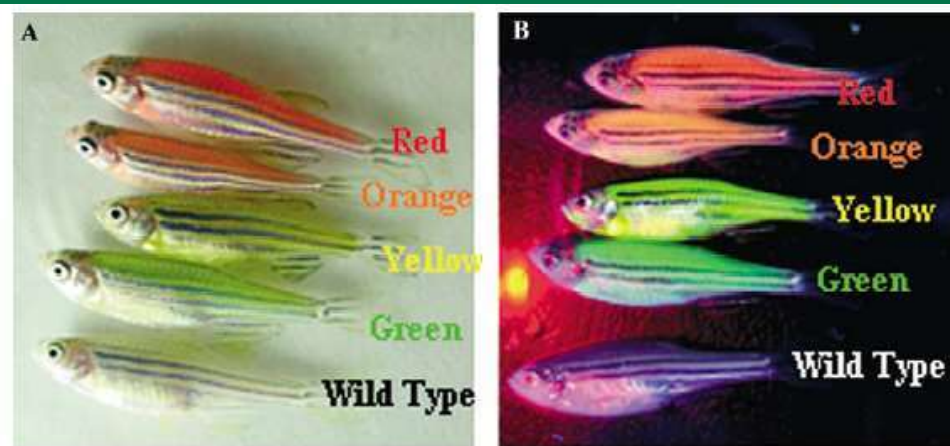
Pan tropic Retroviral Vector



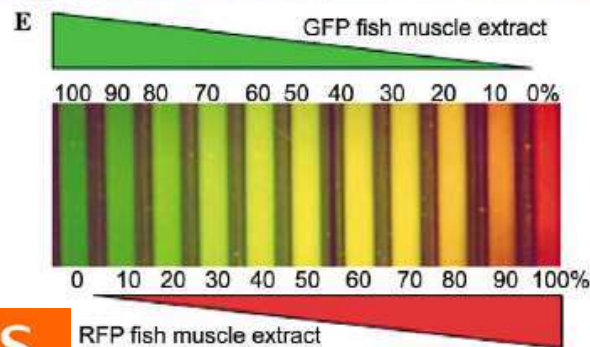
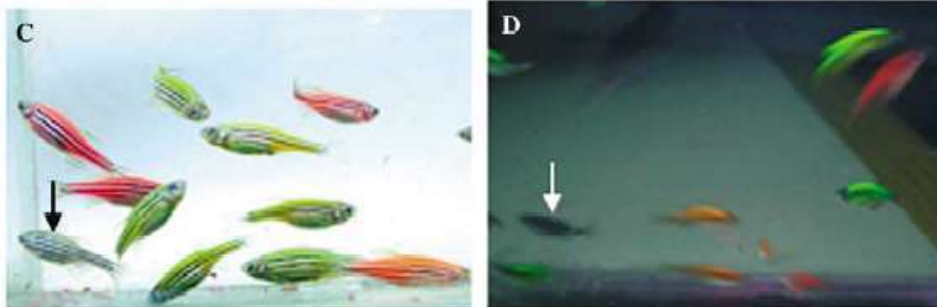
Electroporation



Fluorescens transzgenikus zebradánió



nappali fényben + UV (A)
385nm ultraibolya fényben (B).
nappali fényben (C)
385nm ultraibolya fényben (D).



GloFish



megvásárolható:

- Thailand
- USA

Nem engedélyezett:

- California
- EU
- Canada



<http://www.glofish.com/>

GloFish

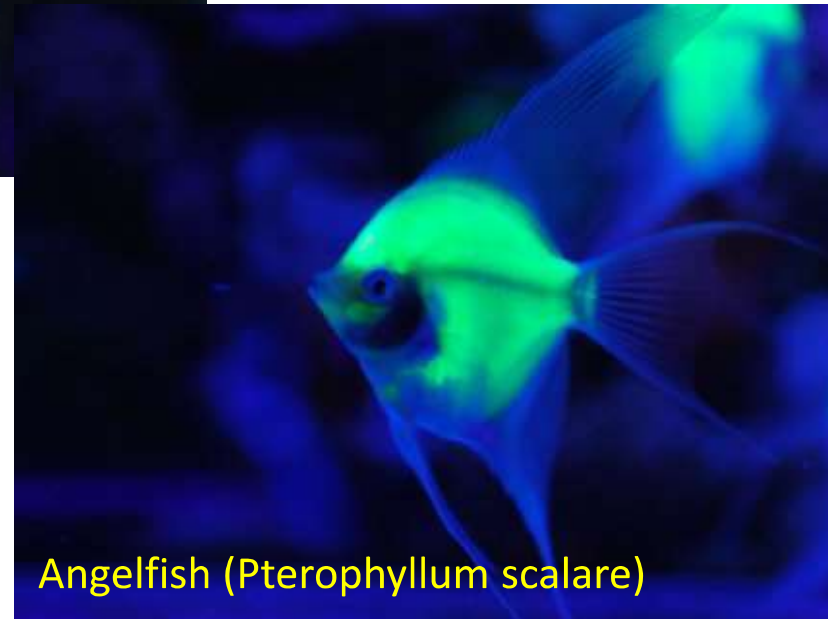


Convict cichlids (*Amatitlania nigrofasciata*)



Taiwan's Council of Agriculture
Bejelentés:
28 June 2010

A tervek szerint 2012- ben
szeretnék a diszhal piacra
bevezetni ezt a „cichlid” fajt



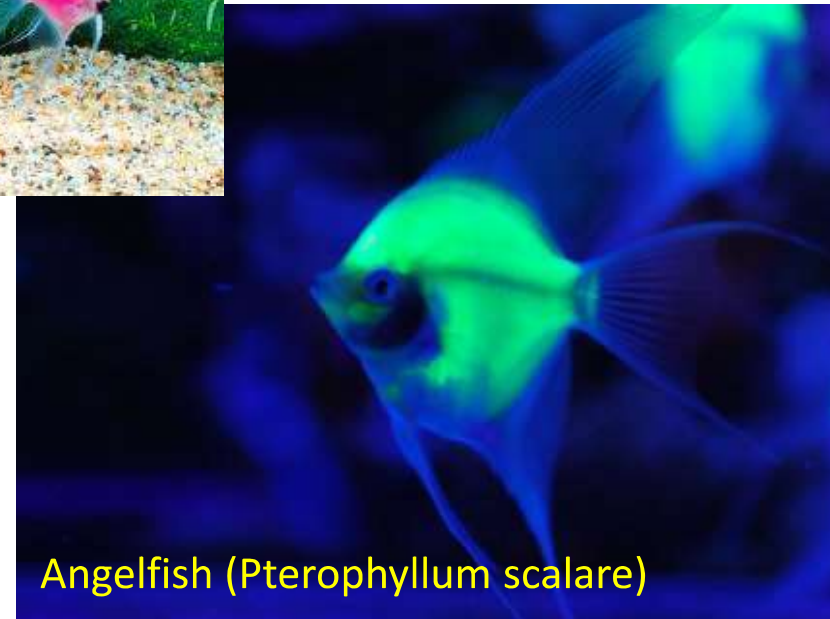
Angelfish (*Pterophyllum scalare*)

Convict cichlids (*Amatitlania nigrofasciata*)



A tervek szerint 2012- ben szeretnék a diszhal piacra bevezetni ezt a „cichlid” fajt

Taiwan's Council of Agriculture
Bejelentés:
28 June 2010



Angelfish (*Pterophyllum scalare*)

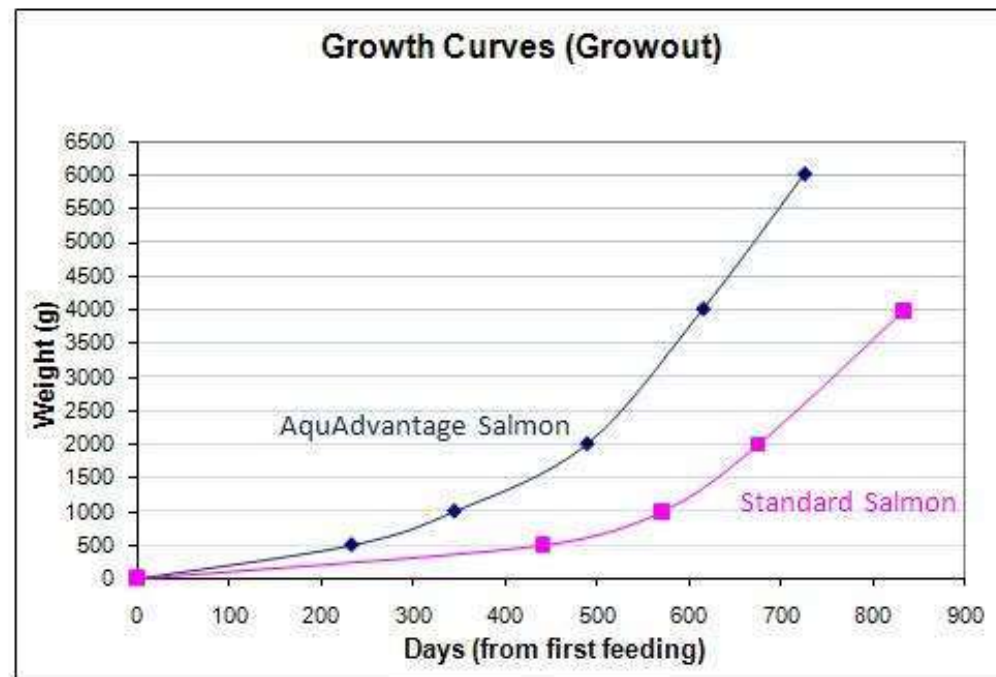


Entis E. (1998) Taste testing at a top Canadian restaurant. Aqua Bounty Farms 1:1-4

AquAdvantage[™] Atlanti lazac (Aqua Bounty Technologies Inc., Waltham, MA), egy gyorsított növekedésű étkezési hal engedélyeztetése van folyamatban az US Food and Drug Administration (FDA) 1999-óta ([Logar and Pollock, 2005](#))

Ocean pout antifreeze gén promóter + chinook salmon növekedési hormon gén

Triploidizációval sterilizált (második sarkitest kilökődésének gátlása+ cell sorter ellenőrzés kikelés előtt)



Glowing Sushi



