



Magyar Agrár - és Élettudományi Egyetem

Szent István Campus

Mezőgazdasági biotechnológus szak

**Magas koleszterintartalmú takarmány hatása NOX5 génkiütött nyulakra;
génexpressziós vizsgálatok**

Belső konzulens: Bodrogi Lilla

tudományos főmunkatárs

Pintér Tímea

tudományos segédmunkatárs

Készítette: Lóki Lilla

DGNFML

nappali tagozat

Intézet/Tanszék: Genetika és Biotechnológia Intézet

Állatbiotechnológia Tanszék

Gödöllő

2022

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
1. Bevezetés és célkitűzés.....	4
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1. Reaktív oxigéngyökök.....	5
2.2. Az oxidatív stressz és az érlelmeszesedés.....	7
2.3. NADPH oxidázok.....	10
2.4. Nox 5.....	12
2.5. Patológias folyamatok.....	14
2.6. A NOX 5 KO nyúl.....	16
2.6.1. A kísérleti nyúl, miért jó modellállat a nyúl.....	16
2.6.2. A vizsgált NOX 5 génkiütött nyúl.....	20
3. A vizsgálatok módszerei.....	21
3.1. A kísérletben felhasznált állatok.....	21
3.2. Koleszterin etetés.....	21
3.3. Mintavétel.....	22
3.4. RNS tisztítás.....	22
3.5. A tisztított RNS gélelektroforézise.....	24
3.6. qRT-PCR módszer leírása.....	28
3.7. A $\Delta\Delta C_t$ analízis módszere.....	30

4. Eredmények és értékelésük.....	30
5. Összefoglalás.....	41
Irodalomjegyzék.....	42
Nyilatkozatok	

Rövidítések jegyzéke

NOX5: NADPH-oxidáz 5 enzim

LDL: alacsony sűrűségű lipoprotein

HDL: magas sűrűségű lipoprotein

qRT-PCR: kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció

ROS: A reaktív oxigéngyökök angol megfelelőjének „reactive oxygen species” rövidítése

SOD: szuperoxid-dizmutáz enzim

GPx: glutation-peroxidáz enzim

CAT: kataláz enzim

NOS: nitrogén-monoxid szintáz enzim

GAPDH: gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz gén

1.: Bevezetés és célkitűzések

A szív- és érrendszeri betegségek és az oxidatív stressz közötti kapcsolat jól ismert jelenség, amely a szervezet redox rendszerének felborulásához és a reaktív oxigéngyökök felé való eltolódáshoz vezet. Az emlős szervezetekre gyakorolt, jól ismert káros hatások mellett azonban a reaktív oxigéngyökök fontos szabályozó szerepet töltenek be. Ennek kulcsenzimeai a NADPH-oxidázok (NOX-ok és DUOX-ok), melyek elsősorban a reaktív oxigéngyökök szabályozott termeléséért felelősek.

Egyre több kutatás számol be ezen enzimek széleskörű biológiai funkcióiról, azonban a NOX5 izoforma esetében korlátozott ismereteink vannak, melynek legfőbb oka, hogy a modellállatként kedvelt rágcsálókban nem expresszálódik. A NOX5-öt először a herében és a limfoid szövetekben azonosították, a közelmúltban azonban az erekben is kimutatták, emiatt a vaszkuláris válaszreakciókban, valamint atheroszklerózis kialakulásában betöltött szerepére is jelentős figyelem fordítódik.

Mivel nyulak esetében a NOX5 expressziója igazolt herében, nyirokcsomóban, valamint aortában, további vizsgálatok céljából CRISPR technológiával létrehoztak egy NOX5-enzimhiányos nyúlmodellt. Ezeken az állatokon korábban koleszterinetetéses-kísérletet végeztek, mely eredményei arra mutatnak, hogy ez az enzim az alacsony expresszió mellett is jelentős hatással van az érlemezsedés kialakulására. A Nox5 gén hiányával párhuzamosan fokozódott az érlemezsedés mértéke a nyulak aortájában koleszterinetetés következtében, ami arra utal, hogy a NOX5 enzim jelenléte protektíven hathat a plakkképződéssel szemben. A jelenség pontos mechanizmusa még nem ismert, jelen vizsgálat a sejt szintű folyamatok megértéséhez járulhat hozzá.

Az atheroszklerózis kialakulásában az alacsony sűrűségű lipoproteinek (LDL) és gyulladásos faktorok jelenléte, valamint az oxidatív folyamatok együttesen játszanak szerepet. Az oxidatív stresszre adott sejtválaszok nyomon követhetők a szervezet antioxidáns védelmi rendszerében bekövetkezett változásokon keresztül. A munkám célkitűzése ezért, hogy a vérben lévő sejtes alkotókban az oxidáns-antioxidáns rendszerben fellépő expressziós változások eltéréseit hasonlítsam össze NOX5 génkiűtött és vad típusú állatok esetében.

A munkafolyamat:

-gének kiválasztása (háztartási gén és vizsgált gének)

-qRT-PCR primerek tervezése

- primerek tesztelése és a qRT-PCR reakció beállítása
- qRT-PCR vizsgálatok Nox5 KO és vad típusú állatok vérmintáin
- eredmények összehasonlítása és értékelés

2.: Irodalmi áttekintés

2.1.: Reaktív oxigéngyökök

A reaktív oxigéngyökök olyan atomok, molekulák vagy ionok, amik egy vagy több párosítatlan elektront tartalmaznak a külső elektronpályájukon, és általában rendkívüli reakciókészséget mutatnak. (Di Meo & Venditti 2020) Az angol megfelelője a „reactive oxygen species”, melynek rövidítése: ROS.

Ezen oxigénből származó kis molekulák közé tartozik a szuperoxid ($\bullet\text{O}_2^-$), a hidroxil gyök ($\bullet\text{OH}$), a peroxil-gyök ($\text{RO}_2\bullet$), és az alkoxil-gyök ($\text{RO}\bullet$) és bizonyos nem reaktív oxigénformák, amik vagy oxidálószeres és/vagy könnyen reaktív oxigénformákká alakulnak át, mint az ózon (O_3), hidrogén-peroxid (H_2O_2), az egyatomos oxigén ($^1\text{O}_2$) és a hipoklórossav (HOCl). A reaktív oxigéngyökök termelődése általában egy kaszkád reakció, ami a szuperoxid előállításával kezdődik. A szuperoxid gyorsan átalakul hidrogén-peroxiddá, akár spontán is, kiváltképp alacsony pH esetén, vagy a szuperoxid-dizmutáz enzim által katalizált reakcióban. A ROS termelődés kaszkádreakciójának további eleme a szuperoxid reakciója nitrogén-monoxiddal, aminek eredményeként peroxinitrit keletkezik, a peroxidáz által katalizált hipoklórossav keletkezés hidrogén-peroxidból, és a vas által katalizált Fenton reakció, ami a hidroxil gyök képződéséhez vezet.

A reaktív oxigéngyökök nagyszámú különféle molekulával reakcióba léphetnek, beleértve más, kis szervesetlen molekulákat, csakúgy, mint fehérjéket, zsírokat, szénhidrátokat és nukleinsavakat. Ilyen kölcsönhatások által a reaktív oxigéngyökök visszafordíthatatlanul tönkre tehetik, vagy megváltoztathatják a célmolekula funkcióját. (Bedard & Krause 2007)

A lipideket nagymértékben károsíthatják a szabadgyökök, lipid-peroxidáció által. A fehérjékre gyakorolt károsító hatásuk az enzimaktivitás elvesztését eredményezheti. A DNS-ben okozott károsodás mutagenézishoz és karcinogenezishoz vezethet. (Devasagayam et al. 2004)

Következésképpen a reaktív oxigéngyököket egyre gyakrabban az élő szervezetekben bekövetkező károsodások fő tényezőjeként azonosították. 1956-ban Harmann átütő megfigyelést tett a reaktív oxigéngyököknek az öregedés folyamatában betöltött szerepével kapcsolatban, és a reaktív oxigéngyökök, mint a sejtkárosodást okozó ágensek koncepciója széleskörben elfogadottá vált az öregedéssel kapcsolatos elméletekben.

Mégis, legalább egy előnyös szerepét a reaktív oxigéngyökök termelésének már korán felismerték, konkrétan a sejt védelmében betöltött fontos szerepét. Ez akkor vált egyértelművé, amikor felismerték a reaktív oxigéngyökök hiánya és a leukociták csökkent ölképessége közötti kapcsolatot. Azonban az utóbbi évtizedekben egy második, fontos elmélet is kialakult a reaktív oxigéngyökökkel kapcsolatban. A reaktív oxigéngyököknek valójában nem csak a sejtkárosodásban és a patogének megölésében van szerepük, de nagyszámú reverzibilis szabályozási folyamatban is részt vesznek, gyakorlatilag minden sejtben és szövetben. (Bedard & Krause 2007)

Ezért a reaktív oxigéngyökök kettős szerepet játszanak az élő szervezetekben: az aerob metabolizmus toxikus melléktermékei, amik oxidatív sérülést és szöveti működési hibákat okoznak, ugyanakkor jelzőmolekulákként funkcionálnak, amik előnyös stresszre adott válaszreakciókat aktiválnak. A kutatások során azt találták, hogy a reaktív oxigéngyökök kritikus szerepet játszanak a NF- κ B transzkripciós faktor irányítása alatt álló gének aktivációjában, a prosztaglandin bioszintézis mediátorai, az embrionális fejlődés során is funkcióval bírnak, továbbá jelátviteli molekulákként működnek a sejten belül és a sejtek közötti kommunikációban is. Fontos előrelépés volt a reaktív oxigéngyökök előnyös hatásait illetően az a felfedezés, hogy az egyszerű baktériumoktól egészen az emlősökig indukálhatnak redox-szenzitív jelátviteli kaskádokat, ami antioxidáns enzimek expressziós szintjeinek növekedéséhez vezet. (Di Meo & Venditti 2020)

A reaktív oxigéngyökök fiziológiás termelődése történhet más biológiai reakciók melléktermékeként is a mitokondriumban, a peroxisómákban és más sejtalkotókban. Azonban a fagocita NADPH oxidáz (NOX) volt az első példája egy olyan rendszernek, amelyről igazolták, hogy nem melléktermékként, hanem elsődleges funkciójaként termeli a reaktív oxigéngyököket. A NOX enzimsaládba tartozó új enzimek felfedezése demonstrálta, hogy az

olyan enzimek, melyeknek elsődleges funkciója a reaktív oxigéngyökök termelése nem csak a fagocitákban található meg, hanem gyakorlatilag minden sejtben. (Bedard & Krause 2007)

2.2.: Az oxidatív stressz és az érlemeszesedés

Az érlemeszesedést ma krónikus gyulladásos betegségnek tekintik. A túlzott ROS termelés által kiváltott oxidatív stressz kritikus, végső mechanizmusként jelenik meg az érlemeszesedés folyamatában. Habár az érrendszer homeosztázisához nélkülözhetetlen a termelődésük, a fokozott ROS termelés szerepet játszik az érkárosodásban. Az endogén antioxidánsok ellenőrzőpontokként működnek a reaktív oxigéngyökök termelés ezen nemkívánatos következményeinek elkerülése céljából, és az oxidáns/antioxidáns folyamatok egyensúlyhiánya az oxidatív stressz állapotához vezet. Az érlemeszesedéses betegségek kezelésére jelenleg alkalmazott szerek, mint az aszpirin, a sztatinok és a renin-angiotenzin rendszert gátló gyógyszerek pleiotróp antioxidáns hatást fejtenek ki.

Az érlemeszesedés egy krónikus gyulladásos betegség, amit a lipidek és a gyulladásos sejtek felhalmozódása jellemez a közepes és nagyméretű artériák falában. A betegség kialakulása együtt jár a gyulladást elősegítő jelátviteli rendszerek aktiválódásával, a citokinek/kemokinek expressziójának és az oxidatív stressz mértékének növekedésével.

Az érlemeszesedés kialakulásának kiindulási, kezdeti eseménye az endotélium (hámszövetréteg) sérülése az érfalban. Ennek következtében az LDL koleszterin bejut a szubendoteliális térbe és ott felhalmozódik. Az LDL oxidálódik, kóros állapotban oxidált LDL válik belőle. A módosult lipoprotein részecskék növelik a sejtadhéziós molekulák (például VCAM-1; P-és E szelektin) expresszióját az endotél sejtekben, aminek következtében a leukociták (főleg monociták és T-limfociták) összegyűlnek a szubendoteliális térben.

Kemoattraktáns fehérjék kölcsönhatásával - mint az MCP-1, az eotaxin és a gamma interferon (INF- γ) - ezek a gyulladásos sejtek az intima szövetrétegbe vándorolnak. A monociták makrofágokká differenciálódnak, különböző receptorokat expresszálnak, (mint a CD 36, SRA, és LOX-1) és felveszik a módosult lipoproteineket. Ezeket a lipidekkel megtelt makrofágokat habsejteknek hívják a megjelenésük miatt, és jelenlétük az artériák falában a kezdeti érlemeszesedéses elváltozás ismertetőjele. A T-limfociták és a hízósejtek, melyek az intima rétegbe vándorolnak, a habsejtekkel együtt különféle citokineket bocsátanak ki, amik serkentik a gyulladást és a ROS termelést.

Az ezen sejtek által kibocsátott növekedési faktorok, ugyanúgy, mint a reaktív oxigéngyökök serkentik a simaizom sejtek vándorlását és a kollagén lerakódást, ami plakk képződéséhez vezet. A reaktív oxigéngyökök előidézik a fent említett receptorok expresszióját a simaizom sejtekben és a habsejtté alakulásukat elősegítik. Indukálják a mátrix metalloproteinázok kibocsátását, ami lebontja a plakk kötőszövetes szélét/falát és az endotél sejtek alapmembránját, ami a plakk fizikai leválását okozza. A plakk fizikai leválása megtörténhet az endotél sejtek felszíni eróziójával az alapmembránjuk sérülése következtében; a plakkban lévő hajszálerek szakadása miatt, ami mikrovérömlenyt/trombózt okoz vagy a plakk pro-trombogén tartalmának kikerülésével, a kötőszövetes rész sérülése miatt.

Ezek a léziók hirtelen nagyobbodását okozzák, és trombózt válthatnak ki a plakkot tartalmazó artériákban. Ezek a fizikai zavarok nem mindig okozzák a véráramlás kóros elzáródását. Sokszor a véralvadásgátló biológiai útvonalak felülírják a folyamatokat és a gyógyulás kezdetét veszi. Ez további simaizom proliferációhoz és kollagén felhalmozódáshoz vezet, ezáltal a zsíros plakk több rostos kötőszövetet tartalmazó plakká alakul át.

A NADPH oxidáz, a xantin-oxidáz, a mitokondriális enzimek, a lipoxigenáz enzimek, a mieloperoxidáz és a szétkapcsolt endotéliális nitrogén-monoxid szintáz enzim (eNOS) a fő reaktív oxigéngyök termelők az erekben.

A xantin-oxidáz megtalálható az endotélium sejtjeiben és a vérplazmában; szuperoxid aniont és hidrogén-peroxidot állít elő. Az érlelmeszesedéses plakkban magasabb mennyiségben mutatták ki. Az angiotenzin II és az oszcilláló nyírófeszültség növeli az endoteliális xantin-oxidáz expresszióját. Kutatások kimutatták, hogy a xantin-oxidáz inhibitorok csökkentik az érlelmeszesedés kialakulását ApoE génkiütött egérben, és hogy enyhítik az endoteliális működési zavart erős dohányosoknál. Az enzim serkenti a LOX-1 és CD-36 receptorok expresszióját a makrofágokon és az érrendszeri simaizomszövet sejteken, és növeli a reaktív oxigéngyök termelést. Ez viszont aktiválja a NLRP3 inflammaszómát és egyéb downstream gyulladáskeltő mediátorokat, ami a makrofágokból habsejtek kialakulását eredményezi. Emellett az enzim által előállított húgysav a CD-36 expresszióján keresztül váltja ki a habsejt képződést.

A lipoxigenáz enzimek hidrogén-peroxidot termelnek, arachidonsavat használva szubsztrátként. Az 5-lipoxigenáz és a 12 és 15-lipoxigenázok kötődnek az érlelmeszesedéshez közülük. Az érfali simaizomszövet sejtekben NOX enzimaktivitást indukálnak, oxidatív stresszt okozva ezzel az érrendszer szöveteiben. A lipoxigenázok végtermékei, a leukotriének,

maguk is elősegítik a gyulladást, és aktiválják az endoteliális sejteket, a makrofágokat és a habsejteket. Együttal mátrix metalloproteinázok és citokinek felszabadulásához vezetnek.

A mieloperoxidáz főképp a neutrofil granulocitákban és kismértékben a monocitákban található, és hipohalogénsavakat termel, mint a hipoklórossav (HOCl) a hidrogén-peroxiddal történő reakcióval. Baktericid hatása van, és fontos szerepet játszik az immunrendszerben. Ennek a rendszernek a működési hibája ROS termelését eredményezi, ami oxidatív stresszt okoz. Továbbá a mieloperoxidáz oxidálja az LDL-t, a HDL-t, és a nitrogén-monoxidot, ezáltal kiváltva és erősítve az érlemezsedést.

A jelentősebb antioxidáns rendszerek az érfalban a szuperoxid-dizmutázok (SOD), a glutation-peroxidázok (GPx), a kataláz (CAT), a paraoxonázok, a tioredoxinok és a nitrogén-monoxid (NO). A szuperoxid-dizmutáz hidrogén-peroxiddá alakítja a szuperoxidot, amit tovább bontanak a glutation-peroxidázok, a katalázok és a tioredoxin. Ennek az enzimnek három izoformáját különböztetik meg – SOD1(citoplazma, és mitokondrium belső membránja); SOD2 (mitokondrium mátrixában); SOD3 (extracelluláris) – az alapján, hogy hol található.

A SOD felszabályozása nem jár közvetlenül csökkent reaktív oxigéngyök termeléssel. Ez a távoli oxidánsok megnövekedett mennyiségének köszönhető, amik a végtermék, a hidrogén-peroxid miatt termelődnek, és elősegítik az érlemezsedést. A kataláz enzim túltermeltetése, ami képes lebontani a hidrogén-peroxidot, a SOD1-el együtt, ApoE génkiütött egerekben csökkentette az érlemezsedést, azonban egymagában a SOD1 túltermeltetése növelheti az ateroszklerózis mértékét.

A kataláz enzim a hidrogén-peroxidot vízzé és oxigénné alakítja. A CAT a peroxisómákban található, és javítja az érlemezsedést magas zsírtartalmú diétán tartott egér modelleken.

A glutation-peroxidáz antioxidáns enzim, sokféle sejt típusban megtalálható és számos peroxidáz mennyiségét képes csökkenteni, például a lipid-peroxidázokét és az oxidált foszfolipidekét. A glutation-peroxidáz túltermeltetése Apo E génkiütött egérben csökkentette az olyan érlemezsedést elősegítő folyamatokat, mint az endotéliumban és a monocitákban az adhéziós molekulák expressziója.

A paraoxonázok egy fehérjecsalád, (PON 1; PON 2; PON 3), ami csökkenti az oxidatív stresszt, a lipid peroxidációt és az érlemezsedést modellállatokban. Paraoxonáz 1 a HDL-hez kapcsolódik és a felszabályozása ApoE génkiütött egérben véd a lipid oxidációtól és csökkenti az érlemezsedést. A paraoxonáz 2 az érfalban expresszálódik, az endoplazmatikus

retikulumban vagy a mitokondrium membránjában található meg és csökkenti a szuperoxid képződését. Áthelyeződhet a plazmamembránba a lipid peroxidáció hatására, és az eger modellben csökkentette az érlemezésedet és az oxidatív stresszt. Hasonlóan a paraoxonáz 3 is megakadályozza a szuperoxid képződést a mitokondriumban, alacsony szinten expresszálódik a plakkokban, ami védő funkcióra utal.

A nitrogén-monoxid szintáz (NOS) enzim egyszerre játszik antioxidáns és az oxidációt elősegítő szerepet az érlemezésedetben. Az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) konstitutívan expresszálódik az endotélium sejtjeiben. Az általa termelt nitrogén-monoxid gátolja az LDL oxidációját, a leukociták adhézióját és migrációját, a vérlemezkék aggregációját és az érrendszeri simaizom sejtek proliferációját. Az eNOS hiánya ApoE génkiütött egerben fokozza az érlemezésedet. A neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS) a centrális és perifériális idegsejtek mellett az erek falában is megtalálható, hozzájárul az ér tágulásához, így érlemezésedet ellenesnek tekinthető.

Másrészt az indukálható NOS (iNOS), ami gyulladás, oxidatív stressz és vérmérgezés esetén indukálódik, érlemezésedet előidéző hatású, valószínűleg a peroxinitrit képződés miatt, ami egy érlemezésedet elősegítő oxidáns. Emellett az iNOS aktivitás relatív BH4 hiányhoz vezethet, amire az eNOS-nak szüksége lenne, de a hiány miatt szétkapcsolódik ez utóbbi enzim. A szétkapcsolt eNOS ROS termelő, így hozzájárul az ateroszklerózis kialakulásához.

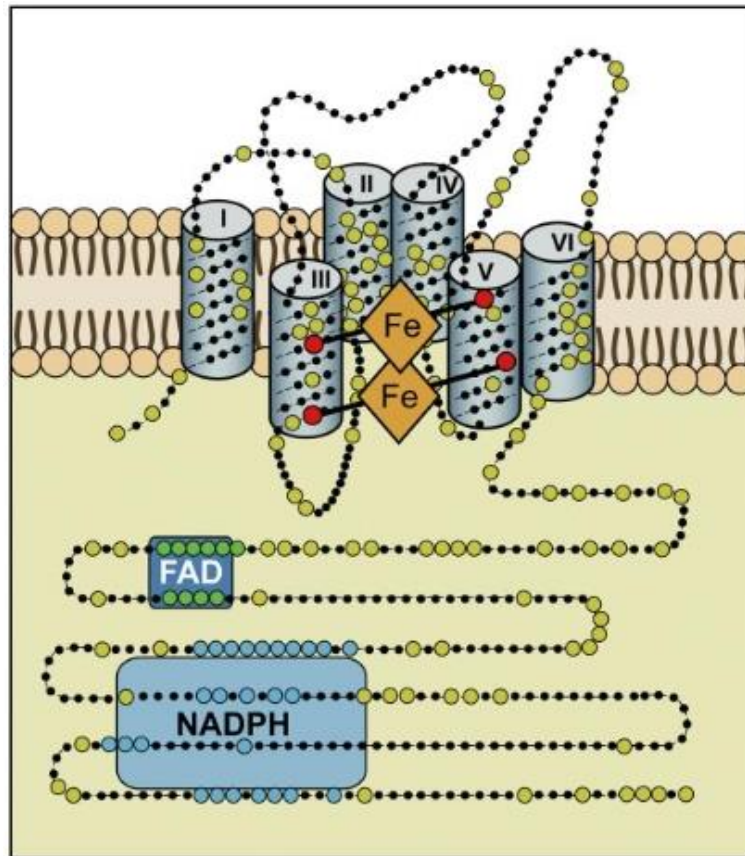
A szív-és érrendszeri betegségek kialakulásában szerepet játszó rizikó tényezők szinte mindegyike során megjelenik az oxidatív stressz állapota. A magas vérnyomás, a cukorbetegség, a dohányzás, a diszlipidémia aktiválja a NADPH oxidáz rendszert, ami többlet szuperoxid anion termelődéshez vezet. Ezek a körülmények L-arginin és BH4 (eNOS kofaktor) hiányhoz vezetnek, ami az eNOS szétkapcsolódását, endoteliális működési zavart és még több reaktív oxigéngyök termelődést okoz. A dohányzás erős endoteliális NADPH oxidáz aktivátor, emellett közvetlenül is oxidálja az LDL-t. Az oxidált LDL jobban aktiválja a NADPH oxidázt, mint a natív LDL, és csökkenti az eNOS aktivitását. (Kattoor et al. 2017)

2.3.: NADPH oxidázok

Sokáig a NADPH - oxidáz általi szuperoxid termelést csak a fagocitákra jellemző tulajdonságnak tekintették. A fagocita NADPH-oxidázok citokróm alegységének 6 homológját

mutatták ki: NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1, és DUOX2. Ezek a homológok a fagocita NADPH-oxidázzal (NOX2/ gp91^{phox}) együtt alkotják a NADPH-oxidáz, azaz NOX enzimcsaládot. Ezek az enzimek transzmembrán fehérjék, amik elektronokat szállítanak a plazmamembránon keresztül és szuperoxidot állítanak elő, ami további reaktív oxigéngyökök képződéséhez vezet. Az elektrontranszport során az elektron akceptor molekula általában oxigén. Az enzimcsalád különböző tagjainak aktivációs mechanizmusa és szöveti eloszlása markánsan eltér. A NOX enzimcsalád tagjainak fiziológiás funkciói közé tartozik a gazdasejt védelme, fehérjék poszttranszlációs módosítása, sejtek közötti jelátvitel, a génexpresszió szabályozása és a sejtosztódás és – differenciáció szabályozása. Ezek az enzimek sokféle kóros folyamat kialakulásában is szerepet játszanak. A hiányuk immunszuppresszióhoz, pajzsmirigy alulműködéshez vezethet. A megnövekedett NOX enzimaktivitás is sok kóros folyamatot vált ki, különösen szív- és érrendszeri betegségeket, és neurodegenerációt.

A közös funkciójuknak megfelelően a NOX enzimeknek vannak konzervált strukturális/szerkezeti tulajdonságaik, amik közősek az enzimcsalád minden tagjában. (1. ábra) A karboxil-terminális végről elindulva a konzervált strukturális elemek a következők: 1.) NADPH kötőhely a karboxil-terminális végen; 2.) FAD kötő régió a karboxil-terminális véghez legközelebb eső transzmembrán domén közelében; 3.) hat konzervált transzmembrán domén; 4.) négy magas szinten konzervált hem kötő hisztidin, kettő a 3. és kettő az 5. transzmembrán doménban. (Bedard & Krause 2007)



1. ábra: A NOX enzimek általános szerkezete (Bedard & Krause 2007)

A fagocitákra jellemző Nox 2 plazmamembránhoz kötött alegységből (gp91phox, azaz Nox2 és p22phox); 3 a citoplazmában található alegységből (p47phox, p67phox, és p40phox) és egy alacsony molekulásúlyú G fehérjéből (Rac1 vagy Rac2) áll, amelyek nyugalmi állapotban nincsenek összekapcsolva. Stimuláció esetén a plazmamembrán alegységek összekapcsolódása a citoplazmában található alegységekkel és a Rac1 vagy 2 fehérjével szuperoxid termelődéséhez vezet. A katalitikus alegység a Nox2, ami transzmembrán heterodimert alakít ki a p22phox alegységgel és elektrontranszportláncként funkcionál.

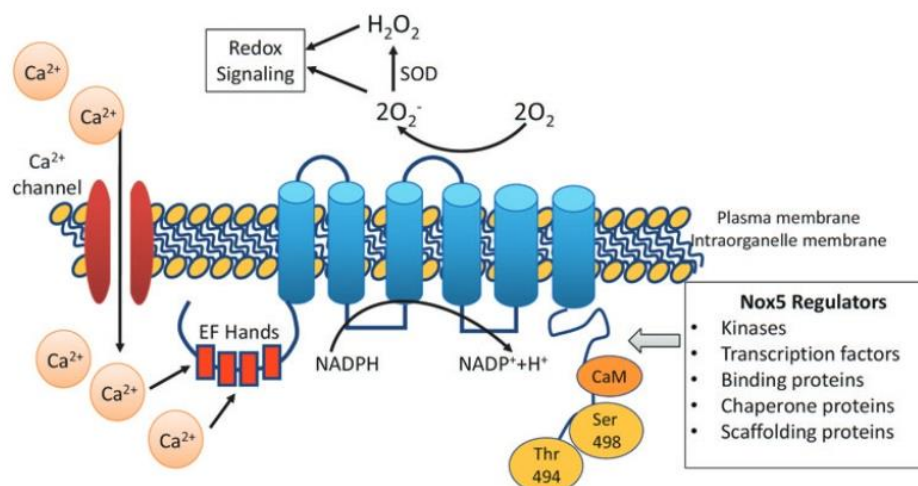
A p22phox, egy nem glikozilált, membránhoz kötött fehérje, a molekulatömege 22 kilodalton, 1:1 arányban kapcsolódik össze a Nox-szal. A fő funkciója a Nox1,2,3, és 4 fehérjék stabilizálása, és a citoplazmában található alegységekkel való interakció a Nox1,2 és 3 esetében. Míg a Nox1-nek, 2-nek, 3-nak és 4-nek feltétlenül szüksége van a p22phox alegységre az aktivációhoz, addig a Nox5 nem igényli ezt. (Touyz et al. 2019)

2.4.: Nox 5

A NOX5-öt 2001-ben fedezte fel két kutatócsoport. Cheng és munkatársai egy 565 aminosavból álló fehérjét kódoló cDNS-nek írták le, míg Banfi és munkatársai egy 700 aminosavból álló fehérjét kódoló cDNS-nek írták le. Az ember esetében a NOX5 gén a 15. kromoszómán található. A Banfi és társai által leírt izoformákat (NOX5 α , - β , - γ és δ) egy hosszú intracelluláris NH₂ véget tartalmazó Ca²⁺ kötő EF kéz domén különbözteti meg a NOX1-NOX4 enzimektől. (2. ábra) Az ötödik izoformából, amit Cheng és munkatársai írtak le (NOX5 ϵ vagy NOX5-S) hiányzik ez a régió, így jobban hasonlít a szerkezete a NOX1-4 enzimekére. Immunoblot vizsgálatokon a NOX5-öt egy 85 kilodalton méretű fehérjeként írták le. Ez összhangban van a becsült molekulatömegével, és arra utal, hogy a fehérje nem glikozilált. Ugyanúgy, mint a NOX2 esetében a NADH nem helyettesítheti a NADPH-t, mint citoplazmában található elektrondonort a NOX5 esetében sem.

A NOX5 mRNS expresszióját a herében, a lépben, a nyirokcsomókban, az érfalak simaizmában, a csontvelőben, a hasnyálmirigyben, a méhlepényben, a petefészekben, a méhben, a gyomorban és többféle magzati szövetben mutatták ki. A NOX5 aktiválásában a citoplazmában bekövetkező Ca²⁺ koncentráció növekedése vesz részt. (Bedard & Krause 2007)

A megnövekedett citoplazmában található Ca²⁺ koncentráció elemi szükséglet a Nox5 aktivitáshoz, mint azt sejtkultúrákon végzett tanulmányok bizonyítják, ahol Ca²⁺ nélküli pufferben nem történik reaktív oxigéngyök képződés. (Touyz et al. 2019) Az enzim Ca²⁺ kötő doménja független egységként viselkedik, és az ion szintjének emelkedésére konformációs változásokon megy keresztül. Úgy vélik, ez aktiválja az enzimet egy intramolekuláris fehérje-fehérje kölcsönhatáson keresztül, ami a Ca²⁺ kötő régió és az enzim karboxil-terminális vége között játszódik le. (Bedard & Krause 2007)



2. ábra: A NOX5 szerkezete és szabályozása (Touyz et al. 2019)

2.5.: Patológiás folyamatok

A megnövekedett mennyiségű ROS termelés és a megváltozott redox jelátvitel az érrendszerben szerepet játszanak a szív-és érrendszeri betegségek kórélettanában, beleértve a magas vérnyomást, és ezt részben a megnövekedett Nox enzimaktivitásnak tulajdonítják.

A Nox1, Nox2, Nox4 és Nox5 gének kifejeződnek és az enzimek funkcionálisan aktívak az emberi érrendszer sejtjeiben. A Nox1-et, Nox2-t és Nox4-et már jól jellemezték szív-és érrendszeri betegségmodelleken, a Nox5 -ről azonban kevesebbet tudunk. Ez részben a kísérleti modellállatok hiányával hozható összefüggésbe, mert a rágcsálókból hiányzik ez az enzim. Az emberi Nox5 gént expresszáló egereken végzett tanulmányok rávilágítottak ezen enzim lehetséges szerepére a szív-és érrendszeri betegségekben. Egy genomszintű asszociációs vizsgálat (GWAS) a Nox5 gént a vérnyomás szabályzásával összefüggésbe hozható génként azonosította. 475000 személyen végezték ezt a GWAS vizsgálatot, és a szisztolés vérnyomással mutatta a legszorosabb összefüggést a Nox5.

A magas vérnyomáshoz hozzájáruló mechanizmusok összetettek, sok patológiás folyamatot magukba foglalnak, beleértve a Na^+ transzport szabályozásának megváltozását a vesében, az endotélium működési zavarát, az érrendszer hiperkontraktilitását, az artériák elmeszesedését, az immunsejtek aktiválódását és a gyulladást. A közös ezekben a folyamatokban az oxidatív

stressz, a túlzott Nox enzimek általi reaktív oxigéngyök termelés miatt, a nitrogén-monoxid (NO) csökkent biológiai hozzáférhetősége miatt, és a csökkent antioxidáns kapacitás miatt.

Az oxidatív stressz megnövekedett redox jelátvitellel, transzkripciós faktorok aktiválásával, gyulladást elősegítő jelátviteli útvonalak serkentésével, stresszhez kötődő kinázok indukálásával és DNS károsodással, azaz sejtkárosodáshoz, és érrendszeri működési zavarhoz vezető molekuláris folyamatokkal jár együtt. Míg sok kísérleti adat támasztja alá az oxidatív stressz kiváltó tényezőként való szerepét a magas vérnyomás kialakulásában, addig a reaktív oxigéngyökök direkt szerepére a magas vérnyomás kórélettanában hiányosak az ismeretek. Sok klinikai kutatás mutatott ki azonban pozitív összefüggést a vérnyomás és az oxidatív stressz biomarkereinek sejtplazmában található szintjei között, beleértve a malondialdehid, a fehérjék oxidációs termékei és az F2-izoprosztánok mennyisége között, és fordított összefüggést a vérnyomás és a plazmában található antioxidánsok között, például teljes antioxidáns kapacitás, a szuperoxid-dizmutáz és az antioxidáns vitaminok (E és C-vitamin) mennyisége között. Ezen erős, az oxidatív stresszt és a magas vérnyomást összekötő összefüggések ellenére további vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy megcáfolhatatlanul igazolják az ok-okozati összefüggést.

A Nox enzimek közvetlen szerepét a magas vérnyomás kialakulásában demonstrálták Nox1, Nox2, Nox4 vagy p47phox hiányos egereken, ahol az angiotenzin II által indukált magas vérnyomás és az endotéliális működési zavar csökkent. Míg az angiotenzin II kiváltotta magas vérnyomás akut modelljei esetében tapasztalható Nox enzimaktivitás, addig a krónikus modelljei az angiotenzin II függő magas vérnyomásnak a Nox1-től és a Nox2-től függetlennek tűnnek. A Nox-okat az érfalban túlexpresszázó transzgénikus egerek az angiotenzin II-re túlzott vérnyomási és érrendszeri válaszreakciót mutatnak. A magas vérnyomású egerek és patkányok kezelése különféle antioxidánsokkal, például C és E vitaminnal, szuperoxid-dizmutázzal csökkentette az érrendszeri és az egész szervezetet érintő oxidatív stresszt és a vérnyomást. A nitrogén oxid mennyiségének növelésére szolgáló stratégiák - beleértve a BH4 kezelést - az érrendszert védő és magas vérnyomás ellenes hatást mutattak a modellállatokon.

Az érrendszeri Nox1/2 aktivitásból származó reaktív oxigéngyököknek szerepe van az érrelmeszesedésben, az aorta aneurizmában (a főverőér kóros tágulata), a cukorbetegség során fellépő vaszkulopátiában. A Nox4 szerepe kevésbé tisztázott, mert érkárosodást okozó, és érvédő hatását is kimutatták a kísérleti körülményektől függően. Ischémiás vagy hipoxiás állapotban az endotéliumban található Nox4 szerepet játszik a vér-agy gát károsodásában és az

idegi autotoxicitásban. A Nox4^{-/-} stroke modell egerek védettek voltak az oxidatív stressztől, a vér-agy gát szivárgástól és az idegi apoptózistól.

Másrésről egyre több eredmény mutatja, hogy érvédő és érlemeszesedés ellenes funkciója van az endotéliális és a szívizomsejtekben található Nox4-nek, mert a Nox4 hiánya ezekben a sejttípusokban szív-és érrendszeri sérüléshez és endotéliális működési zavarhoz vezet az érlemeszesedést és magas vérnyomást modellező állatokban. Az eltérő eredmények okai valószínűleg a Nox4 aktivitás helyéhez, a reaktív oxigéngyök típusához és a termelődésének helyéhez, és az éppen tanulmányozott más-más betegségmodellhez köthetők. (Touyz et al. 2019)

2.6.: A NOX 5 KO nyúl

2.6.1.: A kísérleti nyúl, miért jó modellállat a nyúl

A transzgénikus nyulak kiváló modellállatoknak bizonyultak különböző öröklődő és szerzett betegségek esetén, mint a hipertrófiás kardiomiopátia, a lipoprotein- metabolizmus zavarai és az érlemeszesedés. A transzgénikus nyulak emellett megfelelő bioreaktorok is rekombináns fehérjék termelésére, mind kísérletekben, mind kereskedelmi szinten. Széles körben ismert tény, hogy bizonyos esetben a ható mutáció, ami az emberben kiváltja az adott betegséget a rágcsálókban nem okoz hasonló kóros tüneteket. Az egér modellben a genetikai változások eredményének tanulmányozására szolgáló analitikai technikák közül számos egyetlen időpontra korlátozódik, mivel az egér nem éli túl az analízist. A nyúl (*Oryctolagus cuniculus*) filogenetikailag közelebb áll a főemlősökhöz, mint a rágcsálók, és elég nagy a testmérete ahhoz, hogy lehetővé tegye a fiziológiai állapot változásának nem-halálos módszerekkel történő nyomon követését/monitorozását. A transzgénikus nyulakra épülő rendszerek azért is különösen értékesek, mert fontos rést töltenek be az egér modell, és a nagyobb testű emlősök modellállatként való használata között. A legkisebb házasított állat, melynek tejében rekombináns fehérjét lehet termeltetni, mind kísérleti, mind kereskedelmi szinten.

A koleszterin etetett nyulak a lipoproteinek vizsgálatának, és az érlemeszesedésben betöltött szerepük vizsgálatának klasszikus modelljének számítanak, mert a nyúl rendkívül érzékenyen reagál az étrenddel bevitt koleszterinre. A koleszterinben gazdag étrend magas koleszterinszinthez, és az érlemeszesedés gyors kialakulásához vezet a nyulakban. Ellentétben az egérrel, a nyúl lipoprotein metabolizmusa hasonló az emberéhez. A nyúl májában sem

történik módosulás az apolipoprotein B mRNS-ében, csakúgy, mint az ember esetében; ezzel szemben az egér májában jelentősen módosul az apoB mRNS. A nyúl esetében az apolipoprotein B-t tartalmazó lipoproteinek az emberéhez hasonló kémiai összetétellel és koleszterin észter transzfer fehérjével rendelkeznek, amely fehérje központi szerepet játszik az ateroszklerózis folyamatában, és mind a nyúl, mind az ember vérplazmájában megtalálható, míg az egerből hiányzik. A veleszületett lipid-metabolizmus rendellenességet hordozó nyúlvonalak létezése hozzájárult ahhoz, hogy különösen informatív transzgénikus nyulakat hozhassanak létre. A Watanabe öröklődő hiperlipidémiás (WHHL) nyúl olyan genetikai variáns, amely az örökletes hiperkoleszterinémiát modellezi, (a legfontosabb fenotípus, amit vizsgáltak rajta a magas LDL koleszterinszint) és segített a hiperkoleszterinémia és az érlemezés közötti kapcsolat bizonyításában. (Bösze et al. 2003) Beltenyésztéssel alakította ki ezeket a nyulakat Dr. Yoshio Watanabe, tehát egy spontán mutáció eredményeként jött létre a fenotípus, nem transzgénikusak. (Fan et al. 2021) A WHHL nyulak genetikai analízise kimutatta, hogy az LDL receptor funkciója károsodott bennük, 12 nukleotid kiesésének köszönhetően az LDL receptor gén 4. exonjából, ami egyben 4 aminosav kieséséhez vezet az LDL receptor fehérje ciszteinben gazdag ligandum kötő részében. (Yamamoto et al. 1986)

A transzgénikus nyúlvonalak növekvő száma matt kivitelezhetővé vált a dupla transzgénikus nyúl létrehozása vagy egy transzgén bevitele egy speciális genetikai háttérre (WHHL) egyszerű keresztezéssel. Így újfajta betekintést nyerhetünk a lipoprotein metabolizmusban résztvevő fehérjék közötti interakciókba. A nagy artériák simaizom sejtjeinek – beleértve a koszorúereket is – génexpressziójának megcélzása jó modellt nyújt a génterápia alkalmazásához az érlemezés kezelésére.

Transzgénikus egereken végzett vizsgálatok rávilágítottak a szív fejlődésében, az adrenerg rendszer fejlődésében és különböző kóros állapotok - mint a koszorúér betegség -kialakulásával kapcsolatos mechanizmusokban szerepet játszó részletes molekuláris kölcsönhatásokra. Azonban a transzgénikus egér modellek nem mindig mutatják az emberre jellemző fenotípust, mert molekuláris szinten fontos különbségek találhatók a rágcsáló és az emberi szív- és érrendszer fiziológiájában. E tekintetben a nyúl jelentős előnyökkel rendelkezik az egerrel szemben. Például az összehúzóási ciklusa jelentősen hosszabb, mint az egéré, és a szívének mérete lehetővé teszi az emberi szív működés klinikai vizsgálatára kifejlesztett eszközök használatát. Még a fehérjék összetétele is a hasonlít az emberi szívizomsejtééhez. A β miozin nehézlánca 98%-ban homológ az emberi fehérjéével. (Bösze et al. 2003)

A nyúl szívének fehérje összetétele közelebb áll az emberéhez, mint a rágcsálóké: az emberi szívben a béta-miozin nehézlánc alkotja a teljes miozin 90%-át, míg a nyúl esetében, ez 80%, az egér szívével ellentétben, ahol az alfa-miozin nehézlánc túlsúlyban van 95%-kal. (Bösze et al. 2016)

A génmódosított állatok előállítása idő és szaktudás igényes. Ugyanakkor a transzgénikus emlős bioreaktorok által termelt és ebből tisztított fehérjék klinikai tesztelése is idő és költségigényes folyamat. A transzgénikus nyúl egy kisebb költségű alternatíva a nagyobb testű gazdasági haszonállatokhoz képest, elsősorban azért, mert a nyúl kisebb testű, így olcsóbb tartani, de azért is mert a reprodukciós ciklusa rövidebb, mint a nagytestű háziállatoknak. További előny a gyógyszerészeti alkalmazásnál, hogy a nyúl tartható specific pathogen free (SPF) körülmények között, és napjainkig nem azonosítottak humánpatogén fertőző ágenszt a nyúlban. A transzgénikus nyulakkal előállítható gyógyászati termékek három kategóriába sorolhatók: a: monoklonális ellenanyagok, b: hormonok és bioaktív fehérjék, c: terápiás fehérjék. (Bösze et al. 2003)

Az első transzgénikus nyúl létrehozása (1985) után 25 éven keresztül a klasszikus mikroinjektálás maradt a létrehozásukra használt egyetlen hatékony módszer, és számos fontos emberi betegséget modellező nyúlmodellt hoztak így létre, habár a módszer hatékonysága alacsony. A hipertrófiás kardiomiopátia nyúl modelljét is létrehozták, ami egy viszonylag gyakori örökletes szívbetegség, ami komoly pitvari szívritmuszavarhoz vezethet, és a fiatalok körében a hirtelen szívhalál legfőbb oka.

Az első modellt erre a betegségre 1999-ben hozták létre, mikroinjektálással, egy gyakori pontmutációt hordoz a béta-miozin nehézláncában. A hasznossága későbbi tanulmányokban emelkedett ki, amikor arra használták fel, hogy bebizonyítsák, a simvastatin kezelés a hipertrófia csökkenését idézi elő, és az atorvastatin hipertrófia megelőzésére gyakorolt hatását is vizsgálták rajta.

Másik, egyre jelentősebb területe a szívbetegség modelleknek a veleszületett aritmogén betegségek - mint a hosszú QT szindróma – modelljei. Röviden, az ezt a betegséget modellező nyulak szelektíven túlexpresszálják a domináns – negatív pórus mutáns változatát a KvLQT1 vagy HERG ioncsatornának a szívükben, ezzel pontosan utánozva az emberi QT szindróma fenotípusát a QT szakasz idejének megnövekedésével.

Az első, Sleeping Beauty transzpozonnal létrehozott transzgénikus nyulaknál 0.4 ng/μl cirkuláris pT2/Venus plazmidből (a Venus egy CAG promóter által irányított riporter gén) és 5 ng/μl Sleeping Beauty 100X transzpozáz enzimből álló keveréket mikroinjektáltak nyúl zigóták előmagjába. A transzpozáz enzim által irányított vágási majd beillesztési mechanizmusnak köszönhetően az alapító egyedek a transzgén egyetlen kópiáját hordozzák mindegyik integrációs helyen, ellentétben a mikroinjektálással, amikor a transzgén konkatamerekben integrálódik akár 2-től 100 kópiában, vagy többen is.

Ez előnye a transzpozon alapú transzgenezisnek, mivel azoknak a transzgénikus nyulaknak a génexpressziós eltérései, amelyeknél egy kópiában integrálódott a mutáns emberi gén a genomba (hemizigóta formában), jobban összevethetők a humán genotípussal, ahol egy normál és egy mutáns gén van. További előnye a transzpozon alapú transzgenezisnek a 15,1%-os transzgénikus/összes született utód arány, és ezzel együtt az 1,48% transzgénikus utód az összes mikroinjektált és visszaültetett embrióból, ami magasabb a mikroinjektálásnál kapott átlagos hatásfoknál. A fentebb említettek a Sleeping Beauty transzpozon alapú transzgenezist a mikroinjektálás vonzó alternatív módszerévé teszik, a szívbetegség modellek additív transzgenezissel történő költség-és időhatékony létrehozására.

A CRISPR/ CAS rendszerrel létrehozott nyúlmodellek

A CRISPR/CAS genomeditálási rendszer a legmodernebb, az egyszerűsége és hatékonysága miatt a legnépszerűbb, egyre növekvő számú transzgénikus állatmodellt hoznak vele létre. Az első CRISPR/CAS9-cel létrehozott nyulat 2014-ben hozták létre. Yang és munkatársai 9 gént ütöttek ki sikeresen in vitro nyúl embriótenyészetekben. Négy génnek (CD36, low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E és ryanodine receptor 2) a specifikus RNS keverékét használták az alapítók létrehozásához, majd a génkiütött vonal alapításához. Néhány alapító egyed a célgén biallélikus mutációját hordozta, másszóval lehetséges volt egy lépésben homozigóta génkiütött állat létrehozása. Az egy gént szerkesztő kutatásokat később egyszerre több génre kiütött nyúl modell létrehozása követte, melynél 3 vagy 5 gént céloztak meg egyszerre ugyanabban az embrióban, magas hatékonysággal, ami a CRISPR/CAS9 rendszer másik erőssége.

A transzgenezishez genetikai alapként felhasználható elérhető nyúlfajták nem beltenyésztettek, ezért a transzgénikus vonal nyulai között nagyobb lehet az egyéni eltérés/variáció, amit

figyelembe kell venni a vizsgálatok tervezésekor és az eredmények értékelése során. (Bösze et al. 2016)

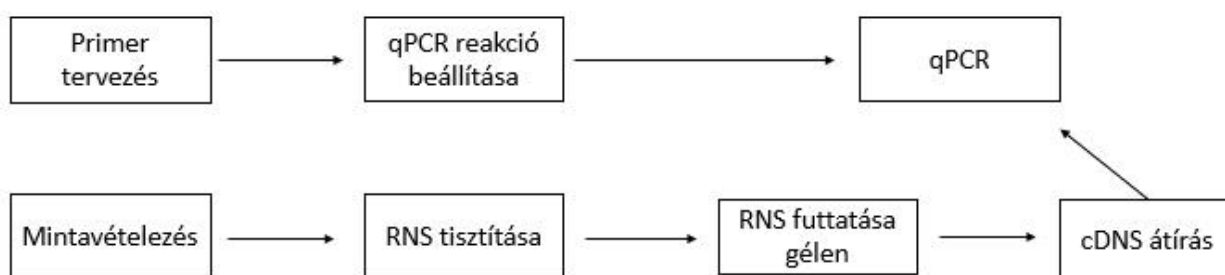
2.6.2.: A vizsgált NOX 5 génkiütött nyúl

A NOX5 gén kiütésére is a CRISPR/Cas9 technológiát használták. A guide RNS-t a nyúl NOX 5 gén referencia szekvenciájának harmadik exonjára tervezték. Az egysejtes embriókba a Cas9 mRNS-t és a guide RNS-t mikroinjektálással juttatták be, majd recipiens nyulakba ültették őket. Az újszülött fiókákból genomi DNS-t izoláltak és a T7 endonukleáz assay-vel végezték a genotípus szűrését. 8 alapító állat született, amelyből 7 heterozigóta mutáns, 1 biallelikus mutáns volt és 3 alapító volt mozaikos. A NOX 5 génben bekövetkezett változásokat szekvenálással határozták meg pontosan. 7 korai stop kodont eredményező frameshift mutációt mutattak ki. Két vonalat (No. 700 és No. 901) alakítottak ki és tartottak fenn az F4 generációig. A NOX5 ^{-/-} nyulakon 1 éves korukig nem figyeltek meg nyilvánvaló egészségi elváltozást. A vizsgálatokat a No. 700 vonalon végezték, ami 10 bázispár deléciót hordozott a gén harmadik exonjában. Mivel ez az exon jelen van minden variánsban, ezért azt várták, hogy a génkiütött állatokban nem termelődik funkcionális fehérje. A NOX1, NOX2 és NOX4 gén cDNS-ének off-target analízise és szekvenálása bizonyította, hogy a CRISPR indukálta mutáció specifikus volt a NOX5 génre. A nyirokcsomókban található NOX 5 fehérje jelenlétének kimutatására western blot hibridizációs vizsgálatot végeztek anti-rabbit NOX5 egér szérum felhasználásával, ami igazolta a NOX5 fehérje hiányát. Az állatokon vérnyomás mérést és az aorta átmérőjének ultrahangos meghatározását is elvégezték, de nem tapasztaltak szignifikáns eltérést. Mivel a NOX enzimek egér modellben bizonyítottan részt vesznek az érlelmeszesedés modulációjában, megvizsgálták a nyulakban is a koleszterindús táp etetésének következtében kialakuló érlelmeszesedést. A plakk-képződés indukálására magas zsírtartalmú, 0,5 % koleszterint tartalmazó tápot etettek. Az egyidős (12 hetes) vad típusú és NOX5 ^{-/-} hím nyulakat 4 napig 50% normál és 50% magas zsírtartalmú tápon tartották, majd ezután 8 hétig csak a 120g/nap mennyiségű magas zsírtartalmú tápot fogyasztották. A vérmintákat az etetési kísérlet előtt, a 4. héten és a kísérlet végén gyűjtötték, és a vérplazma lipid szintjének mérése kimutatta, hogy a NOX5 ^{-/-} nyulak kezdeti értékei nem tértek el a referencia értékektől, de a plazma koleszterinszintjük kórosan növekedett. A plakkok megfestésére Oil Red O festéket használtak, és meghatározták a plakkok által beborított érfelületet. Az enzim hiánya fokozza az

érelmeszesedést. Szignifikánsan több plakkképződött a génkiütött nyulak aortafalán, ami a NOX5 szerepét igazolja az érelmeszesedés folyamatában. (Petheő et al. 2021)

3.: A vizsgálatok módszerei

A vizsgálat munkafolyamatának lépéseit a 3. ábra foglalja össze. Nyúl vérből izolált RNS-ből cDNS átírása és primerek tesztelése, majd qPCR.



3. ábra: A munkafolyamatot röviden bemutató ábra

3.1.: A kísérletben felhasznált állatok

Etikai nyilatkozat

Minden állat a kutatási célra használt állatok gondozásáról és felhasználásáról szóló magyar jogszabályokkal szigorú összhangban volt kezelve, a kísérletet jóváhagyta a MATE-GBI Állatjóléti és etikai bizottság, és Pest megye kormányhivatala által a kísérlet a PE/EA-58-2/2018 engedélyezési számon regisztrálásra került. Az állatok szenvedésének minimalizálásáért minden lehetséges erőfeszítést elkövettek. A Nox5 génmódosított állatok a MATE-GBI állatház tenyészetéből származtak.

A kísérlethez használt nyulakat a MATE-GBI állatházában tartották. A kísérlet elvégzésének időszakán kívül az állatokat egyedi ketrecekben szállásolták el, a vízhez és élelemhez állandó hozzáférést biztosítva. Az állatokat a standard megvilágítási programon, (06.00–18.00 h) és 20 °C hőmérsékleten tartották.

3.2.: Koleszterin etetés

Az állatok kezelése (koleszterinetetés) a Petheő et al, 2021 publikáció alapján történt. Röviden összefoglalva: Az állatok 8 héten keresztül 0,5 % koleszterint tartalmazó tápot ettek. Az egyidős (12 hetes) vad típusú és NOX5 -/- hím nyulakat 4 napig 50% normál és 50% magas zsírtartalmú tápon tartották, majd ezután 8 hétig csak a 120g/nap mennyiségű magas zsírtartalmú tápot fogyasztottak. A dolgozatban összefoglalt munkához a 0. időpontban vett és a 4. heti vérvételből származó mintákat használtam.

3.3.: Mintavétel

2 vad típusú és 2 NOX5 knock-out állattól 3-3 ml vért vettünk, fülvénából, a gyártó utasításainak megfelelően (Applied Biosystems™ Tempus™ Blood RNA Tube) az etetés megkezdésének időpontjában (0. nap) és 4 hetet, illetve 8 hetet követően (ez utóbbi vizsgálata nem része jelen dolgozatnak) RNS izolálás céljából (1. táblázat).

1. táblázat: Minták magyarázata és az RNS koncentráció adatok. Az 1. és 2. minta az etetési kísérlet előtti, a 6. és 7. minta a 4 hetes koleszterindús táppal való etetés utáni, a WT pedig a vad típusú kontrollt jelöli.

Minta sorszáma	kezelés	Állat	Mintavétel dátuma	RNS cc
1	koleszterin etetés 0. nap	NOX5-1	2020.12.16.	787,9
2		NOX5-2	2020.12.16.	462,4
3		WT5	2020.12.16.	410,2
4		WT6	2020.12.16.	517,5
5	koleszterin etetés 4. hét	NOX5-1	2021.01.15.	1384
6		NOX5-2	2021.01.15.	1422,8
7		WT5	2021.01.15.	431,2
8		WT6	2021.01.15.	468,2

3.4.: RNS tisztítás

Az RNS izolálást az Applied Biosystems™ Tempus™ Spin RNA Isolation Kit-tel végeztem, a gyártó utasításainak megfelelően.

2. táblázat: Az RNS izolálás protokollja

1.: A mintát az Applied Biosystems Tempus Blood RNA Tube csőből az 50 ml-es Falcon csőbe áttöltjük. A csöveket jelöljük.
2.: 3 ml PBS puffert adunk a mintákhoz, hogy a végtérfogat 12 ml legyen.
3.: Minimum 30 másodpercig vortexeljük.
4.: Centrifugálás 30 percig 4 °C-on, 3000xg.
5.: A felülúszót leöntjük, a csövet papírtörletre lefelé fordítjuk, hogy az összes felülúszót leithassuk.
6.: 400 µl RNA purification resuspension solution-t pipetázunk a pelletre, reszuspendálás, vortexelés.
7.: RNáz mentes csőbe helyezzük az oszlopokat és feliratozzuk őket.
8.: Az oszlop membránját 100 µl Wash solution 1 oldattal megnedvesítjük.
9.: A 400 µl mintát az oszlopokra pipetázunk.
10.: Centrifugálás 30 másodperc, az oszlopot kivesszük, felülúszót leöntjük, az oszlopot visszahelyezzük.
11.: 500 µl Wash solution 1 oldatot pipetázunk az oszlopra, centrifugálás 30 másodpercig, majd felülúszó leöntése.
12.: 500 µl Wash 2 solution oldatot pipetázunk az oszlopra, majd centrifuga 60 másodperc, és a felülúszó leöntése.
13.: DNáz kezelés: 10µl DN-áz + 70 µl RDD mintánként összepipetázni, majd felvinni az oszlopra és 15 percig szobahőmérsékleten inkubálni.
14.: 500 µl Wash solution 2 oldat az oszlopra pipetázni, majd 5 percig szobahőmérsékleten inkubálni, 30 másodperc centrifuga és a felülúszó leöntése.

15.: 500 µl Wash solution 2 oldat az oszlopra pipettázni, 30 másodperc centrifuga, felülúszó leöntése.
16.: A membrán megszáritása 1 percig tartó centrifugálással.
17.: Új csőbe áthelyezzük az oszlopot, 80 µl Rnáz mentes vizet pipettázunk rá.
18.: Thermomixerben 2 percig 70°C-on inkubáljuk.
19.: Centrifugáljuk 30 másodpercig, majd a felülúszót visszapipettázzuk a membránra és újabb 30 másodpercig centrifugáljuk.
20.: Az RNS oldat koncentrációjának mérése NanoDrop-al.

3.5.: A tisztított RNS gélelektroforézise

Eszközök és reagensek:

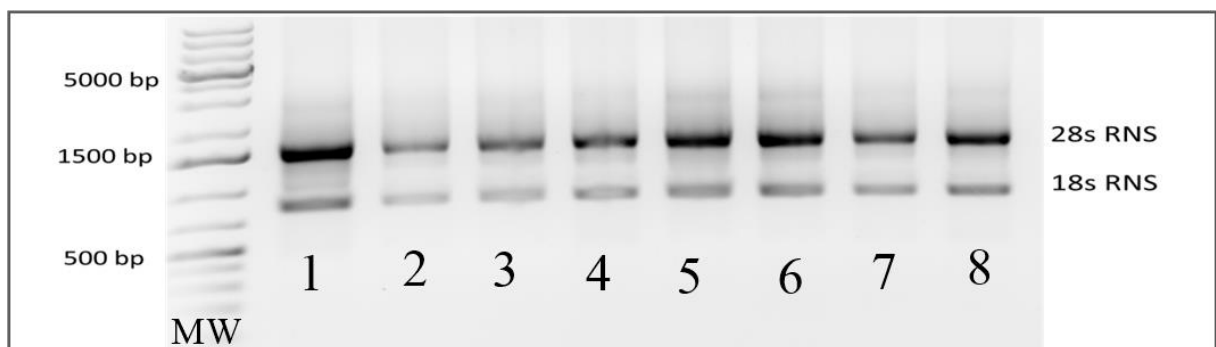
- futtatókád
- fésű
- tálca
- mérleg
- pipetta
- 10x TBE pufferoldat
- mikrohullámú sütő
- Erlenmeyer lombik
- agaróz por
- RN-áz mentes víz

Az eszközök előkészítése: A tálca végeit lezárjuk a műanyag elemekkel, amit még körbe is ragasztunk, hogy a kifolyást elkerüljük. Belehelyezzük a zsebek kialakításához szükséges fésűt.

A gél készítése: Az 1%-os agaróz gélhez 1g agarózt adunk 100 ml 1xTBE pufferhez az Erlenmeyer lombikban. A mikrohullámú sütőben addig melegítjük az oldatot, amíg az agaróz teljesen fel nem oldódik. Körülbelül 60 °C-ra hagyjuk visszahűlni az oldatot, a lombikot vízcsap

alá tartva hideg vízzel hűtve gyorsíthatjuk ezt. Ezután hozzáadjuk az etídium bromidot, a fragmentek láthatóvá tételéhez használt interkalálódó festéket. A tálcába öntjük az oldatot és 30 percig szobahőmérsékleten hagyjuk megszilárdulni. Az öntésnél a buborékok képződését el kell kerülni, különösen a zsebek környékén kell erre vigyázni, egy kis pengével kiszűrhetjük vagy elhúzzhatjuk a zsebtől őket.

A gél megszilárdulása után óvatosan eltávolítjuk a fésűt, és a véglezáró elemeket, majd a futtatókádba helyezük a tálcát. A futtatókádat feltöltjük után elegendő mennyiségű 1xTBE pufferrel, a gél teljesen el kell, hogy lepje a kádban a pufferoldat. Majd a zsebekbe pipetázzuk a mintákat és a molekulatömeg markert, a pipettát lassan nyomva, és a pipetta továbbnyomásával keletkező buborékképződést elkerülve. A kádhoz csatlakoztatjuk a kábeleket, figyelve a megfelelő pólusra, mert ha megcseréljük a nem megfelelő irányba fog elindulni az RNS a gélben. Az áram felkapcsolása után 120 V-on addig futtatjuk a gél, míg a fragmentek már megfelelően elválnak egymástól, de ne fussanak le a gélről. Az áram lekapcsolása után következhet a gél vizsgálata.



4. ábra: Nyúl vérből izolált RNS futtatása 1%-os agaróz gélen. Molekulatömeg marker fajtája: Thermo Scientific Gene Ruler 1kB

Az RNS intakt, nem bomlott le, ezt az mutatja meg, hogy a sávok - 18S riboszómális RNS-t, és 28S riboszómális RNS-t jelzik - egyértelműen látszanak, még ha látható is egy kis smear/elmosódottság a kevés töredezett szál miatt.

Primerek

A primerek tervezése az online elérhető Primer3 software-rel történt a nyúl referencia szekvenciák alapján.

- GAPDH: Gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz gén; a háztartási gén,
- NRF2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 gén
- PRDX1: Peroxiredoxin-1 gén
- GPX1: glutation-peroxidáz 1 gén
- CAT: kataláz gén

3. táblázat: A qPCR -hez használt primerek

Gen	Név (Faj: <i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Forward	Reverse	Termék hossza (bp)	T _m	RNS expresszió humán plazmasejtekből (nTPM)*
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	AAGGTCATCATCTCAGCCC	TGCGTTGCTGACAATCTTGAG	100	59	2668,2
NRF2	Nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2	GCTCATCCCGTAACATGCTG	AAGTGGCTGCTCAGAAATTGC	192	60	118,8
PRDX1	Peroxiredoxin	GCCCTACGGAGATCATTTGCT	GTGTTGATCCAAAGCCAGGTG	115	60	612,8
GPXI	Glutathione peroxidase 1	AGTTTGGGCATCAGGAGAAACG	GAAAGAGCATGAAGTTGGGCTC	98	60	82,4
CAT	Catalase	ACTCGCGAACCAGAAACTCTC	AGGACATCGGGTTTCTGCG	180	60	25,4
*www.proteinatlas.org						

3.6.: qRT-PCR módszer leírása

A qPCR azaz kvantitatív PCR alkalmazásával a templát amplifikációja a fluoreszcens jelölésnek köszönhetően valós időben követhető. Ahogy az amplikon mennyisége nő, a fluoreszcencia erőssége is úgy növekszik a minden PCR-ciklus után elvégzett mérés során, amit ábrázolva kirajzolódik az amplifikációs görbe (7. ábra).

Egy küszöbérték van meghatározva, amelyet átlépve már értelmezhető a fluoreszcens jel erőssége a háttéren. Azt a ciklusszámot, aminél a jel átlépi ezt a küszöbértéket Ct értéknek nevezzük. Az alacsony Ct érték magas cDNS koncentrációt jelez, míg a magas érték azt jelenti, hogy a fluoreszcencia több ciklus alatt haladja meg a küszöbértéket, így alacsonyabb a koncentráció.

Leggyakrabban a Taq-man próbát, vagy SYBR Green-t alkalmaznak a qPCR kivitelezéséhez. A SYBR Green esetében egy interkalálódó festék adja a fluoreszcens jelet, ami a kétszálú DNS-hez kötődik.

A qPCR-t alkalmazzák génexpresszió vizsgálatára, genetikai tesztek végzésére, kórokozók kimutatására, betegségek kutatására (6. táblázat; 7. táblázat.)

4. táblázat: Az alkalmazott qPCR program. Összesen 60 ciklus

	hőmérséklet	idő
preinkubáció	95 °C	900 sec.
denaturáció	95 °C	15 sec.
primer tapadása	62 °C	20 sec.
lánchosszabbítás	72 °C	15 sec.

A ciklusok után a gép High Resolution Melting analízist végez, majd hűtve tárolja a mintákat. Az olvadáspont analízis lehetővé teszi a nukleinsav szekvenciájában lévő kis eltérések azonosítását a kétszálú PCR amplikon kontrollált denaturálása által. A hőmérséklet növelésével az amplikon jellemző tulajdonságai, főképp a GC tartalma és a hossza határozzák meg a denaturáció lezajlását. Amikor a fluoreszcens jelet vizsgálják a denaturáció időtartama alatt, az csökken az idő előrehaladtával, ahogy egyre több kétszálú DNS szál válik egyszálúvá és a festék felszabadul. Az olvadási hőmérséklet (T_m) - az a hőmérséklet, amin a DNS 50%-a van már csak kétszálú formában – becsülhető az olvadási görbe deriválásával. (Erali et al. 2008)

5. táblázat: qPCR protokoll

qPCR összerakás	
	1x
Mix (SYBR green)	10 µl
forward primer	1,2 µl
reverse primer	1,2 µl
cDNS	5 µl
víz 20 µl-ig	2,6 µl

6. táblázat: Az 1. qPCR plate elrendezése. 1-8-ig: minták, az 1. táblázatban leírtak szerint; ntc: non template controll, azaz cDNS-t nem tartalmazó kontroll; k: kalibrátor, több plate esetén a platek közötti technikai eltérést küszöböljük ki a kalibrátor mintával.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	1	1	1	1	1	1	k	k	ntc	ntc
B	2	2	2	2	2	2	2	2	k	k	ntc	ntc
C	3	3	3	3	3	3	3	3	k	k	ntc	ntc
D	4	4	4	4	4	4	4	4	k	k	ntc	ntc
E	5	5	5	5	5	5	5	5				
F	6	6	6	6	6	6	6	6				
G	7	7	7	7	7	7	7	7				
H	8	8	8	8	8	8	8	8				
	GAPDH		NRF2		PRDX		GPX1					

7. táblázat: A 2. qPCR plate elrendezése6. táblázat: Az 1. qPCR plate elrendezése. 1-8-ig: minták, az 1. táblázatban leírtak szerint; ntc: non template controll, azaz cDNS-t nem tartalmazó kontroll; k: kalibrátor, több plate esetén a platek közötti technikai eltérést küszöböljük ki a kalibrátor mintával.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	k	k
B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	k	k
C	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	ntc	ntc
D	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	k	k
E	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	k	k
F	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	ntc	ntc
G	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	k	ntc
H	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	k	
	GAPDH		NRF2		PRDX		GPX1		CAT			

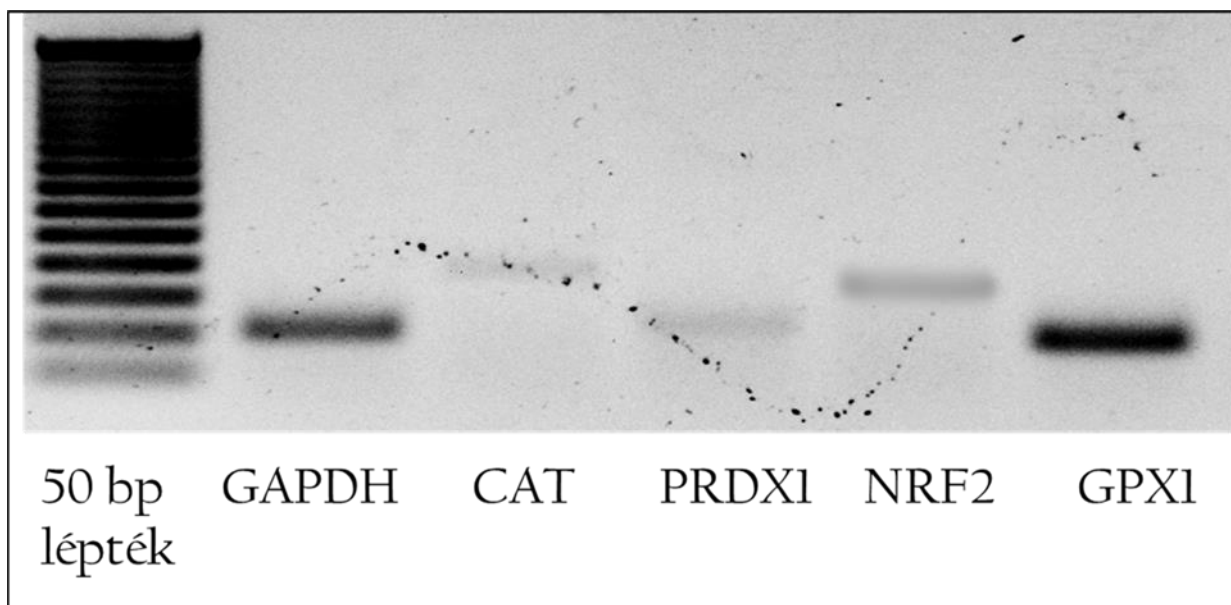
3.7.: A $\Delta\Delta C_t$ analízis módszere

A $\Delta\Delta C_t$ módszert génexpressziós vizsgálatokban kapott adatok elemzésére használják, két különböző minta közötti relatív génexpressziós szint kiszámítására (8. ábra, 9. ábra). A relatív kvantifikáció lényege, hogy egy referencia mintához képest adja meg a génexpresszió szintjében bekövetkező változásokat. A qPCR gép által generált C_t értékeket közvetlenül használja fel a számításhoz. Ahhoz, hogy korrigálják azt, hogy a különböző minták különböző mennyiségű DNS-t vagy RNS-t tartalmaznak, és hogy a PCR beállításából és az amplifikációs folyamat eltéréséből adódó variancia csökkentésére referencia géneket, vagy belső kontroll géneket használnak a qPCR-nél. A háztartási gének, mint a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz gén, gyakran használt referencia gén, mert az expressziójának szintje viszonylag stabil marad mindenféle kezelés hatására.

A relatív génexpresszió kiszámítására szolgáló képlet: $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$. A képlet alkalmazása során először a több technikai ismétlésben elvégzett qPCR esetén a C_t értékeket mintánként átlagoljuk. Így kapunk a referencia génnél és a vizsgált génnél is a kezelt mintából is egy átlagot és a kontroll mintából is egyet. A következő lépésként a ΔC_t értéket határozzuk meg az újonnan számított átlagokat használva, ami a vizsgált gén (GOI) és a referencia gén (HKG) C_t átlagértékei közötti különbség. $\Delta C_t = C_t(\text{GOI}) - C_t(\text{HKG})$. Mind a kezelt, mind a kontroll mintában el kell végezni ezt a számítást. Ezután a $\Delta\Delta C_t$ számítása: $\Delta C_t(\text{vizsgált minta}) - \Delta C_t(\text{kontroll minta})$. Ezután a már korábban leírtak szerint ez a kiszámított érték lesz a 2 negatív hatványa a relatív génexpresszió meghatározásához. (Rao et al. 2013) (8. táblázat, 9. táblázat, 10. táblázat, 11. táblázat, 12. táblázat)

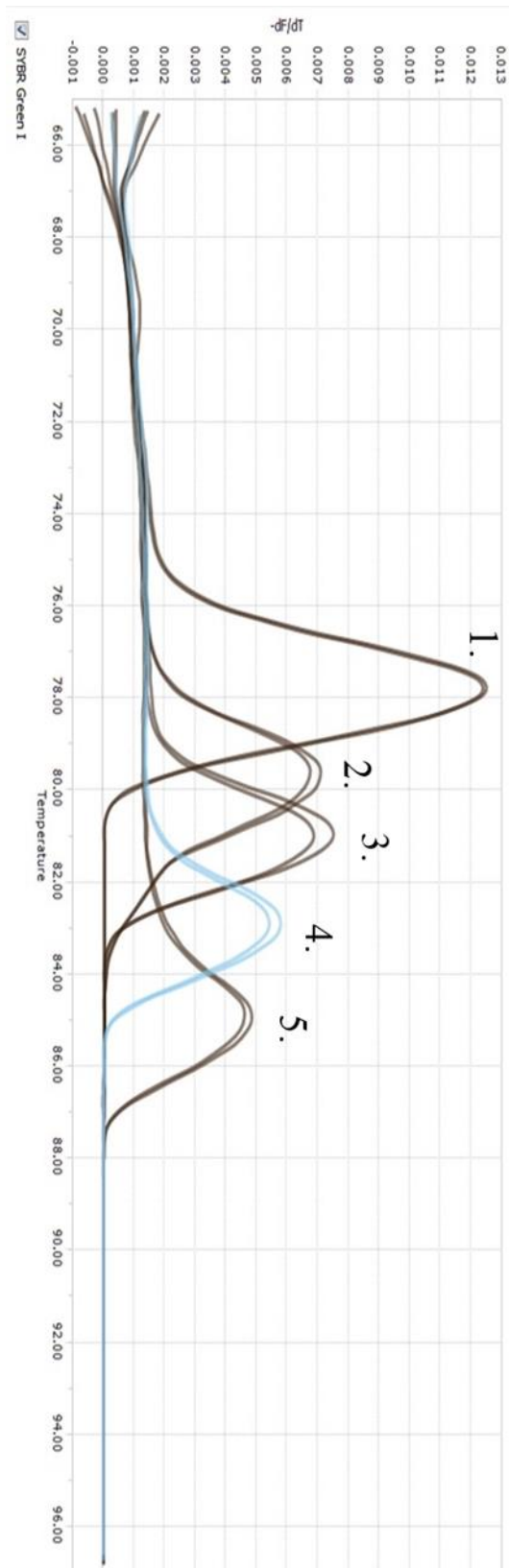
4.: Eredmények és értékelésük

1%-os agaróz gélen futtattuk a kitisztított (2. táblázat) mintákat, hogy meggyőződjünk azok tisztaságáról, minőségéről és a genomi DNS mentességéről (4. ábra). A tisztított RNS-ből cDNS szintézist végeztünk reverz transzkripcióval (PCRBiosystems qPCRBIO cDNA Synthesis Kit). Egy vad típusú minta segítségével hagyományos PCR reakcióban (T_m 60°C) teszteltük a primerek működését (5. ábra). 25 nanogramm cDNS-t használtunk minden primernél. A termékek mérete 100-200 bázispár nagyságú. A fotón látható, hogy ez így is történt, azaz a primerek specifikusak, eltérő méretű PCR termék nem jelent meg a reakcióban.

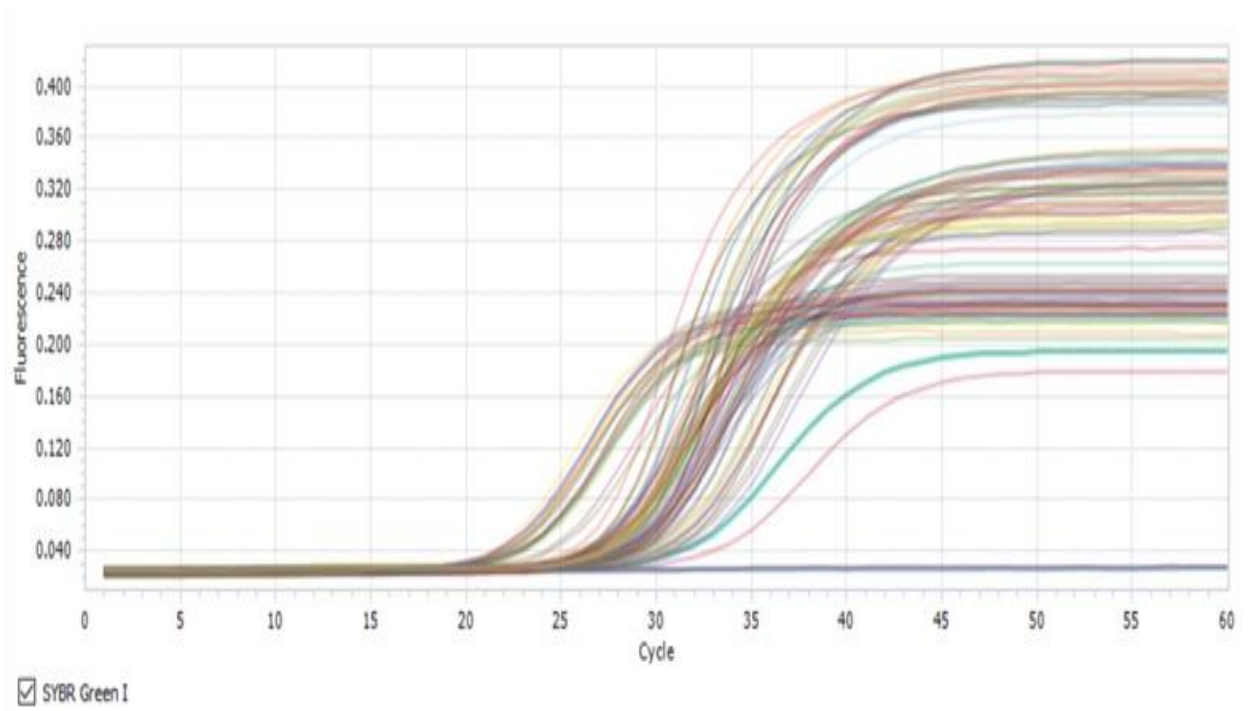


5. ábra: A primerek ellenőrzése. Egy vad típusú minta segítségével hagyományos PCR reakcióban (T_m 60°C) teszteltük a primerek működését. 25 nanogramm cDNS-t használtunk minden primernél. A termékek mérete 100-200 bázispár nagyságú. A fotón látható, hogy ez így is történt, azaz a primerek specifikusak, eltérő méretű PCR termék nem jelent meg a reakcióban.

A qPCR reakcióhoz Applied Biosystems™ Power SYBR™ Green PCR Master Mix-et használtunk és Roche-LightCycler® 96 QPCR gépen végeztük (4. táblázat, 5. táblázat). A primerekkel szemben fő kritérium volt a specifikusság (3. táblázat). A qPCR futás végén ún. melting peak analízist is végzett a gép. A primerek használhatóságát ez is igazolja, egy reakcióban egyféle olvadási csúcs jelenik meg, ami annak azt igazolja, hogy egyféle termék képződik az adott reakcióban. Ez minden primerpár esetében így volt (6. ábra).



6. ábra: A qPCR primerek olvadásicsúcs-görbéi. Az 1. csúcs a GAPDH; a 2. az NRF2; a 3. a PRDX; a 4 a GPX1 és az 5. a CAT génhez tartozó primerpár olvadási csúcsát jelöli.



7. ábra: qPCR amplifikációs görbék

9. táblázat: PRDX gén eredményei

		Experim ental Well 1	Experim ental Well 2	Control Well 1	Control Well 2	Average Experim ental Ct Value	Average Experim ental Ct Value	Average Control Ct Value	Average Control Ct Value	Δ Ct Value (Experim ental)	Δ Ct Value (Contr ol)	$\Delta\Delta$ Ct Value	Expressi on Fold Chang e		
		Raw Ct Value	Raw Ct Value	Raw Ct Value	Raw Ct Value	TE	HE	TC	HC	Δ CtE	Δ CtC	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct	Átlag	Szórás
		HKG	HKG	HKG	HKG	GOI	GOI	GOI	GOI	GOI	GOI	GOI	GOI	GOI	GOI
0. hét	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		27,21	25,87	25,22	25,13	-	26,54	-	25,18	1,37	0,40	0,97	0,5087	0,67191388	0,23076294
		28,15	27,67	25,62	25,52	27,91	-	25,57	-	0,66	0,40	0,26	0,8351		
		25,99	26,12	25,22	25,13	-	26,06	-	25,18						
	NOX5-KO	26,62	26,80	25,62	25,52	26,71	-	25,57	-						
		27,38	27,50	25,22	25,13	-	27,44	-	25,18	2,06	0,40	1,66	0,3164	1,22258976	1,28149048
		29,69	29,30	25,62	25,52	29,50	-	25,57	-						
		31,28	30,29	25,22	25,13	-	30,79	-	25,18	-0,70	0,40	-1,09	2,1287		
4. hét	WT	30,23	29,95	25,62	25,52	30,09	-	25,57	-						
		25,96	25,39	25,22	25,13	-	25,68	-	25,18	1,33	0,49	0,84	0,5586	0,37504416	0,25964878
		26,79	27,22	25,89	25,44	27,01	-	25,67	-						
		25,65	25,87	25,22	25,13	-	25,76	-	25,18	2,88	0,49	2,39	0,1914		
	NOX5-KO	28,90	28,37	25,89	25,44	28,64	-	25,67	-						
		27,60	27,09	25,22	25,13	-	27,35	-	25,18	1,17	0,40	0,77	0,5864	0,53054427	0,07901665
		28,68	28,34	25,62	25,52	28,51	-	25,57	-						
		27,13	26,53	25,22	25,13	-	26,83	-	25,18	1,47	0,40	1,08	0,4747		

10. táblázat: GPX1 gén eredményei

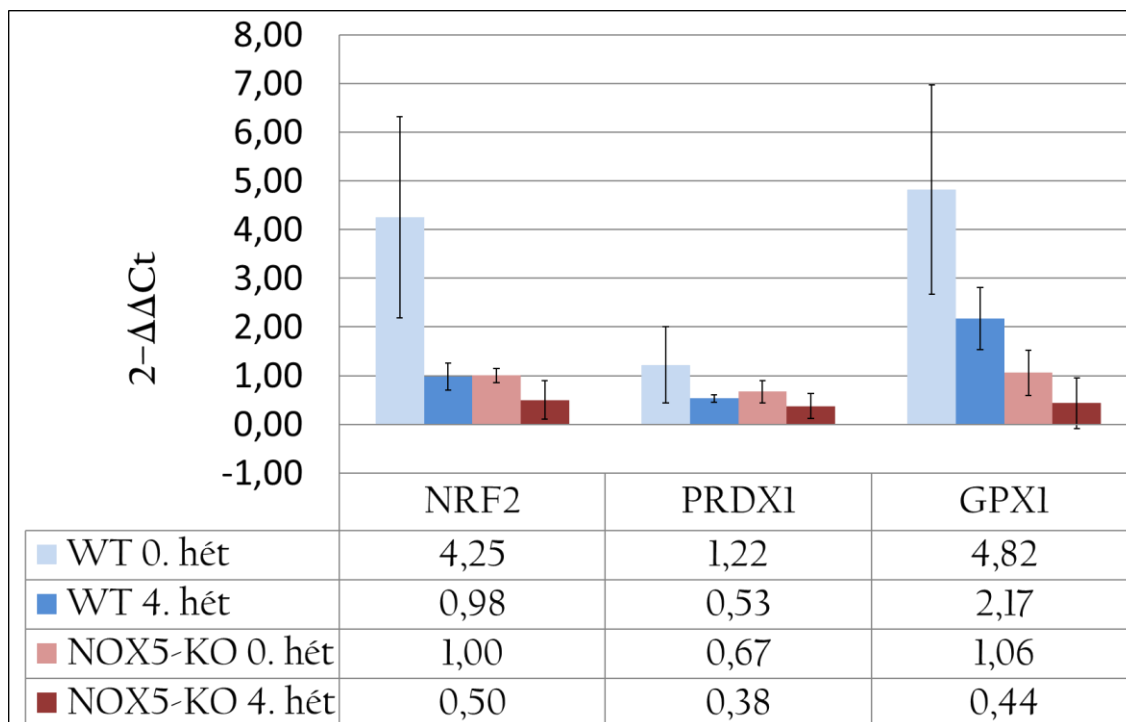
		Experim ental Well 1	Experim ental Well 2	Control Well 1	Control Well 2	Averag e Experim ental Ct Value	Averag e Experim ental Ct Value	Averag e Control Ct Value	Averag e Control Ct Value	Δ Ct Value (Experim ental)	Δ Ct Value (Contr ol)	Delta Delta Ct Value	Expres sion Fold Chang e		
		Raw Ct Value	Raw Ct Value	Raw Ct Value	Raw Ct Value	TE	HE	TC	HC	Δ CTE	Δ CTC	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct	Átlag	Szórás
0.hét	NOX5-KO	1 HKG	25,87	25,22	25,13	-	26,54	-	25,18	1,06	2,03	-0,97	1,9521	1,05850101	1,26368823
		2 GOI	27,37	27,18	27,22	27,60	-	27,20	-						
		1 HKG	25,99	26,12	25,22	25,13	26,06	-	25,18	4,63	2,03	2,60	0,1649		
		2 GOI	30,46	30,90	27,18	27,22	-	27,20	-						
	WT	5 HKG	27,38	27,50	25,22	25,13	27,44	-	25,18	1,79	2,03	-0,24	1,181	4,81856849	5,14430908
		5 GOI	29,35	29,10	27,18	27,22	-	27,20	-						
		6 HKG	31,28	30,29	25,22	25,13	30,79	-	25,18	-1,06	2,03	-3,08	8,4561		
		6 GOI	29,86	29,60	27,18	27,22	-	27,20	-						
4. hét	NOX5-KO	3 HKG	25,96	25,39	25,22	25,13	25,68	-	25,18	4,36	0,49	3,87	0,0684	0,43751756	0,52202045
		3 GOI	30,33	29,74	25,89	25,44	-	25,67	-						
		4 HKG	25,65	25,87	25,22	25,13	25,68	-	25,18	0,80	0,49	0,31	0,8066		
		4 GOI	26,54	26,41	25,89	25,44	-	25,67	-						
	WT	7 HKG	27,60	27,09	25,22	25,13	25,76	-	25,18	2,63	2,03	0,60	0,6598	2,17025228	2,13616722
		7 GOI	28,34	28,43	27,18	27,22	-	27,20	-						
		8 HKG	27,13	26,53	25,22	25,13	26,83	-	25,18	0,15	2,03	-1,88	3,6808		
		8 GOI	27,06	26,89	27,18	27,22	-	27,20	-						

11. táblázat: CAT gén eredményei

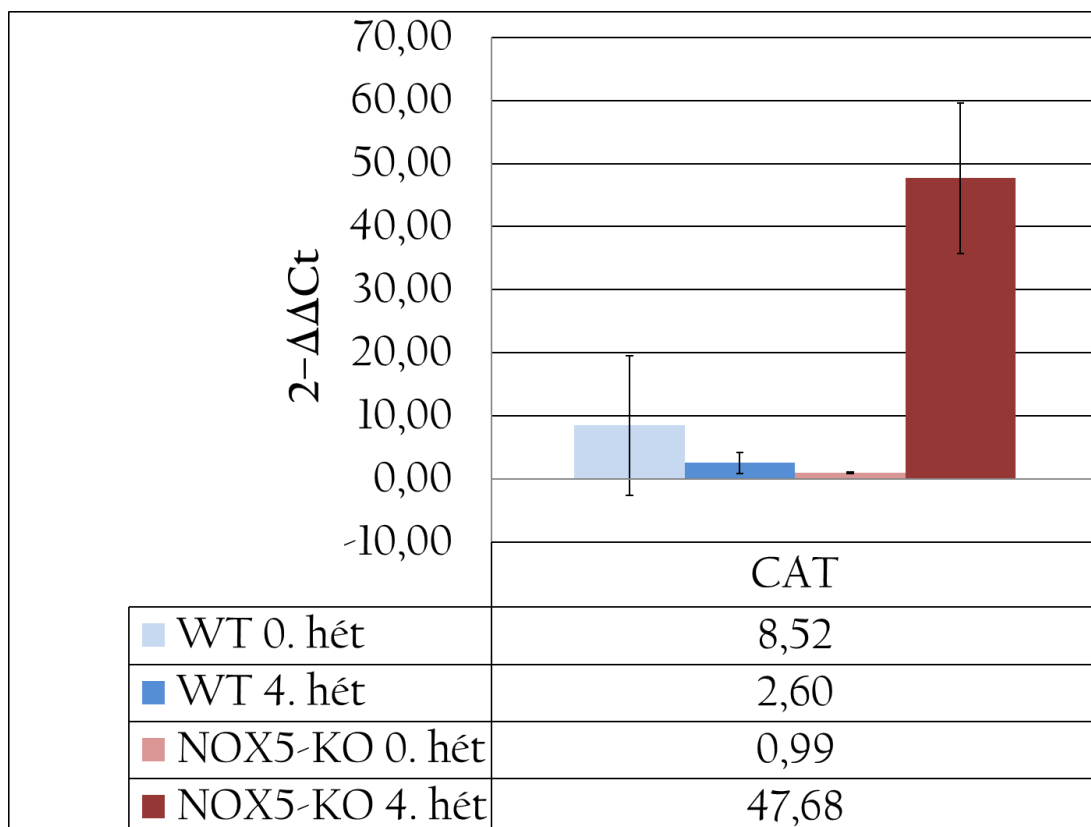
		Experimental Well 1	Experimental Well 2	Control Well 1	Control Well 2	Average Experimental Ct Value	Average Experimental Ct Value	Average Control Ct Value	Average Control Ct Value	ΔCt Value (Experimental)	ΔCt Value (Control)	Delta Ct Value	Expression Fold Change			
0. hét	WT	GOI	27,21	25,87	25,22	25,13	-	26,54	-	25,18	-4,82	-4,73	-0,09	1,06437018	0,99227892	0,10195245
		HKG	21,64	21,81	20,58	20,32	21,73	-	20,45	-	-	-	-	0,92018765		
		GOI	25,99	26,12	25,22	25,13	-	26,06	-	25,18	-4,61	-4,73	0,12	0,92018765		
		HKG	21,44	21,46	20,58	20,32	21,45	-	20,45	-	-	-	-	0,92018765		
		GOI	27,38	27,50	25,22	25,13	-	27,44	-	25,18	-4,20	-4,73	0,53	0,69495911		
		HKG	23,30	23,18	20,58	20,32	23,24	-	20,45	-	-	-	-	0,69495911		
	NOX5-KO	GOI	31,28	30,29	25,22	25,13	-	30,79	-	25,18	-8,76	-4,73	-4,03	16,336194	8,51557656	11,0600233
		HKG	22,11	21,95	20,58	20,32	22,03	-	20,45	-	-	-	-	16,336194		
		GOI	25,96	25,39	25,22	25,13	-	25,68	-	25,18	-4,81	0,49	-5,30	39,2603193		
		HKG	20,97	20,77	25,89	25,44	20,87	-	25,67	-	-	-	-	39,2603193		
4. hét	WT	GOI	25,65	25,87	25,22	25,13	-	25,76	-	25,18	-5,32	0,49	-5,81	56,1027662	47,6815427	11,9094084
		HKG	20,71	20,17	25,89	25,44	20,44	-	25,67	-	-	-	-	56,1027662		
		GOI	27,60	27,09	25,22	25,13	-	27,35	-	25,18	-6,65	-4,73	-1,92	3,78423059		
		HKG	20,63	20,77	20,58	20,32	20,70	-	20,45	-	-	-	-	3,78423059		
	NOX5-KO	GOI	27,13	26,53	25,22	25,13	-	26,83	-	25,18	-5,22	-4,73	-0,50	1,40932076	2,59677567	1,67931485
		HKG	21,76	21,46	20,58	20,32	21,61	-	20,45	-	-	-	-	1,40932076		
		GOI	21,76	21,46	20,58	20,32	21,61	-	20,45	-	-	-	-	1,40932076		
		HKG	21,76	21,46	20,58	20,32	21,61	-	20,45	-	-	-	-	1,40932076		

12. táblázat: NRF2 gén eredményei

		Experim ental Well 1	Experim ental Well 2	Control Well 1	Control Well 2	Averag e Experim ental Ct Value	Averag e Experim ental Ct Value	Averag e Control Ct Value	Averag e Control Ct Value	Δ Ct Value (Experim ental)	Δ Ct Value (Contr ol)	Delta Delta Ct Value	Expres sion Fold Chang e		
		Raw Ct Value	Raw Ct Value	Raw Ct Value	Raw Ct Value	TE	HE	TC	HC	Δ CTE	Δ CTC	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{\Delta\Delta$ Ct	Áttag	Szórás
0.hét	NOX5-KO	1 HKG	25,87	25,22	25,13	-	26,54	-	25,18	0,64	0,49	0,15	0,9013	1,00157779	0,14188427
		GOI	27,36	27,00	25,89	27,18	-	25,67	-						
		HKG	25,99	26,12	25,22	-	26,06	-	25,18	0,35	0,49	-0,14	1,1019		
		GOI	26,58	26,23	25,89	26,41	-	25,67	-						
	WT	5 HKG	27,50	25,22	25,13	-	27,44	-	25,18	1,06	0,49	0,57	0,6736	4,25448958	5,06411887
		GOI	28,59	28,41	25,89	28,50	-	25,67	-						
		HKG	31,28	30,29	25,22	-	30,79	-	25,18	-2,48	0,49	-2,97	7,8354		
		GOI	28,26	28,35	25,89	28,31	-	25,67	-						
4. hét	NOX5-KO	3 HKG	25,39	25,22	25,13	-	25,68	-	25,18	0,86	0,49	0,36	0,7765	0,50089075	0,38972633
		GOI	26,46	26,60	25,89	26,53	-	25,67	-						
		HKG	25,65	25,87	25,22	-	25,76	-	25,18	2,64	0,49	2,15	0,2253		
		GOI	28,57	28,23	25,89	28,40	-	25,67	-						
	WT	7 HKG	27,09	25,22	25,13	-	27,35	-	25,18	0,26	0,49	-0,23	1,1769	0,98074542	0,277414
		GOI	27,69	27,51	25,89	27,60	-	25,67	-						
		HKG	27,13	26,53	25,22	-	26,83	-	25,18	0,84	0,49	0,35	0,7846		
		GOI	27,75	27,59	25,89	27,67	-	25,67	-						



8. ábra: Relatív génexpressziós változások az NRF2, a PRDX1 és a GPX1 gének esetében, a koleszterinnel etetett vad típusú (WT) és NOX5 enzimhiányos (NOX5-KO) nyulakban vizsgálva 4 hét különbséggel.



9. ábra: Relatív génexpressziós változások a CAT gén esetében, a koleszterinnel etetett vad típusú (WT) és NOX5 enzimhiányos (NOX5-KO) nyulakban vizsgálva 4 hét különbséggel.

Az összes vizsgált gén esetében sikerült jól beállítani a reakciókat, így azok alkalmasak a génexpressziós változások követésére. A tervezett primerek specifikitása jó és az azonos minták közötti alacsony szórás is jó reakciókörülményeket feltételez. A kis elemszámú mérésekből nem ítélt meg, hogy jelentkezett-e eltérés a két vizsgálati csoport között. Statisztikai próbát sem végeztünk, mivel ekkora elemszámnál ez nem lehetséges. A koleszterinnel történő etetés hatásainak vizsgálatához a kísérleti csoportok elemszáma min. 4 állat, a statisztikai elemzéshez szükséges minimum elemszám, de a kísérlet eredményessége szempontjából ennél több állat szükséges, hogy a kísérlet során fellépő állatorvosi ellátást igénylő megbetegedések, esetleg elhullás esetében a kísérletből kizárásra kerülő állatok pótlása megtörténjen, illetve a statisztikai elemzés megbízhatóságát is növeli a nagyobb elemszám, ezért a tervezett elemszám csoportonként 8 állat. Az állatházi lehetőségek korlátozottak (ketrecek száma, tenyésztésbe vonható állatok létszáma), ezért a kísérlethez szükséges állatok szaporításakor ezt is figyelembe kell venni, hogy ekkora elemszámú csoportok előállítását bizonytalanságot hordoz abban a tekintetben, hogy mikor tudjuk elkezdni a kísérleteket.

Tervezett kísérleti csoportok:

- *koleszterin-etetett Nox4-KO csoport
- * koleszterin-etetett vad típusú csoport
- *hagyományos táppal etetett Nox4-KO csoport
- * hagyományos táppal etetett vad típusú csoport

Mivel egyes antioxidáns rendszert szabályozó gének nem expresszálnak plazmasejtekben, azok esetében érdemes kiterjeszteni a vizsgálatainkat más szövetekre, például máj és vese szöveire. Ilyen gének például a SOD1, NOX4. A kísérleti csoportok feldolgozásakor az állat különböző szerveiből veszünk mintákat, ezeket rögtön folyékony nitrogénben fagyasztjuk és későbbi vizsgálatokra -70 C-on fagyasztva tároljuk. A dolgozatomban szereplő állatok szöveti mintái rendelkezésre állnak, melyeken előzetes expressziós vizsgálatokat tudunk végezni további gének teszteléséhez, illetve a várható expressziós változások előzetes vizsgálatához. A

koleszterinetetés negyedik hetében történő mintavétel egy köztes állapotot jelöl. A korábban már beállított vizsgálati metodika alapján (Petheő et al., 2021) a 0. és a 8. héten történő mintavételt fogjuk alkalmazni.

5.: Összefoglalás

Az emlős szervezetek oxidáns-antioxidáns rendszere összetett, egymással interakcióban álló és egymásra ható jelátviteli folyamatokból áll. Ezen folyamatok központi szabályozói az NRF2 és a Keap1; a lényeges enzimek, melyek a szervezet redox státuszának szabályozásában vesznek részt a PRDX, GPX, CAT, SOD enzimek és különböző izoformáik; továbbá a szervezetben fiziológiásan termelődő ROS-képzés enzimjei, a NOX különböző izoformái, melyek megjelenése szövet-szerv specifikus jellegzetességeket mutat. A NOX4, mely több szervben is expresszálódik, emiatt jelentősége az érintett szervek, illetve az egész szervezet redox-egyensúlyának szabályozásában lényeges. A Nox5 expressziója igen korlátozott, csak néhány szövetben jelenik meg és ezekben is alacsony szinten expresszál, viszont, mint az a Nox5-KO nyulak esetében az érlelmeszedés vizsgálata során is kiderült, eddig még nem jellemzett molekuláris útvonalakon keresztül az alacsony expressziós szint is jelentős hatással bír patológiás folyamatokra. Jelen vizsgálathoz azon géneket választottuk ki, amelyek plazmasejtekben expresszálódnak, azonban jelentős szerepük van az élő szervezetekben végbe menő antioxidáns védelmi mechanizmusokban, és a relatív expressziójukat mértük a NOX5 génkiütött nyúlban.

A vizsgálat metodikai része, azaz a qPCR reakció beállítása és a primerek tesztelése a NRF2, PRDX1, GPX1, CAT gének esetében sikeresen megtörtént. A következő lépés a vizsgált állatok számának bővítése, illetve a vizsgálat kiterjesztése, az antioxidáns és az oxidáns rendszer egyéb génjeire.

Irodalomjegyzék

Bedard, K., Krause, K.-H. (2007): The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 87(1): 245-313.

Bősze, Zs., Hiripi, L., Carnwath, J. W., Niemann, H. (2003): The transgenic rabbit as model for human diseases and as a source of biologically active recombinant proteins. *Transgenic Research*, 12(5): 541-53.

Bősze, Zs., Major, P., Baczkó, I., Odening, K. E., Bodrogi, L., Hiripi, L., Varró, A. (2016): The potential impact of new generation transgenic methods on creating rabbit models of cardiac diseases. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 121(2): 123-30.

Devasagayam, T.P., Tilak, J.C., Boloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., Lele, R.D. (2004): Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Journal of the Association of Physicians of India*, 52:794-804.

Di Meo, S., Venditti, P. (2020): Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020: 9829176.

Erali, M., Voelkerding, K.V., Wittwer, C.T. (2008): High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Experimental and Molecular Pathology*, 85(1): 50-8.

Fan, J., Wang, Y., Chen, Y. E. (2021): Genetically Modified Rabbits for Cardiovascular Research. *Frontiers in Genetics*, 12: 614379

Kattoor, A.J., Pothineni, N.V.K., Palagiri, D., Mehta, J.L. (2017): Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports*, 19(11): 42.

Petheő, G. L., Kerekes, A., Mihálffy, M., Donkó, Á., Bodrogi, L., Skoda, G., Baráth, M., Hoffmann, O. I., Szeles, Z., Balázs, B., Sirokmány, G., Fábíán, J. R., Tóth, Z. E., Baksa, I., Kacs Kovics, I., Hunyady, L., Hiripi, L., Bősze,

Z., Geiszt, M. (2021): Disruption of the NOX5 Gene Aggravates Atherosclerosis in Rabbits. *Circulation Research*, 128(9): 1320–1322.

Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., Lin, X. (2013): An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*, 3(3): 71-85.

Touyz, R. M., Anagnostopoulou, A., Camargo, L. L., Rios, F. J., Montezano, A. C. (2019): Vascular Biology of Superoxide-Generating NADPH Oxidase 5-Implications in Hypertension and Cardiovascular Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 30(7): 1027-1040.

Yamamoto, T., Bishop, R. W., Brown, M. S., Goldstein, J. L., Russell, D. W. (1986): Deletion in cysteine-rich region of Ldl receptor impedes transport to cell-surface in WHHL rabbit. *Science*, 232: 1230–1237.

4. sz. függelék – Hallgatói és konzulensi nyilatkozat minta

NYILATKOZAT

Alulírott LÓKI LILLA, a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, SZENT ISTVÁN Campus, MEZŐGAZDASÁGI BIOTECHNOLÓGUS szak nappali/levelező* tagozat végzős hallgatója nyilatkozom, hogy a dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem. Hozzájárulok ahhoz, hogy Záródolgozatom/Szakdolgozatom/Diplomadolgozatom egyoldalas összefoglalója felkerüljön az Egyetem honlapjára és hogy a digitális verzióban (pdf formátumban) leadott dolgozatom elérhető legyen a témát vezető Tanszéken/Intézetben, illetve az Egyetem központi nyilvántartásában, a jogi és etikai szabályok teljes körű betartása mellett.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem*

Kelt: 2022. év OKTÓBER hó 19. nap

Lóki Lilla
Hallgató

NYILATKOZAT

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a Záródolgozatot/Szakdolgozatot/Diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A Záródolgozatot/Szakdolgozatot/Diplomadolgozatot záróvizsgán történő védésre javaslom / nem javaslom*.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem*

Kelt: 2022. év OKTÓBER hó 19. nap

Bodnag Lilla
Belső konzulens

*Kérjük a megfelelőt aláhúzni!

4. sz. függelék – Hallgatói és konzulensi nyilatkozat minta

NYILATKOZAT

Alulírott LÓKI LILLA, a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, SZENT ISTVÁN Campus, MEZŐGAZDASÁGI BIOTECHNOLÓGUS szak nappali/levelező* tagozat végzős hallgatója nyilatkozom, hogy a dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem. Hozzájárulok ahhoz, hogy Záródolgozatom/Szakdolgozatom/Diplomadolgozatom egyoldalas összefoglalója felkerüljön az Egyetem honlapjára és hogy a digitális verzióban (pdf formátumban) leadott dolgozatom elérhető legyen a témát vezető Tanszéken/Intézetben, illetve az Egyetem központi nyilvántartásában, a jogi és etikai szabályok teljes körű betartása mellett.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem*

Kelt: 2022. év OKTÓBER hó 19. nap

Loki Lilla
Hallgató

NYILATKOZAT

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a Záródolgozatot/Szakdolgozatot/Diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A Záródolgozatot/Szakdolgozatot/Diplomadolgozatot záróvizsgán történő védésre javaslom / nem javaslom*.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem*

Kelt: 2022 év OKTÓBER hó 19 nap

[Signature]
Belső konzulens

*Kérjük a megfelelőt aláhúzni!