



# **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

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. 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 érlelmeszesedés kialakulására. A Nox5 gén hiányával párhuzamosan fokozódott az érlelmeszesedés mértéke a nyulak aortájában koleszterinetetés következtében, ami arra utal, hogy a NOX5 enzim jelenléte protektíven hathat a plakkképződéssel szemben.

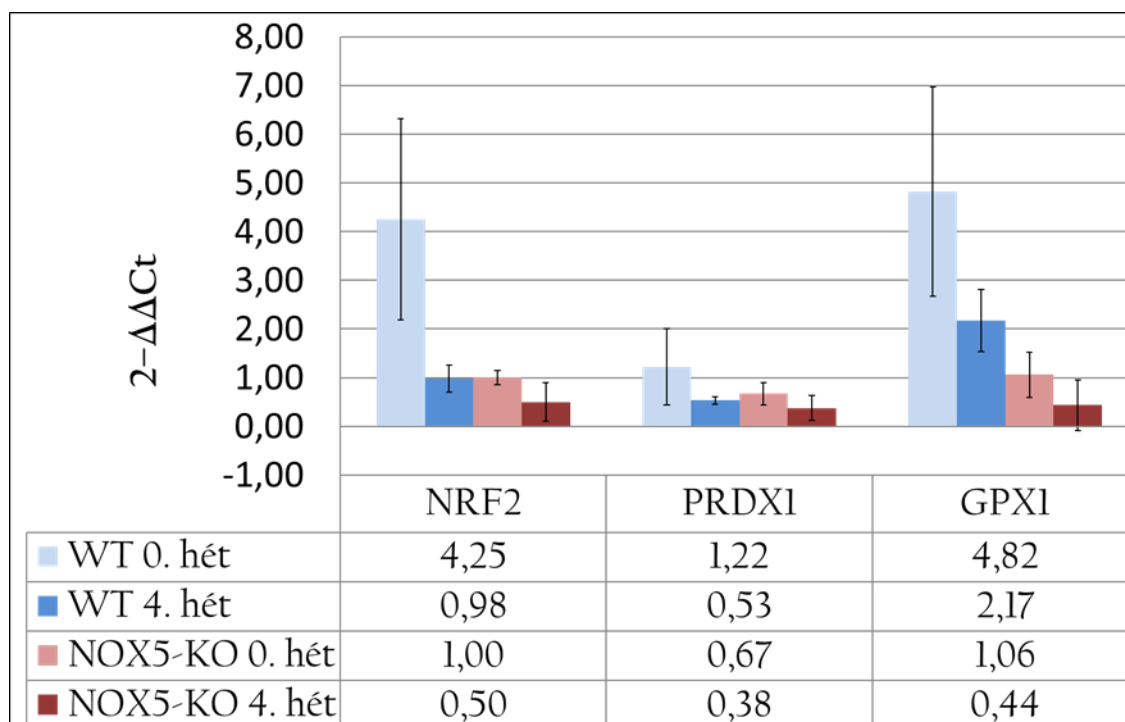
A munkám célkitűzése, hogy a vérben lévő sejtes alkotókban az oxidáns-antioxidáns rendszerben fellépő expressziós változások eltéréseit hasonlítsam össze NOX5 génkiütött és vad típusú állatok esetében a magas koleszterintartalmú táp etetése előtt és után. Etetési kísérlet: Az állatok 8 héten keresztül 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. Én a 4 hetes etetés utáni vérmintákkal dolgoztam.

A munkafolyamat:

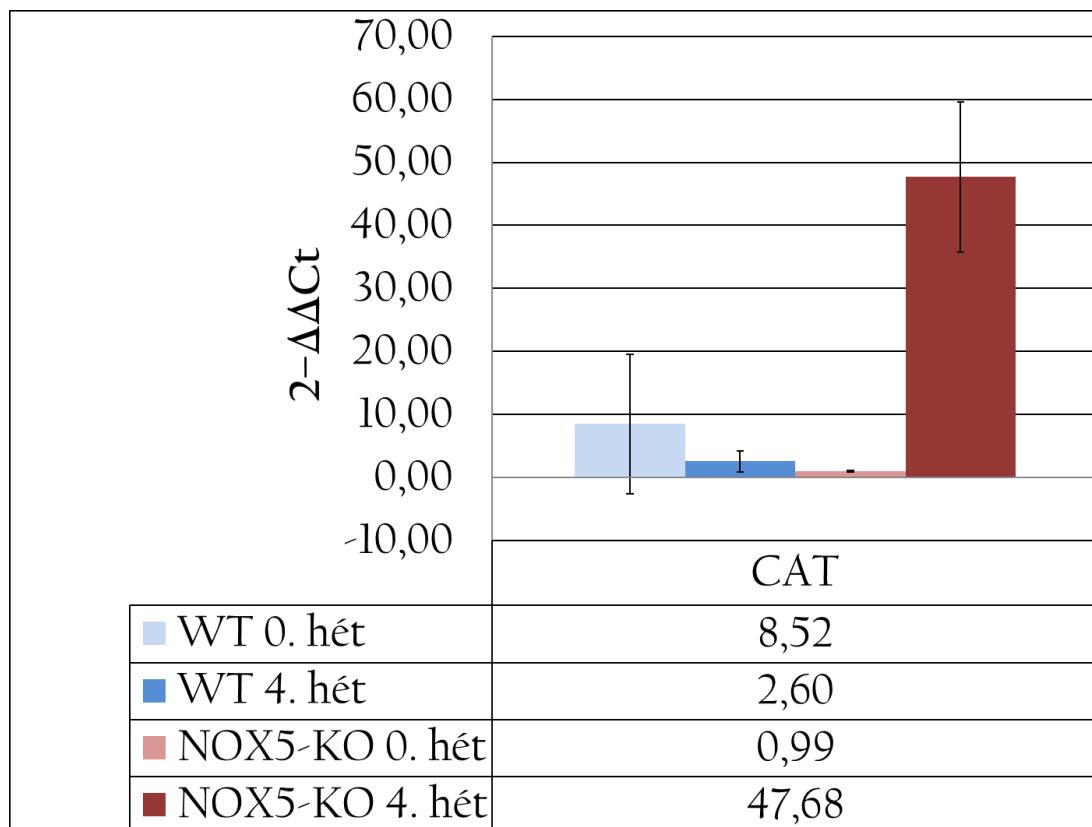
- gének kiválasztása (háztartási gén és vizsgált gének)
- qRT-PCR primerek tervezése
- primerek tesztelése és a qRT-PCR reakció beállítása
- qRT-PCR vizsgálatok Nox5 KO és vad típusú állatok vérmintáin
- eredmények összehasonlítása és értékelés

A vizsgálati módszerek: Nyúl vérből RNS izoláltam. 1%-os agaróz gélen futtattuk a kitisztított mintákat, hogy meggyőződjünk azok tisztaságáról, minőségéről és a genomi DNS mentességéről. A tisztított RNS-ből cDNS szintézist végeztünk reverz transzkripcióval. Egy vad típusú minta segítségével hagyományos PCR reakcióban ( $T_m$  60°C) teszteltük a kiválasztott génekre tervezett primerek működését. A CAT, PRDX1, NRF2, GPX1 gének esetében sikerült a qPCR reakciót beállítani. A qPCR elvégzése után a relatív génexpressziót  $\Delta\Delta Ct$  analízissel határoztuk meg.

Eredmények és értékelésük:



1. 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.



2. 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 specifitása 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.

Mivel egyes antioxidáns rendszert szabályozó gének nem expresszálódnak plazmasejtekben, azok esetében érdemes kiterjeszteni a vizsgálatainkat más szövetekre, például máj és vese szövetekre.

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 érlelmeszesedés 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 génkiűtött nyúlban.