



SZENT ISTVÁN EGYETEM
Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

Transzgénikus állatmodell előállítás és jellemzése hosszú QT szindróma vizsgálatára

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Major Péter

GÖDÖLLŐ

A doktori iskola megnevezése: Állattenyésztés-Tudományi Doktori Iskola

Tudományága: Állattenyésztés-tudomány

Vezetője: **Professzor Dr. Mézes Miklós DSc., akadémikus**
Tanszékvezető, egyetemi tanár
Szent István Egyetem,
Mezőgazdasági- és Környezettudományi Kar,
Állattudományi Alapok Intézet,
Takarmányozástani Tanszék

Témavezető: **Dr. Bősze Zsuzsanna DSc.**
Tudományos tanácsadó, csoportvezető
Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet
Állatbiotechnológiai főosztály

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

TARTALOM

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
2.1 ELEKTROFIZIOLÓGIA	9
2.1.1. AZ SZÍV TULAJDONSÁGAI	9
2.1.2. AKCIÓS POTENCIÁL	9
2.1.3. ELEKTROKARDIOGRÁFIA (EKG)	11
2.1.4. TORSADES DE POINTES (TDP)	12
2.1.5. REPOLARIZÁCIÓS TARTALÉK (REPOLARIZÁCIÓS REZERV)	13
2.1.6. KÁLIUM CSATORNÁK	14
2.1.6.1. KÉSŐI KÁLIUM IONCSATORNA	15
2.1.7. HOSSZÚ QT SZINDRÓMA	16
2.1.7.1 HOSSZÚ QT SZINDRÓMA ÉS A NONSENSE-MEDIATED mRNA DECAY (NMD)	17
2.2. ÁLLATMODELLEK	18
2.2.1. EGÉR MODELLEK A KARDIOLÓGIÁBAN	18
2.2.2. A KORÁBBAN LÉTREHOZOTT HOSSZÚ QT NYÚLMODELLEK BEMUTATÁSA	20
2.3. TRANSZGÉNIKUS ÁLLAT LÉTREHOZÁSA	21
2.3.1. MIKROINJEKTÁLÁS	22
2.4. KCNE1 GÉNREŐL ÉS A G52R MUTÁCIÓRÓL	24
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	26
3.1. FELHASZNÁLT ANYAGOK	26
3.1.1. ÁLLATOK	26
3.1.2. KLÓNOZÓ ÉS EXPRESSZIÓS VEKTOROK	26
3.1.3. HUMÁN CDNS KÖNYVTÁR	26
3.2. FELHASZNÁLT ÁLLATBIOTECHNOLÓGIAI MÓDSZEREK	27
3.2.1. POLIMERÁZ-LÁNCREAKCIÓ (PCR)	27
3.2.2. PCR MUTAGENEZIS	27
3.2.3. RNS KIVONÁS	28
3.2.4. KVANTITATÍV PCR (qPCR)	28
3.2.5. WESTERN BLOT	28
3.2.6. IMMUNHISZTOKÉMIA ÉS KONFOKÁLIS MIKROSZKÓPOS VIZSGÁLAT	29
3.2.7. IZOELEKTROMOS FÓKUSZÁLÁS	29
3.2.8. SZUPEROVULÁLTATÁS	30
3.2.8.1. EGÉR	30
3.2.8.2. NYÚL	30
3.2.9. MIKROINJEKTÁLÁS	30

3.2.9.1. EGÉR	30
3.2.9.2. NYÚL	31
3.2.10. EMBRIÓ BEÜLTETÉS	31
3.2.10.1. EGÉRBEN	31
3.2.10.2. NYÚLBAN	32
3.3. FELHASZNÁLT ELEKTROFIZIOLÓGIAI MÓDSZEREK	32
3.3.1. AZ RR ÉS QT INTERVALLUM RÖVIDTÁVÚ VARIABILITÁSA (STVRR, STVQT)	33
3.3.2 FOLT-FESZÜLTSGZÁR (PATCH CLAMP) MÉRÉSEK	33
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	34
4.1. VAD TÍPUSÚ ÉS MUTÁNS KCNE1 EXPRESSZIÓJÁRA ALKALMAS KONTRUKCIÓK LÉTREHOZÁSA.	34
4.2. <i>IN VITRO</i> EREDMÉNYEK	35
4.3. <i>IN VIVO</i> EREDMÉNYEK	35
4.4. A TRANZSGÉN RŐL ÁTÍRÓDÓ mRNA KIMUTATÁSA	38
4.5. ELEKTROFIZIOLÓGIAI EREDMÉNYEK	41
5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	43
6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA ÉS JAVASLATOK	44
7. ÖSSZEFOGLALÁS	47
8. MELLÉKLETEK	49
M1. IRODALOM JEGYZÉK	49
M2. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	58
M3. ABSTRACT – ANGOL ÖSSZEFOGLALÓ	59
M4. PRIMEREK LISTÁJA	61
M5. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	62

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AP	-	Akciós Potenciál
cDNS	-	complementary DNA
cccDNS	-	covalently closed circular DNA
CPI	-	Cytoplasmic plasmid injection citoplazmába történő mikroinjektálás
CHO cell	-	Chinese hamster ovary cell
CRISPR	-	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
EAD	-	Early AfterDepolarization korai utódepolarizáció
EARA	-	European Animal Research Association
EKG	-	Elektrokardiográfia
ERP	-	Effektív Refrakter Periódus
FCS		fotal bovine serum főtális borjú savó
GnRH	-	Gonadotrop Releasing Hormon Gonadotropin-felszabadító hormon
hCG	-	Human Chorionic Gonadotropin Humán koriális gonadotropin
hERG	-	human Ether-a`-go-go Related Gene
HSZH	-	Hirtelen szívhalál
IEF	-	Isoelectric focusing Izoelektromos fókuszálás
IK	-	feszültségfüggő késői egyenirányítói káliumáram
IKr	-	IKrapid feszültségfüggő késői egyenirányítói káliumáram gyors komponense
IKs	-	IKslow feszültségfüggő késői egyenirányítói káliumáram lassú komponense
IKur	-	IKultrarapid feszültségfüggő késői egyenirányítói káliumáram ultragyors komponense
IU	-	International Unit Nemzetközi Egység (NE)
KCNQ1	-	IKs ioncsatorna pólus alkotó alegységét kódoló gén
KCNE1	-	IKs ioncsatorna szabályzó alegységét kódoló gén
LQTs	-	Long QT Syndrome hosszú QT szindróma
LQT5	-	Long QT 5 syndrome hosszú QT szindróma 5 típusa
NMD	-	Nonsense-mediated mRNA decay <i>nincs magyar megfelelője</i>
minK	-	fehérje: IKs ioncsatorna szabályzó alegysége, KCNE1 gén kódolja
MYH7	-	Myosin Heavy Chain Beta Isoform (MHC- β) nehézláncú - miozin β -izof ormja

PCR	-	Polimerase Chain Reaction polimeráz lánreakció
PNI	-	Pronucleus injection előmagba történő mikroinjektálás
PMSG	-	Pregnant Mare Serum Gonadotropin vemhes kanca szérum gonadotropin
PVSI	-	Perivitelline Space injection perivitellináris térbe történő mikroinjektálás
PCR	-	Polymerase Chain Reaction polimeráz lánreakció
RT-PCR	-	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Reverz transzkripciót követő polimeráz lánreakció
QPCR	-	Quantitative Polymerase Chain Reaction kvantitatív polimeráz lánreakció
TALEN	-	Transcription activator-like effector nucleases
TdP	-	Torsades de Pointes
Tg	-	transzgénikus
QTc	-	frekvencia korrigált QT intervallum
SB	-	Sleeping Beauty
STVQT	-	Short-term beat-to-beat variability of QT interval QT intervallum rövidtávú variabilitása
STVRR	-	Short-term beat-to-beat variability of RR interval RR intervallum rövidtávú variabilitása
TM	-	Transzmembrán
ZFN	-	Zink Finger Nuclease
VF	-	Ventricular fibrillation Kamrai fibrilláció
VT	-	Ventricular Tachycardia kamrai tahikardia

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A hirtelen szívhalálnak (HSZH) a legáltalánosabb, de még elfogadott definíciója a következő: az a kardiális eredetű halál, amelynél a tünetek kezdetétől a halál beálltáig maximum egy óra telik el (Cerrone et al, 2011, Janse MJ, 2003). A hirtelen szívhalál történetét vizsgálva Fazekas Tamás és munkatársai egészen a Bibliai időkig visszanyúlnak. Elmondásuk szerint Sámuel könyvében Éli főpapnál és utódainál leírt tünetek, a dominánsan öröklődő, familiáris Romano-Ward szindrómának megfeleltethetők. Ugyanitt említik, hogy a Babiloni Talmudban egy másik hasonló leírás alapján felfedezhető a hirtelen szívhalálnak ez a típusa. Sőt Hippokratész: Aforizmak II/41 szakaszában fellelhető a hirtelen szívhalál első leírása: „Akik minden felismerhető okot nélkülöző gyakori és mély ájulásokban szenvednek, hirtelen halnak meg...” (Fazekas 2012, Janse MJ 2003).

Nagy-Britanniában kb. 70-90 ezer, az Amerikai Egyesült Államokban évente kb. 400-460 ezer váratlan szívmegeállást detektálnak, a túlélés mindössze 1-3% (Martin et al, 2012). Magyarországon, becslések szerint a meglepetésszerű szívhalál gyakoribb, mint a gazdaságilag fejlett államokban: hazánkban évente kb. 20-26 ezer (naponta kb. 70) ember hal meg kórházon kívül hirtelen szívmegeállásban (Fazekas 2012). Hirtelen szívhalálban elhunytak 15-20% -ért felel a hosszú QT szindróma valamelyik típusa (Semsarian et al, 2015).

Kezdetben a HSZH karakterizálása igen sok problémát jelentett az orvostudományban, mert az elhunytak jelentős részénél semmilyen anatómiai elváltozást nem találtak a szívben, ezért először ezeket „idiopátiás kamrai fibrilláció (VF)” fogalom körébe sorolták. Azonban, a molekuláris géndiagnosztikai módszerek fejlődésével bebizonyosodott, hogy az esetek jelentős részében a szívizomsejtek ioncsatorna rendellenességei állnak a háttérben. Az ilyen ioncsatorna rendellenességek hatására az ingerület terjedése lassul a sejtek felszínén, azaz az akciós potenciál időtartama meghosszabbodik. A lassult ingerület hatással van az EKG görbe szerkezetére is, mivel az ioncsatornákon átfutó egységnyi ionáramok csökkennek, s így az EKG görbe egészséges arányai megváltoznak. Az EKG görbe nevezetes része a Q és T hullám, e két pont közötti periódus egy szívkamra összehúzóási idő. A QT távolság meghosszabbodása különféle ioncsatorna hibákra vezethető vissza. Eddig összesen 16 db különböző hosszú QT szindrómát különítettek el az őket okozó ioncsatornák mutációjára miatt (Medeiros et al, 2007, Giudicessi et al, 2018). Ma már számtalan öröklődő, esetenként hirtelen szívhalált okozó strukturális szívizombetegséget, kardiomiopátiákat és (makro) anatómiailag ép, szívben fellépő szubcelluláris ioncsatorna-betegséget, ún. channelopathiát ismerünk (pl.: *hosszú- és rövid-QT szindrómák*). Egy-egy öröklött mutáns csatorna, azonban még nem okoz rögtön szívmegeállást, hanem csupán potenciális veszélyt

jelent a későbbiekben, mivel csökkenti annak a lehetőségét, hogy az ioncsatornák egymást helyettesítsék. Az egyik legfőbb probléma, ami a halálesetek számát növeli, hogy a veleszületett ioncsatorna hibák miatt csökken a helyettesítő képesség, s így egy újabb ioncsatorna kiesést, ami pl. egy gyógyszer hatóanyag miatt jött létre, a szervezet már nem képes kompenzálni, ezáltal megnövekedik az aritmiák megjelenésének valószínűsége. Egy-két ioncsatorna mutáns csökkent működését roppant nehéz detektálni a szervezetben és előre jelezni magasabb kockázatot az aritmiák megjelenésére. Valamint nehéz azonosítani a tünetek okozó mutációt és így funkció vesztett csatorna típusát. Ezért a mutáns humán géneket kifejező nem egér állatmodellek lehetőséget adnak pontosabban modellezni az adott betegséget és érzékenyebb előrejelzési módszereket fejleszteni. Az ilyen betegségek korai azonosítását éppen az tette bonyolulttá, hogy csak az aritmiák megjelenésekor vagy már a halál bekövetkezésekor derült ki, hogy a beteg miben szenvedett. A transzgénikus betegségmodellek lehetővé teszik olyan egyedek létrehozását, amelyek terheltsége jól ismert, s így a drasztikus tünetek megjelenése előtt vizsgálhatók ezek előjelei.

A nyúl régóta kedvelt állatmodell a kísérletes kardiológiai vizsgálatokban, mivel elektrofiziológiai tulajdonságai hasonlítanak az emberéhez, így a rágcsáló modelleknél jobban használhatók. Ezen kívül még szerveinek mérete miatt is előnyben részesített, mivel könnyebben vizsgálható, mint egy egér vagy egy patkány, de tartásának helyigénye jóval kisebb, mint a kutya vagy egy sertés esetében.

Célkitűzéseim a következők voltak:

1. Megépíteni a transzgén konstrukciókat, amelyek tartalmazzák a nyúl beta-miozin promotert és a humán G52R mutáns, KCNE1 cDNS-t, illetve ennek mutációt nem hordozó változatát.
2. Létrehozni az LQT5 transzgén expressziójának ellenőrzésére alkalmas transzgénikus egér vonalat.
3. Létrehozni az LQT5 szindróma vizsgálatára alkalmas transzgénikus nyúl modellt, vizsgálni a transzgén öröklődését, vonalat alapítani.
4. Igazolni molekuláris biológiai módszerekkel a transzgén szövet specifikus expresszióját. Valamint a transzgénről átíródó fehérje mennyiségét meghatározni.
5. Együttműködő partnereinkkel jellemezni a transzgenikus nyúlmodellt elektrofiziológiai módszerekkel.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 ELEKTROFIZIOLÓGIA

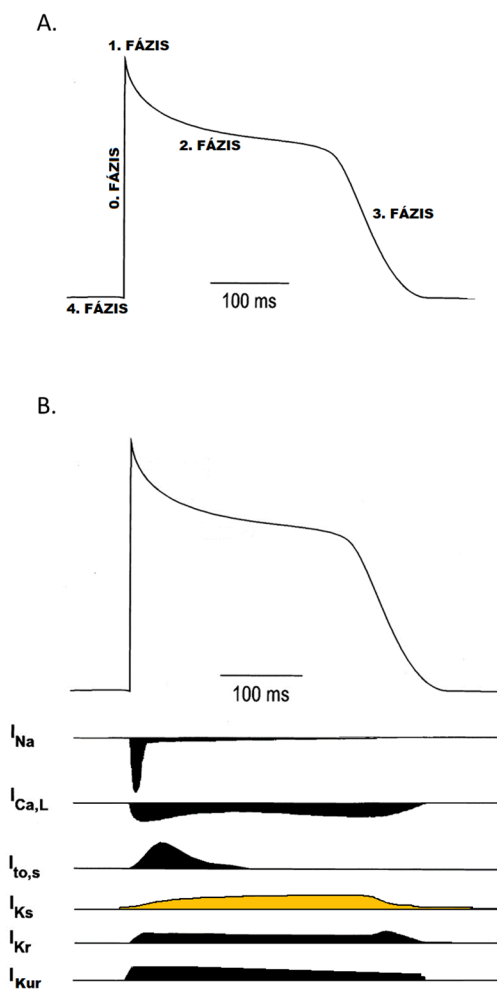
2.1.1. AZ SZÍV TULAJDONSÁGAI

A szív a testben az egyetlen saját ingerképző központtal és ingerületvezető rendszerrel rendelkező szerv. A szív ingerületképző szerve a szinusz csomó (*nodus sinuatrialis*), amely az emlősök szívében a jobb pitvarban, közelebről a *sinus venarum cavarumban* van. Emberben közelítőleg 1mm vastagságú, hossza kb. 15 mm, szélessége 3 mm. A szinusz csomó középpontjában vannak azok a sejtek, amelyekben a ritmusos ingerületképzés végbe megy, a periférián a sejtek feladata elsősorban az ingerület átadás. A szinusz csomóban keletkező ingerület, depolarizációs hullám, a pitvarizomzatban terjedve eléri a pitvar-kamrai csomót (*nodus atrioventricularis*). A pitvar izomzatban az ingerület terjedése nem homológ, van három olyan „internodalis pálya”, amelynek sejtjei kissé gyorsabb vezetésűek. A pitvar-kamrai csomó sejtjei sokkal kisebbek, mint a szinusz csomóé, így a sejtek érintkezésénél kevesebb réskapcsolat (*macula communicans*) található, következésképp elektromos ellenállásuk nagyobb és vezetési gyorsaságuk kisebb. Ennek az ingerületvezetési késleltetésnek fontos szerepe van abban, hogy a kamrák a pitvarokat követve csak bizonyos idő elteltével húzódnak össze. A pitvar-kamrai csomóból kiinduló páratlan His-köteg, a belőle kettéágazó Tawara-szárak és az elágazódásaik, a Purkinje-rostok állománya újra gyorsan vezetik az ingerületet, 150-szer olyan gyorsan, mint a pitvar-kamrai csomó, és 6-szor gyorsabb, mint a környező szívizomsejtek. Így jön létre az a jelenség, hogy a pitvar-kamrai határon túljutott ingerület az egész kamrai izomzatot szinte egyszerre hozza ingerületbe (Kovács, 2008, Sass Miklós és Zboray Géza, 2004). Egy felnőtt humán szív átlagos tömege nőknél 230-280g, férfiaknál 280–340g. Ezzel szemben nyúl szív átlagos súlya 8g (4 hónapos bak, 3,8 kg), egy kifejlett egér 0,0085g (8 hetes, hím egér). Az emberi átlag pulzusszáma 72, a nyúlé 180-250, a patkányé 450-750 és az egéré 670, a tengerimalac pedig 200-300 között van (*Merck Veterinary Manual: www.msdtvetmanual.com*). Ezek az értékek is szemléltetik, hogy a nyúl szív fiziológiai jellemzői állnak legközelebb az emberéhez, nem is beszélve az elektrofiziológiai hasonlóságokról. Így rámutatnak arra a tényre, hogy az egér nem ideális állatmodellje a humán szív modell kísérleteknek.

2.1.2. AKCIÓS POTENCIÁL

Az sejtmembránok belső és külső felszíne között eltérő az ionok eloszlása, koncentrációja. A sejt belsejében (intracelluláris térben) a káliumion (K^+) míg a sejten kívüli térben a nátriumionok (Na^+) vannak többségben, addig a sejten kívüli (extracelluláris) térben a negatív töltésű klorid- (Cl^-) ionok gyűlnek össze. Az ioneloszlás egyenlőtlensége a membrán két oldala között elektromos

potenciálkülönbséget okoz, amelynek értéke nyugalomban kb. -80mV , ez a sejt nyugalmi membránpotenciálja. Ingerület hatására az extracelluláris Na^+ és Cl^- ionok beáramlanak a sejt belsejébe, ezt nevezzük depolarizációnak. Majd az ingerület második felében megtörténik az intracelluláris K^+ ionok kiáramlása, amit repolarizációnak hívunk. A nyugalmi potenciál szintje az ún. ingerlékeny membránú sejtekben (pl.: idegsejteken, izomsejteken) képes megváltozni, akciós potenciállá (AP) alakulni. A szívmembránú sejtek akciós potenciálját számos ionáram árnyalt összjátéka alakítja ki. A szív különböző részeiben az akciós potenciálok különböző lefutásúak. Általában az alábbi szakaszok (fázisok) különböztethetők meg, függően attól, hogy melyik szívtájékon keletkeznek (1. ábra) (Zaza 2000).



1. ábra: Az akciós potenciál részei és a hozzájuk tartozó ioncsatorna.

A. rész: Az emberi szívkamra akciós potenciálja és fázisai:

- A 0. fázis az ún. gyors depolarizáció, ekkor a membránpotenciál értéke negatívból hirtelen pozitívvá ugrik.
- Az 1. fázis egy gyors, de csak részleges repolarizáció, ami miatt a potenciál hirtelen egy kevésbé pozitív értéket vesz fel.
- A 2. fázis az ún. platófázis, melyben a membránpotenciál általában pozitív, s csak alig változik
- A 3. fázis a gyors repolarizáció, ekkor újra visszaáll az eredeti negatív membránpotenciál.

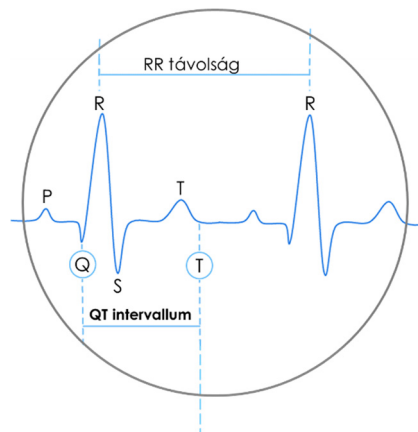
B. rész: Az emberi szívkamarai akciós potenciál fázisaiban működő különböző ioncsatornák, és rajtuk áramló töltések szemléltetése, a fázisokban történő működésük alapján. I_{Na} : Nátrium ioncsatorna, $I_{\text{Ca,L}}$: L típusú kalcium ioncsatorna, $I_{\text{to,s}}$: Tranziens, kifelé irányuló káliumáram, I_{Ks} : késői egyenirányító káliumáram lassú komponensének gátlása, I_{Kr} : késői egyenirányító káliumáram gyors komponensének gátlása (Moreno et al, 2012).

A szívritmuszavarok kialakulása az ingerületvezetés valamint ingerképzés zavarával hozható összefüggésbe. Az akciós potenciál után következik az effektív refrakter periódus, ami azt az időtartamot jelenti, ami ahhoz szükséges, hogy a szívmembrán újra

ingerelhető legyen. Az ingerületvezetés zavar miatt létrejövő aritmiák többsége re-entrán (újra belépő), azaz az ingerület visszatérésén és körforgásán alapul. A reentry-mechanizmus kialakulásának legfontosabb feltétele az egyirányú ingerületvezetési blokk. Emiatt olyan szívmembránú területek jutnak újra ingerületi állapotba, amelyek éppen relatív refrakter periódusban vannak. Ennek megfelelően egy ingerületi kör alakulhat ki. Normál esetben, az egyirányú, határozott hullám elnyomja a máshonnan érkező ingerület zavaró hatását, ezzel fenntartja az összehúzóerők normális ritmusát. Ha létrejön az egyirányú ingerületvezetési blokk, annak az a következménye,

hogy a problémás sejtekben megakad a fő ingervezetési irány és a szomszédos sejteken végigfutó ingerület „átszivárog” és az hozzá aktivitásba őket. De az így aktiválódott sejtben az inger fáziskésésben lesz a normális főághoz képest és a következő hullámok terjedését ezzel lassítja vagy eltéríti, ezzel megtörve a szív egészséges lüktetését, és arra készíti, hogy a szabályos összehúzódások helyett, gyors kis intenzitású remegés jöjjön létre.

Vannak azonban olyan aritmiák is, amelyekben mindkét elektropatológiai jelenség helyet kap. A kóros ingerképzés egyik jellegzetes típusa a korai utódepolarizáció (early afterdepolarization = EAD), amely a szívizom repolarizációját megnyújtó gyógyszerek alkalmazása során fellépő hosszú QT szindrómával és *torsades de pointes*, kamrai tachycardiával van összefüggésben: a ritmuszavart ingerképzési zavar (az EAD) indítja el, és ingerületvezetési zavar (reentry) tartja fenn.



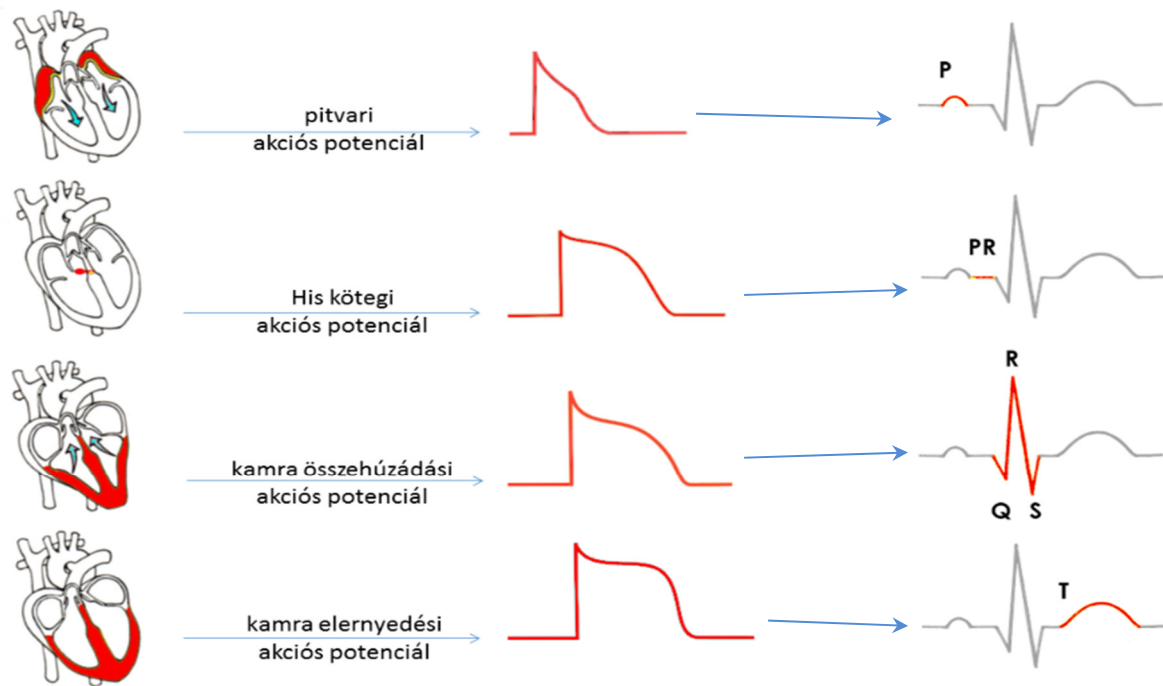
2. ábra: Az EKG görbe nevezetes pontjai és a QT távolság. (Az ábrát Major Péter készítette.)

- **P hullám** (pitvari hullám): az ingerület pitvari terjedésének felel meg
- **P-Q távolság:** átvezetési idő a pitvar és kamra között, időtartama
- **QRS komplexum** (kamrai hullám): a kamrák depolarizációját jelöli (gyors lefolyású), kis negatív Q-hullámból, magas pozitív R-hullámból és negatív S-hullámból áll. Ez idő alatt megy végbe a kamra teljes munkaizomzatának depolarizációja.
- **S-T távolság:** a kamrák lassú repolarizációs szakasza
- **T hullám:** elnyújtott közepes amplitúdójú hullám, a kamrák teljes repolarizációját jelzi
- **RR távolság:** két R-csúcs távolsága. A szívfrekvencia állapítható meg belőle. Szívfrekvenciát több RR távolság átlagából számolunk. Mivel normális esetben ingadozik a légzés során, ez a légzési aritmia. A tüdőben mechanoszenzitív receptorok vannak, amelyek a n. vagus afferens rostjain át az agytörzsön keresztül szabályozzák a szívfrekvenciát.
- **Q-T távolság:** kamraizomzat depolarizációjának és repolarizációjának együttes időtartama.

2.1.3. ELEKTROKARDIOGRÁFIA (EKG)

Az EKG olyan non-invazív diagnosztikai eljárás, amely a szív különböző részeiről származó AP-akat összesíti, és segítségével jellemezhető a szív egészségügyi állapota. Az EKG-görbe

potenciálváltozások (ún. hullámok) sorozatából áll, amelyek közül – megegyezés alapján – a pozitív irányú kitéréseket ábrázoljuk felfelé. Az EKG görbe nevezetes részei/hullámai: P, Q, R, S, és T (2. ábra) (Fonyó Attila, 2014, Aaronson, 2000).



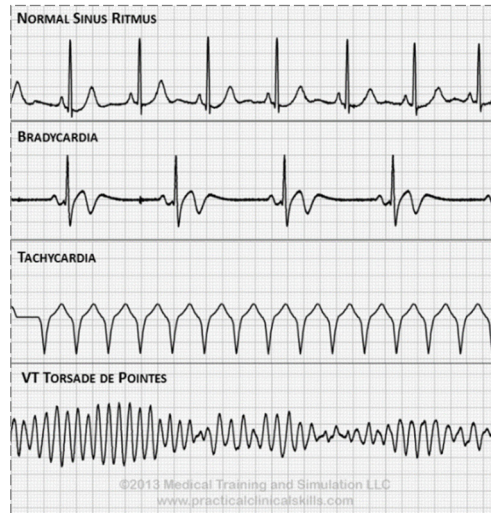
3. ábra: A szív ciklusok és az EKG összefüggéseinek vázlatos bemutatása.

Az inger terjedése egy szívdobbanás alatt, az ehhez tartozó, különböző szívtájékokról származó akciós potenciálok alakja és a szív ciklus szakaszai az EKG görbén. (Az ábrát Major Péter készítette backyardbrains.com/hearttrate képe alapján.)

2.1.4. TORSADES DE POINTES (TDP)

Kamrai tachycardiáról (VT) beszélünk, ha a kamrafrekvencia meghaladja a 100/perc-et, minimálisan 3 kapcsolt extraszisztolával, azaz a normál ritmuson kívüli szívösszehúzóással. A TdP a polimorf kamrai tachycardia speciális formája. Számos kardiovaszkuláris és nem-kardiovaszkuláris szer alkalmazása következtében alakulhat ki TdP, ami kedvezőtlen esetben kamra fibrillációhoz és hirtelen szívhalálhoz vezethet (Fenichel R. et al, 2004, Baczkó I., 2008). A megnyúlt repolarizáció és a TdP közötti kapcsolat a hosszú QT szindróma két formájában – veleszületett és szerzett – mutatkozik meg. Gyermekek- és fiatal felnőttekben a tachyaritmia tipikusan a növekedett adrenalin vagy adrenalin hatású szerek hatására létrejövő izomtónus esetén jelentkezik. Ezzel szemben a szerzett forma főleg idősebbeknél fordul elő olyan gyógyszerek adása után, amelyek megnyújtják a repolarizációt, és/vagy súlyos bradyaritmiát okoznak (4. ábra) (Aaronson et al, 2000). Ezek a szerek megtalálhatók a CredibleMeds weboldalán, a 2017-ben frissített lista alapján ismertem hosszú QT szindrómát okozó gyógyszerek például ilyenek a

fenotiazin hatóanyagú skizofréniára kezelésére szolgáló gyógyszerek, az arzén-trioxid hatóanyagú Trisenox, amit a leukémia kezelésére használnak, vagy az azitromicin hatóanyagú bakteriális fertőzésekre adott gyógyszerek csoportjába tartozó Azithromycin-1 (<https://www.crediblemeds.org/index.php/?cID=328>).



4. ábra: A kamrai szívritmus zavarok főbb típusai.

Az elsősorban egészséges, a második sorban a lassú szívverés által létrejött bradikard állapot, harmadik a gyorsabb szívfrekvencia miatt létre jött tachikard állapot és végül a Torsade de Pontes összehasonlítása EKG görbén előidézett torzulásaik alapján (www.practicalclinicalskills.com).

2.1.5. REPOLARIZÁCIÓS TARTALÉK (REPOLARIZÁCIÓS REZERV)

Az egészséges AP létrejöttéhez sok ioncsatorna összehangolt és finoman szabályozott munkája szükséges. Az akciós potenciál hosszának növekedése a repolarizáló káliumáramok funkció csökkenésével vagy a depolarizáló nátrium- és kalciumáramok funkciójának fokozódása révén is bekövetkezhet. A repolarizációs tartalék kifejezés arra a jelenségre utal, amely szerint a szívizom repolarizációban szerepet játszó ioncsatornák közül néhány a funkciójának csökkenését, vagy funkciójának teljes kiesését a többi ionáram helyettesíteni képes. Azaz a funkciókiesés nem feltétlenül vezet klinikailag manifesztálódó repolarizációs zavarokhoz (pl. az EKG-n mérhető jelentős QT-intervallum megnyúláshoz) (Jost et al, 2007). Ezt a helyettesítő képességet nevezzük repolarizációs tartaléknak, ez az ioncsatornák alkalmazkodó képessége a különböző repolarizációt gátló hatásokkal szemben. Ennek a képességnek csökkenését okozhatják a különböző, örökletes ioncsatorna mutációk vagy gyógyszer hatóanyagok mellékhatásai miatt létrejött ioncsatorna elnémulások. A repolarizációs tartalék csökkenése kiváltó oka a hosszú QT szindrómáknak vagy a hirtelen szívmegállás miatt létrejövő haláleseteknek (Baczkó I, 2008). A csökkent repolarizációs rezerv kimutatására újabban használt módszer a rövidtávú QT variabilitás mérése, amely nem a QT intervallum megnyúlás mértékét nézi, hanem a QT távolság változékonyságát. Ez azon alapul,

egyrésről, hogy a repolarizációs rezerv csökkenése nagyon sokszor nem okoz, látványos EKG görbe megnyúlásokat. Másrésről pedig, hogy ez nem egy statikus állapotot, hanem dinamikusan változó jelleget mutat (Baczkó I, 2008, Jost et al, 2005).

2.1.6. KÁLIUM CSATORNÁK

A kardiovaszkuláris kutatások fontos része kálium áramokkal kapcsolatos ismeretek és azok hiányosságainak feltérképezése, valamint ezen információk rendszerezése után új terápiás célpontok kialakítása (Chiamvimonvat et al, 2017). A kálium áramlást működtető rendszerek a legfontosabb repolarizáló ionáramok, mivel nekik köszönhető a membránpotenciál egyensúlyi állapota. Az emlős szívizomszövetben számos kálium ioncsatorna létezik, a szív tájékoktól és a sejttípusoktól függően. Ez a sokszínűség garantálja pontos szabályozását többek közt membrán potenciálnak, az akcióspotenciálnak, az akciós potenciál időtartamának vagy az effektív refrakter periódusnak (ERP) (Bartos et al, 2015).

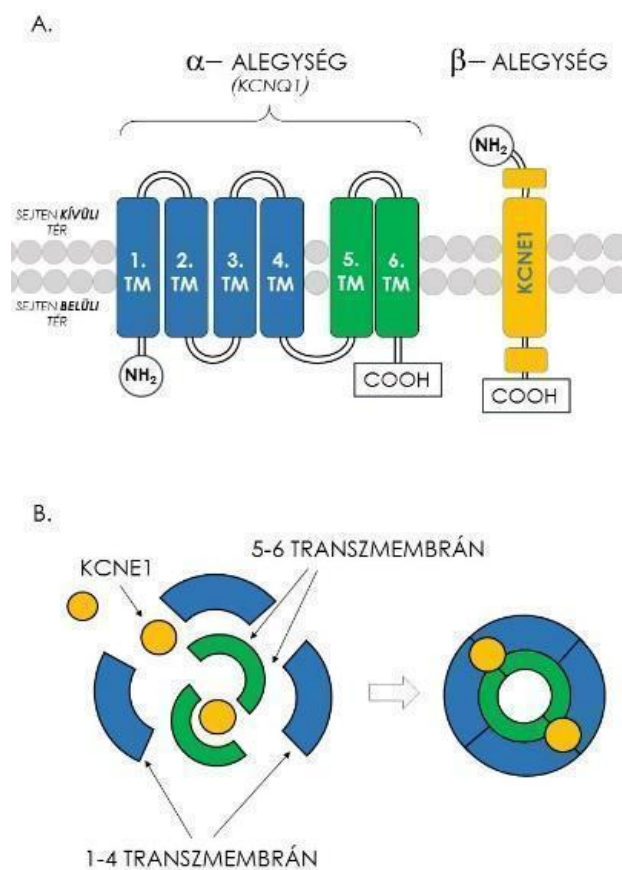
A káliumcsatornák szerkezeti felépítése az ioncsatornák felépítésének általános elveit követi, miszerint pórusformáló α -alegységből és járulékos β -alegységekből épülnek fel (Cheng et al, 1999). Szerkezeti felépítésük szerint a humán káliumcsatornákat két transzmembrán (2 TM), 4 TM és 6 TM egységből felépülő csoportra oszthatjuk.

Az akciós potenciál platófázisban lépnek működésbe a késői káliumcsatornák. A késői káliumáramot létrehozó ioncsatornák depolarizáció hatására nyílnak meg és negatívabb feszültségértékek mellett meglehetősen lassan zárulnak. A csatornákon keresztül folyó káliumáram (IK) a feszültség és idő függvényében változik és fontos szerepet játszik az akciós potenciál repolarizációjában (Waldo et al, 1993). A késői káliumáramot kinetikai- és egyenirányító tulajdonságok, gátlószer érzékenység, valamint intracelluláris ionmozgások szempontjából három komponensre bonthatjuk: ezek az ultragyors komponens (IK_{ur}), a gyors komponens (IK_r) és a lassú komponens (IK_s) (Zeng et al, 1995, Varró et al, 2000). Az IK_{ur} gyorsan aktiválódik, majd nem, vagy csak nagyon lassan inaktiválódik (Zaza et al, 2000). Az IK_r az IK_{ur}-nél lényegesen lassabban aktiválódik, majd inaktiválódik. Az IK_s aktivációja lassabb, mint az IK_r-é, de az IK_s nem inaktiválódik, hanem deaktiválódik. A deaktiváció azt jelenti, hogy ez esetben az ioncsatornák nyitott állapotból közvetlenül zárt állapotba kerülnek, és nem inaktív állapotba, mint teszik azt az inaktiváció során. Az IK_s deaktivációja gyorsabb, mint az IK_r-é (Harmati G, 2011). A késői káliumáram elsődleges szerepet játszik a szívizom akciós potenciáljának repolarizációjában. Az áramot létrehozó csatornafehérjék szerkezetének megváltozása vagy farmakológiai befolyásolása az áram - és így az akciós potenciál hosszának megváltozásához és aritmiák kialakulásához vezethet. Ezek közül a legjellemzőbbek a hosszú QT szindrómák különböző formái. Ezekben a betegségekben az akciós potenciál megnyúlása miatt fokozódik a

korai utódepolarizációk és a *torsades de pointes* kamrai tachycardia kialakulásának valószínűsége, így gyakrabban fordul elő hirtelen szívhalál (Wu et al, 2015).

2.1.6.1. KÉSŐI KÁLIUM IONCSATORNA

A késői káliumáram működését szívizomsejtek mindegyik típusában leírták már, ám az egyes komponensek áramsűrűsége jelentősen eltér a különböző fajokban és a miokardium egyes régióiban (Ono et al, 2000). A késői káliumáramnak a szív bal kamrájában eltérő szívcsúcs-szív bázis irányú expressziója figyelhető meg. Például a nyúl preparátumokon, mind az IKs, mind az IKr kisebb a szívcsúcsban lévő ún. apikális miocitákon, mint az anulus fibrosus felé eső, ún.



„bázis” részen más és más (Cheng et al, 1999).

A késői kálium ioncsatorna a feszültségvezérelt K^+ -ion csatornák csoportjába tartozik (Nerbonne, Kass, 2005). Pólusalkotó, α -alegységét hat TM alkotja. A szívizomsejteken észlelhető IKs-t a 11. kromoszóma rövid karján levő KCNQ1 gén által kódolt Kv7.1 csatornafehérje és a KCNE1 gén által kódolt minK, mint járulékos fehérje együttes expressziója hozza létre. A KCNQ család K^+ csatornáit a feszültségfüggő K^+ csatornák doménjeinek klasszikus, hat TM-ból álló felépítése jellemzi, azonban az α -alegységekből hiányzik a Kv csatornákra jellemző tetramerizációhoz szükséges régió (Panaghie et al, 2006).

5. ábra: A késői egyenirányító lassú káliumáram ioncsatorna vázlatos rajza.

A. rész: Az IKs alfa és béta alegységeket alkotó transzmembránok elhelyezkedése a sejtmembránban.

B. rész: Az IKs ioncsatorna felépülése alfa és béta alegységekből. (Az ábrát Major Péter készítette.)

A 21. kromoszóma hosszú karján található KCNE1 gén által kódolt minK fehérje egyetlen transzmembrán (1TM) doménből áll, és önmaga nem képez ioncsatornát. Szerepe, hogy a KCNQ1 fehérjéhez β -alegységként kapcsolódva szabályozza a pórusformáló alegység farmakológiai befolyásolhatóságát és működését. A veleszületett hosszú QT szindróma leggyakoribb formájáért,

az 1-es típusú hosszú QT szindrómáért a KCNQ1 gén mutációja felelős. A KCNE1 gén mutációját szintén leírták; ez a mutáció felelős a hosszú QT szindróma 5. típusának kialakításáért (Ma et al, 2003, Harmer et al, 2010).

2.1.7. HOSSZÚ QT SZINDRÓMA

Friedrich Ludwig Meissner leipzig-i nőgyógyász és gyermekorvostól származik a hosszú QT szindróma első beszámolója, 1857-ből jóval az EKG feltalálása előtt. Meissner említi azt az esetet mikor egy siket lány meghal, egy élénk tanári „dorgálás” miatt, s miután közlik a rossz hírt a családdal a szintén siketségben szenvedő bátyja is hirtelen meghal. Ez valószínűleg a Jervell and Lange-Nielsen szindróma első orvosi leírása, amely az hosszú QT szindróma 5-s típusába tartozik (Tranebjaerg et al, 1999).

Röviden, a hosszú QT szindróma (LQT) a szív ingervezető rendszerének zavara, amely eszméletvesztést vagy hirtelen halált okozhat. A QT-szakasz megnyúlását a kamrai akciós potenciálok repolarizációs fázisának meghosszabbodása idézi elő. A QT intervallum növekedés ioncsatorna szintű elektropatológiai oka a kifelé irányuló, repolarizáló K^+ áramok intenzitásának csökkenése, vagy a befelé lassan haladó, depolarizáló Na^+ vagy Ca^{2+} áram erősségének növekedése. Mindig gondolni kell LQTS-re, ha a QT intervallum férfiakban ≥ 440 , nőkben ≥ 460 ms-nál hosszabb (Baptista et al, 2011).

1. táblázat: A hosszú QT szindróma eddig azonosított típusai és kialakulásukért felelős gének illetve az általuk kódolt fehérjék felsorolása (A táblázatot Major Péter készítette Pagon RA et al, 2017, Giudicessi et al, 2018 publikációk alapján).

TÍPUS	GÉN	FEHÉRJE	TÍPUS	GÉN	FEHÉRJE
LQT 1	KCNQ1	FESZÜLTÉG HATÁSÁRA AKTIVÁLÓDÓ K^+ CSATORNÁK; ALCSALÁD: K	LQT 8	CACNA1C	L-TÍPUSÚ FESZÜLTÉG-FÜGGŐ Ca^{2+} CSATORNA
LQT 2	KCNH2	FESZÜLTÉG HATÁSÁRA AKTIVÁLÓDÓ K^+ CSATORNÁK; ALCSALÁD: H	LQT 9	CAV3	CAVEOLIN-3
LQT 3	SCN5A	NÁTRIUM CSATORNA FEHÉRJE, 5 - ALFA ALEGYSÉG	LQT 10.	SCN4B	NÁTRIUM-CSATORNA BÉTA- ALEGYSÉG
LQT 4	ANK2	ANKYRIN-2 FEHÉRJE	LQT 11	AKAP9	A-KINASE HORGONYZOTT FEHÉRJE
LQT 5	KCNE1	FESZÜLTÉG HATÁSÁRA AKTIVÁLÓDÓ K^+ CSATORNÁK; ALCSALÁD: E	LQT 12	SNTA1	ALFA-1-SZANTROPIN
LQT 6	KCNE2	FESZÜLTÉG HATÁSÁRA AKTIVÁLÓDÓ K^+ CSATORNÁK; ALCSALÁD: E	LQT 13	KCNJ5	G-FEHÉRJÉVEL AKTIVÁLT, EGYENIRÁNYÍTÓ KÁLIUMCSATORNA
LQT 7	KCNJ2	BEFELÉ EGYENIRÁNYÍTÓ K^+ CSATORNA	LQT 14	CALM1	CALMODULIN: Ca moduláló fehérje
			LQT 15	CALM2	CALMODULIN: Ca moduláló fehérje
			LQT 16	CALM3	CALMODULIN: Ca moduláló fehérje

A kiváltó tényezők gyakran kombinálódhatnak így fokozva a kamrai ritmuszavarok megjelenésének valószínűségét. A testfelszíni EKG-felvételen a kamrai repolarizációt kimutató QT-szakaszok a különböző, külső környezeti tényezők és kórállapotok hatására jelentősen megnyúlhatnak és a befolyásoló tényezők megszűnése után helyreállhatnak vagy mérséklődhetnek. A szerzett hosszú QT szindróma tehát egy dinamikusan változó állapot, nem

egy statikus kórelváltozás. Eddig 16 különböző típusú hosszú QT szindrómát különböztetünk meg az ioncsatorna mutációk alapján (1. táblázat) (Pagon RA et al, 2017, Giudicessi et al, 2018). A két leggyakoribb hosszú QT szindróma az 1-es és a 2-es típus, amelyek az esetek 30-35%-ért ez felelősek (Levine E. et al, 2008, Thea et al, 2017). A hosszú QT 1 típusú szindróma esetében a lassú, késői kálium ioncsatorna pólus alkotó alegysége hordozza a hibás működést okozó mutációt. A hosszú QT 2 típus esetében a késői kálium ioncsatorna gyors komponensének pólus alkotó alegysége a hibás (Brunner M. et al, 2008.). A hosszú QT szindróma által kiváltott TdP a kor előrehaladtával sokkal nagyobb arányban jelenik meg nőkben, mint a férfiakban (Sauer et al, 2012). A nemi különbség magyarázatát nagy valószínűséggel az adja, hogy az ösztrogének megrövidítik a kamrai repolarizációs időt, míg az androgén nemi hormonok nem befolyásolják érdemben a QT-szakasz hosszát (8. ábra) (Odening KE. et al, 2012).

2.1.7.1 HOSSZÚ QT SZINDRÓMA ÉS A NONSENSE-MEDIATED mRNA DECAy (NMD)

Mivel voltam olyan szerencsés, hogy az elmúlt években mind a NMD mind a hosszú QT szindróma kutatásával foglalkozhattam, ezért megkerestem a kapcsolatot a két téma között. S annak az időszaknak az emlékére, amit az NMD világában tölthettem, egy rövid fejezetet szánok ennek a kapcsolat bemutatására.

Röviden az NMD-ről: Számos, eukarióta mRNS hordozhat hibát, amelyek translációja megváltozott aktivitású fehérjék keletkezéséhez vezethet. Az evolúció során több különböző típusú hibás mRNS-eket hatékonyan felismerő és degradáló RNS minőségbiztosítási rendszer (RNA quality control) fejlődött ki (Doma et Parker, 2006). Az egyik ilyen minőségbiztosítási rendszer a Nonsense-mediated mRNA decay (NMD), amelynek a két fő feladata ismert. Az egyik a hibás, korai stop kóddal rendelkező mRNS-ek degradációja, a másik az endogén expressziók utólagos finom hangolása (Rehwinkel et al, 2005., Nyiko et al, 2013). Tehát az NMD a korai stopkódot tartalmazó hibás mRNS-ek azonosításáért és megsemmisítésért felel, ezáltal megakadályozza a csonka, gyakran domináns-negatív-hatású fehérjék keletkezését. Ezek a mutáns fehérjék azért veszélyesek, mert a normál vad típusú fehérjék helyett képesek beépülni a komplexekbe, de ott nem tudják ellátni a megfelelő funkciót, így megbénítják a teljes komplexet. A korai stop kód hibáját tartalmazó mRNS-ek kétféleképpen jöhetnek létre. Vagy olyan génekről íródnak át, amik a kódoló régiójukban tartalmaznak pontmutációt, inszerciót, deléciót vagy pedig hibás transzkripció vagy alternatív splicing következményei. Az NMD-nek az a hibaelhárító funkciója, amivel kiszűri az egy génről átíródott RNS változatok közül a translációra alkalmatlanokat, az nem egy igen-nem válasz, hanem a gén expressziójának egy finomhangolási lehetősége, amivel szabályozni tudja a fehérje mennyiséget a sejtben. Így alapvető szerepet tölt be az endogén gén szabályozásában is (Behm-Ansmant et al, 2007).

A hosszú QT 2 szindróma létrejöttéért a hERG gén mutációi felelősek (Curran et al, 1995). A mutációk több mint 30% olyan frameshift vagy nonsense mutáció, ami korai stop kodon kialakulásáért felelős. A hERG gén expressziója is NMD szabályozás alatt áll (Gong Q et Zhou Z. 2018, Zarraga et al, 2017.). Az IKr áram alfa-alegységét kódolja a hERG gén, amely szoros kölcsönhatásba áll IKs árammal, aminek a szabályzó alegységét az általunk használt KCNE1 fehérje kódolja (Guo et al, 2011). Az régen igazolt tény, hogy a KCNQ1 és a KCNE1 munkája és expressziója szoros kölcsönhatásra épül (Sanguinetti et al, 1996, Koichi et al, 2010). A hERG expresszió összhangban van a KCNE fehérje családdal (Um SY, McDonald TV, 2007). Továbbá Jun Guo és munkatársai publikációja kifejti, hogy a IKr és az IKs kölcsönhatásának jellege még nincs teljesen megértve, de cikkükben ők is leírták, hogy a hERG (IKr alfa egysége) és a KCNQ1 (IKs alfa alegysége) fizikailag társul a plazmamembránon és igazolták, hogy a KCNE1 és a hERG között van kölcsönhatás, de ennek részletei még nem tisztázottak (Guo et al, 2011). Valamint a Chunyun Du 2013-ban publikált cikkéből az is kiderül, hogy a különböző KCNE1 variánsok/mutánsok, hogyan befolyásolják a hERG funkcióját és így az IKr áramot, s nem zárja ki ennek a hatásnak a kölcsönösségét sem (Chunyun et al, 2013). Eddig ezeket az indirekt bizonyítékokat találtam az NMD és a Hosszú QT szindróma között.

2.2. ÁLLATMODELLEK

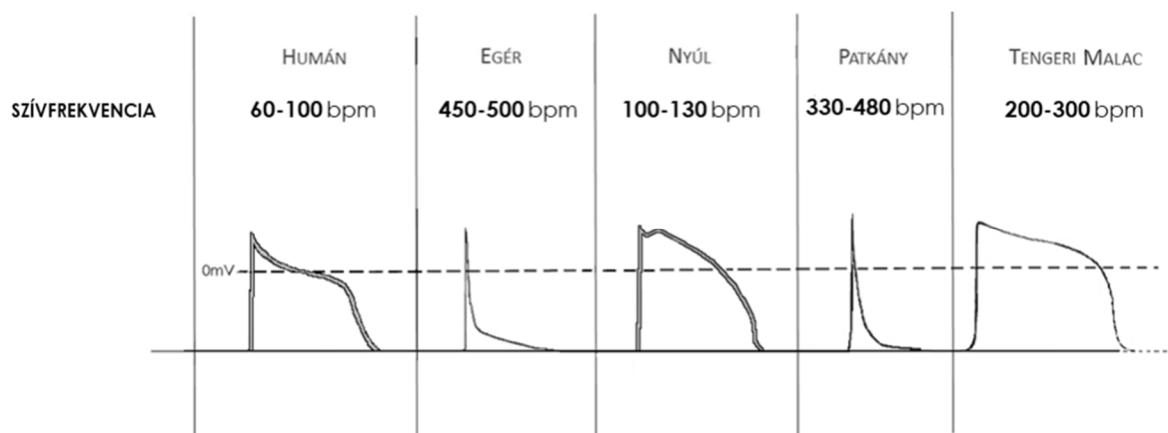
2.2.1. EGÉR MODELLEK A KARDIOLÓGIÁBAN

A tesztelés alatt álló gyógyszerek esetében mindig ellenőrzik azok aritmia kiváltó mellékhatását, hogy lehető legkisebbre csökkentsék az életveszélyes, gyógyszer indukálta aritmia, például TdP, kialakulásának lehetőségét a gyógyszer szedése közben (Farkas et al, 2004). Az egér az emlősök közül a leggyakoribb állatmodell, több száz laboratóriumi egértörzs és tízezernél is több egérmodell létezik. Külön erre szakosodott online adatbázisok és katalógusok (pl.: genoway.com, taconic.com, informatics.jax.org) segítenek eligazodni egérmodellek között kereső kutatóknak. Azonban az egér nem minden esetben bizonyul jó állatmodellnek.

Az állatok etikus tartásával és kísérletben való felhasználásával foglalkozó 3R szabály egyik alappontja, hogy olyan állatokat használjunk egy-egy vizsgálatban, amelyen a vizsgált folyamat a lehető legjobban modellezhető (Russel W. et al, 1959). Ezt teljesíteni olyan állatmodellekkel lehet, amelyek egy adott probléma vizsgálatára lettek létrehozva. Az LQT szindróma modelljeként létrehozott transzgenikus egerekről szóló közlemény az egérmodell előnyei mellett annak hátrányait is hangsúlyozta (Salama et London 2007). Legszenvedélyesebb probléma, hogy az egér szívben lefutó AP-ok alakja teljesen más formájú, mint az az emberben ismert. Ennek fő oka, hogy az egér AP-ját az ionáramok más sorrendben és intenzitással építik fel,

mint az a humán akciós potenciál esetében ismert. Valamint az egér szívritmusa körülbelül 10-szer gyorsabb, mint az emberi. Illetve a szív kis mérete miatt is a humán szív vizsgálatához kifejlesztett módszerek átalakítását, adaptálását igényli, így nehézkesé válik a vele való munka. A KCNE1 knockout (Drici et al, 1998; Kupersmidt et al, 1999) a knock-in (Nishio et al, 2009; Rizzi et al, 2008) valamint a domináns negatív funkcióvesztéses mutációk transzgenikus egérmódellei (Demolombe et al, 2001) csak részben tudták modellezni a humán hosszú QT fenotípusokat (Salama, London 2007).

A hosszú QT szindróma modellezésére a legalkalmasabb fajok: a kutya, a tengeri malac és a nyúl. Ezen állatok nagy hasonlóságot mutatnak elektrofiziológiai tulajdonságaikban az emberéhez. De ezek közül a fajok közül, a kutya és a tengerimalac génmódosított modell állatként való alkalmazása még elenyésző mértékű. Ezek alapján elmondható, hogy az egy génes, aritmogenikus betegségek nyúl kísérletes modelljének szignifikáns előnyei vannak. Például, a szívösszehúzódás jelentősen hosszabb, mint az egérben, és nyúl szívének mérete lehetővé teszi a humán szív működés klinikai vizsgálatához kifejlesztett eszközök alkalmazását. Mindezek mellett a nyúl az egyik legrégebbi kísérleti állat és igen széles skálájú génmódosítási módszertár valamint publikációs adatok segítik a vele való munkát (Rothenberg et al, 2005).



7. ábra: Kardiológiai kísérletekhez leggyakrabban használt fajok akciós potenciáljának és szívfrekvenciájának összehasonlítása. A humán akciós potenciálhoz és szívritmushoz a nyúl értékei hasonlítanak leginkább.

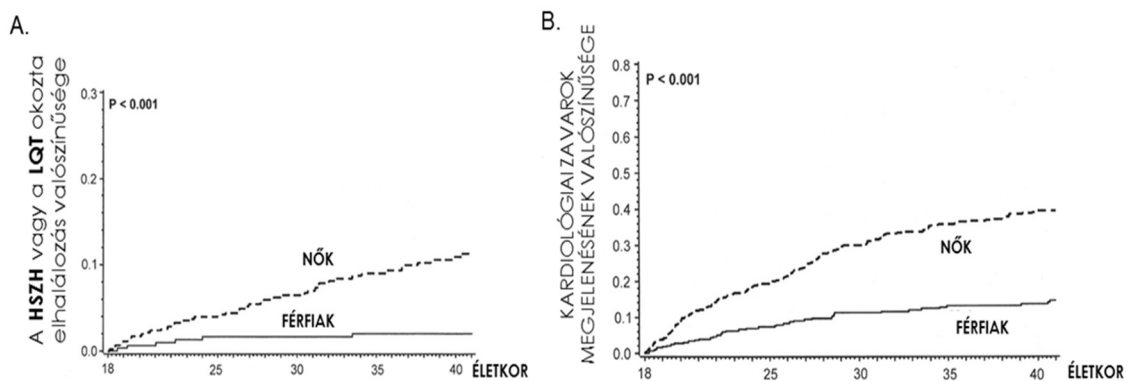
(Az ábrát Major Péter készítette.)

Ennek ellenére mindmáig csupán csak kettő, a domináns negatív pórus mutánsokat túltermelő transzgenikus hosszú QT nyúl modelltől számoltak be, Gideon Koren laboratóriumából: ezek a humán KvLQT1 (LQT1 loss of IKs) vagy a hERG csatornák (LQT2, loss of IKr) mutánsai (Brunner et al, 2008).

2.2.2. A KORÁBBAN LÉTREHOZOTT HOSSZÚ QT NYÚLMODELLEK BEMUTATÁSA

A harmadik leggyakrabban használt kísérleti emlősállat a nyúl, az Európai Bizottság 2013 jelentése alapján (EARA 2013), melyet hagyományosan alkalmaznak az érleszesedés (atherosclerosis), illetve a több betegségcsoportot magában foglaló metabolikus szindróma vizsgálatára is, többek között azért, mert a laboratóriumi egérrel szemben a nyúl rendkívül érzékeny a koleszterin gazdag diétára és zsírsavcsere folyamatai, az abban résztvevő enzimek is nagy hasonlóságot mutatnak az emberhez (Fan et al, 2015). Ezekben a vizsgálatokban spontán létrejött mutáns és célzott génmódosítással létrehozott nyúlvonalak tucatjait használják. A kardiológia kutatásokon belül az elektrofiziológiai tulajdonságok vizsgálatára eddig igen kevés irányítottan létrehozott mutáns nyúlmodellt használnak (Bösze et al, 2016).

A két leggyakoribb hosszú QT szindróma – az hQT 1 és hQT 2 típus - modellezésére hozták létre az első transzgenikus nyúlmodelleket (Brunner et al, 2008). A hosszú QT 1 típus esetében az IKs ioncsatorna pólus alkotó alegysége (KvLQT1 gén) hordozza a mutációt. A velük végzett elektrofiziológiai mérések QT meghosszabbodást mutattak, de a spontán aritmiák és a hirtelen szívhalál számának szignifikáns növekedése nem volt kimutatható. Ezzel szemben, az hosszú QT2 vonalban, amelynél az IKr ioncsatorna pórus alkotó alegysége (hERG) a mutáns, a nyulak spontán aritmiás tüneteket mutattak. A pubertáskornak számító életszakaszban néhány egyedben a mutáns ioncsatorna hirtelen szívhalált okozott (Brunner et al, 2008; Odening et al, 2010). Korábbi közlemények igazolták, hogy a kardiovaszkuláris zavarok és a hirtelen szívhalálra visszavezethető



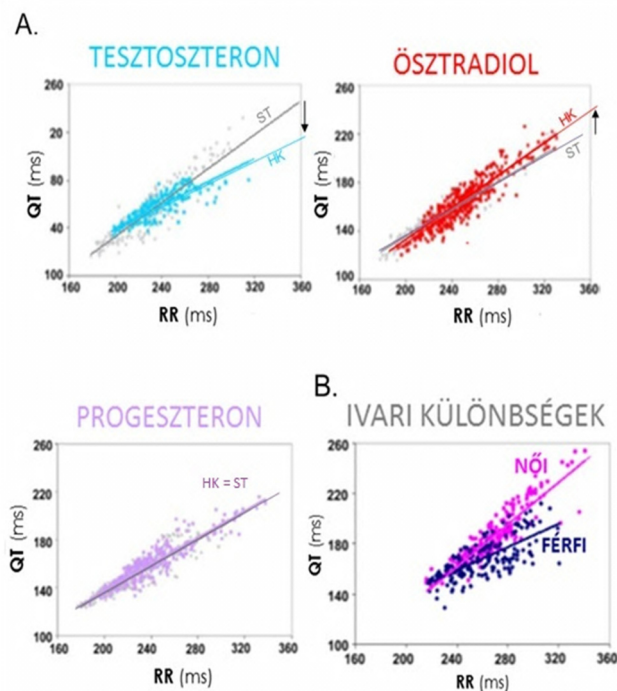
8. ábra: A kardiológiai problémák előfordulásának esélye nemekre lebontva.

A rész: A HSHZ és az LQT megjelenések valószínűségének nemtől függő változása az életkor előrehaladtával.

B rész: A kardiológiai zavarok megjelenések valószínűsége nemekre lebontva, az életkor előrehaladtával. (Az ábra Sauer és munkatársai, 2007-es cikkéből származik.)

elhalálozási okok az életkor előrehaladtával a nőkben szignifikánsan magasabbak, mint a férfiakban (8. ábra) (Sauer et al, 2007). Az LQT2 nyúlmodell használatával, igazolták, hogy a magas ösztradiol szint növeli a kardiológiai zavarok megjelenésének valószínűségét, mert

csökkenti az IKs ionáram hatékonyságot. A kísérletben LQT2 nőstényeken petefészek eltávolítást hajtottak végre, így biztosítva a hormonhiányos állapotot, s ezután mesterségen pótolták a különböző nemi hormonokat (progeszteront, ösztradiolt és tesztoszteront). A vizsgálat során kiderült, hogy azokban az állatokban, amelyben csak tesztoszteront, vagy csak progeszteront kaptak, nem volt szignifikáns növekedése a szív működési zavarok megjelenésének a kontroll állatokhoz képest. De azokban az állatokban, akikben ösztradiolt pótoltak szív működési zavarok megjelenése jelentősen növekedett (Odening KE. et al, 2012). Egy másik kísérletben azt nézték, hogy ugyanezekben a nyulakban QT távolság mértéke mennyivel növekedik RR intervallumhoz képest, a hormonok beadása előtt és után. Azt tapasztalták, hogy az ösztradiolt kapott nyulakban számottevő növekedés volt ebben az értékben. A tesztoszteron pótoló nyulakban a QT távolság nem változott, sőt csökkent, ugyanúgy, mint azokban a kontroll nyulakban, akiknek szintén eltávolították a petefészket. A progeszteronnal kezelt állatokban a QT intervallum se növekedést, se csökkenést nem mutatott a hormon beadás előtti állapothoz képest. Amikor, ugyanezzel a módszerrel mérték LQT2 mutáns nyulakat, mindkét ivarból, (és a nőstények esetében petefészek eltávolítás nem történt) azt tapasztalták, hogy nőstényekben a QT távolság mértéke jóval hosszabb, mint a hímekben (9 ábra) (Odening et al, 2012).



9. ábra: Az LQT2 transzgenikus nyulakban mért QT távolság változása a nemi hormonok hatására.

A rész: A női nemi hormonok hatására szignifikánsan növekszik a RR távolsághoz viszonyított QT távolság. (A szürke vonal az alap (ST), a színes pedig a négy hetes hormonkezelés után (HK) mért eredmény.) **B. rész:** A LQT2 nyulakban mért ivar alapú különbségei az RR távolsághoz viszonyított QT távolságnak. Jól látható a női ivarú állatokban ez a távolság kezelése nélkül is szignifikánsan hosszabb.

(Az ábra Odening et al, 2012 - cikkből származik)

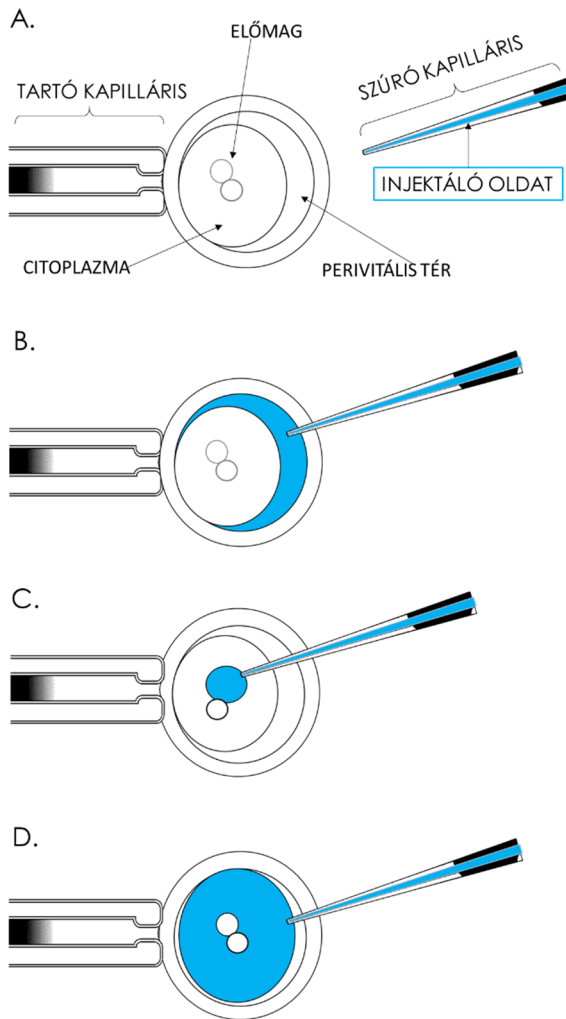
2.3. TRANSZGÉNIKUS ÁLLAT LÉTREHOZÁSA

Az embrió manipulálási eljárások már az 1890-es években kezdtek kialakulni (Heape W, 1891) de igazi fellendülést a rekombináns DNS technika fejlődése hozta meg (Mintz et al, 1974). Ezen két tudományág egymást erősítő fejlődésének köszönhetjük az olyan módszerek megszületését, amelyek lehetővé tették a génmódosítást emlősállatokban. Transzgenikus állatnak

nevezzük azokat az állatokat, amelyek genomja olyan mesterséges módosítást tartalmaz, amely a természetben eddig nem fordult elő. Illetve fontos, hogy ezt a módosítást képes legyen örökíteni is az egyed. Transzgénikus egereket elsőként vírussal fertőzött embriókból hoztak létre, de aztán a 1980-as évektől a megtermékenyült petesejtbe történő idegen DNS mikroinjektálása lett a legnépszerűbb és a célzott genom módosítást lehetővé tevő DNS ollók (Bösze et al, 2016) megjelenéséig kizárólagos módszer a nem-egér transzgénikus emlősállatok létrehozására (Gordon et al, 1981, Brinster et al, 1981, Palmiter et al, 1982, Carl A. Pinkert, 2014). A DNS olló alapú módszerek, vagy másnéven genom szerkesztési technikák, mint pl. a Zink Finger, a TALEN vagy a CRISPR/Cas9, megjelenésük óta töretlenül népszerűek. Hasonlóság mind a három technikában, hogy két fő részből épülnek fel, egy szekvencia felismerő domainből és egy dupla szálú DNS hasító domainből (Bösze et al, 2016). A Zink Finger és a TALEN esetében egy restriktív enzim (FokI) végzi a kettős DNS szál hasítását (Bogdanove et al, 2018), még a CRISPR módszer esetében a Cas enzim végzi a DNS vágását (Hale et al, 2009). Transzgénikus emlősállat előállításnál a CRISPR/Cas9, TALEN, és a Zink Finger technikát használó konstrukciók bejuttatására továbbra is mikroinjektálás a leggyakrabban használt módszer.

2.3.1. MIKROINJEKTÁLÁS

A mikroinjektálás az a folyamat, amely során az idegen DNS-t bejuttatják a megtermékenyült petesejtbe, másnéven a zigótába. A mikroinjektálásnak három fő típusa ismert. Első esetben az injektálás az egysejtű embrió citoplazmájába (cytoplasmic plasmid injection, CPI) történik. A második esetben az idegen DNS-t a zona pellucida és az embrió közötti, ún. perivitellinális térbe (PVSI) juttatják, míg a harmadik esetben - melyhez a legtöbb gyakorlat szükséges - az embrió előmagjába történik (PNI) az injektálás (10. ábra). Az, hogy melyik típust alkalmazzuk, attól függ, hogy a bejuttatni kívánt DNS-hez milyen közvetítő módszert választottunk. Ha az idegen gént cirkuláris plazmid (cccDNS) formájában juttatjuk be és a manapság népszerű, transzpozon alapú transzgenézis módszert alkalmazzuk, akkor elég a citoplazmába történő mikroinjektálást választanunk (Garrels et al, 2012, Ivics Z et al, 2014). Ha lenti vírus alapú transzgen konstrukciót szeretnénk bejuttatni, akkor az injektálás a perivitellinális térbe történik (Lois 2002, Michalkiewicz 2007). Ha lineáris DNS-t viszünk be, amely nem tartalmaz semmilyen molekuláris „szállító” eszközt, akkor az előmagba injektálunk (Gordon et al, 1980). Továbbiakban, az előmagban történő injektálás módszerét részletezem két okból: egyrészt, mert ez a technikailag legnehezebb eljárás, másrészt mert mi is ezt használtuk LQT5 mutáns nyulaink előállítására.



10. ábra: A mikroinjektálás típusai.

A rész: A nyúl embrió mikroinjektálás vázlatos rajza.

B rész: Perivitellinális térbe történő mikroinjektálás.

C rész: Előmag alapú (pronukleusz) mikroinjektálás.

D rész: Citoplazmába történő mikroinjektálás

(Az ábrát Major Péter készítette)

A megtermékenyült emlős petesejt a fejlődés korai fázisában egy anyai és egy apai eredetű előmagot is tartalmaz. Ezek idővel összeolvadnak és osztódni kezd az embrió, ezért az embriókat még ebben, az előmagok elkülönült állapotában kell kimosni a donornak szánt anyanyulakból. Az injektáló oldattal a transzgén konstrukció bevitele az egyik előmagba még az összeolvadás előtt megtörténik. Inverz mikroszkóp segítségével, speciális optikát használva (differenciál interferencia optika: Nomarski illetve Hoffman optika) az előmagvak jól láthatók. Ilyenkor az embriót tartó kapillárisal rögzítjük. Egy másik 1-

2 mikrométer átmérőjű kapillárisal, az alacsony koncentrációjú (1-2 ng/μl) DNS oldatot az egyik előmagba nyomjuk. A két előmag közül az apai a nagyobb és jobban láthatóbb, ezért a szűrés általában ezt az előmagvat érinti. Az injektált DNS térfogata embriónként néhány pikoliter mennyiséget jelent, de ez kis térfogat így is magas, több száz kópiányi DNS-t jelent (Hogan et al, 1986, Samantha et al, 2017). Ezután a manipulált embriókat álvemhesített nőtényekbe helyezük laparoscópiás technika segítségével (Hiripi, 2001). Az idegen DNS a genomba véletlenszerűen és konkatamer formában épül be. Az esetek többségében integráció csak az egyik kromoszómán történik meg, így a megszületett egyed hemizigóta lesz a transzgénre nézve. Az utódok közül, az ún. alapítókat, amelyekben megtörtént az idegen DNS integrációja transzgén specifikus vizsgálatokkal (PCR, Southern blot) azonosítjuk.

Az előmagba történő mikroinjektálás hátránya az, hogy nem szabályozható a beépült transzgén kópiaszáma és a beépülés helye sem, valamint a módszer alacsony hatékonyságú (Ivics et al, 2014). Nehézség még, hogy a nagy gyakorlatot igényel, a pontos injektálás, az előmagba. Ezeket olvasva jogosan felmerülhet a kérdés, hogy akkor miért ezt a módszert választottuk. Egyrészt, ezt az injektálási módszert rutinszerűen használjuk a laborban. Másrészt a transzpozon

alapú transzgenézis technika, pontosabban Sleeping Beauty transzpozon alapú, még nem került be a csoportunk eszköztárába 2011-ben, amikor kísérleteim során a transzgenikus egér majd nyúl előállítására sor került.

2.4. KCNE1 GÉNÉRŐL ÉS A G52R MUTÁCIÓRÓL

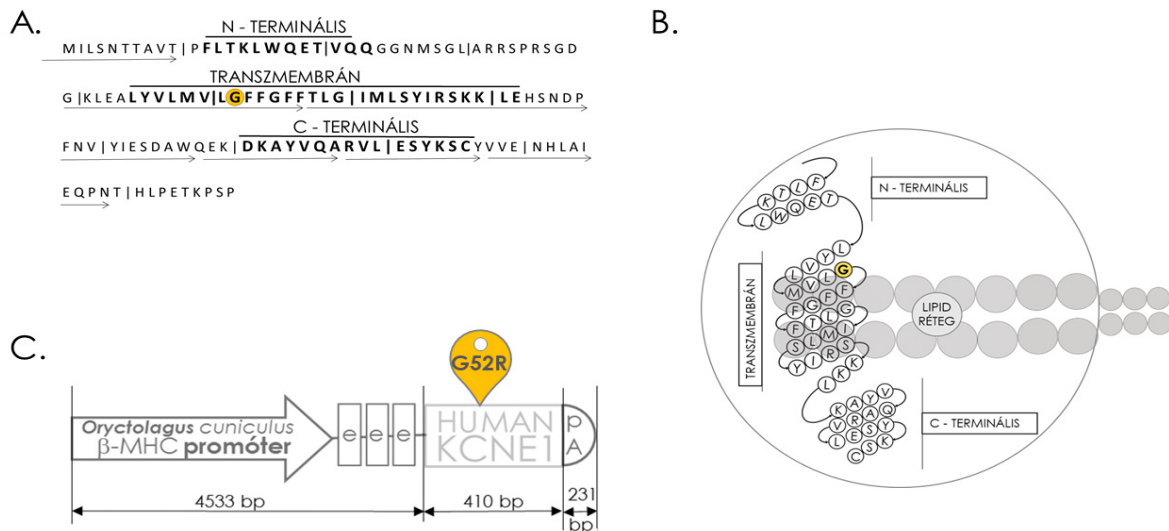
A szívizomsejtekben, a minK a KCNQ1-vel képez komplexet és hozza létre a kései feszültségfüggő káliumáram lassú komponensét, az IKs-t. Az IKs kálium ioncsatorna két fő részből áll. A pólus alkotó alfa alegységből, amely hat kisebb egységből tevődik össze (5. ábra). Ezt hívjuk KCNQ1-nek. Illetve béta alegységből, amelyek a pólus szabályzásáért felelős, ennek a fehérjének a neve minK és a KCNE1 gén kódolja. Az alfa és béta alegység sztöchiometrikus aránya is szabályozza az IKs csatorna aktivitását (Koichi N. 2010, Congbao et al, 2008).

A minK fehérje a kálium feszültségfüggő csatorna alcsalád E tagja, emberben a 21. kromoszómán lévő KCNE1 gén kódolja ([/www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov): Gene ID: 3753). A feszültségfüggő kálium ioncsatornák jelentik a legkomplexebb csoportot mind funkcionális, mind strukturális szempontok alapján. Szerepük van a szívritmus kialakításában, az inzulin szekrécióban, szabályozza a neurotranszmitterek felszabadulását és simaizom összehúzódást (Melman et al, 2002, Leigh et al, 2014). A KCNE1 gén egyike az öt tagú KCNE családnak, amelyekről készülő fehérjék szabályozó, béta-alegységként működnek a szervezetben. Az emberben a KCNE1 expressziót kimutatták már a pitvarban és a kamrában, a belső fülben és a vesében (Sugimoto et al, 1990, Nicolas et al, 2001). A minK fehérje egy 129 aminosavból áll, ennek központi része a 45-71 aminosav közötti, α -hélix szerkezetű transzmembrán domén. Ehhez az α -hélix szerkezethez kapcsolódik kétoldalt az N- és C- terminális. A C-terminális felel a KCNQ1 inaktivációjáért az N-terminális pedig a csatorna farmakológiai profilját és pH érzékenységét szabályozza (Congbao et al, 2008). A KCNQ1-minK arányok jellemzésével már számos tanulmány foglalkozott, köztük a legfrissebb azt igazolta, hogy az IKs-n átfolyó kálium áram jóval alacsonyabb 2:1 KCNQ1:minK, mint az 1:1 arány esetében is. Azaz mikor mind az alfa alegység, mind a négy egységéhez kapcsolódik egy-egy minK, akkor az IKs csatorna működése hatékonyabb lesz (Murray et al, 2016). Valamint igazolták transzfektált sejtekkel, hogyha az arány a szervezetben eltolódik 1:10-hez a minK javára az sem befolyásolja károsan az ioncsatorna működését. (Az 1:10 arány ebben az esetben nem azt jelenti, hogy 10 minK fehérje és 1 KCNQ alegység építi fel a csatornát, hanem egy olyan rendszerben is működő képes a csatorna, ahol a minK túl van expresszáltatva (Haibo et al, 2013). Ezek az eredmények segítettek csökkenteni azt a kételyt, hogy a transzgén miatt szervezetben túltermeltetett minK fehérje okoz bármi féle elektrofiziológiai zavart.

A minK fehérje szoros összefüggésben az IKr alfa alegységével a hERG proteinnel is. McDonald és munkatársai publikálták, hogy a CHO sejtekben, vizsgálták minK és a hERG viszonyát és azt

találtak, hogy minK jelenlétében szignifikánsan növekedet a hERG-hez kötött ionáram (McDonald et al, 1997).

Munkánk során a minK alegységekben hoztunk létre egy aminosav cserét. Mégpedig az 52. aminosav cseréjét okoztuk glicinről (G) argininre (R). Ezt úgy értük el, hogy a minK fehérjét kódoló KCNE1 génben kicseréltük a 154. guanint argininre (G52R).



11. ábra: A transzgén konstrukcióhoz használt humán KCNE1 gén által kódolt minK fehérje bemutatása.

A rész: A humán minK fehérje aminosav sorrendje. **B rész:** A humán minK fehérje elhelyezkedése a sejtmembránban és a G52R mutáció hatására létrejött aminosav csere helyzete. **C rész:** A transzgén konstrukció vázlatos képe és a G52R mutáció helye a KCNE1 cDNS-n. (Az ábrát Major Péter készítette.)

A KCNE1 gén G52R mutációját egy kínai családba azonosították Ma és munkatársai, akik *Xenopus* petesejtekben is bizonyították domináns-negatív hatását (Ma et al, 2003). A tanulmányban a kínai család négy generációját vizsgálták és mutatták ki az 5. típusú hosszú QT szindrómát és az azt okozó G52R mutációt. A G52R mutáció nem változtatja meg sem az IKs ioncsatorna alegységekből történő felépülését, sem az alegységek membrán transzportját, de a mutáns KCNE1 nem képes szabályozni a csatorna nyitó funkcióját és domináns negatív módon 50%-al csökkenti a normál ion áramot (Ma et al, 2003).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. FELHASZNÁLT ANYAGOK

3.1.1 ÁLLATOK

A laboratóriumi állatok a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs központ (NAIK), Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet (MBK), Állatbiotechnológiai Főosztály állatházában a mindenkori Európai Unió szabályoknak és az 1998. évi XXVIII. Tv., AZ ÁLLATOK VÉDELMEÉRT ÉS KÍMÉLETÉÉRT, a 243/1998 (XII.31.) Kormányrendelet, az állatkísérletek végzéséről, valamint a 36/1999 (IV.2.) FVM-KÖM-GM rendelet, a kísérleti állatok tenyésztésének, tartásának, szállításának stb. szabályairól, megfelelően voltak, vannak elhelyezve és tartva. Állatkísérleti engedélyszám: PEI/001/275-4/2013

Az *in vivo* előkísérlethez donornak, FVBN egereket használtunk, mert ezek előmagjai jól láthatók, és ez kitűnően alkalmasá teszi őket pronukleusz mikroinjektálásra. Recipiens egerek a CD1 törzsbe tartoztak, mivel ezek nagy alom létszámmal és jó utódnevelő képességgel rendelkeznek. Transzgénikus nyúl előállításához azonos korú, 3,5 kilogrammos tenyészérett, Újzélandi fehér nyulakat használtunk. Mind az egereket, mind a nyulakat konvencionális állatházba, 12 órás nappalos fényprogramon, *ad libitum* takarmányozáson tartottuk. Az elektrofiziológiai vizsgálatok 3,5-4 hónapos, ivarérett nyulakon történtek, amelyek a G3. vagy G4. generációba tartoztak, kontrollként vad típusú alomtestvéreket bocsájtottunk rendelkezésükre. Ivaralapú különbséget a mérések során nem találtak ezért a hím és nőstény egyedeken végzett különböző ivarok méréseitit összesítették.

3.1.2 KLÓNOZÓ ÉS EXPRESSZIÓS VEKTOROK

A humán KCNE1 cDNS mutagenéziséhez a Stratagene StrataClone PCR Cloning Kit-ben kapott 4270 bp nagyságú, pSC-A-amp/kan vektort használtam. A nyúlgenomból felszaporított β -MHC promótert és a mutáns KCNE1 cDNS-t a Thermo Fischer Scientific által forgalmazott Invitrogen: pCRW-Blunt II-TOPO vektorban illesztettem össze. Expressziós vektornak pedig szintén az Invitrogen által gyártott pcDNATM3.1 (+) Mammalian Expression Vector-t használtam. A klónozásokat az *E. coli* DH5a törzsében végeztük.

3.1.3 HUMÁN CDNS KÖNYVTÁR

A humán KCNE1 cDNS-t a svéd 3h Biomedical AB cégtől rendelt Humán Szív cDNS könyvtárból (Cat no: SC6204) izoláltam. A gyártó leírása szerint felnőtt, humán szívkamrából származik a

minta és mentes HIV, Hepatitis B (HBV), Hepatitis C (HCV), mikoplazma baktériumoktól, élesztő és gomba fertőzéstől. Koncentrációja min: 1×10^6 sejt/ml.

3.2. FELHASZNÁLT ÁLLATBIOTECHNOLÓGIAI MÓDSZEREK

3.2.1. POLIMERÁZ-LÁNCREAKCIÓ (PCR)

Az alapító egyedek azonosításához PCR módszert alkalmaztunk. A kísérlet során használt primereket kivétel nélkül a Primer3 online elérhető alkalmazással terveztük (<http://primer3.ut.ee/>). A PCR-hez a MyTaq™ Red Mix -t (Bioline) enzimet használtuk és reakciókat a PTC-200 Thermocycler gépben végeztük el. A primer 10 pmol-s, a templát ~100 µg/ µl koncentrációjút használtunk. A PCR kondíciói a következők voltak:

1. 95°C 3 perc,
2. 95°C 15 mp,
3. primertől függően: 55-60°C, 25 mp, 30-35 ciklus
4. 72°C 40 mp,
5. 72°C 3 perc

3.2.2. PCR MUTAGENEZIS

A humán KCNE1 cDNS-ében végzett hely specifikus nukleotid cserét a QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit-tel végeztem (Agilent Technology). Első lépés volt a humán cDNS könyvtárból izolált KCNE1 szekvencia beépítése pSC-A-amp/kan vektorba. Ez után egy olyan 36 bp hosszúságú primer pár tervezése következett, amely teljesen homológ a humán KCNE1 szakasz közepével, kivéve mutáció helyét, mert ott már az új nukleotidokat tartalmazza. Ezután egy Pfu Ultra (high-fidelity) polimerázzal egy lényegében PCR reakcióban (templát maga a teljes cirkuláris plazmid volt, primereknek pedig a mutagenézis primerpárt használtam) megkezdtem a mutáns szál szintézisét 18 cikluson keresztül. Ezután hozzáadtam a metiláció függő DpnI restriktív enzimet és inkubáltam 1 órán át. Ezalatt a DpnI. elemésztette a régi vad típusú konstrukciót és az inkubáció végére csak a mutáns cDNS tartalmazó vektor maradt. Majd ebből a reakció mixből, mindenféle inaktiválás nélkül, 2 µl adtam 45 µl XL10-Gold ultracompetens sejthez. Ezt követően 30 perces jégben való inkubációval, 42°C-os hő sokkal, majd 500 µl NZY+ táptalajban növesztettem őket 1 óráig 230 rpm-es rázóban. Aztán 150 µl-t szélesztettem 80 µg/ml X-gal-t és 20 mM IPTG-t tartalmazó amplicilines táptalajra és egy éjszakán át 37°C-os inkubátor szekrényben felnövesztettem a telepeket. A felnőtt telepekből (összesen 5 db telep) plazmidot izoláltam és szekvenáltattam.

3.2.3. RNS KIVONÁS

Az RNS kivonásokat Molecular Research Center, Inc. által gyártott RNAzol®RT-vel (Cat.No.: RN190) készítettem. A 100 mg nagyságú szövetmintákra 1ml RNAzol-t mértem, majd Bullet Bender Storm24 készülék segítségével homogenizáltam őket. Ezután 400 µl nukleáz-mentes vízzel felhígítottam és 10 perc inkubálás után 13000 rpm-n (nehézségi gyorsulás:12000g) 15 percig centrifugáltam. A felülúszót 1 térfogatnyi izopropanolban kicsaptam, majd 15 percig tároltam szobahőn és 13000 rpm-n 10 percig centrifugáltam. Ezután a csapadékot 400 µl, 75%-os alkoholban kétszer mostam, majd beszárítás után a mintákat és 35 µl nukleáz-mentes vízben visszaoldottam.

3.2.4 KVANTITATÍV PCR (qPCR)

A kvantitatív mérésekhez az RNS-t a Molecular Research Center, Inc. által gyártott RNAzol® RT-vel vontuk ki, majd DNázssal kezeltük és Tetro cDNA Synthesis Kittel (Bioline) cDNS első szálát írtunk róla. Az reverz transzkripcióhoz a kit random hexamer primerét használtuk. Az így készült cDNS reakciót további tisztítás nélkül használtuk a qPCR-hez, melyet a Maxima SYBR green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific) Rotor-Gene (RG-3000)-R (Corbett Research) gépben végeztünk. A kiértékelésnél a RotorGene software-vel (Corbett Research, Sidney, Australia) mért Delta Delta CT értéket vettük számításba. Normalizációs kontrollként az 28S és a RPS5 nyúl endogének mértani átlagát használtuk. A qPCR-ekhez használt DNS oligok pontos szekvenciája a mellékletben megtalálható.

3.2.5 WESTERN BLOT

A transzgén fehérje szintű expressziójának vizsgálatát Western blot segítségével végeztük. 7 db vad típusú nyúl bal szívkamrájából szedtem a mintákat, amelyeket közösen kezeltünk, ugyan így csináltam két transzgénikus csoportot is, csoportonként 6-6 mintával. Aztán térfogatnyi jéghideg PBS-ben homogenizáltuk a szöveteket majd a centrifugálás (15perc, 2000 rpm) után, a felülúszót újra centrifugáltuk (10000g, 45 percig), így megszabadultunk a szöveti maradványoktól. A fehérjekivonathoz ezután β-merkaptó-etanolos felvivő puffert adtunk (0,5 M Tris-HCl, 10 % SDS pH 6,8, 30 % glicerin, 0,012 % brómfenol-kék, 6 % β-merkaptó-etanol) és denaturáltuk 95°C-on, 5 percig. Denaturáló gélben 10 % poliakrilamid és SDS jelenlétében elválasztottuk a fehérjéket. A tömörítő gél 0,5 M Tris-HCl-ot, 0,4 % SDS-t (pH 6,8), míg maga a szeparáló gél 1,5 M Tris-HCl-ot, 0,4 % SDS-t tartalmazott, ez utóbbi pH-ja azonban már 8,8-as volt. Az egy éjszakán át (12 óra) száradó gélen zsebenként 10 µl denaturált fehérjemintát választottunk el 0,5 % SDS tartalmú Tris-glicin pufferben, 25-35 mA áramerősség mellett, Hoefer Minigel futtatókádban (Hoefel Scientific Instruments). A szeparált mintákat tartalmazó gélt kétszer 15 percig mostuk transzfer pufferben, ami 60 mM Tris-t, 40 mM CAPS-t (pH 9,6) tartalmazott, eközben a PVDF membránt (Merck,

Millipore,) is előkészítettük a blottoláshoz, 2 percig metanolban, 5 percig desztillált vízben nedvesítettük, majd 15 percig transzfer pufferben áztattunk. Elektromos (Semi-dry) blottoló berendezéssel (Hoefer Scientific Ins.) 30 perc alatt, 100 V feszültség mellett rögzítettük a mintákat a membránon. A blottolás végeztével a membránt 5 % tejporthoz tartalmazó TBS-T (Tris pufferelt sóoldat, 0,05 % Tween 20 detergens) pufferben blokkoltuk. Az anti-KCNE1 (Abcam: ab65795) elsődleges ellenanyagot 1:2000 hígításban ugyancsak 5 % tejporthoz tartalmazó TBS-T oldatában reagáltattuk 90 percig 4°C-on a fehérjékkel. Majd a membránt négyszer 10 percig mostuk TBS-T oldatban. A másodlagos ellenanyagot, mely goat anti-mouse (Sigma) 1:8000 hígítási arányban 60 percen keresztül szobahőn inkubáltuk a membránon. Ezután újabb három TBS-T-s mosás következett. A másodlagos antitestet luminol alapú kemilumineszcenciás kit (ECL-Plus Kit, Amersham) és autoradiográfia (Hyperfilm, Amersham) segítségével tettük láthatóvá.

3.2.6. IMMUNHISZTOKÉMIA ÉS KONFOKÁLIS MIKROSZKÓPOS VIZSGÁLAT

A frissen izolált transzgénikus és kontroll nyúl szív kamrai izomsejteket acetonnal fixáltuk. A festést közvetlenül megelőzően rehidráltuk és 1 órán át 5% BSA-val (bovine serum albumin, Sigma) kiegészített PBST-ben (foszfát-pufferelt sóoldat + 0,01% Tween) szobahőmérsékleten blokkoltuk. A sejteket 1,5 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten az elsődleges ellenanyaggal (egérben termelt monoklonális anti-humán KCNE1, Abcam) 1:2000 hígításban, ezt követte háromszor 1 perces mosás PBS-el és 1 órás inkubálás a másodlagos ellenanyaggal (anti-egér IgG fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelölve (Sigma-Aldrich) 1:300 hígításban. Végül a fedőlemezen lévő mintákat tárgylemezre helyeztük és Aqua Poly/Mount (Polysciences Inc.) végeztük a beágyazást. Negatív kontrollnak a csak másodlagos ellenanyaggal inkubált mintákat használtuk. A fluoreszcens felvételeket Olympus FV1000 (Tokyo, Japan) konfokális lézerszkenner elektronmikroszkóppal, azonos paraméterek mellett készítettük. A felvételeket optimalizáltuk és Adobe Photoshop software-el konvertáltuk.

3.2.7. IZOELEKTROMOS FÓKUSZÁLÁS

Az izoelektromos fókuszálást és az izoelektromos pont meghatározást az Országos Onkológiai Intézetben Dr. Doleschall Zoltán végezte. NanoPro1000 (Protein Simple, Wallingford, CT, USA) készülékkel. A fehérje kivonást a már Western blotnál leírt módon végeztük, azaz a jéghideg PBS pufferben homogenizált mintákat jégen szállítottam el az Országos Onkológiai Központba.

3.2.8. SZUPEROVULÁLTATÁS

3.2.8.1. EGÉR

Az FVBN nőstény donor egereket 8 - 10 hetes (30 gramm) korban 5 NE PMSG-vel (Intervet International B.V., Holland) majd 48 óra elteltével 5 NE hCG-vel (Ferring GmbH) hasüregbe (intraperitoneálisan) oltottuk. Ezt követően ezeket a nőstényeket FVBN hímekhez tettük be egy éjszakára, ezenkívül recipiens CD1 nőstényeket tettük össze vazektonizált hímekkel. A párzás tényét a másnap látható hüvelydugó (plug) jelezte. Az egereket cervikális diszlokációval megöltük majd a petefészket, a petevezetékét a méh egy kis darabjával együtt kimetszettük. A petevezető ampullájából az egysejtes embriókat (zigótákat) M2 médiumba mostuk ki. A zigótákat borító kumulusz sejteket hyaluronidáz enzim (Sigma) segítségével távolítottuk el. A kimosott embriókat a mikroinjektálás megkezdéséig KSOM médiumban (Sigma), embriótesztelt olaj alatt (Sigma), 37 °C-on, 85 % páratartalom mellett, 5% CO₂-al telített termosztátban (NuAire) tároltuk.

3.2.8.2. NYÚL

Az Újzélandi fehér nősténynyulakat 18 hetes korban, legalább 3,5 kg testsúly megléte mellett, 120 NE PMSG-vel (Intervet International B.V., Holland) intramuszkulárisan oltottuk be. 72 óra elteltével 180 NE hCG-vel (Ferring GmbH) intravénásan kezeltük a nőstény nyulakat. Ugyanekkor mesterségesen termékenyítettük is őket, Újzélandi fehér hímek frissen vett spermájával. A megtermékenyülést követő nap reggelén a nőstények petevezetőjét eltávolítottuk. A petevezetőkből a zigótákat 20% FCS-sel (fetal calf serum, Invitrogen) kiegészített PBS médiumba mostuk ki. A mikroinjektálásig az embriókat M2 médiumban ásványi olajjal (Mineral oil, Sigma) lefedve, 38,5°C-on, 5% CO₂-dal telített környezetben tartottuk.

3.2.9. MIKROINJEKTÁLÁS

3.2.9.1. EGÉR

Az embriókat a KSOM médiumból M2 médiumba helyeztük át, majd szintén M2 médiumból cseppentettünk, a cseppforma stabilitásának megtartása végett repel silane-nal (Pharmacia Biotech) kezelt mélyített tárgylemezre, és ebbe tettük át az injektálásra szánt embriókat. A cseppet embrióolajjal fedtük le, hogy a párolgás miatt kialakuló koncentrációváltozást megelőzzük. Az injektálást Nomarski differenciál interferencia kontraszt egységgel és háromdimenziós mozgást biztosító mikromanipulátor karokkal (Narishige) felszerelt IMT-2 invert mikroszkóp (Olympus) segítségével végeztük. Az embriók rögzítéséhez és a DNS bejuttatásához szükséges tartó (d=100 µm), illetve injektáló kapillárisokat (d=1-2 µm) (Harvard) mikropipetta húzóval (Model-97 micropipette puller, Sutter Instrument Co.) alakítottuk ki. A beállítási paraméterei: heat: 600, pull: 200, velocity: 130, time: 180. A tartó kapillárisok átmérőjét és formáját mikroalakítóval

(Narishige) készítettük el. A néhány pikoliter mennyiségű injektáló oldatot rendszerint a zigóták hím előmagjába juttattuk be. Az injektálást követően M2 médiumba helyeztük az embriókat és a már említett paraméterekkel bíró termosztátba helyeztük őket. Néhány óra elteltével ellenőriztük, hogy mely embriók éltek túl a beavatkozást.

3.2.9.2. NYÚL

Az egyik manipulátor karba a tartó kapillárist helyeztük ($d=100\ \mu\text{m}$, Harvard Apparatus, GC-100T-15), míg a másik karba az injektáló kapilláris kapott helyet ($d=1-2\ \mu\text{m}$, Harvard Apparatus, GC-100TF-15). Ezeket a vékony üveg kapillárisokat mikropipetta húzóval (Model-97) készítettük el, a húzás paraméterei megegyeztek az egér mikroinjektálásnál leírtakkal. A tartó kapillárisokat szintén az egérenél leírt módszerrel készítettük el. A donor állatok petevezetőiből kimosott egysejtes embriókat kiválogattuk. A mikroinjektáláshoz megfelelő, jól látható előmaggal rendelkező embriókat mélyített tárgylemezen lévő $20\ \mu\text{l}$ -es médium (20% FCS-vel kiegészített PBS) cseppbe helyeztük. Az embriókat tartalmazó médiumcseppet embrióolajjal fedtük le. A tárgylemezt óvatosan a mikroszkóp (Olympus IMT-2) tárgyasztalára helyeztük, és a mikromanipulátor karok segítségével elvégeztük az injektálást. A tartó kapilláris segítségével rögzített embriók előmagjába $1-2\ \text{pl}$ injektáló oldatot jutattunk. A már injektált embriókat a tárgylemezen elkülönítettük a nem kezeltétől. Maximálisan 25 embriót helyeztünk a médiumcseppbe, elkerülve, hogy túl sokáig legyenek erős megvilágítás és nem optimális hőmérsékleti tartományban, ami lassíthatja vagy megakadályozhatja fejlődésüket. Az injektálás végeztével az embriókat áthelyeztük egy új csepp 20% FCS-vel kiegészített PBS médiumba és termosztátban inkubáltuk a beültetésig.

3.2.10. EMBRIÓ BEÜLTETÉS

3.2.10.1. EGÉRBEN

A mikroinjektálást túlélte embriókat 2,5 %-os, Avertinnel altatott 3-4 hónapos, CD1 nőtény egerekbe ültettük vissza. A recipiensként használt nőtény egereket a beültetést megelőző nap vazektomizált hímekhez helyeztük ki. Másnap reggel a kopulációs dugó (plug) megléte alapján válogattuk ki az embriótranszferre alkalmas álvemhes egyedeket. Oldalanként 10-12 db embriót helyeztünk vissza az infundibulumon keresztül a petevezetőbe. Amennyiben nem tudtunk megfelelő módon hozzáférni az infundibulumhoz, közvetlenül az ampullába ültettük vissza az embriókat.

3.2.10.2. NYÚLBAN

A fiatal, 4-5 hónapos, recipiens Újzélandi fehér nőtényeket az embriók beültetése előtti napon 0,2 ml GnRH analóg készítménnyel (Receptal, Intervet) kezeltük intravénásan. Hogy az állatokon minél kisebb sérülés keletkezzen ezért a műtéteket laparoszkópos módszerrel végeztük. Az anesztéziához 0,4 ml Xilazin (CP-Xilazin 2% inj A.U.V., Cp-Pharma Handelsges. mbH) és 0,7-1,2 ml Ketamin (Cp-Pharma Handelsges mbH) oldatot használtunk. Az altatásban lévő állatok hasáról lenyírtuk a szőrt, hogy ne zavarja a műtétet. Köldöktájékon szikével apró (2-3 mm-es) bemetszést ejtettünk az állatokon, hogy megkönnyítsük a hasfalon át történő bevezetését a trokárnak. A trokár segítségével az állat hasüregét felfújtuk levegővel, hogy elkerüljük a belső szervek megsérülését a laparoszkóp bejuttatásakor. Megszámoltuk a petefészen elhelyezkedő ovulációs helyek (corpus hemorrhagicum) számát, mert így ellenőrizhető, hogy a GnRH injekció valóban hatásos volt-e. A petefészekhez közel a hasfalon keresztül a felfújt hasüregbe szúrt vénás kanül (Introcan-Safety IV Catheter W, BBraun) tűjét a tölcséren keresztül a petevezetőbe jutattuk. A kanül tűjét egy üvegapillárisra (Brand, 701902) cseréltük. Ez a kapillaris tartalmazta a médiumban úszó embriókat, ezt két levegőbuborék, majd két médiumcsepp vette körül. A buborékok azt a célt szolgálták, hogy biztosan lássuk, az embriók bekerülnek a petevezetőbe. Az álvemhes nyulak jobb és bal petevezetőibe oldalanként kb. 10 db, a mikroinjektálást túlélte, egy - vagy kétsejtes embriót transzferáltunk. A laparoszkóp eltávolítását követően a vágást 7,5 mm-es seb kapoccsal zártuk.

3.3. FELHASZNÁLT ELEKTROFIZIOLÓGIAI MÓDSZEREK

A rövidtávú RR és QT variabilitást, valamint az aritmiák előfordulási gyakoriságának mérését SZTE ÁOK, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetben, Dr. Varró András és munkatársai által végezték.

A transzgénikus és vad típusú nyulakat tiopentállal altatták ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.v.), a jobb fül marginális vénájába adagolva. Egy 500 IU mL⁻¹ heparint tartalmazó, izotóniás sóoldattal feltöltött műanyag katétert vezettek be a bal *arteria carotisba* az artériás vérnyomás mérése érdekében. A későbbi intravénás szer adagoláshoz a jobb *vena jugularis* kanülálását végezték. A kiindulási alapértékek felvétele előtt az állatokat hagyták stabilizálódni 20 percen keresztül. A vérnyomást és az elektrokardiogramot (végtagi elvezetések I, II és III) folyamatosan regisztrálva és (2 kHz mintavételezés), digitalizálva lett a későbbi "offline" analízishez (National Instruments, Austin, TX, USA) és a SPEL Advanced Haemosys szoftver használták (v3.2, Experimetria Kft., Budapest, Magyarország). Az RR és QT intervallumok 30 ütés átlagából számolták (a minimálisan szükséges

ütésszám az intervallumok rövidtávú variabilitásának számításához). Az altatott nyulakon a QT intervallum mérése során a korábban leírt módszertant alkalmazták (Farkas et al, 2010). A frekvencia korrigált QT intervallum (QTc) kiszámításához az altatott nyulakra specifikusan kifejlesztett egyenletet (Batey et Coker 2002) volt használva, mely a szívfrekvencia függő QT intervallum változások pontos követését tette lehetővé: $QTc = QT (0,704 * (RR 250))$.

Az intravénás infúziókat programozható infúziós pumpából adagolták (Terufusion TE-3, Terumo Eu-rope, Leuven, Belgium). A kísérlet során, mind a vad típusú, mind a transzgénikus nyulak az IKr gátló dofetilidet (Richter Gedeon, Budapest, Magyarország) $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ dózisban kapták 10 perces infúzió során $2 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}$ térfogatban.

3.3.1. AZ RR ÉS QT INTERVALLUM RÖVIDTÁVÚ VARIABILITÁSA (STVRR, STVQT)

Az RR és QT intervallumok bemutatására ún. Poincaré grafikonokon történik, melyeken minden RR és QT intervallumot az azt megelőző RR és QT értékének függvényében ábrázoltunk a szívfrekvencia és a repolarizáció ütések közötti időbeli instabilitásának jellemzésére. A grafikonok 30 egymást követő intervallum szinusz ritmusban mért értékeinek eredményei a kísérlet során egy adott időpontban. A kísérlet adott időpontjában történő TdP ritmuszavar kialakulása esetén (pl. az IKr gátló dofetilid beadását követően), a méréseket a TdP kialakulását megelőzően történtek. A következő képletet használták a beat-to-beat rövidtávú RR vagy QT variabilitás (STV) számítására: $STV = \sum |D_{n+1} - D_n| (30 \times \sqrt{2})^{-1}$, ahol D a QT vagy RR intervallum időtartama. Az STV a Poincaré grafikonon az azonossági középvonaltól való átlagos távolságot képviseli, és a "beat-to-beat" RR és QT intervallum instabilitás becslése a Poincaré grafikon korábban leírt kvalitatív és kvantitatív analízisén alapul (Brennan et al, 2001).

3.3.2 FOLT-FESZÜLTSGZÁR (PATCH CLAMP) MÉRÉSEK

A patch clamp méréseket a Szegedi Tudomány Egyetem Általános Orvostudományi Kar, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetében, Dr. Ördögh Balázs és munkatársai végezték. CHO-K1 sejteken, és a kiértékelést DIGIDATA 1440A, pClamp 10 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) szoftverrel történtek (Major et al, 2016).

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

4.1. VAD TÍPUSÚ ÉS MUTÁNS KCNE1 EXPRESSZIÓJÁRA ALKALMAS KONTRUKCIÓK LÉTREHOZÁSA.

Bár a hosszú QT szindróma különböző típusait már vizsgálták különböző állatmodelleken, elsősorban génmódosított egerekben, nekünk a világon harmadikként sikerült olyan transzgenikus nyúl betegségmodell létrehozni, ami alkalmas a korábbiaknál árnyaltabb elektrofiziológiai tulajdonságok mérésére. Kísérletekkel bizonyítottuk az eddig csak humánban leírt és *Xenopus* petesejteken tesztelt pontmutáció fenotípusos következményeit *in vivo* környezetben. A doktori munkám során sikerrel alapítottunk olyan transzgenikus nyúl vonalat, amellyel eddigieknél pontosabban jellemezhető a humán hosszú QT 5 típust kiváltó repolarizációs tartalékok csökkentő szindróma oka. Valamint ennek a transzgenikus nyúl betegségmodellnek a molekuláris biológiai jellemzését is elvégeztem.

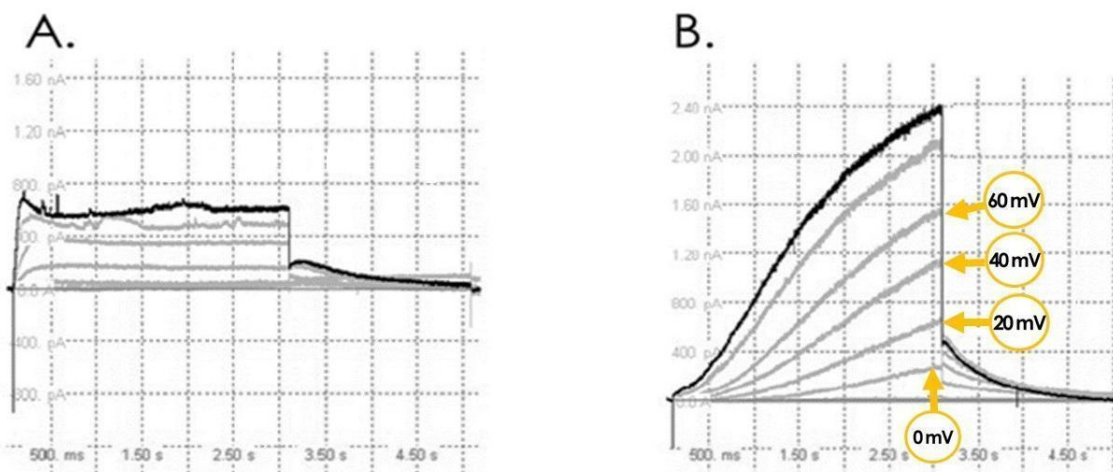
A transzgen konstrukcióhoz szükséges kódoló részt, azaz a teljes KCNE1 gént izoláltam a humán szívizom cDNS könyvtárból (3H Biomedical AB). Ezután egy klónozó vektorba helyeztem, ahol Agilent Tech. Quick Change Mutagenesis Kit-tel kicseréltem benne a 154. pozícióban lévő guanint adeninre. Ez a pontmutáció egy aminosav cserét is okozott a fehérje összetételben, mert az 52. helyen lévő glicin (G) argininre (R) cserélődött. A G52R mutációt azért választottuk, mert Ma és munkatársai 2003-ban publikálták, hogy a vizsgált család érintett tagjainak egy részében hosszú QT 5 típusú szindróma okoz (Ma. et al, 2003). A nyúl β -MHC promóter szívsvövet specifikus expresszióhoz szükséges részét és a 3' végéhez tartozó három rövid, nem transzlálódó exont Újzélandi fehér nyúl genomi DNS-ből felszaporítottam és beépítettem pCRW-Blunt II-TOPO vektor (Invitrogen) TOPO helyére. A teljes promóterre nem volt szükségem, mert korábban közölt adatok igazolták (James J. et al, 2000.), hogy az általunk használt 4533 bp hosszúságú darab elegendő a szívkamra specifikus expresszióhoz. Ezután két klón konstrukciót hoztam létre. Az egyik esetben a pCRW-Blunt II-TOPO vektorban lévő promóter után EcoRV helyre klónoztam a vad típusú KCNE1 cDNS-t. A másik esetben a mutáns KCNE1-t építettem a promóter mögé, szintén EcoRV helyre. Majd a promótert és a vele egybeépített cDNS-t a vektorokból BamHI – NotI emésztéssel izoláltam és áthelyeztem pcDNA3.1-es vektorba, ahol a konstrukciót egy BGH polyA szignál tette teljesé. Ezt követően NheI-SexAI restrikciós enzimekkel kivágtam a pcDNA3.1 vektorból az így linearizálódott, kész transzgen konstrukciót (β -MHC promóter + KCNE1 cDNS + BGH polyA szignál) és mikroinjektáló pufferrel 4ng/ μ l –es oldatot készítettem belőle.

4.2. *IN VITRO* EREDMÉNYEK

A sejtmembrán transzport tanulmányozásának egyik módszere a patch clamp (folt-feszültségzár) technika (Hamill et al, 1981). A módszer alapötlete, hogy egy apró membrán területen (patch), elektromos szempontból izolálva a membrán többi részétől és adott feszültséget kapcsolva rá (clamp), mérhetővé válnak a foltban található csatornán vagy csatornákon átfolyó áramok.

A transzgén konstrukciókat *in vitro* tesztelni akartuk a mikroinjektálás megkezdése előtt. Így partnerünk, Katje Odening freiburgi laborjában CHO-K1 sejtekbe transzfektálták és ion áram méréseket végeztek rajta patch-clamp technikával.

Ennek a módszernek előnye, hogy ilyenkor a CHO-K1 sejtvonalakban a pólus alkotó, alfa alegység mellett, egyszerre csak az egyik béta alegység volt jelen, így külön-külön mérhetővé vált a különböző szabályzó alegységek munkája. A G52R mutáns béta alegységet tartalmazó ioncsatorna esetében az I_{Kr} áram nem volt mérhető. A kísérletben bizonyítottuk, hogy a mutáns transzgén valóban csökkenti a kálium áramlást a CHO-K1 sejtek membránján. (12. ábra).



12 ábra: CHO sejteken végzett ionáram mérések.

A rész: I_{Kr} áram a mutáns humán G52R–KCNE1 béta alegységgel. **B rész:** I_{Kr} áram a vad típusú humán KCNE1 béta alegység jelenlétében. (A mérés Katja Odening csoportjában történt).

4.3. *IN VIVO* EREDMÉNYEK

A transzgén konstrukció *in vivo* tesztelése FVB/N egerekkel történt. A szuperovulált FVB/N nőstényeket FVB/N hímekekhez tettük ki, majd a párzás utána, cervikális diszlokációval megölt állatok petevezetőjéből 305 db embriót mostunk ki. Ebből 268 db volt alkalmas előmagi mikroinjektálásra, 224 db embrió lett visszaültetve álvemhesített, CD1 egerekbe. Ebből 14 utód született, amelyből egy transzgénikus alapító lett. A heterozigóta szülőpárokkal történő keresztezéssel homozigóta vonalat szerettünk volna alapítani de az F2 generációs almokban homozigóta utódokat nem sikerült azonosítanunk. Ezért újabb heterozigóta keresztezésekből két a

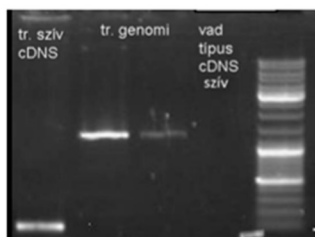
vevesség különböző szakaszában levő nőtényekből embriókat izoláltunk és genotipizáltunk. Az eredményeket a 2 táblázat mutatja, melyekből látható, hogy csak az általunk vizsgált legkorábbi embriók esetében tudtunk homozigóta utódokat kimutatni a későbbi fejlődési szakaszban ezek már nem életképesek.

2. táblázat: A transzgenikus heterozigóta egér keresztezésekből származó embriók összefoglalása. Homozigóta utód keresése 12,5 napos és 14,5 napos korban, amikor az embrionális szív fejlődése elkezdődik. A homozigóta utódok száma, már ebben a fejlődési stádiumban is nagyon alacsony, és szignifikánsabb alacsonyabb emiatt a transzgenikus arány is, mint a várt. (A táblázatot Major Péter készítette.)

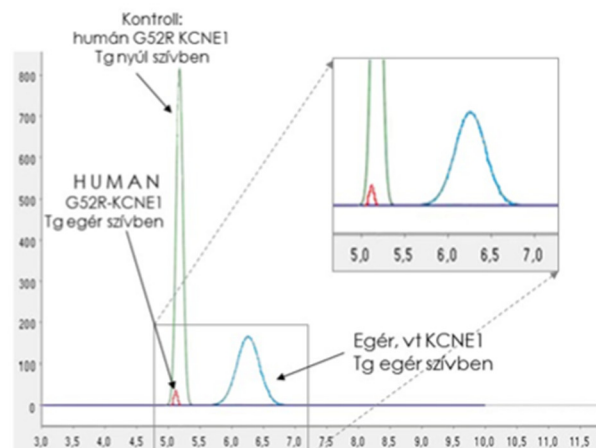
	EMBRIÓK SZÁMA	HETEROZIGÓTA. EMBRIÓK SZÁMA	HOMOZIGÓTA GYANÚS EMBRIÓK SZÁMA	TG. ARÁNY (összes TG/össz. embrió) (VÁRT: 75%)
12,5 NAPOS	97	42	3	46 %
14,5 NAPOS	6	3	1	66 %
Σ	103	45	4	47 %

A transzgenikus egér vonalban RT-PCR technikával kimutattam, a transzgén szívszövet specifikus expresszióját mRNS szinten. Izoelektromos fókuszálással kimutattuk a transzgenikus egerek szívében a mutáns, humán fehérje jelenlétét. Izoelektromos fókuszpont alapján elkülönítettük a humán és egér fehérjéket a transzgenikus egyed szívében (13. ábra, B. rész). Az egér, saját minK fehérjének izoelektromos pontja 6,3.

A.



B.



13. ábra: A transzgén kifejeződésének ellenőrzése RNS és fehérje szinten.

A rész: A transzgénről készült mRNS kimutatása, a transzgenikus nyúl szívben. **B rész:** A transzgén fehérje összehasonlítása izoelektromos fókuszálással a transzgenikus egér és nyúl szívben.

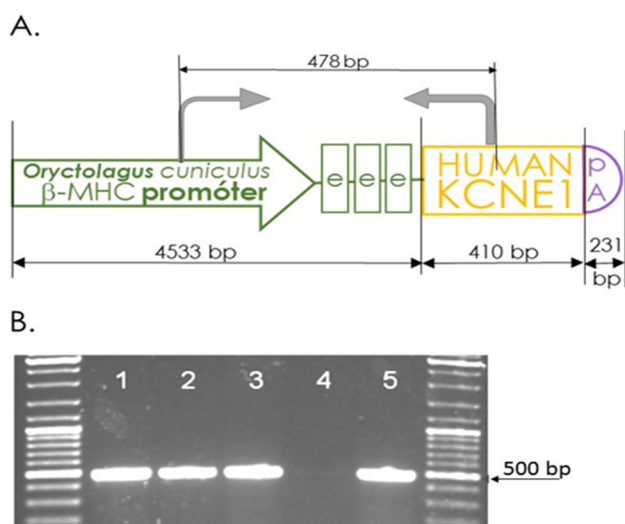
(Az ábrát készítette Major Péter.)

A humán mutáns minK fehérje izoelektromos pontja pedig 5,1. Ennek a mérésnek azért is van nagy jelentősége, mert ilyen technikával és pontossággal még nem mérték meg a humán G52R-minK izoelektromos pontját, eddigi kalkulációk csak fehérje aminosav sorrendje alapján történtek (3. táblázat).

3. táblázat: A neten található különböző az izoelektromos pont kiszámítására alkalmazott szoftverek eredményei és a Simple Western Nanopro-val mért eredmények összehasonlítása. (A táblázatot készítette Major Péter.)

netes forrás	egér	nyúl	G52R-minK
DTASelect	6,7	5,2	8,1
EMBOSS	6,7	4,8	8,4
GRIMSLEY	6,6	4,8	7,5
Patrickios	4,3	3,5	4,3
Rodwell	6,3	4,8	8,1
Sillero	6,7	5,1	8,4
Solomon	6,3	4,9	8,5
Lehninger	6,3	4,8	8,5
Wikipedia	6,3	4,8	8,1
ProMoST	6,3	5,07	7,6
ÁTLAG:	6,25	4,77	7,75
Általunk mért:	6,3	4,8	5,1

Miután mind az *in vitro* és *in vivo* előkísérlet is biztató eredménnyel zárult, hozzáfoghattunk a transzgenikus nyúl létrehozáshoz, amelynek keretében Újzélendi fehér donor nyulakból szuperovuláltatás és mesterséges termékenyítés után egysejtes embriókat mostunk ki. A kísérlet során 490 db nyúl embriót mikroinjektáltunk. Ebből 466 db kezelt embriót laparoszkópos embriótranszfer segítségével 20 db recipiens nőténybe ültettünk. A 20 db recipiensből 9 db anya ellett és összesen 38 db utód született, amelyből négy hordozta a transzgént. A négy transzgenikus alapítóból egy élte meg a tenyészerett kort.



15. ábra: A transzgen utódok azonosítása.

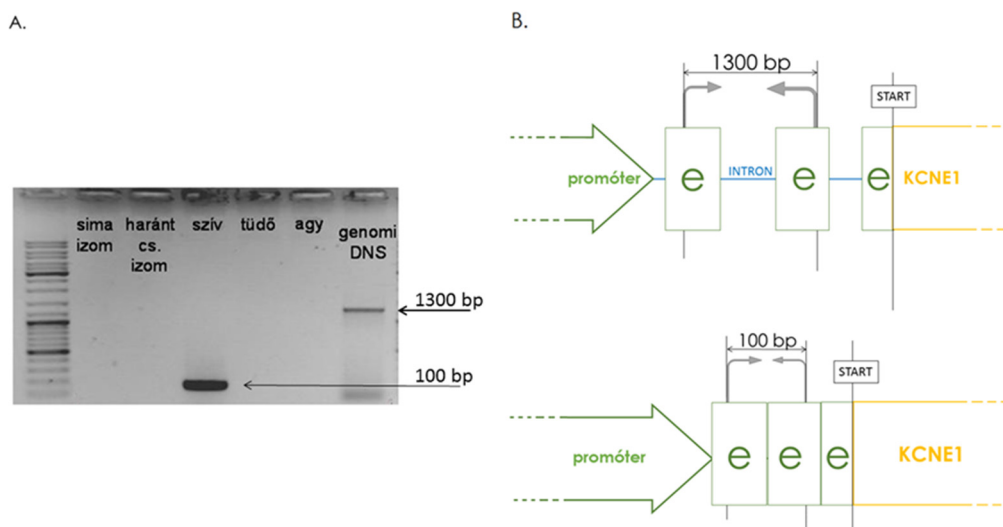
A rész: Transzgenikus utódok kimutatására használt Promóter vége forward és CDNS eleje revers primer pár feltapadása (e. = exon).

B rész: PCR technikával azonosított transzgenikus utódok. 1-3 minták: tg hordozó nyulak, 4. minta: vad típusú nyúl, 5. minta: pozitív plazmid kontroll /a képen nem szerepel az összes tg utód/ (Az ábrát készítette Major Péter.)

A másik három állat nem a transzgén hatásának következtében pusztult el. Az alapítókat PCR eljárással azonosítottuk, olyan transzgén specifikus primerekkel, amelyeknek a forward része a nyúl β -MHC promóterre tapad fel, a reverz pár pedig a humán KCNE1 cDNS-re (15. ábra).

4.4. A TRANSZGÉN RŐL ÁTÍRÓDÓ mRNS KIMUTATÁSA

Az F1-F3 generációkban végeztem a transzgén expresszójának vizsgálatait. Először RT-PCR segítségével a szívszövet specifikus expressziót vizsgáltam. A promótert, a 3' végénél, három exon követi, amelyeket intronok választanak el egymástól, ezért ez lehetővé tette, hogy könnyedén kimutassam az transzgén konstrukcióról készült érett mRNS-t. Mivel az RT-PCR primereit úgy terveztem az exonokra, hogy egy intron fogjon közre, amely az RNS érési folyamatai során kivágódik, így jól láthatóan ellenőrizhető, hogy expresszió történt a transzgénről, mert a humán KCNE1 gén mRNS-éről készült a PCR termékek jóval rövidebbek lesznek, mintha azok, a genomba integrálódott transzgénről készültek volna (16. ábra). A transzgén expresszióját leellenőriztem a három féle izomszövetben és a transzgénről készült mRNS csak a szívizomsejtekben volt kimutatható. A tüdő és az agy azért szerepel a minták között, mert a The Human Protein Atlas (proteinatlas.org) publikált olyan adatot, hogy a tüdőben és az agyban is kimutatható KCNE1 expresszió.

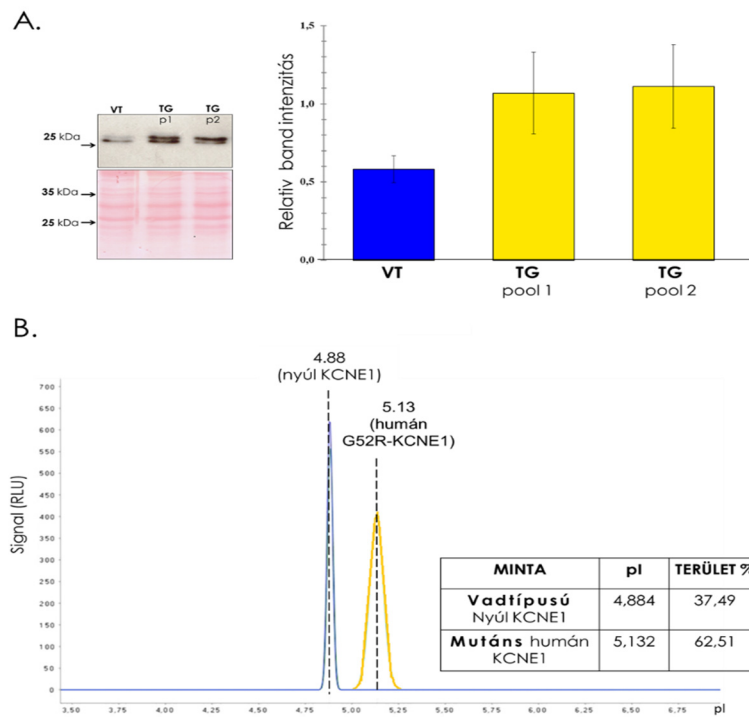


16. ábra: Transzgén konstrukció expressziójának vizsgálata

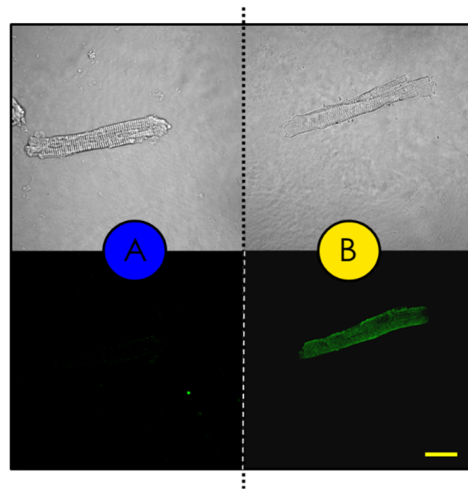
A rész: A szövet specifikus expresszió ellenőrzése transzgenikus nyulakban. **B rész:** A szövet specifikus expresszió ellenőrzéséhez használt PCR működési elve (Az ábrát készítette Major Péter).

Ezután a transzgenikus nyulakban a fehérje expressziót is sikerült kimutatunk kétféle technikával. Először Western blot segítségével igazoltuk a transzgénről átíródó mink fehérje expressziót. Mivel az alkalmazott ellenanyag (anti-Humán KCNE1, Abcam), amelyet a humán mink fehérje egy konzervatív szekvencia részlete ellen termeltettek, mind a humán mind a nyúl minK fehérjét

felismerte, a Western blot azt igazolta, hogy transzgenikus állatok szívében több minK fehérje található, mint a vad típusú állatokéban (17. ábra A). Ezért Dr. Doleschall Zoltán segítségével az Országos Onkológiai Intézetben, meghatároztuk a transzgenikus nyulaink szívében a transzgenről átíródó illetve a nyúl saját endogén minK fehérjék izoelektromos pontjait és ezek alapján sikerrel elkülönítettük a két fehérjét. A mutáns, humán minK fehérje izoelektromos pontja itt is 5,1 volt, szemben a nyúl, saját minK fehérje izoelektromos pontjával, ami 4,8-nak bizonyult. Továbbá sikerült a humán minK fehérje mennyiségét is nyúl minK-hez viszonyítva meghatározni és ennek eredménye alapján elmondható, hogy 1,5x több mutáns humán minK termelődik a nyúl szívben a nyúl endogén fehérjéhez képest (17. ábra B). Immunohisztokémiával kimutattuk, hogy a mutáns humán KCNE1 a frissen izolált szívizomsejtek membránjához asszociált (18. ábra), amely aláhúzza a korábbi *in vitro* adatokat és megerősíti azt a hipotézist, hogy ez a mutáció nem befolyásolja az ioncsatorna fehérjék membránba való transzportjának képességét (Harmer et al, 2010).



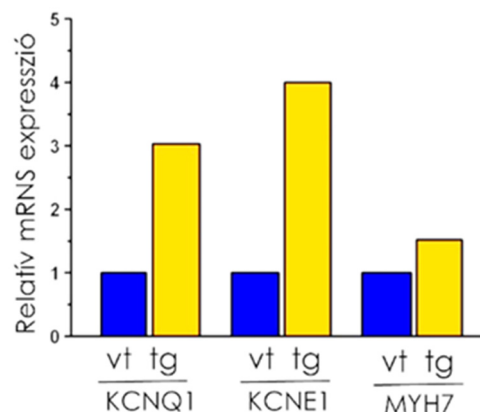
17 ábra: Fehérje vizsgálatok eredménye. **A rész:** transzgenikus nyúl szívben Western blottal mért fehérje expresszió. **B rész:** A transzgenikus nyúl szívben izoelektromos fókuszálással mért fehérje expresszió és izoelektromos pont mérés eredménye. A görbék alatti terület-% értékben mutatja a vad típusú (nyúl endogén) és a mutáns minK fehérje egymáshoz viszonyított mennyiségét a transzgenikus nyúl szívben (Az ábrát saját közlemény alapján készítettem).



18. ábra: A szívizom szövet immunhisztokémiai festése anti-human KCNE1 antitesttel.

Az A oldal mutatja a vad típusú nyúlból származó mintát, a B oldal mutatja a humán mutáns fehérjét expresszáló, transzgénikus nyúl szívizomsejteket. (Az ábra Major et al, 2016 cikk magyar nyelvű fordítása)

Kvantitatív PCR (qPCR) segítségével megmértem a nyúl KCNQ1 mRNS és szintén nyúl MYH7 mRNS expresszióját normalizálva a RPS5 és a 28S háztartási gének mértani átlagára. Azért választottam ezt a két gént (KCNQ1, MYH7), mert ezek vannak a legközvetlenebb kapcsolatban a transzgén konstrukciómmal. Ezalatt azt értem, hogy a nyúl MYH7 gén (beta-MHC) promóterével hajtottam meg a transzgén konstrukciót. Illetve a KCNQ1 gén az alfa alegysége IKs ioncsatornának, s ezt befolyásolja a KCNE1 génről készült szabályozó fehérje, a minK. Ennek a két fehérjének a sztöchiometriás aránya, befolyásolja az IKs ioncsatorna működését (Koichi et al, 2010., Murray et al, 2016). Az így kapott eredmények igazolták, hogy transzgénikus állatok szívében a nyúl KCNQ1 és a nyúl MYH7 mRNS szint szignifikánsan magasabb, mint a vad típusú alom testvér szívében (18. ábra).

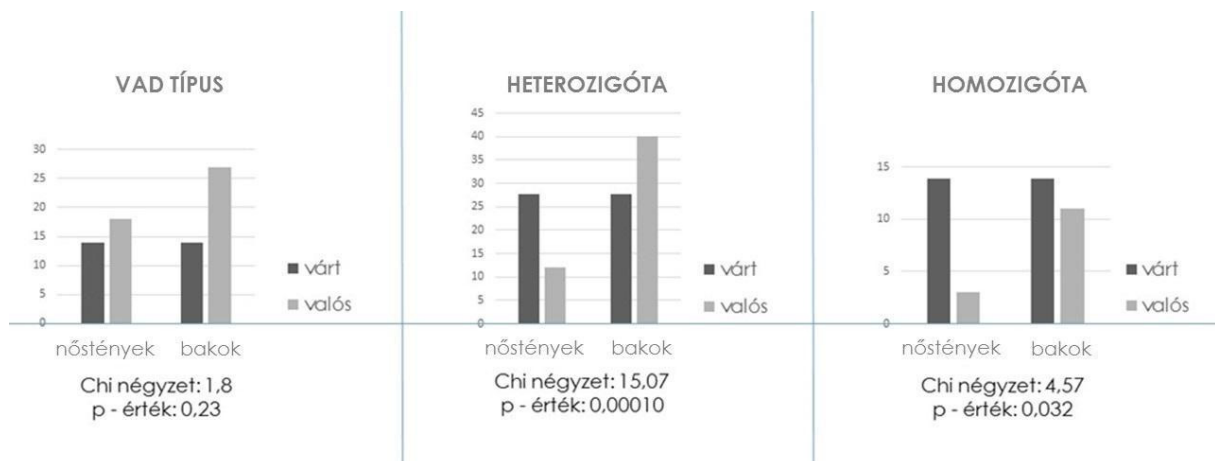


19. ábra: A génexpresszió mennyiségi vizsgálata.

A transzgénikus nyúl szívkamrában az endogén mRNS-ek expressziójának változása. Az IKs alfa alegységét kódoló KCNQ1 mRNS szintje drasztikusan emelkedett még a nehéz láncú miozin (MYH7) gén - aminek a promóterét használtuk a transzgén konstrukcióban – expressziója is szignifikánsan emelkedett.

(Az ábra Major et al, 2016 cikk magyar nyelvű fordítása)

A több éven át tartó vonal fenntartó tenyésztés során akartunk homozigóta utódokat létrehozni. De nem volt olyan egyed, ami kétlépcsős homozigóta detektálási módszerünk biztosan homozigótának talált. A kétlépcsős rendszerben a homozigóta utódokat úgy azonosítjuk, hogy először kiválogatjuk transzgen specifikus qPCR primer segítségével a homozigóta gyanús utódokat. Homozigóta gyanúsnak tekintünk minden olyan egyedet, amelyben a transzgen relatív expressziója legalább 1,6x nagyobb a biztosan heterozigóta kontrollhoz képest. Miután a homozigóta gyanús egyedek elérik a tenyészéret kort keresztezzük őket vad típusú állatokkal és aztán a megszületett almokban megmérjük a transzgenikusok arányát. Ha homozigóta volt a szülő, akkor heterozigótának kell lenni az összes utódnak. Ha ez megtörtént, akkor tudjuk biztosra elmondani, hogy valóban homozigóta az egyed. De ezt a második “lépcsőt” nem tudtuk kivitelezni. Mivel a homozigóta gyanús egyedek vagy nem éltek meg az tenyészérett kort vagy nem született utód a vad típusú állatokkal való keresztezésből. A megszületett, heterozigóta utódok között a nőstények aránya is szignifikánsan kisebb, mint az elméletileg várt (20. ábra).



20. ábra: A transzgenikus vonalban tapasztalt ivareltolódás.

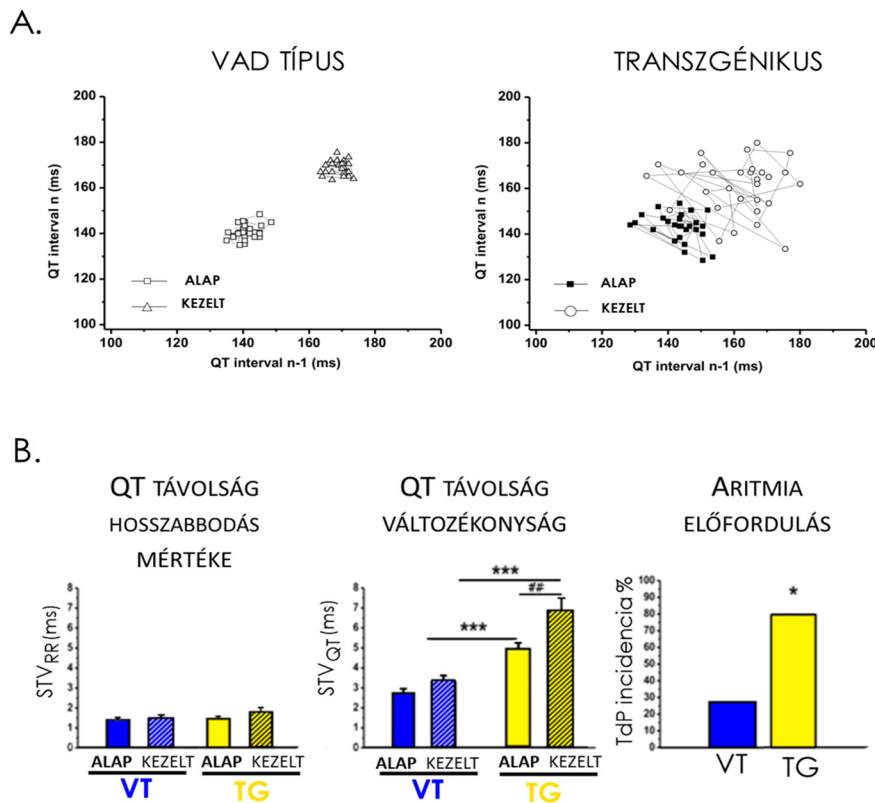
A hosszú QT 5 transzgenikus nyúl vonal F2 nemzedékében a transzgent hordozó utódokban tapasztalt ivar eltolódások statisztikai elemzése a nem transzgenikus alom testvér utódokkal összehasonlítva. Itt a homozigóta gyanús utódokat szerepelnek, amelyeket qPCR módszerrel azonosítottunk. De itt is jól látszik, hogy számuk jóval alacsonyabb, mint a várt (Az ábrát készítette Major Péter).

4.5. ELEKTORFIZIOLÓGIAI EREDMÉNYEK

A 3. és a 4. generációba tartozó, LQT5-s, ivarérett nyulakon a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiái Intézetében végeztek elektrofiziológiai vizsgálatokat. Ezek igazolták, hogy a késői egyenirányítói kálium áram lassú komponensének hibája miatt csökken a repolarizációs tartalék és dofetilid kezelés további szignifikáns QT távolság variabilitás (STVQT) emelkedést okozott transzgenikus állatokon (20. ábra: A rész). Míg a dofetilid hasonló QT távolság (QTc) nyúlást okozott a két csoportban addig

az STVQT növelő hatása sokkal drasztikusabb volt és magasabb aritmia gyakorisággal járt együtt a transzgénikus állatokban. A dofetilid Torsades des Pointes (TdP) ritmuszavart provokált három vad típusú állatban a tizenegyből, addig a TdP incidencia szignifikánsan magasabb volt, tizenkét egyedben a tizenöt a transzgénikus nyúlból (21. ábra: B része).

A transzgénikus állatokban szignifikánsan megnövekedett az aritmiák előfordulása más ioncsatornákat (IKr) gátló szer beadásának hatására. Továbbá a transzgénikus nyulakban a QT távolság variabilitás szignifikánsan magasabb ioncsatorna gátlók nélkül is. Ionáram inhibitor után pedig a QT variabilitás drasztikus mértékben megnövekszik. (21. ábra: A rész). Ez az eredmény annak fényében fontos, hogy eközben az EKG-n a két RR csúcs közötti intervallum távolsága - amelybe beletartozik a QT távolság - nem változik szignifikánsan (21. ábra: B rész). Összefoglalva megállapítható, hogy állatmodellünk alkalmas olyan hatóanyagok vizsgálatára, amelyek nem okoznak látványos QT távolság növekedést, de növelik az aritmiák előfordulási esélyét.



21. ábra: Elektrofiziológiai mérések eredményei.

A rész: A QT variabilitás változása a vad típusú és transzgénikus állatok szívében ioncsatorna gátló hozzáadása hatására. **B rész:** A QT távolság megnyúlásának és a QT távolság variabilitásának mértéke és az aritmiák megjelenésének aránya ugyanazon az állat csoporton. (Az ábra Major et al, 2016 cikk magyar nyelvű fordítása)

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Megépítettem a hosszú QT5 szindróma vizsgálatára alkalmas állatmodell létrehozásához szükséges transzgen konstrukciókat: a nyúl beta-miozin promótert tartalmazó humán KCNE1 cDNS-t G52R mutációt, illetve annak a vad típusú változatát tartalmazó vektorokat.
2. Sikerrel hoztam létre a hosszú QT5 transzgen konstrukcióval transzgenikus egérvonalat, amelyben igazoltam ennek működését RNS és fehérje szinten is.
3. Ezután létrehoztam a világon harmadik, hosszú QT szindróma vizsgálatára alkalmas transzgenikus nyúl modellt, amely gyakorlati használhatóságát elektrofiziológiai eredményei alapján megállapítottam.
4. Molekuláris biológiai módszerekkel igazoltam szövet specifikus expressziót LQT5-s transzgenikus nyúl vonalban és az immunhisztokémiai festés eredményei alapján megállapítottam annak sejtmembránban való lokalizációját.
5. Sikerült az LQT5 transzgenikus nyúl modell által expresszált humán ioncsatorna fehérje mennyiségének meghatározására, illetve az izoelektromos pontja alapján való elkülönítése.
6. Transzgenikus heterozigóta LQT5 vonal esetében igazoltam, hogy a heterozigóta transzgenikus utódok között ivar eltolódás van, szignifikánsan kevesebb nőstény utódot lehet kapni, homozigóta utódot pedig nem lehetett létrehozni.

6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA ÉS JAVASLATOK

Az állatmodellek mindig is fontos részei voltak az élettani kutatásoknak. Az elmúlt évtizedekben soha nem látott mértékben megnövekedett meg a használatuk a biológiai és orvosi kutatásokban, hála a biotechnológia gyors fejlődésének. A nyúl, mint laboratóriumi állat már évtizedek óta hasznos társa a kutatóknak, mert például jó modellje egyes humán betegségeknek, továbbá génmódosítást követően különböző szöveteiben gyógyhatású rekombináns fehérjéket termeltethetünk (Bősze et al, 2003). Fiziológiai és filogenetikai szempontból közelebb áll az emberhez, mint az egér vagy a patkány vagy más laboratóriumi modellállatok..

Munkám célja az volt, hogy létrehozzak egy olyan transzgenikus nyúlvonalat, amelynek szívkamrájában egy humán, mutáns ioncsatorna fehérje termelődik. S így az eddigieknél részletesebben vizsgálható a hosszú QT 5 szindróma elektrofiziológiai háttere. PhD munkám során igazoltam a transzgen konstrukció beépülését, öröklődését és expresszióját mind RNS, mind fehérje szinten. A szegedi Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetben végzett elektrofiziológiai mérések pedig igazolták a transzgenikus nyúl szívében kifejeződő mutáns humán minK fehérjének az IKs ionáramra kifejtett hatását. Bár immunfestéssel igazoltuk a humán minK fehérje megjelenését a transzgenikus nyúl szívművelő membránjában, a későbbiekben jó lenne, ha immunfestéssel a pólusalkotó alfa-alegységeket és a hozzá kapcsolódó humán minK béta-alegységek co-lokalizációját is megnéznénk valamint Immunprecipitációval azt, hogy humán transzgen fehérjénk kivel interaktál az ioncsatorna fehérjék közül.

A munkámat még a genomszerkesztési módszerek (Genom Editing: TALEN, Zink Finger, CRISPR/Cas) térhódítása előtt kezdtem, ezért a továbbiakban e módszerek alkalmazásával fejleszteném eredményeimet. A meglévő LQT5-ös vonal használatával lehetséges lenne egy olyan transzgenikus vonal létrehozása, amelyből CRISPR technikával kikapcsoljuk a nyúl endogén KCNE1-et és így csak a mutáns humán KCNE1 expresszálna a transzgenikus nyúl szívében. Szerencsés esetben, amennyiben van élő utód, az endogén KCNE1 nélküli, transzgenikus modell alkalmas lenne arra, hogy pontos képet kapjunk arról, hogy a endogén KCNE1 mekkora arányban segít be G52R mutánst is tartalmazó IKs csatorna működésébe, igazolhatná vagy pontosíthatná a *in vitro* tesztek eredményeit. Segíthetne, hogy pontosabb képet kapjunk a minK fehérje egyéb fiziológiai szerepeit is megismerni.

Egérben publikált adatok szerint a hosszú QT2 típusú terhes állatok esetében 9,5 napos korig nincs eltérés a heterozigóták és homozigóták fejlődése között (Teng et al, 2008.) Továbbá érdekes megfigyelésünk volt a transzgenikus utódok között az ivararány eltolódása. Erre részben magyarázat lehet a női nemi hormon hatása, amely növeli a kardiológiai zavarok és a hosszú QT

szindróma megjelenésének valószínűségét (Odening KE. et al, 2012, Sauer et al, 2007). A jövőben az LQT5-ös transzgenikus vonalon javasolt lenne a női nemi hormonok egyedi hatását megnézni, egy hasonló logikájú kísérletben, mint Katja Odening és munkatársai az LQT2-es transzgenikus vonalon (Odening KE. et al, 2012), amely során eltávolították a transzgenikus LQT2 nőstények petefészket, és utólag, külön-külön pótolták a főbb nemi hormonokat, így nézték azok egyéni hatását a hormonhiányos nyulak szervezetében. Vizsgálatukkal bizonyították a hosszú QT2 típusú szindrómát hordozó nőstények QT intervalluma szignifikánsan hosszabb, mint a bak nyulaké valamint, hogy a női hormonok utólagos pótlása - leginkább az ösztadiol hormon - szignifikánsan növeli a kardiológiai zavarok megjelenésének gyakoriságát. A transzgenikus nyúlmodelleken végzet további, részletes hormonvizsgálatok is nélkülözhetetlen információkkal szolgálhatnak, hogy megismerjük az elektrofiziológiai betegségek (köztük olyan súlyos betegségek, mint a hirtelen szívhalál) pontosabb hátterét, s így lehetőséget adjanak új és pontosabb előrejelzési technikák kifejlesztésére és/vagy gyógymódok kialakítására. Eddig a 16 hosszú QT szindróma közül összesen 3 típusnak készült el a transzgenikus nyúl modellje, a sajátunkat is beleszámolva. Ha pénz és energia nem számítana, létrehoznám a már meglévő, additív transzgenézissel létrehozott hosszú QT1, QT2 és QT5 nyúlmodelleket valamely, a már a csoportunkban is alkalmazott genom editáló módszerrel. Ez lehetővé tenné, hogy megtudjuk az új módszerekkel létre hozott állatok eredményei mennyire térnek el a már meglévő transzgenikus modellek eredményétől.

Ezekon kívül az LQT5-ös modellünket közreműködésemmel Freiburgban kereszteztük a LQT2-es nyúl modellel, létrehozva így a kettős transzgenikus LQT2-5 vonalat. A dupla transzgenikus vonalak még nem publikált eredményei azt mutatják, hogy az LQT2-5 mutánsok nem csak érzékenyebbek az IKs blokkolókra, hanem magasabb a pro-aritmiás biomarkerek szintje is. Illetve hosszabb időtartammal és nagyobb gyakorisággal jelennek meg a rosszabb indulatú aritmia kialakulások is.

Ezen túlmenően olyan érdekes alap kutatások alanyai is lehetnének ezek a nyúlmodellek, amelyekben az NMD faktorok és az ioncsatorna fehérjék kapcsolatát nézik. Közelebb kerülhetünk általuk, nem csak az ioncsatornák működésének megértéséhez, hanem ahhoz is, hogy az ioncsatorna fehérjék szabályozására milyen hatással van az általuk regulált fehérjék arányának mesterséges megváltoztatása. Mindenekelőtt célszerű lenne megvizsgálni, hogy az NMD komplex tagjainak mRNS expressziója megváltozott-e a transzgenikus nyulak szívében.

Végül, de nem utolsó sorban, az LQT5 modell transzgenikus nyúlvonalunk segítségével egy olyan összehasonlító kísérletet is elvégezhetnénk, amelyben összevethetők a kardiológiai vizsgálatokban leggyakrabban használt állatfajok (kutya, tengerimalac és nyúl) elektrofiziológiai

tulajdonságai. Tisztázva ezzel, hogy melyik a legalkalmasabb állatmodell az emberi szívritmuszavarok modellezésére.

Az utóbbi években a transzgenezis technikák fejlődése, a gyógyszeripari és az orvosi kutatásokra is közvetlen hatással van. Ezeken a területeken a kísérleti állatok újabb és újabb típusai fognak majd létre jönni, amelyekkel könnyen modellezhetők lesznek az eddig csak nehezen vizsgálható élettani folyamatok. Illetve megnövekszik azoknak a fajoknak a száma, amelyek alkalmassá válnak a humán betegségek modellezésére. Valamint a jól jellemezhető vagy pontosan ismert molekuláris biológiai háttér miatt, növekszik a kísérletek hatékonysága, így csökkenteni lehet az egy-egy kísérlet során felhasznált állatok létszámát. A kardiológiai kutatások területén már sok száz transzgenikus egérmodell használnak, de ezek nem teljesen hiteles emberi betegségmodellek, az emberétől eltérő ionáram összetételük miatt. Az emberi kardiológiai kutatások a területen eddig csak kisszámú génmódosított nyúl modellt alkalmaztak. A PhD munkám során létrehozott transzgenikus nyúl nem csak hiánypótló állatmodell, de egy új korszak egyik előfutáraként is tekinthető. Az LQT5-modell nyúlra kapott eredmények már eddig is fontos információkkal szolgáltak a humán szív repolarizációs ionáramok tulajdonságainak megismerésében.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A biológia és az orvostudomány több évszázados fejlődésének nélkülözhetetlen része az állatokon való kísérletezés. A védőoltások, az antibiotikumok, a szervátültetések, a kemoterápia mind nem léteznének, ha nem lettek volna megelőző állatkísérletek, valamint jóval kevesebbet tudnánk olyan betegségekről is, mint a malária vagy a himlő. Az állatkísérletek azonban nemcsak az emberi életek megmentéséhez járulhatnak hozzá, hanem alapvető biológiai és genetikai ismereteink bővülésével a haszonállatok és a házi kedvencek élettartamát és életminőségét is javíthatják. A biotechnológia módszerek fejlődésével olyan egyre szélesebb körbe használható transzgenikus technikák jöttek létre, amelyeknek hála számos olyan folyamat vált kutathatóvá a génmódosított állatokban, amit hagyományos társaikban nélkülöznünk kellett. Másik nagy előnye az irányítottan létrehozott mutáns állatoknak, hogy pontosan ismert a molekuláris biológiai háttér, így kisebb állat létszámmal lehet részletgazdagabb eredményeket kapni. S ez a technológiai fejlődés, hozzájárul a 3R állatvédelmi szabály hatékonyabb alkalmazásához a kísérletek tervezésénél, hisz ez a szabályzat egyik javaslata az etikus állat kísérletekhez, hogy a lehető legkevesebbre csökkenjen a kísérletekben felhasznált állatok száma (Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959).

A hirtelen szívhalál több mint 4 millió ember halálát okozza évente a világban, ezzel egyik vezető halálozási okká vált (Priori et al, 2015). A hirtelen szívhalál egyik fő okozója a *torsade de pointes* szívritmuszavar, aminek a megjelenése ioncsatorna hibákon alapuló hosszú QT szindrómával magyarázható. A hosszú QT szindróma olyan alanyokon figyelhető meg, akinél csökkent az ioncsatornák egymást helyettesítő képessége így növekszik az akciós potenciál időtartama. A hosszú QT szindróma miatt bekövetkező hirtelen szívhalál, előrejelzése eddig igen nehézkes volt, mert nem állt rendelkezésre olyan érzékeny módszer, amellyel a csökkent repolarizációs tartalék pontosan kimutatható lett volna. Ilyen prediktív módszerek kifejlesztéséhez, olyan állatmodellek szükségesek, amelyek ioncsatorna defektusai pontosan ismertek és mérhetőek. Ezeket az állatmodelleket létrehozni pedig legegyszerűbben transzgenézissel technikákkal lehetséges.

Munkám során megépítettem a génmódosított állatok létrehozásához szükséges transzgen konstrukció mutáns és vad típusú változatát. Mikroinjektálás módszerével létrehoztam örökítő képes transzgenikus egér és nyúl alapítókat. Aztán az utódaikat molekuláris biológiai módszerekkel jellemeztem; igazoltam szövet specifikus expressziót és izoelektromos pont alapján sikerrel elkülönítettük a mutáns humán és a nyúl KCNE1 fehérjét a z LQT5 nyúl szívekben. Valamint Western blottal kombinált izoelektromos fókuszálással meghatároztuk a humán fehérje

mennyiségét az endogén fehérje mennyiségéhez képest. A qPCR-rel igazoltuk a transzgén konstrukcióhoz köthető génekről készült mRNA relatív expresszió növekedését. A transzgén állatok szívében az endogén KCNQ1 és az endogén MYH7 mRNA szintje szignifikánsan megemelkedett. *In vitro* kísérletekben bizonyítottuk, hogy valóban a G52R mutáció okozza az IKs ionáram csökkent működését. A SZTE-ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetében végzett elektrofiziológiai mérésekkel igazolták, hogy az aritmiák pontosabb előrejelzéséhez nem a QT távolság mértékének növekedése szükséges, hanem a QT távolság változékonysága. LQT5-ös modelljeinkkel, ahol az IKs ioncsatorna mutáns, bizonyítható volt, hogy IKr ioncsatorna gátlók hozzáadása nélkül is növekedik az aritmiák megjelenésének valószínűsége a repolarizációs tartalék csökkenése miatt. Sikertelenül bizonyítani, hogy az ioncsatorna defektust hordozó, génmódosított állatokban a QT variabilitás nagyobb, mint a vad típusú alom testvérekben. Valamint azt is igazoltuk a transzgénikus nyúl modellünk segítségével, hogy az aritmiák megjelenése nehezen mutatható ki, ha csak a QT távolság megnyúlás mértékét nézzük, de szorosabb összefüggés mutatható ki a QT variabilitás mértékével. Így az LQT5 nyúlmodell alkalmas a csökkent repolarizációs tartalékot előrejelző módszer fejlesztésére. Azaz egy gyakorlatban is azonnal használható transzgénikus állatmodellt sikerült létrehozni, amely nemzetközi jelentőséggel is bír. Hisz a világon harmadik hosszú QT szindrómás transzgénikus nyulat PhD munkám keretében hoztam létre. Valamint, megkezdődtek a nemzetközi együttműködések az első két hosszú QT szindrómás nyulat létrehozó csoporttal. Létrehoztuk a kettős transzgénikus, hosszú QT szindrómás vonalat, melynek jellemzése folyamatban van. Ezzel is az eddigieknél komplexebb, az emberi elektrofiziológiai zavarok tanulmányozására pontosabb modellt kaptunk.

8. MELLÉKLETEK

M1. IRODALOM JEGYZÉK

- Aaronson PI, Judit N. Rövid kardiológia. B V Lap- és Könyvkiadó.; 2000.
- Attila Fonyó, Márk Kollai. Az orvosi élettan tankönyve. Medicina; 2014.
- Baczkó I. A repolarizációs tartalék farmakológiai gyengítése növeli a rövid távú QT variabilitást és a Torsades de Pointes ritmuszavar előfordulását, *Cardiologia Hungarica* 38 4-9
- Baczkó I, Jost N, Virág L, Bősze Z, Varró A. Rabbit models as tools for preclinical cardiac electrophysiological safety testing: Importance of repolarization reserve. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2016;121: 157–168. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2016.05.002
- Baptista R, Silva S, Dias P, Monteiro P, Feio J, Providência LA. In-hospital prescription of QT-prolonging drugs in a cohort of more than 100,000 patients. *International Journal of Cardiology*. 2011;147: 165–166. doi:10.1016/j.ijcard.2010.09.076
- Bartos DC, Grandi E, Ripplinger CM. Ion Channels in the Heart. *Comprehensive Physiology*. 2015;: 1423–1464. doi:10.1002/cphy.c140069
- Behm-Ansmant I, Kashima I, Rehwinkel J, Saulière J, Wittkopp N, Izaurralde E. mRNA quality control: An ancient machinery recognizes and degrades mRNAs with nonsense codons. *FEBS Letters*. 2007;581: 2845–2853. doi:10.1016/j.febslet.2007.05.027
- Bjune T, Risgaard B, Kruckow L, Glinge C, Ingemann-Hansen O, Leth PM, et al, Post-mortem toxicology in young sudden cardiac death victims: a nationwide cohort study. *EP Europace*. 2017;20: 614–621. doi:10.1093/europace/euw435
- Bogdanove, Adam J., Andrew Bohm, Jeffrey C. Miller, Richard D. Morgan, and Barry L. Stoddard. "Engineering Altered Protein–DNA Recognition Specificity." *Nucleic Acids Research* 46, no. 10 (04, 2018): 4845-871. doi:10.1093/nar/gky289.
- Brennan M, Palaniswami M, Kamen P. Do existing measures of Poincare plot geometry reflect nonlinear features of heart rate variability? *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 2001;48: 1342–1347. doi:10.1109/10.959330
- Brinster R. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell*. 1981;27: 223–231. doi:10.1016/0092-8674(81)90376-7
- Brunner M, Peng X, Liu GX, Ren X-Q, Ziv O, Choi B-R, et al, Mechanisms of cardiac arrhythmias and sudden death in transgenic rabbits with long QT syndrome. *Journal of Clinical Investigation*. 2008; doi:10.1172/jci33578
- Bősze Z, Major P, Baczkó I, Odening K, Bodrogi L, Hiripi L, et al, The potential impact of new generation transgenic methods on creating rabbit models of cardiac diseases. *Progress in*

- Biophysics and Molecular Biology. 2016;121: 123–130. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2016.05.007
- Cerrone M, Priori SG. Genetics of sudden death: focus on inherited channelopathies. *European Heart Journal*. 2011;32: 2109–2118. doi:10.1093/eurheartj/ehr082
- Cerrone M, Priori SG. Genetics of sudden death: focus on inherited channelopathies. *European Heart Journal*. 2011;32: 2109–2118. doi:10.1093/eurheartj/ehr082
- Cheng J. Heterogeneous distribution of the two components of delayed rectifier K current: a potential mechanism of the proarrhythmic effects of methanesulfonanilide class III agents. *Cardiovascular Research*. 1999;43: 135–147. doi:10.1016/s0008-6363(99)00061-9
- Chiamvimonvat N, Chen-Izu Y, Clancy CE, Deschenes I, Dobrev D, Heijman J, et al, Potassium currents in the heart: functional roles in repolarization, arrhythmia and therapeutics. *The Journal of Physiology*. 2017;595: 2229–2252. doi:10.1113/jp272883
- Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincen G, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell*. 1995;80: 795–803. doi:10.1016/0092-8674(95)90358-5
- Demolombe S. Transgenic mice overexpressing human KvLQT1 dominant-negative isoform Part I: Phenotypic characterisation. *Cardiovascular Research*. 2001;50: 314–327. doi:10.1016/s0008-6363(01)00231-0
- Doma MK, Parker R. Revenge of the NRD: Preferential Degradation of Nonfunctional Eukaryotic rRNA. *Developmental Cell*. 2006;11: 757–758. doi:10.1016/j.devcel.2006.11.004
- Drici M-D, Arrighi I, Chouabe C, Mann JR, Lazdunski M, Romey G, et al, Involvement of IsK-Associated K-Channel in Heart Rate Control of Repolarization in a Murine Engineered Model of Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. *Circulation Research*. 1998;83: 95–102. doi:10.1161/01.res.83.1.95
- Du C, Harchi AE, Zhang H, Hancox JC. Modification by KCNE1 variants of the hERG potassium channel response to premature stimulation and to pharmacological inhibition. *Physiological Reports*. 2013;1. doi:10.1002/phy2.175
- EKG. Practical Clinical Skills. Available: <https://www.practicalclinicalskills.com/ekg>
- Fan J, Kitajima S, Watanabe T, Xu J, Zhang J, Liu E, et al, Rabbit models for the study of human atherosclerosis: From pathophysiological mechanisms to translational medicine. *Pharmacology & Therapeutics*. 2015;146: 104–119. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.09.009
- Farkas A, Batey AJ, Coker SJ. How to measure electrocardiographic QT interval in the anaesthetized rabbit. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2004;50: 175–185. doi:10.1016/j.vascn.2004.05.002

- Fazekas T. A hosszú-QT-szindróma és a torsades de pointes kamrai tachycardia története. Kaleidoscope history. 2012;3: 26–74. doi:10.17107/kh.2012.5.26-74
- Fenichel RR, Malik M, Antzelevitch C, Sanguinetti M, Roden DM, Priori SG, et al, Drug-Induced Torsades de Pointes and Implications for Drug Development. Journal of Cardiovascular Electrophysiology. 2004;15: 475–495. doi:10.1046/j.1540-8167.2004.03534.x
- Free Registration Now Required for Access to QTDrugs Lists. CredibleMeds :: Common Drug-Drug Interactions. Available: <https://www.crediblemeds.org/index.php/login/dlcheck>
- Garrels W, Ivics Z, Kues WA. Precision genetic engineering in large mammals. Trends in Biotechnology. 2012;30: 386–393. doi:10.1016/j.tibtech.2012.03.008
- Giudicessi JR, Wilde AA, Ackerman MJ. The genetic architecture of long QT syndrome: A critical reappraisal. Trends in Cardiovascular Medicine. 2018;28: 453–464. doi:10.1016/j.tcm.2018.03.003
- Gong Q, Zhou Z. Nonsense-Mediated mRNA Decay of hERG Mutations in Long QT Syndrome. Methods in Molecular Biology Potassium Channels. 2017;: 37–49. doi:10.1007/978-1-4939-7362-0_4
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1980;77: 7380–7384. doi:10.1073/pnas.77.12.7380
- Gordon J, Ruddle F. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. Science. 1981;214: 1244–1246. doi:10.1126/science.6272397
- Guo J, Wang T, Yang T, Xu J, Li W, Fridman MD, et al, Interaction between the Cardiac Rapidly (IKr) and Slowly (IKs) Activating Delayed Rectifier Potassium Channels Revealed by Low K⁺-induced hERG Endocytic Degradation. Journal of Biological Chemistry. 2011;286: 34664–34674. doi:10.1074/jbc.m111.253351
- Hale, Caryn R., Peng Zhao, Sara Olson, Michael O. Duff, Brenton R. Graveley, Lance Wells, Rebecca M. Terns, and Michael P. Terns. "RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex." *Cell* 139, no. 5 (11 2009): 945-56. doi:10.1016/j.cell.2009.07.040.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology. 1981;391: 85–100. doi:10.1007/bf00656997
- Harmati Gábor, 2011, Béta-adrenerg stimuláció hatása a kutya kamrai szívműködésének késői káliumáramaira, Doktori Értekezés, Debreceni Egyetem | Általános Orvostudományi Kar Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

- Harmer SC, Wilson AJ, Aldridge R, Tinker A. Mechanisms of disease pathogenesis in long QT syndrome type 5. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2010;298. doi:10.1152/ajpcell.00308.2009
- Hiripi László, 2001, A nyúl kappa-kazein gén jellemzése, és termeltetésének hatása transzgénikus állatokban. Szent István Egyetem, Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola
- Hogan B, Costantini F, Lacy E. *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory; 1986.
- Hoffmann Orsolya Ivett, 2013, Lentivírus alapú transzgenézis és a Sleeping Beauty technológia alkalmazása transzgénikus nyulak előállításában. Szent István Egyetem, Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola
- The Human Protein Atlas. *The Human Protein Atlas*. 2018. Available: <http://proteinatlas.org/>
- III. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. *Proceedings of the Royal Society of London*. 1891;48: 457–458. doi:10.1098/rsp.1.1890.0053
- Ivics Z, Hiripi L, Hoffmann OI, Mátés L, Yau TY, Bashir S, et al, Germline transgenesis in rabbits by pronuclear microinjection of Sleeping Beauty transposons. *Nature Protocols*. 2014;9: 794–809. doi:10.1038/nprot.2014.009
- Jaenisch R, Mintz B. Simian Virus 40 DNA Sequences in DNA of Healthy Adult Mice Derived from Preimplantation Blastocysts Injected with Viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1974;71: 1250–1254. doi:10.1073/pnas.71.4.1250
- James J, Sanbe A, Yager K, Martin L, Klevitsky R, Robbins J. Genetic Manipulation of the Rabbit Heart via Transgenesis. *Circulation*. 2000;101: 1715–1721. doi:10.1161/01.cir.101.14.1715
- Janse MJ. A brief history of sudden cardiac death and its therapy. *Pharmacology & Therapeutics*. 2003;100: 89–99. doi:10.1016/s0163-7258(03)00104-9
- János Kovács. *Sejttan: egyetemi tankönyv*. ELTE Eötvös; 2008.
- Jost N, Virág László, Bitay Miklós, Takács János, Lengyel C, Biliczki Péter, et al, Restricting Excessive Cardiac Action Potential and QT Prolongation. *Circulation*. 2005;112: 1392–1399. doi:10.1161/circulationaha.105.550111
- Jost N, Papp JG, Varró A. Slow Delayed Rectifier Potassium Current (IKs) and the Repolarization Reserve. *Annals of Noninvasive Electrocardiology*. 2007;12: 64–78. doi:10.1111/j.1542-474x.2007.00140.x
- Kang C, Tian C, Sönnichsen Frank D., Smith JA, Meiler J, George AL, et al, Structure of KCNE1 and Implications for How It Modulates the KCNQ1 Potassium Channel† *Biochemistry*. 2008;47: 7999–8006. doi:10.1021/bi800875q

- Kang C, Tian C, Sönnichsen Frank D., Smith JA, Meiler J, George AL, et al, Structure of KCNE1 and Implications for How It Modulates the KCNQ1 Potassium Channel† *Biochemistry*. 2008;47: 7999–8006. doi:10.1021/bi800875q
- Kupershmidt S, Snyders DJ, Raes A, Roden DM. A K Channel Splice Variant Common in Human Heart Lacks a C-terminal Domain Required for Expression of Rapidly Activating Delayed Rectifier Current. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273: 27231–27235. doi:10.1074/jbc.273.42.27231
- Levine E, Rosero SZ, Budzikowski AS, Moss AJ, Zareba W, Daubert JP. Congenital long QT syndrome: Considerations for primary care physicians. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. 2008;75: 591–600. doi:10.3949/ccjm.75.8.591
- Lois C. Germline Transmission and Tissue-Specific Expression of Transgenes Delivered by Lentiviral Vectors. *Science*. 2002;295: 868–872. doi:10.1126/science.1067081
- Lotti SN, Polkoff KM, Rubessa M, Wheeler MB. Modification of the Genome of Domestic Animals. *Animal Biotechnology*. 2017;28: 198–210. doi:10.1080/10495398.2016.1261874
- MGI-Mouse Genome Informatics-The international database resource for the laboratory mouse. Glossary:Loss of Heterozygosity. Available: <http://www.informatics.jax.org/>
- Ma L. Characterization of a novel Long QT syndrome mutation G52R-KCNE1 in a Chinese family. *Cardiovascular Research*. 2003;59: 612–619. doi:10.1016/s0008-6363(03)00510-8
- Major P, Baczkó I, Hiripi L, Odening KE, Juhász V, Kohajda Z, et al, A novel transgenic rabbit model with reduced repolarization reserve: long QT syndrome caused by a dominant-negative mutation of the KCNE1 gene. *British Journal of Pharmacology*. 2016;173: 2046–2061. doi:10.1111/bph.13500
- Martin CA, Matthews GDK, Huang CL-H. Sudden cardiac death and inherited channelopathy: the basic electrophysiology of the myocyte and myocardium in ion channel disease. *Heart*. 2012;98: 536–543. doi:10.1136/heartjnl-2011-300953
- Mcdonald TV, Yu Z, Ming Z, Palma E, Meyers MB, Wang K-W, et al, A minK–HERG complex regulates the cardiac potassium current IKr. *Nature*. 1997;388: 289–292. doi:10.1038/40882
- Mcdonald TV, Yu Z, Ming Z, Palma E, Meyers MB, Wang K-W, et al, A minK–HERG complex regulates the cardiac potassium current IKr. *Nature*. 1997;388: 289–292. doi:10.1038/40882

- Medeiros-Domingo A, Iturralde-Torres P, Ackerman MJ. Clinical and Genetic Characteristics of Long QT Syndrome. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*. 2007;60: 739–752. doi:10.1016/s1885-5857(08)60010-9
- Melman Y. KCNE Regulation of KvLQT1 Channels Structure–Function Correlates. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2002;12: 182–187. doi:10.1016/s1050-1738(02)00158-5
- Michalkiewicz M, Michalkiewicz T, Geurts AM, Roman RJ, Slocum GR, Singer O, et al, Efficient transgenic rat production by a lentiviral vector. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2007;293. doi:10.1152/ajpheart.00060.2007
- Moreno C, Macías Á, Prieto Á, Cruz ADL, González T, Valenzuela C. Effects of n–3 Polyunsaturated Fatty Acids on Cardiac Ion Channels. *Frontiers in Physiology*. 2012;3. doi:10.3389/fphys.2012.00245
- Mouse, Rat & Cell Engineering | Find your reliable solution | genOway. Expert provider of customized genetically modified mouse, rat and cell models. Available: <https://www.genoway.com/>
- Murray CI, Westhoff M, Eldstrom J, Thompson E, Emes R, Fedida D. Unnatural amino acid photo-crosslinking of the IKs channel complex demonstrates a KCNE1:KCNQ1 stoichiometry of up to 4:4. *eLife*. 2016;5. doi:10.7554/elife.11815
- Murray CI, Westhoff M, Eldstrom J, Thompson E, Emes R, Fedida D. Unnatural amino acid photo-crosslinking of the IKs channel complex demonstrates a KCNE1:KCNQ1 stoichiometry of up to 4:4. *eLife*. 2016;5. doi:10.7554/elife.11815
- Nakajo K, Ulbrich MH, Kubo Y, Isacoff EY. Stoichiometry of the KCNQ1 - KCNE1 ion channel complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107: 18862–18867. doi:10.1073/pnas.1010354107
- National Center for Biotechnology Information. Current neurology and neuroscience reports. U.S. National Library of Medicine; Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nerbonne JM, Kass RS. Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. *Physiological Reviews*. 2005;85: 1205–1253. doi:10.1152/physrev.00002.2005
- Nicolas M-T, Demêmes D, Martin A, Kupersmidt S, Barhanin J. KCNQ1/KCNE1 potassium channels in mammalian vestibular dark cells. *Hearing Research*. 2001;153: 132–145. doi:10.1016/s0378-5955(00)00268-9
- Nishio H, Kuwahara M, Tsubone H, Koda Y, Sato T, Fukunishi S, et al, Identification of an ethnic-specific variant (V207M) of the KCNQ1 cardiac potassium channel gene in sudden unexplained death and implications from a knock-in mouse model. *International Journal of Legal Medicine*. 2009;123: 253–257. doi:10.1007/s00414-009-0321-3

- Nyikó T, Kerényi F, Szabadkai L, Benkovics AH, Major P, Sonkoly B, et al, Plant nonsense-mediated mRNA decay is controlled by different autoregulatory circuits and can be induced by an EJC-like complex. *Nucleic Acids Research*. 2013;41: 6715–6728. doi:10.1093/nar/gkt366
- Odening KE, Kirk M, Brunner M, Ziv O, Lorvidhaya P, Liu GX, et al, Electrophysiological studies of transgenic long QT type 1 and type 2 rabbits reveal genotype-specific differences in ventricular refractoriness and His conduction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2010;299. doi:10.1152/ajpheart.00074.2010
- Odening KE, Choi B-R, Liu GX, Hartmann K, Ziv O, Chaves L, et al, Estradiol promotes sudden cardiac death in transgenic long QT type 2 rabbits while progesterone is protective. *Heart Rhythm*. 2012;9: 823–832. doi:10.1016/j.hrthm.2012.01.009
- Ono K, Shibata S, Iijima T. Properties of the delayed rectifier potassium current in porcine sinoatrial node cells. *The Journal of Physiology*. 2000;524: 51–62. doi:10.1111/j.1469-7793.2000.00051.x
- Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC, et al, Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*. 1982;300: 611–615. doi:10.1038/300611a0
- Panaghie G, Tai K-K, Abbott GW. Interaction of KCNE subunits with the KCNQ1 K channel pore. *The Journal of Physiology*. 2006;570: 455–467. doi:10.1113/jphysiol.2005.100644
- Pinkert CA. *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook (Third Edition)*. Elsevier; 2014.
- Plant LD, Xiong D, Dai H, Goldstein SAN. Individual IKs channels at the surface of mammalian cells contain two KCNE1 accessory subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111. doi:10.1073/pnas.1323548111
- Primer3 Input. Primer3 Input. Available: <http://primer3.ut.ee/>
- Priori SG, Blomström-Lundqvist C, Mazzanti A, Blom N, Borggrefe M, Camm J, et al, 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death. *European Heart Journal*. 2015;36: 2793–2867. doi:10.1093/eurheartj/ehv316
- Rehwinkel J. Nonsense-mediated mRNA decay factors act in concert to regulate common mRNA targets. *Rna*. 2005;11: 1530–1544. doi:10.1261/rna.2160905
- Rizzi N, Liu N, Napolitano C, Nori A, Turcato F, Colombi B, et al, Unexpected Structural and Functional Consequences of the R33Q Homozygous Mutation in Cardiac Calsequestrin. *Circulation Research*. 2008;103: 298–306. doi:10.1161/circresaha.108.171660

- Rothenberg F, Nikolski VP, Watanabe M, Efimov IR. Electrophysiology and anatomy of embryonic rabbit hearts before and after septation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2005;288. doi:10.1152/ajpheart.00770.2004
- Salama G, London B. Mouse models of long QT syndrome. *The Journal of Physiology*. 2006;578: 43–53. doi:10.1113/jphysiol.2006.118745
- Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Specter PS, Atkinson DL, et al, Coassembly of KVLQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac IKS potassium channel. *Nature*. 1996;384: 80–83. doi:10.1038/384080a0
- Sauer AJ, Moss AJ, McNitt S, Peterson DR, Zareba W, Robinson JL, et al, Long QT Syndrome in Adults. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;49: 329–337. doi:10.1016/j.jacc.2006.08.057
- Semsarian C, Ingles J, Wilde AAM. Sudden cardiac death in the young: the molecular autopsy and a practical approach to surviving relatives. *European Heart Journal*. 2015;36: 1290–1296. doi:10.1093/eurheartj/ehv063
- Southan C, Sharman JL, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Alexander SPH, et al, The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY in 2016: towards curated quantitative interactions between 1300 protein targets and 6000 ligands. *Nucleic Acids Research*. 2015;44. doi:10.1093/nar/gkv1037
- Sugimoto T, Tanabe Y, Shigemoto R, Iwai M, Takumi T, Ohkubo H, et al, Immunohistochemical study of a rat membrane protein which induces a selective potassium permeation: Its localization in the apical membrane portion of epithelial cells. *The Journal of Membrane Biology*. 1990;113: 39–47. doi:10.1007/bf01869604
- Taconic Biosciences. Genetically Engineered Rodent Models | Precision Research Models. rodent research models. Available: <https://www.taconic.com/>
- Taconic Biosciences. Genetically Engineered Rodent Models | Precision Research Models. rodent research models. Available: <http://taconic.com/>
- Teng GQ, Zhao X, Lees-Miller JP, Quinn FR, Li P, Rancourt DE, et al, Homozygous Missense N629D hERG (KCNH2) Potassium Channel Mutation Causes Developmental Defects in the Right Ventricle and Its Outflow Tract and Embryonic Lethality. *Circulation Research*. 2008;103: 1483–1491. doi:10.1161/circresaha.108.177055
- Tranebjaerg Rg L, Bathen JR, Tyson J, Bitner-Glindzicz M. Jervell and Lange-Nielsen syndrome: A Norwegian perspective. *American Journal of Medical Genetics*. 1999;89: 137–146. doi:10.1002/(sici)1096-8628(19990924)89:3<137::aid-ajmg4>3.0.co;2-c

- Varró A, Baláti B, Iost N, Takács J, Virág L, Lathrop DA, et al, The role of the delayed rectifier component I_{Kr} in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. *The Journal of Physiology*. 2000,523: 67–81. doi:10.1111/j.1469-7793.2000.00067.x
- Veterinary Manual. Veterinary Manual. Available: <http://www.msddvetmanual.com/>
- Waldo A, Wit A. Mechanisms of cardiac arrhythmias. *The Lancet*. 1993,341: 1189–1193. doi:10.1016/0140-6736(93)91012-b
- Wu, Chi-Shin, Yu-Ting Tsai, and Hui-Ju Tsai. "Antipsychotic Drugs and the Risk of Ventricular Arrhythmia And/or Sudden Cardiac Death: A Nation-wide Case-Crossover Study." *Journal of the American Heart Association* 4, no. 2 (01, 2015). doi:10.1161/jaha.114.001568.
- Yu H, Lin Z, Mattmann ME, Zou B, Terrenoire C, Zhang H, et al, Dynamic subunit stoichiometry confers a progressive continuum of pharmacological sensitivity by KCNQ potassium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013, 110: 8732–8737. doi:10.1073/pnas.1300684110
- Zarraga IG, Zhang L, Stump MR, Gong Q, Vincent GM, Zhou Z. Nonsense-mediated mRNA decay caused by a frameshift mutation in a large kindred of type 2 long QT syndrome. *Heart Rhythm*. 2011, 8: 1200–1206. doi:10.1016/j.hrthm.2011.03.039
- Zaza A, Rosen MR. *An introduction to cardiac electrophysiology*. Harwood Academic; 2000.
- Zeng J, Laurita KR, Rosenbaum DS, Rudy Y. Two Components of the Delayed Rectifier K^+ Current in Ventricular Myocytes of the Guinea Pig Type. *Circulation Research*. 1995,77: 140–152. doi:10.1161/01.res.77.1.140

M2. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Bősze Zsuzsannának, a hosszúra nyúlt munkám során nyújtott folyamatos és nélkülözhetetlen segítséget, türelméért és mindenért, amit nehéz lenne pár sorba összefoglalni.

Hálával tartozom Dr. Hiripi Lászlónak, Dr. Gócza Elenek, Dr. Hoffmann Orsolyának, Dr. Bender Balázsnak, Dr. Bodó Szilárdnak, Kerekes Andreának és az egész NAIK Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Állatbiotechnológiai Főosztály volt és jelenlegi dolgozóinak a kísérletekben nyújtott segítségért. Szintén köszönettel tartozom Dr. Silhavy Dánielnek, Dr. Mérai Zsuzsannának és Dr. Nyikó Tündének a kutatási pályafutásom kezdetén kapott sok-sok segítségért. Továbbá köszönettel tartozom Dr. Salamon Pálnak szórakoztató, de tanító jellegű történeteieért.

Külön köszönettel tartozom családomnak, akik végig mellettem álltak és bíztak abban, hogy eljutok ideig.

Munkám az OTKA NK 104397 és az OTKA CNK 77855 pályázatok támogatásával valósult meg.

M3. ABSTRACT – ANGOL ÖSSZEFOGLALÓ

An indispensable part of hundreds of years of medical and biological development is animal tests. All vaccinations, antibiotics, transplantation surgeries and chemotherapies would not exist without preceding animal experiments as well as a lot less would be known about such diseases like malaria and small pox. Those animal tests contributed to extending life expectancy and quality of human patients as well as livestock animals and beyond that significantly increased our knowledge base. The advent of developing biotechnological methods enabled us to introduce genetic modification into the genome of model and livestock animals and hereby creating a more faithful model of monogenic human diseases than wild type counterparts. An additional advantage of mutant animals is that their molecular history is precisely known, thus more valuable results can be obtained with fewer specimens. This technological improvement has contributed to a more efficient application of 3R Animal Protection Rules and Regulations in the course of experiment planning. These regulations state that in order to accomplish ethical animal tests the number of specimens must be reduced to the minimum (Russell et Burch, 1959). The most common cause of Sudden Cardiac Death (SCD) in adult humans is ischaemic heart disease, however in significant number of cases the aetiology of SCD is not known and lethal ventricular arrhythmias are suspected in the background. Alterations in cardiac repolarization, as part of a normal adaptive response, in certain circumstances can lead to serious cardiac arrhythmias directly threatening life. Long QT syndrome (LQT) is a disorder that is characterized clinically by prolongation of the QT interval on surface ECG and increased burden of ventricular arrhythmias and SCD. All forms of the long QT syndrome involve an abnormal repolarization of the heart. LQTS can arise from mutation of one of the ion channels genes. These mutations tend to prolong the duration of the ventricular action potential (APD), thus lengthening the QT interval. There are 16 different types long QT syndromes. One of the major causes of sudden cardiac death is the torsade de pointes arrhythmia, which can be explained by long QT syndrome caused by ion channel defects. Long QT syndrome could be as well the result of reduced ability of the ion channels to substitute each other, thus increasing the duration of action potential. All forms of the long QT syndrome involve an abnormal repolarization of the heart. In order to develop novel predictive methods we need transgenic animal models whose ion channel defects are well known and characterized.

Our choice was a mutation in the slow component of the cardiac delayed rectifier current (I_{ks}) first described and published in a Chinese family with LQT5 syndrome. In cardiac myocytes, the I_{Ks} channel is a macromolecular complex composed of a poreforming α -subunit (KCNQ1) and modulatory β -subunit (KCNE1). Loss-of-function mutations within KCNE1 gene were implicated in cardiac action potential prolongation and ventricular arrhythmogenesis in LQT5. KCNE1, also

known as minK, was the first among the Kv channel accessory subunits, which was cloned from human heart. In the course of my PhD study as a first step, I constructed a mutant and wild type variant of the transgene construct carrying the human KCNE1 cDNA with the missense mutation of G52R. Then I have created transgenic mouse and rabbit founders by microinjection of the transgene construct carrying the mutant human KCNE1 cDNA under a heart specific promoter. The progenies were characterized by molecular biological methods. I confirmed tissue specific expression and have successfully isolated the mutant human and rabbit KCNE1 proteins based on their isoelectric point from the LQT5 transgenic rabbit hearts. We demonstrated an increase in the relative expression of mRNA from genes whose expression were related to the transgenic protein expression by qPCR. In the heart of transgenic animals, the levels of endogenous KCNQ1 and endogenous MYH7 mRNA increased significantly. Our *in vitro* experiments revealed that expression of a human KCNE1 protein with G52R mutation actually causes a reduced function of the IKs ion current. Data obtained in the Institute Department of Pharmacology and Pharmacotherapy (SZTE-ÁOK) proved that more accurate prediction of arrhythmias is possible with determining the variability of QT distance compared to the „traditional” measuring of increased QT distance. Our LQT5 transgenic rabbit model, increased prevalence of arrhythmias could be detected due to the decrease of repolarization reserve. It has been shown that QT variability is increased in transgenic animals than in their wild-type litter mate. Thus, the LQT5 rabbit model is suitable for developing a novel method for predicting the reduced repolarization reserve. To underline the importance of our rabbit model we initiated international co-operations with two groups in Germany and USA respectively, who already generated transgenic rabbit lines with another types of long QT syndrome. Our collaboration aims of creating and characterizing transgenic rabbit line carrying mutations in two different ion channel proteins and therefore modeling a double long QT syndrome. The double transgenic line was created and its electrophysiological characterization is currently in progress.

M4. PRIMEREK LISTÁJA

Promotert és exonokat átfogó primer

beta-MHC Promoter Forw: 5'- ACA AAG CCC AGC TCC CTA AT - 3'
 beta-MHC Promoter Rev.: 5'- GGC TGT ACC TGT AGT GAG CG - 3'

KCNE1 cDNS-t izoláló primer

KCNE1 cDNS Forw.: 5' - ATG ATC CTG TCT AAC ACC ACA GCG - 3'
 KCNE1 cDNS Rev.: 5' - TTA GCC AGT GGT GGG GTT CA - 3'

Mutagenesishez használt primer:

G52R Mutagenesis Forw: 5'- CGT CCT CAT GGT ACT GAGA TTC TTC GGC TTC TTC
 AC - 3'
 G52R Mutagenesis Rev: 5'- GTG AAG AAG CCG AAG AAT CTC AGT ACC ATG AGG
 ACG - 3'

Transzgenikus utódok kimutatásához használt, genotipizáló primer:

Nyúl Promoter Forw: 5'- GCC TCA GCC AGA ACC AGT TA - 3'
 Human cDNS Rev: 5'- GCT TCT TGG AGC GGA TGT AG - 3'

Ivar meghatározáshoz használt primer

Sexing Forw: 5'- TAT GCC CTT ATG TTC GGA GC -3'
 Sexing Rev.: 5'- CGG CTG TAA TTT ATG GTA AAG GG -3'

qPCR-hez használt primerek

KCNE1 Forw: 5'- CTA CAT CCG CTC CCA GAA ACT -3'
 KCNE1 Rev: 5'- GCT GGT TTT CAA GGA CGT AGC -3'

KCNQ1 rabbit Forw: 5'- AGG AGC TGA TCA CCA CCC TGT A -3'
 KCNQ1 rabbit Rev: 5'- ATC TGC GTA GCT GCC GAA CTC -3'

MYH7 rabbit Forw. 5'- GCCTCAGCCAGAACCAGTTA -3'
 MYH7 rabbit Rev 5'- GGC TGT ACC TGT AGT GAG CG -3'

28S rabbit Forw: 5'- GTT GTT GCC ATG GTA ATC CTG CTC AGT ACG-3'
 28S rabbit Rev: 5'-TCT GAC TTA GAG GCG TTC AGT CAT AAT CCC-3'

RPS5 rabbit Forw: 5'-TAC ATT GCG GTG AAG GAG AA-3'
 RPS5 rabbit Rev: 5'-TCA TCA TGG AGT TGG TGA GG-3'

Szövetspecifikus expresszióhoz használt primer

RT-PCR promoter exon Forw: 5'- TGA GTC CCC TTC CTC ATC TG -3'
 qPCR human KCNE1 Rev: 5'- CCG AAG AAT CTC AGT ACC -3'

Homozigóta utódokhoz használt qPCR primer

qPCR human KCNE1 Forw: 5'-TGT GGC AGG AGA CAG TTC AG - 3'
 qPCR human KCNE1 Rev: 5'- CCG AAG AAT CTC AGT ACC -3'

M5. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Nemzetközi tudományos, impakt faktoral rendelkező lapokban megjelent publikációk:

1. **Major P**, Baczkó I, Hiripi L, Odening KE, Juhász V, Kohajda Z, Horváth A, Seprényi G, Kovács M, Virág L, Jost N, Prorok J, Ördög B, Doleschall Z, Nattel S, Varró A, Bősze Z. A novel transgenic rabbit model with reduced repolarization reserve: long QT syndrome caused by a dominant-negative mutation of the KCNE1 gene. *British Journal of Pharmacology*. 2016;173: 2046–2061. doi:10.1111/bph.13500 IF: 5,49
2. Bősze Z, **Major P**, Baczkó I, Odening K, Bodrogi L, Hiripi L, Varró A. The potential impact of new generation transgenic methods on creating rabbit models of cardiac diseases. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2016;121: 123–130. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2016.05.007 IF: 3,22
3. Baczkó I, **Major P**, Juhász V, Varga R, Hornyik T, Hiripi L, Bősze Z, Varró A. LQT5 transgenic rabbits: a new model exhibiting increased cardiac repolarization instability and arrhythmia susceptibility. *Curr Res Cardiol*. 2015; 2(3): 57, page 129. IF. 0,42

Nem szorosan a disszertációhoz tartozó impakt faktoral rendelkező publikáció:

1. Nyikó T, Kerényi F, Szabadkai L, Benkovics AH, **Major P**, Sonkoly B, et al. Plant nonsense-mediated mRNA decay is controlled by different autoregulatory circuits and can be induced by an EJC-like complex. *Nucleic Acids Research*. 2013;41: 6715–6728. doi:10.1093/nar/gkt366. IF: 9,11

Nemzetközi tudományos, impakt faktoral rendelkező folyóiratban, elfogadott absztraktok

1. Castiglione A, Hornyik T, Franke G, Perez-Feliz S, **Major P**, Hiripi L, Koren G, Bősze Zs, Varró A, Brunner M, Bode C, Baczkó I, Odening K. Combined use of transgenic LQT2, LQT5 and LQT2-5 rabbit models with decreased repolarization reserve as novel tool to detect pro-arrhythmic risk. *Clinical Research In Cardiology* 2017 106:Suppl.1 Paper: V128

2. Hornyik T, Castiglione A, Franke G, Perez-Feliz S, **Major P**, Hiripi L, Koren G, Bősze Zs, Varró A, Brunner M, Bode C, Baczkó I, Odening KE, Transgenic lqt2, lqt5 and lqt2-5 rabbit models with decreased repolarization reserve as novel tools for more reliable identification of pro-arrhythmic markers. *Current Research: Cardiology- Experimental Clinical*, 2016, 3:3 p. 109.
3. **Major P**, Baczkó I, Hiripi L, Odening KE, Ördög B, Varró A, Bosze Zs. Creation and characterization of the first transgenic rabbit model of long QT5 syndrome, *Transgenic Research*, 2016 25: 2 Pp. 248-248. , 1 P.
4. Baczkó I, Juhász V, **Major P**, Kovács M, Hornyik T, Kerekes A, Hiripi L, Bősze Zs, Papp JGy, Varró A, LQT5 transgenic rabbits are characterized by increased repolarization instability and arrhythmia susceptibility. *Cardiovascular Research*, 2014 Volume 103, Issue suppl_1, 15, Pages S50, doi.org/10.1093/cvr/cvu085.2
5. Baczkó I, Juhász V, **Major P**, Kovács M, Hornyik T, Hiripi L, Bősze Zs, Varró A, A novel LQT5 transgenic rabbit model for the assessment of proarrhythmic side effects of developmental compounds, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2014, 115:Suppl1 Pp.94-95.,2 P.

Nemzetközi tudományos, impakt faktorral nem rendelkező lapokban megjelent publikációk

1. Major P., Kerekes A., Skoda G., Hiripi L., Bősze Zs. Genetically modified animals as potential genetic resources The 1st International Scientific Conference Biotechnology of Farm Animals Slovak J. Anim. Sci., 46, 2013 (4): 155-159, ISSN 1337-9984
2. Baczkó I, Juhász V., Major P., Kovács M., Hornyik T., Kerekes A., Hiripi L., Bősze Zs, Papp J.Gy., Varró A. LQT5 transgenic rabbits are characterized by increased repolarization instability and arrhythmia susceptibility. *Cardiovasc Res* 2014; 103, S50. doi:10.1093/cvr/cvu085
3. Baczkó I, Juhász V, Major P, Kovács M, Hornyik T, Hiripi L, Bosze Zs, Varró A: A novel LQT5 transgenic rabbit model for the assessment of proarrhythmic side effects of developmental compounds. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2014; 115 (Suppl. 1), 94, 303.
4. Hornyik T, Castiglione A, Franke G, Perez-Feliz S, Major P, Hiripi L, Koren G, Bősze Zs, Varró A, Odening KE, Baczkó I. Egy új, csökkent repolarizációs rezervű, dupla transzgenikus LQT2-5 nyúl model szívelektrofiziológiai jellemzése. *Cardiol Hung* 2016; Suppl. F; 46, F38.
5. Hornyik T, Castiglione A, Franke G, Perez-Feliz S, Major P, Hiripi L, Koren G, Bősze Zs,

Varró A, Brunner M, Bode C, Baczkó I, Odening KE. Combined use of transgenic LQT2, LQT5 and LQT2-5 rabbit models with decreased repolarization reserve as novel tool for pro-arrhythmia research. *European Heart Journal* 2016; 37 (Abstract Supplement), 619.

2. Hornyik T, Castiglione A, Franke G, Perez-Feliz S, Major P, Hiripi L, Koren G, Bősze Zs, Varró A, Brunner M, Bode C, Baczkó I, Odening KE. Transgenic LQT2, LQT5 and LQT2-5 rabbit models with decreased repolarization reserve as novel tools for more reliable identification of pro-arrhythmic markers. *Current Research: Cardiology* 3(3): P17, 109, 2016.

Hazai tudományos, impakt faktoral nem rendelkező lapokban megjelent publikációk

1. Major P., Bősze Zs. Varró A. A nyúl, mint modell állat; *Élet és Tudomány*, 70 évfolyam 35.szám, 2015.augusztus 28.