



SZENT ISTVÁN EGYETEM
Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

TRANSZGÉNIKUS ÁLLATMODELL ELŐÁLLÍTÁSA ÉS JELLEMZÉSE
HOSSZÚ QT SZINDRÓMA VIZSGÁLATÁRA

MAJOR PÉTER

GÖDÖLLŐ

2019

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. Bósze Zsuzsanna DSc.**
Tudományos tanácsadó, csoportvezető
Nemzeti Agrárkutatói és Innovációs Központ
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet
Állatbiotechnológiai főosztály

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI ÉS KITŰZÖTT CÉLOK

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, mint a malária vagy a himlő. Az állatkísérletek nemcsak az emberi életek megmentéséhez járulhatnak hozzá, hanem alapvető biológiai és genetikai ismereteink bővülésével a haszonállatok és a házi kedvencek élettartamát és életminőségét is javították. A genetikai és biotechnológiai módszerek fejlődése a legutóbbi időkben lehetővé tette, hogy a humán betegségek modellezésére célzottan módosított állatokat hozzunk létre. Ez a lehetőség forradalmasította az orvosi kutatásokat, mivel olyan új típusú kísérleti állatok jöttek létre, amelyek egy-egy orvosbiológiai kérdés megválaszolásához célzottan használhatók. A leggyakrabban használt kísérleti állatok szerveik felépítésétől, méretétől stb. függően más és más típusú emberi betegségek modellezésére a legalkalmasabbak. A mutáns állatok további előnye, hogy molekuláris tulajdonságaik pontosan ismertek, így részletesebb eredmények érhetők el kevesebb egyedszámmal. Ez a technológiai fejlesztés hozzájárul a 3R állatvédelmi szabályok és szabályozások hatékonyabb alkalmazásához a kísérlettervezés során. Mivel ezek a rendelkezések azt javasolják, hogy etikus állatkísérletek elvégzéséhez a kísérletben szereplő állatok számát minimálisra kell csökkenteni (Russell et Burch, 1959). Világszerte az egyik vezető halálozási ok a hirtelen szívhalál (Sudden Cardiac Death - SCD), amely évente több mint 4 millió ember halálát okozza (Silvia et al, 2015). A hirtelen szívhalál kiváltó tényezője az úgynevezett *torsade de pointes* (abnormális szívritmus), amelynek a háttérében a hosszú QT szindróma állhat. A hosszú QT-szindróma (LQT) olyan rendellenesség, amit az EKG-n a QT-intervallum meghosszabbodása jelez. A hosszú QT-szindróma minden formája a szív rendellenes repolarizációját mutatja. Az örökletes hosszú QT szindrómák egy-egy ioncsatorna-gén mutációjából származnak, ezek a mutációk hajlamosak meghosszabbítani a kamrai akciós potenciál időtartamát (APD), ezáltal növelik a QT-intervallumot. Eddig 15 különböző típusú hosszú QT szindrómát írtak le, amelyek különféle ioncsatorna mutációkra vezethetők vissza.

Az örökletes hosszú QT-szindróma által kiváltott hirtelen szívhalál megelőzéséhez a prediktív módszerek kialakításához olyan állati betegségmodellekre van szükség, amelyeken az ioncsatorna hibák ismertek és hatásuk jól mérhető. A hosszú QT-szindróma két különböző ioncsatorna mutációjának nyúlmodelljeként USA-német együttműködésben létrehozott LQT1 és LQT2 transzgenikus nyúlmodellek hasznosságát számtalan vizsgálat és következtetés bizonyítja. A laboratóriumi nyúl (*Oryctolagus cuniculus*) mint kísérleti modellnek jelentős előnyei vannak a

laboratóriumi egérrel összehasonlítva, mivel a nyúl szív elektrofiziológiai tulajdonságai sokkal közelebb állnak az emberéhez.

PhD munkám során a késleltetett egyenirányító áram lassú összetevőjének (IKs) szabályzó komponensével dolgoztunk. Az emberi szív miocitákban az IKs csatorna egy pórusképző α -alegységből (KCNQ1; Gene ID: 3784) és egy moduláló β -alegységből (KCNE1; Gene ID: 3753) áll. A KCNE1 gén, mint az IKs β -alegysége egy transzmembrán fehérjét kódol, amely összekapcsolódik a pólusképző alfa alegységgel és így az IKs csatornát képezik. A KCNE1 gén mutációi szerepet játszanak az akciós potenciál megnyúlásában és a kamrai aritmogenezisben. A KCNE1, más néven minK, az elsők között volt a Kv csatornás tartozék alegységek közül, melyeket emberi szívből klónoztak. A mi nyúlmodellünkben a KCNE1 génben létrehozott missense mutáció -egy pontmutáció következtében létrejövő aminósavcserén:G52R alapul. Ezt a mutációt először egy kínai, LQT5 szindrómától terhelt családban azonosították (Ma et al, 2003). A szívizom sok különböző típusú ioncsatornát tartalmaz, amelyek képesek helyettesíteni egymást. Ezt a helyettesítési képességet repolarizációs tartaléknak nevezzük. Az általunk létrehozott transzgénikus nyúlban a mutáns, humán KCNE1 fehérje zavart működése csökkenti a szív repolarizációs tartalékát, és érzékenyebbé teszi az aritmiák kialakulására. Egyes esetekben a QT intervallum megnyúlása nem alkalmas arra, hogy előre jelezze az aritmia kialakulását. Ezzel szemben a QT változékonysága pontosabb prognózisú módszernek találtuk, amely alkalmas lehet a csökkent repolarizációs tartalék előrejelzésére.

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 a cDNS-nek mutációt nem hordozó változatát.
2. Létrehozni a mutáns KCNE1 fehérje expressziójának ellenőrzésére alkalmas transzgénikus egér vonalat.
3. Létrehozni az LQT5 szindróma vizsgálatára alkalmas transzgénikus nyúl modellt, vizsgálni a transzgén öröklődését, vonalat alapítani.
4. A transzgén szövet specifikus expresszióját vizsgálni molekuláris biológiai módszerekkel, valamint a transzgenről átíródó fehérjét kimutatni és mennyiségét meghatározni.
5. Együttműködő partnereinkkel jellemezni az LQT5 szindróma transzgénikus nyúlmodellt elektrofiziológiai módszerekkel.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. FELHASZNÁLT ÁLLATOK

A laboratóriumi állatok a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs központ (NAIK), Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet (MBK), Állatbiotechnológiai Főosztály állatházában a mindenkor Európai Unió szabályoknak és az 1998. évi XXVIII. Tv., AZ ÁLLATOK VÉDELMEÉROL ÉS KÍMÉLETÉRŐL, 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, FVB/N egereket használtunk, mert ezek előmagjai jól láthatók, és ez kitűnően alkalmassá teszi őket pronukleusz mikroinjektálásra. Recipiens egerek a CD1 törzsbe tartoztak, mivel ezek nagy alom létszámmal és jó utódnevelő képességgel rendelkeznek. Transzgénikus nyúl előállításához 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 elektrofiziológiás 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 méréseket összesítették.

2.2. 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* DH5 α törzsében végeztük.

2.3. 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: 1x10⁶ sejt/ml.

2.4. TRANSZGÉNIKUS ÁLLAT LÉTREHOZÁSA

Kétfajta transzgén-konstrukciót hoztam létre, mind a kettő tartalmazza a nyúl β -miozin nehéz láncú gén (MYH1; Gene ID: 100125991) promóterének irányítása alatt ét vagy aaztán a humán vad típusú KCNE1 cDNS-t vagy a humán KCNE1 G52R mutáns cDNS-t és egy szarvasmarha polyA szignált. A humán KCNE1 cDNS-ében végzett hely specifikus nukleotid cserét a QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit-tel végeztem (Agilent Technology).

Először *in vitro* teszteltük, KCNQ1 pólus alkotó fehérje jelenlétében a vad típusú és a G52R-KCNE1 mutáns a konstrukciót. Ezután előmag mikroinjektálás módszerével létrehoztunk transzgénikus egeret majd a transzgénikus nyulat a mutáns transzgén konstrukcióval. Az FVBN donor egerek intramuszkulárisan, 5 NE PMSG-t majd 48 órával utána 5 NE hCG-t kaptak 8-10 hetes korban. Az embriókat az így mesterségesen ovuláltatott FVBN egerekből kimostuk, majd ezeket az embriókat mikroinjektáltuk, majd CD1 álvemhes egerekbe tettük. Ezután a transzgénikus utódokat azonosítottam az almokban genomi PCR segítségével. Két transzgénikus egér született, amelyek a transzgént örökítették az utódaiknak.

A legalább 3,5 kg testtömegű, új-zélandi donor nőtény nyulak intramuszkulárisan kaptak 120 NE PMSG-t 3-4 hónapos korban majd 72 órával a PMSG injekció után 180 NE hCG-t kaptak, majd mesterségesen termékenyítettük őket. A termékenyítés utáni napon a szuperovuláltatott nyulakból az embriókat kimostuk és mikroinjektálás után az embriókat álvemhes, recipiens állatok petevezetőjébe juttattuk endoszkópos eljárással. Az embriótranszferből született utódokat transzgénre specifikus PCR-rel azonosítottam., Az utódgenerációkban a transzgén kifejeződés szövetspecifitását RT-PCR-rel vizsgáltam, ezt követően a KCNE1 fehérje mennyiségét western blottal és izoelektromos fókuszálással határoztuk meg. Inverz nested PCR segítségével megállapítottam a transzgén beépülés helyét. A transzgén öröklődését mindkét transzgénikus fajban megfigyeltük. A szövet specifikus transzgén expressziót mindkét transzgénikus fajban különféle expressziós szinteken molekuláris biológiai módszerekkel megmértem. Továbbá a transzgénikus nyúl vonal elektrofiziológiai tulajdonságait a Szegedi Tudományegyetem Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetében vizsgálták. Az LQT2-5 kettős transzgénikus nyúlvonal elektrofiziológiai jellemzése folyamatban van a freiburgi Egyetemmel együttműködésben.

3. EREDMÉNYEK

A hosszú QT szindróma vizsgálatára már számtalan transzgénikus egérvonalat hoztak létre, a mi modellünk a világon a harmadik transzgénikus nyúl modell, amely a hosszú QT szindrómát okozó ioncsatorna mutációk által okozott tünetek elektrofiziológiai jellemzésére alkalmas. Doktori ösztöndíjas időszakom alatt megépítettem kétféle transzgén konstrukciót. Mindkét esetben a nyúl β -MHC promotert tartalmazza a transzgén konstrukció, csak a cDNS típusában tér el, mert vagy a humán vad típusú KCNE1-et vagy pedig a G52R mutációt hordozó humán KCNE1-t tartalmazza. A β -MHC-G52R-KCNE1-bGHpolyA konstrukciót használtuk fel egér és nyúl embriók mikroinjektálására, a vad típusú transzgenre az *in vitro* CHO sejteken végzett kísérletekben volt szükség..

Először CHO sejtekben *in vitro* kísérletekben hasonlítottuk össze a vad típusú és a mutációt hordozó transzgén konstrukciók működését. A kísérlet során, amikor a mutáns alegység volt a KCNQ1-hez hozzárendelve, akkor az alfa alegység a mutáns KCNE1-vel, olyan áramot eredményezett, amely nem tartalmazta az IKs jellegzetes lassú aktiválódását és az áramsűrűség is eltért a vad típusú KCNE1-t tartalmazó rendszertől. Ezzel bizonyítottuk, hogy valóban a G52R mutáció okoz problémát az ionáramban. A transzgén konstrukció *in vivo* tesztelése FVB/N egerekkel történt. A szuperovuláltatott FVB/N nőstényeket FVB/N hímekhez 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. Nyulak esetében, 497 db injektált nyúl embrió közül 466 db lett beültetve 21 db álvemhesített recipiensekbe. 38 utód (8%) született és közülük 4 utódban (10%) mutattam ki a transzgén integrációját genomi PCR segítségével. Mindkét transzgénikus fajban a szövet specifikus transzgén expressziót molekuláris biológiai módszerekkel jellemeztem. Kimutattam, hogy az IKs alfa-egységének mRNS expressziója szignifikánsan növekedett csakúgy mint a nyúl KCNE1 mRNS expressziója a transzgénikus nyúl szívben. Izoelektromos pontja alapján elválasztottuk a transzgénikus nyúl szívben a humán és nyúl KCNE1 fehérjét és meghatároztuk a humán KCNE1 fehérje mennyiségét. Ezenkívül azt találtam, hogy a biztosan homozigóta utódok nem életképesek. 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 transzgén specifikus qPCR primer segítségével a homozigóta gyanús utódokat. Homozigóta gyanúsnak tekintünk minden olyan egyedet, amelyben a transzgén relatív

expressziója legalább 1,6x nagyobb a biztosan heterozigóta kontrollhoz képest. Miután a homozigóta gyanús egyedek elérik a tenyészeret kort keresztezük őket vad típusú állatokkal és aztán a megszületett almokban megnézzük a transzgénikusok 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 tenyészerett kort vagy nem született utód a vad típusú állatokkal való keresztezésből. Továbbá a megszületett, heterozigóta utódok között a nőstények aránya is szignifikánsan kisebb, mint az elméletileg várt. A transzgénikus- vad típusú utódok arányát vizsgálva megállapítottam, hogy az elméletileg vártnál lényegesen alacsonyabb a transzgénikus utódok száma.

Az LQT5 nyulak elektrofiziológiai vizsgálataiban kimutattuk, a gyors káliumionáramot (IKr) blokkoló - dofetilid – hozzáadásával, hogy a vad típusú alomtársakhoz képest a transzgénikus nyulak repolarizációs tartaléka kisebb, ezért érzékenyebbek a szívritmus zavarok kialakulására. A dofetilid csak transzgénikus állatokban csökkentette szignifikáns mértékben a pulzusszámot. Továbbá a dofetilid jelentősen növelte a transzgénikus állatok rövid QT variabilitását (STVQT). Miközben a dofetilid mindkét csoportban hasonló QT-megnyulást eredményezett, azaz STVQT-t növelő hatása sokkal hangsúlyosabb és a transzgénikus állatokban az aritmiák száma magasabb volt.

4. KÖVETKEZTETÉSEK 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 (Bösze 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 Farmakoterápiái 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 szívizomsejtek 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 szívben. 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 fiziológias szerepeit is megismerni.

Egérben publikált adatok szerint a hosszú QT2 típusú terhelte állatok esetében 9,5 napos korig nincs eltérés a heterozigóták és homozigóták fejlődése között. 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. 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, amely során eltávolították a transzgenikus LQT2 nőstények petefészkét, 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 ösztradiol 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 modellekkel, 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 jelenek 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 transzgenézis technikák fejlődése, a gyógyszeripari és az orvosi kutatásokra is közvetlen hatással van. Ezekon a területeken a kísérleti állatok újabb és újabb típusai fognak majd létrejönni, 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.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

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

6. 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. 4.56?

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, 619.

6. 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* 2016, 3(3): P17, 109,

/

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.