

Szent István Egyetem

Mezőgazdasági- és Környezettudományi Kar

Genetika és Biotechnológiai Intézet

**Szívrítmus zavar (LQTS) létrehozása és
kialakulásának vizsgálata egérmodellben**

Készítette:

Kis Szilvia

MSc II. Évf.

Belső konzulens:

Dr. Horvainé Szabó Mária

SZIE-MKK

Külső konzulens:

Dr. Bősze Zsuzsanna

csoportvezető

és

Major Péter

PhD hallgató

Mezőgazdasági Biotechnológiai

Kutatóközpont

Gödöllő

2013.

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK.....	3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1. A szív ingerképző és ingerületvezető rendszere	5
2.2. Akciós potenciál.....	6
2.2.1. Elektrokardiográfia.....	7
2.2.2. EKG-hullám.....	8
2.3. Ioncsatornák felépítése és működése	8
2.3.1. Káliumcsatornák és káliumáramok	10
2.3.1.1. Késői káliumáram - I_K	11
2.4. KCNE-géncsalád.....	12
2.5. A bevitt génkonstrukció	12
2.6. A hosszú QT-szindróma.....	13
2.7. Repolarizációs tartalék.....	15
2.9. Transzgénikus állatok előállítás	15
2.9.1. Transzgénikus egerek előállításának módszerei.....	16
2.10. Embriónális korú letalitás vizsgálata LQT szindrómás transzgénikus egérmodellekben	17
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	19
3.1. A transzgénikus egerek előállításához felhasznált egértörzsek	19
3.2. Transzgénikus vonalak alapítása.....	20
3.3. Embrió-kinyerés és fixálás.....	20
3.4. DNS-kivonás	21
3.5. PCR-technikák alkalmazása.....	21
3.6. Q-PCR.....	22
4. EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉSEK	24
5. ÖSSZEFOGLALÁS, KÖVETKEZTETÉSEK.....	27
6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	28
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	29
8. INTERNETES HIVATKOZÁSOK.....	35
9. MELLÉKLET	36
10. NYILATKOZAT	40

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Magyarországon a leggyakoribb elhalálozási ok a hirtelen szívhalál. A Magyar Kardiológusok Társaságának nyilatkozata szerint átlagosan naponta 70, évente 20-25 000 ember hal meg hirtelen szívhalálban. A mortalitási adatok szerint annyi áldozatot szed, mint a tüdőrák, mellrák és az AIDS/HIV együttvéve.

Az ingerületvezetési rendszer károsodása hirtelen szívmegálláshoz vezethet. Az ingerület kialakulásáért a sejtek membránpotenciál-változása felelős, melyet ioncsatornák feszültségkülönbsége hoz létre. A sejtmembrán két oldala között lévő feszültségkülönbség dinamikus egyensúlyt alkot, a nyugalmi potenciált, és így a membránfelszín polarizált állapotba kerül. Ennek az egyensúlynak a megbomlása maga az ingerület. A csatornákon keresztül haladó ionáramok a sejtmembrán felületén létrejövő feszültségváltozásból kifolyólag akciós potenciált eredményeznek. Az akció potenciál két fő része a depolarizáció (a Na^+ és Ca^{2+} áramok beáramlása) és a repolarizáció (K^+ ionok kiáramlása). A szívritmus kiindulópontja ez a folyamat, mely során a sinuscsomóból az ingerület a pitvari izomsejteken keresztül a kamrai izomzatra terjed az ingerületvezető rendszer segítségével.

Az ingerképzés és az ingerületvezetés a befelé és kifelé irányuló ionáramok (I_{ion}) rendezett váltakozásának következménye. A Na^+ és Ca^{2+} -csatornák az akciós potenciál keletkezésében és fenntartásában, a K^+ -csatornák a repolarizálásban szerepelnek. A K^+ -csatorna fehérjét kódoló génnek mutációja felelős a hosszú QT szindróma kialakulásában (LQT). A csatornán kiáramló I_{K} lassabban távozik, így a repolarizáció meghosszabbodik. A repolarizációs idő megnyúlása a szívfrekvencia QT szakaszára esik. A QT-intervallum magába foglalja a kamraizomzat aktivitásának (depolarizáció és repolarizáció) teljes hosszát, megnyúlása súlyos aritmiákhoz vezethet. Az eddigi megfigyelések alapján tizenhárom gén mutációjának tulajdonítható hosszú QT szindrómát írtak le. Szerzett LQT betegség is kialakulhat gyógyszeres kezelések következtében. Felléphet *Torsade de Pointes* (TdP), mely ritka és különleges formája a polimorf kamrai tahycardiának és velejárója a LQT szindrómának, amely spontán megszűnhet és kialakulhat, illetve kamrai fibrillációhoz és hirtelen szívhalálhoz vezethet.

A kísérleteink során az említett tizenhárom típus közül a LQT5 típust vizsgáljuk, melyet az I_{Ks} ioncsatorna mutációja hoz létre. Az I_{Ks} kálium-ioncsatorna β -alegység fehérje génjének (KCNE1) egyik mutációját (G52R) egy családi örökletes LQT5 típusú betegekben azonosították. A G52R misszensz mutáció, ahol a KCNE1 gén 154. pozíciójában lévő guanin adeninre cserélődik, s így arginin (R) keletkezik a glicin (G) 52. helyén (G52R). Ennek a KCNE1 génben bekövetkező

mutációnak a modellezésére transzgénikus egereket hoztak létre munkatársaim a G52R mutációt hordozó transzgén, előmagos és lentivírus mikroinjektálásával.

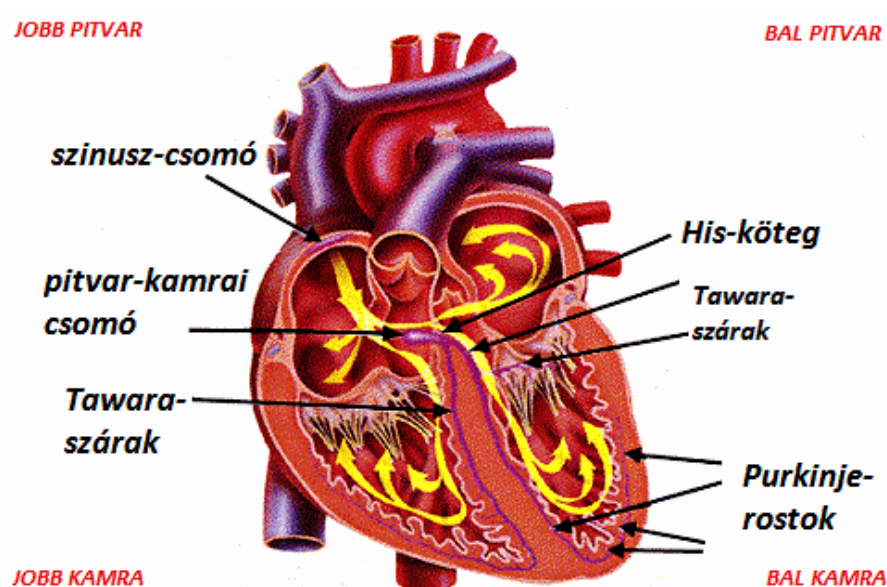
Munkám célkitűzése a két transzgénikus egérvonal genotipizálással történő kialakítása és az egyedek vizsgálata volt. Továbbá a heterozigóta szülőpárok utódainak genotipizálása és az öröklődési arány meghatározása. A homozigóta forma letálisnak bizonyult in utero, így a következő célkitűzésem az volt, hogy fejlődési stádiumokra lebontva megkeressem a pontos idejét az elhalálózásnak embrionális korban.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A szív ingerképző és ingerületvezető rendszere

A szívritmus rendszerének folyamata önálló ingerképző és ingerületvezető rendszerén alapul (BAGYÁNSZKI & FEKETE, 2006). A szív elsődleges ingerképző rendszere a sinuscsomó (*nodus sinuarterialis*, Keith-Flack-csomó), a második a pitvarkamrai AV-csomó (*nodus atrioventricularis*, Aschoff-Tawara-csomó). Az ingerületvezető rendszer részei a His-köteg, folytatásában a Tawara-szárak, és azok végein a Purkinje rostok (1. ábra).

Az emlősök szívében a ritmusgenerátor a sinuscsomó (pacemaker), mely pitvari myocytákból és kötőszövetből épül fel. Elhelyezkedése szerint a jobb pitvarban a *vena cava superior* (felső üres visszér, nagy gyűjtővéna) és *vena cava inferior* (alsó üres visszér, gyűjtővéna) beömlése és a *crista terminalis* között található. A sinuscsomóban keletkezett impulzusok összehúzódnásra készítetik a pitvart. Az elektromos impulzus a pitvari myocytákon keresztül érik el az AV-csomót (*atrioventricularis*), mely a pitvarkamrai septumban található. Folytatásában a szívsövényben elhelyezkedő His-kötegen keresztül tovább fut a Tawara-szárakon és a Purkinje-rostokon az ingerület, majd keresztülhalad a kamrai myocyták munkaizomzatán. A sinuscsomó impulzusai határozzák meg a szívritmus sebességét. (BARRETT ET AL., 2010).



1. ábra: Szív ingerületkeltő és -vezető rendszere. A nyilak az ingerület terjedésének irányát jelölik. (<http://ecg-experts.blogspot.hu>)

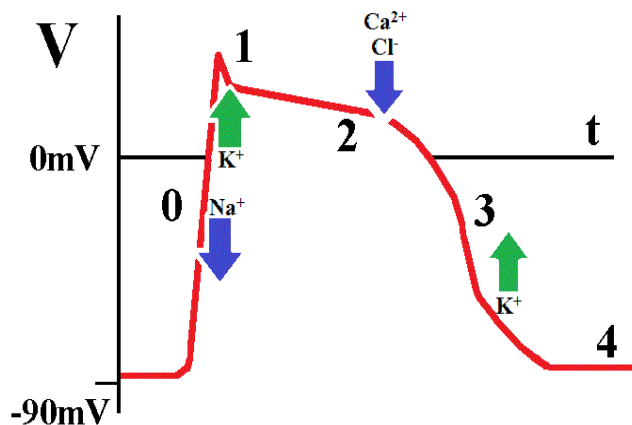
2.2. Akciós potenciál

Más ingerlékeny szövetek sejtjeihez hasonlóan a szívizomsejtek a megfelelő ingerekre sajátos potenciálváltozással válaszolnak, melyet akciós potenciálnak nevezünk (PAPP & VARRÓ, 1999). A szívsejtjeinek membránján zajló változó ionáramok feszültségváltozást idéznek elő, akciós potenciált (AP) keltenek, s ezek felelősek a ritmikus működésért. A sejtek mindenkor membránpotenciálja az adott időpillanatban a sejtmembrán két oldala közötti elektrokémiai gradiensektől, továbbá a plazmamembrán egyes ionokra vonatkozó eltérő permeabilitásától, áteresztőképességétől függ (HORVÁTH, 2009).

Az akciós potenciál alakja a különböző szívterületekben is eltéréseket mutat. Az idegi vagy vázizom akciós potenciál időtartama kb. 100-szor hosszabb a szívizomsejtek akciós potenciál időintervallumától. Ennek a szív működés szempontjából a legfontosabb következménye, hogy amikor az akciós potenciál változása befejeződik és az effektív refrakter periódus (ERP) véget ér, már a kontrakció is nagyrészt lejátszódott. Az ERP az a legrövidebb időtartam, mely a szívizomsejt akciós potenciál lezajlása után újra ingerelhetővé válik, így a hosszú repolarizációs idő és az ERP miatt a szívizom nem tetanizálható, illetve nem alakulhat ki görcsös állapot (PAPP & VARRÓ, 1999).

Nyugalmi állapotban csak azok a K^+ csatornák vannak nyitva, amelyek egyensúlyi potenciálja közel esik a nyugalmi membránpotenciálhoz. Az emlősök szívizomsejtjeiben ioncsatornák idő- és feszültségfüggő konduktancia-változásai létrehozzák az akciós potenciált (2. ábra), melynek öt fázisát különböztetjük meg:

- **0. fázis:** azaz a gyors depolarizáció, mely rendkívül sebes potenciálváltozást eredményez, s a lefolyása alatt a negatív membránpotenciál átmenetileg pozitív lesz, mivel idő-, és feszültségfüggő gyors Na^+ csatornák aktiválódnak.
- **1. fázis:** a szívizomsejt-típusok nagyobb részében egy gyors repolarizáció keletkezik.
- **2. fázis:** plató fázis, mely egy dinamikus egyensúlyi állapot, ahol a befelé áramló és kifelé áramló ionok membránpotenciálja megegyezik. A plató fázis fenntartásában főként egy lassú befelé irányuló Ca^{2+} áram felel.



2. ábra: A kamrai szívizomsejtek akciós potenciáljának fázisai. A nyilakkal jelzett ionáramok kifelé irányuló („outward”) és befelé irányuló („inward-2) áramokat jelölnek.

- **3. fázis:** a plató szakasz után egy gyorsabb repolarizáció következik, lezajlása után a membránpotenciál visszaáll az eredeti negatív értékre. A gyors repolarizációt számos ionáram együttes működése alkot (HORVÁTH, 2009).
- **4. fázis:** pacemaker, azaz spontán automáciát mutató szövetekben (sinusz-csomó, AV-sejtek, Purkinje-rostok) a repolarizáció befejeződése és az új, gyors depolarizáció között spontán, ún. lassú diastolés depolarizáció figyelhető meg.

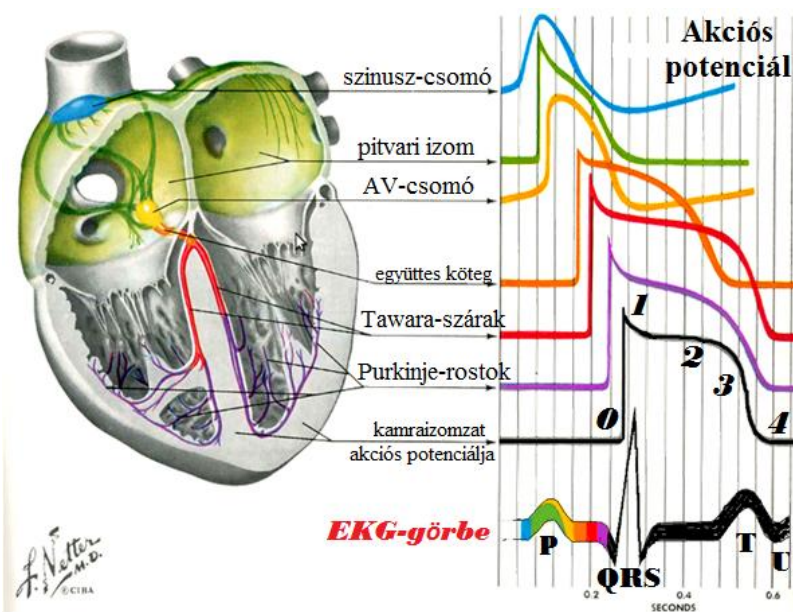
Ha a 4. fázis eléri a küszöbpotenciál-értékét, akkor tovaterjedő akciós potenciált eredményez, azaz egy újabb 0. fázisú depolarizációt. Az ingerképzés ütemét a 4. fázis diastolés depolarizációjának mértéke és meredeksége határozza meg (PAPP & VARRÓ, 1999).

Az akciós potenciál 4. fázisa (elektromos diastole) során az extranodalis szívizomsejtek, valamint a kamra sejtjének membránpotenciálja is nyugalmi értéken marad a ciklus újra kezdéséig.

2.2.1. Elektrokardiográfia

Az akciós potenciál szívizom-összehúzódást eredményez, mely a sinuscsomóból indul ki, s az ingerületvezető rendszeren áthalad. A szív működést kísérő elektromos változások a szív körül egy változó irányú és erősségű elektromos erőteret hoznak létre, amely a test felszínére terjedve, felületi elektródok és megfelelő erősítő-berendezés segítségével regisztrálható. A szívritmust, az elektromos feszültséget elektrokardiográffal vizsgálhatjuk. A testre elektródákat helyeznek fel, s az EKG segítségével egy egyedi, szabályos görbét kapunk a szív működéséről, amit a 2. ábra jobb oldalán figyelhető meg. Az EKG szakaszai a szív területeiről adnak információt (FONYÓ & LIGETI, 2008). Az EKG hullám egymáshoz viszonyított nevezetes pontjaival specifikusan jellemezhetők a szív területei.

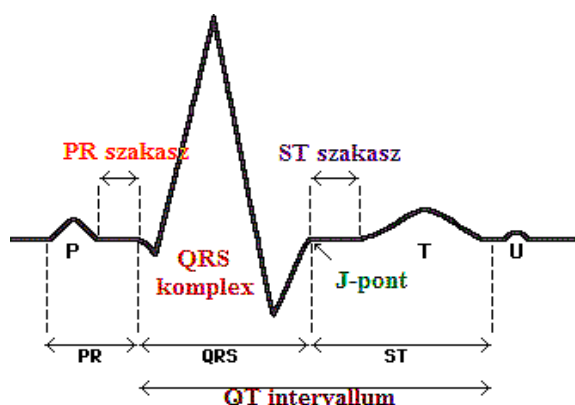
3. ábra: Jobb oldalon a szív ingerképző és vezető rendszere, bal oldalon a kamra izomzat akciós potenciáljának öt fázisa és az elektrokardiogram részei.
(www.netterimages.com)



2.2.2. EKG-hullám

Az elektrokardiográf által a szívösszehúzódnak elektromos ingerületeit mérhetjük (4. ábra). Az elektrokardiográf által mért nevezetes pontjai a következők: P, Q, R, S, T és U. A P hullám, mely a pitvari ingerületet jelzi, utána a Q, R, S a kamrai depolarizáció váltja ki, a T hullám pedig a kamrai repolarizáció hatása (HOUGHTON & GRAY, 2001). A szívizom aktivációja a sinuscsomóban kezdődik, de csekély tömege miatt EKG-hullám formájában nem jelenik meg. Ezután következik a pitvarizomzat depolarizációja, amely a pitvar-kamrai határ, illetve az AV-csomó irányába halad. Ennek mindhárom elvezetésében egy pozitív hullám, a P-hullám felel meg, amely az EKG görbe első hulláma. A P-hullám hossza azaz időtartam, mely alatt a depolarizáció a pitvaron keresztül terjed.

Az ingerület a pitvarokról az AV-csomón a His-kötegeken, a Tawara-szárazon és a Purkinje-rostokon keresztül halad a kamrák felé, s ez a mutatja a PQ-intervallumot, mely a pitvar-kamrai átvezetés ideje (3. ábra). A kamraizomzat depolarizációjának jele a QRS-komplex, amelynek amplitudója jóval nagyobb a többinél, illetve időtartama rövidebb, mint a pitvari depolarizáció (P-hullám). A QRS-komplex az izoelektromos ST-szakasz követi, mely időben a kamrai akciós potenciál plató szakaszával esik egybe, s ekkor a kamra felszíne negatív töltésű. A T-hullám már pozitív, mely a kamra repolarizációjának a jele. QT-intervallum a kamrai myocyták depolarizációjának és repolarizációjának együttes időtartama. (FONYÓ & LIGETI, 2008).

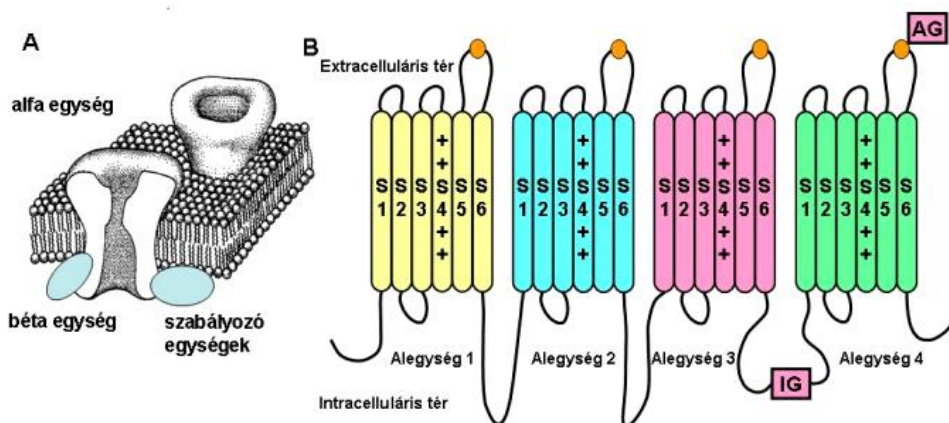


4. ábra: Az EKG-hullámok standard elnevezései

2.3. Ioncsatornák felépítése és működése

Az ioncsatornák a kettős lipidrétegű sejtmembránba beágyazott bonyolult szerkezetű fehérje struktúrák, melyek több alegységből épülnek fel. Az ioncsatornák összehangolt működésének következtében alakul ki az akciós potenciál, s felelősek az alakjáért, lefolyásáért. Az alfa alegység alkotja magát a pórust, s a járulékos működésért felelős a béta, s ioncsatornától függően a gamma

alegysége. S az ezeken a fehérjestruktúrákon keresztül haladó ionmozgások a különböző ionáramok. Az ioncsatornák nyílásához, záródásához, működéséhez nincs szükség plusz energiára, az ionok passzív mozgását a feszültségváltozás vagy valamilyen ligand kötődése okozza. Az egyes ionokra a membrán nem egyformán permeábilis. A gerincesek kamrai szívműködésében nyugalomban K^+ ionokra vonatkozóan nagy, míg Na^+ , Ca^{2+} és Cl^- ionokra nézve kicsi a membrán permeabilitása, tehát nyugalomban a K^+ ionok egyensúlyi potenciáljához esik (HORVÁTH, 2009).



5. ábra: A transzmembrán ioncsatorna sematikus grafikai ábrázolásában a gyors nátriumcsatorna (PAPP & VARRÓ, 1999)

Az fenti ábrán a gyors Na^+ csatorna sematikus illusztrációján jól látható a pórusalkotó α -egység, melyet járulékos β -egységek és szabályozó-egységek egészítenek ki. Az α -egységet további négy alegység alkotja, melyek egyenként hat transzmembrán proteinszegmensből állnak. Ezeket a szegmenseket (S) és alegységeket intracelluláris (IC) és extracelluláris (EC) proteinhurkok, ún. *loopok* kötik össze. Ezek a hurkok az EC térben a feszültségérzékelő aktivációs kaput, az IC oldalon pedig az inaktivációs kaput alkotja. A *loopok* feszültségérzékelő kapukat és gyógyszerkötőhelyeket is képezhetnek (PAPP & VARRÓ, 1999). A gyors nátriumáram (I_{Na}) az akciós potenciál gyors depolarizációjáért felelős (0. fázis).

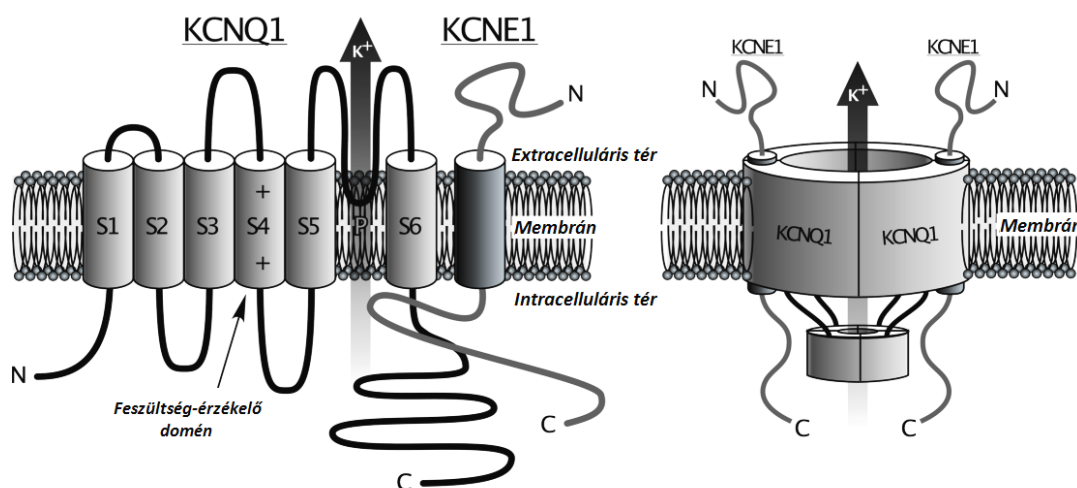
Az ioncsatornában az ionok mozgása passzív, azaz az elektrokémiai hajtóerő függvénye. Ha ezekben a struktúrákban, szegmensek vagy hurkok felépítésében mutáció lép fel, akkor működési zavarok keletkezhetnek, ilyen ioncsatorna-defektus az általunk vizsgált hosszú QT szindróma is (PAPP & VARRÓ, 1999).

2.3.1. Káliumcsatornák és káliumáramok

A káliumcsatornák expressziója nagy diverzitást mutat. A transzmembrán szegmenseik (S) száma és az ebből eredő funkcionális eltéréseknek köszönhetően három családba sorolhatjuk őket, a feszültségfüggő (K_v - 6S), befelé egyenirányító (K_{ir} - 2S) és a kétpórusú ioncsatorna (K_{2p} - 4S). A feszültségfüggő K^+ -ioncsatorna családba tartozók négy α -alegységből tevődnek össze, tetramer felépítésűek, ezen belül az egyes alegységek hat transzmembrán szegmensből állnak (NERBONNE & KASS, 2005).

Az S1-S4 szegmens a feszültségérzékelő domain, ahogy az 6. ábrán is jól látható. A pórust a négy α -alegység S5 és S6 szegmense közötti, egyenként 19 aminosavból álló összekötő régiók alkotják. A pórusformáló régió glicin-tirozin-glicin (GYG) vagy glicin-fenilalanin-glicin (GFG) motívuma a szelektivitásának szignatúrája. A pórusformáló fehérjéken kívül megtalálhatók ún. β -alegységek is, melyek az ioncsatornák szabályozásában vesznek részt (HORVÁTH, 2009).

A membránpotenciál mind systole, mind diastole során pozitívabb, mint a K^+ egyensúlypotenciálja, mely azt eredményezi, hogy a nettó K^+ áram mindig kifelé irányuló, és ezáltal a membrán repolarizációját, valamint a nyugalmi membránpotenciál fenntartását segíti elő. Lehetnek ligandvezéreltek, feszültségfüggők, és van egy csatorna, melyet „háttéráramnak” is neveznek. A legfontosabb feszültségfüggő káliumáramok a szívben a tranziens kifelé irányuló áram (I_{to}), és a késői káliumáram (I_K) komponensei: I_{K1} , I_{Ks} , I_{Kur} . Ezek az áramok meghatározó szerepet játszanak az akciós potenciál kialakításában (6. ábra) (HORVÁTH, 2009).



6. ábra: A feszültségfüggő káliumcsatornák családjába tartozó hat szegmensből áll késői egyenirányító káliumáram (I_{Ks}) ioncsatornájának sematikus ábrázolása. Az I_{Ks} áram a KCNQ1 gén által kódolt csatornafehérje és a KCNE1, mint járulékos fehérje együttes expressziója.

(MOROKUMA ET AL., 2008)

A kálium áramok szerepet játszanak a szívizomsejtek repolarizációjában. Az akciós potenciál felszálló ága (0. fázis) és a nyugalmi membránpotenciál helyreállása (3. fázis vége) között a szívizomsejtekre jellemző plató fázis (2. fázis) található. A kamrai szívizomsejtek repolarizációjában és az abban szerepet játszó áramok tulajdonságainak vizsgálata kiemelt jelentőségű a kardiológiai alapkutatásokban. A szívizomzat egyes rétegeiben az áramsűrűség eltérő. A kamrák myocardiumában a legmagasabb értéket a subepicardialis, míg a legalacsonyabbat a subendocardialis sejtrétegben mérték. Expresszióját több humorális tényező befolyásolhatja és életkor is hatással van a működésére. Az adrenerg receptorok aktiválódása csökkenti az I_{to} csatornafehérjék kifejeződését. A tranziens kifelé irányuló áram kifejeződése csökken krónikus pitvarfibrilláció, szívelégtelenség, pacemakeres kamrai ingerlés során is (HORVÁTH, 2009). A következő alfejezetben a késői kálium áramokat részletezem.

2.3.1.1. Késői káliumáram - I_K

A késői káliumáram kinetikai és egyenirányítói tulajdonságai szerint három fajtáját különböztetjük meg, mely a gyógyszerek iránti érzékenysége és intracelluláris modulációja szerint: a gyors (I_{Kr}), mely aktivációt és inaktivációt egyaránt mutat, a lassú (I_{Ks}) csupán aktivációt, míg az ún. ultragyors komponens (I_{Kur}) aktiválódása nagyon gyors, de lassan vagy egyáltalán nem inaktiválódik. A myocardiumokon észlelhető I_{Ks} áramot (6. ábra) a 11. kromoszóma rövid karján lévő KCNQ1 (K_vLQT1) gén által kódolt $K_v7.1$ csatornafehérje és a MinK, mint járulékos fehérje együttes expressziója kódol. (HORVÁTH, 2009) A veleszületett hosszú QT szindróma leggyakoribb formájáért, az 1-es típusúért (LQT1) a KCNQ1 gén mutációja felelős (WANG ET AL., 1996). A KCNE1 gén mutációi által okozott szívrendellenességeket LQT5 típusúaknak nevezzük. A KCNQ1 és KCNE1 gének által kódolt fehérje α -alegysége (K_vLQT1) és a (β -alegysége) MinK által létrehozott ionáram az I_{Ks} . A I_{Kr} áramot pedig a KCNH2 és KCNE2 gén által kódolt HERG (α -alegység) és a Mirp1 (β -alegység) vezeti (GOUAS ET AL., 2005). A késői káliumáram gyors komponensét (I_{Kr}) a csatornaalkotó $K_v11.1$ fehérjét a 7. kromoszóma hosszú karján elhelyezkedő KCNH2 (HERG) gén kódolja. A KCNH2 mutációja a hosszú QT szindróma 2. típusát (LQT2) okozhatja, míg a KCNE2 gén mutációja az LQT6 típusút. A kamrai szívizomsejtek repolarizáció és felépítő áramainak vizsgálata jelentős a kardiológiai alapkutatásokban. Bármilyen farmakológiai szer, mely gátolja a kamrai szívizomsejtek repolarizációját, megnyújtja az akciós potenciál hosszát és ezáltal szerzett QT szindrómát okozhat (HORVÁTH, 2009).

2.4. KCNE-géncsalád

A KCNE család géntermékei a kálium csatornák felépítésében töltnek be szerepet. A káliumion csatornák nélkülözhetetlen szerepet játszanak számos sejt funkcióiban, elektrofiziológiai és farmakológiai tulajdonságaiban. A KCNE1 gén egy transzmembrán fehérjét (Mink, β alegység) kódol, s a KvLQT1 génnel társulva késői egyenirányító kálium (I_K) csatornát alkot (6. ábra). Ezek a csatornák pozitív töltésű kálium ionokat szállítanak.

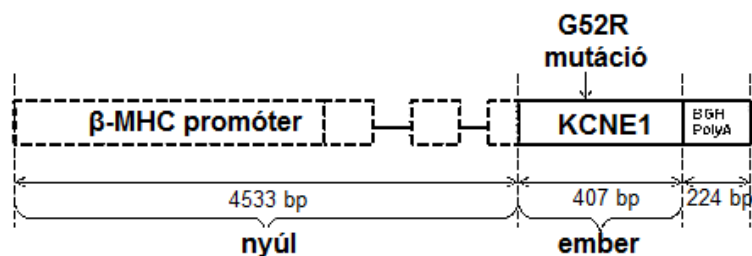
A KCNE1 (MinK) 14.5 kDa molekulatömegű fehérje. A KCNE1 fehérjét elsőként patkány vesében azonosították (TAKUMI ET AL., 1988), csak a későbbi vizsgálatokban derült ki kulcsfontosságú szerepe a szív működésében.

2.5. A bevitt génkonstrukció

Az LQT5 szindróma modellezésére az MBK, Állatbiotechnológiai Intézetében Dr Bősze Zsuzsanna és munkatársai, Dr Hiripi László és Major Péter PhD hallgató által tervezett és létrehozott transzgén felépítése az 1. számú mellékletben megtalálható.

A gén információt tároló programcsomag, amely fehérjét kódol. A természetes gén egy vagy több fehérjét kódol. (HESZKY ET AL., 2005).

A hosszú QT szindróma (LQTS) modellezésére humán KCNE1 G52R mutációját hozták létre humán cDNS bankból izolált KCNE1 cDNS-ben. A G52R pontmutáció, ahol a KCNE1 gén 154. pozíciójában lévő guanint adeninre cserélték, s így arginin (R) keletkezik a glicin (G) 52. helyén (G52R). Az eredeti mutációt MA és munkatársai írták le egy kínai családban (2003). A transzgénben szívkamra-specifikus β -MHC promóter irányítása alá helyezték a G52R mutációt hordozó humán KCNE1 cDNS-t (7. ábra).



7. ábra: A hosszú QT szindróma modellezésére létrehozott génkonstrukció G52R pontmutációval

2.6. A hosszú QT-szindróma

A veleszületett hosszú QT szindróma örökletes betegség, mely a szívizomsejtek akciós potenciáljának megnyúlásával jár, amit elektrokardiográfiával mutathatunk ki. A QT intervallum meghosszabbodását jelzi a mért elektrokardiogramon. A megnyúlt QT-intervallum fokozott kockázatot jelent a hirtelen szívhalálban és egyéb kamrai tachycardia megjelenésében. A legtöbb esetben ioncsatornákat kifejező gének mutációja áll a háttérben (1. táblázat). Az LQT szindrómának több fajtáját leírták már, a genotipizálás során valamennyinél feszültségfüggő kálium áramok mutációját vélték felfedezni. A mutáns ioncsatornák felépítését és szerkezetét már részletesen ismerjük, viszont a teljes mechanizmus megértéséhez egy átfogóbb vizsgálatra van szükség. Olyan további kutatások kellene, ahol az egyedi mutációk in vivo hirtelen szívhalálhoz vezethetnek, s ezért szükséges a modellállatok létrehozása és vizsgálata (SALAMA & LONDON, 2007).

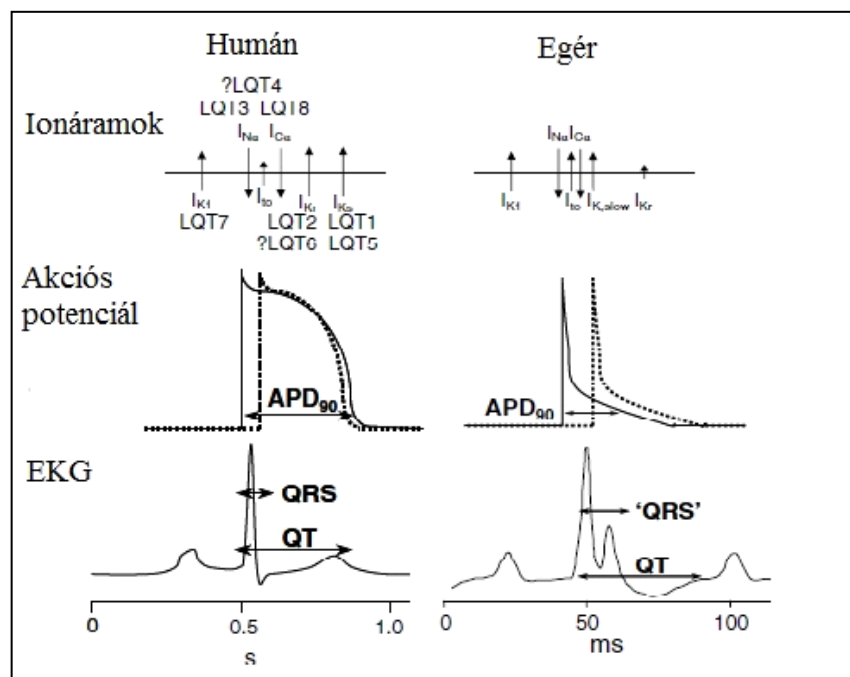
1. táblázat: A hosszú QT-szindróma típusainak modellezésére előállított transzgénikus egerek, referenciákkal kiegészítve. (SALAMA & LONDON, 2007)

Lókusz	Gén	Fehérje	Ionáramok	Referenciák
LQT1	KCNQ1	KvLQT1	↓IKs	<i>Lee et al. (2000), Casimiro et al. (2001)</i>
LQT2	KCNH2	HERG1	↓Ikr	<i>London et al. (1998), Lees-Miller et al. (2003), Teng et al. (2008)</i>
LQT3	SCN5A	Nav1.5	↑INa	<i>Nuyens et al. (2001), Tian et al. (2004)</i>
LQT4	ANK-B	Ankyrin-B	↑INa	<i>Chauhan et al. (2000)</i>
LQT5	KCNE1	MinK/IsK	↓IKs	<i>Drici et al. (1998), Kupersmidt et al. (1999), Marx et al. (2002)</i>
LQT6	KCNE2	Mirp1		
LQT7	KCNJ2	Kir2.1	↓IK1	<i>Zaritsky et al. (2001)</i>
LQT8	CACNA1	Cav1. 2		

A hosszú QT-szindróma általában egy öröklődő, autoszomális domináns betegség, de ismert szerzett változata is. Ezt a rendellenességet kálium csatornákat kódoló gének mutációja okozza. Így a defektes ioncsatornáknak a káliumáram kisebb, s a repolarizáció megnyúlik ezáltal. A megnyúlt repolarizáció az I_{Ks} és I_{Kr} áramok mutációját jelzi, mely hosszú QT fenotípust mutat. Az EKG hullám megnyúlt QT-szakasza figyelhető meg és kamrai tachycardia. Akkor beszélhetünk hosszú QT szindrómáról, amikor a megnyúlt szakasz hosszabb, mint a két R csúcs közötti távolság fele.

A szerzett LQTS-t hosszan tartó gyógyszeres kezelések, vagy anyagcsere-folyamatok zavarai okozhatják. Ez a szindróma nem okoz feltűnő betegséget, tüneteket, de növeli a szívritmuszavarokat, s hirtelen szívhalálhoz vezethet. Azok a gyógyszerek veszélyesek a leginkább melyek blokkolják azokat a káliumáramokat, melyek részt vesznek a repolarizációban. Habár az

ioncsatornák emberben és egérben konzerváltak, szignifikáns eltérések figyelhetők meg a fajok között (8. ábra). Egerek tekintetében a szívfrekvencia körülbelül tízszer magasabb, mint az emberekben, rövidebb akciós potenciálokkal. Humánban a főbb repolarizációs áramok az I_{Ks} (KCNE1, MinK) és az I_{Kr} (HERG1) (SALAMA & LONDON, 2007).



8. ábra: Szívizomsejtek hosszú QT-szindróma típusok felépítésében résztvevő ionáramok, akciós potenciál és EKG görbe összehasonlítása emberben és egérben (LONDON 2001, NERBONNE ET AL. 2001)

2.7. Repolarizációs tartalék

A szívizom repolarizációja „egy fiziológiásan túlbiztosított élettani folyamat” (PAPP & VARRÓ, 1999). Ez úgy jöhet létre, hogy a transzmembrán ioncsatornáknak nincs kizárólagos vagy különleges szerepük a repolarizációs folyamat létrehozásában. Ha egy ioncsatorna mutációja (downreguláció) mérsékelt megnyúlást idéz elő, a többi ioncsatorna kompenzálja a működésben. Ezt nevezzük repolarizációs tartaléknak (repolarization reserve) Roden munkája nyomán (RODEN, 1998, 2006). Kiemelkedő szerepe van a lassan aktiválódó káliumáramnak (I_{Ks}), mely cAMP függő ionáram. Az I_{Ks} áram nyugalmi szimpatikus tónusnál és normális hosszúságú akciós potenciál során, a relatíve lassú aktiváció miatt, kisebb mértékben aktiválódik és emiatt nem vesz részt a normális repolarizáció biztosításában. Viszont fokozott szimpatikus tónus következtében csökkenése vagy teljes kiesése veszélyes repolarizáció megnyúlás léphet fel. Ennek a megnyúlásnak lehet genetikai háttere, de lehet fellépő rendellenesség, szívelégtelenség, s gyógyszeres kezelés hatása is. A fokozott szimpatikus tónus emeli a cAMP értéket normális esetben, mely fokozza az L-típusú kalciumáramot, ami megnyújtja a repolarizációs időt. Viszont ezek hatására több I_{Ks} áram aktiválódik, ami negatív *feed-back* mechanizmussal akadályozza a repolarizáció megnyúlását. Ezért az áram gátlása akadályozza a gépezet működését. Normális szimpatikus aktivitás és cAMP szint mellett a normális repolarizáció során az I_{Ks} áram kiesése nem okoz QT megnyúlást. Viszont a fokozott szimpatikus tónus és megnövekedett cAMP szint és a már megnyúlt repolarizáció mellett az I_{Ks} áram repolarizációt impulzív védőhatása kiesik, akkor kockázatos QT megnyúlás léphet fel (PAPP & VARRÓ, 1999).

2.9. Transzgénikus állatok előállítás

Számos módszer rendelkezésre áll génmódosított állatok előállítására, melyeket kisebb nagyobb sikerrel alkalmaztak az elmúlt két évtized során. A nyolcvanas évek elején Gordon és munkatársai (1980) állították elő az első genetikailag módosított állatot, egy egeret. Az eljárás sikere új utakat nyitott meg mind az orvosi, a mezőgazdasági, mind pedig az alapkutató területén. Az idegen gén bevitelére az ún. előmag-mikroinjektációs technikát alkalmazták, mely a mai napig a leghatékonyabb módszernek bizonyult a génmódosított emlősállatok előállítására. Másik módszer a spermium közvetítésével történő génbevitel technikája, melynek hatékonysága első sikeres alkalmazása óta (LAVITRANO, 1989) sokáig igen alacsony volt. Az ES sejt technikával történő

genetikai módosítás nagy előnye, hogy célzott génbevitelt tesz lehetővé. Azonban számos fajnál, például a nyúlnál is, ahol nem állnak rendelkezésre jól jellemzett összejtvonalak a módszer nem alkalmazható. Az elmúlt néhány évben igen jelentős előrehaladás történt a retrovírus vektorral történő génbevitel terén. Az ún. harmadik generációs lentivírus vektorok igen hatékony eszközzé válhatnak a génmódosított haszonállatok előállításának során. A lentivírus vektor képes bejutni mind az osztódó, mind pedig a nem osztódó sejtekbe, ahol az általa hordozott DNS szakasz a genomba integrálódva képes a genetikai információ kifejezésére a sejt saját apparátusának felhasználásával. A módszert elsőként egérben alkalmazták 2002-ben (PFEIFER ET AL., 2002), az azóta eltelt néhány évben létrehoztak már génmódosított juhot és sertést is. Az utódgenerációkban azonban igazolták, hogy a beépült vírusvektorok egy része epigenetikus szabályozás áldozatává válik, azaz például metiláció miatt nem képes ellátni funkcióját a genomban. Ez behatárolja a módszer széles körű alkalmazhatóságát. Az igen ígéretesnek induló testi sejtes klónozásnak a legnagyobb hátulütője az igen alacsony hatásfoka. Szerke a világon számos állatfajt sikerrel klónoztak ám a hatékonyság, mely állatfajonként ugyan eltérő, nem haladja meg átlagosan a 0,5-5 százalékot. További problémát jelent, hogy az így megszületett utódoknak is mintegy a fele valamilyen rendellenességgel jön a világra. Jelenleg, leginkább a klónozáshoz használt donorsejt genetikai újraprogramozásának hibájával illetve az embrió implantációja és a méhlepény kialakulása körül zajló események rendellenességével magyarázzák az eljárás alacsony hatásfokát (PEAT & REIK, 2012).

A betegségek modellezésére létrehozott állatok örökletes rendellenességek vizsgálatára alkalmasak, s lehetőséget adnak a betegségek következményeinek tanulmányozására illetve gyógyszer kipróbálásra.

2.9.1. Transzgénikus egerek előállításának módszerei

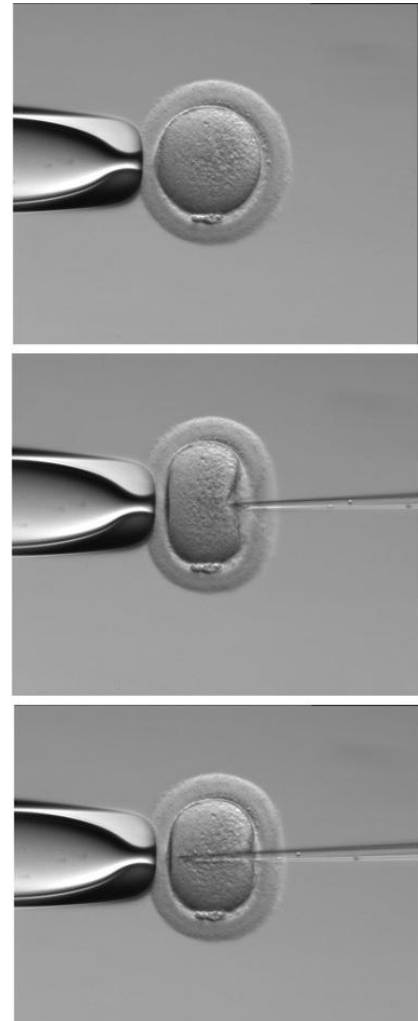
Bár először vírussal fertőzött embriók révén hoztak létre transzgénikus állatokat, az 1980-as évek elejétől kezdve a mikroinjektálás módszere vált uralkodóvá. Azonban ez az eljárás költséges, nagy jártasságot igényel és elég időigényes. Ráadásul csak néhány faj esetén éri el a kívánt hatékonyságot. Mindezen okok miatt vizsgálják a transzgénikus állatok létrehozásának alternatív módjait is (BÖSZE & GÓCZA, 2005).

A hetvenes években sikerült először retrovírust egér zigótába mikroinjektálni (JAENISCH ET AL., 1975). Az első nem virális mikroinjektálást 1980-ban hajtották végre sikeresen (GORDON ET AL., 1980). Ezután felgyorsultak az események. Az egyik legkiemelkedőbb áttörés a klónozás volt.

Dollynál már differenciálódott sejt sejtmagját ültették át petesejtbe, s életképes egyedek eredményezték a kísérlet (WILMUT ET AL., 1997).

A transzgénikus állatok előállítására jelenleg az alábbi módszereket alkalmazzák széles körben: lineáris előmag mikroinjektálás, kimérák létrehozása genetikailag módosított embrionális őssejtek felhasználásával, genetikailag módosított testi sejtek sejtmagjának átvitele klónozással, lentivírus vektorral történő génbevitel, spermiumok által történő DNS bevitel (BŐSZE & GÓCZA, 2005). Az általam is vizsgált két transzgénikus egérvonalat, előmag mikroinjektálással illetve lentivírus transzdukcióval állították elő.

Az előmag mikroinjektálás technikája terjedt el elsőként a világon (JAENISCH ET AL., 1975). A transzgenezis során a mesterségesen bevitt idegen DNS stabilan integrálódik a recipiens állat genomjába. A módszer lényege, hogy a transzgént tartalmazó DNS oldatot közvetlenül, juttatjuk a megtermékenyített petesejt előmagjába. A transzgén az injektált petesejt egy részében beépül az állat genomjába, és ezt követően annak kromoszómájával replikálódik és öröklődik (BŐSZE & GÓCZA, 2005).



**9. ábra: Mikroinjektálás
pronukleuszba**
(www.mmcri.org)

2.10. Embrionális korú letalitás vizsgálata LQT szindrómás transzgénikus egérmodellekben

A homozigóta halandósága nem vet fel új kérdéskört. Eddig is nagy figyelem összpontosult a transzgénikus állatok előállításánál az embrionális korban elpusztult homozigótákra. Az egerek E8,5 és E13,5 (embrionális) nap közötti fejlődési stádiuma megegyezik a humán 3-tól 6 hetes korig fejlődő terhességgel (SRINIVASAN ET AL., 1998). Az egerek korai embrionális korban (11,5 napon) a szív differenciálódása már mutathat rendellenességeket.

Papadatos és munkatársai (2002) kísérletében SCN5A-deficiens egeret hoztak létre, de homozigóta ($Scn5a^{-/-}$) nem született. A kísérletet arra alapozták, hogy azoknál a betegeknél, akiknél megfigyelhető deléció, vagy funkció-vesztés mutációja a szív Na^{+} -csatorna génjében, az SCN5A-ban, összefüggésbe hozhatók a szívritmuszavarok széles körével, beleértve a bradycardiát (pulzusszám lassulás), az atrioventriculáris vezetés késleltetését és a kamrai fibrillációt. Feszültségfüggő Na^{+} -csatornák az akciós potenciál kezdeti gyors depolarizációs fázisáért (0. fázis) felelősek és ebből adódóan az ingerületvezetési rendszer meghatározói. Megfigyelték, hogy a hibás SCN5A gén méhen belüli elhalálozást okoz a homozigóta ($Scn5a^{-/-}$) embriókban, míg a heterozigóta ($Scn5a^{+/-}$) embriók a mendeli-törvényeknek megfelelően születnek meg, normális túléléssel. A kifejlett $Scn5a^{+/-}$ egyedekből preparált szívműsejtek patch-clamp analízise során kiderült, hogy közel 50%-al csökkent a Na^{+} csatornák vezetőképessége.

Teng és munkatársai (2008) kutatómunkájának témája az embrionális letalitást okozó homozigóta misszensz hERG (KCNH2) kálium-csatorna mutációjának vizsgálata volt. A humán ERG1 kálium-csatorna funkció-vesztés mutáció gyakran okoz hosszú QT2 szindrómát (LQTS2). In vivo homozigóta modell kidolgozása volt a cél a mutációra. A modellt hERG N629D mutációt homológ rekombinációval hozták létre mERG ortológ egér génben, egér embrionális őssejtek által. Az N629D/N629D embriók elpusztultak 11,5 naposan a méhen belül, hirtelen szívmegállásban. További vizsgálatokkal fejlődési rendellenességeket fedeztek fel a *loopok* (hurkok) architektúráiban, gyengén fejlett *bulbus cordis* figyeltek meg. A 9,5 napos homozigóta embriók szívműsejtjeiben az I_{Kr} teljes funkció-vesztése volt megfigyelhető elhúzódó akciós potenciál intervallummal, és hajlandóság szívritmuszavarok megjelenésére.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A transzgénikus egerek előállításához felhasznált egértörzsek

Az Állatbiotechnológiai kutatócsoport által használt egértörzs két vonala, hirtelen szívhalál vizsgálatára az FVB/N és a CD1 törzs. Az FVB/n egyik legalkalmasabb egértörzs a transzgénikus kísérletekre, és az azt követő genetikai vizsgálatokra. Az FVB/N beltenyésztett (inbred) törzsre jellemző a kimagasló szaporodóképesség, a nagy alomszám. A megtermékenyített FVB/N egér petesejtjei nagy, jól látható előmaggal rendelkeznek, amely megkönnyíti a DNS mikroinjektálás technikáját (TAKETO ET AL, 1991).

Transzgénikus állat előállításához szuperovuláltatott egereket használnak. Magas, egyidejű petesejtszámot a nőstény állatok tüszőérésének mesterséges serkentésével lehet elérni, hormonkezelést kell alkalmazni. Az egészséges és megfelelő életkorú (8-10 hetes) nőstény egyedek kiválasztása után, eCG (vemhes-kanca szérum gonadotropin, más néven PMSG3) hormonnal kezelve többszörös tüszőérést következik be. Az injekciót követő második napon a tüszők repedését hCG (humán korion gonadotropin) hormonnal indukáljuk. A kiszabadult petesejtek a petevezetőből kimoshatók (*physiology.elte.hu*).

Amikor embriók kinyerése a cél, a nőstényeket a hCG injekciót követően pároztatjuk. A párosodást ellenőrizzük a következő nap délelőtt a hüvelyben a Cowper-mirigy váladék jelenlétével (plug vagy hüvelydugó képződés). Egysejtes állapotú embriókat a párosodástól számított fél nap után mosunk ki. Hiarulonidáz enzimmel eltávolítjuk az embriókat körülvevő kumulusz sejteket. Az ilyen stádiumú embrió a petevezető ampullájában található.

Mikroinjektálással bevisszük a megtervezett génkonstrukciót. A mikroinjektált embriókat beültetjük a kiválasztott recipiens nősténybe, mely hormonkezelésen átesett. CD1 egértörzs nőstényeibe ültetik be az embriókat egy egyszerű, gyors eljárással.

CD1 egértörzs széles körben használt transzgenezis, orvosbiológiai kísérletekben, nem drága és könnyen hozzáférhető kültenyésztett (outbred) egér populáció, valamint alomnevelésben is kivételesen jó. Hatékony tenyésztethetőség és nagy alomszám jellemzi. A genetikai kísérletekben az inbred törzsek előnyben vannak az outbred törzsekkel szemben, feltérképezett genetikai hátterük miatt is (ALDINGER ET AL.).

3.2. Transzgénikus vonalak alapítása

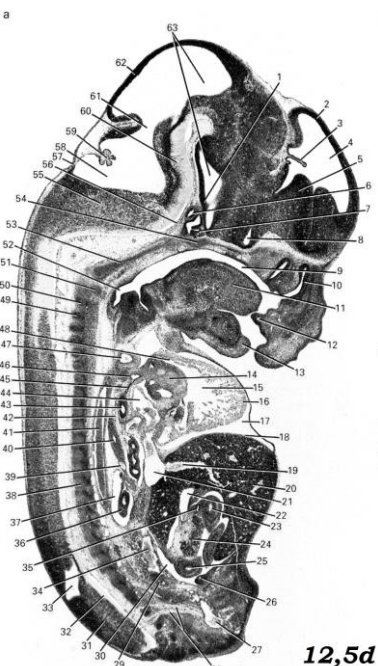
Az előmagos mikroinjektálásból illetve lentivírus injektálásból született utódok közül elsőként transzgén specifikus genomi PCR-el kell a transzgént hordozó úgynevezett alapító egyedeket kiválasztani, majd ha ezek ivaréretté válnak FVB/N egerekkel párosztatva létrehozunk az F1 utódokat. Amennyiben az alapító egér ivarsejt transzgénikus az F1 utódok között genomi PCR-el azonosítani tudjuk azokat az egyedeket, amelyek örökölték a transzgént. Mivel ezekből több almot is létre lehet hozni, egy részükben vizsgálni tudjuk a transzgén kifejeződését mRNS szinten RT-PCR módszerrel és annak szövetspecifitását (3. melléklet).

Az azonos vonalba tartozó egyedek párosztatásával pedig létre tudjuk hozni az F2 nemzedéket, amelyben a mendeli szabályok érvényesülése esetén 25%-ban homozigóta egyedek születését is várjuk. Munkám kezdetekor az F2 nemzedék megszületése és azok genetikai analízise volt napirenden.

3.3. Embrió-kinyerés és fixálás

A kísérlet során a 12,5 napos embriókat (10. ábra) egy végleges beavatkozással távolítjuk el a CD1-s recipiensekből. Kioperáljuk a méhet, és mikroszkóp alatt kibontjuk a magzattartókból az embriókat. Jegyzőkönyvet vezetünk az embriók számáról, a lehetséges felszívódásokról és rendellenességekről.

A kibontás után PBS oldatban (*Phosphate buffered saline*) vizsgáljuk őket és mintát veszünk, plate-re helyezük és feliratozzuk. Az embriókat tartalmazó lemezbe ezután 1000 µl PFA-fixálót helyezünk, a szövetek fixálására, s 4°C-on egy napig hatni hagyjuk. A PFA (*Fixing Cells with Paraformaldehyde*) erősen mérgező anyag, veszélyes anyagok használatának szabályzata szerint kell eljárni.



10. ábra: 12,5 napos neonatális korban lévő embrió (KAUFMAN, 1992)

3.4. DNS-kivonás

A PCR technikák alkalmazása előtt a DNS-t ki kell nyernünk a szövetekből, sejtekből. A mi esetünkben állati szövetekből (egérembrió farok és szikzacskó), előző nap mintát veszünk, majd 700µl Lízis-pufferben és 10µl Proteináz-K segítségével *overnight* elemésztjük a lombik rázatóban (55°C-on). Másnap fenol-kloroformkezeléssel folytatjuk a DNS izolálást. A DNS-kivonás protokollja a 2. számú mellékletben található.

3.5. PCR-technikák alkalmazása

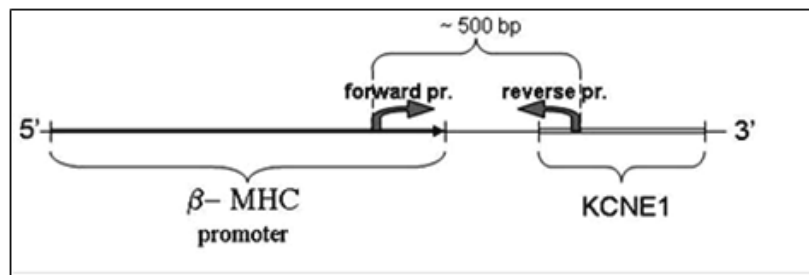
A polimeráz láncreakció (PCR: *Polymerase Chain Reaction*) a DNS egy adott szakaszának a felszaporítása in vitro. Mullis és Saiki dolgozta ki az eredeti módszert 1985-ben. DNS denaturáció, magas hőmérsékleten szétválasztjuk a DNS két szálát

1. DNS renaturáció – primerek kapcsolódása, rövid nukleotid szekvenciák
2. DNS polimerizáció: polinukleotid szintézis (dNTP a DNS „építőkövei”)
3. Ennek a három szakasznak a megismétlése 25-40 ciklusban.

Az általános PCR hőmérséklet-program szerint a denaturáció: 94°C-on 1,5 percig fut, majd a primerek megtapadás: 55-60°C-on 1 percig, és a polimerizáció: 72°C. 25-40 ciklust követően 7-10 percig tartja 72°C-on majd leállítja a reakciót 4°C-ra hűtve. A templát képzéséhez a DNS denaturációja során a két szálát összetartó hidrogén-hidakat bontjuk meg magas hőmérséklettel. A primerek a feltapadáshoz a komplementer szálakat keresik meg. Ez a folyamat függ a célkópiák számától, az időtől és tapadási hőmérséklettől, aminek az optima az olvadási hőmérséklet (T_m , *melting temperature*) (KISS, 1999).

Az általam használt primerek (11. ábra):

- Promóter 3' vég forward pr.: **5'-GCCTCAGCCAGAACCAGTTA-3'**
 - KCNE1 5' vég reverz pr: **5'-GCTTCTTGGAGCGGATGTAG – 3'**
 - Primer T_m : 56 °C
 - PCR kondíciók: kezdeti denaturáció 95 °C-on 4 percig
 - denaturáció 95 °C, 30 sec
 - annealing 54 °C, 40 sec
 - szintézis 72 °C , 45 sec
 - végső szintézis: 5 perc
- } 30X



11. ábra: A transzgén specifikus primerek elhelyezkedése a transzgén DNS konstrukció sematikus ábrázolásán

3.6. Q-PCR

A Q-PCR (quantitative, real time PCR) olyan technika, amely a PCR eljáráson alapszik, de a DNS amplifikálása mellett a mennyiséget is méri. Az amplifikált DNS mennyiségét, kópiaszámát mutatja meg valós időben való detektálással. Mi ezt a módszert használtuk a homozigóta embriók detektálására.

A Q-PCR technika a DNS-szintézis reakcióelegyének komponense egy SYBRGreen nevű, nagyon érzékeny DNS-festék. A SYBRGreen fluoreszkáló vegyület, melynek fénye könnyen detektálható, amikor kötődik a DNS-hez. A polimerizáció folytatódik, a SYBRGreen molekulák kötődnek a DNS-molekulákhoz, s növekszik a fluoreszcencia. Ez a fluoreszcencia mérhető valós időben, az DNS szintetizálódás közben, valamint a DNS mennyisége a reakcióban. Ennek a mérése egy magas érzékenyséű fotóelektron-sokszorozó detektorral vagy digitális CCD kamerával valósul meg, mely a fluoreszcencia felvillanása után a DNS mennyiségét méri minden ciklusban (RUSSELL, 2010). A Q-PCR pontosabban tudja megállapítani a kópiaszám változását, mint a Southern-blot módszer, amely autoradiogáfias intenzitásmérésekre épül. A Southern-blot vizsgálat hasznos információkat ad az integrált konstrukció szerkezeti épségéről, de csak közelítő adatokat szolgáltat a kópiaszámról (BÁNHEGYINÉ, <http://dokutar.omikk.bme.hu>). A Southern-analízis nem mutatja ki a kromoszómák megkettőződést, ha nem jár egyéb szerkezeti változással is, ha az integrált expressziós kazetta nem változik meg a duplikáció során. Ezért a Q-PCR módszerrel végzett gyors analízis segít a duplikáció kimutatásában, amely kópiaszámnövekedést okoz, de nem jár egyéb szerkezeti változással, és így a Southern-blot analízis nem mutatja ki (VANGULIDER ET AL., 2008).

Az eddig vizsgált mindhárom generációban a transzgénikus utódok aránya szignifikánsan eltér- alacsonyabb a mendeli szabályok alapján elméletileg várható 50%-tól, és a megszületett utódok egy része is elpusztult újszülött korban. Ez felvetette annak lehetőségét, hogy a

transzgénikus embriók egy része már ellés előtt elpusztul. Ennek alátámasztására további kísérletekre volt szükség.

A kópiaszám meghatározást az Applied Biosystems Power Sybr Green Master Mix segítségével végeztük az alábbi oligonukleotidok felhasználásával:

- Forw.: 5' - TGT GGC AGG AGA CAG TTC AG - 3'
 - Rev.: 5' - CCG AAG AAT CTC AGT ACC ATG A - 3'
 - PCR kondíciók:
 - PCR kondíciók: kezdeti denaturáció 95 °C-on 10 percig
 - denaturáció 95 °C, 15 sec
 - annealing+szintézis 60 °C, 60 sec
- } 40X

Az normalizációs kontrollnak az egér (P47757 kódszámú) aktin génjét használtuk. A kapott Q-PCR adatokat a RotorGene 6 programmal értékeltük ki.

4. EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉSEK

A hosszú QT5 szindróma modellezése és további hisztológiai, farmakológiai vizsgálatai elősegíthetik a KCNE1 csatornafehérjének jobb megismerését. A KCNE1 gén G52R mutációja, egy kínai családban leírt mutáció (MA ET AL., 2003), amely 154. pozíciójában lévő guanin adeninre történő cserélődését jelenti, ami a KCNE1 gén 52. helyén lévő glicin (G) változását okozza argininre (R). A transzgenézissel bevitt humán mutáns KCNE1 (minK) gén a szövetspecifikus β -MHC promóter irányítása alatt beépül a genomba és tovább örökíti a transzgenikus modellállat utódaiba. Major Péter korábbi vizsgálatai szerint a megszületett egyedek genotípusait a 2. táblázatban tüntettem fel.

2. táblázat: A megszületett utódok genotipizálásának eredménye

Átlagos alomméret heterozigóta szülőktől:	5,7/alom
Az utódok heterozigóta eloszlása /elvárt: 75% /	28%
Összes újszülött:	55
Transzgenikus újszülött:	16
Átlagos alomméret lentivírus heterozigóta és vad típusú szülőktől:	7,3/alom
Az utódok heterozigóta eloszlása /elvárt: 25% /	32%
Összes újszülött:	69
Transzgenikus újszülött:	21
Átlagos alomméret pronukl. mikroinjektált heterozigóta és vad típusú szülőktől:	8,1/alom
Az utódok heterozigóta eloszlása /elvárt: 25% /	25,20%
Összes újszülött:	210
Transzgenikus újszülött:	52

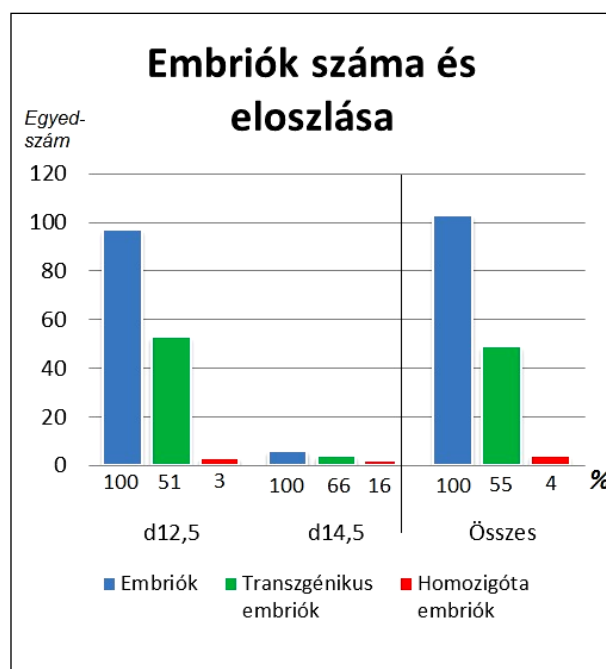
3. táblázat: Embriók eloszlása heterozigóta és homozigóta forma szerint

Fejlődési stádium	Embriók száma	Transzgenikus embrió (db)	Arány (%) Mendel: 75%!	Homozigóta embriók (db)	Arány (%) Mendel: 25%!
d12,5	97	53	54,6	3	3,0
d14,5	6	4	66,6	1	16,6
Σ	103	57	55,3	4	3,9

A heterozigóta szülőktől származó utódok között lényegesen alacsonyabb számban kaptunk transzgenikus utódokat mint az a mendeli törvények alapján várható volt, ezért feltételeztük, hogy a

homozigóta transzgénikus egerek csökkent életképességűek. Ezért a tudományos diákköri dolgozatom következő célkitűzéseként prenatális korban embriókat genotipizáltam. Az első vizsgálatokat 14,5 napos embriók mintáival kezdtük, sikeresen, hiszen homozigóta egyedet is sikerült azonosítani. Így egy korábbi fejlődési stádiumot pályáztunk meg, a szívkamra kifejlődésének időszakát a 12,5 napos embrionális kort. Az eredményem 103 embrióból 57 transzgénikus, ebből 53 heterozigóta és 4 homozigóta egyed (3. táblázat).

Korábbi és új eredmények összevetése után a 3. táblázatban lévő adatokat kaptuk, amit a 11. ábrán, diagramon összesítettem az embriók száma alapján. A 12,5 napos embriók 54,6%-a volt transzgénikus, s ebből csupán 3% homozigóta Q-PCR meghatározással. A mendeli öröklődés szabályaihoz viszonyítva 12%-al kevesebb transzgénikus és 22%-al kevesebb homozigóta egyedet találtunk ebben a fejlődési stádiumban.



11. ábra: Az embriók száma lebontva neonatális 12,5 és 14,5 napos korra, s a harmadik oszlopcsoportban az összesített arányok láthatók.

Ezeket az eredményeket tovább bontottam a két transzgénikus vonalra, még pedig a lentivírus-közvetítette és az előmagos-mikroinjektálás transzgenezissel létrehozott vonalakra (4. táblázat). Kiderült az eredményekből, hogy kizárólag az előmagos-mikroinjektálás transzgénikus vonalában találtunk homozigóta egyedet a prenatális 12,5 napos korban. A különbség a két különböző integrációs hely miatt alakulhatott ki. A lentivírus közvetítette transzgénikus vonalnál

4. táblázat: A két transzgénikus vonal összehasonlítása

Transzgénikus vonalak	Embriók száma	Transzgénikus egyedek száma és aránya	Homozigóta egyedek száma és aránya
A	52	36 (69%)	4 (9%)
B	51	21 (41%)	0 (0%)
Σ	103	57 (55%)	4 (7%)

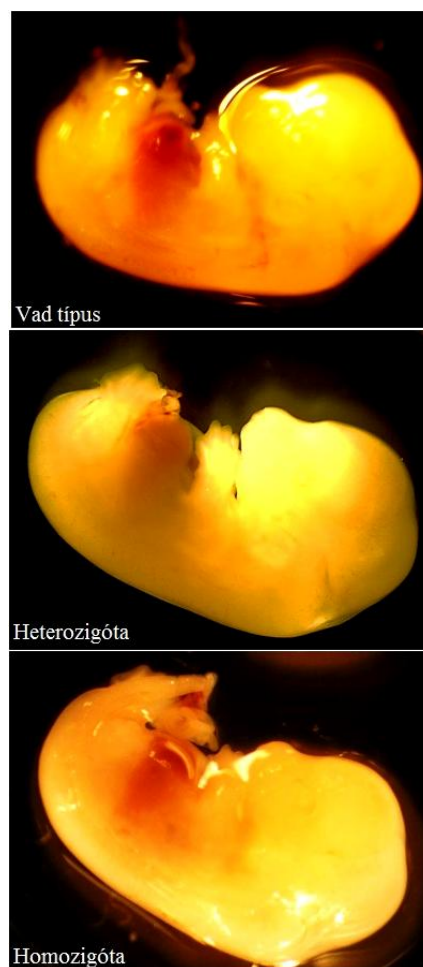
pozíció hatás miatt lépett fel egy korábbi fejlődési stádiumban a mutáns gén letális hatása, máshol integrálódott a genomban.

Egy korábbi hosszú QT-szindróma vizsgálatánál Teng és munkatársai (2008) az LQT2-típusú betegséget modellezték, ahol életképes homozigóta formát 11,5 napos embrionális korban már nem találtak, míg a mi eredményeink szerint 12,5 naposan 3%-ban vannak jelen homozigóták, s egy 14,5 napos fejlődési stádiumú homozigóta embrió is életképesnek bizonyult. A mutáció érvényesülése csak később jelentkezett.

A homozigóta embriók fejlődésében morfológiai különbséget nem találtunk sztereo mikroszkópos megfigyelés során, melyről fényképeket készítettünk és a 12. ábrában szemléltetünk.

Eredményeink bizonyítják, hogy a homozigóta utódok már ebben a fejlődési szakaszban is a vártnál lényegesen kisebb számban életképesek és alapjául szolgálnak a genotipizált G52R mutáns egér embriók hisztológiai vizsgálatának, mely hozzájárulhat a mutáció a szív fejlődése során betöltött szerepe jobb megértéséhez. A hosszú QT5-szindróma modellállatok szív elektrofiziológiai mérései is folyamatban vannak.

További terveim között szerepel, hogy korábbi fejlődési stádiumban lévő embriókat is genotipizáljak, s meghatározzam az öröklődési arányokat. Valamint megkeresni azt a stádiumot, mikor az öröklődési arányok még követik a szabályokat, s az embriók fejlődését sem blokkolja a gén mutációja.



12. ábra: A 12,5 napos prenatalis korban lévő homozigóta, vad típusú és heterozigóta embriók vizsgálata sztereo mikroszkóp segítségével.

5. ÖSSZEFOGLALÁS, KÖVETKEZTETÉSEK

Magyarországon a leggyakoribb elhalálozási ok a hirtelen szívhalál. A Magyar Kardiológusok Társaságának nyilatkozata szerint átlagosan 70 ember hal meg naponta hirtelen szívhalálban. Az elhalálozási adatok szerint annyi áldozatot szed, mint a tüdőrák, mellrák és az AIDS/HIV együttvéve.

Az ingerület kialakulásáért a sejtek membránpotenciál-változása felelős, melyet ioncsatornák működése hoz létre. A sejtmembrán két oldala között lévő feszültségkülönbség egy dinamikus egyensúlyt alkot, mely nyugalmi potenciált jelent, és így a membránfelszín polarizált állapotba kerül. Ennek az egyensúlynak a megbomlása maga az ingerület, a felszín depolarizálódik, ingerület keletkezik, s ezt nevezik akciós potenciálnak, s így a csatornákon keresztül haladó ionáramok a sejtmembrán felületén létrejövő feszültségváltozásból kifolyólag akciós potenciált eredményeznek. A szívritmus kiindulópontja ez a folyamat, mely a sinuscsomóból az ingerület a pitvari izomsejteken keresztül a kamrai izomzatra áterjed az ingerületvezető rendszer segítségével.

A kálium-ioncsatorna β alegység fehérje génjének (KCNE1) mutációját (G52R) írták le családi örökletes hosszú QT szindrómás betegekben. Ez a mutáció a repolarizációs időt nyújtja meg a szívizomsejtekben, pontosabban a szívfrekvencia QT szakaszát. A G52R misszensz mutáció, ahol a KCNE1 gén 154. pozíciójában lévő guanin adeninre cserélődik, s így arginin (R) keletkezik a glicin (G) 52. helyén (G52R).

A kísérletek célja egy olyan modell létrehozása volt, melyben a mutáns humán fehérje is kifejeződik szívspecifikusan egérben. Két transzgénikus vonalat hoztunk létre, mindkettőben ki tudtuk mutatni a transzgén mRNS szívizom-specifikus expresszáldást. Tenyésztési adatainkból kiderült, hogy homozigóta G52R transzgénikus egér nem születik a heterozigóta szülőpároktól, tehát nem életképes. A heterozigóta egerek viszont nem mutatnak az LQT szindrómára jellemző fenotípust. Célkitűzésem volt a heterozigóta szülőpároktól származó utódok embrionális korban történő vizsgálata és a génmutáció okozta problémák, megállapítva a transzgénikus embriók genotípusát illetve egy következő lépésben a transzgén kópiaszámát, heterozigóta/homozigóta arányokat határozzunk meg. Kvantitatív PCR-rel az összes transzgénikus embrió közül csak 4,5% volt a homozigóták aránya.

Az eredményeink alapját képezik a genotipizált G52R mutáns egér embriók hisztológiai vizsgálatának.

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozok a lehetőségért, hogy a Tudományos Diákköri dolgozat elkészítéséhez szükséges kísérleteket a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Állatbiotechnológiai Intézet laboratóriumában végezhettem.

A dolgozat elkészítésében nyújtott szakmai segítségéért szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek Dr. Bösze Zsuzsannának és Dr. Horvainé Szabó Máriának, valamint Dr. Gócza Elennek jó tanácsaiért.

Köszönöm Major Péternek, PhD hallgatónak a gyakorlati módszerek elsajátításában végzett segítségéért és hasznos ötleteiért, és hálával tartozom végtelen türelméért.

Külön köszönöm Skoda Gabriellának, PhD hallgatónak, valamint Dr. Bodó Szilárdnak a dolgozatom építő jellegű kritikáit.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- ALDINGER K. A., SOKOLOFF G., ROSENBERG D. M., PALMER A. A., MILLEN K. J.** (2009): Genetic Variation and Population Substructure in Outbred CD-1 Mice: Implications for Genome-Wide Association Studies, *PLoS ONE* 4(3): 4729
- BAGYÁNSZKI M., FEKETE É.,** (2006): Összehasonlító állatszervezettani előadások, JATEPress, Szeged, pp. 193-200
- BARRETT K., BROOKS H., BOITANO S., BARMAN S.** (2010): Ganong's Review of Medical Physiology, 23rd Edition, The McGraw-Hill Companies, pp. 489-586
- BŐSZE ZS., GÓCZA E.** (2005): Transzgénikus haszonállatok előállításának lehetőségei és céljai. In: **HESZKY L., FÉSÜS L., HORNOK L.:** Mezőgazdasági biotechnológia, Agroinform Kiadó pp. 264-286
- CASIMIRO M. C., KNOLLMANN B. C., EBERT S. N., VARY J. C. JR, GREENE A. E., FRANZ M. R., GRINBERG A., HUANG S. P. & PFEIFER K.** (2001): Targeted disruption of the *Kcnq1* gene produces a mouse model of Jervell and Lange-Nielsen Syndrome, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2526–2531.
- CHAUHAN V. S., TUVIA S., BUHUSI M., BENNETT V. & GRANT A. O.** (2000): Abnormal cardiac Na⁺ channel properties and QT heart rate adaptation in neonatal ankyrinB knockout mice, *Circ Res* 86: 441–447.
- DRICI M. D., ARRIGHI I., CHOUABE C., MANN J. R., LAZDUNSKI M., ROMÉY G. & BARHANIN J.** (1998): Involvement of IsK-associated K⁺ channel in heart rate control of repolarization in a murine engineered model of Jervell and Lange-Nielsen syndrome, *Circ Res* 83: 95–102.
- FONYÓ A., LIGETI E.** (2008): Az orvosi élettan tankönyve, 4. kiadás, Medicina Könyvkiadó Rt.

GORDON J. W., SCANGOS G. A., PLOTKIN D. J., BARBOSA J. A., RUDDLE F. H. (1980): Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77(12):7380-4.

GOUAS L., NICAUD V., BERTHET M., FORHAN A., TIRET L., BALKAU B., GUICHENEY P. AND THE D.E.S.I.R. STUDY GROUP (2005): Association of KCNQ1, KCNE1, KCNH2 and SCN5A polymorphisms with QTc interval length in a healthy population, *Nature/EJGH* 13: 1213–1222

HESZKY L., FÉSÜS L., HORNOK L.: Mezőgazdasági biotechnológia, Agroinform Kiadó pp., 264-286

HORVÁTH B. (2009): Káliumáramok szerepe kutya bal kamrai szívizomsejtek repolarizációjában, Egyetemi Doktori (Ph.D) értekezés, pp. 5-19

HOUGHTON A. R., GRAY D. (2001): Az EKG helyes értelmezése, Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, pp. 17-20

JAENISCH R., FAN H., CROKER B. (1975): Infection of preimplantation mouse embryos and of newborn mice with leukemia virus: tissue distribution of viral DNA and RNA and leukemogenesis in the adult animal, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72(10): 4008-12

KAUFMAN M. H. (1992): The Atlas of Mouse Development, University of Edinburgh, *Elsevier Academic Press*, pp. 172-175

KISS E., (1999): Növényi molekuláris genetika, egyetemi jegyzet pp. 88-100

KUPERSHMDT S., YANG T., ANDERSON M. E., WESSELS A., NISWENDER K. D., MAGNUSON M. A. & RODEN D. M. (1999): Replacement by homologous recombination of the minK gene with lacZ reveals restriction of minK expression to the mouse cardiac conduction system, *Circ Res* 84: 146–152.

LAVITRANO M., CAMAIONI A., FAZIO VM, DOLCI S, FARACE MG, SPADAFORA C. (1989): Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice, *Cell.* 57(5):717-23.

LEE M. P., RAVENEL J. D., HU R. J., LUSTIG L. R., TOMASELLI G, BERGER R. D., BRANDENBURG S. A., LITZI T. J., BUNTON T. E., LIMB C., FRANCIS H., GORELIKOW M., GU

- H., WASHINGTON K., ARGANI P., GOLDENRING J. R., COFFEY R. J. & FEINBERG A. P.** (2000): Targeted disruption of the *Kvlqt1* gene causes deafness and gastric hyperplasia in mice, *J Clin Invest* 106: 1447–1455
- LEES-MILLER J. P., GUO J., SOMERS J. R., ROACH D. E., SHELDON R. S., RANCOURT D. E. & DUFF H. J.** (2003): Selective knockout of mouse ERG1 B potassium channel eliminates IKr in adult ventricular myocytes and elicits episodes of abrupt sinus bradycardia, *Mol Cell Biol* 23: 1856–1862.
- LONDON B., PAN X-H., LEWARCHIK C. & LEE J. S.** (1998): QT interval prolongation and arrhythmias in heterozygous *Merg1*-targeted mice, *Circulation* 98: 51-56.
- MA L., LIN C., TENG S., CHAI Y., BAHRING R., VARDANYAN V., LI L., PONGS O., HUI R.** (2003): Characterization of a long QT syndrome mutation G52R-KCNE1 in a Chinese family, *Cardiovascular Research* 59: 612-619
- MARX S. O., KUROKAWA J., REIKEN S., MOTOIKE H., D'ARMIENTO J., MARKS A. R. & KASS R. S.** (2002): Requirement of a macromolecular signaling complex for β adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel, *Science* 295: 496–499
- MOROKUMA J., BLACKISTON D. & LEVIN M.** (2008): KCNQ1 and KCNE1 K⁺ Channel Components are Involved in Early Left-Right Patterning in *Xenopus laevis* Embryos, *Cell Physiol Biochem* 21:357-372
- NEAL A. M., TAYLOR H. C., MILLAR I.D., KIBBLE J. D., WHITE S. J. & ROBSON L.** (2011): Renal defects in KCNE1 knockout mice are mimicked by chromanol-293B in vivo: identification of a KCNE1-regulated K⁺ conductance in the proximal tubule, *J Physiol* 14: 3595-3609
- NERBONNE J. M. & KASS R. S.** (2005): Molecular Physiology of Cardiac Repolarization, *Physiol Rev* 85: 1205-1253
- NUYENS D., STENGL M., DUGARMAA S., ROSSENBACKER T., COMPERNOLLE V., RUDY Y., SMITS J. F., FLAMENG W., CLANCY C. E., MOONS L., VOS M. A., DEWERCHIN M., BENNDORF K., COLLEN D., CARMELIET E. & CARMELIET P.** (2001): Abrupt rate accelerations or premature beats cause life-threatening arrhythmias in mice with long-QT3 syndrome, *Nat Med* 7(9): 1021–1027.

ÖRDÖG B. (2009): Expression and Function of the Potassium Channels of the Human Heart, PhD thesis, Szeged

PAPADATOS G. A., WALLERSTEIN P. M. R., HEAD C. E. G., RATCLIFF R., BRADY P. A., BENNDORF K., SAUMAREZ R. C., TREZISE A. E. O., HUANG C. L. H., VANDERBERG J. I., COLLEDGE W. H. AND GRACE A. A. (2002): Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*, *PNAS* 99: 6210-6215

PAPP GY., VARRÓ A. (1999): A szívritmuszavarok keletkezésének celluláris elektrofiziológiai alapjai. In **FAZEKAS T., PAPP GY., TENCZER J., VARRÓ A.** ; Klinikai szív elektrofiziológia és aritmiológia, 2. fejezet, Akadémia kiadó

PEAT J.R., REIK W. (2012): Incomplete methylation reprogramming in SCNT embryos, *Nat Genet* 44(9): 965-6

PFEIFER A., IKAWA M., DAYN Y., VERMA I. M. (2002): Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(4): 2140-5.

PONGS O. AND SCHWARZ J. R. (2010): Ancillary subunits associated with voltage-dependent K^+ -channel, *Physiol Rev* 90: 755-796.

RODEN D. M. (1998): Taking the idio out of idiosyncratic – predicting torsades de pointes, *Pacing Clin Electrophysiology* 21:1029-1034

RODEN D. M. (2006): Long QT syndrome: reduced repolarization reserve and the genetic link, *J Intern Med* 259: 59-69

ROYER A., VAN VEEL T. A. B., BOUTER S. L, MARIONNEAU C., GRIOL-CHARRHBILI V., LEONI A.-L., STEENMAN M., VAN RIJEN H. V. M., DEMOLOMBE S., GODDARD C. A., RICHER C., ESCOUBET B., JARRY-GUICHERD T., COLLEDGE W. H., GROS D., DE BAKKER J. M. T., GRACE A. A., ESCANDE D. AND CHARPENTIER F. (2012): Mouse model of *Scn5a*-linked hereditary Lenegre's disease. Age-related conduction slowing and myocardial fibrosis, *Circulation* 111: 1737-1746

RUSSELL P. J. (2010): IGenetics. A molecular approche, *Benjamin-Cummings Publishing Company*, pp. 264-270

- SALAMA G., LONDON B.** (2007): Mouse models of long QT syndrome, *J Physiol* 578.1: 43–53
- SEEBOHM G., STRUTZ-SEEBOHM N., URECHE O. N., HENRION U., BALTAEV R., MACK A. F., KORNYCHUK G., STEINKE K., TAPKEN D., PFEUFER A., KAAB S., BUCCI C., ATTALI B., MEROT J., TAVARE J. M., HOPPE U. C., SANGUINETTI M. C. AND LANG F.** (2008): Long QT syndrome-associated mutations in KCNQ1 and KCNE1 subunits disrupt endosomal recycling of IKs channel, *Circ Res* 103: 1451-1457
- SRINIVASAN S., BALDWIN H. S., ARISTIZABAL O., KWEE L., LABOW M., ARTMAN M., TURNBULL D. H.,** (1998): Noninvasive, In Utero Imaging of Mouse Embryonic Heart Development With 40-MHz Echocardiography, *Circulation* 98: 912-918
- TAKETO M., SCHROEDER A. C., MOBRAATEN L. E., GUNNING K. B., HANTEN G., FOX R. R., RODERICK T. H., STEWART C. L., LILLY F. AND HANSEN C. T.** (1991): FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 15;88: 2065–2069.
- TAKUMI T., OHKUBO H. AND NAKANISHI S.** (1988): Cloning of membrane protein that includes a slow voltage-gated potassium current, *Science* 242: 1042-1045.
- TENG G. Q., ZHAO X., LEES-MILLER J. P., QUINN R., Li P., RANCOURT D. E., LONDON B., CROSS J. C. AND DUFF H. J.** (2008): Homozygous missense N269D hERG (KCNH2) potassium channel mutation causes development defects in the right ventricle and its outflow tract and embryonic lethality, *Circ Res* 103: 1483-1491
- TIAN, X. L., YONG, S. L., WAN, X., WU, L., CHUNG, M. K., TCHOU, P. J., ROSENBAUM, D. S., VAN WAGONER, D. R., KIRSCH, G. E., AND WANG, Q.** (2004): Mechanisms by which SCN5A mutation N1325S causes cardiac arrhythmias and sudden death in vivo, *Cardiovasc. Res* 61: 256–267
- VANGUILDER H. D., VRANA K. E., FREEMAN W. M.** (2008): Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis, *BioTechniques* 44: 619-626
- WANG Q., CURRAN M. E., SPLAWSKI I., BURN T. C., MILLHOLLAND J. M., VANRAAY T. J., SHEN J., TIMOTHY K. W., VINCENT G. M., DE JAGER T., SCHWARTZ P. J., TOUBIN J. A., MOSS A. J., ATKINSON D. L., LANDES G. M., CONNORS T. D., KEATING M. T.** (1996):

Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias, *Nat Genet* 12: 11-23

WILMUT, I., SCHNIEKE, A.E., MCWHIR, J., KIND, A.J., CAMPBELL, K.H. (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, *Nature* 385: 810-813

ZARITSKY J. J., REDELL J. B., TEMPEL B. L. & SCHWARZ T. L. (2001): The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K⁺ current (IK1) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes, *J Physiol* 533: 697–710.

8. INTERNETES HIVATKOZÁSOK

http://www.vital.hu/hirtelen_szivhalal_szivroham_defibrillator

<http://ecg-experts.blogspot.hu/2009/11/cardiac-conduction-system.html>

<http://www.netterimages.com/image/15615.htm>

http://physiology.elte.hu/gyakorlat/szakirany/Egerek_szuperovulaltatasa_genotipizalasa.pdf

http://dokutar.omikk.bme.hu/collections/mgi_fulltext/bio/2002/10/1005.pdf

<http://www.termesztvilaga.hu/szamok/tv2006/tv0603/ordog.html>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S09594440X11000029>

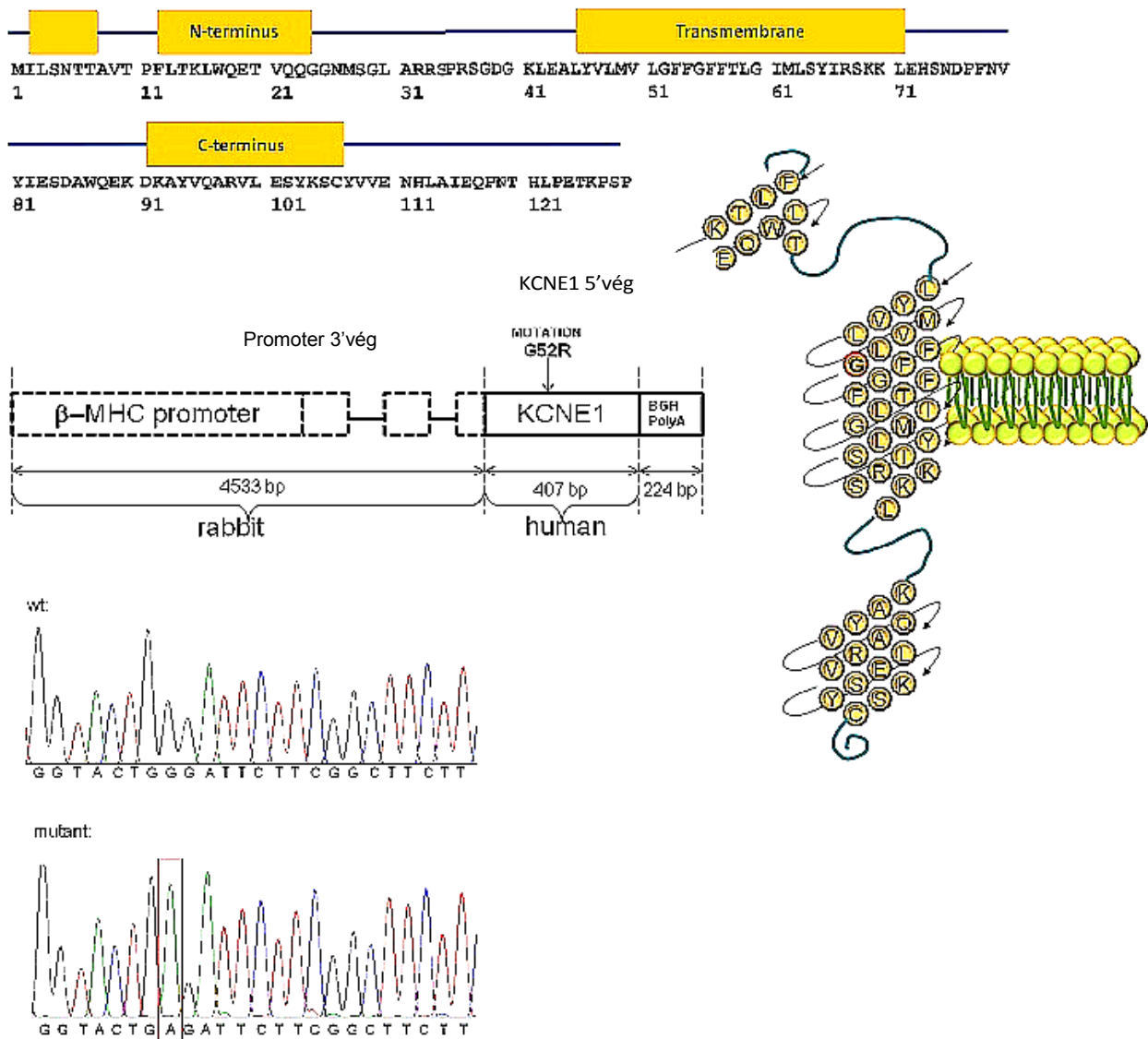
<http://www.mmcri.org/home/webSubContent.php?list=webcontentlive&id=134&catID=3&subCatID=14>

<http://www.emouseatlas.org/emap/ema/home.html>

9. MELLÉKLET

1. számú melléklet: Szívritmuszavar – hosszú QT szindróma- előállítása a fent látható génkonstrukcióval.

A KCNE1 gén mutációját szemlélteti a transzmembránon áthidaló áram segítségével, amelyen látható a KCNE1 gén mutációja, amikor is KCNE1 gén 154. pozíciójában lévő guanin adeninre cserélődik, s így arginin (R) keletkezik a glicin (G) 52. helyén (G52R). A génkonstrukciónkban szívszövet-specifitást biztosító β -MHC-promóter után kapcsolták a humán mutáns gént, amit egy polyA farokkal lezártunk.



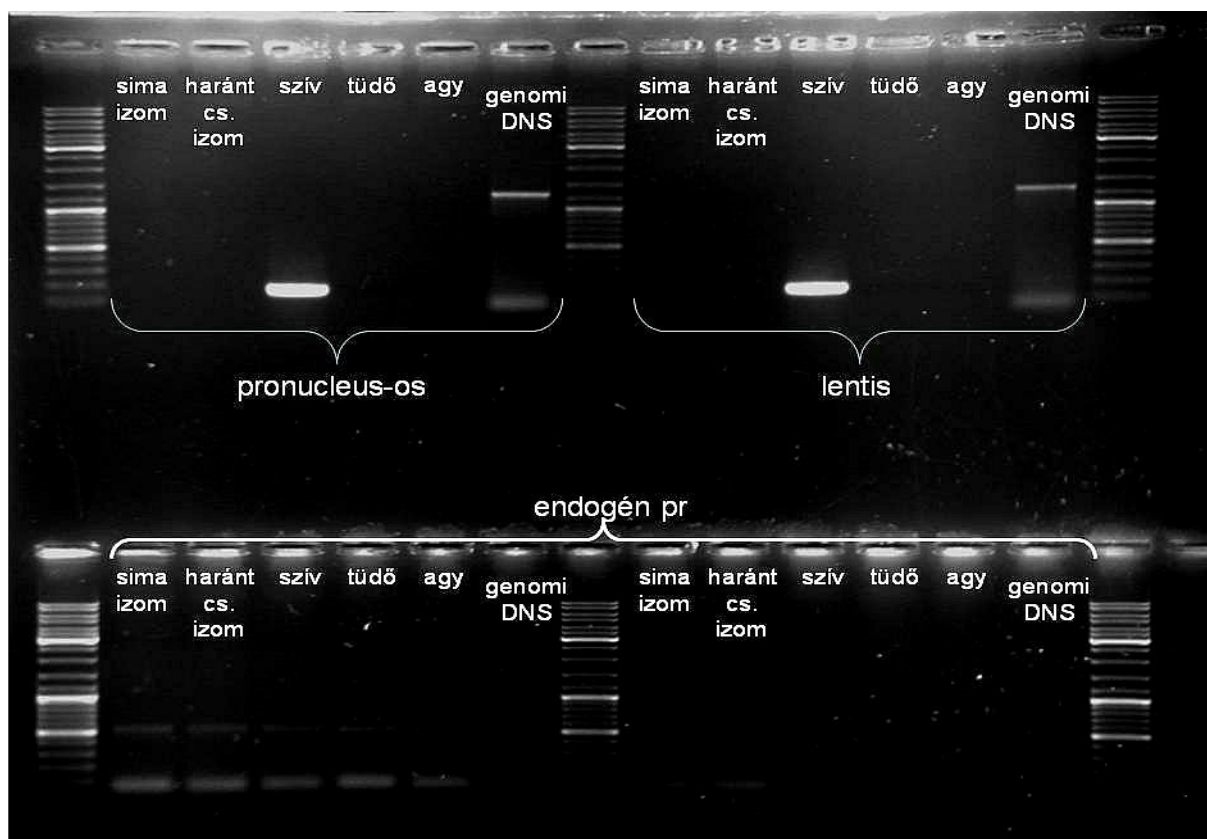
2. számú melléklet: Totál DNS kivonás protokoll – Fenol-kloroform extrakció

1. 1,5ml-es Eppendorf csöveket – előző nap 700µl Lízis-pufferben, 10µl Proteináz-K segítségével 55°C-os lombikrázatóban *overnight* elemésztjük az állati szövet – pár percig centrifugában 13000 rpm-en összeráztatjuk, hogy az esetleges szőr darabok is feloldódjanak.
2. A következő lépésben 350-350µl Fenolt és Kloroformot adunk a megemésztett szövetekhez és 10 perces max. rpm-en centrifugáljuk. Az extrakció során három fázisra különül el a folyadékunk, a felső vizes-fázis a DNS-t tartalmazza, az interfázisban fehérjestruktúrák, az alsó-szerves fázisban RNS-ek, lipidek csapódnak ki.
3. A továbbiakban a felső vizes-fázisra van szükségünk, melyet vágottvégű pipettával szívunk le, a DNS töredezettségének megelőzése érdekében. A már bekészített és feliratozott Eppendorf csövekbe kimértünk előzőleg 700µl Isopropanolt, s rápipettázuk az óvatosan leszívott felső fázist. 10 perces max. rpm-en centrifugálás közben kicsapódik a DNS-ünk, pellet keletkezik az Eppendorf csövek alján.
4. Frissen leöntjük az Isopropanolt és 700-1000µl 70%-os alkoholt pipettázunk a pelletre, ez az utolsó mosás. A 10 perces, max rpm-s centrifuga után leöntjük frissen az alkoholt és beszárítjuk a mintáinkat steril fülke alatt vagy szárító berendezés segítségével. A beszáradt DNS-s a további PCR-kísérletekhez visszaoldjuk 50µl desztillált vízben.

Megjegyzés: A veszélyes anyagokra vonatkozó labor szabályzat alapján kell eljárni az anyagok felhasználása során. Fenolt a súlyos egészségkárosító hatása miatt csak elszívófülke alatt szabad alkalmazni.

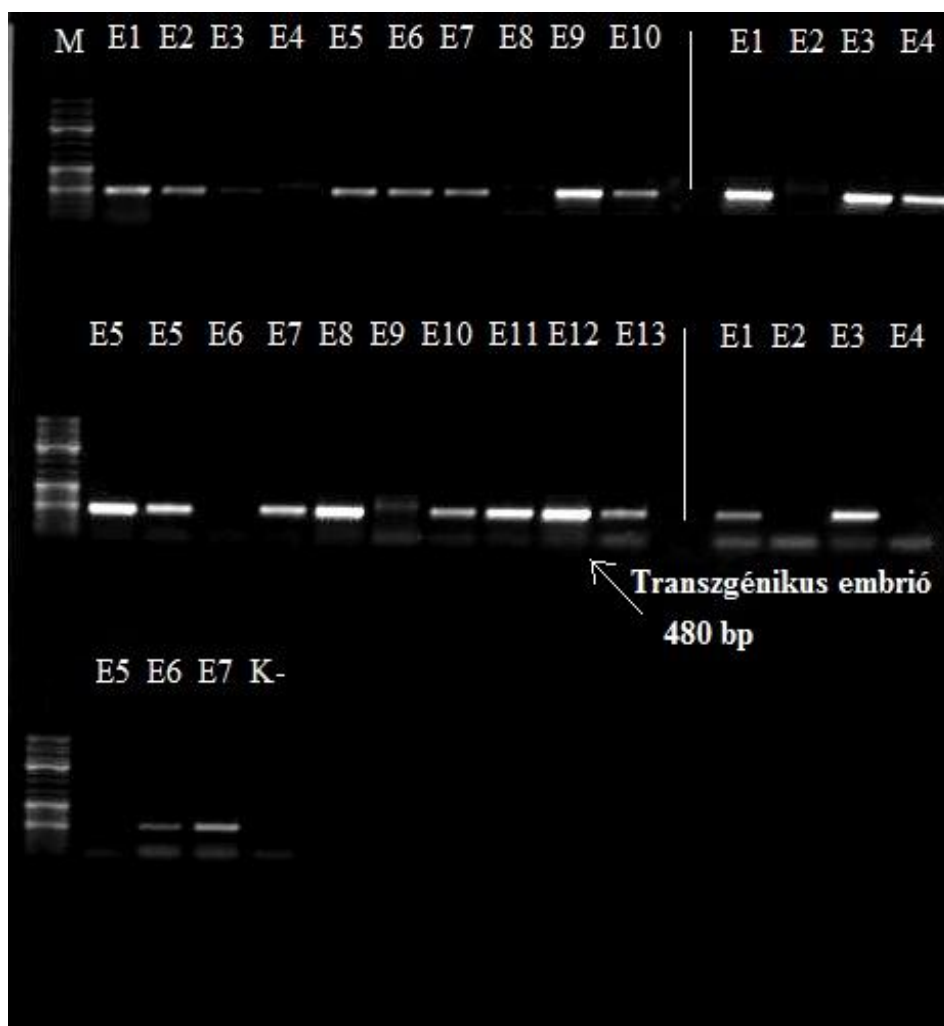
3. számú melléklet: Szívszövetspecifikus β -MHC-promóter

A transzgénben nyúl szívkamra-specifikus β -MHC-promóter irányítása alá helyezték a G52R mutációt hordozó humán KCNE1 cDNS-t. A transzgenezis módszereinek hatékonyságát és a promóter specifitásának ellenőrzését PCR-technikával végezték az MBK Állatbiotechnológiai Intézet munkatársai. Két-két párhuzamos sort vittek fel, az egyiket a specifikus, tervezett primerekkel amplifikálták, míg a kontroll sort endogén primerekkel. Mind a pronukleuszos mikroinjektálás, mint a lentis vírusbevitel alkalmas a gén bevitelére, azonos hatékonysággal. A KCNE1 gén β -MHC-promóter irányítása alatt kizárólag csak a szívben fejeződik ki.



4. számú melléklet: Embrió DNS-minták genotipizálásának gélelektroforézis képe

A gélelektroforézisről digitális képet Syngene Gene genius Dark Room Bio Imaging System technikával készítettem. A specifikus primereink által amplifikált DNS mintákat választottuk szét 1%-os agaróz gélen. A különböző időpontokban kinyert embriók DNS-mintáinak gélelektroforézise, az utolsó minta negatív kontroll. A detektált band-ek a transzgénikus embriókat mutatják, nagyságuk 480 bp.



10. NYILATKOZAT

Alulírott Kis Szilvia, a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Mezőgazdasági biotechnológus MSc. szak nappali tagozat végzős hallgatója nyilatkozom, hogy a dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem. Hozzájárulok ahhoz, hogy tudományos diákköri dolgozatom egyoldalas összefoglalója felkerüljön a kar honlapjára.

A diplomadolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem.

Gödöllő, 2013.hó.....nap

.....

Hallgató aláírása

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a felhasznált irodalmat a hallgató korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezelte, a tudományos diákköri dolgozatot a Tudományos Diákköri Konferencián védésre ajánlom.

A szakdolgozat/diplomadolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem.

Gödöllő, 2013.hó.....nap

.....

Témavezető aláírása