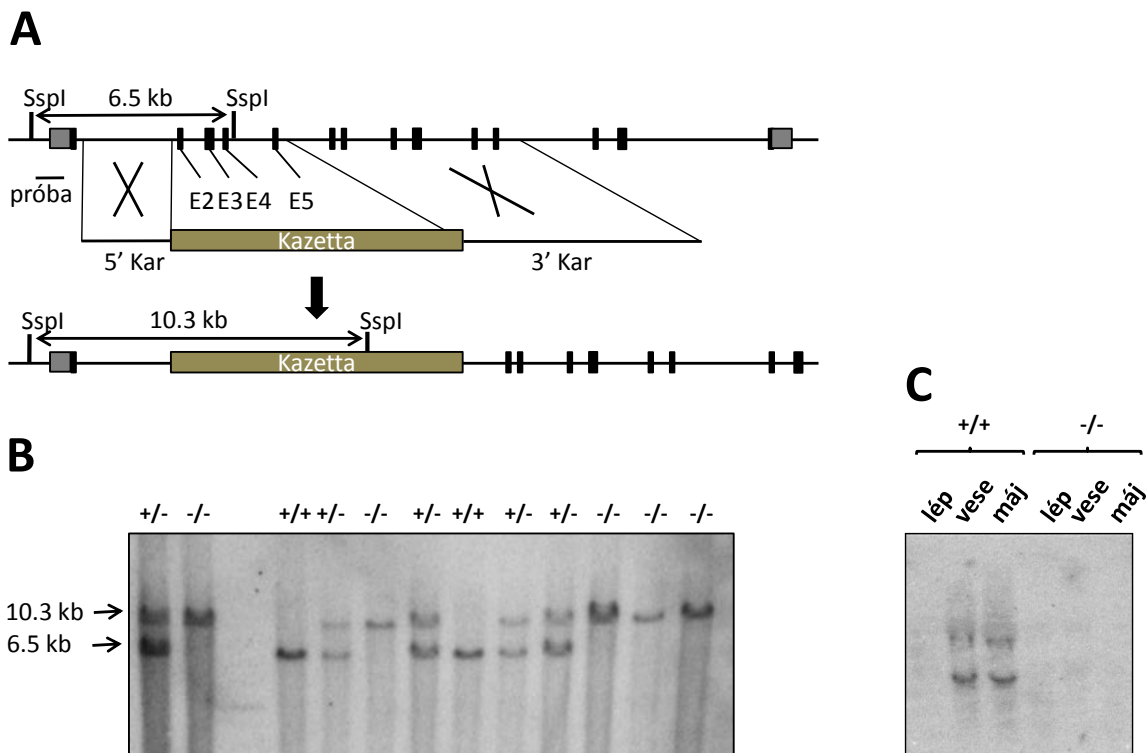


Beszámoló az OTKA PD-101421 azonosítójú pályázathoz

A rák ma világszerte az egyik vezető halálok. Az intenzív kutatások ellenére, genetikai sokféleségének köszönhetően a kifejlődéséhez szükséges genetikai változások nehezen felderíthetők. A rákos sejtek génállománya természetüknél fogva változékonnyá így a betegség kifejlődése szempontjából jelentőséggel bíró ún. „driver” mutációk elkülönítése, a háttérben nagy gyakorisággal megjelenő ún. „passenger” mutációktól, komoly nehézségekbe ütközik. A „driver” mutációk jellemzően szomatikusan alakulnak ki a betegség kifejlődése során, ezért a klasszikusan a csírvonal módosításával előállított transzgenikus állatmodellek az ilyen mutációk létrehozására/vizsgálatára sokszor alkalmatlanok. Éppen ezért a jelen OTKA pályázat elsődleges célkitűzése egy olyan szomatikus génbeviteli és szelekciós rendszer előállítása volt amely a csírvonal módosításának elkerülésével, akár több mesterségesen létrehozott „driver” mutáció egyidejű és gyors szomatikus vizsgálatát is lehetővé teszi egér modellben. Az OTKA támogatás segítségével sikerrel fejlesztettük ki ezt a genetikai rendszert, amely a rák kialakulásának *in vivo* egér modellben történő vizsgálatára minden eddiginél alkalmasabb.

Első lépésben létrehoztuk és karakterizáltuk a *Fah*^{-/-} egér törzset (1. Ábra), amely a transzplantációs kísérleteink recipiens törzse.



1. Ábra A *Fah* knock-out egér törzs létrehozása és karakterizálása

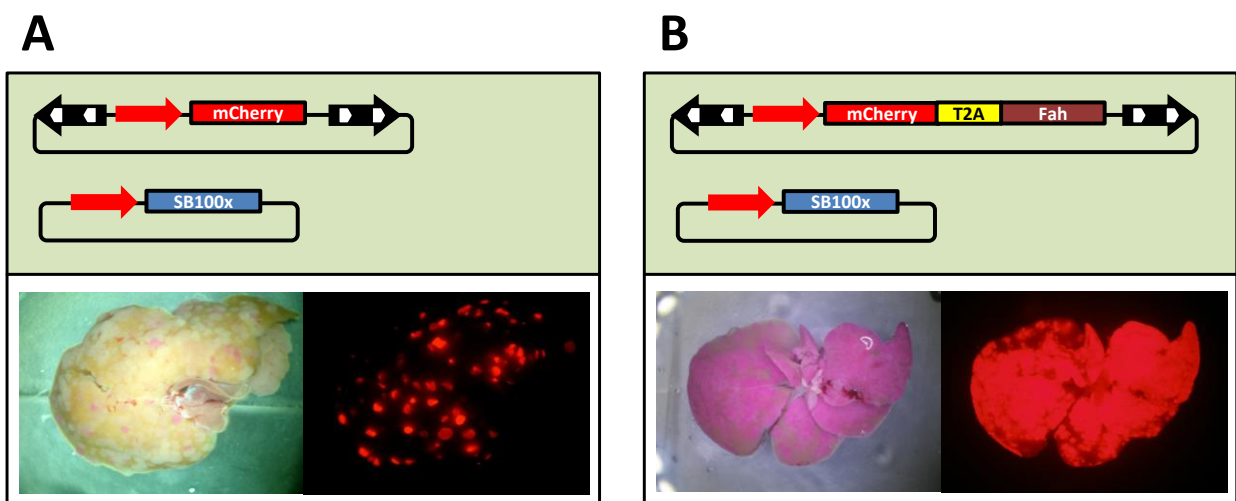
(A) Az irányított genetikai beavatkozás sematikus reprezentációja.

(B) Heterozigóta keresztezésekből származó egerek DNS mintáinak Southern hibridizációja az (A) panelen jelölt próba felhasználásával.

(C) Vad típusú és mutáns egerek szerveiből preparált totál RNS minták Northern hibridizációja *Fah* cDNS próbával.

A máj egy kiváló regenerációs képességgel rendelkező szerv, amely rágcsálókban mindössze 10% fennmaradó intakt májszövetből kiindulva is teljes regenerációra képes. Ennek következtében mutáns genetikai háttéren, ahol a transzplantált vad típusú májsejtek szelekciós előnnyel rendelkeznek, nagyfokú szerv újrakolonizálás érhető el. A $Fah^{-/-}$ egér törzs az emberi *I. típusú tirozinémia* egér modellje, amely ilyen mutáns genetikai háttérként alkalmazva hasznosíthatóvá teszi számunkra a máj egyedi regenerációs képességét a szomatikus transzgenezis céljaira. A $Fah^{-/-}$ egér törzset inbred C57BL6 genetikai háttéren állítottuk elő a transzplantált májsejtek kilőkődésének minimalizálása érdekében.

A $Fah^{-/-}$ törzs felhasználásával sikeresen beállítottuk a primér májsejtek izolálására, kultúrában tartására és transzplantációjára irányuló technikákat (2. Ábra A). Amennyiben a vizsgálni kívánt transzgén bevitelére a *Fah* terápiás génnel összekapcsolva történik, a $Fah^{-/-}$ egér törzs lehet a transzplantációhoz felhasznált donor törzs is (2. Ábra B). Ezzel a továbbfejlesztett, génterápiával egybekötött, transzgén beviteli eljárással a repopulációban résztvevő májsejtek 100%-a transzgén hordozóvá is válik.



2. Ábra A szomatikus génbeviteli rendszer működése

(A) Az mCherry markergént a hiperaktív Sleeping Beauty (SB) transzpozon rendszer segítségével építettük be a $Fah^{+/+}$ májsejtek genomjába transzplantációjukat megelőzően.

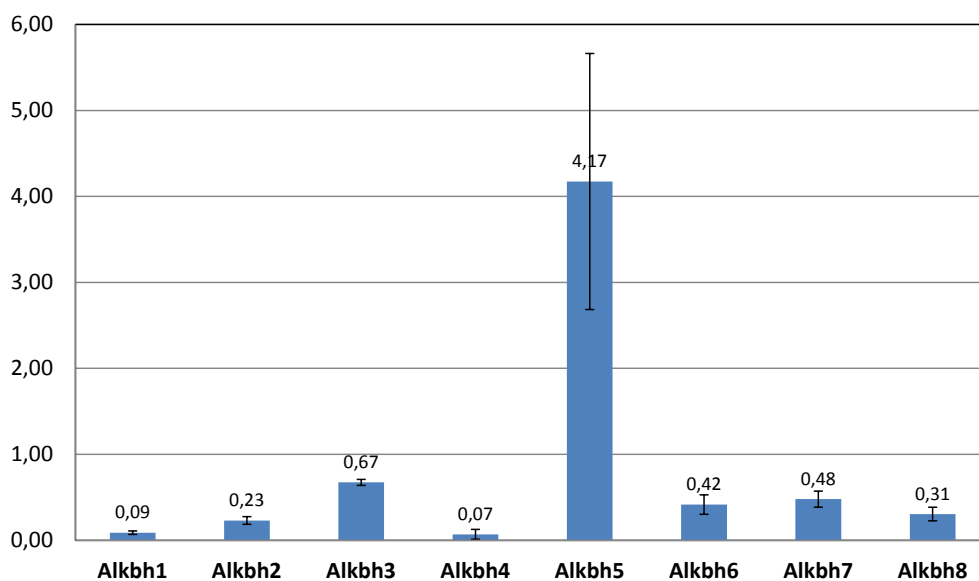
(B) Az mCherry markergént a terápiás *Fah* génnel együtt juttattuk be SB transzpozon rendszer segítségével $Fah^{-/-}$ májsejtek genomjába transzplantációjukat megelőzően.

Felső panelek: A felhasznált SB transzpozon és transzpozáz konstrukciók vázlatos ábrázolása. Alsó panelek: Repopulálódó májak látható fény és fluoreszcens képei 7 héttel a transzplantációt követően. (A teljes repopuláció körülbelül 10 hetet vesz igénybe.) Fekete nyilak, SB transzpozon „inverted terminal repeats” (ITRs); piros nyilak, promoterek; T2A, Thoseaasigna vírus 2A peptid.

A pályázat további célkitűzése volt a fenti génbeviteli rendszer karkterizálása az egér AlkB homológok célzott csendesítésén keresztül. A DNS hibajavító mechanizmusainak károsodása fontos szerepet játszik a rák kialakulásában. Ezen mechanizmusok érdekes alcsoportja a DNS egyes károsodásainak un. direkt javítása. A bakteriális AlkB fehérje is ezen direkt hibajavító fehérjék csoportjába tartozik. Egérben a bakteriális AlkB fehérjének 8 homológja (Alkbh1-8) ismert. Közülük az *Alkbh2* és *Alkbh3* a DNS, míg az *Alkbh3* és *Alkbh5* az RNS metilációs károsodásainak javításában vesz részt. A további AlkB homológok funkciója nukleinsavak hibajavításához a szakirodalmi adatok alapján nem köthető.

Az Alkbh1-8 fehérjéket kódoló cDNS-eket szubklónoztuk egér szövetekből. Továbbá QRT-PCR módszerrel karakterizáltuk az *Alkbh1-8* gének expresszióját egér májban (3. Ábra), és szövetkultúrában optimalizáltuk a nukleinsavak hibajavításában résztvevő AlkB homológok miR alapú csendesítését.

A sikerrel létrehozott génbeviteli rendszer felhasználásával szakirodalmi adatok és az egér *Alkbh1-8* gének májban való kifejeződési intenzitásai (3. Ábra) alapján jelenleg vizsgáljuk az *Alkbh2*, *Alkbh3* és *Alkbh5* csendesítésének következményeit mozaikos egér modellben.



3. Ábra Az *Alkbh1-8* gének kifejeződése májban
A HPRT és S18 belső szetnderdekre normalizálva.