

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**BETEGSÉGEK MODELLEZÉSE TRANSZGENIKUS EGEREKKEL**

**Dr. SÁNTHA MIKLÓS**

Magyar Tudományos Akadémia  
Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Biokémiai Intézete

**Szeged**

**2017**

## 1. Bevezetés

Az állatkísérletek évezredek óta végigkísérik az orvos- és állatorvostudomány fejlődését. Görög tudósok, mint pl. Arisztotelész, Erasistratus, már az évszámításunk előtt is végeztek állatkísérleteket. Galenus, a híres görög-római orvos anatómiai, élettani és kórtani tudásának fejlesztésére rendszeresen alkalmazott állatkísérleteket és boncolást.

Az állatmodellek lehetővé teszik a betegségek pathomechanizmusának részletes tanulmányozását, hiszen a beteg szervek, szövetek izolálhatók és részleteiben tanulmányozhatókká válnak hisztológiai, immunhisztokémia, elektrofiziológiai, molekuláris biológia módszerek és képalkotói eljárások (MRI, MEMRI, PET) felhasználásával. Ez nemcsak a kórfolyamat jobb megismerését, hanem a minél korábbi és biztosabb diagnózist is elősegíti. Az állatmodellek egyik legnagyobb értéke azonban a gyógyszerfejlesztésben, az új megelőzési és terápiás eljárások kidolgozásában jelentkezik. Hogy mennyire szükség van a gyógyszerek előzetes állatokon végzett kipróbálására arra álljon itt két példa. 1937-ben egy amerikai cég piacra dobott egy terméket, a „Sulfanilamid Elixirt”, amelyben a szulfanilamidot dietilén glikolban (DEG) oldották fel és a terméket eperízéssel hozták forgalomba, anélkül, hogy előtte állatokon kipróbálták volna. Az eredmény több száz halott és óriási botrány lett. Az eset után a közvélemény nyomására létrehozták a Food and Drug Administration (FDA) elődjét, amely kötelezővé tette gyógyszerjelöltek toxicitási vizsgálatának elvégzését állatokon, a forgalomba hozatal előtt. Európának is megvolt a saját „tanuló leckéje”, amikor az 1950-es 60-as évek fordulóján forgalomba hozták a thalidomidot, Contergan néven. Nyugtatóként, fájdalomcsillapítóként ajánlották álmatlanság, fáradtság, hasi fájdalmak kezelésére, ezért a terhes kismamák rendszeresen szedték. Az eredmény 46 országban mintegy 10.000 „contergan bébi”, akik végtag rendellenességgel, kéz vagy láb - vagy mindkettő - nélkül születtek. A szert a 60-as években visszahívták és betiltották.

Az állatkísérletek alkalmazása tehát szükségszerű. Utóbbi időben nagy erőfeszítések történnek arra vonatkozólag, hogy az állatkísérleteket valamely *in vitro* módszerrel helyettesítsék. A szövettenyésztés, a perfundált szervek, szövettani metszetek, sejtfarkciók használata ígéretes alternatív lehetőséget jelenthetnek a jövőben. Jelenleg azonban nincs megfelelőbb módszer az állatkísérleteknél. Az EU által tett ajánlások az 1959-ben Russell és Burch által körvonalazott 3R betartására ösztönöznek, azaz az állatkísérletek lehetőség szerinti

kiváltása *in vitro* módszerekkel (**R**eplacement), a felhasznált kísérleti állatok számának racionális csökkentése (**R**eduction), az elvégzett kísérletek során alkalmazott kímélő bánásmód (**R**efinement) és ezáltal igyekeznek elfogadhatóvá és humánussá tenni az állatkísérleteket.

## 2. Kutatási célok

Az értekezés 15 év munkáját foglalja magában. 1998-ban 2 éves posztdoktorális ösztöndíjat nyertem el a new yorki Rockefeller egyetemre. Itt Maria Karayiorgou vezetésével pszichiátria betegségek egérmodelljeit próbáltuk meg előállítani catechol-O-methyltranszferáz (*Comt*) és prolin dehydrogenáz (*Prodh*) hiányos egerek segítségével.

2000-ben tértem haza a Rockefeller Egyetemről és kaptam megbízást az SZBK Biokémiai Intézetben önálló csoport vezetésére. Céлом ekkor egy transzgenikus egereket előállító laboratórium felállítása volt. Hosszas megfontolás után a kardiovaszkuláris rendszer működését befolyásoló gének manipulálására tettünk kísérletet. Ennek megfelelően először a humán apolipoprotein-100 (APOB-100), majd a humán cholesteryl-eszter transzfer protein (CETP) és a humán biglycan fehérjéket túltermelő transzgenikus egértörzseket hoztunk létre a klasszikus, pronukleusz mikroinjekció technikával. Pár évvel később érdeklődésünk a sejtprotekció (cardioprotekció és neuroprotekció) felé fordult, ennek tanulmányozására humán HSP27 fehérjét túltermelő transzgenikus egérvonalat állítottunk elő.

Ezt követően újabb cél következett, a transzgenikus állatok fenotípusának analízise. Kezdetektől tisztában voltunk azzal, hogy nagy, nemzetközi konzorciumokkal nem versenyezhetünk, de amit saját erőnkől meg tudtunk csinálni (QRT-PCR, Western blot, immunhisztokémia, proteomika, viselkedési tesztek) azt megcsináltuk. Mivel számos vizsgálat meghaladta anyagi erőnket és szakértelmünket, ezért kiterjedt együttműködések létrehozására volt szükség. Nagyon örülök, hogy sikeres és gyümölcsöző együttműködést sikerült kialakítani az SZBK több munkacsoportjával, az SZTE számos tanszékével, valamint több európai és tengerentúli kutatólaboratóriummal. Céljaink és erőfeszítéseink közösek voltak, csakúgy mint a munkák eredménye. Egy új transzgenikus egér fenotípusának leírása bizonyos szempontból „hálás” feladat, mert minden vizsgálatnak, eredménynek újdonság

értéke lehet. Ennek ellenére sokszor szerettünk volna látni egy-egy betegségre jellemző fenotípust, amit a kísérletek során soha nem kaptunk meg.

### 3. Módszertan

#### 3.1. Transzgenikus egerek előállítása

##### 3.1.1. Az egér catechol-O-methyltransferáz (*Comt*) gén kiütése .

A genomikus *Comt* lokuszon egy Hind III - SacI fragment tartalmazza a gén teljes kódoló szakaszát. A génkiütésre alkalmazott targeting vektor a *Comt* gén egy 8.5 kb. hosszúságú homológ szakaszát tartalmazta, amelyet egy pozitív szelekciós marker, a *neo* gén kazetta szakított meg. Az endogén lokuszon a 2-4 exonok lettek helyettesítve a *neo* gén kazettával homológ rekombináció révén. Negatív szelekciós markerként a *tk* gént alkalmaztuk. A targeting vektort elektroporációval juttattuk A7 embrionális őssejtekbe. Az elektroporált ES sejtek mintegy 15%-ában sikerült kiütni a *Comt* gént homológ rekombináció révén. A *comt* null mutációt hordozó ES sejteket C57B6 blasztocyasztákba injektáltuk. A megszületett utódokban a mutációt Southern hibridizációval és PCR módszerrel azonosítottuk.

##### 3.1.2. A humán APOB-100 fehérjét túltermelő transzgenikus egerek előállítása.

A humán *APOB-100* gént tartalmazó phagemid (P1) klónt Dr. Matthew Callow-tól (Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, California) kaptuk. Ez a klón egy 19 kb. hosszúságú 5' szekvenciát, a teljes *APOB-100* gént (42 kb) és egy 14 kb. 3' nem transzlálódó szakaszt tartalmaz. 1253 petesejtet mikroinjektáltunk a human *APOB-100* transzgénnel és 618 petesejtet ültettünk vissza álvemhes nőtények petevezetőjébe. 45 megszületett utód közül 10 egér hordozta a transzgént, amit PCR reakcióval és dot blot hibridizációval azonosítottunk. A beépült transzgének kópiaszámát dot blot hibridizációval becsültük meg. Azt találtuk, hogy 2 transzgenikus állat (485, és 491) magas (5-7), egy transzgenikus állat (461) közepes (3-5) és két másik transzgenikus állat (435 és 451) alacsony (1-2) kópiában hordozza a transzgént.

A transzgenikus egerek utódaiban a human *APOB-100* transzgén szöveti kifejeződését Kvantitatív Real Time PCR-rel (QPCR) és Western blot analízissel vizsgáltuk. A humán APOB-100 fehérje kimutatására kecskében termelt, poliklonális anti-APOB-100 ellenanyagot

alkalmaztunk. A humán APOB-100 fehérjét a transzgenikus állatok májából, szivéből, aortájából és szérumból tudtuk kimutatni.

### **3.1.3. Humán biglycan fehérjét túltermelő transzgenikus egerek előállítása.**

A humán biglycan cDNS-t tartalmazó plazmidból (GeneStorm, Expression-Ready clone) Sall- BssHIII kettős emésztést követően agaróz gélelektroforézissel izoláltuk a 3440 bp hosszúságú biglycan transzkripció egységet (CMV-biglycan). A tisztított transzgént 2ng/μl koncentrációban B6xCBA F1 donorokból származó petesejtek pronukleuszába mikroinjektáltuk. Az utódokban a transzgén jelenlétét PCR reakcióval mutattuk ki. 9 transzgenikus vonalat állítottunk elő.

QPCR módszerrel kimutattuk, hogy az egyik vonalban (Tg1052) igen magas a human biglycan transzgén mRNS szintje a májban, szívben, agyban, vesében, lépben és az aortában. Saját laboratóriumunkban előállított ellenanyag segítségével Western-blot kísérletben kimutattuk, hogy a biglycan fehérje mennyisége az aortában közel 2-3 szorosa, a szívben 4-5 szöröse a vad típusú kontrollhoz viszonyítva.

### **3.1.4. Humán HSP27 fehérjét túltermelő transzgenikus egerek előállítása.**

A humán *HSP27* cDNS-t Prof. Wilbert Boelens-tól (University of Nijmegen, Netherlands) kaptuk. A transzgenikus konstrukcióban a *HSP27* cDNS-t a virális CMV promóter hajtja meg. A linearizált transzgént 2ng/ul koncentrációban FVB nőstény egerek petesejtjeibe injektáltuk. Az utódok farokszövetéből 10 napos korban DNS-t preparáltunk és a transzgén jelenlétét PCR – reakcióval mutattuk ki a következő primereket alkalmazva: 5'-GTC CCT GGA TGT CAA CCA CT-3' és 5'-GAC TGG GAT GGT GAT CTC GT-3'. A PCR reakciót a következő paraméterekkel futtattuk le: 94 °C-on 5 perc, majd 94 °C-on 40 sec, 65 °C-on 40 sec és 72 °C-on 40 sec 37 cikluson keresztül, végül 72 °C-on 5 perc. Két transzgenikus vonalat kaptunk (line 33 és line 24). A *HSP27* expresszióját Western blot vizsgálattal és immunfestéssel ellenőriztük.

### 3.2. A létrehozott transzgenikus állatok fenotípusának analízise.

A létrehozott transzgenikus állatok fenotípusának igen mélyreható és sokoldalú elemzésével lehet igazolni azt, hogy az adott genetikai beavatkozás létrehoz-e a szervezetben olyan biokémiai, molekuláris biológiai és fiziológiai elváltozásokat, amelyek egy adott betegség kialakulásához hasonlít illetve azzal analóg. Munkánk során széleskörű hazai és külföldi kollaborációt hoztunk létre annak érdekében, hogy transzgenikus állataink fenotípusát minél sokrétűbben és mélyrehatóbban vizsgálhassuk.

A pszichiátria jellegű viselkedési vizsgálatokat a *new yorki Rockefeller University*-n posztdoktorként végeztem Dr. Maria Karayiorgou csoportjában, a cardiovascularis elváltozásokat és a biglycan cardioprotektív szerepét a *Szegedi Tudományegyetem Általános (SZTE) Orvosi Karának Biokémiai Intézetének*, a cerebrovaszkuláris elváltozásokat az *Élettani Intézetnek*, a viselkedési tesztek az *EGIS Gyógyszergyárnak*, a szemelváltozásokat az *angliai University College London*, az inzulin rezisztencia kialakulását a *torontoi Hospital for Sick Children*, a neurodegeneráció kialakulását a *magdeburgi Leibniz-Institute for Neurobiology*, a *grazi QPS-Austria*, az *SZTE Orvosvegytani*, valamint *Pszichiátriai Intézetének*, a HSP27 neuroprotektív szerepét az *SZBK Biokémiai Intézetének (Prof. Víg L. csoport)*, a genomikai vizsgálatokat az *SZBK Funkcionális Genomika Laboratóriumának (Dr. Puskás L. csoport)*, a vér-agy gát szerkezetét és az endothél funkciókat az *SZBK Biofizikai Intézetének (Dr. Deli M. csoport)* munkatársaival együttműködésben vizsgáltuk.

## 4. Az eredmények összefoglalása

Az értekezés az elmúlt 15 év kísérleti munkáját foglalja össze. A Rockefeller Egyetemen előállított *COMT* knock out és *PRODH* mutáns egértörzsekkel olyan pszichiátriai elváltozásokat, mint a schizofrénia, az agresszió és a szorongás kíséreltünk meg modellezni. A hazai laboratóriumban előállítottunk 5 transzgenikus egérvonalat, amelyek a humán APOB-100, biglycan, hCETP, HSP27 és  $\alpha$ B-crystallin fehérjéket termelték túl. Ezen genetikailag módosított állatok fenotípusának részletes és mélyreható vizsgálatával igyekeztünk modellezni a hyperlipidémiát, cardio és cerebrovaszkuláris elváltozásokat, az inzulin rezisztenciát, az időskori neurodegenerációt és demenciát, valamint az időskori makula degenerációt (AMD).

Az alábbi táblázat összefoglalja mindazokat az elváltozásokat és betegségeket, amelyeket munkánk során modellezni igyekeztünk. Ugyancsak bemutatja, hogy milyen transzgenikus egértörzseket állítottunk elő a dolgozatban tárgyalt betegségek modellezésére.

Betegség	Transzgenikus egérmodell
<b>1. Pszichiátriai elváltozások:</b> 1. Schizofrénia 2. Agresszió 3. Szorongás (anxiety)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Comt</i> hiányos KO egértörzs</li> <li>▪ <i>Prodh</i> hiányos mutáns egértörzs</li> <li>▪ Humán biglycan fehérjét túltermelő egértörzs</li> </ul>
<b>2. Szív és érrendszeri betegségek:</b> 1. Hyperlipidémia 2. Atherosclerózis 3. Szívelégtelenség	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Humán APOB-100 fehérjét túltermelő egértörzs</li> </ul>
<b>3. Cerebrovaszkuláris elváltozások, neuroinflammáció és az időskori makula degeneráció (AMD)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Humán APOB-100 és</li> <li>▪ Humán APOB-100 x biglycan fehérjéket túltermelő kettős transzgenikus egértörzs</li> </ul>
<b>4. Időskori demencia és neurodegeneráció</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Humán APOB-100 fehérjét túltermelő egértörzs</li> </ul>
<b>5. Inzulin rezisztencia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Humán APOB-100 fehérjét túltermelő egértörzs</li> </ul>
<b>6. Cardioprotekció</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Humán biglycan fehérjét túltermelő egértörzs</li> <li>▪ Humán HSP27 fehérjét túltermelő egértörzs</li> </ul>
<b>7. Neuroprotekció</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Humán HSP27 fehérjét túltermelő egértörzs</li> </ul>

## Jelentősebb eredmények:

### 4.1. Pszichiátriai elváltozások modellezésére tett kísérletek.

Korunk egyik leggyakoribb pszichiátriai betegsége a schizofrénia. Korábban megfigyelték, hogy a 22 kromoszóma q11-es régiójának mikrodélécioja olyan pszichiátriai betegségek szignifikánsan gyakoribb előfordulásával jár, mint pl. a schizofrénia, kényszerbetegség (obszesszív-kompulzív betegség, OCD), szorongás (anxiety) és depresszió. Ezért a schizofréniát egy olyan gén kiütésével kíséreltük meg modellezni, amelynek génje a 22q11 régióban található. Választásunk a catechol -O- methyltransferáz (*COMT*) génre esett. A *COMT* enzim - amonoamine oxidase (MAO A és B) mellett – a dopamin lebontásában játszik szerepet elsősorban a striátumban, nucleus accumbens-ben és az agykéregben. A *COMT* gén null mutációját ugyan sikeresen létrehoztuk, de a schizofrenia egyik fő tünetét, a szenzomotoros kapuzás (sensorimotor gating) hibás működését nem sikerült igazolnunk a transzgenikus egerekben. Ezzel szemben a *COMT* hiányos egerekben kimutattuk, hogy a dopamin szintje szignifikánsan megemelkedett a hím állatok frontális agykéregében szemben a nőstényekkel, amelyekben a dopamin szintje alig változott, viszont a noradrenalin és szerotonin szintjük lecsökkent. Ez a szexuálisan dimorfikus neurokémiai változás az állatok viselkedésében is megmutatkozott, a hím állatok fokozott agresszív viselkedést, a nőstények fokozott féltékenységet mutattak.

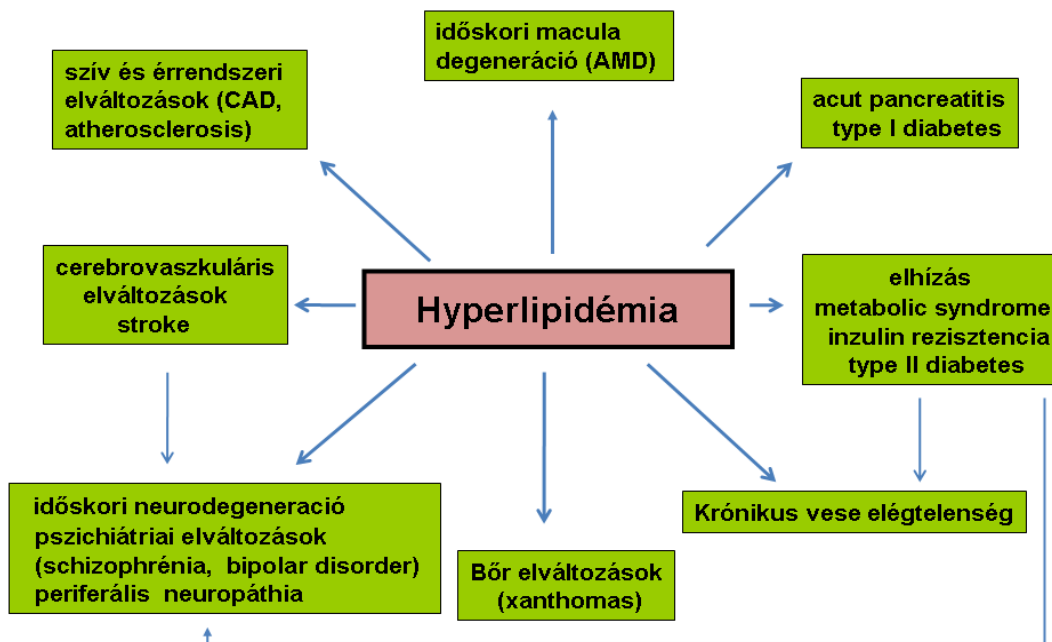
Egy másik egértörzsben (Pro/re), amelyben a *PRODH* gén mutációját és ennek megfelelően hyperprolinémiát mutattunk ki sikerült a szenzomotoros kapuzás (sensorimotor gating) hibás működését igazolnunk.

### 4.2. A hyperlipidémia modellezése.

Az egerek vérének fő lipoprotein komponense az APOA fehérjét tartalmazó HDL molekula. Vérükben az atherosclerózis kialakulásért felelős APOB-100 tartalmú LDL molekula - szemben az emberrel- csak igen kis mennyiségben található meg. Ezért, a humán *APOB-100* gén bevitelével és túltermelésével olyan humanizált egértörzset állítottunk elő, amelynek a szérum lipoprotein összetétele az emberéhez hasonlít. Az így előállított *APOB-100* transzgenikus egerek koleszterin-dús tápon tartva hyperkoleszterinémiások, normál



egértápon tartva hypertriglyceridémiásak. Az alábbi ábra irodalmi adatokra támaszkodva mutatja be, hogy a hyperlipidémia számos betegség rizikófaktora.



1.ábra A hyperlipidémia, mint számos betegség rizikófaktora

#### 4.3. Az időskori neurodegeneráció modellezése *ApoB-100* transzgenikus egerekben.

Az első kísérlet sorozatunkban sikeresen igazoltuk, hogy a hyperlipidémiás *ApoB-100* transzgenikus egerek szív és érrendszerében oxidatív stressz, atherosclerózis és cardiovascularis elváltozások alakulnak ki. A következőkben kimutattuk, hogy az érrendszeri elváltozások a cerebrovaszkuláris rendszerre is kiterjednek, az agyi kapillárisokban ugyanúgy, mint a szívben oxidatív stressz és az endothel sejtek károsodása jön létre. Az endothel sejtek károsodása a vér-agy gát működésének zavarához, neuroinflammáció és amyloid plakkok kialakulásához, valamint a tau fehérje hiperfoszforilációjához vezet. A hisztológiai elváltozásokat a szinaptikus és kognitív funkciók zavara kíséri, végül pedig a neuronok nagy számban elhalnak és kiterjedt neurodegeneráció jön létre. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy az *ApoB-100* transzgenikus egértörzs alkalmas modellje az időskori vaszkuláris eredetű neurodegenerációnak.

#### 4.4. A biglycan és a Hsp27 fehérje cardioprotektív szerepe.

A biglycan a kis, leucinban-gazdag (SLRP) fehérjék családjába tartozó, extracelluláris mátrix fehérje. A biglycan a szervezetben kiterjedten előfordul és igen sokrétű szerepe van. Résztvesz a csontképzésben, az izomdifferenciációban és fontos szerepe van az extracelluláris-intracelluláris jelátvitel közvetítésében. Előzetes kísérleteinkben már igazoltuk, hogy koleszterol dús diéta hatására *APOB-100* transzgenikus egerek aortájában az atherosclerotikus plakkok száma és területe szignifikánsan megemelkedik a vad típusu alomtársakéhoz viszonyítva. Ebből kiindulva, a biglycan anti-atherosclerotikus hatását koleszterin dús diétán tartott *APOB-100 / biglycan* kettős transzgenikus egerekben tanulmányoztuk. Azt találtuk, hogy az aorta elváltozások száma a kettős transzgenikus egerekben közel felére csökkent, míg az aorta átfolyása szignifikánsan megemelkedett az *APOB-100* hyperlipidémiás egerekkel összehasonlítva.

A kismólsúlyú hősokkfehérjék családjába tartozó Hsp27 egy ATP független chaperon fehérje, amelynek egyik legfontosabb feladata, hogy a hibás szerkező fehérjékhez kapcsolódva egyrészt megakadályozza, hogy azok aggregátumokat képezzenek, másrészt a proteaszómákhoz szállítja azokat, hogy ott degradálódjanak.

Fiziológiás körülmények között lényeges szerepe van a fehérjék bioszintézisében, transzportjában, áthelyezésében, feltekerésében és végső szerkezetük összeállításában. A hősokk fehérjék szintje jelentősen megemelkedik stressz állapotban és különféle betegségekben. A Hsp27 cardioprotektív hatását egy a szívizomsejtekre igen toxikus vegyület, a doxorubicin intraperitoneális befecskendezésével mutattuk ki. Azt találtuk, hogy míg a doxorubicinnel kezelt vad típusú egerekben a szívizomsejtek nagy számban károsodnak és halnak el, addig a Hsp27 fehérjét túltermelő transzgenikus egerek szívizomzatában szignifikánsan kevesebb sejt hal el.

#### 4.5. A Hsp27 neuroprotektív hatása.

A Hsp27 fehérje neuroprotektív hatását akut és chronikus etanol kezelés után vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy akut etanol kezelés hatására az egyensúly és mozgáskoordináció kisebb mértékben romlik, hosszan tartó etanol fogyasztás hatására pedig szignifikánsan kevesebb neuron pusztul el a Hsp27 transzgenikus egerek agykérgében, hippocampusában és kisagyában, mint a vad típusú társaikéban.

Az elsők között bizonyítottuk, hogy a Hsp27 fehérjének Alzheimer-kórban szintén neuroprotektív hatása van. Az Alzheimer-kór egérmodelljét (APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup>) Hsp27 transzgenikus egerekkel keresztezve kimutattuk, hogy Hsp27 túltermelés hatására javulnak a szinaptikus és kognitív funkciók, szignifikánsan csökken az amyloid plakkok és az elhalt neuronok száma.

## 5. Új tudományos eredmények

Kutatásainknak számos újdonságtartalma volt.

1. *Comt* hiányos egerekben először mutattuk ki, hogy a megemelkedett agyi dopaminszint az egerekben szexuálisan dimorfikus viselkedést, a hímekben agressziót, a nőstényekben fokozott féltékenységet hoz létre.
2. Az egér *Prodh* gént elsőként klónoztuk, megállapítottuk kromoszómális lokalizációját és kimutattuk, hogy mutációja a szenzomotoros kapuzás hibás működését eredményezi.
3. Az *APOB-100* transzgenikus egerek analízisével az elsők között mutattunk rá arra, hogy a krónikus hyperlipidémia (hypertriglyceridémia) az ismert cardiovascularis elváltozásokon túlmenően cerebrovaszkuláris elváltozásokat, a vér-agy gát permeabilitásának fokozódását, neuroinflammációt, amyloid plakkok felhalmozódását, a *Tau* gén hyperfoszforilációját eredményezi, amelynek következtében romlanak a preszinaptikus és kognitív funkciók, végül időskorban memóriazavar, kiterjedt neurodegeneráció és demencia jön létre.
4. Ugyancsak kevésbé volt ismert, hogy a májban nagy mennyiségben termelt *APOB-100* fehérje endoplazmatikus stresszt (ER) okoz, ami közvetetten csökkenti az AKT fehérje foszforiláltságát és ezáltal a Glut-4 vezikulák transzportját a membránhoz. Ezúton, valamint a JNK fehérje fokozott foszforilációja révén gátolja az inzulin jelátvitelt és inzulin rezisztenciát okoz a májban.
5. *APOB-100/biglycan* kettős transzgenikus egereken végzett kísérletek során kimutattuk, hogy a kettős transzgenikus egerek szemében a Bruch-membrán megvastagodása révén az emberi időskori makula degenerációhoz (AMD) hasonló elváltozások alakulnak ki.
6. Ugyancsak ebben a kettős transzgenikus egértörzsben mutattuk ki a biglycan lipidesökkentő, anti-atherosclerotikus és cardioprotektív hatását. Ezeket az eredményeket újdonságtartalmuk miatt szabadalmaztattuk. A doxorubicin ismert

tumorellenes szer, amit elsősorban leukémiás betegekben alkalmaznak. Elterjedését a szívizomsejtekre gyakorolt erős toxikus hatása korlátozza. A HSP27 cardioprotektív hatását doxorubicinnal kezelt *HSP27* transzgenikus egerek szívében mutattuk ki.

7. *APP<sup>swe</sup>/Pse1(AD modell)/HSP27* többszörösen transzgenikus egerekben kimutattuk, hogy a HSP27 védi a neuronokat az alkohol káros akut és krónikus hatásaival szemben, valamint csökkenti az Alzheimer-kór kapcsán kialakuló amyloid plakkok számát. Javítja a betegségben sérült szinaptikus és kognitív funkciókat, tehát az Alzheimer-kór kezelésében a HSP27 fontos terápiás célpont lehet.

Az utóbbi eredményeknek a tumor terápiában és az Alzheimer-kór terápiájában lehet jelentősége a jövőben, mert olyan kismolekulasúlyú vegyületek szájon át történő bevitelével amelyekkel az endogén *HSP* gének indukcióját tudnánk előidézni a szívizomsejtek illetve a neuronok különböző káros hatások ellen megvédhetőek lennének.

## 6. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom csoportom tagjainak, közvetlen kollegáimnak, akik a manuális munkák nagy részét végezték, így PhD hallgatóimnak **Bereczki Erikának, Tóth E. Melindának, Lénárt Nikolettnek, Csibrány Balázsnak**, szakdolgozóimnak **Doma Eszternek, Buús Richárdnak, Alföldi Róbertnek, Nagy Dórának, Dukay Brigittának**, valamint technikusaimnak **Feketéné Ircsinek, Gonda Szilviának, Mari Mónikának** és **Kis-Sebestyén Ibolyának**.

Az értekezésben többször igyekeztem hangsúlyozni, hogy a transzgenikus állatok fenotípusának analízise mennyire kollektív munka volt és a sikeres együttműködést köszönöm hazai kollegáimnak, **Ferdinándy Péter, Penke Botond, Bari Ferenc, Kálmán János, Janka Zoltán, Vigh László, Puskás László, Deli Mária, Lévay György** professzoroknak és munkatársaiknak, valamint külföldi partnereimnek, **Michel Simonneanak, Maria Karayiorgounak, Joseph Gogosnak, Lengyel Imrének, Bernát Gábornak, Khosrow Adelinek, Manfred Windischnek** és **Jin-Jing Peinek**.

Végül hálásan köszönöm **szüleim** és **feleségem** folyamatos támogatását az elmúlt 15 év minden egyes napján.

## 7. A szerző közleményei

### 7.1. Az értekezés tárgyköréhez kapcsolódó közlemények

#### 7.1.1. Pszichiátriai elváltozások modellezése

1. Gogos, J.A., Morgan, M., Luine, V., **Santha, M.**, Ogawa, S., Pfaff, D., and Karayiorgou, M. (1998) Catechol-O-methyltransferase-deficient mice exhibit sexually dimorphic changes in catecholamine levels and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 9991-6. IF: 9.82
2. Gogos, JA\*, **Santha, M.\***, Takacs, Z., Beck, KD., Luine, V., Lucas, LR., Nadler, JV., and Karayiorgou, M. (1999) The gene encoding proline dehydrogenase modulates sensorimotor gating in mice. *Nature Genet.* **21**:434-9. \*megosztott első szerzők. IF:30.69
3. Huotari, M., **Santha, M.**, Lucas, LR., Karayiorgou, M., Gogos, JA., Mannisto, PT. (2000) Effect of dopamine uptake inhibition on brain catecholamine levels and locomotion in catechol-O-methyltransferase (*COMT*) disrupted mice. *J. Pharm. Exp. Ther.* **303**:1309-1316. IF: 3.55

#### 7.1.2. Szív és érrendszeri betegségek modellezése

1. Csont T, Bereczki E, Bencsik P, Fodor G, Görbe A, Zvara Á, Csonka C, Puskás LG, **Sántha M**, Ferdinandy P. (2007) Hypercholesterolemia increases myocardial oxidative and nitrosative stress thereby leading to cardiac dysfunction in *APOB-100* transgenic mice. *Cardiovascular Res.* **76**:100-9. IF:5.28

#### 7.1.3. Cerebrovaszkuláris elváltozások és az időskori makula degeneráció (AMD) modellezése

1. Süle Z, Mracskó E, Bereczki E, **Sántha M**, Csont T, Ferdinandy P, Bari F, Farkas E. (2009) Capillary injury in the ischemic brain of hyperlipidemic, apolipoprotein *B-100* transgenic mice. *Life Sci.* **84**:935-9. IF:2.56
2. Sallo FB, Bereczki E, Csont T, Luthert PJ, Munro P, Ferdinandy P, **Sántha M**, Lengyel I. (2009) Bruch's membrane changes in transgenic mice overexpressing the human biglycan and apolipoprotein *B-100* genes. *Exp Eye Res.* **89**:178-86 IF:2.54
3. Puskás, LG., E. Bereczki, **M. Sántha**, L. Vigh, F. Spener, K. Kitajka. (2004)Cholesterol and cholesterol plus DHA diet-induced gene expression and fatty acid changes in mouse eye and brain. *Biochimie* **86**:817-24 IF:3.70

#### 7.1.4. Az időskori demencia és neurodegeneráció modellezése

1. Bjelik A, Bereczki E, Gonda S, Juhasz A, Rimanoczy A, Zana M, Csont T, Pakaski M, Boda K, Ferdinandy P, Dux L, Janka Z, **Santha M.**, Kalman J (2006) Human *APOB* overexpression and a high-cholesterol diet differently modify the brain APP metabolism in the transgenic mouse model of atherosclerosis. *Neurochemistry Int.* **49**:393-400. IF:3.20
2. Bereczki, E., Bernát, G., Csont, T., Ferdinandy, P., Scheich, H. and **Sántha, M.** (2008) Overexpression of human apolipoprotein *B-100* induces severe neurodegeneration in transgenic mice. *J. Proteome Res.* **7**:2246-52. IF:5.68
3. Lénárt N, Szegedi V, Juhász G, Kasztner A, Horváth J, Bereczki E, Tóth ME, Penke B, **Sántha M.** (2012) Increased tau phosphorylation and impaired presynaptic function in hypertriglyceridemic *APOB-100* transgenic mice. *PLoS One.* **7**:e46007. IF:3.73
4. Nikolett Lénárt, Gábor Bernát, Henning Scheich and **Miklós Sántha.** (2012) Hyperlipidemia induced neurodegeneration in *APOB-100* transgenic mice. *Proceedings of the CEELA-II- 2012 Conference, Budapest, June 2*
5. Löffler T, Flunkert S, Havas D, **Sántha M.**, Hutter-Paier B, Steyrer E, Windisch M. (2013) Impact of *APOB-100* expression on cognition and brain pathology in wild-type and hAPPsl mice. *Neurobiol Aging.* **34**:2379-88. IF: 4.85

#### 7.1.5. Az inzulin rezisztencia modellezése

1. Su Q, Tsai J, Xu E, Qiu W, Bereczki E, **Santha M.**, Adeli K. (2009) Apolipoprotein B100 acts as a molecular link between lipid-induced endoplasmic reticulum stress and hepatic insulin resistance. *Hepatology* **50**:77-84. IF:10.84

#### 7.1.6. A cardioprotekció modellezése

1. Erika Bereczki, Szilvia Gonda, Tamás Csont, Eva Korpos, Agnes Zvara, Péter Ferdinandy and **Miklós Sántha.** (2007) Overexpression of Biglycan in the Heart of Transgenic Mice: An Antibody Microarray Study. *J. Proteome Res.* **6**:854-861. IF: 5.67
2. Bereczki, E. and **Santha, M.** The role of biglycan in the heart. (2008) *Connective Tissue Research* **49**:129-132. IF:1.11
3. Bereczki E., Gonda S., Csont T., Korpos E., Ferdinandy P. and **Santha M.** (2008) Cardiac protein profile of biglycan transgenic mice. FECTS (Federation of Connective Tissues Societies) annual meeting Marseille, 2008. Július 9-14.
4. **Santha, M.**, Bereczki E., Gonda S., Csont C., Ferdinandy P (2008) Use of biglycan or enhancers of biglycan activity in the preparation of pharmaceutical compositions. Szabadalom. International Application No.:PCT/HU2008/000003.



### 7.1.7. A neuroprotekción modellezése

1. Toth ME, Gonda S, Vigh L, **Santha M.**(2010) Neuroprotective effect of small heat shock protein, *HSP27*, after acute and chronic alcohol administration. *Cell Stress Chaperones* **6**:807-17.IF:3.16
2. Tóth ME, Szegedi V, Varga E, Juhász G, Horváth J, Borbély E, Csibrány B, Alföldi R, Lénárt N, Penke B, **Sántha M.** 2013. Overexpression of *HSP27* ameliorates symptoms of Alzheimer's disease in APP/PS1 mice.*Cell Stress Chaperones* **18**:759-71.IF:2.53
3. Tóth ME, Vigh L, **Sántha M.** 2014. Alcohol stress, membranes, and chaperones. *Cell Stress Chaperones* **19**:299-309.IF:2.53

## 7.2. További közlemények, amelyek a PhD dolgozat benyújtása után készültek.

1. Kasza Á, Hunya Á, Frank Z, Fülöp F, Török Z, Balogh G, **Sántha M**, Bálint Á, Bernáth S, Blundell KL, Prodromou C, Horváth I, Zeiler HJ, Hooper PL, Vigh L, Penke B. 2016. Dihydropyridine Derivatives Modulate Heat Shock Responses and have a Neuroprotective Effect in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis.* 53(2):557-71. IF: 4.15
2. Löffler T, Schweinzer C, Flunkert S, **Sántha M**, Windisch M, Steyrer E, Hutter-Paier B. 2016. Brain cortical cholesterol metabolism is highly affected by human APP overexpression in mice. *Mol Cell Neurosci.* 74:34-41. IF: 3.84
3. Lénárt N, Walter FR, Bocsik A, Sántha P, Tóth ME, Harazin A, Tóth AE, Vizler C, Török Z, Pilbat AM, Vigh L, Puskás LG, **Sántha M**, Deli MA. 2015. Cultured cells of the blood–brain barrier from apolipoprotein B-100 transgenic mice: effects of oxidized low-density lipoprotein treatment. *Fluids and Barriers of the CNS* 12 (1), 1-16. IF: 5.30
4. Zádor F, Lénárt N, Csibrány B, **Sántha M**, Molnár M, Tuka B, Samavati R, Klivényi P, Vécsei L, Marton A, Vizler C, Nagy GM, Borsodi A, Benyhe S, Páldy E. 2015. Low dosage of rimonabant leads to anxiolytic-like behavior via inhibiting expression levels and G-protein activity of kappa opioid receptors in a cannabinoid receptor independent manner. *Neuropharmacology* 89, 298-307. IF: 5.10
5. Oláh Z., J Kálmán, ME Tóth, Á Zvara, **M Sántha**, E Ivitz, Z Janka, M Pákáski. 2015. Proteomic Analysis of Cerebrospinal Fluid in Alzheimer's Disease: Wanted Dead or Alive. *Journal of Alzheimer's disease: J. Alzheimer's Disease* **44 (4), 1303-1312.** IF:4.15
6. Su Q, Baker C, Christian P, Naples M, Tong X, Zhang K, **Santha M**, Adeli K. 2014. Hepatic mitochondrial and ER stress induced by defective PPAR $\alpha$  signaling in the pathogenesis of hepatic steatosis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **306 (11), E1264.** IF: 3.78
7. Wang S, ME Toth, E Bereczki, **M Santha**, ZZ Guan, B Winblad, JJ Pei. 2011. Interplay between glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and tau in the cerebellum of Hsp27 transgenic mouse. *Journal of Neuroscience Research* **89 (8), 1267-1275.** IF: 2.73
8. Csont T, Görbe A, Bereczki E, Szunyog A, Aypar E, Tóth ME, Varga ZV, Csonka C, Fülöp F, **Sántha M**, Ferdinandy P. 2010. Biglycan protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury: Role of nitric oxide. *J Mol Cell Cardiol.*4:649-652. IF:5.49
9. Páldy E, Bereczki E, **Sántha M**, Wenger T, Borsodi A, Zimmer A, Benyhe S. 2008. CB(2) cannabinoid receptor antagonist SR144528 decreases mu-opioid receptor expression and activation in mouse brainstem: role of CB(2) receptor in pain. *Neurochem Int.* **53:309-16.** IF: 3.22

10. Paldyova E, Bereczki E, **Santha M**, Wenger T, Borsodi A, Benyhe S. 2008. Noladin ether, a putative endocannabinoid, inhibits mu-opioid receptor activation via CB2 cannabinoid receptors. *Neurochem. Int. J.* **52**:321-8. IF: 3.22
11. Paldyova E., Bereczki E., **Santha M**, Wenger T, Borsodi A, Benyhe S. 2007. Altered gene expression and functional activity of opioid receptors in the cerebellum of CB1 cannabis receptor knockout mice after acute treatments with cannabinoids. *Acta Biol. Hung.* **58**:113-129.
12. Bjelik A, Pákási M, Bereczki E, Gonda S, Juhász A, Rimanóczy A, Zana M, Janka Z, **Sántha M**, Kálmán J. 2007. APP mRNA splicing is upregulated in the brain of biglycan transgenic mice. *Neurochem Int.* 2007, 50(1):1-4.
13. Zvara, A., Szekeres, G., Janka, Z., Kelemen, JZ. , Cimmer, C., **Sántha, M.** and Puskás, LG. 2005. Over-expression of dopamine D2 receptor and inwardly rectifying potassium channel genes in drug-naive schizophrenic peripheral blood lymphocytes as potential diagnostic markers. *Disease Markers* **21**:61-9.
14. Boda, B., C. Mas, C. Giudicelli, V. Nepote, F. Guimiot, B. Levacher, A. Zvara, **M. Santha**, I. LeGall, M. Simonneau. 2004. Survival motor neuron SMN1 and SMN2 gene promoters: identical sequences and differential expression in neurons and non-neuronal cells. *Eur J Hum Genet.* **12**:729-37.
15. Szekeres, G., Zvara, A., Hackler, L. Jr., Janka, Z., **Santha, M.**, and Puskas, L. 2002. Identification of peripheral genetic markers of schizophrenia with cDNA chips. *European Neuropsychopharmacology* **Vol.12**:S302
16. Zhou, L., Nepote, V., Rowley, D.L., Levacher, B., Zvara, A., **Santha, M.** Simonneau, M., and Donovan, D.M. 2002. Murine Peripherin gene sequences direct Cre recombinase expression to peripheral neurons in transgenic mice. *FEBS Letters* **522**:63-67.

### 7.3. Konferencia szereplések előadáskivonatai a PhD dolgozat benyújtása után

1. Oláh, Z. M Pákási, A Zvara, P Klivényi, E Ivitz, **M Sántha**, L Vécsei, Z Janka 2014. EPA-0381–Preliminary studies on cerebrospinal fluid of patient with Alzheimer's disease using peptide microarray. *European Psychiatry*, 29 p1.
2. Nikolett Lénárt, Gábor Bernát, Henning Scheich and **Miklós Sántha**. 2012. Hyperlipidemia induced neurodegeneration in APOB-100 transgenic mice. *Proceedings of the CEELA-II- 2012 Conference, Budapest, June 2*
3. Qiaozhu Su, Kezhong Zhang, **Miklos Santha** and Khosrow Adeli. 2011. Impaired Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Coupled with Endoplasmic Reticulum Stress Induces Hepatic Insulin Resistance *Arteriosclerosis, Thrombosis, Vascular Biology, Annual Conference 2011, April 28-30, 2011 – Chicago, IL*

4. Tamás Csont, Erika Berezki, Gabriella F Kocsis, Zoltán Varga, **Miklós Sántha**, Péter Ferdinandy. 2010. Overexpression of human biglycan prevents myocardial dysfunction in cholesterol-fed *APOB100* transgenic mice. 2010. XX. *ISHR World Congress, 2010. May 13 16, Kyoto, Japan*
5. Su Q, Tsai J, **Santha M**, Adeli K. 2009. Role of Apolipoprotein B100 in Lipid-Induced Endoplasmatic Reticulum Stress and Hepatic Insulin Resistance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29, e9-e130.
6. Barkoczi B., Chiovini B., Juhasz G., Berezki E., **Santha M.**, Penke B., and Szegedi V. 2009. Synaptic plasticity studies in *APOB-100* transgenic mice. *Frontiers in Systems Neuroscience, Conference Abstract; 12<sup>th</sup> Meeting of the Hungarian Neuroscience Society doi: 10.3389./conf.neuro.01.2009.04.139*
7. Süle, Z., Bari, F., **Sántha, M.**, Berezki, E., Farkas, E. 2008. Capillary injury in the ischemic brain of hyperlipidemic, apolipoprotein *B-100* transgenic mice. *J. Vasc. Res.* 45 (Suppl. 2), 122.
8. Berezki E., Gonda S., Csont T., Korpos E., Ferdinandy P. and **Santha M.** 2008. Cardiac protein profile of biglycan transgenic mice. *FECTS (Federation of Connective Tissues Societies) annual meeting Marseille, 2008. Július 9-14.*
9. Sallo, FB., PJ. Luthert, P. Munro, **M.Santha**, E.Berezki, I. Lengyel. 2007. Changes in Bruch's Membrane in *APOB100/Biglycan* double transgenic mice - implications for Age-Related Macular Degeneration. *ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology), Annual meeting 2007. 08-A-4998.*
10. Csont T., Bencsik P., Berezki E., Rigó K., Kocsis FG., Giricz Z., Csonka C., **Sántha M.**, and Ferdinandy P. 2005. Hypercholesterolemia leads to cardiac dysfunction in apo100 transgenic mice: role of oxidative stress & MMPs. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology Vol.38. p. 1015 P045*
11. Bjelik Annamária, Zana Marianna, Juhász Anna, Rimanóczy Ágnes, Berezki Erika, Pákáski Magdolna, **Sántha Miklós**, Janka Zoltán, Kálmán János. 2005. Changes in the cerebral amyloid precursor protein metabolism in the transgenetic mouse models of atherosclerosis (*APOB-100* and biglycan). *Clinical Neuroscience/Ideggyógyászati Szemle.* 58; 9/10. sz., 344-345. p.,
12. Bjelik Annamária, Zana Marianna, Juhász Anna, Rimanóczy Ágnes, Pákáski Magdolna, Berezki Erika, **Sántha Miklós**, Penke Botond, Janka Zoltán, Kálmán János. 2004. Amyloid precursor protein metabolism in high cholesterol diet *APOB* transgenic mice. *Clinical Neuroscience/Ideggyógyászati Szemle.* 57; 9/10sz., 322.,
13. Csont, T., Bencsik, P., Berezki, E., Csonka, C. Onody, A., Fodor, G., Giricz, Z., **Santha, M.**, Ferdinandy, P. 2004. Cholesterol-enriched diet leads to increased oxidative stress and cardiac dysfunction in *APOB 100* transgenic mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology Vol.37. p281. C69*

14. Zvara, Á., Szekeres, G., Hackler, L., Janka, Z., **Sántha, M.** és Puskás, L. 2002. A szkizofréniára jellemző perifériás genetikai markerek azonosítása cDNS chipekkel. *Neuropsychopharmacologica Hungarica. Vol. IV. Suppl.1. p.34.*
15. Zhou, L., Nepote, V., Borgmeyer, C., Rowley, D.L., Dersch, C., Malcheska, H., Syein, C., Rothman, R.B., **Santha, M.**, Simonneau, M., and Donovan, D.M. 2000. Conditional knockout of the mu opioid receptor in the dorsal root ganglion using loxP and a peripherin-Cre mouse. *Soc. Neurosci. Abstr. Vol. 26. Part 2 p.111.*
16. Gogos J.A., **Santha M.**, Malinova L., Lattal K.M., Abel T., and Karayiorgou M. 1999. The gene encoding proline dehydrogen is a strong candidate gene for the 22q11-associated psychiatric phenotypes. *Mol. Psychiatr. 4: S107-S107. Suppl. 1 Sep.*
17. Mas, C., F. Bourgeois, A. Bulfone, K. Chrzanowska, J.M. Moalic, A. Zvara, **M.Santha**, G. Gyapay, M. Simonneau. 1999. Identification of candidate genes for neurodevelopmental diseases combining their expression in proliferating neuroepithelium with mapping assignment. *European Journal of Paediatric Neurology, Volume 3, Issue 6 1999, Page A98.*

#### 7.4. Szabadalmak

1. Puskas Laszlo, Agnes Zvara, **Miklos Santha**, Gyorgy Szekeres, Zoltan Janka. 2005. USE OF GENES AS MOLECULAR MARKERS IN DIAGNOSIS OF SCHIZOPHRENIA AND DIAGNOSTIC KIT FOR THE SAME Publication Number: WO/2005/106026 International Application No.: PCT/HU2005/000044.
2. **Santha, M.**, Bereczki E., Gonda S., Csont C., Ferdinandy P 2008. USE OF BIGLYCAN OR ENHANCERS OF BIGLYCAN ACTIVITY IN THE PREPARATION OF PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS International Application No.: PCT/HU2008/000003.

#### 7.5. Könyvfejezet

1. Toth Melinda E, **Santha Miklos**, Penke Botond, Laszlo Vigh. 2015. How to stabilize both the proteins and the membranes: diverse effects of sHsps in neuroprotection In "The Big Book of Small Heat Shock Proteins" Eds. RM Tanguay and LE Hightower. Springer International Publishing AG. ISBN: 978-3-319-16076-4.