

A humán NADPH-oxidáz 5 (NOX5) enzim vizsgálata új monoklonális antitesttel

Doktori tézisek

Szeles Zsolt

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola
Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Geiszt Miklós, DSc, egyetemi tanár
Dr. Petheő Gábor László, PhD, egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Szöllősi András, PhD, tudományos főmunkatárs
Dr. Wunderlich Lívius, PhD, egyetemi adjunktus

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Csala Miklós, DSc, egyetemi tanár
Tagok: Dr. Szarka András, DSc, egyetemi tanár
Dr. Cervenák László, Ph.D, tudományos tanácsadó

Budapest
2024

BEVEZETÉS

Az emlősökben a NADPH-oxidázok (NOX) családja felelős a reaktív oxigénszármazékok (ROS) szabályozott módon történő előállításáért. A családba 7 fehérje sorolható a NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, illetve DUOX1 és DUOX2 enzimek. A NOX-ok szuperoxidot vagy hidrogén-peroxidot állítanak elő. A szabályozás mechanizmusa eltérő az egyes enzimek között. Vannak, amelyek ROS termeléséhez citoszolikus fehérje alegységek szükségesek, míg más izoformáknál az intracelluláris kalciumionkoncentráció megemelkedése váltja ki a ROS felszabadulását. Olyan izoformát is leírtak, amely konstans aktivitást mutat, és elsősorban transzkripciós szinten szabályozott. A NOX-ok az emberi szervezet számos sejt- és szövettípusában megtalálhatók. Jelen vannak a vastagbélben (NOX1), a fehérvérsejtekben (NOX2), a belső fülben (NOX3), a vesében és az erekben (NOX4), a lépben és a herében (NOX5), illetve a nyálmirigyben, a légutakban és a pajzsmirigyben (DUOX1 és 2) is. Széles szöveti expressziójuknak köszönhetően számos élettani folyamatban vehetnek részt. Ismert a szerepük az immunvédekezésben (NOX2, DUOX1), az egyensúly érzékelésében (NOX3) és a pajzsmirigyhormonok szintézisében (DUOX2) is.

Több mint 20 évvel ezelőtt, 2001-ben írták le a NOX5-öt, azonban az enzim élettani funkcióját mind a mai napig nem ismerjük.

A NOX5 szerkezetében megtalálható a NOX-okra általánosan jellemző 6 transzmembrán domén és a C-terminális oldalon

elhelyezkedő FAD és NADPH-kötőhelyek. A NOX5 N-terminális oldalán egy egyedi struktúra van, az EF-hand domének. Az enzim aktiválódásához az intracelluláris kalciumionkoncentráció megemelkedése szükséges. A kalciumionok bekötődnek az EF-hand doménekhez, aminek következtében konformációváltozáson megy keresztül a fehérje. Az N-terminális lánc közelebb kerül a C-terminális lánchoz, ami elindítja az elektronok vándorlását a NADPH-ról a FAD-on és transzmembrán doménekén keresztül a molekuláris oxigénre. A NOX5 működése során oxigént redukál szuperoxid anionná. A C-terminális oldalon találhatóak olyan szerin és treonin aminosavak, amelyek foszforilálódása fokozza a NOX5 kalciumérzékenységet.

A NOX5 sajátossága, hogy nem igényel további citoszolikus vagy membránkötött fehérje alegységeket a működéséhez és a stabilizálódáshoz. Mindazonáltal a NOX5 hajlamos a multimerek képzésére, és az enzim aktivitása jellemzően dimer vagy tetramer formában valósul meg. A többi NOX-szal ellentétben a NOX5 nem glikozilált fehérje.

Az emberi szervezetben a NOX5-nek hat izoformája van, amelyeket jellemzően görög betűkkel szokták jelölni (α , β , γ , δ , ϵ és ζ). A hat izoforma közül csak az α és a β bizonyítottan funkcióképes. Evolúciós érdekesség, hogy a rágcsálók többségében nem található meg a *Nox5* gén, így a laboratóriumokban széleskörben használt egerekben és patkányokban sem. Így ezek az állatmodellek sajnos nem alkalmazhatók arra, hogy a NOX5 élettani funkciót felderítsük.

Az elérhető adatok alapján a NOX5 elsősorban az endoplazmás retikulumban (ER) és a sejtmagmembránban helyezkedik el. Az emberi szervezetben a legnagyobb mennyiségben a lépben és a herében fejeződik ki, kisebb mértékben a nyirokcsomókban, a prosztatában, a méhben és a méh-lepényben.

Áttekintve a kereskedelmi forgalomban elérhető, humán NOX5 fehérjét felismerő antitesteket, az állapítható meg, hogy számos antitest olyan sejtlizátumokban detektálja a NOX5 fehérjét, amelyekben a Human Protein Atlas (HPA) adatbázis nem jelez NOX5 mRNS expressziót. Ezen ellentmondás miatt feltételezhető, hogy ezen antitestek nem NOX5-öt mutatnak ki. A NOX5 szakirodalmában számos közleményt találtunk, amelyekben ilyen bizonytalan specifikitású antitestekkel dolgoztak.

Munkacsoportunk azt a megközelítést választotta a NOX5 vizsgálatára, hogy NOX5 hiányos (KO) új-zélandi fehér nyulakat hoz létre CRISPR/Cas9 technikával. Magas koleszterintartalmú táppal etetett nyulakon végzett kísérletekben azt találtuk, hogy a KO állatokban nagyobb területen képződtek plakkok az aortában, mint a kontroll egyedek esetében. Ebből arra következtettünk, hogy a NOX5-nek védő hatása lehet az érrelmeszesedéssel szemben.

CÉLKITŰZÉS

Kutatómunkám során a humán NOX5-öt tanulmányoztam és a NOX5 hiányos nyúl „off-target” elemzését végeztem el. Kísérleteinkben a következő célokat tűztük ki magunk elé:

- Új, monoklonális NOX5 antitest kifejlesztése az Immunogenes Kft-vel együttműködve, amely megbízhatóan felismeri a humán NOX5 fehérjét, és az új antitest részletes jellemzése.
- NOX5-öt stabilan kifejező HEK293T sejtvonal létrehozása. A sejtek szuperoxidtermelésének a vizsgálata és az enzim intracelluláris lokalizációjának a megállapítása.
- Endogén NOX5-öt tartalmazó UACC-257 melanóma sejtvonal tanulmányozása, a sejtek szuperoxidtermelésének a vizsgálata, a NOX5 intracelluláris lokalizációjának a megállapítása és az új antitest vizsgálata a sejtvonal felhasználásával.
- NOX5 detektálása és expressziójának tanulmányozása primer humán szövetekben.
- NOX5 kimutatása primer humán vaszkuláris sejtvonalakban.
- CRISPR/Cas9 technikával létrehozott NOX5 hiányos nyulak „off-target” analízise a NADPH-oxidázokra.

MÓDSZEREK

Sejtvonalak

HEK293T sejtekből létrehoztam egy NOX5-öt túltermelő vonalat (HEK-NOX5) és egy kontroll HEK293T vonalat (HEK-Kontroll). Az endogén NOX5 fehérjét az UACC-257 melanóma sejtvonalban terveztem kimutatni. Humán, primer vaszkuláris sejtek vizsgálatára a következő sejtek álltak a rendelkezésünkre: humán koronária simaizom sejtek, humán aorta simaizom sejtek és humán szív eredetű mikrovaszkuláris endotélsejtek.

Klónozás

A nyílt leolvasási keretű humán NOX5 β cDNS (BC125098.1) a pcDNA3.1/V5-His-TOPO vektorban állt a rendelkezésemre. DNS polimerázzal kiterjesztettem a NOX5 inzertet a megfelelő restrikciós vágóhelyekkel kiegészítve, majd beillesztettem a pSB/CMV/MCS/Puro vektorba.

A GST-NOX5 és a NOX5-His₆ konstruktok esetében a humán NOX5 fehérje első 167 aminosavát, az EF-hand doméneket kódoló szekvenciát erősítettem ki az eredeti plazmidból, majd illesztettem a pGEX-4T-1, illetve a pLATE31 vektorba fehérjetermeltetés céljából.

Klónozás az „off-target” analízishez

Nyúl vastagbélből (NOX1-hez), lépéből (NOX2-höz) és veséből (NOX4-hez) szövetmintákat gyűjtöttünk, RNS-t preparáltunk, majd cDNS-t készítettünk. A cDNS-ből specifikus primerek

felhasználásával kierősítettem az egyes nyúl NOX izoformákat, és pcDNA3.1/V5-His-TOPO vektorba illesztettem. A ligátumot *E. coli* TOP10 baktériumokba transzformáltam, majd hat telepet használtam fel plazmidpreparálásra. Először restikációs emésztéssel bizonyosodtunk meg a kívánt plazmidösszetételről, majd az emésztési kép alapján 1-1 DNS konstrukciót elküldtünk DNS szekvenálásra.

Fúziós fehérjék előállítása

A GST-NOX5 és a NOX5-His₆ fehérjék előállításához a plazmidokat fehérjetermelő *E. coli* BL21 törzsbe juttattam. A transzformált baktériumokat Terrific Broth médiumban növesztettem, és IPTG hozzáadásával indukáltam a fehérjetermelést, ami 3-4 órán keresztül zajlott, 37 °C-on, rázóinkubátorban.

GST-NOX5 és NOX5-His₆ fehérjék tisztítása

A baktériumokat centrifugálással üleptettem, majd egy Tris alapú, proteáz inhibitorokat tartalmazó lízis pufferrel szuszpendáltam az üledéket. Szonikálással roncsoltam a baktériumokat, majd az oldhatatlan részeket centrifugálással elválasztottam. A felülúszóhoz glutation-gyöngyöt adtam a GST-NOX5 kinyeréséhez, illetve nikkelgyöngyöt a NOX5-His₆ kihalászásához. A gyöngyöket mostam a megfelelő oldatokkal, majd eluáltam a rekombináns fehérjéket glutation, illetve imidazol tartalmú eluáló oldatokkal. Az eluátumokat dializáltam PBS-ben, majd bekoncentráltam a fehérjeoldatokat.

siRNS és DNS transzfekció

Az UACC-257 sejtekben az endogén NOX5 mennyiségének csökkentését négy különböző, NOX5 specifikus siRNS-sel értem el, míg kontrollként kontroll siRNS-t alkalmaztam. A 40 nM végkoncentrációjú siRNS transzfekciója Lipofectamine RNAiMAX reagenssel történt, és a hatás kifejlődésére 2 napot hagytam.

A HEK293T sejteket az inzert nélküli vagy a NOX5 inzertet tartalmazó pSB/CMV/MCS/Puro vektorral és egy transzpozáz enzimet kódoló vektorral együtt transzfektáltam 1:5 arányban, összesen 2 µg DNS-t felhasználva egy hat lyukú sejtenyésző lemez egy lyukában. Két nappal a transzfekció után 7,5 µg/ml puromycin hozzáadásával kezdtem kiválogatni a pozitív klónokat, és a szelekciót két hétig tartottam fent. A HEK-Kontroll és a HEK-NOX5 sejteket ER-ba irányított mCherry konstrukttal transzfektáltam, hogy megállapítsuk a túlermeltetett NOX5 intracelluláris lokalizációját. A kísérletekhez Lipofectamine LTX & PLUS reagenst használtam.

RNS preparálás, cDNS írás, kvantitatív PCR (qPCR)

Különböző sejtvonalakból, DNS emésztés mellett, RNS-t preparáltam. A kinyert RNS-ről cDNS-t szintetizáltam. A qPCR reakciókat a LightCycler 480 Probes Master használatra kész reakció keverékkel végeztem, 0,5 µl Taqman próba oligonukleotid és 0,5 µl cDNS felhasználásával. A mintákban a NOX5 és, belső kontrollként, aktin expresszióját vizsgáltam. A kiértékelés során a NOX5/aktin arányt elemeztem.

Western blot és Instant blue festés

A NOX5 fehérje kimutatása céljából humán szövetlizátumokat vásároltunk, illetve fehérjeoldatokat készítettem különböző sejtvonalakból RIPA oldat segítségével. A szolubilizált fehérjék elválasztását 10%-os poliakrilamid tartalmú gélen végeztem, redukáló és denaturáló körülmények között. A gélről a fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltam, majd Ponceau-festéssel ellenőriztem a blottolás sikerességét. A membránt 5 %-nyi tejport tartalmazó PBS-Tween oldattal blokkoltam. Első antitestként a kifejlesztett humán NOX5 ellenes antitestet használtam 1-10 µg/ml-es koncentrációban, kontrollként pedig β-aktin, α-simaizom aktin vagy vinculin ellenes antitesteket.

Az Instant blue festéshez a gélelektroforézis után a gélt Instant blue festéssel inkubáltam.

Immunitokémia

A sejteket paraformaldehiddel (PFA), acetonnal vagy metanollal fixáltam. A PFA-s fixálást egy inkubációs lépés követte 10 mM-os glicin oldattal, majd egy permeabilizálási lépés 0,1 % Triton X-100 detergenssel. Ezután egy órát blokkolódtak a minták 5 % BSA tartalmú PBS-ben. Az első antitesteket (NOX5: 2-5 µg/ml, kalnexin: 1:100) a blokkoló oldatban hígítottam, majd egy egész éjszakán keresztül kezeltem velük a sejteket. Másnap mostam a fedőlemezen lévő sejteket, majd egy órát inkubáltam sötétben a fluoreszcensen jelölt második antitestekkel.

Immunhisztokémia

A NOX5 fehérje szöveti eloszlásának a megállapításához normál, humán here, lép és petefészkek metszeteket vásároltunk. A metszeteket deparaffináltam, rehidratáltam majd két lépésben végeztem el az antigénfeltárást. Először pH=6-os, 10 mM nátrium-citrátot tartalmazó oldatban, magas nyomáson és hőmérsékleten kezeltem a metszeteket 20 percig, majd használatra kész, antigénfeltáró pepszinoldattal, 10 percig, 37 °C-on. A NOX5 fehérje kimutatásához az Alexa Fluor 488 Tyramide SuperBoost Kit-et alkalmaztam. Az endotélsejt marker von Willebrand-faktor (vWF) fehérjét fluoreszcens másodlagos antitestekkel detektáltam.

Szuperoxid mérések

A méréseket a CLARIOstar Plus Microplate Reader műszerrel végeztem, 37 °C-on. A sejtalapú vizsgálatokat HEPES-sel pufferezt (H-) médiumban csináltam. A szuperoxid detektálásához a Diogenes reagenskeveréket adtam a sejtekhez. Extracelluláris szuperoxid jelet regisztráltam lumineszcens módban.

Statisztika

A mérések eredményeit átlag \pm SEM (átlag standard hibája) formában ábrázoltam. A szuperoxidtermelés statisztikai elemzése során a Mann-Whitney U tesztet alkalmaztam. A kiértékelés folyamán az egyes időpontokban mért értékeket a maximális detektált értékre normalizáltam, majd az egyes ingerekre adott csúcsválaszokat hasonlítottam össze. Az elemzés és az értékelés a GraphPad Prism 7.0

programmal történt.

Egysejtes RNS-szekvenálási adatok elemzése, RNS-szekvenálási eredmények gyűjtése

A NOX5 mRNS expressziójának tanulmányozásához kétféle egysejtes RNS-szekvenálási adatokat tartalmazó adatbázist elemeztem. Az egyik a Tabula Sapiens transzkriptomikai atlasz volt, amely ötszázezer sejtről tartalmaz információkat, 24 különböző szövetből és szervből, több mint 400 féle sejtípust azonosítva. A mintákat 15 donorból gyűjtötték össze. A másik forrásnak a HPA, ingyenesen elérhető adatbázis szolgált. A HPA-ból szervszintű és különböző sejtípusokra lebontott egysejtes RNS-szekvenálási eredmények érhetőek el. Az UACC-257 sejtek RNS-szekvenálási eredményeit a CellMiner honlapról kérdeztem le.

EREDMÉNYEK

1. Új, humán NOX5 fehérjét felismerő antitest kifejlesztése

Az új, humán NOX5 fehérjét felismerő antitest kifejlesztését az Immunogenes Kft-vel együttműködésben valósítottuk meg.

Antigénként a NOX5 fehérje EF-hand régióját választottuk. Ennek a 167 aminosav hosszú szakasznak elkészítettem a GST (GST-NOX5), illetve 6 darab hisztidin aminosavval (NOX5-His₆) kapcsolt formáját. *E. coli* BL21 baktériumtörzssel megtermeltem, majd affinitáskromatográfiás eljárással tisztítottam, végül dializáltam és bekoncentráltam a fehérjéket. A cég a GST-NOX5 fehérjével bFcRn transzgenikus BALB/c egereket immunizált. Western blot-tal (WB) ellenőriztem a szérumokban a kialakult immunválaszt, majd két egér lépét használta fel az Immunogenes Kft a hibridóma sejtek létrehozásához. A hibridómák termelte antitestek teszteléséhez használták a NOX5-His₆ antigént. Több, ígéretesnek látszó klón közül az 1E10 jelölésű bizonyult a legmegfelelőbbnek. Kísérleteink során elvégeztük az új, 1E10 monoklonális antitest (mAb) részletes jellemzését és a továbbiakban ezt használtuk a NOX5 fehérje kimutatására.

2. NOX5-öt túltermelő HEK293T sejtek létrehozása, a NOX5 fehérje kimutatása a sejtekben, a sejtek szuperoxidtermelő képességének vizsgálata

Sleeping beauty vektorba klónoztam a humán NOX5 β -t, és egy

transzpozáz enzimet kódoló vektorral együtt HEK293T sejtekbe (HEK-NOX5) transzfektáltam. Létrehoztam egy NOX5 inzert nélküli HEK293T kontroll sejtvonalat is (HEK-Kontroll). Puromycines szelekcióval stabil sejtvonalatokat alkottam, amelyeket felhasználtam az antitestfejlesztés során is a klónok előszűrésére.

WB kísérletekben meggyőződünk, hogy az új 1E10 mAb csak a HEK-NOX5-ös mintákban detektál NOX5 jelet, míg a HEK-Kontroll mintában nem ismer fel semmit sem. Ugyanezt tapasztaltuk az immunfestés során kapott eredmények esetében is. A NOX5 intracelluláris elhelyezkedésének vizsgálatához a sejteket az endoplazmás retikulumban (ER) kifejeződő mCherry konstrukttal transzfektáltam. Az láttuk, hogy a két jel nagymértékben átfedő képet mutat, és megállapítottuk, hogy a túltermeltetett NOX5 elsősorban ER és sejtmembrán elhelyezkedést mutat.

Diogenes reagens felhasználásával követni tudtuk a sejtek szuperoxidtermelését az extracelluláris térben. A HEK-NOX5-ös sejtekben sikerült szuperoxidtermelést kiváltani receptor-mediált úton ATP-vel és a SERCA pumpa gátlása révén thapsigarginnal (Tg). A HEK-Kontroll sejtek egyáltalán nem válaszoltak a stimulusokra. A HEK-NOX5 sejtek szuperoxid jelét sikeresen csökkentettük NOX inhibitor difenil-jodónium (DPI), illetve szuperoxid-dizmutáz hozzáadásával.

3. Endogén NOX5 fehérje kimutatása UACC-257 sejtekben, a sejtek szuperoxidtermelő képességének vizsgálata

Az endogén NOX5 fehérje kimutatására az UACC-257 melanóma sejtek álltak a rendelkezésemre. A legtöbb antitestjellemzést célzó kísérletet ennek a sejtvonalnak a felhasználásával végeztem.

Csökkenő NOX5 jelet detektáltam a WB során, ha a 4 különböző, NOX5 mRNS-t célzó siRNS bármelyikével transzfektáltam a sejteket, míg a kontroll siRNS kezelés hatására nem történt a NOX5 fehérje mennyiségében változás. A kísérlettel validáltam az új mAb-ot, továbbá megbizonyosodtam afelől, hogy felismeri az endogén NOX5 fehérjét. Megvizsgáltam azt is, hogy a mAb hány darab melanóma sejtben képes még kimutatni a NOX5 fehérjét. Ehhez a sejtekből hígítási sort készítettem, és a WB képek alapján úgy láttam, hogy minimum 1000 darab sejtben képes megbízhatóan felismerni az antitest a NOX5-öt. További kísérletekben azt találtam, hogy az endogén NOX5-öt csak nem hőkezelt mintákból tudjuk kimutatni, illetve, hogy a mAb nem ismeri fel a DUOX1 fehérje EF-hand régióját, egy esetleges aspecifikus jelet létrehozva.

Immuncitokémiai kísérletekben NOX5 siRNS-sel kontrollált módon sikerült bizonyítanom az antitest specifikus felismerő képességét. Az immunfestések alkalmával a mAb a paraformaldehides, metanolos és acetonos fixálás után is megbízható eredményt adott, ami szélesítheti a mAb felhasználási lehetőségeit. A kalnexin és a NOX5 együttes immunfestése során igyekeztem megállapítani az endogén NOX5

fehérje intracelluláris lokalizációját. Eredményeink szerint az endogén NOX5 fehérje is döntően az ER-ban és a sejtmagmembránban dúsul, ugyanis a NOX5 és a kalnexin jele nagymértékben átfedő képet adott.

Megbizonyosodtam a melanóma sejtek ROS termelő képességéről is. A sejtek TRPV4 agonista GSK1016790A és Tg hatására szuperoxidot állítottak elő. DPI, illetve NOX5 siRNS kezeléssel igazoltam, hogy a detektált szuperoxid jel NOX5 eredetű.

4. NOX5 fehérje kimutatása humán szövetekben

Humán lép és here mintákban WB-tal igazoltuk a NOX5 fehérje jelenlétét. A mintákban detektáltunk egy csíkot, amely az UACC-257 sejtek NOX5-jével azonos magasságban volt. Petefészek lizátumban is bizonyítottuk az oxidáz jelenlétét. Negatív kontrollként szív- és vázizom minták álltak a rendelkezésünkre, ezekben semmilyen jelet nem mutatott ki az új mAb.

Immunhisztokémiai kísérletekben tanulmányoztuk a NOX5 eloszlását here, lép és petefészek szövetmetszeteken. Azt tapasztaltuk, hogy a here esetében a NOX5 jel forrása döntően a herecsatornák falából érkezik, a spermatogenezisben részt vevő sejtekből, míg a luminálisan elhelyezkedő spermiumok nem jelölődnek. Immunfestéseink nem támasztják alá azon irodalmi következtetéseket, amelyek szerint a NOX5-nek az érett spermiumokban van fontos szerepe. A petefészek metszet esetében a NOX5 jel döntően az interstíciumában volt. A lép esetében a metszetet együtt festettük meg NOX5-re és az endotélsejt

marker vWF-ra. Meglepetésünkre a két jel átfedő képet mutatott, gyűrűszerű struktúrákat kirajzolva a szövetben. Ebből arra következtettünk, hogy a lépben az endotélsejtek a NOX5 forrása.

RNS adatbázisok segítségével is igazoltuk az immunfestésekkel tett megfigyeléseinket, miszerint a herében a spermatidák és spermatocták, a petefészekben az oocyták és a granulosa sejtek, a lépben pedig az endotélsejtek a NOX5 forrásai.

5. NOX5 kimutatása primer humán vaszkuláris sejtekben

Irodalmi adatok alapján a NOX5 fehérje széles körben kifejeződik vaszkuláris simaizom- és endotél sejtekben. Rendelkezésünkre álltak koronária simaizom sejtet, aorta simaizom sejtet és szív eredetű mikrovaszkuláris endotélsejtet. Antitestünk egyik sejt esetében sem detektált NOX5 fehérjét. qPCR-ral megvizsgáltuk ezért a minták NOX5 mRNS tartalmát is, de csak csekély mértékű expressziót tapasztaltunk, amely feltehetőleg nem eredményez számottevő mennyiségű NOX5 fehérjét.

6. NOX5 hiányos nyulak „off-target” analízise

Megvizsgáltuk, hogy a NOX5 hiányos nyulakban nem sérültek a NOX1, NOX2 és NOX4 gének. Mintákat gyűjtöttünk a NOX1-hez a vastagbélből, a NOX2-höz a lépéből, a NOX4-hez pedig a veséből, majd molekuláris biológiai módszerekkel klónoztuk és megszekvenáltuk a nevezett géneket. Megállapítottuk, hogy épek a NOX5 hiányos nyúlban a vizsgált NOX izoformák génjei.

KÖVETKEZTETÉSEK

- Kifejlesztettünk egy már kereskedelmi forgalomban is kapható, új, monoklonális, egér antitestet, amely specifikusan ismeri fel a humán NOX5 fehérjét Western blot és immunfestési eljárásokban.
- A NOX5 fehérjét túlermelő HEK293T sejtekben az enzim sejtmembrán és endoplazmás retikulum lokalizációt mutat.
- Az endogén NOX5-öt tartalmazó UACC-257 melanóma sejtekben az enzim szintén endoplazmás retikulum és sejtmembrán lokalizációt mutat. Kimutattuk, hogy a melanóma sejtek NOX5 fehérjéje képes szuperoxidot előállítani TRPV4 csatorna agonista GSK és SERCA inhibitor thapsigargin hatására.
- Elsőként mutattuk ki a NOX5 fehérjét humán here, lép és petefészek mintákban.
- A herében a NOX5-öt döntően a spermatogenezisben résztvevő sejtek fejezik ki és nem az érett spermiumok.
- A lépben a NOX5 forrása az endotélsejtek.
- Az általunk vizsgált humán vaszkuláris primer sejtekben nem volt kimutatható a NOX5 fehérjeszinten.
- A NOX5 hiányos nyulainkban nem sérültek a NOX1, NOX2 és NOX4 gének.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

1. Szeles Z, Petheő GL, Szikora B, Kacs Kovics I, Geiszt M. A novel monoclonal antibody reveals the enrichment of NADPH oxidase 5 in human splenic endothelial cells. *Sci Rep.* 2023;13(1):17174. IF: 4.6

2. Petheő GL, Kerekes A, Mihálffy M, Donkó Á, Bodrogi L, Skoda G, Baráth M, Hoffmann OI, **Szeles Z,** Balázs B, Sirokmány G, Fábíán JR, Tóth ZE, Baksa I, Kacs Kovics I, Hunyady L, Hiripi L, Bősze Z, Geiszt M. Disruption of the NOX5 Gene Aggravates Atherosclerosis in Rabbits. *Circ Res.* 2021;128(9):1320-1322. IF: 23.218

