

Zárójelentés

OTKA T037656

A relaxin hatása a progresszív vesefibrózisra alb/relaxin transzgenikus egerekben

Tudományos háttér:

A krónikus vesebetegségek évek évtizedek leforgása alatt végstádiumú veseelégtelenséghez (End Stage Renal Disease: ESRD) vezetnek. Függetlenül a vesebetegséget elindító kórfolyamattól, az ESRD kialakulásának hátterében patológiailag a progresszív vesefibrózis folyamata áll. Fiziológias körülmények között a renális extracelluláris mátrix (ECM) dinamikus egyensúlyban van, melyet két folyamat tart fenn. Az egyik az ECM komponensek szintézise a másik azok lebontása a matrix metalloproteázok (MMP) és a plazminogén aktivátor-plazmin rendszer által. A matrix lebontását végző MMP-k (kollagenázok, zselatinázok) aktivitását egyrészt szöveti mennyiségük, másrészt az MMP-k aktivitását gátló TIMP-ek (tissue inhibitors of metalloproteinases) jelenléte határozza meg. Vesefibrózis kialakulása során a matrix dinamikus egyensúlya megbomlik: a mátrix fehérjék expressziója fokozódik és csökken az MMP-k aktivitása

A relaxin:

A relaxin az inzulin hormoncsaládba tartozó, 6 kDa méretű, A és B láncból álló diszulfid hidakkal összekapcsolt peptid. Lényeges, hogy nemcsak a relaxin molekulának, hanem a prorelaxinnak is van biológiai aktivitása. Fiziológiásan a terhesség harmadik trimeszterében választódik el a legnagyobb mennyiségben a corpus luteum által. A hormon jelen van mindkét nem agyában és szívében is, ahol szerepe még nem teljesen tisztázott. A relaxin legfontosabb hatása a szülőcsatorna simaizomzatának és kötőszöveti állományának felkészítése a szülésre. Hatására az extracelluláris mátrix lebontása következik be, csökkenti a mátrix fehérjék szintézisét, fokozza a mátrix degradációt okozó mátrix metalloproteináz (MMP) enzimrendszer termelését és aktivitását. Hasonló mátrixmobilizáló hatását dermális fibroblasztokban is igazolták. A relaxin az érfal simaizomzatában fokozza az NO termelést, valamint szelektív renális vazodilatációt okoz továbbá patkány szív ischémiás károsodásával szemben védő hatású. Fibroblastokon bizonyított a relaxin receptor jelenléte mindkét nemből. Terhességben kimutatták a relaxin immunmoduláns hatását is. A relaxin a vese hiperfiltrációját okozza, melyet két tény is alátámaszt: 1) a megtermékenyítés után a relaxin plazma szint párhuzamosan emelkedik a glomeruláris filtrációs ráta fokozódásával (GFR) az első trimeszter során, 2) a menstruációs ciklus luteális fázisában szintén párhuzamosan emelkedik a plazma relaxin szint és a GFR. Vesefibrózis modellben bizonyították exogén relaxin antifibrotikus hatását is. Relaxin transzgenikus állatmodel hiányában olyan eredmények eddig nem voltak amelyek az endogén relaxin megváltoztatott szintjének hatását vizsgálták volna. A relaxin hosszantartó, krónikus adagolása kísérletes állatmodellekben szinte megoldhatatlan problémát jelent, mivel rövid a fehérje félféltideje, a krónikus kanül vagy a rendszeres injektálás, de még az ozmotikus minipumpa műtéti cseréje is megviseli az állatokat.

Kutatásunk célja:

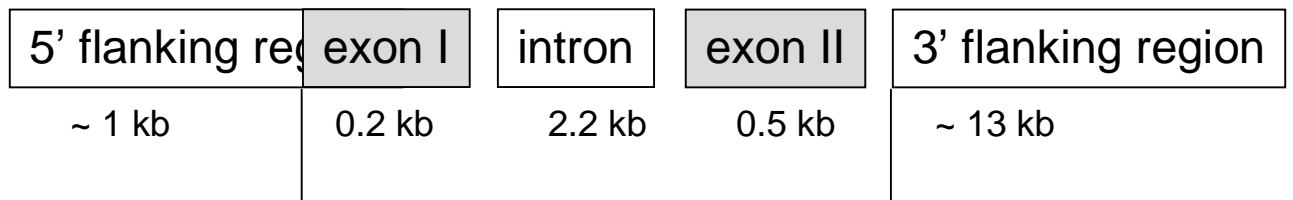
Hipotézisünk szerint a relaxin csökkenti renális fibrózis kialakulását ezért vizsgálni kívántuk a relaxinnak a veseműködésre illetve a vesefibrózisra kifejtett hatását. Ezért a relaxin in vivo hatásának vizsgálatára relaxin transzgenikus egereket hozunk létre,

melyekben az egér albumin promóter és enhancer irányítása alatt expresszálódik a transzgén.

Eredményeink

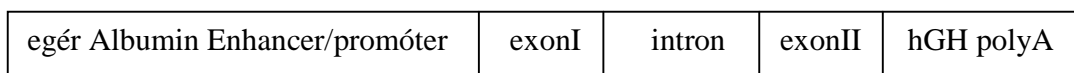
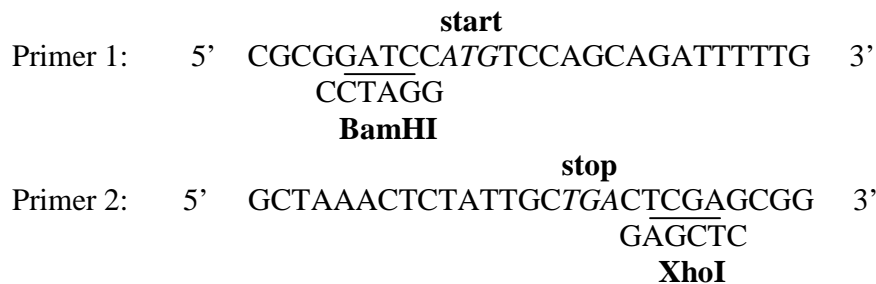
Az alb/relaxin transzgén egér létrehozása:

A transzgén hepatikus expressziójához az egér albumin enhancert és promótert (2.3kb) használtuk. Poliadenilációs szignálként a humán növekedési hormon (hGH) poliadenilációs régióját klónoztuk a konstruktba. Az egér genomikus DNS-ből PCR reakcióval amplifikáltuk a relaxin gén start és stop kodon közötti 4.2 kb méretű szekvenciáját, mely tartalmazta a gén egyetlen intronját is. Az intron jelenléte a transzgénben nagymértékben fokozza a transzgén expressziójának biztonságát. A PCR primereket úgy terveztük meg, hogy a reakció során egyben létrejöjjön az ampikon 5' végén a BamHI, a 3' végén az XhoI restriktív enzimre jellemző palindromikus szekvencia. Így a sikeres PCR reakció után a fenti enzimekkel történő kettős emésztés biztosította az albumin promóter 3' vége és a hGH 5' vége közé irányuló direkcionális klónozáshoz szükséges restriktív szekvenciák jelenlétét. A PCR reakcióhoz Vent DNS polimerázt használtunk, melynek „proofreading” tulajdonsága biztosítja a hibamentes amplifikációt. A transzgén teljes szekvenálásával ellenőriztük a klónozás, illetve az amplifikáció pontosságát. A transzgén végső tisztítását elektroelúcióval végeztük, mely a legnagyobb tisztaságot és a legminimálisabb fragmentálódást okozza.



Primer 1 (BamHI)

Primer 2 (XhoI)



A transzgén

Az alb/EGFP/relaxin transzgenikus egerek létrehozása:

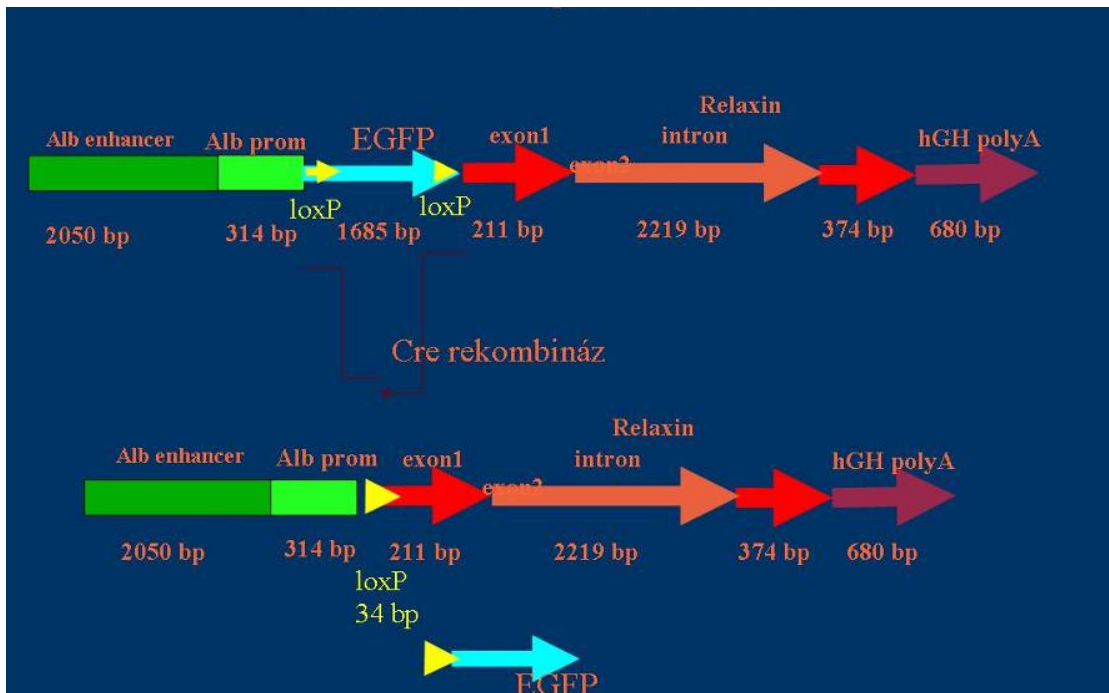
A transzgenikus technika során a transzgenben szereplő szabályozó régiók szabják meg a kódoló szekvencia expresszióját: így befolyásolják a transzgenikus fehérje térbeli-időbeli megjelenését. A hagyományos transzgenikus technikának köszönhetően sokféle endogén fehérje expressziójának sajátosságait „lemásolhatjuk“, ugyanakkor nem lehetséges minden elképzelhető expressziós mintázat kialakítása. A kísérletes körülmények sok esetben –így esetünkben is- további igényeket támasztanak. Pl. Jelen esetben az albumin promotor segítségével a transzgen expresszióját sikerült a májsejtekre korlátozni, de az expresszió időbeliségét szinte lehetetlen volt ezáltal befolyásolni. Ugyanakkor az indukált vesebetegség modelljeinkben elsődleges lenne a relaxin hatását úgy vizsgálni, hogy csak a betegség iniciációja, kialakulása után induljon meg a relaxin expressziója.

A másik probléma a hagyományos transzgenikus modelleknél a kontroll állatok megválasztásában rejlik. Mivel a transzgen integrálódásával esetleg a szomszédos genomikus DNS expresszálódásában is változást okoz, a transzgen „javára“ írható változások között így nemcsak olyan eltérések mutakozhatnak, amik az expresszált transzgenikus fehérje következményei. Ez megnehezíti az eredmények értelmezését, és ezért klasszikus felfogás szerint ahhoz, hogy egy fenotípusbeli eltérést a transzgenikus fehérje következményének tulajdoníthassunk, szükséges, hogy több transzgenikus vonalat is generáljunk, (melyek eltérő integrációs hellyel rendelkeznek,) és bennük azonos fenotípust detektáljunk.

Ezek gondok részben csökkenthetőek egy bonyolultabb, indukálható transzgenikus rendszer esetében. Ennek a módszernek számos típusa ismert, de a gyakorlatban a a Cre/lox rendszer alkalmazása vált a legelterjedtebb technikává, számos előnyének köszönhetően. A Cre rekombináz egyik legfontosabb működése az, hogy mint “hely-specifikus rekombináz” saját felismerési szekvenciáját (loxP) felismeri, és két viszonylag közel eső (pár kilobázis távolságra lévő) felismerési szekvencia közötti DNS szakasz eltávolítását katalizálja, míg egy felismerési szekvenciát hátrahagyva a genomban a DNS szálakat egyesíti. Így érthető, hogy indukálható rendszerek alakíthatók mi, melyekben pl. a relaxin transzgen expresszióját azzal “késleltetjük”, hogy kódoló szekvenciája elé egy loxP szekvenciákkal körülvett eltérő transzgenikus szekvenciát iktatunk be, melynek STOP kodonja lehetlenné teszi, hogy a tőle “downstream” (3') elhelyezkedő relaxin szekvencia expresszálódjon, mindaddig, míg a Cre rekombináz ezt a beiktatott DNS szekvenciát el nem távolítja. A közbeiktatott szekvencia jól használható pl. egy “reporter” fehérje expresszáltatására, hogy a transzgenikus egyedek felismerése könnyebb legyen. Így esetünkben a zöld fluoreszkáló fehérje (GFP, EGFP) került felhasználásra. A Cre rekombináz expressziójának szabályozása szerencsére, a rendszer elterjedtségéből adódóan, nem jelentett további költségeket, hiszen számos Cre transzgenikus egértörzs beszerezhető, melyekben a Cre rekombináz expressziója jól karakterizált. Mi a kísérleti rendszerünkben alapvetően 2 Cre transzgenikus egértörzs felhasználását terveztük: 1) EIIa/cre transzgenikus egerekben a Cre rekombináz már a megtermékenyített petesejtben is aktív, így ez teljesen eltávolítja a loxP szekvenciák közé iktatott DNS szekvenciát az utódban, 2) Mx1/Cre transzgenikus egerekben a Cre mindaddig nem expresszálódik, míg egy interferon-alpha injekciót nem adunk az állatnak, és azt követően főleg a májra korlátozódik. Az első Cre transzgenikus egérrel keresztezve az indukálható relaxin transzgenikus egértörzset egy új transzgenikus

egértörzset is nyertünk, mely abban tér el a alb/relaxin transzgenikus egerektől, hogy egyetlen loxP (33 bp) szekvenciával hosszabb a transzgenikus allél, viszont rendelkezik egy kontroll törzzsel (az eredeti Alb/EGFP/relaxin transzgenikus egértörzs), melyhez képest az EGFP kódoló szekvenciájával rövidebb transzgenikus allél van jelen a genomjában, azonos lokuszon: az eltérés a relaxin (vagy EGFP) expressziója közöttük. A Mx1 Cre esetében csak a szomatikus sejtekben történik rekombináció, így az nem jár átörökíthető rekombinációval. Viszont az eredeti egértörzs vehikulummal kezelt egyedei ebben az esetben is tökéletes kontroll állatok.

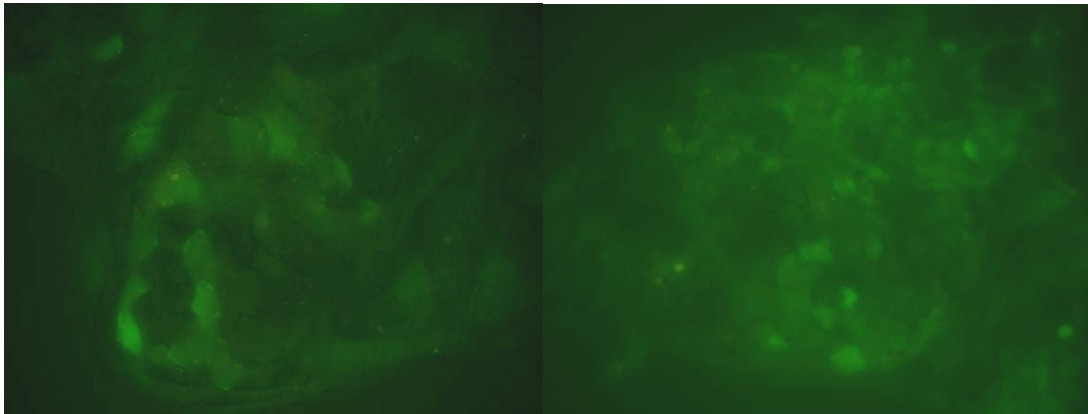
Egy olyan új transzgenikus egértörzset hoztunk létre, amiben a Cre/lox rendszer segítségével tudunk egy új funkciót, egy fehérje termelését elindítani. Ebben az egértörzsben a promoter régiót követően helytel az EGFP kódoló szakasz következik, melyet két loxP hely vesz körül, majd a relaxint kódoló szakasz következik. A transzgénről készült RNS transzkriptum tartalmazza a másik gén kódoló szakaszát is, mivel polyadenilációs szignál csak a második fehérje kódoló szakasza után van jelen, de fehérje nem készül róla.



A loxolt alb/EGFP/Relaxin transzgén működése.

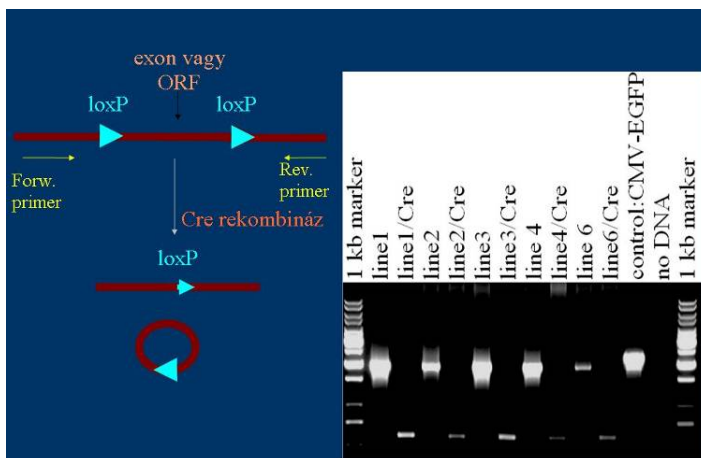
A transzgén in vitro tesztelése:

A transzgén konstrukció biológiai ellenőrzését tranziens transzfekcióval végezzük. Mivel célunk a hepatikus expresszió ezért májsejtvonalat válsztottunk: Hep G2 (hepatoblastoma) sejtvonalat. A sejtek tranziens transzfekcióját követően fluoreszcens mikroszkóppal detektáltuk a zöld fluoreszcens proteint a sejtek citoplazmájában.



Az ábrán a pcDNA-EGFP plazmiddal stabilan transzfektált sejtek fluoreszcens mikroszkópos képe látható 630-szoros, ill. 400-szoros nagyítás mellett.

Tranziens transzekció pcDNA-Cre-vel, DNS izolálás a Cre hatás detekciója PCR-ral. A pcDNA-EGFP vektorral stabilan transzfektált sejteket szelekciós ágenszt (geneticint) nem tartalmazó médiummal osztottuk le, majd 50-70% konfluenciánál a sejteket pcDNA-Cre expressziós plazmiddal tranziensen transzfektáltuk. 48 órával a transzekciót követően a sejtekből genomiális DNS-t izoláltunk. A DNS izolálásához a sejteket proteináz K tartalmú lízis pufferban inkubáltuk, majd fenol-kloroform extrakcióval a DNS-t kivontuk. A precipitációt és mosást követően Tris-EDTA pufferban oldottuk fel az izolált DNS-t és PCR-t (polimeráz lánc reakciót) használtunk a genotipizáláshoz. A PCR-hoz olyan primerpárt terveztünk, amelynek „forward” primere a CMV promoterre, a „reverse” primere az EGFP-től 3’ irányban elhelyezkedő polyadenilációs szignálra specifikus. A PCR reakció mindegyik klón esetében ugyanazt eredményezte: a (pcDNA-EGFP-vel) stabilan transzfektált sejtek DNS-e egy kb. 2.2 kb (kilobázis) méretű amplikont eredményezett, míg a Cre rekombinázt kódoló plazmiddal történt transzekciót követően mindegyik klón utódaiból izolált DNS 600 bp (bázispár) hosszúságú terméket eredményezett. Ez azt jelenti, hogy a Cre rekombinázt minden klón esetében létrehozta a rekombinációt: 2.2 kb-0.6 kb=1.6 kb méretű DNS szakaszt távolított el, ami pontosan az EGFP-t kódoló, két loxP hellyel körülvett DNS hossza.



A stabilan transzjektált sejteket tranziensen transzjektáltuk pcDNA-Cre plazmival, majd genomális DNS-t vontunk ki, és genotipizáltuk a kolóniákat. Az első és utolsó sávban 1 kb marker futott. A következő 5 sávpárban az első mindig a pcDNA-Crevel nem transzjektált sejtekből, míg a második a Cre-vel transzjektált sejtekből származó DNS-ről készült PCR amplikon képe. Kettővel a jobb oldali marker előtt a pcDNA-EGFP plazmidot használó reakció amplikonja szerepel, mint pozitív kontroll, és az utolsó előtti sávban a negatív kontroll szerepe (DNS mentes). Mint látható minden kolónia esetén megtörtént az excísió, és 1.6 kb-vel kisebb amplikont eredményezett a reakció.

A mikroinjektálás:

A transzgenikus konstruktokat kollaborátorunk - Dr Jeffrey Kopp (NIDDK/NIH) vezette laboratóriumban mikroinjektálták. Háttérörzsként az FVB/N beltenyésztett egereket használtuk.

A transzgenikus és vad típusú egérvonalak fenntartása, tenyésztése:

A mikroinjektálást követően négy új transzgenikus vonalat tartottunk fent:

- 5853 WT - vad típusú
- 5848 alb/Relaxin - relaxin transzgenikus
- 5860 alb/loxP EGFP loxP/Relaxin - EGFP-relaxin transzgenikus
- 5855 alb/loxP EGFP loxP/Relaxin - EGFP-relaxin transzgenikus

Létrehozunk továbbá egy újabb relaxin transzgenikus vonalat:

-5860 alb/loxP/Relaxin: Ezt a vonalat az 5860 alb/loxP EGFP loxP/Relaxin egereknek a EIIa/CRE transzgenikus egerekkel való keresztezésével hoztuk létre.

Homozigóta vonal:

-Homozigóta 5848 alb/Relaxin - Heterozigóta egyedek keresztezésével létrehoztunk homozigóta transzgenikus egyedeket is az 5848-as vonalból.

A folyamatos tenyésztéshez és a keresztezéshez fenntartottuk az alábbi vonalakat is:

- FVB/N vad típusú egerek
- C57Bl6 vad típusú egerek
- EIIa/CRE-transzgenikus egerek
- Alb/TGF-beta transzgenikus vonal fenntartása és folyamatos visszakeresztezése a C57Bl6 háttérre (ennek részleteit később ismertetjük)

Így összességében *hat új transzgenikus egérvonalat hoztunk létre* és karakterizáltunk a pályázat ideje alatt. További négy vad típusú vonalat tartottunk fent a tenyésztéshez.

Az állatok tartási körülményei: Kutatásainkat nagymértékben megnehezítette, hogy a pályázat ideje alatt sajnos nem volt megfelelő méretű és színvonalú állatház a Semmelweis Egyetem Nagyvárad téri elméleti tömbjében. Az időközben érvénybelépő szigorú nemzetközi EU szabványok nem tettek lehetővé köztes megoldás kialakítását. (Az állattartás feltételeinek nehézségeit és a 2006 végére megvalósult kedvező fordulatot a jelentés végén részletesen ki fogom fejteni.)

A megfelelő állatház hiányában szükséges volt egy külön állatszoba kialakítása annak érdekében, hogy megvédjük az állatokat az esetleges fertőzésektől. Ebben az

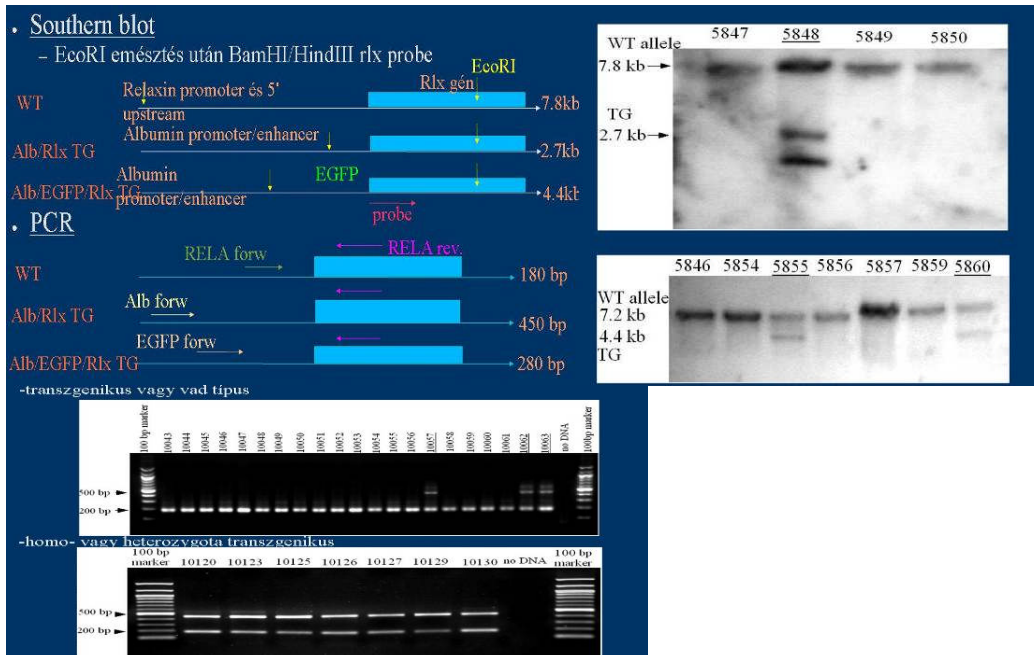
állatszobában biztosítottuk a 12 órás fény-sötét ciklust és a megfelelő 21⁰C hőmérsékletet.

Genotipizálás:

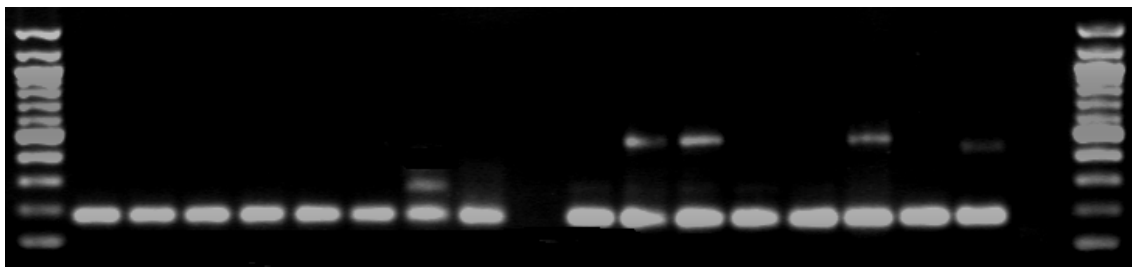
A transzgenikus vonalak tenyésztése során az egerek genotipizálását farok szövetből kivont DNS-ből Southern blottal illetve specifikus PCR primerek segítségével végezzük. Itt ismertetjük a Cre rendszer in vivo rekombinációjával kapcsolatos eredményeinket is.

Cre rekombináz mediált in vivo rekombináció. A Cre/lox rendszer in vitro működésének ellenőrzése mellett in vivo használatában is gyakorlatunk van. Létrehoztunk egy olyan új transzgenikus egértörzset, amiben a Cre/lox rendszer segítségével tudunk egy új funkciót, egy fehérje termelését elindítani. Ebben az egértörzsből a promotor régiót követően az EGFP kódoló szakasz következik, melyet két loxP hely vesz körül, majd egy másik fehérjét kódoló szakasz következik. A transzgenről készült RNS transzkriptum tartalmazza a másik gén kódoló szakaszát is, mivel polyadenilációs szignál csak a második fehérje kódoló szakasza után van jelen, de fehérje nem készül róla. A transzgen expresszióját RT-PCR-rel is megerősítettük. (lásd 4. ábra) Két transzgenikus vonalat választottunk ki Southern blottal, melyekben a transzgen másolat száma 1, amire a Cre rekombináz működésének felhasználása miatt van szükség. (lásd 4. ábra)

Ezt követően ezeket az egereket olyan Cre transzgenikus egerekkel kereszteztük, melyekben a Cre rekombináz expresszióját az EIIa promotor vezérli. Ennek megfelelően a Cre expresszió már egysejtes embriókban is folyik, és a másik transzgen rekombinációja ebben a korai stádiumban megtörténik. Ennek köszönhetően a megszülető utódok az apai és anyai alléltól eltérő: teljesen új allélt fognak viselni, mely minden egyes sejtjükben jelen lesz, ezért germinális transzmisszióját eredményezi az új allélnak. A két egértörzs keresztezéséből született egerek genotipizálásánál egyrészt ellenőriztük az apától származó „loxolt” allél eltűnését az utódokban, másrészt megerősítettük az új mutáció megjelenését. Pozitív kontrollnak egy másik transzgenikus egértörzs egyedének DNS mintáját használtuk. Ebben a törzsből a transzgen a „loxolt” EGFP-vel is rendelkező transzgenikus törzstől annyiban tér el, hogy egyáltalán nem tartalmazza az EGFP és a loxP szekvenciákat. Ezért ez az allél és az rekombináció segítségével készített egerek mutációja abban tér el, hogy a Cre mediált rekombináció révén kialakított allél egy loxP helyet is tartalmaz, mely 34 bázispár hosszúságú. Kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy mindkét „loxolt” vonalon megtörténik a rekombináció a Cre rekombináz jelenlétében: 34 bázispárral hosszabb mutáns allélt viselő egyedek jöttek a keresztezésből, mely allél egyik szülőben sem volt jelen. Az apai loxolt allélt nem sikerült amplifikálni, mivel az egyetlen sejtben sincs jelen. (5. ábra)



Az ábra felső részén Southern blot képe látható. A transzgén az egérben normálisan is jelenlevő fehérjéj kódol, de eltérő a promotere, ezért a genomialis allélnak felel meg a felső csík (7.8 kb méretű), míg a (4.4 kb méretű) alsó csík a transzgén. A felső bloton az 5848-as állat, alsón az ötödik (5855) és kilencedik (5860) minta transzgenikus egérből származik. Denzitometriás mérés alapján, mindkét állatban egy transzgén kópia van jelen. Az ábra alsó részén PCR-rel történő genotipizálás képe látható, mely alkalmasnak bizonyult a heterozygota és a homozigóta állatok elkülönítésére is.

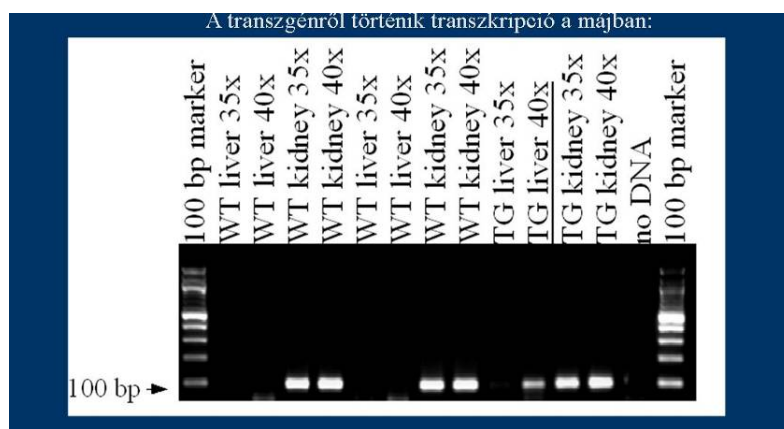


Az ábra a Cre rekombináz in vivo működését mutatja: a "loxolt" allélt viselő transzgenikus egér keresztezése a EIIa/Cre transzgenikus egerekkel. A keresztezésből származó egyik alom 6 egeret eredményezett. Ezekből származó DNS minta genotipizálásához két PCR reakciót használtunk. Az első reakció az apai allél (280bp) amplifikálását kellene, hogy eredményezze, ha valamelyik egér ezt örökölné. Mint látható a 100 bp marker utáni hat mintában nem készült amplikon erről az allélról, csak a vad típusú kontroll amplikon készült el (alsó 180 bp csík), a következő minta az apa, akiben jelen van a 280bp-os amplikont eredményező allél. Ezt követi a másik transzgenikus törzsből származó minta, akiben nincs loxolva ugyanez a transzgén: benne is csak a 180 bp-os termék látható, majd a negatív kontroll sávja következik, ahol nincs amplikon. Ettől jobbra következnek a másik PCR reakció termékei. Itt a rekombináció révén létrejött, nem loxolt allélról készül egy 482 bp nagyságú amplikon, illetve 448 bp nagyságú a kontrollnak használt loxP szekvenciót nem tartalmazó transzgénről. A hat utód közül a 2., a 3. és a 6. transzgenikus, majd az apai DNS következik melyről nem készül ilyen méretű termék. Ettől jobbra látszik a másik törzsből származó minta, melyről az előbbieknél 34 bp-ral kisebb amplikon készült, végül a DNS mentes, negatív kontroll.

Súlygyarapodás: Feljegyeztük a állatok súlyát és nem volt szignifikáns eltérés a relaxin transzgenikus és vad típusú állatok súlygyarapodása között.

Túlélési görbe: Feljegyeztük az egerek születési és természetes elhullási dátumát, melyből a túlélési görbe meghatározható volt. Nem volt szignifikáns eltérés a relaxin transzgenikus és vad típusú állatok túlélése között.

Transzgén expresszió meghatározása: A transzgenikus egerek májából kivont teljes RNS mintán elvégzett Northern blottal illetve RT-PCR reakcióval is bizonyítottuk a relaxin transzgén expresszióját. Kontrollként vad típusú egerek májából kivont RNS-t használtunk, melyben természetesen nem volt kimutatható a relaxin expresszió.



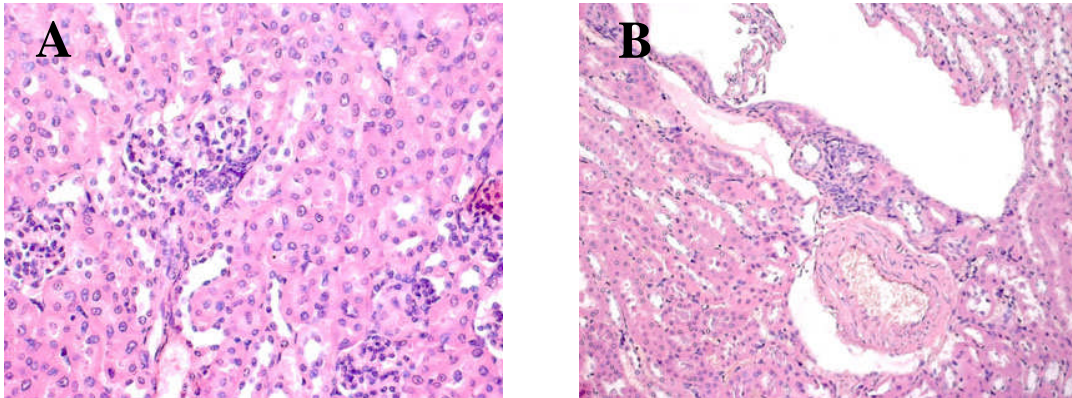
Az ábra RT-PCR után az ampliconok gél elektroforézises képét mutatja. A két szélső sávban 100 bp marker futott. A következő kétszer négy sáv nem transzgenikus egérből származó RNS templárról készült, mely a májból (2,3, 6,7), ill. veséből (4,5,8,9) származott. A 10-11. sávban transzgenikus egérből származó máj RNS, míg 12-13. vese RNS volt a templát. Az azonos szövetből származó, egymás melletti minták esetében különböző ciklusszámban (35 ill. 40) futott a reakció. A transzgenikus egerek májában is expresszáldott a transzgén által kódolt fehérje RNS-e, de viszonylag kis mennyiségben, mert csak 40 ciklus után volt látható amplicon. A nem transzgenikus egerek esetében csak aspecifikusan képződő primer dimerek amplifikálódtak.

Funkcionális mérések: A vesefunkció meghatározására maradék nitrogén mérést (BUN) végtünk, mert egérben a szérum kreatininnél szenzitívebben jelzi krónikus vesebetegség megjelenését. A glomeruláris permeabilitás és tubuláris funkció vizsgálatára a vizelet protein/kreatinin arányának meghatározását végeztük. Fiatal relaxin transzgenikus egerekben nem találtunk funkcionális eltérést. Az idős 14-20 hónapos állatok adatai feldolgozás alatt vannak. Ezekben a szövettani kép alapján romló funkcionális értékek várhatók.

Szövettani értékelés: Formalin fixált és parafin beágyazott szövetekből végeztük az értékelést:

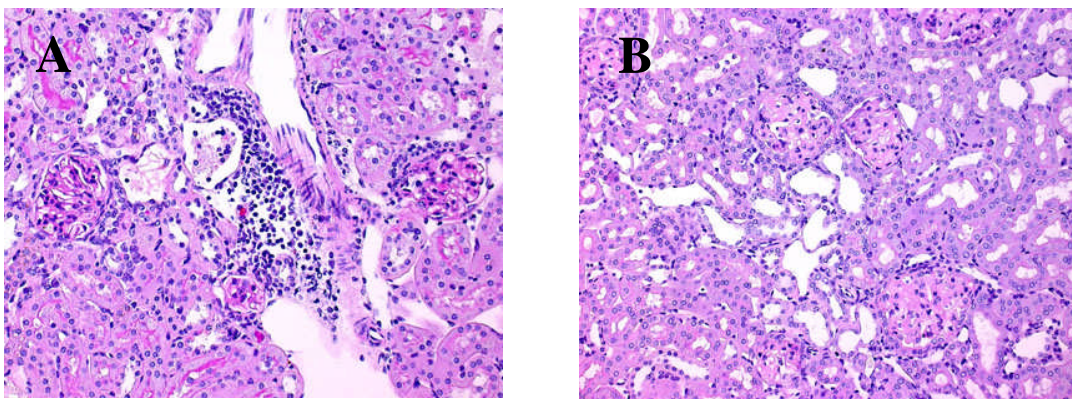
Vese: A vesék PAS festéssel történő szövettani feldolgozása során mononukleáris sejtes infiltrációt figyeltünk meg már 2 hetes kortól kezdődően. Az infiltráció a születés utáni első 2 hónapban főleg periglomeruláris elhelyezkedésű, kis kiterjedésű ám számos gócból áll. Ezt a fenotípust mind a vad típusú, mind a transzgenikus állatokban megfigyeltük, nőstényekben és hímekben egyaránt. Ugyanakkor ebben a korai stádiumban (1-2 hónapos

kor) a relaxin transzgenikus vesékben tendenciájában nagyobb mértékű infiltrációt detektáltunk. Ezt a váratlan fenotípust részben magyarázhatja a relaxin közelmúltban leírt hatása, mely szerint fokozza a monociták adhézióját és MCP-1 iránti érzékenységet. Eredményeink szerint az infiltráció progrediál, és egy- illetve két éves korú állatokban már eltűnik a vad típusú és transzgenikus állatok között kezdetben még látható különbség. Az infiltráció további vizsgálatára folyamatban van egér makrofág ellenes antitest (Serotec) valamint anti-CD3 antitest (Dako) segítségével az immunhisztokémiai festések optimalizálása.



Periglomeruláris infiltráció 1 hónapos (A) ill. perivaszkuláris beszűrődés 2 hónapos (B) transzgenikus hím egér veséjében (HE festés).

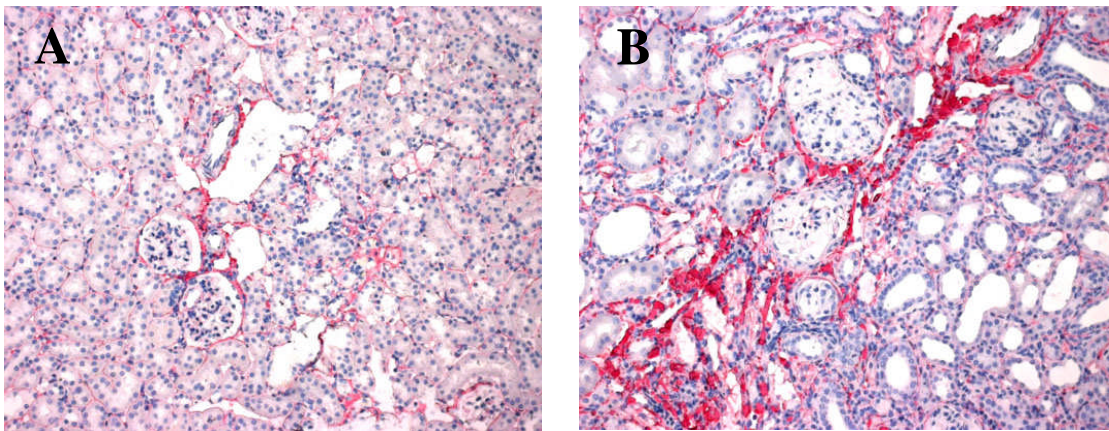
A glomerulosclerosis jellemzésére az el Nahas által leírt score rendszert használtuk. Eredményeink szerint a fiatal (1-2 hónapos) állatokban nem látható glomeruláris károsodás. Ezzel szemben 9 hónapos kortól a glomerulusok egy részében megfigyelhető a kapilláris kacsok kitapadása a Bowman-tokhoz, és néhány transzgenikus vesében elszórtan hipercelluláris glomerulusok is láthatók. Két éves korban már jelentős glomerulosclerosis látható a vad típusú egerekben is, elsősorban mesangiális sejtszaporulattal és mátrix expanzióval. Ugyanakkor az azonos korú relaxin transzgenikus vesékben közel kétszer súlyosabb glomeruláris hegesedést láttunk, nem ritkán 75%-ban vagy teljesen obliterált glomerulusokkal.



A: Közepes súlyosságú glomerulosclerosis 2 éves vad típusú vesében (jelentős perivaszkuláris beszűrődéssel). B: Kiterjedt, súlyos glomerulosclerosis 2 éves transzgenikus vesében (kb. 90%-os obliteráció), PAS festés.

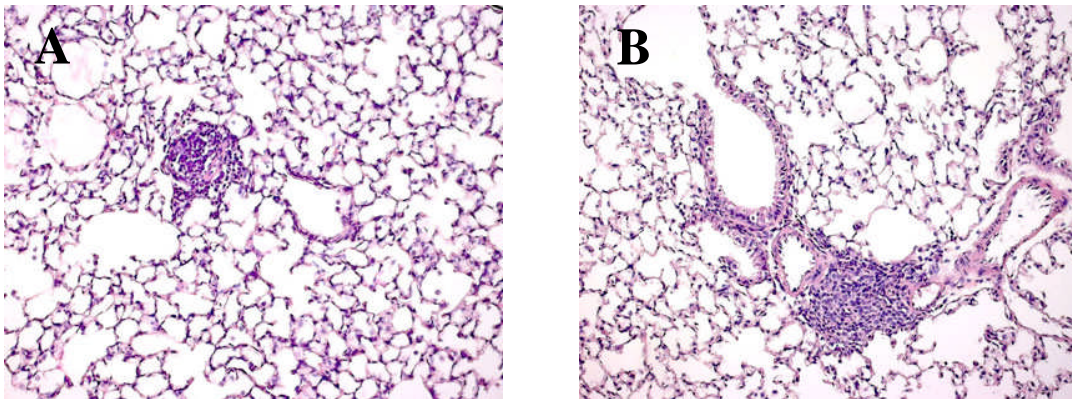
A lehetséges tubuláris károsodás jelenlétét szintén az irodalomból jól ismert score rendszerrel mértük. Elsősorban a tubulusok dilatációját, tubulus hámsejtek leválását és intraluminális hyalin jelenlétét vizsgáltuk. Érdekes, hogy a vad típusú egerek veséjében nem találtunk semmilyen tubulus károsodásra utaló jelet a teljes vizsgált élettartamban (2 hetestől 2 éves korig). Ugyanakkor a relaxin transzgenikus vesékben egyéves korban már megjelenik egy nagyon enyhe hyalin lerakódás, mely 2 éves korra kiegészül jelentős dilatációval és néhol a tubulus sejtek leválásával is.

A tubulointerstíciális károsodást fibronectin immunhisztokémiával is igazoltuk. A transzgenikus egerekben jelentős mértékű tubulointerstíciális fibronectin festődést találtunk, a vad típusú vesékben enyhébb volt a fibrózis.



Fibronectin fesződés 1.5 éves vad típusú (A) ill. Transzgenikus (B) vesében.

Tüdő: A transzgenikus egerek tüdejében már igen korán megjelenik körülírt perivaszkuláris infiltráció, 2 hetes állatokban ez a folyamat már jól detektálható.



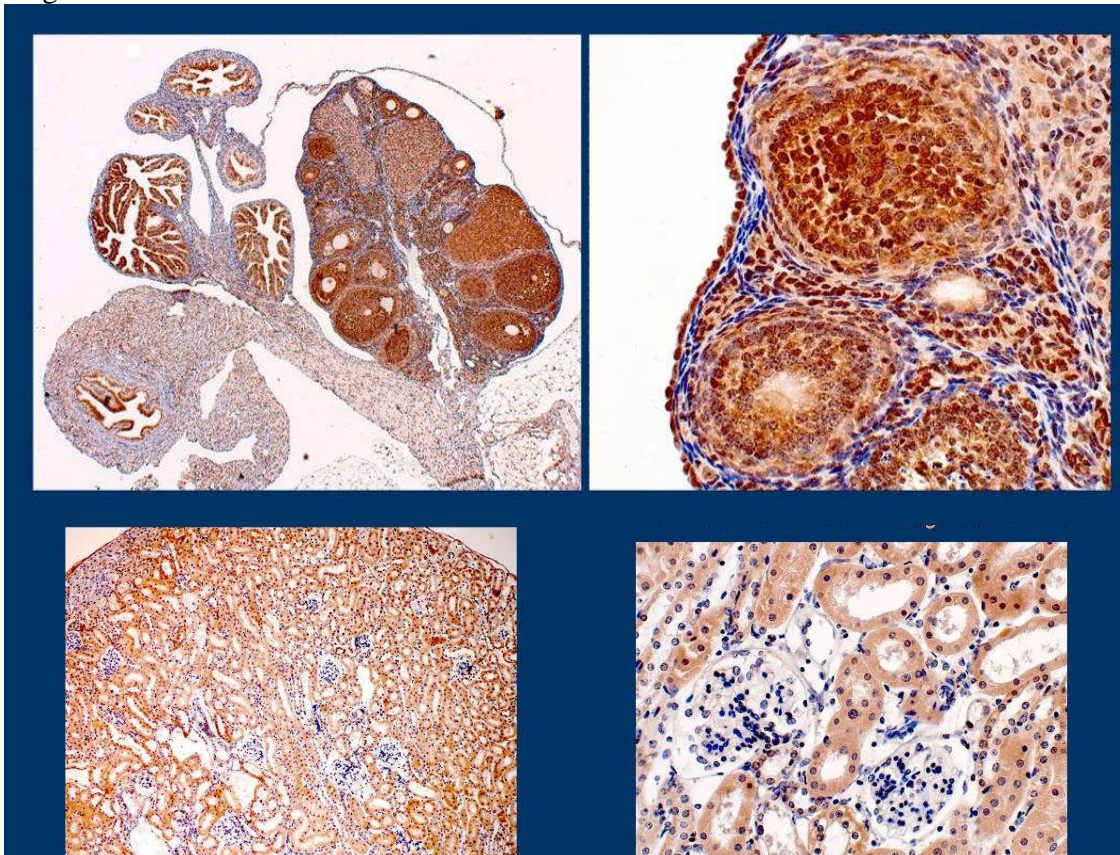
A: kezdődő beszűrődés 2 hetes transzgenikus egér tüdejében. B: Kiterjedt perivaszkuláris infiltráció 4 hónapos egérben (HE festés).

Az emlő, ovarium, here szövet szövettani értékelése során rutin festéssel vizsgált transzgenikus vonalban nem találtunk szövettani eltérést. A májszövetben a fiatal relaxin transzgenikus egerekben csökkent PAS pozitivitást figyeltünk meg.

Relaxin meghatározás: Northern blottal és RT-PCR-rel kimutattuk a transzgenikus egerek májában a transzgén – a relaxin mRNS expresszióját. A cirkulált relaxin szint méréséhez relaxin EIA kit-et használtunk a kellő számú minta összegyűjtése után. A használt relaxin EIA kit detekciós határa kb 10 pg/ml. Sajnos nincsen forgalomban olyan relaxin ELISA kit mely egér relaxinra lenne specifikus. Idősebb transzgenikus állatban találtunk határozottan megemelkedett szérumban relaxin szintet.

A szenzitivitás fokozásának érdekében jelenleg végezzük annak a közelmúltban publikált bioassay-nak a beállítását, melynek során T293-as sejteket transziensen transzfektálunk LGR7 receptorral, majd a vad típusú illetve transzgenikus állatok szérumának hozzáadása után mérjük a cAMP aktivitást. Optimalizálnunk kell a LGR7 transzfekciót annak érdekében, hogy a transzfekciós hatékonyság különbségei ne befolyásolják a mért cAMP aktivitását.

A relaxin lokalizálása a vesében immunhisztokémiai vizsgálattal. A relaxin kimutatásának érdekében immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk transzgenikus és vad típusú egerekben. A vese endogén relaxin expressziója, a relaxin receptorok jelenléte megerősíti a relaxin lokális antifibrotikus hatását a vesében.

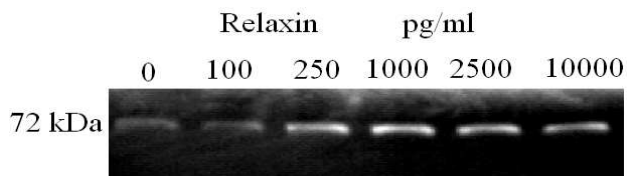


A relaxin detekciója immunhisztokémiai vizsgálattal. A felső két képen a relaxin detekciójához pozitív

kontrollként szolgáló ovarium és tuba uterina látható, míg az alsó képen a relaxin immunodetekciója szerepel a vesében.

In vitro assay a relaxin MMP aktivitást fokozó hatásának vizsgálatára:

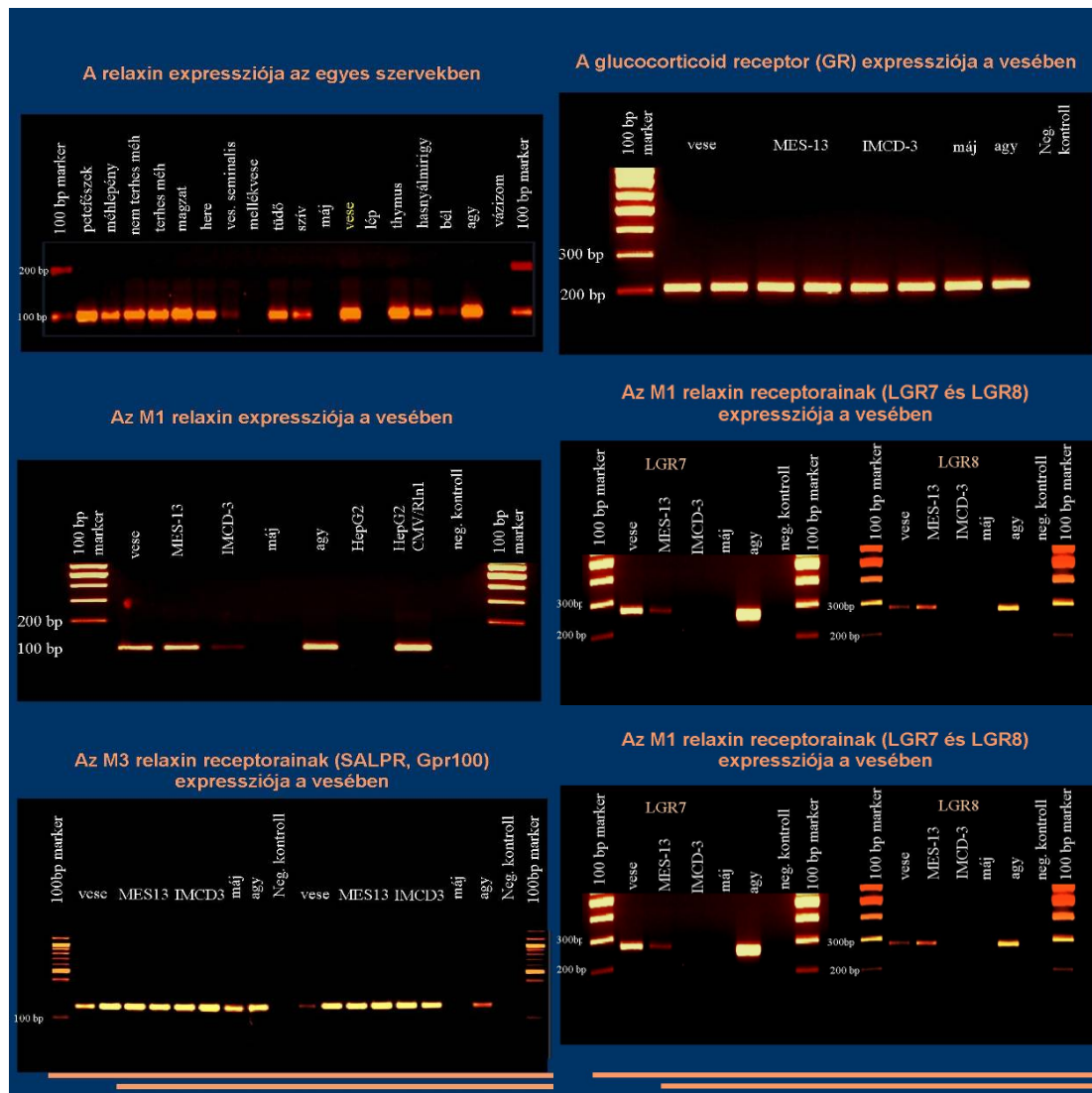
A relaxin képes a mátrixbontó enzimek aktivitását növelni. Ezáltal az extracelluláris mátrixban az egyensúlyt a mátrix lebontása felé tolja el. Mezangiális sejteket relaxinnal kezelve koncentrációfüggő zselatináz aktivitás figyeltünk meg zymogramon.



Ezek alapján feltételezhető, hogy progresszív vesebetegségben, amikor a veseszövet pusztulásnak indul, a lokális (renális) relaxin termelés csökkenése is hozzájárul az ECM rohamos felszaporodásához.

Relaxin receptorok meghatározása a vesében: Kutatásunk további célja volt annak meghatározása, hogy a vese termel-e relaxint, és ha igen, melyik izoformákat, illetve melyik relaxin receptorok vannak jelen a vesében, és azokat melyik sejtek termelik. Egér veséből, illetve mezangiális és gyűjtőcsatorna sejtvonalból izolált RNS-t használva templátként RT-PCR-t végeztünk M1 és M3 relaxinra, illetve LGR7-re, LGR-8-ra, SALPR-ra, Gpr100-ra és GR-ra. A relaxin szöveti jelenlétét immunhisztokémiai vizsgálattal erősítettük meg.

A relaxin izoformák közül csak az M1-et termeli a vese, az M3 relaxin expressziója a vesében nem kimutatható, M1 relaxin termelés van a mezangiális sejtekben, de a belső medulláris gyűjtőcsatorna sejtekben ez nem jellemző. Az M1 relaxin receptorai közül mindegyik forma jelen van (LGR7 és LGR8) a vesében, ill. a mezangiális sejtekben, de nem expresszálják őket a gyűjtőcsatorna sejtek. Az M3 relaxin receptorainak (SALPR és Gpr100) expressziója viszont mindenként vizsgált sejttípusban kimutatható. Hasonlóan minden sejtben kimutatható volt a GR expresszió. Immunhisztokémiai vizsgálattal a relaxin jelenléte kimutatható volt a vesében, vizsgálataink a hormon relatív diffúz jelenléte mellett szólnak fiziológiás körülmények között.



Megállapítjuk, hogy - korábbi közlésekkel ellentétben - a relaxin nemcsak a keringéssel kerül a vesébe, hanem helyben is termelődik. Így a keringési és antifibrotikus hatásában parakrin hatások is szerepet játszhatnak. A mindaddig tisztázatlan funkciójú H3, ill. M3 relaxin izoforma, bár nem termelődik a vesében, feltehetően itt is kifejti hatását, mert receptorainak széleskörű expressziója figyelhető meg; így felmerül a lehetőség, hogy ennek a hormonnak -a korábbi elképzelésektől eltérően- ne tisztán központi idegrendszeri funkciót tulajdonítsunk.

TGF-beta transzgenikus egerek:

Kísérletünk fontos részét képezi a relaxin és TGF-beta kettős transzgenikus egerekben kialakuló fibrózis vizsgálata. Ennek érdekében először el kellett végeznünk az alb/TGF transzgenikus egerek visszakeresztelését.

TGF-beta szerepe: A transzformáló növekedési faktor-beta (TGF- β) multifunkcionális citokin, melynek fontos szerepe van a fejlődésben, a sebgyógyulásban, immunfolyamatokban, haematopoezisben, carcinogenezisben, és a fibrózissal járó

folyamatokban. Az ECM felszaporodásában kulcsfontosságú szerepe van a TGF- β -nak. Progresszív fibrózissal járó vesebetegségekben fokozott a TGF- β expressziója. Humán adatok is igazolják, hogy az exogén TGF- β in vivo növeli az ECM fehérjék expresszióját a vesében és szövettanilag glomeruloszklerózishoz és tubulointersticiális fibrózishoz vezet.

Korábbi munkánk során megfigyeltük és leírtuk, hogy az albumin promóter és enhancer által irányított TGF- β transzgen hepatikus expressziója az albumin promóter fiziológias működésének megfelelően a születést követően indul meg. Ezekben a TGF- β transzgenikus egerekben a megemelkedett plazma TGF- β szint miatt progresszív vesefibrózis, és veseelégtelenség alakul ki, melynek következtében az állatok 25%-a elpusztul 15 hetes korukra. A kialakuló fibrózist a kollagén I és III valamint a dekorin és a biglikán mRNS és fehérje szintű expressziójának fokozódása jellemezte. A transzgenikus törzs létrehozásakor a transzgen konstruktot B6CBA (C57BL6 x CBA F1 egerek) zigótába injektálták és a transzgenikus vonalakat ugyanezen hibrid háttéren tartották fenn. A transzgenikus egerekben öt hetes korukra két élesen elkülönülő fenotípus alakult ki. A transzgenikus állatok "súlyos" fenotípusú részében rapidan progrediáló vesefibrózis alakult ki, melyre ödéma, szövettanilag 4+ glomeruloszklerózis, megemelkedett karbamid nitrogén (BUN), valamint az endogén (renális) TGF- β és TIMP-1 mRNS expressziójának szignifikáns növekedése volt jellemző. Az állatok másik "enyhe" fenotípusú csoportjában ödéma nem jelentkezett, szövettanilag a glomeruloszklerózis 1-2+ volt, és a TGF- β és TIMP-1 mRNS expressziójának csak minimális (nem szignifikáns) megemelkedése volt megfigyelhető. A kettős fenotípust egy alomból származó állatokban is megfigyeltük. Mindkét fenotípusú csoportban azonos mértékben, a fiziológias érték 4-5-szörösére emelkedett a plazma TGF- β szintje. Technikai okok miatt a 1990-es években hibrid törzsek alkalmazása volt elterjedt transzgenikus egerek készítésére. Mivel elsődleges cél a mutáció létrehozása és fenntartása volt, ezért a legellenállóbb egereket (outbred és hibrid) választották. Ezért esetünkben a C57BL6CBA F1 hibrid háttérre esett a választás. A transzgenikus vonalat úgy tartották fenn, hogy folyamatosan visszakeresztették az C57BL6CBA F1 háttérre. Így az első lépésben F1 (az alapító) transzgenikus egeret keresztezték F1 háttérű egérrel, melyből F2 utódok születtek. Ezeket az F2 utódokat folyamatosan F1 háttérű hibrid egerekre visszakeresztelve tartották fenn. Ennek következménye, hogy az eredeti adatok főleg az F2 és F3 nemzedékből származnak. Ezek a nemzedékek genetikailag nem tekinthetők egységesnek, mert a két beltenyészett háttér eltérő arányban keveredhet bennük. A kettős fenotípus ennek a változó arányban jelenlévő C57BL6 és CBA háttérnek a következtében jött létre.

TGF-beta transzgenikus egerek visszakeresztése C57BL6 háttérre:

Hármas céllal kezdtük meg a C57BL6/CBA alb/TGF-beta1 transzgenikus egerek visszakeresztését beltenyészett háttérre. 1) Egy eltérő progressziójú vesebetegség modellt vártunk a beltenyészett egerektől 2) Homogén háttéren akartuk vizsgálni az emelkedett plazma TGF- β szint okozta renális és extrarenális eltéréseket 3) Beltenyészett törzsön lévő TGF-beta transzgenikus egerek szükségesek a relaxin transzgenikus egerekkel való keresztezéshez

Az elmúlt több mint két és fél év során ezért visszakeresztettük (15 generáción keresztül) a TGF- β transzgenikus egértörzset a C57BL6 beltenyészett egértörzsrre, ezáltal homogén (99.9%-ig C57BL6) háttérű populációt értünk el. Ezen a genetikai háttéren az állatok túlélése meghaladja az egy évet, a vesefibrózis progressziója lelassult, vesefunkciójuk megtartott, extrarenálisan nem észlelhető fibrózis és megszűnt a korábban megfigyelt kettős fenotípus annak ellenére, hogy a TGF- β transzgen hepatikus expressziója miatt változatlanul magas a plazma TGF- β szintje. Így új krónikus vesefibrózis modellt hoztunk létre, melyben a fibrózis progressziója olyan mértékben lelassult, hogy az egerek élettartama nem rövidül jelentősen.

TGF-beta Hibrid (F1) egerek létrehozása: Ezt követően hibrid egereket hoztunk létre úgy, hogy a BalbC, FVB/N, CBA és C57BL6 nőstény egereket kereszteltünk a TGF-beta1 transzgenikus hímekekkel.

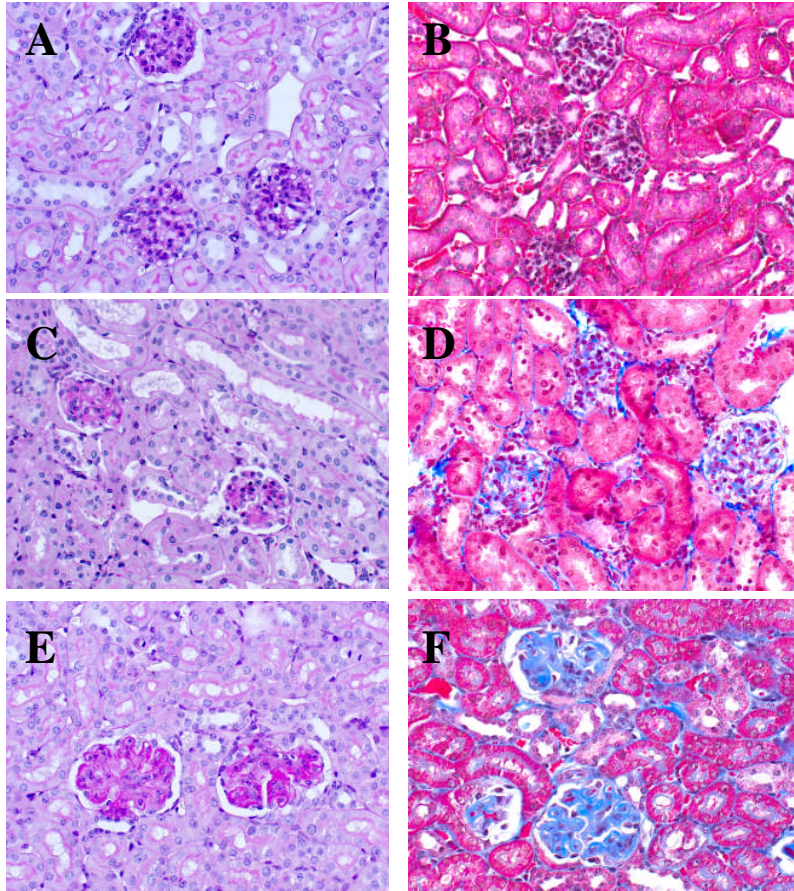
	<i>Hím</i> C57BL6 TG	<i>Hím</i> C57BL6 WT
<i>Nőstény</i> C57BL6	C57BL6 TG	C57BL6 WT
<i>Nőstény</i> CBA	(CBA/C57BL6)F1 TG	(CBA/C57BL6)F1 WT
<i>Nőstény</i> FVB/N	(FVBN/C57BL6)F1 TG	(FVBN/C57BL6)F1 WT
<i>Nőstény</i> BalbC	(BalbC/C57BL6)F1 TG	(BalbC/C57BL6)F1 WT

A transzgenikus és a vad típusú egerek tenyésztése

(TG: TGF- β transzgenikus, WT: vad típusú)

Az FVB/N és a CBA egerekkel történt keresztezés eredményeinek feldolgozása még folyamatban van. Megállapítható, hogy a TGF- β transzgenikus C57BL6 háttérű egereket a beltenyészett FVB/N egerekkel keresztezve olyan F1 háttérű transzgenikus utódok születtek, amelyekben a szülőknél megfigyelt lassan progrediáló vesefibrózis felgyorsulása jelentkezett..

A BalbC törzssel való keresztezésből származó hibrid egerekben a vesefibrózis progressziója felgyorsult, az állatok túlélése lerövidült, 15 hetes korukra 100% mortalitás alakul ki végállapotú veseelégtelenség miatt. A hibrid egerekben is 4-5-szöröse a keringő TGF-beta1 szintje a fiziológiásnak.



6 hetes vad típusú és transzgenikus egerek:

- A) C57Bl6 vad típusú egerek PAS, 400X
- B) C57Bl6 vad típusú egerek Masson's trichrom, 400X
- C) (alb/TGF-beta1 C57Bl6)F1 PAS 400X
- D) (alb/TGF-beta1 C57Bl6)F1 Masson's 400X
- E) (alb/TGF-beta1 BalbC)F1 PAS 400X
- F) (alb/TGF-beta1 BalbC)F1 Masson's 400X

A TGF-beta transzgenikus egerek visszakeresztzése a BalbC törzsre:

A C57BL6 törzsre történő visszakeresztzéssel egyidejűleg megkezdjük a TGF- β transzgén BalbC törzsre való visszakeresztzését is. Ezen a háttéren a visszakeresztzés nem volt sikeres, mert a második generációban olyan súlyos veseelégtelenség alakult ki, hogy az állatok a három hónapos kort sem érték el és utódjuk nem született. Ezekben az állatokban már hat hetes korban súlyosabb vesefibrózis figyelhető meg szövettanilag, mint a C57BL6 háttéren egy éves korban.

Megfigyeléseink alátámasztják, hogy a különböző genetikai háttér felelős ezekben a transzgenikus egerekben a vesefibrózis eltérő progressiójáért. Az eltérő fenotípus nem magyarázható a transzgén expressziójának változásával, mert a plazma TGF- β szint azonos volt a "súlyos" és "enyhe" fenotípusú egerekben. Másrészt gyakorlatilag ki is

zárhatjuk a transzgen illetve annak integrálódási helye közelében létrejövő rekombinálódást, mivel a TGF- β transzgen az Y kromoszómára inszertálódott.

Cardiomegalia C57BL6 alb/TGF-beta transzgenikus egerekben:

Vizsgáltuk továbbá a transzformáló növekedési faktor-betát (TGF-beta) fokozottan termelő transzgenikus (Alb/TGF-beta) egerekre jellemző másik patológiás eltérés a cardiomegalia és a vesefibrózis között esetlegesen fennálló kóroki kapcsolatot.

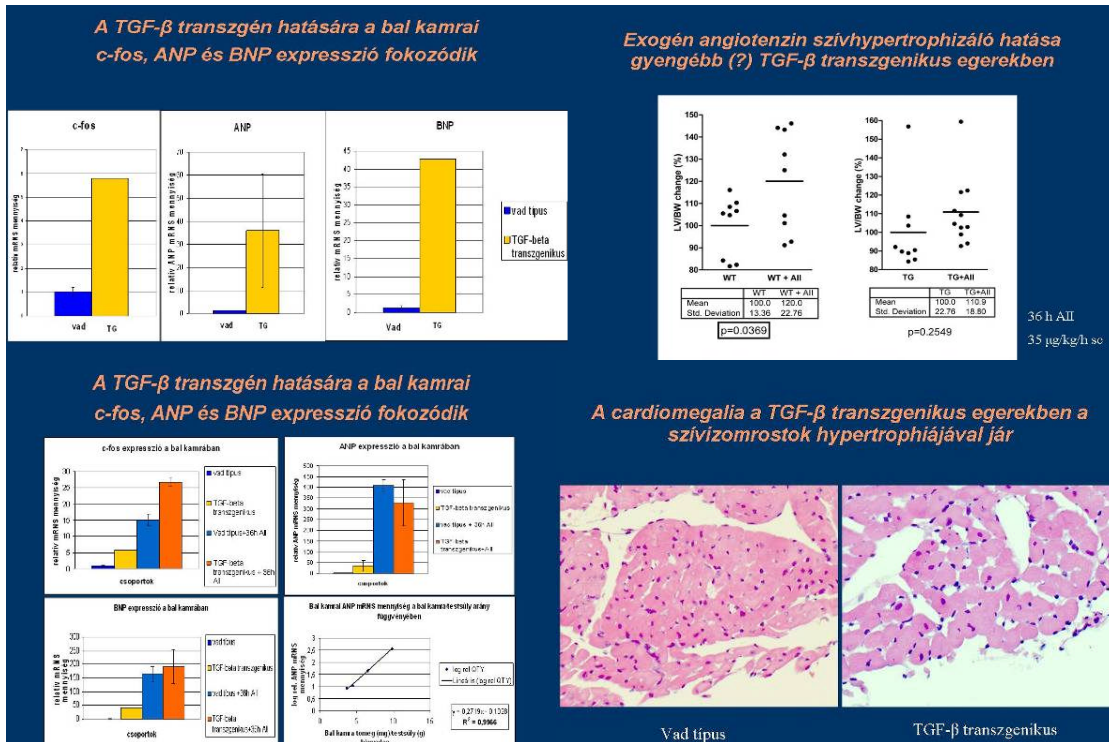
Feltételeztük, hogy a két kórfolyamat között nem áll fenn kóroki kapcsolat, azaz az egyik kórfolyamat szelektíven befolyásolható anélkül, hogy ez a másik folyamat kialakulására és lefolyására hatással lenne. Korábbi eredményeink szerint a TGF-beta hatására transzgenikus egerekben kialakuló vesefibrózis progressziója döntően függ a genetikai háttértől. Ezért a két vizsgált kórfolyamat szétválasztására a genetikai predispozíciót változtattuk meg azért, hogy a betegségeket indukáló TGF-beta transzgent a már említett C57BL6 beltenyészett genetikai háttérre kereszteltük.

A C57BL6 genetikai háttér a vesefibrózis kialakulását erőteljesen lassította, míg a cardiomyopathia és cardiomegalia kialakulásával szemben nem fejtett ki "védő" hatást. 8-12 hetes korban a transzgenikus egerekben szignifikánsan emelkedett a testsúlyra normalizált bal kamrai súly. ($p=0,0021$)

A C57Bl6 genetikai háttérű TGF- β transzgenikus egerekben cardiomegalia alakul ki				A C57Bl6 genetikai háttérű TGF- β transzgenikus egerekben cardiomegalia alakul ki				
	Testsúly (g)	Bal kamra (mg)	Jobb kamra (mg)	Vese (mg)		Bal kamra (mg)/ testsúly (g) arány	Jobb kamra (mg)/ testsúly (g) arány	Vese (mg) / testsúly (g) arány
Vad típusú, 12 hetes	26,14 \pm 0,82	84,58 \pm 3,59	24,16 \pm 1,45	169,32 \pm 6,71	Vad típusú, 12 hetes	3,19 \pm 0,09	0,91 \pm 0,05	12,78 \pm 0,36
TGF- β tg, 12 hetes	24,95 \pm 0,41	113,36 \pm 9,07*	26,35 \pm 1,27	166,83 \pm 4,10	TGF- β tg, 12 hetes	4,60 \pm 0,38*	1,06 \pm 0,04*	13,50 \pm 0,26
TGF- β tg, 12 hónapos	36,64 \pm 1,18	155,89 \pm 12,85	32,50 \pm 2,22	241,9 \pm 12,83	TGF- β tg, 12 hónapos	4,32 \pm 0,42	0,90 \pm 0,08	13,08 \pm 0,76

A vesében a szöveti eltérések ebben az életkorban minimálisak voltak. A transzgenikus állatok túlélése a C57Bl6 genetikai háttéren jelentősen javult, az átlagos élettartam meghaladta az 1 éves kort, és a vesefibrózis ebben az életkorban is mérsékeltebb volt, mint ugyanezen transzgen hatására BalbCxC57Bl6 F1 hibrid háttéren kialakuló vesefibrózis esetén 6 hetes korban. A cardiomegalia kialakulásával kapcsolatosan az ANP, BNP és c-fos gének expresszióját vizsgáltuk real-time RT-PCR-rel.

A transzgenikus állatok bal kamrájában mindháromnak fokozott expressziója volt megfigyelhető. A bal kamrai ANP expresszió szoros korrelációt mutatott a bal kamrai súllyal. ($R^2=0,9966$)



Összefoglalásul megállapítható, hogy a TGF-beta hatására kialakuló vesefibrózis és cardiomegalia egymástól függetlenül is kialakulhatnak, vagyis a két kórfolyamat között nincs közvetlen kóroki kapcsolat. A vesefibrózis kialakulásához, és rapid progressziójához a TGF-beta fokozott expresszióján kívül más genetikai tényezők is szükségesek, melyek hiánya a fibrózis kialakulását szinte tökéletesen gátolja. A cardiomyopathia kialakulásával kapcsolatban ilyen védő hatású faktort eddig nem sikerült kimutatni.

TGF-beta/Relaxin kettős transzgenikus egerek létrehozása:

A TGF-beta/relaxin kettős transzgenikus egerek létrehozását a TGF-beta transzgenikus egerek visszakeresztezésének korai (8. Generáció) stádiumában kezdtük meg először. Ebben a stádiumában még jelen volt a TGF-beta transzgenikus egerek vesefibrózisát jellemző súlyos és enyhe fenotípus. Így a TGF-beta/Relaxin transzgenikus egerekben is jelentkezett a kettős fenotípus, mely megnehezítette a relaxin antifibrotikus hatásának pontos vizsgálatát. A relaxin transzgenikus egereknél leírt vesepatológiai elváltozás felveti a relaxin immunmoduláns hatását, ezért a keresztezendő TGF-beta transzgenikus egereknek homogén genetikai háttérrel kell rendelkezniük ahhoz, hogy a kettős transzgenikus állatok összehasonlíthatók legyenek. Ennek érdekében folytattuk a TGF-beta egerek C57BL/6 háttérre való visszakeresztezését, és a TGF-beta/Relaxin kettős transzgenikus állatok létrehozását 2007. elején újra kezdtük az új, immár visszakeresztezett TGF-beta egerekkel.

A kutatómunkát negatívan befolyásoló tényezők, körülmények

Állatház hiánya:

Kutatásainkat nagymértékben lassította, hogy a pályázat ideje alatt sem az Intézetben, sem a Nagyvárad téri elméleti tömbben (NET) nem volt megfelelő kapacitású és SPF szintű (Specified Pathogen Free) állatház. A pályázat beadásakor már *konkrét ígéretem* volt arra, hogy hamarosan elkészül a NET 23. emeletén a használhatatlanná vált állatház rekonstrukciója. Így abban a hiszemben adtam be pályázatomat, hogy bőségesen van idő a rekonstrukcióra, mert kutatómunkám első éve a konstrukt elkészítésével, verifikálásával, in vitro tesztelésével, a mikoinjektálásával fog telni és ezalatt elkészülhet a rekonstrukció. Sajnos azonban az állatház az ígéret ellenére nem készült el az Egyetem nehéz anyagi helyzete miatt. 2003 tavaszán, amikor megérkeztek az alapító vonalak saját magunknak kellett valamilyen szükségmegoldást találnunk az intézet keretein belül. Ennek a megoldásnak egyik legnagyobb hátránya az volt, hogy nem tudtunk elég helyet kapni ahhoz, hogy az ismertett tíz transzgenikus és vad típusú vonalat kellő számban tenyészük a karakterizáláshoz és a vizsgálatokhoz. Transzgenikus egerekkel végzett vizsgálatoknál sokkal nagyobb kolóniákra (minimum kétszer annyi tenyészpárra) van szükség, mert egy-egy alomból esetenként csak néhány egér bizonyult transzgenikusnak. Időközben gondoskodnunk kellett megfelelően képzett állatgondozóról is.

Az OTKA pályázat keretében végzett kutatómunka pozitív hatásai a tudományos infrastruktúrára és műszerezettségre.

Állatház kialakítása:

Az OTKA támogatás keretében végzett kutatómunkánk igen fontos indirekt hatása is volt mivel lehetővé tette az állatház rekonstrukcióját. A NET igazgató tanácsának felkérésére, a Semmelweis Egyetem anyagi támogatásával közel 50M-os beruházás keretében szakmai vezetéssel kialakítottunk egy 160nm-es modern SPF szintű állatházat. 2006. decembere óta ebben az állatházban folytathatjuk – most már optimális körülmények - között munkánkat.

GVOP-KMA műszerpályázat:

A Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatal által meghirdetett pályázaton 2004-ben sikerült támogatást nyernünk *Transzgenezis* című pályázatunkkal. A kizárólag műszerbeszerzésre fordítható összeg lehetővé tette, hogy laboratóriumunkat továbbfejlesszük és kialakítsunk egy korszerű részleget transzgenikus állatok vizsgálatára: . Ennek a műszerpályázatnak a szakmai -tematikus- részét az OTKA által támogatott kutatásaink képezte. Így tematikus OTKA kutatásaink közvetlenül hozzájárultak a GVOP pályázat sikeréhez.

Összefoglalás

Pályázatunk keretében új relaxin transzgenikus egértörzs létrehozását, karakterizálását és további keresztezését (TGF-beta1 transzgenikus törzssel) vállaltuk. Munkánk eredményeként létrehoztunk és fenntartunk nyolc egértörzset (vad típusú, transzgenikus, kettős transzgenikus törzsek különböző genetikai háttéren), melyek egy komplex modellrendszert képeznek vesefibrózis pathomechanizmusának tanulmányozására. Sajnos az ismertett körülmények miatt lassabban haladunk a tervezettnél, de egy ekkora volumenű "projekt" nem fog véget érni az OTKA támogatás lezárásával, hanem azt követően sok éven át várható a munka folytatása az új eredmények és publikációk, melyeket az elmúlt években az OTKA támogatásával alapoztunk meg. Irodalmi adatokra hivatkozva szeretném megemlíteni, hogy egy-egy sikeres transzgenikus egértörzs létrehozását követően tíz évet meghaladóan is igen sok új tudományos eredményt és publikációt produkál.

Pályázatunkat és kutatómunkánkat jellemezte, hogy a munkát teljes egészében itthon végeztük (ez alól csak a konstrukt mikroinjektálása volt kivétel), semmilyen részfeladathoz nem "használtuk" a külföldi partner segítségét. Az elmúlt évek során igyekeztünk továbbfejleszteni a kutatási infrastruktúrát és sikerült egy nemzetközi színvonalú hazai transzgenikus laboratórium kialakítani.

A 2002-2005 évi tervezettől eltérő költségfelhasználás szakmai indoklása

A kutatómunka során az ismertett pénzügyi nehézségek ellenére minimálisan kellett csak eltérnünk a pénzügyi tervtől. Ezeket az eltéréseket az éves jelentések során részletesen indokoltuk. Munkánk során nem volt szükség új eszköz beszerzésére az OTKA keretből, mert a GVOP-KMA pályázaton elnyert összegből szereztük be a kívánt eszközöket.