

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

3014.

SZELES ZSOLT

Celluláris és molekuláris élettan
című program

Programvezető: Dr. Hunyady László, egyetemi tanár

Témavezetők: Dr. Geiszt Miklós, egyetemi tanár

Dr. Petheő Gábor László, egyetemi docens

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

Doktori értekezés

Szeles Zsolt

Semmelweis Egyetem
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, PhD, tudományos tanácsadó

Budapest
2024

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés.....	7
1.1. Reaktív oxigénszármazékok.....	7
1.1.1 Reaktív oxigénszármazékok keletkezése a sejtekben.....	8
1.1.2 Reaktív oxigénszármazékok elleni védelem	10
1.1.3 A reaktív oxigénszármazékok funkciói	12
1.1.4 A reaktív oxigénszármazékok károsító hatásai.....	12
1.2 A NADPH-oxidázok.....	14
1.2.1 NOX2.....	16
1.2.2 NOX1.....	19
1.2.3 NOX3.....	21
1.2.4 NOX4.....	22
1.2.5 DUOX1 és DUOX2.....	23
1.3 NOX5.....	25
1.3.1 A <i>nox5</i> gén.....	25
1.3.2 A NOX5 szerkezete	27
1.3.3 A NOX5 aktivációja és szabályozása.....	29
1.3.4 A NOX5 fehérje intracelluláris lokalizációja és szöveti eloszlása.....	31
1.3.5 A NOX5 vizsgálatára használt gyári antitestek megbízhatóságának problematikája	31
1.3.6 A NOX5 vizsgálatára használt állatmodellek.....	33
1.3.7 A NOX5 lehetséges élettani és kórélettani szerepe.....	34
2. Célkitűzések	39
3. Módszerek	40
3.1 Felhasznált anyagok, minták és antitestek	40
3.2 Felhasznált sejtvonalak	40
3.3 Klónozás.....	40
3.4 Klónozási kísérlet sor az „off-target” analízishez.....	42
3.5 Fúziós fehérjék előállítása	43
3.6 GST-NOX5 fehérje tisztítása	44
3.7 NOX5-His ₆ fehérje tisztítása	44

3.8 siRNS és DNS transzfekció.....	45
3.9 RNS preparálás, cDNS írás, kvantitatív PCR (qPCR).....	46
3.10 Western blot és Instant blue festés	46
3.11 Immuncitokémia	47
3.12 Immunhisztokémia	48
3.13 Szuperoxid és intracelluláris kalciumion mérések	49
3.14 Statisztika	50
3.15 Egy sejt RNS szekvenálási adatok elemzése, RNS szekvenálási eredmények kigyűjtése az UACC-257 sejtvonalról	50
4. Eredmények	52
4.1 A humán NOX5-öt felismerő monoklonális antitest kifejlesztése	52
4.1.1 A fúziós fehérjék előállítása.....	52
4.1.2 Az egerek immunizációja és az immunválasz tesztelése	55
4.1.3 Hibridóma sejtek előállítása, a végső klón kiválasztása	56
4.2 NOX5-öt túltermelő HEK293T sejtek tanulmányozása	57
4.2.1 A sejtvonalak létrehozása	57
4.2.2 NOX5 fehérje detektálása a HEK sejtekben, az enzim intracelluláris lokalizációjának meghatározása	58
4.2.3 A HEK-NOX5 sejtek funkcionális jellemzése	61
4.3 Az endogén NOX5 tanulmányozása UACC-257 sejtekben.....	64
4.3.1 NADPH-oxidázok expressziójának <i>in silico</i> analízise az UACC-257 sejtekben	64
4.3.2 Endogén NOX5 fehérje detektálása az UACC-257 sejtekben Western blot technikával.....	66
4.3.3 Endogén NOX5 fehérje detektálása az UACC-257 sejtekben immunfestéssel.....	70
4.3.4 Endogén NOX5 fehérje aktivitásának a vizsgálata az UACC-257 sejtekben	73
4.4 NOX5 fehérje kimutatása humán szövetekben.....	74
4.4.1 NOX5 fehérje kimutatása lép- és herelizátumokban.....	74
4.4.2 NOX5 fehérje kimutatása here szövetmetszeten immunfestéssel.....	76
4.4.3 NOX5 fehérje kimutatása a petefészekben	79

4.4.4 NOX5 fehérje kimutatása lép szövetmetszeten immunfestéssel	82
4.4.5 Kontroll kísérletek a NOX5 kimutatáshoz humán szövetekben.....	84
4.5 NOX5 kimutatása humán primer sejtekben	86
4.6 NOX5 hiányos nyúl „off-target” analízise NADPH-oxidázokra	89
5. Megbeszélés	93
6. Következtetések	102
7. Összefoglalás	103
8. Summary	104
9. Irodalomjegyzék	105
10. Saját publikációk jegyzéke	122
11. Köszönetnyilvánítás.....	123
Függelék.....	124

Rövidítések jegyzéke

AMPK: adenzin-monofoszfát aktivált protein-kináz

ATP: adenzin-5'-trifoszfát

bp: bázispár

BSA: szarvasmarha (bovin) szérum albumin

[Ca²⁺]_{ic}: intracelluláris kalciumion koncentráció

CGD: krónikus granulomatózis betegség (chronic granulomatous disease)

CMV: citomegalovírus

DPI: difenil-jodónium

DTT: ditiotreitól

DUOX: dual oxidase, azaz kettős oxidáz

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

EGTA: etilén glikol-bisz(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraecetsav

ER: endoplazmás retikulum

ERO1: endoplazmás retikulum oxidoreductin 1

FAD: flavin-adenin-dinukleotid

GSH: glutation (redukált forma)

GSK: GSK1016790A, TRPV4 csatorna agonista

GST: glutation-S-transzferáz

HAoSMC: humán aorta simaizom sejtek

HCSMC: humán koronária simaizom sejtek

HMVEC: humán szív eredetű mikrovaszkuláris endotélsejteket

HPA: Human Protein Atlas

IBS: Inflammatory Bowel Disease, azaz gyulladáshos bélbetegség

kDa: kilodalton

KI: knock-in, bevitt gén

KO: knock-out, törölt gén

LPO: laktoperoxidáz

mAb: monoklonális antitest

MAO: monoamin-oxidáz

MAPK: mitogén aktivált protein kináz

MPO: mieloperoxidáz

mRNS: messenger RNS, hírvivő RNS
MT: molekulatömeg
NADPH: redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADH: redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NOX: NADPH-oxidáz
PDI: protein-diszulfid-izomeráz
PBS: foszfátpufferelt sóoldat
PFA: paraformaldehid
PLA2: foszfolipáz A2
PKC: protein kináz C
PMA: forbol-12-mirisztát-13-acetát
PMSF: fenil-metil-szulfonil-fluorid
ROS: reaktív oxigén származék
Tg: thapsigargin
TGF- β 1: transzformáló növekedési faktor- β 1 (transforming growth factor- β 1)
TNF- α : tumor nekrozis faktor- α
TPO: tireoperoxidáz
SDS-PAGE: nátrium-dodecil-szulfát tartalmú, poliakrilamid alapú gélelektroforézis
SERCA: szarko-endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATP-áz
SOD: szuperoxid-diszmutáz
vWF: von Willebrand-faktor

1. Bevezetés

Mióta a mitokondriumokat a korai eukarióták integrálták, küzdenek a sejtek a légzési láncból származó reaktív oxigénszármazékok (ROS) ártalmas hatásaival (1). Az evolúció során kialakult alkalmazkodás a ROS-terheléshez olyannyira kifinomulttá vált, hogy ezek a ROS-ok hírvivőként és effektorokként is fontos szerepet játszanak a celluláris homeosztázis megőrzésében. Az evolúció során elért sikert egyértelműen jelzi a professzionális ROS-termelő enzimek, a redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát oxidázok (NADPH-oxidázok vagy röviden NOX-ok) családjának megjelenése (2).

PhD kutatómunkám során a NADPH-oxidáz 5 (NOX5) enzim vizsgálatába kapcsolódtam be. A NADPH-oxidázok körében általános probléma, hogy nem állnak rendelkezésre megfelelő antitestek a kimutatásukhoz. A NOX5 esetében ugyanez a helyzet. Ezért a fehérje detektálását egy új, általunk előállított antitesttel szeretnénk elérni. Fontosnak tartottuk a kifejlesztett antitest alapos jellemzését, ezért a kísérleteink során lépésről lépésre bizonyosodtunk meg az új reagens hiteles felismerőképességéről. Számos kontroll kísérlet elvégzését követően a NOX5 fehérje kimutatását céloztuk meg humán sejtekben és szövetekben.

A kísérleteink célpontjában álló NOX5 miatt, a PhD disszertációm bevezetésében először röviden bemutatom a reaktív oxigénszármazékokat, majd a NADPH-oxidázok családját. Összefoglalom a fontosabb tényeket, amelyeket tudunk az egyes NOX izoformákról, végül a NOX5 enzimet mutatom be részletesen a bevezetésben.

1.1. Reaktív oxigénszármazékok

A reaktív oxigénszármazékok az oxidáló ágensek azon csoportját alkotják, amelyek molekuláris oxigénből képződnek. Az ide sorolható molekulák lehetnek gyökös, illetve nem gyökös típusúak. Gyököknek nevezzük azokat az atomokat vagy molekulákat, amelyek egy vagy több párosítatlan elektront tartalmaznak a külső elektronhéjukon. A ROS-ok közül gyökös vegyületek például a szuperoxid anion (O_2^-), a hidroxilgyök ($HO\cdot$), a peroxi-gyökök ($ROO\cdot$) és az alkoxi-gyökök ($RO\cdot$). Jelentősebb nem gyök típusú ROS vegyületek a hidrogén-peroxid (H_2O_2), a szingulet oxigén (1O_2) és az ózon (O_3) (3). Reaktív származékok azonban nem csak oxigénből képződhetnek. Ismertek reaktív nitrogén, kén és halogénszármazékok is. A különböző reaktív vegyületek egymással is képesek reakcióba lépni. Az így képződő vegyületek egyik legkutatottabb képviselője a

peroxinitrit (ONOO^-), ami a szuperoxid anion és a nitrogén-monoxid ($\text{NO}\cdot$) reakciójából képződik (3).

1.1.1 Reaktív oxigénszármazékok keletkezése a sejtekben

A sejtekben keletkező ROS-oknak többféle forrása lehet. Keletkezhetnek különböző reakciók melléktermékeként, valamint dedikált enzimek által előállítva, szabályozott módon.

A szabályozatlanul képződő ROS-ok fő forrásai a mitokondriumok. Az aerob anyagcsere megjelenésével párhuzamosan a sejtek normál működése során képződő reaktív oxigénszármazékok mennyisége is megnőtt. A mitokondriumok belső membránjában lejátszódó terminális oxidációban az oxigénmolekula 4 elektron felvételével vízzé redukálódik. Azonban a redukció olykor csak részlegesen játszódik le, egy elektron felvételével a molekuláris oxigénből szuperoxid képződik (4). A O_2^- -ot a mitokondrium mátrixában található szuperoxid-dizmutáz 2 (SOD2) enzim alakítja H_2O_2 -dá. Összességében a hatékony ATP szintézis melléktermékeként részben O_2^- , de főleg H_2O_2 terheli a sejteket (5). A mitokondriumokból származó ROS a sejteket ért teljes ROS terhelésének több mint 90 %-át teszi ki. Ez a nyugvó sejtek oxigénfogyasztásának mintegy 0,15-5 %-a (6).

A mitokondriális elektrontranszportláncból származó oxidatív ágenseken kívül számos enzimreakció melléktermékeként szintén képződnek ROS-ok. Napjainkig már több mint 40 olyan enzimet azonosítottak, amelyek működése során O_2^- vagy H_2O_2 képződik (3). Néhány példát emelek ki ezek közül. Az endoplazmatikus retikulum (ER) hálózatos állományában a citokróm P450 függő monooxygenázok, azaz a mikroszomális oxidálórendszer biztosítja a májban a xenobiotikumok biotranszformációját (7). Mindezek mellett azonban az ER lumene is jelentős oxidatív közeget jelent. Az itt található ER oxidoreductin 1 enzimek (Ero1-L α és Ero1-L β), protein-diszulfid-izomerázon (PDI) keresztül, részt vesznek a fehérjék oxidatív hajtogatásában és a diszulfidhidak létrehozásában, miközben melléktermékként H_2O_2 szabadul fel (8). A peroxiszómák is igen oxidatív sejtalkotók, amiért a bennük található különféle lumenális oxidázok aktivitása a felelős. Részben a peroxiszómák lumenében történik a zsírsavak α - és β -oxidációja acil-CoA oxidázok által, továbbá megtalálhatóak itt D-aminosav oxidázok, hidroxisav oxidázok és a szarkozin oxidáz is, amelyek a megfelelő szubsztrát

eloxidálásával H_2O_2 -ot állítanak elő melléktermékként (5, 9). A mitokondriumok külső membránjában foglalnak helyet a monoamin-oxidázok (MAO-A és MAO-B). A MAO enzimek felelősek a biogén aminok, mint a dopamin, szerotonin, noradrenalin és a táplálékokkal felvett aminok (pl. tiramin) oxidatív dezaminálásáért, miközben melléktermékként szintén H_2O_2 képződik (5, 10). A citoszólban lelhető fel a molibdéntartalmú xantin-oxidáz, ami a purin nukleotidok katabolizmusában játszik szerepet. A hipoxantin oxidatív hidroxilációját katalizálja xantinná, továbbá a xantin oxidációját húgysavvá, miközben melléktermékként szuperoxid szabadul fel (11, 12).

Az eddigiekben a sejteket érő szuperoxid és hidrogénperoxid terheléssel foglalkoztam, azonban az egyik legreaktívabb celluláris ROS a hidroxilgyök, amely jellemzően az úgynevezett Fenton-reakcióban képződik megfelelő elektrondonor jelenlétében. Leggyakrabban szabad Fe^{2+} ionok katalizálják a H_2O_2 elbomlását hidroxilgyökké: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}\cdot + \text{OH}^-$. A $\text{HO}\cdot$ toxicitását így az határozza meg, hol találhatóak a sejtekben a Fe^{2+} ionok. A H_2O_2 és a $\text{O}_2^{\cdot-}$ ütközés eredményeként is képződhet $\text{HO}\cdot$, az úgynevezett Haber-Weiss reakcióban: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{O}_2 + \text{HO}\cdot + \text{OH}^-$. A keletkező $\text{HO}\cdot$ a lipidperoxidációs reakciók iniciátora (5, 11). Azonban a legfrissebb kutatási eredmények szerint a Fenton-reakció során nem csupán $\text{HO}\cdot$ képződhet, hanem már 100 μM -os bikarbonát koncentráció mellett karbonát anion gyök ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) is: $\text{HO}\cdot + \text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{CO}_3^{\cdot-} + \text{OH}^-$. Így a sejtekben általánosan előforduló 40 mM-os bikarbonát koncentrációnál a Fenton-reakció terméke feltehetőleg a $\text{CO}_3^{\cdot-}$ lehet (13, 14). A $\text{CO}_3^{\cdot-}$ nem csak $\text{HO}\cdot$ -ből képződhet, hanem a ONOO^- és a CO_2 reakciójából is (15). Így az újabb tanulmányok már azt taglalják, hogy a DNS oxidatív károsodásáért nem is a $\text{HO}\cdot$, hanem a $\text{CO}_3^{\cdot-}$ a felelős (16).

A ROS termelő enzimek egy különleges csoportját alkotják a szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimek. A SOD-ok a sejtek számára veszélyesebb $\text{O}_2^{\cdot-}$ -ből kevésbé veszélyes H_2O_2 -ot állítanak elő. Három SOD izoformát különítünk el, attól függően, hogy a katalitikus centrumukban milyen fémion szerepel, illetve, hogy hol találhatóak a sejten belül. A SOD1, amely réz és cink ionokkal működik (Cu-ZnSOD), javarészt a citoplazmában található. Feladata a citoplazmatikus $\text{O}_2^{\cdot-}$ eliminálása. A SOD2 mangánfüggő enzim (MnSOD), amely a mitokondriumok mátrixában helyezkedik el. Dedikált funkciója a mitokondriális elektrontranszportláncból származó $\text{O}_2^{\cdot-}$ továbbalakítása. A SOD3 szintén réz és cink függő fehérje (Cu-ZnSOD). Elsősorban az

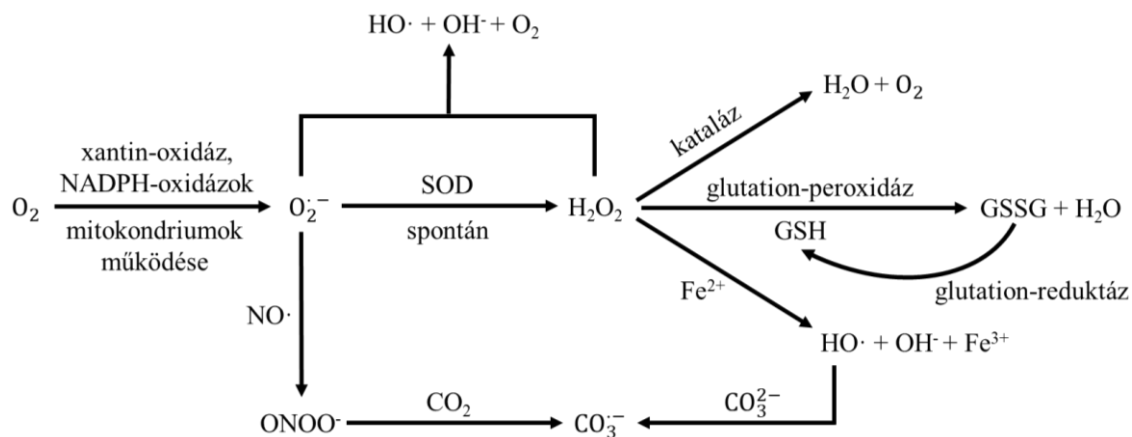
extracelluláris térbe szekretálódik, így fő feladata a sejteket kívülről érő O_2^- veszélyek elhárítása. Megjegyzendő, hogy a SOD-ok ugyan H_2O_2 -ot termelnek, de nem klasszikus ROS termelő enzimként tartja őket számon a szakirodalom, hanem a O_2^- eliminálásával inkább „ROS protektív” szerepük van a sejtekben (7, 17).

A szabályozott ROS termelésért a NADPH-oxidáz enzimek a felelősek. Az enzimes család tagjait az 1980-as évektől kezdték felfedezni és részletesen karakterizálni (18). Disszertációm későbbi fejezeteiben részletesen ismertetem a NOX-okat.

1.1.2 Reaktív oxigénszármazékok elleni védelem

Látható, hogy a biokémiai reakciók melléktermékeként számos sejtorganelumban képződhetnek ROS-ok. Ezért az evolúció során a sejtek antioxidáns mechanizmusokat fejlesztettek ki a kontrollálatlan mennyiségben keletkező ROS-ok elleni védelemre. Antioxidánsok lehetnek enzimek, valamint jellemzően kismolekulájú, szerves vegyületek is (19).

Az enzimatisz védelmi vonalhoz tartoznak a SOD-ok, a kataláz és glutation peroxidáz. A SOD-ok jellegzetességeit fentebb tárgyaltam. A kataláz a peroxiszómákban található, és feladata például a zsírsavak oxidációja során keletkezett H_2O_2 elbontása vízzé és oxigénné. A glutation-peroxidáz az egész sejtben megtalálható. Az enzim szubsztrátjai egyrészt a tripeptid glutation (GSH) másrészt H_2O_2 , valamint szerves peroxidok (ROOH) lehetnek. Az enzimreakció során a GSH-ból oxidált glutation, glutation-diszulfid (GSSG) képződik, miközben a H_2O_2 vízzé, a szerves peroxidok pedig alkohollá (ROH) redukálódnak. A GSH bőségesen rendelkezésre áll a sejteknek, a sejtplazmában 1-11 mM-os, a sejtmagban 3-15 mM-os, a mitokondriumban 5-11 mM-os, az endoplazmás retikulumban több mint 15 mM-os koncentrációban található meg. Így, ha glutation peroxidáz is jelen van, a védelmi rendszer hatékonyan részt tud venni a H_2O_2 eliminálásában (1, 11, 20). Az oxidált glutationt a citoszólban lévő glutation-reduktáz tudja visszaalakítani. A redukció folyamata NADPH függő. A glutation-reduktáz feladata az optimális GSH:GSSG arány fenntartása (19). A legfontosabb ROS-ok kapcsolatait, illetve az eliminációjukban részt vevő szereplőket az 1. ábrán foglalom össze.



1. ábra: A sejtekben általánosan előforduló legfontosabb ROS-ok forrásainak, kapcsolatainak és eliminációs lehetőségeinek bemutatása. Az ábrán az egyes komponensek lehetséges kapcsolatait szemléltetem, nem volt célom azonban a reakciókban részt vevő összes molekula, illetve az egyes termékek sztöchiometriai viszonyainak feltüntetése. Az összefoglaló a (11, 14, 15) források alapján készült.

A nem enzimatis antioxiidánsok közé kicsi, víz- és zsírolható szerves vegyületek sorolhatók. Többek között ilyen vegyületek a retinol (A-vitamin), az aszkorbinsav (C-vitamin), az α -tokoferol (E-vitamin), valamint a karotinoidok és flavonoidok (11). Ezeket az anyagokat jellemzően zöldség- és gyümölcsfogyasztással tudjuk bevinni a szervezetbe a diéta részeként. A molekulák közös szerkezeti sajátossága, hogy telítetlen szénatomokat, szén-szén kettős kötések tartalmazznak, ami alkalmassá teszi őket, hogy gyökökkel és oxidánsokkal hatékonyan reagáljanak. A reakciók következtében szerkezetileg átalakult, stabilabb, kevésbé reaktív származékok jönnek létre, miközben a ROS-ból is kevésbé veszélyes molekula képződik. A GSH és a tioredoxin szintén ebbe a csoportba tartozó peptid és fehérje. A zsírolható tokoferolok és karotinoidok hatékonyan védik a membránalkotó lipideket a lipidperoxidáció káros hatásaitól. A vízoldható aszkorbinsav a sejtek nem membránkötött részeiben, így például sejtplazmában található meg. Rendkívül hatékonyan tudja hatástalanítani a peroxinitritet, a nitrogén-monoxidot, a szuperoxidot, a hidroxil-gyököt és a hidrogén-peroxidot is. Közvetlen antioxiidáns hatásai mellett részt vesz az oxidált glutation és tokoferolok visszaredukálásában is (19). A flavonoidok a növények másodlagos anyagcseretermékei. Szerkezetileg számos aromás gyűrűrendszerrel rendelkeznek, amelyek szintén hatékonyan lépnek reakcióba az oxidatív vegyületekkel. Számos növényi „kivonatban” érintkezünk a mindennapokban a flavonoidokkal. Megtalálhatóak a teában, kávéban és a borban is (1).

1.1.3 A reaktív oxigénszármazékok funkciói

Fiziológiás tartományban számos nélkülözhetetlen, élettani funkciója van a ROS-oknak, különösen a H_2O_2 -nak. Részt vesznek többek között a patogének elpusztításában, a gyulladásos folyamatokban, hormonszintézisben, valamint a sejtműködés szabályozásában (11).

Számos sejttípus esetében leírták, hogy ha citokinekkal, növekedési faktorokkal vagy hormonokkal kezelték a sejteket, akkor alacsony koncentrációjú ROS képződést tapasztaltak. Ilyen hatást vált ki például az interleukin-3 (IL-3), az interleukin-6 (IL-6), a tumor nekrosis faktor- α (TNF- α), az angiotenzin II (AngII), a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF) és a transzformáló növekedési faktor- β 1 (TGF- β 1) (11). Ezek az intra- vagy extracelluláris jelek ROS függően befolyásolhatják számos gén transzkripcióját, például az NRF2 (nuclear factor erythroid 2), az NF- κ B (nuclear factor- κ B), a HIF (hypoxia-inducible factor), a FOXO (forkhead box O transcription factor), az AMPK (5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase) vagy a p53-on keresztül. A transzkripció hatásaként a sejtek proliferálnak, DNS javítást végeznek, gyulladásos, hipoxiás és antioxidáns válaszba kezdenek, vagy adaptálódnak a stresszhelyzethez (5).

A transzkripció változások mellett közvetlen fehérjehatások is felléphetnek. A redox érzékeny ioncsatornák működését befolyásolhatják, szekrécióra kerülő fehérjék előállítását támogathatják, metabolikus változásokat indukálhatnak és sejtciklust is szabályozhatnak a ROS-ok a cisztein és metionin aminosavak módosítása révén (3, 5).

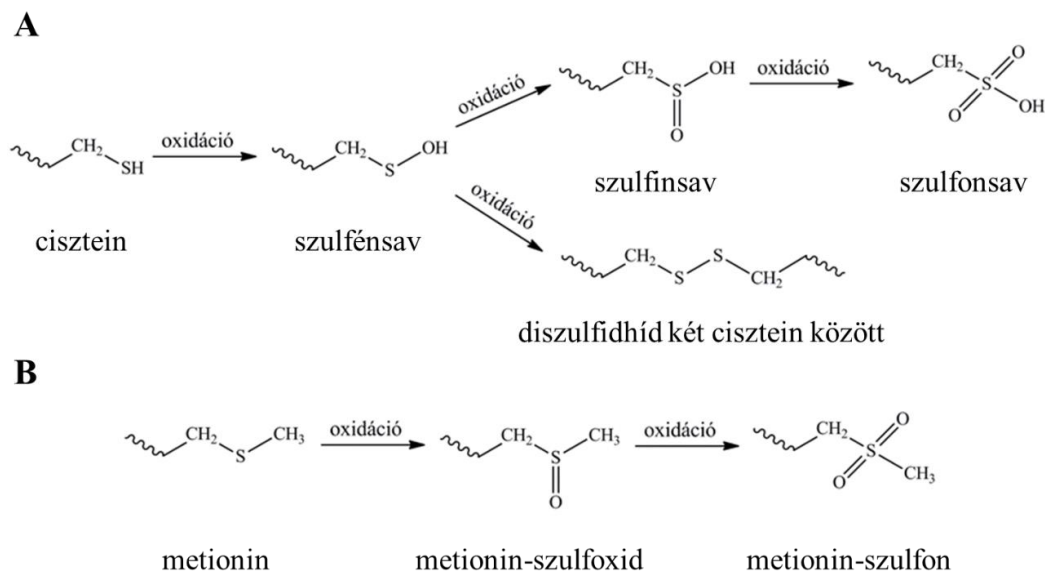
1.1.4 A reaktív oxigénszármazékok károsító hatásai

Mint láthattuk a ROS-ok szükségesek a sejtek normális működéséhez. Azonban, ha a koncentrációjuk túl magas értéket ér el, az károsíthatja a sejteket, szövetek működését. Az antioxidáns kapacitás kimerülésével ún. oxidatív stressz alakul ki, ami negatívan befolyásolhatja a DNS, lipidek és fehérjék funkcióját, kihatva ezzel az egész sejt működésére.

Például a hidroxil-gyök a DNS minden komponensével képes reakcióba lépni. A genetikai anyagban történő oxidatív károsodás gyakran az első lépése a mutációk keletkezésének, a karcinogenezisnek, a sejthalálnak és felgyorsíthatja az öregedési folyamatokat (11).

A szén-szén kettőskötéseket tartalmazó telítetlen zsírsavak is aktív célpontjai az extra ROS terhelésnek, mivel igen könnyen reakcióba tudnak lépni a gyökös vegyületekkel. Az oxidáció következtében ezért módosulhat a celluláris membránok szerkezete. A lipidperoxidációs reakciók végtermékei jellemzően aldehidszármazékok, mint pl. a mutagén és karcinogén tulajdonságokkal bíró malondialdehid vagy a kevésbé mutagén 4-hidroxi-2-nonenal (11).

A fehérjék esetében a cisztein és metionin aminosavak a legérzékenyebbek az oxidatív környezetre. A cisztein esetében a tiolcsoport szulfén-, szulfín- és szulfonsavvá oxidálódhat, vagy két közeli tiol-csoport oxidációjakor diszulfidhíd jöhet létre két cisztein között (21). A metionin ROS hatására metionin-szulfoxiddá, majd metionin-szulfonná alakulhat (22). A fehérje oldalláncokban bekövetkező nem várt oxidációknak súlyos következménye lehet a makromolekulák térszerkezetére, továbbá befolyásolhatnak számos redox-érzékeny jelátviteli utat is. A kénatomon végbemenő oxidatív változásokat a 2. ábrán mutatom be. A fehérjékre ható oxidatív közeg másik jellemző következménye, hogy karbonilcsoportok jelennek meg. A fehérjék karbonilcsoport tartalma jól korrelál az oxidatív stressz mértékével (23).



2. ábra: A kén tartalmú aminosavakon lejátszódó oxidatív változások. (A) A cisztein oxidációja során szulfénsav keletkezik. További oxidációs lépések eredményeképpen a szulfénsavból szulfínsav, majd szulfonsav képződhet, illetve két szulfénsav összekapcsolódásával diszulfidhíd is kialakulhat két cisztein között. (B) A metionin oxidatív környezetben átalakulhat metionin-szulfoxiddá, majd metionin-szulfonná. Az ábra a (21, 22) cikkek alapján készült.

1.2 A NADPH-oxidázok

A 20. század elején megfigyelték, hogy a tengeri sün petesejt és hímivarsejt fúziója során hatalmasan megnövekszik az oxigénfogyasztás. Később ugyanezt a jelenséget tapasztalták, amikor a fehérvérsejtek fagocitózist vizsgálták. Feltételezték ekkor, hogy az extra oxigénigény a megnövekedett mitokondriális energiatermeléshez szükséges a patogén bekebelezése során. Azonban mitokondrium gátlószerek jelenlétében, mint azid és cianid sók, a fagocita sejtek „légzési robbanása” (respiratory burst) ugyanúgy lejátszódott, tehát a megnövekedett oxigénfogyasztás nem a mitokondriumokból származott, ahogy a sejtekből ezzel párhuzamosan felszabaduló jelentős mennyiségű ROS sem. Az 1960-as években észrevették, hogy a folyamat NADPH és nem NADH függő. Pár évvel később tisztázták, hogy a képződő ROS elsődlegesen a O_2^- és nem a H_2O_2 . A fagocitózis tanulmányozása során rájöttek, hogy az antimikrobiális hatás kialakításában szerepet játszanak még a SOD és a mieloperoxidáz (MPO) enzimek is. A patogén bekebelezése során megfigyelt nagy ROS termeléssel járó megemelkedett oxigénfogyasztást pedig elnevezték „oxidatív robbanásnak” (oxidative burst) (24). Az 1980-as évek végére gyűlt össze az a tudáshalmaz, ami alapján azonosították az első NOX enzimet. Royer-Pokora és munkatársai, illetve Teahan és munkatársai sikerrel klónozták a kérdéses fagocita oxidáz komplex katalitikus alegységét, amelyet napjainkban már leginkább NOX2-ként emlegetünk (25, 26). Egy évre rá Nunoí és munkatársai, illetve Volpp és munkatársai azonosították a fehérjekomplex citoszolikus komponenseit (27, 28).

A genomika elterjedésének köszönhetően a 2000-es évek további 6 emberi NOX2 homológ fehérjét azonosítottak. Napjainkban az emlős NADPH-oxidázok családjába 7 enzimet sorolnak, ezek a következők: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 és DUOX2 (24).

Az összes NOX enzimről elmondható, hogy transzmembrán fehérje, amelyek elektront transzportálnak a sejtalkotó membránok egyik (jellemzően citoplazmatikus) oldaláról a másik oldalára, ahol molekuláris oxigént redukálnak O_2^- -á. Egyes izoformák esetén a szuperoxid még a molekulán belül H_2O_2 -dá alakul. Az N-terminális részen a NOX izoformától függően különböző struktúrák fordulnak elő. A család összes tagjában megtalálható egy konzervált fehérjeszerkezet, ami az elektronok transzportálását teszi

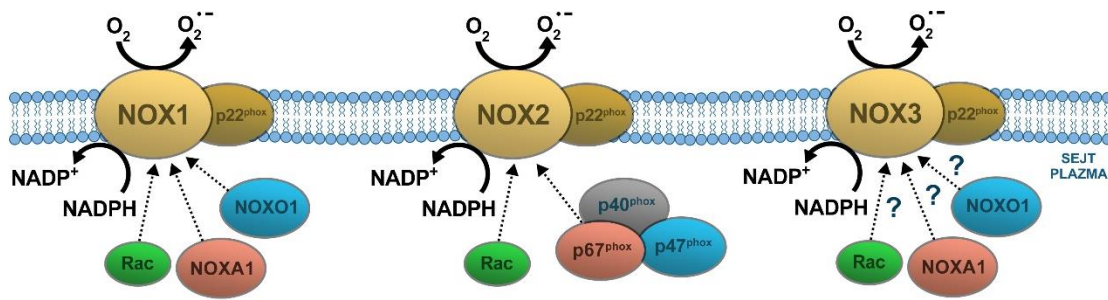
lehetővé. Az N-terminális lánchoz kapcsolódik 6 transzmembrán domén. A 3. és az 5. transzmembrán doménban vannak azok a hisztidin aminosavak, amelyek 2 hem prosztetikus csoportot kötnek. A fehérjék C-terminális részén elhelyezkedik egy FAD-kötőhely, mellette egy NADPH-kötőhely. Gyakorlatilag ez az a konzervált szerkezet, ami minden NOX-ban lehetővé teszi az oxigén redukcióját. (24).

Az elektrondonor NADPH 2 elektront biztosít, ami először a FAD-ot FADH₂-vé redukálja. Ezután az első elektron a proximális hem vázra, majd egy aromás oldalláncú aminosavon keresztül a disztális hem vázra kerül, innen pedig az elektronakceptor oxigénmolekulára, ami O₂⁻-á redukálódik. Miután az első elektron a disztális hem vázra került, a második elektron is elindul ugyanezen az úton (24, 29).

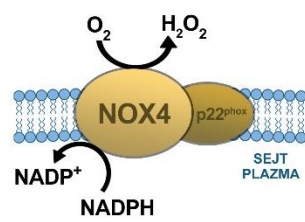
Az enzimek működéséhez azonban kevés a konzervált szerkezet megléte. Az egyes izoformák aktiválódása és együttműködése egyéb fehérje alegységekkel minden esetben különbözik egymástól. A NOX1, NOX2, NOX3 és NOX4 esetében egy kisebb transzmembrán fehérje, a p22^{phox} stabilizálja a NADPH-oxidázt. A NOX1, NOX2 és NOX3 esetében további citoszolikus fehérje alegységek szükségesek az aktív konformáció kialakításához. A NOX5, DUOX1 és DUOX2 fehérjéket az intracelluláris kalciumszint megemelkedése aktiválja, míg a NOX4 konstitutív aktivitást mutat, és aktivitása leginkább transzkripciós szinten szabályozott. Az előállított ROS fajtájában is különbségeket találunk. A NOX4 és a DUOX-ok H₂O₂-ot, míg a másik 4 izoforma O₂⁻-ot szabadít fel. Közös azonban bennünk, hogy a ROS-termelésük szabályozott (30). Az egyes enzimek aktiválódási mechanizmusát és az általuk termelt ROS típusát a 3. ábra foglalja össze.

Szerkezeti információk jelenleg három NADPH-oxidázzal állnak rendelkezésre, a humán NOX2-ről, az egér DUOX1-ről és a *Cylindrospermum stagnale* cianobaktériumból származó NOX5-ről. A struktúrákat modellezéssel és krio-elektronmikroszkópos eljárásokkal állapították meg. A fehérjeszerkezet ismerete közelebb vihet a NOX-okon végbemenő elektrontranszport pontosabb megértéséhez és a specifikus NOX inhibitorok tervezéséhez (29, 31, 32).

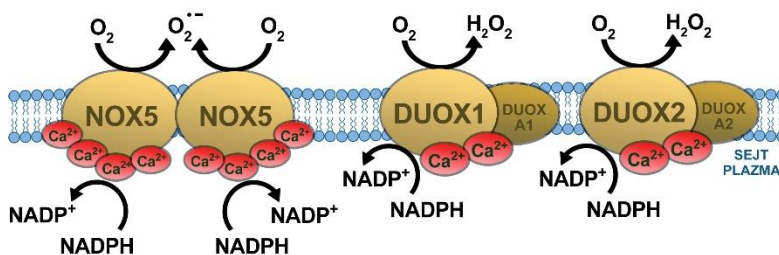
CITOSZÓLIKUS AKTIVÁLÓ FAKTOROKTÓL FÜGGŐ ENZIMEK



ÁLLANDÓ ENZIMAKTIVITÁS



KALCIUMION AKTIVÁLT ENZIMEK



3. ábra: A különböző NADPH-oxidázok aktiválódási mechanizmusai és az általuk termelt ROS típusa. Az ábra a (24, 30) alapján készült.

Fehérjeszekvencia alapján 3 alcsoportba sorolhatók a NADPH-oxidázok attól függően, hogy mennyire hasonlítanak az elsőként felfedezett NOX enzimre, a NOX2-re. Az első csoportba tartozik a NOX1, NOX2, NOX3 és NOX4 a maguk körülbelül 65 kDa-os fehérjéikkel. A második csoportban a DUOX1 és DUOX2 enzimek találhatóak. Nagyobb molekulatömegük van, illetve az enzimek esszenciális része a peroxidáz homológ domén. A harmadik csoportban csupán a NOX5 képviselteti magát. Ez mutatja a legtávolabbi rokonságot a NOX2-től (33).

A NADPH-oxidázok az emberi szervezet számos sejt- és szövettípusában, szervében előfordulnak. Megtalálhatóak többek között a vastagbélben, a belső fülben, a vesében, a lépben, a herében, a pajzsmirigyben, a tüdőben, az érhálózatban, de immunsejtekben is. Feladataik is ennek megfelelően igen sokrétűek. Részt vesznek az immunvédekezésben, a hormonszintézisben, az egyensúly érzékelésében, a sejtek proliferációjában és differenciációjában, a vazoregulációban (34).

1.2.1 NOX2

A NOX2 az elsőként felfedezett NADPH-oxidáz. Mivel a legtöbb ismeretanyag a NOX2 kutatásából született, ezért prototípus enzimeként tekintenek rá a NADPH-

oxidázok között. A bevezetőben leírt molekuláris tanulmányok mellett a klinikai esetek tanulmányozása is oda vezetett, hogy azonosítani tudták az enzimet. Krónikus granulomatózisban (CGD) a betegeket visszatérő fertőzések sújtják, fehérvérsejtjeik képtelenek legyőzni a kórokozókat, testükön granulómák jelennek meg. A CGD-s páciensek fehérvérsejtjeit vizsgálva megállapították, hogy a sejtek képesek kemotaxisra, fagocitózisra és degranulációra, azonban az oxidatív robbanás elmarad, és a sejtek O_2^- -ot nem tudnak termelni, így a patogént nem tudják semlegesíteni (24). 1978-ban Segal és Jones azonosította azt a flavocitokróm b fehérjét a neutrofil granulociták membránjában, amely a CGD-s betegek fehérvérsejtjeiben hiányzott (35). Ez volt a NOX2 fehérje, amit kezdetben citokróm b_{558} -nak (cytochrome b_{558}), majd $gp91^{phox}$ -nak is hívták (24).

A fagocita NADPH-oxidáz (phagocytic NADPH oxidase, phox) egy több komponensből álló enzimkomplex. A komplex magját a NOX2 fehérje adja, amelyben az oxidáz katalitikus centruma is működik. Megtalálhatók a szerkezetben a NADPH- és FAD-kötő domének, illetve az elektronok transzportálásához szükséges két hem gyűrű is (24). A NOX2 570 aminosavból álló, erősen glikozilált protein (18). Denaturáló és redukáló körülmények között végzett gélelektroforézis vizsgálatok alapján 90 kDa körül detektálható a fehérje, míg a cukorláncok lehasítását követően az aminosav szekvencia alapján számolt 55 kDa környékén mutatható ki. Többnyire N-acetilglükózaminból és galaktózból, kisebb részben fruktózból, mannózból és glükózból állnak a glikozil láncok (36). A szénhidrátláncok azokhoz az aszparagin aminosavakhoz csatlakoznak N-glikozilációval (Asn^{131} , Asn^{148} , Asn^{239}), amelyek a második és harmadik extracelluláris hurkokban találhatóak (37).

A NOX2 heterodimerként izolálható a $p22^{phox}$ fehérjével együtt. A $p22^{phox}$ egy 22 kDa-os transzmembrán protein, amelynek a feladata a NOX2 stabilizálása a membránban, illetve különböző interakciók létrehozása egyéb citoszolikus komponensekkel. A $p22^{phox}$ citoplazmatikus C-terminális része egy prolin gazdag régiót (proline-rich region, PRR) tartalmaz, amely kapcsolódási helyet biztosít az aktiválódás során bekötődő $p47^{phox}$ alegységnek (24). A $p22^{phox}$ jelentőségét demonstrálja, hogy azon CGD-s páciensek esetében is elmarad a fehérvérsejtek O_2^- termelése, akiknél a $p22^{phox}$ DNS szekvenciájában fedeztek fel mutációkat (38, 39).

A fagocita oxidáz működéséhez szükség van citoplazmatikus aktivátor fehérjékre is, nevezetesen a $p40^{phox}$ -ra, $p47^{phox}$ -ra és $p67^{phox}$ -ra. Mindhárom phox fehérje egy

multidoménos struktúra, amelyek nyugalomban egy citoszolikus trimert alkotnak. Az aktiváció során egy komplex átrendeződésen mennek keresztül az alegységek, amely eredményeképpen a trimer a membránkötött NOX2-p22^{phox} heterodimerhez kapcsolódik (40).

A phox fehérjék mellett a Rac GTP-áz kis G-fehérje is szükséges még az oxidáz szuperoxid termeléséhez. A Rac szerkezetére jellemző, hogy az N-terminális részén guanozin kötőhely van és egy geranil-geranil lipidrész is csatlakozik a molekulához. A C-terminális részén egy polibázikus régió helyezkedik el, ami a fehérje membránhoz történő kötődését biztosítja. A GTP-áz a guanozin kicserélő faktor (Guanosine Exchange Factor, GEF) szabályozása alatt áll. GDP-kötött állapotban inaktív, GTP-kötött állapotban aktív a Rac. Aktiváció hiányában a Rac a citoplazmában található RhoGDI inhibitoros fehérjéhez kötődik, ami meggátolja a Rac kapcsolódását a lipidmembránokhoz. Foszforilációja esetén a Rac disszociál a RhoGDI-ről, lipid oldallánca segítségével beékelődik a plazmamembránba és hozzákapcsolódik a NOX2-p67^{phox} komplexhez (24). Emlősökben a Rac fehérjének 3 izoformája létezik. A Rac1 általánosan elterjedt a szervezetben, a Rac2 leginkább a mieloid sejtekben fellelhető, míg a Rac3 többnyire a központi idegrendszerben található meg (18). A humán fagocitákat tekintve a neutrofil granulociták leginkább a Rac2-t expresszálják, míg monocitákban és makrofágokban a Rac1 és a Rac2 is megjelenik (40).

A NOX2-t először neutrofil granulocitákban és makrofágokban írták le, innen ered a fagocita NADPH-oxidáz (phox) elnevezés (35). Számos humán szervben kimutatták a NOX2 messenger RNS-ét. Azonban ezen széleskörű expresszió feltehetőleg jelentős részben az egyes szervekben megtalálható szövetközi fehérvérsejtekre, illetve a szervek vérrrel történő kontaminációjára utal (33). Napjainkban egyre több sejtben találtak fehérjealapú bizonyítékot arra, hogy a NOX2 nem csak a fagocitákban van jelen. Több tanulmány szerint is megtalálható szívizomsejtekben (41), idegsejtekben (42), endotélsejtekben (43) és hemopoetikus őssejtekben is (44).

Nyugalomban a NOX2-p22^{phox}, p40^{phox}-p47^{phox}-p67^{phox} és Rac fehérjék szeparáltan találhatóak a fagocitákban (24). A NOX2-p22^{phox} heterodimer indukció nélkül döntően a sejten belül, a granulomok membránjaiban helyezkedik el (45). Az aktivációt a patogént felismerő specifikus receptorok, mint például TLR (Toll-like Receptor), CLR (C-type Lectin Receptor), MMR (Macrophage Mannose Receptor) és scavenger receptorok,

indítják. Ezek mellett természetesen egyéb iniciátorok, mint például opszonizált baktériumok, szintén elindíthatják az aktivációt. Az oxidáz komponensek találkozási egy sor foszforilációs reakció következménye, amiben különböző kinázok vesznek részt, többek között a protein kináz C (PKC) és a mitogén aktivált protein kinázok (MAPK) (24). A foszforilációs kaszkád eredményeként a NOX2-p22^{phox} heterodimert tartalmazó granulumok fuzionálnak a plazmamembránnal vagy a fagoszómával, kapcsolódnak a citoszolikus komponensek és a Rac, végül pedig megindul a O₂⁻ termelése (18). A fagoszómában a O₂⁻ spontán vagy SOD közreműködésével H₂O₂-dá alakul. A mieloperoxidáz a H₂O₂-ot Cl⁻ oxidálására használja fel, hipoklórossavat (HOCl) előállítva. A képződött HOCl igen hatásos antimikrobiális vegyület, ami semlegesíteni tudja a patogéneket (46). A fagocitáló sejtekben tehát a NOX2 funkciója a szabályozott ROS termelésen keresztül megvalósuló patogénelimináció.

1.2.2 NOX1

A 2000-es években egymástól függetlenül két kutatócsoport fedezte fel a NOX2 első homológját, a NOX1-et, amelyet akkoriban még Mox-1-nek valamint NOH1-nek neveztek el (47, 48). A fehérje 564 aminosavból áll, és 56 %-os azonosságot mutat a NOX2-vel (49).

A NOX1 szintén heterodimert alkot a p22^{phox}-szal (50). Az enzim aktiválásához, a NOX2-höz hasonlóan, citoszolikus fehérjealegységre van szükség. Két fehérjét azonosítottak, amelyek fiziológiai körülmények között elengedhetetlenek a NOX1 ROS termeléséhez, a p47^{phox} homológ NOXO1-et (NOX organizer 1) és a p67^{phox} homológ NOXA1-et (NOX activator 1) (51, 52). A Rac GTP-áz szintén a komplex része az aktivációkor (49). Az aktivációs szignál ez esetben is a foszforiláció jelenti, aminek a következtében a szeparált alegységek összeállnak egy komplexszé, majd a NOX1 oxigén redukciójával O₂⁻-ot állít elő (30).

Kimutatták, hogy a NOX1-NOXO1-NOXA1 és a NOX2-p47^{phox}-p67^{phox} rendszerek egyes citoszolikus komponenseinek felcserélésével szintén képesek a komplexek ROS-t előállítani. CGD-s betegek neutrofil granulocitáiban a NOX1 aktivációjához alkalmasak a p47^{phox} és p67^{phox} fehérjék. Sejtmentes rendszerekben szintén leírták, hogy a NOX2 képes O₂⁻-ot termelni, ha a NOXO1 és NOXA1 a citoplazmatikus faktorok. Mindkét kevert rendszer esetében megvalósult ugyan a O₂⁻ termelése, ám a hatékonysága

jelentősen elmaradt attól, mintha a NOX-ok a saját aktivátoraikkal alkotnának komplexet. Ezen érdekes helyettesítési lehetőségeknek a biológiai relevanciájáról még keveset tudunk (53, 54).

A NOX1 a vastagbél epitélisejtjeiben fejeződik ki a legnagyobb mennyiségben (innen származik a colon oxidase elnevezés). Kisebb mennyiségben szintén leírták simaizomsejtokban, prosztatában, méhben, méhlepényben és oszteoklasztokban (49). Az intracelluláris elhelyezkedését tekintve nem egyöntetű a szakirodalom. Keratinocitákban gyenge citoplazmatikus és erős sejtmagi festődést láttak (55). Két tanulmányban vizsgálták a NOX1 lokalizációját vaszkuláris sejtekben. Nyúl simaizomsejtök esetében ER (56), míg a humán simaizomsejteképl plazmamembrán (57) jelölődést detektáltak.

A NOX1 élettani szerepe még nem teljesen tisztázott. Az expressziós mintázatát és a NOX2-höz hasonló működését figyelembe véve, feltételezhető, hogy immunvédelmi szerepe van a vastagbélben. Több kísérletben is azt tapasztalták, hogy különböző bakteriális makromolekulákkal kezelt sejtek NOX1-függő ROS termelést mutattak. A NOX1-nek tehát szerepe lehet a mikrobiom egyensúlyának a fenntartásában, az egyes mikróbák elszaporodását gátolva a mukóza védelmében (49). A közvetlen védelem mellett azonban felmerül annak is a lehetősége, hogy a NOX1 által termelt O_2^- proinflammatorikus citokinek termelődését serkenti egyes ROS-érzékeny jelátviteli utakon keresztül (58).

Egyértelmű összefüggéseket fedeztek fel a gyulladósos bélbetegség (Inflammatory Bowel Disease, röviden IBS) és a *nox1* gén mutációi között. Több, IBS-ben szenvedő beteg vizsgálata során különböző *nox1* misszensz mutációkat fedeztek fel. A mutációt hordozó NOX1 fehérjék szuperoxidtermelő képessége csökkent, és a kísérleti eredmények alapján megállapítható, hogy a kieső NOX1 funkció hozzájárul a patológias állapot kifejlődéséhez. Megjegyzendő, hogy nem kizárólag a *nox1* gén mutációja miatt jöhet létre az IBS, hanem más NOX mutációk is okozhatják azt. A DUOX2, illetve a NOX2 komplex valamely alkotójának a génjében létrejövő mutációk szintén IBS kialakulásához vezethetnek (59).

1.2.3 NOX3

A NOX3 568 aminosavból áll és 58 %-os azonosságot mutat a NOX2-vel (49). 2000-ben írták le először, de tanulmányok a fehérje funkcionális jellemzéséről csak négy évvel később jelentek meg (60, 61).

Az enzim tanulmányozása során azt tapasztalták, hogy a NOX3 O_2^- -termelése $p22^{phox}$ -függő (62, 63). A NOXO1 jelenléte minden tanulmány szerint fokozta a ROS termelést (63, 64). Heterológ expressziós rendszerben a $p47^{phox}$ és a $p67^{phox}$ jelenléte szintén fokozta a NOX3 ROS termelését, azonban ennek fiziológiai relevanciája kérdéses (64). A NOXA1 tekintetében ellentmondásos a szakirodalom. Egyesek szerint a NOXA1 szükséges a komplex működéséhez, míg mások ennek ellenkezőjét állítják. A Rac fehérje esetében szintén ellentmondó tanulmányok születtek arról, hogy jelenléte szükséges-e az enzimkomplex működéséhez (49).

A NOX3 dedikáltan a belső fülben található meg kifejezett állatban. Valós idejű polimeráz lánc-reakcióban (RT-PCR) és *in situ* hibridizációs kísérletek kimutatták a jelenlétét a csigában, a vestibuláris szenzoros epitéliumban és a spirális ganglionban. Detektálták még magzati lépben és vesében is (33, 60). Feladata az otoconia szintézisében vagy a kristályosodási folyamatokban való részvétel (61). HEK-293 és CHO sejtek által túltermeltetett NOX3 fehérje a plazmamembránban helyezkedik el (62).

A NOX3 funkciójának nyomára egy mutáns egértörzset karakterizálva bukkantak. A „head tilt” (*het*) elnevezésű egereket vizsgálva azt figyelték meg, hogy a rágcsálók a fejüket jellegzetesen ferdén tartják, egyensúlyérzékelési zavarban szenvedtek. Molekuláris biológiai módszereket használva megtalálták a defektus okát, a *Nox3* génjében egy mutációt. A NOX3 mutáns egereknél elmaradt az otoconia szintézise, ami súlyosan rontotta az állatok egyensúlyérzékelését (61). *In vitro* kísérletek szerint a NOX3 működéséhez szükséges a $p22^{phox}$. Azonban *in vivo*, $p22^{phox}$ -hiányos CGD-s betegek nem számoltak be szédülésről, az egyensúlyérzékelésük zavaráról, emiatt kérdéses a fehérje szerepe a NOX3 enzimkomplex működésében (65). Ennek ellenére létrehoztak egy $p22^{phox}$ -deficiens egértörzset, az *nmf333* vonalat, amelynél a *het* törzshöz hasonlóan egyensúlyérzékelési zavarokat írtak le (66). Ezen megfigyelések azt sugallják, hogy a $p22^{phox}$ -nak jelentősebb szerepe van az egereknél az egyensúlyérzékelésben, mint az embereknél. Genetikai bizonyítékok vannak arra vonatkozóan, hogy a NOXO1 NOX3-at

támogató szerepe *in vivo* is jelentős,. A *hslt* (head slant, fejét ferdén tartó egér) egérvonal esetében leírták, hogy a fenotípus kialakulásáért a *Noxo1* génben történt mutáció a felelős. Az egerek egyensúlyérzékelési zavarban szenvedtek, illetve az otoconia szintézise is károsodott (67).

1.2.4 NOX4

A NOX4 578 aminosavból áll és 39 %-os azonosságot mutat a NOX2-vel. Leíróik eredetileg a Renox névvel illették (renal oxidase), mivel legnagyobb mennyiségben a vesében fejeződik ki (68).

A NOX4 működéséhez szükséges a p22^{phox} fehérje. Szemben azonban a korábban taglalt NOX-okkal, ennek a homológoknak nincs szüksége citoszolikus aktiváló alegységekre a ROS előállításához. A jelenleg elérhető adatok alapján az eddig taglalt NOX-okkal szemben a NOX4 terméke a H₂O₂ (69).

Mivel citoplazmatikus fehérje alegységek nem szükségesek az enzim aktiválásához, a p22^{phox} szerepe pedig az oxidáz stabilizálása a membránban, feltételezhetőleg a NOX4 konstitutív aktivitással rendelkezik. A H₂O₂ termelését így leginkább génexpressziós szinten lehet szabályozni. Számos olyan ágenst és körülményt leírtak, amely fokozza a *nox4* gén átíródását. Az ER stressz, a mitokondriumfunkció elégtelensége, az érlemeszesedés, a hipoxia, a TGF-β1 és TNF-α mind fokozzák a NOX4 átíródását vaszkuláris simaizom- és endotélsejtekben (69).

NOX4 a legszélesebb körben kifejeződő NOX homológ. Az enzim elsődleges kifejeződési helye a vese. *In situ* hibridizációs kísérletekben a NOX4 mRNS-ét a medulláris gyűjtőcsatornáknak és a vesepapilla epitéliumában detektálták (49), míg immunhisztokémia eredmények szerint a nefron disztális tubulusában is jelen van a fehérje (70). A korábban említett simaizom- és endotélsejteken kívül az mRNS-t detektálták még fibroblasztokban, oszteoklasztokban, keratinocitákban, hematopoetikus őssejtekben, neuronokban és melanoma sejtekben (18). A fehérje sejten belüli elhelyezkedése még nem teljes mértékben tisztázott. A különböző kutatócsoportok eltérő kompartmentekben detektálták az enzimet, úgy mint ER-ban, sejtmagban és mitokondriumban (69).

A NOX4 élettani szerepe a mai napig nem tisztázott. Valószínűsíthető, hogy funkciója függ a sejtípustól és sejten belüli elhelyezkedésétől. Leírták szerepét a sejtproliferációban, a sejtmigrációban és az apoptózisban (71). A kardiovaszkuláris rendszer számos komponensében vizsgálták a NOX4 szerepét állatmodellekben. Több tanulmány is beszámol a NOX4 védő hatásáról szívmegegyobbodásban. A vaszkuláris endotélsejtek tanulmányozása során több kísérlet is abba az irányba mutat, hogy a NOX4 vazodilatációt támogató enzim. A hatást a NOX4 által termelt H_2O_2 fejtheti ki oly módon, hogy az endoteliális nitrogén-monoxid-szintáz kifejeződését és aktivitását növeli, összességében a NO termelést fokozza. Ennek ellenére több tanulmány is rávilágít, hogy nem tapasztaltak a vérnyomásértékekben különbséget a kontroll és a NOX4 hiányos egerek között. Az érlemezsedés vizsgálata kapcsán több különböző eredmény is inkább abba az irányba mutat, hogy a NOX4-nek védő hatása van a betegség kialakulásával szemben (72). A vese kapcsán a NOX4-et összefüggésbe hozták az oxigéntenzió érzékelésével is, ám egyértelmű bizonyítékokat még nem sikerült felmutatni (71).

1.2.5 DUOX1 és DUOX2

A DUOX1 és DUOX2 fehérjék 1551, illetve 1548 aminosavból állnak és 83 %-os a szekvencia azonosságuk. A NOX2-vel 47 %-os azonosságot mutatnak (49).

Szerkezetükben megtalálható a bevezetőben leírt, NOX-okra jellemző, szigorúan konzervált struktúra, továbbá kiegészülnek még egyéb doménekkal is. Az N-terminális végükön csatlakozik két EF-hand motívum, amit egy hetedik transzmembrán hélix követ, végül ehhez kapcsolódik egy peroxidáz-homológ domén. Nevük is innen ered, DUal OXidase, (DUOX), vagyis kettős oxidáz. Az enzimek szabályozása a Ca^{2+} -érzékeny EF-hand-eken keresztül valósul meg, egyéb citoszolikus komponensek nem szükségesek az aktivációhoz. Az $[Ca^{2+}]_{ic}$ emelkedése tehát a DUOX-ok ROS termelésének döntő tényezője. A DUOX-ok a NOX4-hez hasonlóan H_2O_2 -ot termelnek. A peroxidáz-homológ domén nagyfokú hasonlóságot mutat a peroxidáz enzimekhez. Mindazonáltal tényleges peroxidáz aktivitása nincs ennek a résznek, ugyanis olyan, a peroxidáz aktivitáshoz kulcsfontosságú aminosavak hiányoznak, amelyek a hem prosztetikus csoportot kötni tudnák (24). A peroxidáz-homológ domén jelenleg ismert jelentősége, hogy kulcsfontosságú ciszteinek vannak benne, amik hozzájárulnak a DUOX-ok ééréséhez és stabilizálásához (73).

A funkcióképes DUOX enzimek kialakulásához transzmembrán segédfehérjék szükségesek. A DUOX1 működéséhez a DUOXA1, a DUOX2-éhez pedig a DUOXA2 szükséges. A segédfehérjék a nevüket a „DUOX activator”, azaz DUOX aktivátor elnevezésből kapták. A DUOXA-k kellenek a DUOX-ok megfelelő glikozilálásához. Hiányukban az oxidázok az ER-ban ragadnak, így nem helyeződnek ki a plazmamembránba (74, 75). A DUOX-okon két N-glikozilációs pozíció van (76). A segédfehérjék azonban nem csak a fehérjeéréshez nélkülözhetetlenek, hanem a H₂O₂ előállításához is. Heterológ expressziós rendszerben külön-külön transzfektálva a DUOX2-t és a DUOXA2-t nem mérték ROS termelést, szemben azzal, ha mindkét komponenst bejuttatták a sejtekbe (77). Vizsgálták továbbá azt is, hogy a leghatékonyabb H₂O₂ termelést úgy éri el a rendszer, ha a DUOX1-nek a DUOXA1, a DUOX2-nek pedig a DUOXA2 az érési faktora. Ha a DUOX mellett nem a megfelelő segédfehérje volt jelen, akkor jóval kisebb ROS termelést detektáltak (78).

A DUOX1 és DUOX2 nagy mennyiségben fejeződik ki a pajzsmirigyben, ahol a fehérjéket a tireociták apikális oldalán mutatták ki. Innen ered korábbi elnevezésük, a pajzsmirigy oxidáz („thyroid oxidase” rövidítve THOX) (79). A DUOX2 alapvető szerepet játszik a tireociták hormonszintézisében. Az oxidáz által előállított H₂O₂-ot a tireoperoxidáz (TPO) használja fel reaktív jód származékok szintézisére, amelyek aztán a tireoglobulin tirozin maradékait módosítják (80). Leírták, hogy a DUOX2, DUOXA2 vagy a TPO hiánya mind hipotireózishoz vezet (81-84). Érdekesség, hogy a pajzsmirigyben kifejeződik a DUOX1 és a DUOX2 is. Egérmodellekben a kieső DUOX2 funkciót a DUOX1 nem képes pótolni. DUOX2 hiányos embereknél azonban azt tapasztalták, hogy részleges vagy átmeneteli hipotireózis alakult ki, amit a DUOX1 kompenzáló hatásának tulajdonítottak. A DUOX1 szerepe a tireocitákban jelenleg ismeretlen (85).

A DUOX fehérjék a pajzsmirigyen kívül igen széles szöveti expressziót mutatnak. Emlősökben jelen vannak a nyálmirigyben, a gasztrointesztinális traktusban és a légcsövekben (86). A DUOX1 kimagasló expressziót mutat a bőrben (87). Érett formájukban a DUOX-ok a plazmamembránban találhatóak (24).

A DUOX-ok a laktoperoxidázzal (LPO) a mukozális felszínek és a szekrétaumok antibakteriális védelmét biztosítják. Bizonyították a DUOX2 jelenlétét a nyálmirigy kivezető csöveiben, a DUOX1-ét pedig a légúti epitelsejteken. Az oxidázokból származó

H₂O₂-ot az LPO a tiocianát (SCN⁻) oxidálására használja, hipotiocianátot (OSCN⁻) előállítva, amely hatékony antimikrobiális ágens (80).

Leírtak néhány stimulust, amivel serkenteni lehetett a DUOX-ok kifejeződését. Légúti epitélisejtekben a DUOX1 expresszióját fokozta az interleukin-4-gyel, interleukin-13-mal és Th2 citokinnel végzett kezelés, míg a DUOX2 mennyiségét növelte a transz-retinolsav, az interferon- γ és a Th1 citokin (88-91).

1.3 NOX5

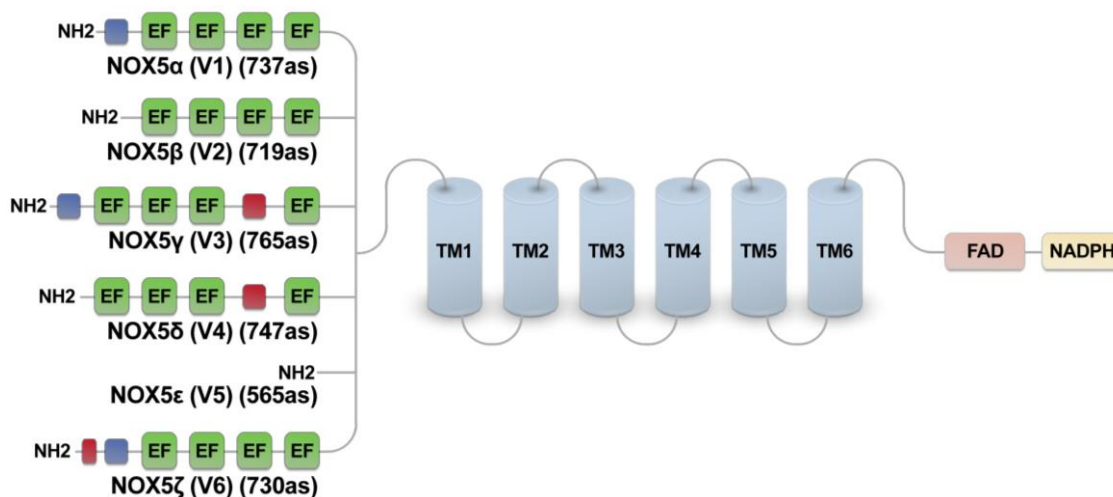
A NOX5-öt két kutatócsoport írta le 2001-ben, a NADPH-oxidázok közül utolsóként. Cheng és munkatársai egy 565 aminosavas fehérjét klónoztak meg, míg Bánfi és munkatársai egy több mint 700 aminosavas fehérjét karakterizáltak (33, 92). Az elmúlt 20 évben ismereteink egyre bővültek a NOX5-ről, azonban a pontos élettani szerepét mind a mai napig nem ismerjük.

1.3.1 A *nox5* gén

Emberekben a *nox5* gén a 15. kromoszóma hosszú karján helyezkedik el és 18 exon alkotja. Az exonok „alternatív splicing-ja” miatt ez idáig hat variánst írtak le, ezeket α , β , γ , δ , ϵ és ζ jelölésekkel látták el. A legújabb HUGO gén nomenklatura ajánlása szerint az izoformákat a görög betűk helyett v1, v2, stb. jelöléssel kell ellátni. Így nyilvános adatbázisokban a NOX5v1 a NOX5 α -t, a NOX5v2 a NOX5 β -t, stb. jelöli. A szakirodalom mindmáig gyakran előnyben részesíti a görög betűs jelöléseket, ezért én is így teszek a dolgozatomban. Két géntranszkripció kezdő helyet azonosítottak, az egyik a β és δ variánsokat (4. exontól) szolgálja ki, a másik az α és γ variánsokat (3. exontól). Az első két exon nemkódoló szekvencia. Az ϵ izoforma start helye a 6. exonnál van (93).

Mind a hat izoformára igaz, hogy konzervált transzmembrán doménekkel és C-terminális régióval rendelkeznek, a különbségeket pedig az N-terminális oldalon elhelyezkedő EF-hand-ekben mutatják. A γ és a δ izoformák a 3. és a 4. EF-hand-ek között egy beékelődött szekvenciát tartalmaznak, amely feltehetően befolyásolja az EF-hand rész kalciumionkötő és ezen izoformák szuperoxidtermelő képességét (94). Az ϵ izoformából hiányzik az EF-hand régió, ezért ún. rövid izoformának is nevezik (NOX5-short vagy NOX5-S), míg a többi hosszú izoformának. A ζ izoformáról mindeddig keveset tudunk, jellemzéséhez további kutatások szükségesek. Megjegyzendő, hogy az

ismert variánsok közül csak az α és β izoformák esetében bizonyított egyértelműen, hogy funkcióképes NOX5-ök (94), míg a NOX5-S valamely ismeretlen módon okoz fokozott celluláris ROS termelést (95). Az izoformák közti különbséget a 4. ábrán szemléltetem.



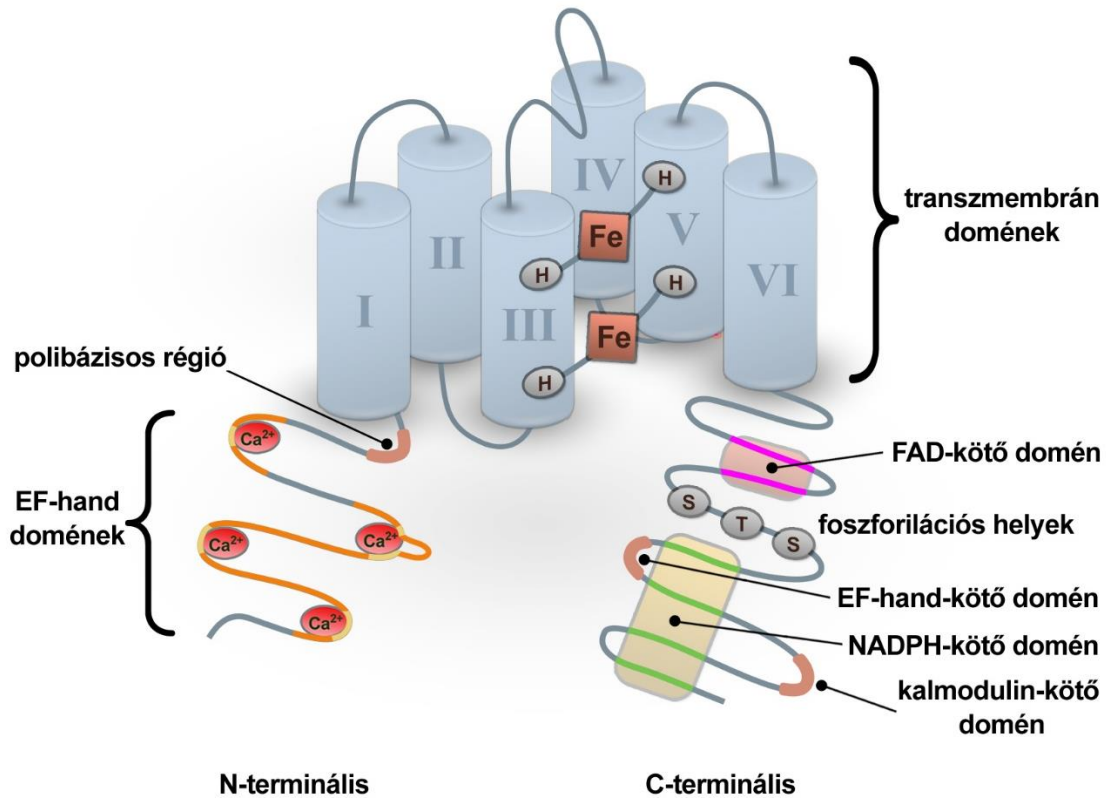
4. ábra: A különböző NOX5 izoformák sematikus bemutatása. Mind a hat NOX5 izoformában közös vonás, hogy konzervált transzmembrán doménekkal (TM1-6) és a C-terminálison elhelyezkedő FAD- és NADPH-kötőhelyekkel rendelkeznek. Az N-terminálison elhelyezkedő EF-hand-ek mutatják az egyes izoformákban a különbséget. Az ábrán feltüntettem a különböző izoformák jelenleg használatos nomenklatúrák szerinti elnevezéseit, illetve az egyes izoformákat alkotó aminosavak (as) mennyiségét. A képet a (94)-as közlemény alapján készítettem.

Evolúciós érdekesség, hogy a rágcsálókban hiányzik a *Nox5* gén. Így a közkedvelten használt egér és patkány állatmodellek sajnos szigorúan véve alkalmatlanok a NOX5 élettani feladatainak a felderítésére (96). Azonban egy friss, genom adatokat vizsgáló tanulmány pontosította a NOX5 expresszió kérdését a rágcsálókban. 31 rágcsálófaj közül, amelyeknek rendelkezésre áll a genomszekvenciája, 27 fajból hiányzik a NOX5. A meglévő információk alapján viszont a mormotákban és a mókusokban, amelyek szintén rágcsálók, jelen van a *Nox5* gén. További érdekesség, hogy a nyúlalakúak rendjén belül csak a nyúlfélékben találták meg az oxidázt, a pocoknyúlfélékben ellenben nem (97). Az emlősök többi rendjét vizsgálva már nem mondható el ez a hiányosság. Az enzim fellelhető emberekben, csimpánzokban, tehenekben, sertésekben és kutyákban is. Érdekes módon, a növényekben a NOX5-re hasonló NOX fehérjék terjedtek el. Több humán NOX5 homológ enzimet azonosítottak

már a növényekben, és mindegyikük EF-hand motívummal rendelkezik, ami a humán NOX5-nek is jellemzője. Az eddigi megfigyelések azt mutatják, hogy a növényi NOX5 által termelt O_2^- a növény védekezési mechanizmusaiban, illetve növekedésében és fejlődésében játszik szerepet (98).

1.3.2 A NOX5 szerkezete

A NOX5 mindössze 27 %-os azonosságot mutat a NOX2-vel, ennek ellenére a bevezetőben leírt szerkezeti tulajdonságok igazak erre az izoformára is. Hat transzmembrán α -hélixszel rendelkezik, a harmadikban és ötödikben helyezkednek el azok a szigorúan konzervált hisztidinek (H268, H282, H356 és H369 a NOX5 β izoformában), amelyek a két hemvázat megkötik. A C-terminális részen találhatóak a szintén szigorúan konzervált, minden NOX-ra jellemző NADPH- és FAD-kötő domének. Továbbá ugyanezen régióban van még egy kalmodulin-kötő domén, EF-hand-kötő domén és foszforilációs helyek is. A NOX5 N-terminális citoplazmatikus peptidlánca igen egyedi a NADPH-oxidázok között. Itt fellelhető egy polibázisos domén, mellette pedig négy EF-hand motívum. Az utóbbiak a Ca^{2+} -ok megkötését szolgálják, ami majd végeredményben az enzimaktivációt is kiváltja (96, 99). A többi NOX enzimtől eltérően a NOX5 különlegessége, hogy nem glikozilált (100). A NOX5 sematikus szerkezetét, jelölve a nevezetes struktúrákat, az 5. ábrán szemléltetem.



5. ábra: A NOX5 fehérje sematikus szerkezete, jelölve a nevezetesebb régiókkal. Az ábra a (96, 100) cikkek alapján készült.

A NADPH-oxidázok közül elsőként, a *Cylindrospermum stagnale* cianobaktériumból megklónozott NOX5-ről publikáltak szerkezeti információkat 2017-ben. A cianobaktérium NOX5-je 40 %-os azonosságot mutat a humán NOX5-tel. Technikai nehézségek miatt a dehidrogenáz és transzmembrán domének szerkezetét külön-külön vizsgálták a tanulmányban, majd *in silico* módszerek segítségével összekapcsolták az eredményeket. A vizsgálat elsőként mutatott rá, hogyan is történhet pontosan az elektronok transzportja a NADPH-ról az oxigén molekulára. Leírtak a transzmembrán domén extracelluláris oldalán egy „oxigénkötő zsebet”, amelyről feltételezik, hogy a redukció során az oxigén itt lép interakcióba a hidrofil fehérjeoldalláncokkal és a külső hem egyik vinil (CH₂=CH-) csoportjával. Az elektron tehát feltételezhetően nem a hemben elhelyezkedő vas ionról kerül az oxigénre. A fentebb említett eredmények hozzájárulnak, hogy pontosabban megértsük a ROS képzés biokémiai mechanizmusait, és hogy specifikus gátlószereket, illetve később akár gyógyszereket fejlesszenek a NOX5-re (29).

1.3.3 A NOX5 aktivációja és szabályozása

A NOX5-öt elsődlegesen a megemelkedett $[Ca^{2+}]_{ic}$ aktiválja, amelynek hatására megindul a O_2^- termelése (92). A Ca^{2+} -ok kötődése az EF-hand motívumokhoz konformációváltozást indukál. A Ca^{2+} -kötött N-terminális rész mindezek következtében kölcsönhatásba lép a C-terminális EF-hand-kötő doménjével. A kialakult szerkezet lehetővé teszi az elektrontranszportot a NADPH-ról az O_2 -re, így megindulhat a ROS termelés (93).

A többi NADPH-oxidáztól eltérően a NOX5 nem igényel sem citoszolikus aktivátor alegységeket, sem az érésében közreműködő fehérjéket, és a $p22^{phox}$ membránstabilizáló hatására sincsen szüksége a O_2^- termeléséhez (30, 101). Másrésről viszont irodalmi adatok arra utalnak, hogy a NOX5 homooligomereket, legfőképpen tetramereket képez, és az enzim maximális aktivitása a tetramer formában valósul meg. Megállapították, hogy az oligomerizáció a dehidrogenáz doméneken keresztül történik. Továbbá a NOX5 α izoformában az 567-es pozícióban lévő prolin mutációjával készítettek egy katalitikusan inaktív NOX5 konstruktot (NOX5-P567H). Megfigyelték, hogy az inaktív NOX5-P567H-t vad típusú NOX5-tel együtt expresszálva, majd a NOX5-P567H mennyiségét egyre növelve dóziszfüggő módon csökkent a komplex ROS termelése. Ezen megfigyelés alapján felvetették annak a lehetőségét, hogy az EF-hand-ekkel nem rendelkező ϵ izoforma egy endogén NOX5 gátlóként funkcionálhat a sejtekben (102). Egy másik kutatócsoport csonkított dehidrogenáz doméneket vizsgálva szintén azt találta, hogy a domének hajlamosak a dímerek, trimerek, tetramerek képzésére. Viszont ha kapcsolódik hozzájuk kalmodulin, akkor a dimer képződése az uralkodó folyamat (103).

Az $[Ca^{2+}]_{ic}$ mellett egyéb tényezők is képesek befolyásolni a NOX5 aktivitását. NOX5-öt túltermelő sejteket kezeltek PMA-val (ti. egy diacilglicerin analóggal), ami aktiválja a protein kináz C (PKC) valamennyi izoformáját. Azt tapasztalták, hogy NOX5-tel transzfektált COS7 sejtekben a PMA kezelés a nyugalmi $[Ca^{2+}]_{ic}$ növelése nélkül is fokozta a ROS termelést. Amikor pedig PMA kezelést követően növelték az $[Ca^{2+}]_{ic}$, nagyobb O_2^- termelést detektáltak, mint a két stimulusnál külön-külön. A PMA sejtmentes esszékben vizsgálva is növelte a NOX5 kalciumérzékenységet. Meghatározták továbbá a potenciálisan foszforilálható aminosavakat, melyek mind a C-terminálison

helyezkednek el, és ezek közül a Ser⁴⁹⁰, Thr⁴⁹⁴ és Ser⁴⁹⁸ jelentősége igazolódott (104, 105). Összességében tehát a foszforilált C-terminális lánc könnyebben lép interakcióba a Ca²⁺-kötött EF-hand doménekkel. A PKC izoformák hatékonysága között is különbségeket fedeztek fel. Azt találták, hogy a PKC α a NOX5 közvetlen szabályozója (105).

A PKC α mellett leírtak még egyéb kinázokat is, amelyek képesek fokozni a NOX5 aktivitását. Kimutatták, hogy a PKC aktiválja a MAPK családba tartozó ERK1 és ERK2 kinázokat is. Az ERK1 és 2 pedig a NOX5-ön végbemenő foszforiláció útján képesek növelni az enzimaktivitást (106). Hasonlókat tapasztaltak a kalcium/kalmodulin függő protein kináz II (CAMKII) és a tirozin kináz c-Abl esetében is (107, 108).

Megjegyzendő, hogy sejtmentes rendszerben vizsgálva a NOX5 szubmaximális O₂⁻ termeléséhez viszonylag magas, mintegy 1 μ M-os [Ca²⁺]_{ic} szükséges (109). Ez az érték mintegy tízszerese a fiziológiás nyugalmi citoplazmatikus Ca²⁺ koncentrációnak. Az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció a nyugalmi 100 nM-os tartományból depolarizáció, extra- vagy intracelluláris jelek hatására ugyan elérheti az 1 μ M-os nagyságrendet, de ez egészséges sejtekben ritkán valósul meg (110). Ezen kísérletes eredményekre alapozva, inkább az a modell az elfogadott, hogy egyes kinázok foszforilálják a NOX5-öt, így az enzim érzékenyebbé válik a Ca²⁺ iránt. Ennélfogva alacsonyabb [Ca²⁺]_{ic} változások is képesek a NOX5 ROS termelését hatékonyan szabályozni (104, 111).

Jellemezték továbbá a ROS-ok hatásait is a NOX5 aktivitására. Úgy találták, hogy az EF-hand-en oxidálódott metionin és cisztein aminosavak kevésbé tudnak kapcsolódni az EF-hand-kötő doménhez, ezáltal csökken az enzim aktivitása is. Az oxidáció lényege feltehetőleg abban áll, hogy egyrészt a NOX5 által termelt O₂⁻ negatívan csatol vissza a NOX5-re, másrészt viszont egy oxidatív citoplazmatikus környezetben megakadályozhatja a további ROS felszabadulását (112). Egy másik tanulmány adatai alapján a reaktív oxigén és reaktív nitrogén származékként egyaránt számontartott nitrogén-monoxid S-nitroziláció útján képes gátolni a NOX5 aktivitását. A szerzők ezen jelenségnek az erekben tulajdonítanak jelentőséget, ahol esetleg a NOX5 kapcsolatba léphet a nitrogén-monoxid-szintáz termelte NO-val (113).

1.3.4 A NOX5 fehérje intracelluláris lokalizációja és szöveti eloszlása

A NOX5 fehérjét intracellulárisan több különböző kutatócsoport is elsősorban az endoplazmás retikulumban és a sejtmagmembránban detektálta (111, 114, 115). Ezek mellett kisebb hányadban, de ugyancsak leírták az enzimet a plazmamembránban is (111, 114, 116). Dave Lambeth kutatócsoportja úgy találta, hogy a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát és a NOX5 N-terminálisán elhelyezkedő polibázisos domén közötti interakció szükséges ahhoz, hogy az enzim kikerülhessen a plazmamembránba (116). Egyetlen, eddig meg nem erősített tanulmány született, amiben dendritikus sejteket vizsgálva azt közölték, hogy a NOX5 a mitokondriumban található (117).

Northern blot kísérletek alapján a NOX5 RNS-ét legnagyobb mennyiségben a lépben és a herében detektálták (33, 92). Kisebb mennyiségben, de úgyszintén kimutatták a NOX5-öt a prosztatában és a méhben. RT-PCR technikával szintén gyenge jelet detektáltak a hasnyálmirigyben, méhlepényben és a petefészekben. Ezenkívül számos magzati szövetben is kimutatták az enzim RNS-ét (33). A kezdeti kutatások azt is megállapították, hogy a két bizonyítottan funkcióképes izoforma közül, az α a lépben, a β pedig a herében a meghatározó (92).

Újabban számos kutatási eredmény látott napvilágot, amelyek szerint a NOX5 jelen van szívizom-, endotél- és vaszkuláris simaizomsejtekben (118-120). Leírták az enzim kifejeződését a spermiumokban is (121). A méhlepényben a citotrofoblasztokban és a szinciciotrofoblasztokban találták meg (122).

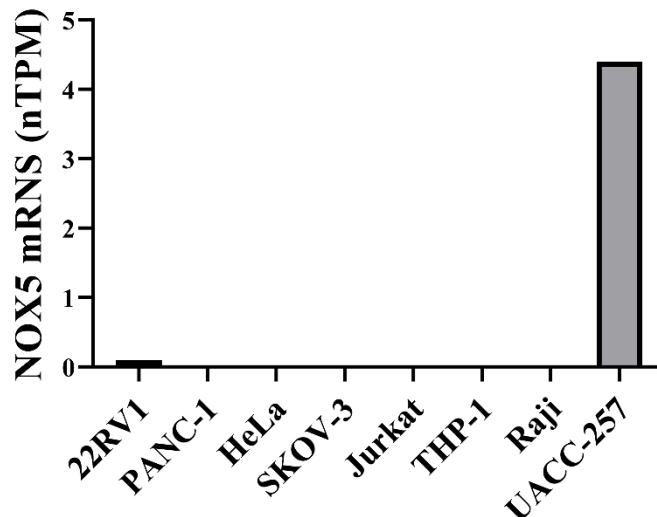
1.3.5 A NOX5 vizsgálatára használt gyári antitestek megbízhatóságának problematikája

A NADPH-oxidázok megbízható fehérjeszintű detektálása a legtöbb izoforma esetében nem megoldott, azonban ez különösen igaz a NOX5 esetében (123). A biotechnológiai cégek jellemzően olyan humán NOX5-öt felismerő elsődleges antitesteket forgalmaznak, amelyeket a megfelelő kontroll kísérletek elvégzése és a termékleírásban szerepeltetett hiteles validálási eredmények nélkül bocsájtottak ki. Számos olyan közlemény látott napvilágot az elmúlt években, amelyekben vagy az összes, vagy egyes meglehetősen alapvető NOX5 fehérjedetektálási vizsgálatban ilyen bizonytalan specifitású kommerciális antitestet használtak fel a kísérletekben (119, 124-127). Az antitestek elfogadhatóságának az érdekében érdemes lenne bemutatni, hogy a

reagensok felismerik a NOX5 jelet a humán lép vagy here mintában, mint pozitív kontrollban. Mindemellett a jel specifikusságát meg kellene erősíteni túltermeltetett NOX5-öt tartalmazó és/vagy NOX5 csendesített fehérjemintákkal. Negatív kontrollként rágszálókból származó minták szolgálhatnának.

Ezzel szemben a biotechnológiai cégek gyakran olyan humán NOX5 ellenes antitesteket forgalmaznak, amelyeket olyan sejtlizátumokon validáltak, amelyekben a Human Protein Atlas (HPA) adatai szerint nem is detektáltak érdemi NOX5 mRNS expressziót. Jellemzően ilyen sejtek a 22RV1, PANC-1, HeLa, SK-OV-3, Jurkat, THP-1 és Raji (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000255346-NOX5/cell+line>). Ezen sejtvonalak NOX5 mRNS tartalmát (kiegészítve a biztosan NOX5-öt tartalmazó UACC-257 sejttel) a 6. ábrán hasonlítom össze. Sőt, olyan kereskedelmi forgalomban elérhető humán NOX5 ellenes antitest is van, amelynél a reagens hitelesítését egér és patkány szöveteken végezték. Holott ezen rágszálókból származó minták maximum negatív kontrollként szolgálhatnának.

A terület mindezen hiányosságai miatt határoztunk úgy, hogy kifejlesztünk és jellemzünk egy monoklonális antitestet, amely specifikusan ismeri fel a humán NOX5 fehérjét.



6. ábra: A humán NOX5 fehérjét felismerő gyári antitestek validálása során alkalmazott sejtvonalak NOX5 mRNS tartalma. Ahogy az ábrán is látható, a nevezett sejtek egyáltalán nem, vagy minimális mennyiségben tartalmazznak NOX5 mRNS-t. Az UACC-257 sejtek NOX5-öt biztosan kifejező „pozitív kontrollként” szerepelnek az ábrán. Az Eredmények fejezetben én is bizonyítom az UACC-257 sejtek NOX5 tartalmát. Az adatok a HPA adatbázisban elérhető információkat vetik össze (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000255346-NOX5/cell+line>). A NOX5 mRNS mennyisége nTPM-ben van megadva, azaz a *nox5* génre specifikus transzkriptumok számát adja meg egymillió leolvasáshoz viszonyítva.

1.3.6 A NOX5 vizsgálatára használt állatmodellek

Ahogy korábban írtam, a NOX5 génje nem található meg a legtöbb rágcsáló fajban, így az egerekben és patkányokban sem. Ez az érdekes evolúciós jelenség nagyban hátráltatja az enzim vizsgálatát, és megnehezíti, hogy megértsük a fehérje fiziológiai szerepét.

Több kutatócsoport is azt az utat választotta, hogy NOX5 knock-in (KI) egereket hozott létre, azaz mesterségesen valamelyik humán NOX5 izoformát fejeztették ki az állatokban. Készültek vaszkuláris simaizomsejt, podocyta és endotélsejt specifikus NOX5 KI egérvonalak. Valamennyi esetben a transzsgént citomegalovírus (CMV) promóter hajtotta meg (128-130). A CMV egy erős promóter, ha jelen van a génben, akkor állandó és nagy mennyiségű fehérjeexpresszió történik (131). Mondhatni, az ilyen állatok modelltől függően generálisan vagy sejtspecifikusan túltermelik a NOX5-öt. Így ezen modellek maximum olyan humán patológias állapotok modellezésére lehetnek

alkalmasak, amelyeknél előfordulhat a NOX5 mennyiségének a megemelkedése. A NOX5 KI egerek kevésbé vihetnek közelebb minket az enzim élettani funkcióinak a megértéséhez. Ennek több oka is van: 1) A biokémiai és élettani folyamataikhoz az egerek evolúciósan a NOX5 enzim nélkül adaptálódtak. Beleavatkozni ebbe a rendszerbe egy kalciumionra érzékeny, szuperoxidot előállító fehérjével, óhatatlanul nehezen megjósolható, de jó eséllyel káros következményeket von maga után. 2) A CMV promóterrel feltehetőleg nem lehet megközelíteni a NOX5 fiziológias mennyiségét az érintett sejtekben. 3) Túltermeltetett fehérje lévén, intracellulárisan olyan kompartmentekben is jelen lehet a NOX, illetve kifejtheti a hatását, ahol azt a fiziológias körülmények között nem tenné meg. Mindezen megfontolások miatt a NOX5 KI egerekből származó adatokat fenntartásokkal kell kezelni, valamint kívánatos lenne humán kísérleti eredményekkel is alátámasztani a későbbiekben.

A fentiekkel szemben munkacsoportunk kollaborációs partner bevonásával azt a kísérletes megközelítést alkalmazta az enzim vizsgálatára, hogy CRISPR/Cas9 technika segítségével kiütötte az endogén NOX5 génjét új-zélandi fehér nyulakban, így alapítva NOX5 knock-out (KO) vonalakat. A génmódosítás hatására egy 10 bázispáros deléción jött létre a NOX5 gén 3. exonjában. Mivel a 3. exon az összes prediktált, nyúlban megtalálható NOX5 transzkripciós változatban szerepet játszik, ezért nem várható, hogy a deléciós mutáns génről működőképes fehérje termelődjön. A funkcióképes NOX5 gén hiánya nem volt letális, a nyulak rendben megszülettek, és nem mutattak szembetűnő egészségkárosodást. Mind a hím, mind a nőstény állatok termékenynek bizonyultak az inszeminációs eljárásokban. Kollégáim bizonyították az oxidáz kimagasló jelenlétét mRNA szinten a herében, nyirokcsomóban és az aortában. Vad típusú állatban, Western blot technikával munkacsoportunk ki tudta mutatni a NOX5 fehérjét nyirokcsomó lizátumban, míg a NOX5 KO nyúlban hiányzott a jel a megfelelő molekulatömeg tartományban. A kísérlettel hitelesítettük a génkiütés sikerességét, valóban nem képződött NOX5 fehérje a KO nyulakban (132).

1.3.7 A NOX5 lehetséges élettani és kórélettani szerepe

Tekintettel a termékenység társadalmi fontosságára, a here, a NOX5-öt érdemleges mennyiségben kifejező szövetek közül, természetesen az elsők között került a kutatói érdeklődés középpontjába. Milyen szerepet játszhat tehát a NOX5 abban a szövetben, amelyben először írták le? Már a NOX5 felfedezése előtt köztudott volt, hogy a herében

számos folyamathoz elengedhetetlenek a ROS-ok. Az oxidánsok szükségesek a jelátviteli pályák megfelelő működéséhez, a spermiumok éréséhez és a kapacitációhoz (133). A minták könnyű hozzáférhetősége miatt került előtérbe az érett spermiumok és a NOX5 kapcsolatának a kérdése. Leírták, hogy kalcium jelet indukálva a sejtekben, megindul a ROS termelés. A megfigyelésbe könnyen bele lehet illeszteni a NOX5-öt, hiszen az enzim az $[Ca^{2+}]_{ic}$ növekedés eredményeként szuperoxidot állít elő (96). NOX5-öt aktiváló ágensekkel, ionomyccinnel és PMA-val, sikeresen stimulálták a humán spermiumok ROS termelését. Az aktivált jelet gátolni, illetve csökkenteni is tudták kalciumion kelátor BAPTA-val, NOX inhibitor difenil-jodóniummal (DPI) és SOD-dal. A funkcionális, illetve a Western blot és immunfestési eredmények mind azt mutatták, hogy jelen van az oxidáz a spermiumokban (121). Azonban a megfelelő genetikai kontrollok nélkül nem lehetünk biztosak a fehérje jelenlétében a hímivarsejtekben. Korábban bizonyították patkány mellékheréből kinyert spermiumokon, hogy a sejtek NADPH hozzáadására szuperoxidtermelésbe kezdenek, és a folyamat DPI-vel gátolható, akárcsak a humán vizsgálatokban (134). Mivel a patkányok genomjában nem található meg a NOX5, ugyanakkor a patkány és humán spermiumokon végzett kísérletekben hasonló eredményekre jutottak, három lehetőség vetődik fel. 1) A humán vizsgálatok során detektált ROS nem NOX5 eredetű. 2) Ha a humán sejtekben a ROS forrása a NOX5, akkor a patkányok esetében lennie kell egy hasonlóan viselkedő ROS forrásnak. 3) A kontrollként alkalmazott DPI, mivel általános flavoprotein gátló, a mitokondriumfunkciókat is képes csökkenteni. Tehát elképzelhető, hogy az indukált és gátolt szuperoxid jelek valójában a mitokondriumból származtak (96). Mindezen bizonytalanságok tükrében nem biztos, hogy a here vonatkozásában a kifejtett spermiumok lesznek az érdemi NOX5 funkció helyszínei. Felmerül tehát, hogy a szerv más sejtjeiben kell keresni az enzim kifejeződésének a jelentőségét.

Megtalálták az enzimet a méhlepényből kinyert citotrofoblasztokban, szinciciotrofoblasztokban és endotélsejtekben is, azonban feltárásra vár, hogy milyen szerepet tölthet be a fehérje ezen sejt típusokban (122). Immortalizált méh simaizomsejtekben is detektáltak NOX5-öt, amelynek a mennyisége angiotenzin II hatására növekedést mutatott. A terhesség során fiziológiásan jelentkező miometrium hipertrófia ezen sejtmodelljében nem csak megnőtt a NOX5 mennyisége, hanem jelentős mértékben dúsult a plazmamembránban (135).

Számos közleményben leírták a NOX5-öt a kardiovaszkuláris rendszer különféle sejttypusaiban, úgymint endotélsejtekben, simaizomsejtekben és fibroblasztokban. Megfigyelték, hogy *in vitro* a NOX5 elősegíti az endotélsejtek proliferációját és az angiogenezist (136). Szívtranszplantáción átesett betegekből kinyert, egészséges és koszorúér-betegségben szenvedő koronáriákat összehasonlítva azt találták, hogy a beteg koszorúerekben megnőtt a NOX5 mennyisége. Immunfestés alapján az enzim az endotéliumban található meg (137). Humán aortából izolált simaizomsejt kultúrában is vizsgálták az oxidáz szerepét. Megfigyelték, hogy vérlemezke eredetű növekedési faktorról (PDGF-el) stimulálva a sejteket a NOX5 által termelt ROS hozzájárul a JAK/STAT útvonal aktivációjához és a sejtek proliferációjához (138).

Montenazo és munkatársai kimutatták a NOX5 KI egerekben, hogy a bevitt enzim szabályozza az érösszehúzódat és a simaizom sejtekben befolyásolja a kontraktilis rendszert (128). Ennek megfelelően a NOX5-öt endotélsejt specifikusan kifejező egérmódelben magasabb vérnyomásértékeket mértek, és úgy találták, hogy megnőtt az agyvérzés kockázata is (139).

Endotélsejt specifikus NOX5 KI egerek esetében vizsgálták a plakk-képződés kialakulását magas koleszterintartalmú diéta hatására. Az eredmények nem mutattak különbséget a kontroll és a NOX5 KI egerek esetében, azaz a NOX5 nem fokozta az érlemezésedet. Az aterogén diéta végére nem találtak jelentős különbséget a kontroll és a NOX5 KI egerek testsúlyában sem. A széróm glükóz, koleszterin és triglicerid szintek is hasonlóak voltak a két csoportban az etetés végén (140).

Mivel számos közleményben előtérbe került a NOX5 szerepe a vaszkuláris rendszerben, munkacsoportunk is megvizsgálta a kérdést. Kontroll és NOX5 KO nyulakból preparált aortagyűrűkön végzett miográfiás kísérletekben nem találtunk különbséget az erek K^+ , adrenalin és acetil-kolin hatására létrejövő válaszaiban. Altatott állatokban a vérnyomás, illetve ultrahangos vizsgálatban az aorták átmérője sem mutatott különbséget. Megvizsgáltuk, hogy magas koleszterintartalmú táppal etetett nyulaknál hogyan változnak a széróm koleszterin és triglicerid értékek, valamint a plakk-képződést hogyan befolyásolja a NOX5 jelenléte vagy hiánya. Az aterogén diéta végére az állatok széróm koleszterin és triglicerid szintjei megemelkedtek, de a kontroll és a NOX5 KO értékek között nem volt szignifikáns különbség. Úgyszintén nem volt eltérés a vizsgált paraméterekben az etetés kezdetekor. A magas koleszterintartalmú táppal etetett

nyulaknál sikerült aortaplakkokat létrehozni. Zsírspecifikus olajvörös festékekkel kezelve az aortaszakaszokat, megállapítottuk, hogy a KO állatokban nagyobb területen képződtek plakkok. Így az eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a NOX5 enzimnek védő hatása van az érlemezéssel szemben, azonban a jelenség hátterében álló pontos mechanizmus felderítése még várat magára (132).

Két tanulmányban vizsgálták a NOX5 szerepét a sejtek differenciálódásában. Accetta és munkatársai MO3-13 sejt vonalat vizsgáltak, ami az oligodendrocita prekursorok molekuláris tulajdonságait hordozza magán. Azt találták, hogy NOX5 aktivátor PMA-val vagy hidrogén-peroxiddal kezelve a sejteket, specifikus oligodendrocita markerek jelentek meg. Továbbá úgy látták, hogy a PMA és a H₂O₂ növeli a NOX5 mennyiségét mRNS szinten, míg a NOX5 mennyiségét csökkentő siRNS gátolta a PMA-val kiváltott differenciációt (141). El-Benna és munkatársai a NOX5 expressziójának növekedését tapasztalták a monociták dendritikus sejtekké történő differenciálódása során, de a monociták makrofágokká alakulása során ez nem volt megfigyelhető. Munkájukban úgy találták, hogy a NOX5 a JAK/STAT/MAPK és az NFκB útvonalakon keresztül szabályozza a monocita-dendritikus sejt differenciálódást (117).

Emelkedett NOX5 szintet detektáltak diabéteszes betegekből nyert vese biopsziákban. NOX5-öt podocita specifikusan kifejező egérmódelben fokozott glomeruláris károsodást, fibrózist és albuminuriát írt le ugyanez a kutatócsoport. Amennyiben az egerekben diabéteszt indukáltak, ezen elváltozások még tovább romlottak. Ugyanezen egértörzs diabéteszes állapotban történő vizsgálatában a podocita sejtek nyúlványainak a csökkenését találták, amely a NOX5 károsító hatása miatt léphetett fel, továbbá az albuminuria oka lehet. Ezekon felül, hogyha humán vagy egér podocytákat magas koncentrációjú glükózzal, illetve angiotenzin II-vel kezeltek, akkor emelkedett ROS termelést detektáltak, amit a NOX5-nek tulajdonítottak (129). Egy másik kutatócsoport azt találta, hogy ha humán podocita sejt kultúrában lentivírusok segítségével bejuttatott siRNS-sel csendesítették a NOX5-öt, az enyhítette a magas glükózkoncentráció által indukált fibrózist és a gyulladási markerek mennyiségét (136). Yu és munkatársai normotóniás és hipertóniás betegekből izolált vese proximális tubulus sejtekben vetették össze az egyes NADPH-oxidázok mennyiségi viszonyait. Azt találták, hogy a NOX5 fehérje kifejeződése ötször magasabb volt a hipertóniás mintákban, mint a

normotóniásokban. Megfigyeléseiket szuperoxidmérésekkel is alátámasztották. További kísérleteikben, ha a hipertóniás betegekből nyert sejtekben vizsgálták a NOX5 sejten belüli eloszlását, azt tapasztalták, hogy az oxidáz a sejtek apikális oldalán dúsul. A NOX5 szerepe még feltárássra vár ezekben a sejtekben, azonban a szerzők feltételezik, hogy hipertóniában hozzájárul a NOX5 az oxidatív stressz kialakításához a proximális tubulus sejtjeiben (114).

Emelkedett NOX5 szintet írtak le néhány tumorban is, mint például limfómában, melanómában, vastagbél-, mell- és prosztatákban illetve Barrett-féle nyelőcső adenokarcinómában is. Ezekben a tumorokban a megemelkedett ROS szint korrelált a megnövekedett sejtproliferációval, a DNS károsodás mértékével, az angiogenezissel és a csökkent apoptózissal (142-146). *In vitro* tanulmányokban is alátámasztották a NOX5 ilyen jellegű szerepét a rákos sejtvonalakban (147, 148). Vastagbél- és mellrák eredetű sejtvonalak tanulmányozásával megerősítették az enzim közvetlen szerepét a sejtek vándorlásában és mozgásában (144, 149). Szintén a NOX5 aktivitás oki szerepét vetették fel a megnövekedett humán tumorsejt invázióban a prostata-, vastagbél- és mellrák eredetű sejtvonalak esetében (144, 149, 150). Egyes adatok szerint a vastagbélrákos betegeknél az emelkedett NOX5 szint rossz prognosztikai faktort jelent. A NOX5 pozitív betegek 5 éves progressziómentes túlélési aránya szignifikánsan rosszabbnak bizonyult, mint a NOX5 negatívoké. A NOX5 pozitív betegeknél továbbá magasabb kiújulási arányt figyeltek meg, mint a NOX5 negatívoknál (143).

2. Célkitűzések

PhD kutatómunkám során, többek között, 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.

3. Módszerek

3.1 Felhasznált anyagok, minták és antitestek

A humán, felnőtt, egészséges lép (NB820-59259), here (NB820-59266), szív (NB820-59217) és harántcsíkolt izom (NB820-59253) lizátumokat, továbbá a lép (NBP2-30202), here (NBP2-75940), petefészek (NBP2-30190) és harántcsíkolt izom (NBP2-77813) szövetmetszeteket a Novus Biologicals-tól szereztük be. A humán, felnőtt, egészséges petefészek lizátumot (HT-406-ZY) a BioCat cégtől vásároltuk. A β -aktin (A1978), vinkulin (V9131) és α -simaizom aktin (A5228) antitesteket a Sigma-Aldrich-tól, az Alexa Fluor 568 anti-nyúl (A10042), az Alexa Fluor Plus 488 anti-egér (A32766), a von Willebrand Faktor (PA516634) és a tormaperoxidáz konjugált anti-egér (31432) antitesteket a Thermo Fischer Scientific vállalattól rendeltük. Az egér IgG1antitest (554121) a BD Bioscience-től származott, a kalnexin antitest (2679T) a Cell Signaling Technology-tól. A legtöbb vegyszert és reagenst a Sigma-Aldrich-tól vásároltuk, amiket nem innen szereztünk be, ott feltüntettem a forrást.

3.2 Felhasznált sejtvonalak

HEK293T sejteket 10 % hőinaktivált főtális szarvasmarha szérummal (Lonza), 50 U/ml penicillinnel és 50 μ g/ml streptomycinnel (Lonza) kiegészített, 4,5 g/l glükózt és 0,584 g/l glutamint is tartalmazó DMEM (Lonza-tól vagy Capricorn-tól vásárolt) médiumban tenyésztettem. Az UACC-257 sejteket RPMI-1640 (Lonza) médiumban növesztettem, ugyanazokkal a kiegészítőkkkel, mint a HEK sejteknél. A humán koronária simaizom sejteket (HCSMC) és a humán aorta simaizom sejteket (HAoSMC) simaizom sejt tenyésztő médiumban tartottam fent (PromoCell) a megfelelő növekedési faktorok jelenlétében. A humán szív eredetű mikrovaszkuláris endotélsejteket (HMVEC) EGM-2 endotélsejt növesztő médiumban (Lonza) tenyésztettem a szükséges növekedési faktorok mellett. Az összes sejtet és sejtvonalat 37 °C-ra termosztált inkubátorban tartottam fent, 5 % CO₂ -t tartalmazó és vízgőzzel telített atmoszférában.

3.3 Klónozás

A nyílt leolvasási keretű humán NOX5 β cDNS (BC125098.1) a pcDNA3.1/V5-His-TOPO vektorban állt a rendelkezésemre. A NOX5-öt kódoló szekvenciát erről a plazmidról erősítettem ki PCR reakcióban Phusion Hot Start DNS polimeráz enzim

(Thermo Fischer Scientific) felhasználásával. Az amplitikon 5' végére egy extra EcoRV, a 3' végére egy extra XbaI vágási helyet terveztünk. Mind a klerősített NOX5 inzertet, mind pedig a pSB/CMV/MCS/Puro vektort az EcoRV és XbaI restrikciós enzimekkel (Thermo Fischer Scientific) vágtam meg, majd a DNS fragmenteket a MEGAquick-spin Plus Total Fragment DNA Purification Kit (Intron Biotechnology) segítségével tisztítottam meg. A megemésztett DNS darabokat T4 DNS ligáz enzim (Thermo Fischer Scientific) hozzáadásával kapcsoltam össze. A ligátumot kémiaailag kompetenssé tett *E. coli* TOP10 baktériumokba transzformáltam. A baktériumokat ampicillines agar lemezre szélesztettem, majd néhány telepéből kultúrát növesztettem és kipreparáltam a plazmid DNS-t a GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fischer Scientific) felhasználásával.

A GST-NOX5 konstrukció létrehozásához a humán NOX5 fehérje első 167 aminosavát, az EF-hand doméneket kódoló szekvenciát erősítettem ki az eredeti plazmidból PCR reakcióban Phusion Hot Start DNS polimerázzal. Mind az inzertet, mind a pGEX-4T-1 vektort BamHI és XhoI enzimekkel vágtam meg, majd tisztítottam és ligáltam, mint korábban. A ligátumot ez esetben is *E. coli* TOP10 baktériumokba transzformáltam, majd a plazmidpreparálás után a konstruktokat restrikciós emésztéssel ellenőriztem.

A NOX5-His₆ konstrukció előállításához szintén a humán NOX5 fehérje első 167 aminosavát kódoló szekvenciát erősítettem ki a GST-NOX5 esetében leírtak szerint. A polihisztidin-kapcsolt NOX5 DNS előállításához az aLICator LIC klónozó és expressziós kitet (Thermo Fischer Scientific) használtam, nevezetesen a pLATE31 vektort, a gyári útmutatót követve. A plazmidok kinyerése és ellenőrzése a korábbiaknak megfelelően történt.

A felhasznált primerek listáját az 1. táblázatban gyűjtöttem össze. Az összes klónozás esetében a végső szekvenciát szekvenálással ellenőriztem (Microsynth AG, Balgach, Svájc).

1. táblázat: A különböző NOX5 konstruktok megalkotásához használt primerek listája.

Primer	Felhasználás célja
TAGATATCACCATGAGTGCCGAGGAGGATG	szenz primer a pSB/CMV/MCS/Puro vektorhoz
TATCTAGACTAGAAATTCTCTTG GAAAAATCTGAAGCC	antiszenz primer a pSB/CMV/MCS/Puro vektorhoz
ATAGGATCCATGAGTGCCGAGGAGGATGCCAG	szenz primer a pGEX-4T-1 vektorhoz (GST-NOX5)
ATACTCGAGCGTCAGCCAGTGGGCAGCGCTG	antiszenz primer a pGEX-4T-1 vektorhoz (GST-NOX5)
AGAAGGAGATATAACTATG AGTGCCGAGGAGGATGCCAGGTG	szenz primer a NOX5-His ₆ konstrukthoz
GTGGTGGTGATGGTGATGGCC CGTCAGCCAGTGGGCAGCGCTG	antiszenz primer a NOX5-His ₆ konstrukthoz

3.4 Klónozási kísérletsor az „off-target” analízishez

A nyúl szövetekből preparált RNS mintákból először cDNS-t készítettem a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fischer Scientific) felhasználásával a gyári útmutatót követve. A reakciókhoz 1 µl oligo(dT)₁₈ primert használtam és 1 µl Ribolock RN-áz inhibitor (Thermo Fischer Scientific) is tettem a reakcióelegybe. A lépés a vese esetében 1 µg RNS-ből indultam ki, a vastagbél esetében 330 ng-ból. A megszintetizált cDNS-t használtam fel a következő PCR reakcióban templátként, amelyben specifikus primerek hozzáadásával kiterjesztettem a nyúl NOX1, NOX2 és NOX4 szekvenciákat. A reakciót DreamTaq polimeráz (Thermo Fischer Scientific) és a hozzá tartozó pufferrel végeztem. Az elegyhez 2 µl cDNS-t adtam, a dNTP végkoncentrációja 200 µM volt, az alkalmazott primereké pedig 1 µM, 25 µl végtérfogatban. A PCR termékeket elválasztottam gélen, majd a megfelelő magasságban lévő csíkokat kivágtam és kipucoltam a MEGAquick-spin Plus Total Fragment DNA Purification Kit (Intron Biotechnology) segítségével. A fragment DNS-eket TA/TOPO (Invitrogen, Life Technologies) klónozási technikával pcDNA3.1/V5-His-TOPO vektorba illesztettem, majd a ligátumot *E. coli* TOP10 baktériumokba transzformáltam. A baktériumokat ampicillines agar lemezre szélesztettem és egy éjszakán át növesztettem

37 °C-os inkubátorban. Másnap a kinőtt telepekből plazmidpreparálás céljából kultúrákat indítottam LB médiumban. Az éjszaka felnövő baktériumokból plazmid DNS-t tisztítottam a GeneJET Plasmid Miniprep Kit segítségével. A kinyert plazmidokat restriktív endonukleázokkal emésztettem, hogy megállapítsam, melyik klón hordozza a kívánt NOX szekvenciákat. Az EcoRI enzimhez EcoRI specifikus puffert használtam, a HindIII enzimhez „Red” puffert. Reakciókeverékeket raktam össze az egyes plazmidokkal és a megfelelő enzimekkel illetve puffereikkel, majd 37 °C-os vízfürdőben inkubáltam a mintákat 4 órán keresztül. A BstXI enzimhez „Orange” puffert alkalmaztam, hasonlóan összemértem a keverékeket, majd 55 °C-os hőblokkban inkubáltam a mintákat 4 órán át. A restriktív enzimeket a Thermo Fischer Scientific-től vásároltuk. Az emésztés eredményeit agarózgélben követtem nyomon, az ígértes klónokat elküldtem szekvenálásra (Microsynth AG, Balgach, Svájc). Az alkalmazott primerek listáját a 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat: Az „off-target” analízishez használt primerek listája.

Primer	Felhasználás célja
CGATGGGAACTGGGTGGTT	szenz primer a nyúl NOX1 szekvenciájához
CCATCCTCATTACTGCAATTCAG	antiszenz primer a nyúl NOX1 szekvenciájához
AAGCAGCACAGTATAGAAGTGCA	szenz primer a nyúl NOX2 szekvenciájához
AGAGGATCTTATATTATTAACCAGAG	antiszenz primer a nyúl NOX2 szekvenciájához
GCATGGATGTGTCCTGGAGAAG	szenz primer a nyúl NOX4 szekvenciájához
GCACACATTCCTTCTTTAGAGTCC	antiszenz primer a nyúl NOX4 szekvenciájához

3.5 Fúziós fehérjék előállítása

A GST-NOX5-öt és a NOX5-His₆-ot kódoló plazmidokat kémiaiilag kompetenssé tett *E. coli* BL21 törzsbe (Thermo Fischer Scientific) transzformáltam. A baktériumokat ampicillines agar lemezekre szélesztettem ki és egész éjszaka növesztettem őket 37 °C-on. Másnap 1-1 telepet felvettem a lemezről és 100-100 ml Terrific Broth (1,2 % tripton, 2,4 % élesztő kivonat, 0,5 % glicerin, 17 mM KH₂PO₄, 72 mM K₂HPO₄, 50 µg/ml ampicillin) médiumba oltottam. A baktériumkultúrát az éjszaka folyamán növesztettem

fel 37 °C-on, 180 rpm-re beállított, körkörös mozgásokat végző rázógéppel. A következő reggelen 900-1400 ml Terrific Broth médiumot adtam a baktérium szuszpenzióhoz. A baktériumok növekedését optikai denzitás méréssel követtem nyomon. Amikor a kultúra elérte az OD=0,5-0,6-os értéket, IPTG (Thermo Fischer Scientific) hozzáadásával indukáltam a fehérjetermelést. Az IPTG végkoncentrációja 0,3-0,5 mM volt a közegben és mintegy 3-4 órán keresztül termeltem a baktériumokkal a kívánt fehérjét.

3.6 GST-NOX5 fehérje tisztítása

A baktériumokat centrifugálással ülepittem 15 percen keresztül, 4 °C-on, 5600 g-vel. A keletkező baktériumüledéket 10 ml lízis pufferben (50 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 2 mM PMSF, 1 tabletta cOmplete Mini EDTA-mentes proteáz inhibitor (Roche), pH=7,6) szuszpendáltam fel, jégen, majd szonikálással roncsoltam szét a baktériumok sejtfalát, ötször 1 perc hosszan, továbbra is jégen dolgozva. Az oldhatatlan frakciót centrifugálással távolítottam el 20 percen keresztül centrifugálva, 4 °C-on, 20000 g-vel. Ezután glutation gyönggyel (Pierce Glutathione Superflow Agarose, Thermo Fischer Scientific) inkubáltam a felülúszót 1 órán keresztül 4 °C-on. A folyamatos keveredést rotátor biztosította. A gyöngyöket hideg lízis pufferrel mostam. A rekombináns fehérjét 2,5 ml glutation tartalmú eluáló pufferrel (5 mM redukált glutation, 50 mM Tris, 151 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT) szorítottam le a gyöngyről. Az elúciót szintén 4 °C-on, 30 percig végeztem. Végezetül, a fehérjeoldatot 5 liter PBS-el szemben, 4 °C-on dializáltam. A dialízis kazetta (Thermo Fischer Scientific) membránja a 2 kDa-nál kisebb molekulák számára volt átjárható. A dializált oldatot Vivaspin koncentrátorral (Sartorius) betöményítettem körülbelül 1 ml-re. A bekonzentrálást centrifugálással végeztem 5600 g-n és 4 °C-on. A koncentrátor a 10 kDa-nál kisebb molekulákat engedte át a szűrőn.

3.7 NOX5-His₆ fehérje tisztítása

A baktériumüledéket hasonlóan dolgoztam fel, mint a GST-NOX5-ös fehérje esetében. Azonban a hisztidinekkel kapcsolt fehérje tisztításához egy foszfát alapú lízispuffert (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 2 mM PMSF, 1 tabletta cOmplete Mini EDTA mentes proteáz inhibitor, pH=8) és Nikkel-gyöngyöket (HIS-Select HF Nickel Affinity Gel) használtam fel. Az ultracentrifugálás után kinyert felülúszót egy éjszakán keresztül inkubáltam a gyönggyel, 4 °C-on, rotátoron történő forgatással. A következő

napon ötször 5 ml, 4 mM imidazol tartalmú foszfát alapú lízispufferrel mostam a gyöngyöt az aspecifikus fehérjekötések eltávolítása céljából. Az elúcióhoz 500 mM imidazol tartalmozó lízispuffert alkalmaztam. Az eluálás szintén egy egész éjszakán keresztül történt, 4 °C-on, rotátoron. A fehérjeoldatot 5 liter PBS-el szemben dializáltam, majd bekoncentráltam a korábban leírt paraméterek szerint.

3.8 siRNS és DNS transzfekció

Az UACC-257 sejteket 6 és 24 lyukú sejttenyésztő lemezre tettem ki. A NOX5 fehérje csendesítése céljából négy különböző siRNS-sel (ON-TARGETplus Human NOX5 siRNA: J-010195-06-0002, J-010195-07-0002, J-010195-08-0002, J-010195-09-0002, Horizon) és egy kontroll siRNS-sel (D-001210-02-20, Thermo Scientific) kezeltem a sejteket, 40 nM végkoncentrációban. A sejteket szuszpenzióban transzfektáltam, Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fischer Scientific) transzfekciós reagens segítségével. Transzfektálás után két napot hagytam az siRNS hatás kifejlődésére, mielőtt további kísérletekben felhasználtam volna a sejteket. Az alkalmazott siRNS-ek szekvenciát a 3. táblázatban gyűjtöttem össze.

A HEK293T sejteket 6 lyukú sejttenyésztő lemezre szélesztettem és Lipofectamine LTX & PLUS (Thermo Fischer Scientific) reagenssel transzfektáltam szuszpenzióban. A stabilan expresszáló sejtvonalak létrehozásához az üres vagy a NOX5 β cDNS-t tartalmazó pSB/CMV/MCS/Puro vektort egy transzpozáz enzimet kódoló vektorral együtt transzfektáltam 1:5 arányban. Összesen maximálisan 2 μ g plazmid DNS-t alkalmaztam egy lyukban. A rezisztens klónokat 7,5 μ g/ml puromycin (A1113803, Thermo Fischer Scientific) hozzáadásával kezdtem kiválogatni két nappal a kezelés után. A szelektációs nyomást két hétig tartottam fent.

Immunitokémiás vizsgálatokhoz az endoplazmás retikulumban kifejeződő, piros fluoreszcens fehérjét, az mCherry-t (ER-mCherry) kódoló plazmidot vittem be a sejtekbe, tranziens transzfekcióval, szuszpenzióban. A HEK sejteket 24 lyukú lemezre szélesztettem, majd 500 ng DNS-t adtam egy-egy lyukba. Az ER-mCherry konstruktot kutatócsoportunk egy korábbi munkatársa, Dr. Enyedi Balázs készítette. Az mCherry fehérje az MGWSCIILFLVATATGAHS ER-ba irányító szignálszekvenciával volt ellátva, mely szekvencia az egér IgG nehéz lánc variábilis régiójából (V_h) származik. A szignálpeptid továbbá egy intron régiót is tartalmazott. Mindez lehetővé tette, hogy az mCherry az ER lumen oldalán helyezkedjen el. Ezen kívül egy KDEL ER retenció

szignál is beépítésre került a konstruktba, amely a fehérje tartósabb ER lokalizációját szolgálja (8).

3. táblázat: A felhasznált NOX5 siRNS-ek szekvenciái.

Gyári kód	Saját jelölés	siRNS szekvencia
J-010195-06-0002	NOX5 siRNS #1	CUAUAGACCUUGGUGACUAC
J-010195-07-0002	NOX5 siRNS #2	GCGAUUCUUUGCCCUAUUU
J-010195-08-0002	NOX5 siRNS #3	CCACGUGGCUGGCUCAAGU
J-010195-09-0002	NOX5 siRNS #4	CAUCUGCACUGGGCAAGAA

3.9 RNS preparálás, cDNS írás, kvantitatív PCR (qPCR)

NucleoSpin RNA, Mini kit for RNA purification (Macherey-Nagel) készletet használtam a teljes RNS izolálásához, a gyártói leírást követve. A preparálás során DNS emésztést is végeztem az RNS-t megkötő oszlopon DN-áz 1 enzimmel. A kinyert RNS koncentrációját NanoDrop One (Thermo Fischer Scientific) rendszerrel mértem meg. A cDNS szintézisét High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fischer Scientific) csomaggal végeztem a gyártói leírás szerint, amely random primereket is tartalmazott. A cDNS képzéséhez minden esetben 2 µg RNS-t használtam fel, a reakciókhoz 1-1 µl Ribolock RN-áz inhibitor (Thermo Fischer Scientific) is adtam. A qPCR reakciókat a LightCycler 480 Probes Master (Roche) használatra kész reakció keverékkel végeztem. A reakciókat 10 µl végtérfogatba mértem össze, elegyítve 0,5 µl Taqman próba oligonukleotidot, 0,5 µl cDNS-t, 4 µl vizet és 5 µl alapkeveréket, ami tartalmazta az enzimet és a puffert. A mérésekhez a Light Cyclor 480 (Roche) készüléket használtam. Az adatok elemzését a „második derivált maximuma” módszerrel végeztem. A kiértékelés során a NOX5-re kapott eredményeket normalizáltam a háztartási gén, aktin eredményeire, az így kapott értékeket elemeztem. A következő Taqman próba oligonukleotidokat használtam fel: NOX5: Hs00225846_m1, aktin: Hs00357333_g1.

3.10 Western blot és Instant blue festés

PBS-sel történő mosás után a sejteket RIPA oldattal (150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % Na-deoxikolat, 0,1 % Na-dodecil-szulfát, 20 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH=8) gyűjtöttem be, kiegészítve 1 mM PMSF-fel és proteázgátlókat tartalmazó tablettával (cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor, Roche, 1 tabletta 10 ml oldatban feloldva). A mintákat 10 percre jégre helyeztem, majd az oldhatatlan részeket

ülepítéssel eltávolítottam 4 °C-on, 10 percig centrifugálva, 16100 g-n. A felülúszókhoz négyzetes töménységű Laemmler mintapuffert adtam, ami 20 %-nyi 2-merkaptoetanolt tartalmazott. Ezt az eljárást követve biztonságosan ki tudtam mutatni a NOX5 fehérjét a sejtekből. A megvásárolt humán szövetlizátumokhoz is ugyanezt a mintapuffert adtam. Az előkészített fehérjemintákat denaturáló, 10 %-os poliakrilamidgélben választottam el, majd nitrocellulóz membránra blottoltam át. A membránt megfestettem Ponceau festékkel, ami aspecifikusan megjeleníti az összes fehérjét, ami a membránba betapadt. A festett membránképet lefényképeztem. Miután a piros festéket elmostam, a membránokat 5 % zsírszegény tejport és 0,1 % Tween-20-at tartalmazó PBS-sel blokkoltam (PBS-Tween). Az elsődleges antitestet 5 % BSA-t tartalmazó PBS-Tween-be oldottam és legalább egy órán keresztül inkubáltam vele a membránt szobahőmérsékleten, vagy pedig egy éjszakán keresztül 4 °C-on. Ezután 30 percen keresztül mostam a membránt PBS-Tween oldattal, hat-nyolcszor cserélve a mosóoldatot. A tormaperoxidáz konjugált, anti-egér másodlagos antitestet a blokkoló oldatba hígítottam és egy órán keresztül inkubáltam vele szobahőmérsékleten, majd ismét 30 perces mosás következett, hasonlóan, mint korábban. Végül a Westernbright ECL kit (Advansta) reagenseiből adtam azonos mennyiségben a membránhoz, pár percet rajta hagyva. A lumineszcens jelet Fuji Medical (Fujifilm) röntgenfilmeket detektáltam. A röntgenfilmeket 600 dpi-s felbontásban beszkeneltem. Az eredményeket az ImageJ szoftver segítségével értékeltem (<http://imagej.org>). Az alkalmazott elsődleges antitest koncentrációk és hígítások: NOX5: 1-10 µg/ml, α-simaizom aktin: 1:500, β-aktin és vinkulin: 1:5000. A másodlagos antitestet 1:10000-ben hígítottam.

Az Instant Blue-val (Biomedica) történő festéshez a megfelelő szeparáció után az akrilamid gélt 10-15 ml Instant Blue-t tartalmazó edénybe helyeztem. A gélt 10-15 percig festettem a folyadékkal 25 rpm-es sebesség mellett orbitális rázógépen. Az eredményekről fényképfelvételt készítettem.

3.11 Immuncitokémia

A letapadt sejteket egyszer jéghideg PBS-sel mostam, majd 4 % paraformaldehidet (PFA) tartalmazó PBS-sel fixáltam őket 20 percen keresztül, jégen tartva a sejttenyésztő lemezt. Ezután a mintákat hatszor jéghideg PBS-sel mostam, majd 10 mM glicint tartalmazó PBS oldattal neutralizáltam az esetleges maradék PFA-t 10 percig. A következő lépésben kétszer a glicin oldattal, kétszer pedig PBS-sel öblítettem. A sejtek

permeabilizálásához a következő oldatot használtam: 0,1 % Triton X-100 detergenst és 1 % BSA-t tartalmazó PBS, amit 20 percig hagytam a sejteken szobahőmérsékleten. A minták blokkolását 5 % BSA-t tartalmazó PBS-sel végeztem, legalább 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten. A NOX5-öt (2-5 µg/ml) és a kalnexint (1:100) felismerő elsődleges antitesteket a blokkoló oldatba hígítottam, és egy éjszakán keresztül hagytam a mintákon 4 °C-on, párasított kamrában. A következő napon nyolcszor mostam PBS-sel a sejteket. A másodlagos antitest(ek)et (1:1000) és a sejtmagfestéket (4 µM Hoechst 33342) is a blokkoló oldatban hígítottam. Az oldattal 1 órán keresztül inkubáltam a mintáinkat, szobahőmérsékleten, sötétben. Végezetül újra PBS-sel mostam nyolcszor. A sejteket tartalmazó fedőlemezt Mowiol segítségével rögzítettem egy tárgylemezhez, és egy éjszakát hagytam száradni a Mowiol-t szobahőmérsékleten, sötétben. Az immunfestés eredményéről Leica DMI6000B fluoreszcens mikroszkóp felhasználásával készítettem felvételeket.

Az UACC-257 sejtek esetében kipróbáltam az acetonnal és metanollal végzett fixálást is. Ezekben az esetekben a PBS-sel mosott sejtekre -20 °C-ra hűtött acetont vagy metanolt mértem. Tíz percen keresztül fixáltam a sejteket a szerves oldószerekkel, -20 °C-on. Ezután hatszor mostam a mintákat PBS-sel, majd következett a blokkolás és az immuncitokémia többi lépése a fentebb leírtak szerint.

3.12 Immunhisztokémia

Formalinnal fixált, paraffinba ágyazott, normál humán szövetmetszeteket vásároltunk az endogén NOX5 fehérje kimutatása céljából. A mintákat először 60 °C-os termoblokkba helyeztem 2 órára a paraffin felolvasztása érdekében. A deparaffináláshoz a következő folyadéksorba merítettem a metszeteket (az inkubáció idejét zárójelben tüntetem fel): xilol (10 perc), xilol (10 perc), abszolút etanol (3 perc), 96 %-os etanol (2 perc), 85 %-os etanol (1 perc), 70 %-os etanol (1 perc), 60 %-os etanol (1 perc), majd 50 %-os etanol (1 perc). Végezetül folyó csapvíz alatt, majd desztillált vízben mostam 1-1 percig a mintákat.

A szöveti antigének feltárását két lépésben valósítottam meg. Először 6-os pH értékű, 10 mM nátrium-citrátot tartalmazó oldatba merítettem a tárgylemezeket és magas nyomáson és hőmérsékleten kezeltem őket 20 percig konyhai kukta felhasználásával. Miután szobahőmérsékletűre hűltek a tárgylemezek, PBS-sel öblítettem őket háromszor. A második lépésben 37 °C-ra melegített termoblokkra helyeztem a metszeteket, majd

használatra kész, antigénfeltáró pepszinoldatot csepegtettem a szövetekre. Tíz percig tartott a feltárás, majd ismét háromszor öblítettem a metszeteket PBS-sel.

Az immunfestéshez az Alexa Fluor 488 Tyramide SuperBoost Kit-et (ThermoFisher) használtam. Az endogén peroxidázok gátlása céljából 3 %-os H_2O_2 -oldattal inkubáltam a szöveteket egy órán keresztül, szobahőmérsékleten. PBS-es mosást követően 10 %-os normál kecskeszérumot adtam a mintákhoz, kiegészítve 0,5 % TritonX-100-zal. Egy órán keresztül, szobahőmérsékleten blokkoltam a szöveteket. Az elsődleges antitest(ek)et a blokkoló oldatba hígítottam, ez esetben viszont 0,1 % TritonX-100-zal egészítettem ki. A here és az ovárium esetében 25 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban alkalmaztam a NOX5-ös antitestet, a lépénél 7,5 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban. A von Willebrand-faktor (vWF), endotélsejt markert 1:100-ban hígítottam. Az első antitesttel a tárgylemezeket egy párásított kamrában inkubáltam, egy éjszakán keresztül, 4 °C-on. Másnap a tárgylemezeket 30 percen keresztül, hatszor mostam PBS-sel, körkörös mozgásokat végző rázógéppel, 130 rpm-en. A gyártó által biztosított tormaperoxidáz-konjugált, anti-egér másodlagos antitestet adtam a szövetekhez, kiegészítve az oldatot 4 μM Hoechst 33342 sejtmagfestékkel és egyes esetekben anti-nyúl antitesttel (1:1000) is. 1 órán keresztül inkubáltam szobahőmérsékleten, sötétben. Ismét egy 30 perces mosás következett a korábbi mosási paraméterekkel. A gyártói leírás alapján elkészítettem a tyramide reagenst tartalmazó szubsztrátoldatot, amivel 10 percig, sötétben inkubáltam a szöveteket. A tyramide oldat eltávolítása után stop reagens oldatot csöppentettem a metszetkerekre, végezetül PBS-sel mostam háromszor 2 percen keresztül, majd Mowiolal egy fedőlemezt ragasztottam a tárgylemezekhez. Az immunfestés eredményeiről szintén a Leica DMI6000B fluoreszcens mikroszkóppal készítettem felvételeket.

3.13 Szuperoxid és intracelluláris kalciumion mérések

A különböző sejtvonalakkal végzett összes mérést CLARIOstar Plus Microplate Reader (BMG LABTECH) műszerrel végeztem el 37 °C-on. Átlátszó aljzatú, fekete oldalú 96 lyukú sejtenyésztő lemezt (Greiner 655090) használtam az intracelluláris kalciumion szint változások követéséhez, a szuperoxidmérésekhez pedig fehér aljzatú, fehér oldalú 96 lyukú sejtenyésztő lemezeket (Greiner 655083) vettem igénybe. A stimulusokat vagy pipetta segítségével adtam a sejtekhez, vagy a CLARIOstar injektáló rendszerével. A végső térfogat 100 μl volt a lemez lyukaiban minden egyes esetben.

A szuperoxid detektálásához 40000 sejtet használtam fel, minden egyes alkalommal. A mérést szuszpendált sejteken végeztem el 1:1 arányú H-médium (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0,8 mM CaCl₂, 5 mM glükóz, 10 mM HEPES) és Diogenes reagenskeverék (National Diagnostics) elegyében. Extracelluláris szuperoxid jelet regisztráltam lumineszcens módban.

Az intracelluláris kalciumion szint változásának a követésére konfluens, letapadt sejtekkel dolgoztam. A sejteket 2 μ M Fura-2 AM kalciumérzékeny festékkel (Life Technologies) töltöttem meg 30 percen keresztül, 37 °C-on, H-médiumban, sötétben. A töltés után a felesleges festéket H-médiummal elmostam, majd a mérést is ugyanebben a médiumban végeztem. A Fura-2 festék gerjesztéséhez a CLARIOstar műszerben gyárilag beállított 335-ös és 380-as nanométeres hullámhosszokat használtam, az emissziós jelet pedig 510 nanométeren detektáltam. Az eredmények értékeléséhez a 335 nanométeres gerjesztéssel kapott emissziós értékeket elosztottam a 380 nanométeres gerjesztéssel kapott értékekkel, majd ezt a 335/380-as hányadost ábrázoltam.

3.14 Statisztika

A mérések eredményeit átlag \pm SEM (átlag standard hibája) formában ábrázolom, az egyes elemszámokat feltüntettem a vonatkozó ábraaláírásokban. A „*” jelölés az ábrákon a 0,05-nél kisebb p értéket jelöli. 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 elemzéshez és az értékeléshez a GraphPad Prism 7.0 programot használtam.

3.15 Egysejtes RNS-szekvenálási adatok elemzése, RNS-szekvenálási eredmények kigyűjtése az UACC-257 sejtvonalról

A NOX5 mRNS expressziójának tanulmányozásához kétféle egysejtes RNS-szekvenálási adatokat tartalmazó adatbázist elemeztem. Az egyik a Tabula Sapiens transzkriptomikai atlasz volt. A Tabula Sapiens tanulmányban közel ötszázezer sejtről gyűjtöttek információkat, 24 különböző szövetből és szervből, több mint 400féle sejttípust azonosítva. A mintákat 15 donorból gyűjtötték össze (151). Az elemzéshez a Talk2Data felületet (BioTuring cég) használtuk. A másik forrásunk a Human Protein Atlas (HPA), ingyenesen elérhető adatbázis (<https://www.proteinatlas.org/>) volt. A HPA-

ból szervszintű és különböző sejtípusokra lebontott egysejtes RNS-szekvenálási eredmények érhetőek el. Ezen értékek nTPM (normalized transcript per million) mennyiségben vannak megadva. A HPA tehát olyan normalizációs eljárásokkal korrigált értékeket mutat, amelyek lehetővé teszik a különböző adatbázisokból, szervekből és sejtekből származó információk összehasonlítását. Az adatokat az időről-időre frissített HPA adatbázis 23. verziója alapján elemeztem.

Az UACC-257 sejtek RNS-szekvenálási eredményeit a CellMiner honlapról (<https://discover.nci.nih.gov/cellminer/>) tudtam lekérdezni. Az expressziós szintek $\log_2(\text{FPKM}+1)$ értékben vannak megadva, ahol az FPKM az egymillió leolvasásra jutó kilobázisonkénti fragmentumok. Az expressziós szintek az egyes gének esetében magukba foglalják a gének különböző izoformáit.

4. Eredmények

4.1 A humán NOX5-öt felismerő monoklonális antitest kifejlesztése

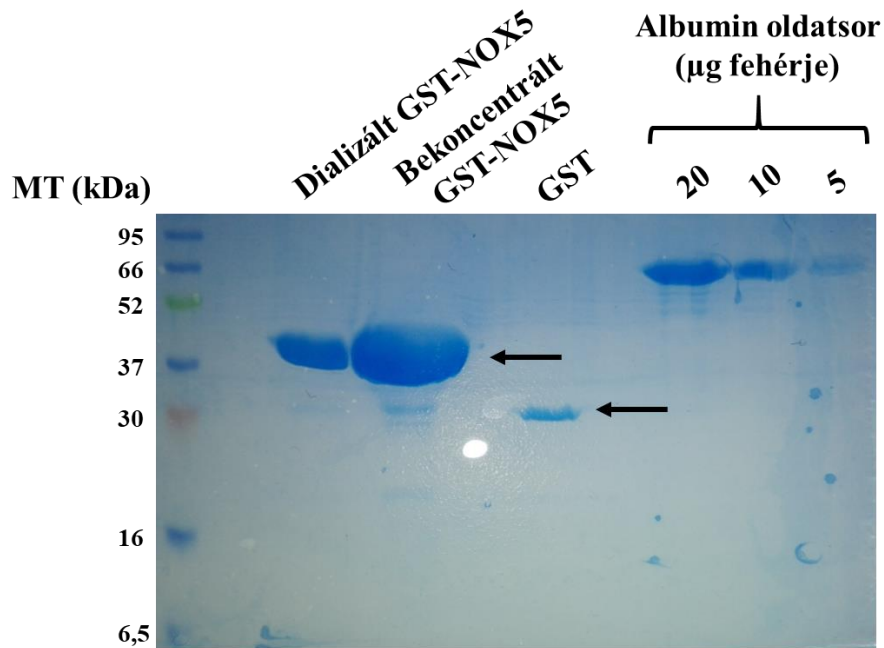
Fontosnak tartottuk, hogy munkánkat egy megbízható antitest segítségével végezzük el. Az elmúlt években megjelent, NOX5-ről szóló tanulmányokat áttekintve, az állapítható meg, hogy számos esetben nem egy megbízható, megfelelően karakterizált, NOX5 fehérjét felismerő antitestet használtak a kísérletekhez (119, 125-127). Ezért úgy döntöttünk, hogy kifejlesztünk egy új monoklonális antitestet egérben (mAb), amely megbízhatóan felismeri a humán NOX5 fehérjét. A mAb kifejlesztését az Immunogenes Kft-vel együttműködve valósítottuk meg. A klónozási folyamatokat, a fúziós fehérjék előállítását és tisztítását, valamint az egérszérumok és klónjelöltek tesztelését Western blot-tal és immunfestéssel én végeztem a Semmelweis Egyetemen. Az egerek immunizációját és véreztetését, a hibridóma sejtek létrehozását és fenntartását, a klónok előszűrését ELISA-val, továbbá a mAb tisztítását az Immunogenes Kft végezte. Ez utóbbi kísérletekről ezért részletesen nem írok a disszertációmban.

4.1.1 A fúziós fehérjék előállítása

Kétféle fúziós fehérjét állítottunk elő. A molekuláris klónozás során a humán NOX5 β első 167 aminosavát (N-terminális, EF-hand doméneket tartalmazó rész) kódoló DNS-t egyesítettük glutation-S-transzferázt (GST) kódoló DNS-sel, illetve 6 darab hisztidin aminosavat hordozó DNS-sel. Így keletkeztek a GST-NOX5 és a NOX5-His₆ fehérjék. Az új fehérjék elnevezésében a kapcsolás (-) helyzete jelzi, hogy a GST N-terminálisan, a His₆ rész pedig C-terminálisan helyezkedik el a 167 aminosavas NOX5 részhez viszonyítva. A kétféle konstrukt elkészítésének az volt az értelme, hogy az egyiket az immunizáláshoz, a másikat pedig a teszteléshez használtuk fel. A GST-NOX5-el történtek az oltások, míg a NOX5-His₆-t az ELISA tesztekhez használta az Immunogenes Kft. Ezzel az eljárással biztosítható volt, hogy az ELISA teszt során pozitivitást mutató klónok biztosan a NOX5 fehérjét ismerjék fel, és ne a GST antigént. Az immunizáció alatt az egerek ugyanis nemcsak a NOX5 antigén ellen képeznek antitestet, hanem a fuzionáltatott GST ellen is. A NOX5-His₆ alkalmazásával egyszerűen figyelmen kívül tudtuk hagyni az anti-GST antitesteket.

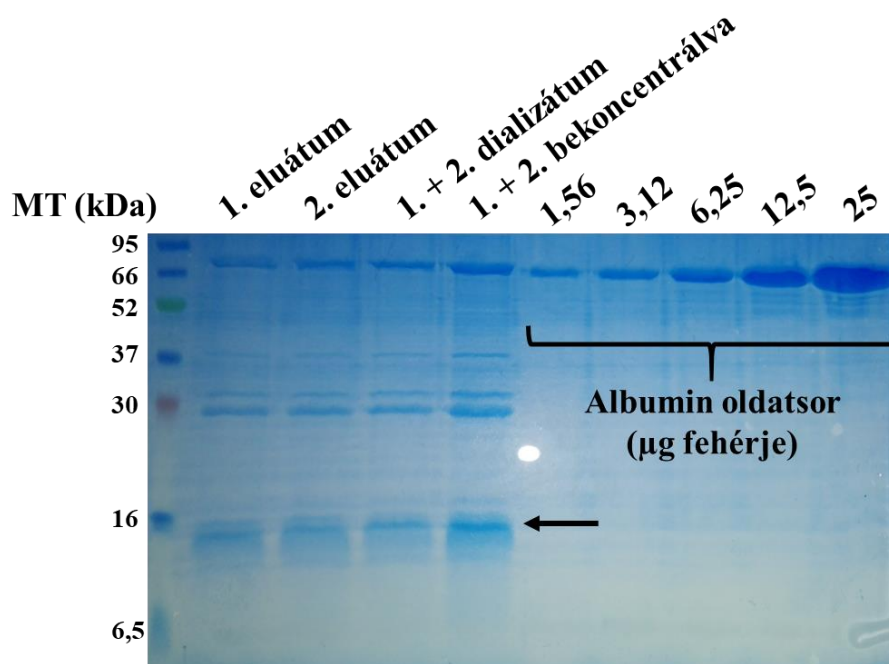
A GST és a His₆ részek az antigének tisztítását teszik lehetővé az oldatból affinitáskromatográfiás eljárással. A kihalászott fehérjéket eluáltuk a GST-konjugált, illetve nikkeliót tartalmazó gyöngyökről, dializáltuk PBS-ben, majd betöményítettük, hogy nagyobb fehérjekoncentrációban adjuk oda az antigént az Immunogenes-nek. A tisztítás mennyiségi és minőségi eredményét Instant Blue-val megfestett poliakrilamid gélen ellenőriztük. Az Instant Blue aspecifikusan megfest minden fehérjét, láthatóvá téve azokat a gélben. A mintákat 5 percig, 95 °C-on hőkezelttem, mielőtt a gélbe töltöttem. A minták fehérjéinek elektroforetikus mobilitás szerinti szétválasztása redukáló és denaturáló körülmények között történt.

A GST-NOX5 preparátum gélképén az látható a 7. ábrán, hogy igen nagy mennyiségben sikerült tisztítani a fehérjét. NanoDroppal meghatároztam a bekonzentrált oldat fehérjekoncentrációját 280 nm-en, amely 12,84 mg/ml volt. A gélbe körülbelül 250 µg fehérjét töltöttem a bekonzentrált oldatból. A GST-NOX5 fehérje várható molekulatömege 46,6 kDa. A gélkép alapján a fehérjehasadás mértéke, illetve az aspecifikus fehérjék mennyisége minimális. A preparátum alatti fehérje 30 kDa környékén aspecifikusan izolált terméket vagy akár a GST-NOX5 bomlásából csekély, szabad GST jelenlétét mutathatja.



7. ábra: A tisztított GST-NOX5 fehérje mennyiségi és minőségi analízise Instant Blue-val megfestett poliakrilamid gélen. A betöményítés után igen nagy koncentrációban és tisztaságban sikerült kinyerni a GST-NOX5 fehérjét, ezt szemlélteti a felső fekete nyíl. A géltre felvitt GST fehérje a bomlás mértékét hivatott tükrözni az alsó nyílnál. Az albumin oldatsor a mennyiségi viszonyokat igyekszik bemutatni.

A NOX5-His₆ preparátum gélképét a 8. ábrán mutatom be. Ez esetben is megmértük a bekonzentrált fehérjeoldat töménységét, ami 1,5 mg/ml-nek adódott. A bekonzentrált oldatból összesen 37,5 µg-nyi fehérjét töltöttem be a gélbe. Az albumin oldatsorhoz viszonyítva a NOX5-His₆ tényleges mennyisége azonban csak körülbelül a tizedét teszi ki az oldat teljes fehérjemennyiségének. Ahogy az ábrán is látható, ez azzal magyarázható, hogy a tisztítás során a nikkel-gyöngyhöz sokkal több nem kívánt fehérje kötődött, amelyeket nem sikerült elmosni a preparálásnál. Ez azt eredményezi, hogy a GST-NOX5-tel szemben, sokkal inhomogénebb preparátummal kellett dolgozni. A NOX5-His₆ számított molekulatömege körülbelül 19 kDa, mivel egy jóval kisebb peptidet kapcsolunk a NOX5-höz.



8. ábra: A NOX5-His₆ fehérje mennyiségi és minőségi analízise Instant Blue-val megfestett poliakrilamid gélen. A NOX5-His₆ fehérje sorsa az eluálástól a bekonzentrálásig követhető nyomon a gélképen. A tisztítani kívánt NOX5-His₆ fehérjét a fekete nyíl jelzi. Az albumin oldatsor a fehérjemennyiségek viszonyait szemlélteti.

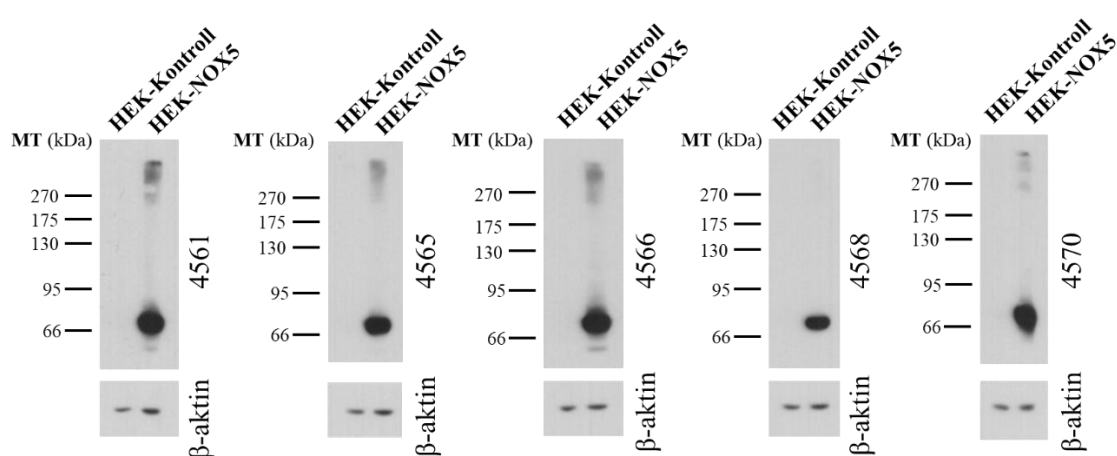
4.1.2 Az egerek immunizációja és az immunválasz tesztelése

Az előállított GST-NOX5 antigént és a teszteléshez szükséges NOX5-His₆ fehérjét átadtuk az Immunogenes Kft-nek. Az egerek immunizációját ők végezték a GST-kapcsolt fehérjével. Az oltásokhoz bFcRn transzgenikus BALB/c egértörzset használtak. Ezekre az állatokra az jellemző, hogy az endogén egér neonatális Fc receptor (FcRn) /*Fcgrt* gén mellett a bFcRn-t (szarvasmarha neonatális Fc receptor α -lánc) kódoló gén 5 példányát hordozzák, amely az egér saját β_2 mikroglobulinjával alkot heterodimert. Kimutatták, hogy az immunizáció során ezen egerek lépe megnagyobbodik, több B-limfocitát állítanak elő és jóval nagyobb IgG titerek érhetőek el a nem transzgenikus kontroll egerekhez viszonyítva (152, 153).

A kezeléseket az első oltás időpontjában 7-8 hetes nőstény egereken végezték. Öt egeret immunizáltak, amelyek a következő kódokat kapták: 4561, 4565, 4566, 4568 és 4570. Először 50 μ g antigént injektáltak intraperitoneálisan 1:1 arányban keverve komplett Freund adjuvánszal. Majd a 14., 28. és 42. napon emlékeztető oltásokat kaptak az állatok, ami 25 μ g antigént tartalmazott 1:1 arányban keverve inkomplett Freund

adjuvánszal. Az immunizáció végeztével az 56. napon vértmintákat gyűjtöttek be az állatoktól és ELISA-val ellenőrizték az immunválasz kialakulását.

Én Western blot technikával ellenőriztem az oltások sikerességét. A szérumokat 1:500-ban hígítottam és 1 órán keresztül inkubáltam a tesztmembránokkal szobahőmérsékleten. Antigénként kontroll és NOX5-öt stabilan kifejező HEK sejtlizátumokat használtam fel, mely sejtekről a későbbiekben írok részletesen (4.2-es fejezet). Az eredményeket a 9. ábra mutatja be. Látható, hogy az összes állat vérében megjelentek olyan antitestek, amelyek felismerik a humán NOX5 fehérjét a sejtlizátumokban.



9. ábra: Az oltott egerek immunválaszának az ellenőrzése Western blot technikával.

Látható, hogy az összes egérben kialakult az immunválasz, vérünkben NOX5-öt felismerő antitestek találhatóak. (Reprezentatív ábrák legalább 3 független kísérletből.)

4.1.3 Hibridóma sejtek előállítás, a végső klón kiválasztása

Az Immunogenes Kft munkatársai az immunizált egerek lépsejtjeit egér hibridóma sejtekkel (SP2/0-Ag14) fuzionáltatták. A keletkező hibridóma sejteket HAT médium (hipoxantin-aminopterin-timidin médium) segítségével szelektálták ki. Később egysejt klónokat hoztak létre, amelyek korlátlanul termelik a rájuk jellemző egyetlen fajta antitest molekulát. Felülúszó mintákat gyűjtöttek a sejtekről, majd ELISA segítségével meghatározták a legjobban teljesítő klónokat. Az ELISA tesztek után a kiválogatott felülúszó mintákat teszteltem, hogy melyik adja a legjobb jelet Western blotban és immunfestésben. Miután kiválasztottuk a legígéretesebb jelöltet, a hibridómát intraperitoneálisan beoltották BALB/c egereknek. Ascitest képeztek az állatokban, amiből ProteinA oszlop segítségével puolták az antitestet.

Az egerek közül a 4565-ös és a 4566-os számú lépét együttesen dolgozta fel a cég. A mAb fejlesztése során számos klónt teszteltünk, mielőtt kiválasztottuk a rendelkezésre állók közül a legjobbat. A kiválasztás alapját a klónok ELISA-ban, Western blot-ban és immunfestésben elért eredményei adták. Ezen klónokat és a tesztek eredményeit nem mutatom be a dolgozatomban, hanem helyette a végső, kiválasztott jelöltre fókuszálok, az 1E10 jelölésű klónra, ami a mAb-t adta. Dolgozatom későbbi fejezeteiben bemutatott kísérletekhez én is az 1E10 mAb-et használtam. Elvégeztem az új ellenanyag részletes karakterizálását, a segítségével detektálni tudtam a NOX5 fehérjét humán sejtekben és szövetekben. Az együttműködés célja egy kereskedelmi forgalomban is kapható, új mAb előállítás volt, ami specifikusan felismeri a humán NOX5-öt. Ezért az Immunogenes Kft. forgalmazza is az antitestet a honlapján, 04-es katalógusszám alatt: <http://immunogenes.com/catalogue-models/overview>.

4.2 NOX5-öt túltermelő HEK293T sejtek tanulmányozása

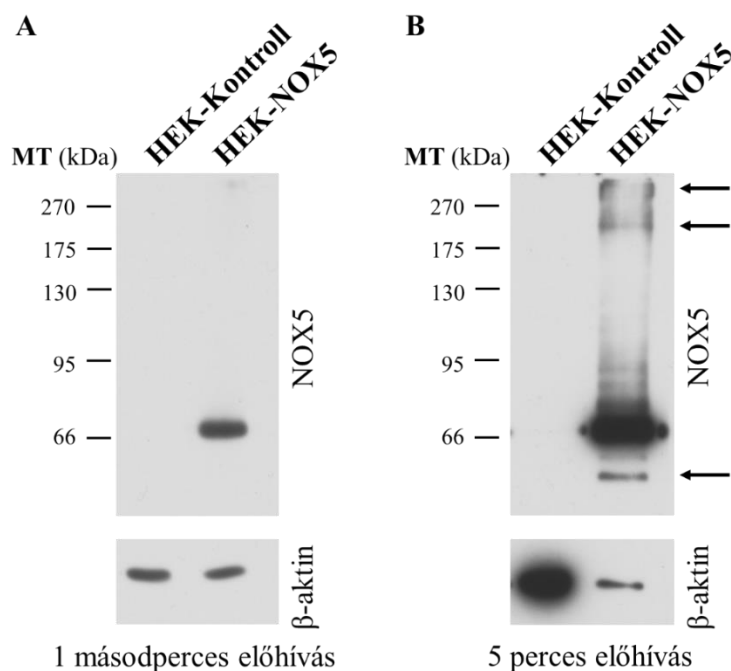
Az antitestfejlesztéssel párhuzamosan létrehoztunk a CMV promóter kontrollja mellett, stabilan humán NOX5-öt kifejező HEK293T sejtvonalat és egy kontroll HEK293T sejtvonalat. A HEK293T sejtek létrehozásának a célja, hogy felhasználjuk őket, mint antigénforrást az antitestfejlesztés során a klónok szűrésére. Ezen túlmenően tanulmányozni szeretnénk volna az oxidáz intracelluláris lokalizációját is. Továbbá funkcionális mérések elvégzése is a terveink között szerepelt, hogy megbizonyosodjunk az enzim hibátlan működéséről.

4.2.1 A sejtvonalak létrehozása

A kontroll HEK293T vonal (HEK-Kontroll) létrehozásához a sejteket egy üres, inzert nélküli Sleeping Beauty vektorral (pSB/CMV/MCS/Puro) transzfektáltam. A NOX5-öt stabilan expresszáló HEK293T vonal (HEK-NOX5) megalkotásához a NOX5 β cDNS-t tartalmazó Sleeping Beauty vektort juttattam a sejtekbe. Két nappal a transzfekció után 7,5 μ g/ml puromycin hozzáadásával kezdtem el kiszelektálni a stabilan transzfektált klónokat. A szelekciós nyomást két héten keresztül tartottam fent, és ezen antibiotikum kezelésen mind a kontroll, mind a NOX5-ös sejtvonala végig ment.

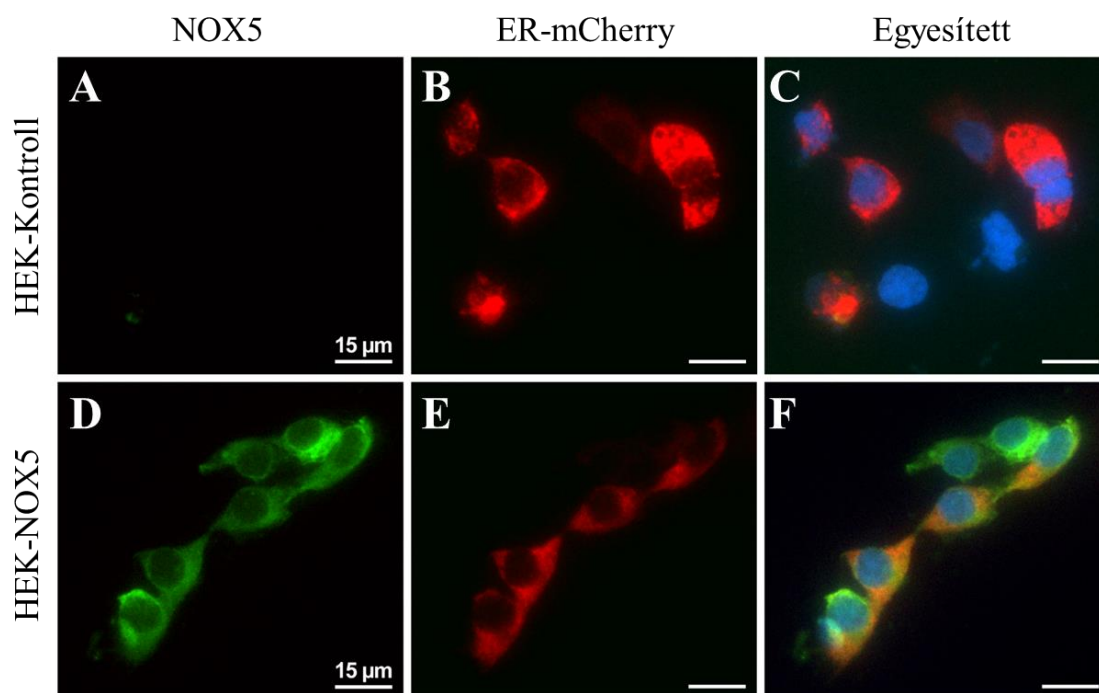
4.2.2 NOX5 fehérje detektálása a HEK sejtekben, az enzim intracelluláris lokalizációjának meghatározása

Miután elkészült az új, monoklonális, 1E10 jelű NOX5 ellenes antitestünk, először HEK sejteken próbáltuk ki. Mind a kontroll, mind a NOX5-ös sejtekből lizátumokat készítettem a Módszerek fejezetben leírtak szerint. A Western blot eredményét a 10. ábra mutatja. Az új mAb csak a HEK-NOX5-ös mintában detektálja a fehérjét. Rövid, 1 másodperces, előhívásnál 66 kDa felett látható az oxidáz jele (10. ábra A). Hosszabb, 5 perces, előhívásnál azonban a HEK-NOX5-ös mintában már felfedezhető több csík is, amelyek a fehérje bomlástermékéből, illetve multimerek képzéséből származhatnak (10. ábra B). A kontroll minta továbbra is negatív. A 10. ábra B részén egy hígabb HEK-NOX5-ös sejt-lizátumot alkalmaztam. Ennek két célja volt. Egyrészt, szemléltetni szeretném, hogy a kifejlesztett antitest nagy érzékenységgel ismeri fel a NOX5 fehérjét. Másrészt, bemutatom, hogy 5 perces előhívási idő után sem detektálunk semmilyen jelet az antitestünkkel a HEK-Kontroll mintában. Ehhez hígabb HEK-NOX5-ös mintára volt szükség, ugyanis közel azonos fehérjemennyiségek mellett a NOX5 jele „átcsapott” volna a HEK-Kontroll minta sávjába, értékelhetlenné téve azt.



10. ábra: Túltermeltetett NOX5 detektálása HEK293T sejtekben az új, monoklonális NOX5 antitesttel. Az új reagens csak a NOX5-öt túltermelő sejtek mintájában mutat pozitívítást. **(A)** Rövid előhívásnál egyetlen csík látható a röntgenfilmen (154). **(B)** Hosszabb előhívásnál több csík is megjelenik a mintában, ami feltehetően a NOX5 multimer képzéséből, illetve degradációjából származhat. A HEK-Kontroll mintához képest ez esetben egy hígabb HEK-NOX5-ös mintát töltöttem a gélbe. (Reprezentatív ábrák legalább 3 független kísérletből.)

A 10. ábrán bemutatott Western blot-ban nem hőkezelt fehérjelizátumokkal dolgoztam. A következő vizsgálatban megnéztem, hogyan hat a hőkezelés a NOX5 fehérje kimutatására. A kísérlet során a HEK-NOX5 lizátumokat növekvő időtartamú, 1-5 perces, 95 °C-os hőkezelésnek tettem ki. A mintákat SDS-PAGE gélen elválasztottam és Western blot-tal detektáltam a NOX5-öt (11. ábra). Az eredményekből leolvasható, hogy a hődenaturáció rontja a NOX5 fehérje kimutathatóságát. A hőkezelés hatására a fehérje valószínűleg aggregálódik, kevesebb képes belépni a szeparáló gélbe, illetve elvándorolni a várt molekulatömeg-tartományba. A jelenséget jól demonstrálja, hogy a nem főzött mintához képest a főzés hatására egyre csökken a NOX5 jele a megfelelő magasságban, míg a membrán tetején egyre több, nem elválasztódott fehérjét mutattam ki.



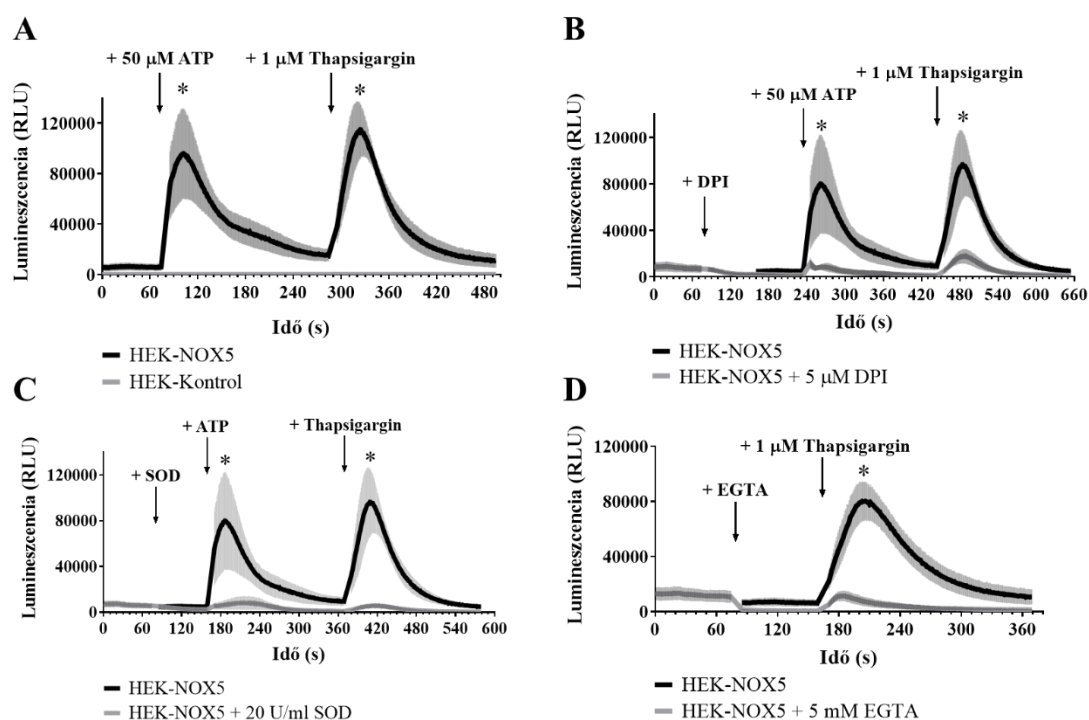
12. ábra: A HEK-Kontroll és HEK-NOX5 vonalak immunfestése az általunk kifejlesztett NOX5 antitesttel. Az immunfestés előtt a sejteket transzfektáltuk az ER-ban lokalizálódó mCherry fehérjével (ER-mCherry), hogy meg tudjuk határozni a NOX5 intracelluláris lokalizációját a HEK293T sejtekben. **(A)** HEK-Kontroll sejtek immunfestése NOX5-re. **(B)** HEK-Kontroll sejtek transzfektálva ER-mCherry fehérjével. **(C)** A zöld és piros csatornák egyesítése a kontroll sejtek esetében. **(D)** HEK-NOX5 sejtek festése NOX5-re. **(E)** HEK-NOX5 sejtek transzfektálva az ER-mCherry fehérjével. **(F)** A zöld és piros csatorna jelei egyesítve a HEK-NOX5 sejtek esetében. A NOX5 ER és sejtmagmembrán lokalizációt mutat a HEK-NOX5 sejtvonalban. A kék szín a sejtmagokat jelöli (154). (Reprezentatív ábra 3 független kísérletből.)

4.2.3 A HEK-NOX5 sejtek funkcionális jellemzése

A létrehozott HEK-Kontroll és HEK-NOX5 sejtvonalak alkalmasak voltak a mAb fejlesztése során a klónok, illetve az antitestek előszűrésére. Ezen túlmenően azonban célunk volt a sejtekbe juttatott NOX5 enzim működésének is a vizsgálata különböző funkcionális mérések segítségével. Végeztünk szuperoxid (O_2^-) és intracelluláris Ca^{2+} -szint változásokat követő méréseket. Ezekkel a kísérletekkel vizsgálni akartuk a különböző stimulusok eredményeként bekövetkező szuperoxidfelszabadulást, valamint

megnézni, hogyan változik az intracelluláris Ca^{2+} -szint a stimulusok és az előállított szuperoxid hatására.

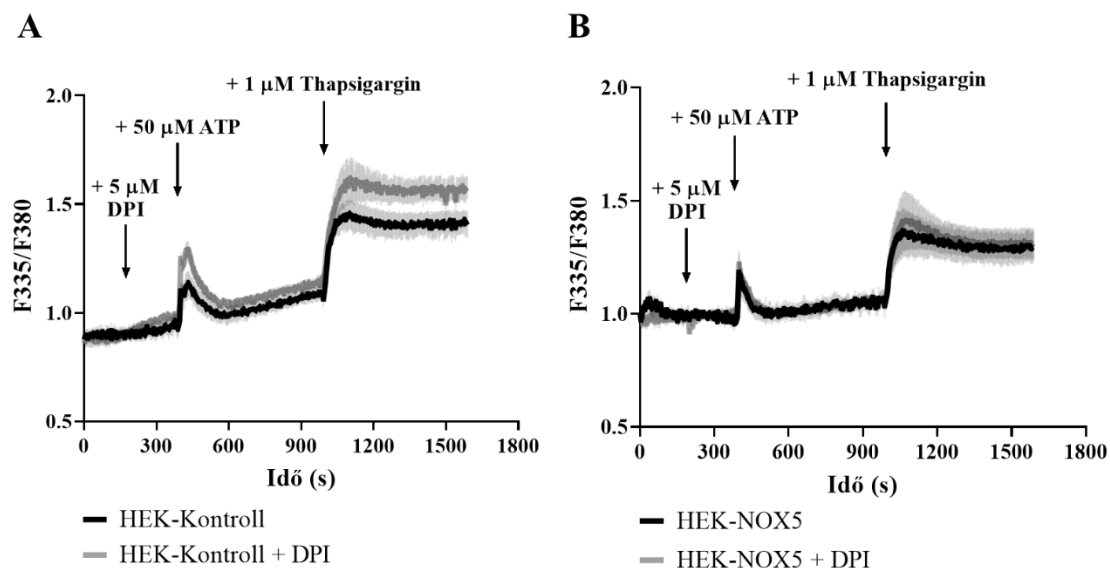
A O_2^- -mérésekhez a Diogenes reagenst használtuk. A Diogenes a sejtekből kiáramló, extracelluláris O_2^- -ot képes detektálni nagy érzékenységgel és specifitással. A HEK-NOX5 sejtek O_2^- -termelését különböző stimulusok és reagensek hozzáadásával tanulmányoztuk. Ahhoz, hogy a sejtek szuperoxidot termeljenek a NOX5 közvetítésével, meg kell hogy emelkedjen az $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$. Ezt ATP, illetve thapsigargin (Tg) hozzáadásával váltottuk ki. Míg a Tg az ER-ban található SERCA pumpa gátlásával éri el az $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ növekedését, az ATP, mint biológiailag inert ligand, receptor-mediált úton hat. A HPA RNS adatai alapján a HEK293 sejtek rendelkeznek különböző P2-es osztályú, ATP-re reagáló és kalcium jelet kiváltó purinerg receptorokkal (P2RX4 és P2RY11) (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000135124-P2RX4/cell+line>, <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000244165-P2RY11/cell+line>). Indukálható O_2^- -termelés csak a HEK-NOX5 sejtek esetében figyelhető meg, míg a HEK-Kontroll sejtek nem válaszoltak a stimulusokra (13. ábra A). A ROS termelés gátlását az általános NAPDH-oxidáz inhibitor difenil-jodónium (DPI) bemérésével értük el. A DPI töredékére csökkentette a detektálható O_2^- jelet (13. ábra B). SOD hozzáadásával megnéztük, hogy a Diogenes reagens mennyire specifikus a O_2^- -ra. 20 U/ml koncentrációban igen hatékonyan csökkenteni tudtuk a detektálható Diogenes jelet. Az intracelluláris térből kiáramló O_2^- -ot a SOD H_2O_2 -dá alakítja, ezáltal csökkentve a szignált (13. ábra C). Az extracelluláris Ca^{2+} -ok szerepét EGTA hozzáadásával tanulmányoztuk. A szuszpenzióhoz adott EGTA nagy affinitással komplexet képez a Ca^{2+} -okkal, így csökkentve az extracelluláris Ca^{2+} koncentrációt, miáltal kevesebb Ca^{2+} áramlik be a sejtekbe. Ilyen körülmények között kisebb O_2^- jelet mértünk (13. ábra D). A HEK-NOX5 sejteknél már egy bazális O_2^- felszabadulás is megfigyelhető, indukció nélkül. A sejtekhez mért DPI és SOD ugyan különböző mechanizmusokkal, de csökkentik ezt a bazális O_2^- mennyiséget is.



13. ábra: HEK-NOX5 sejtek szuperoxidtermelésének a vizsgálata extracelluláris szuperoxidot detektáló Diogenes reagenssel. (A) Szuperoxidtermelés kiváltása receptor közvetített úton ATP hozzáadásával vagy a SERCA pumpa gátlásával, thapsigargin bemérésével. (B) Szuperoxidtermelés gátlása difenil-jodónium (DPI) hatására. (C) A Diogenes reagens szuperoxid specifikitásának a vizsgálata SOD segítségével. (D) Az extracelluláris Ca^{2+} szerepének megfigyelése EGTA jelenlétében. Az eredmények az átlag \pm SEM-et ábrázolják, $n=3-4$, *: $p < 0,05$ (154).

Fura-2-AM festék felhasználásával nyomon tudtuk követni a különböző stimulusokra bekövetkező intracelluláris Ca^{2+} változásokat. Mind a kontroll, mind a NOX5-öt kifejező sejtek esetében megnéztük, hogyan változik a citoplazmatikus kalciumszintjük ATP és Tg hatására, illetve hogyan befolyásolja mindezt a DPI előkezelés. Összességében elmondható, hogy mind a két sejtvonalban az ATP átmeneti, a Tg pedig tartós intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedést váltott ki (14. ábra). A HEK-NOX5 sejtek esetében ezt követte a O_2^- előállítás is (13. ábra A). A DPI, ezáltal pedig a NOX5-függő O_2^- -termelés hiánya, nem befolyásolta a Ca^{2+} szintet. Érdekes jelenség továbbá, hogy a Tg fenntartott Ca^{2+} jelet hozott létre, azonban a HEK-NOX5-ös sejtekben ezt nem egy fenntartott, hanem csak egy átmeneti O_2^- jel követi (13. ábra A). A magyarázat feltehetően egyrészt az, hogy a Tg hatására a sejt elhasználja a NADPH készletét, ennek

következtében pedig nincs elektronutánpótlás további O_2^- előállításához. Másrészt, a képződött O_2^- oxidálhatja az EF-hand-en lévő metionin és cisztein aminosavakat, ezáltal csökkentve az N-terminális fehérjelánc affinitását az EF-hand-kötő doménhez, amely végeredményben a O_2^- termelés leállításához vezet.



14. ábra: Intracelluláris Ca^{2+} szint változásának a nyomon követése fura-2 AM festékkel. DPI, ATP és thapsigargin (Tg) hatásának a vizsgálata HEK-Kontroll (A) és HEK-NOX5 (B) sejtvonalakon. Az ATP átmeneti, míg a Tg tartós emelkedést okozott a Ca-szintben. A DPI, és így a szuperoxid hiánya nem volt hatással a Ca-jelekre. Az eredmények az átlag \pm SEM-et mutatják, $n=3$.

4.3 Az endogén NOX5 tanulmányozása UACC-257 sejtekben

Láttuk, hogy a kifejlesztett mAb megbízhatóan felismeri a túltermeltetett NOX5 fehérjét a HEK293T sejtekben. A következő lépésben ezért olyan rendszert kerestünk, amely endogén módon fejezi ki az oxidázt, nem pedig egy külsőleg bevitt DNS konstrukció hatására. Így került a figyelmünk középpontjába az UACC-257 elnevezésű melanóma sejtvonal.

4.3.1 NADPH-oxidázok expressziójának *in silico* analízise az UACC-257 sejtekben

Az UACC-257 sejtvonal az NCI-60 sejtvonal gyűjtemény egy tagja. Az NCI-60 gyűjteménybe 60 különböző humán rákos sejtvonal tartozik, amelyet az Egyesült Államok Nemzeti Rákkutató Intézete használ rákellenes gyógyszerek fejlesztéséhez az

1990-es évek óta. Az évtizedek során felhalmozódott rengeteg molekuláris információ rendezésére és elérésére hozták létre a CellMiner weboldalt. A honlapról ingyenesen elérhető a 60 sejtvonal molekuláris jellemzése RNS, DNS, fehérje és farmakológiai szinten (<https://discover.nci.nih.gov/cellminer/analysis.do>).

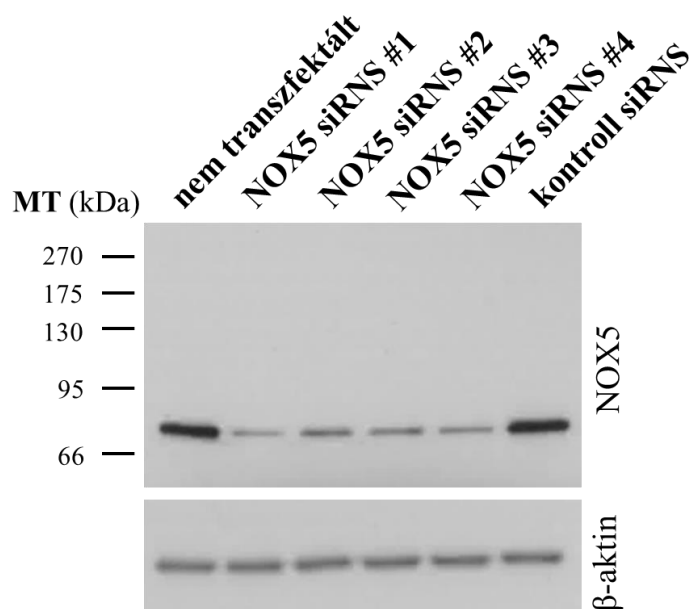
Kutatásom során arra használtam ezt a felületet, hogy az érdeklődésünk középpontjában álló UACC-257 sejtvonalról RNS-szekvenálási információkat gyűjtsek. A különböző NADPH-oxidázok (és egyéb gének) expressziós szintjét hasonlítottam össze a 4. táblázatban. Az elért információk alapján ebben a melanóma sejtvonalban a NOX5 a meghatározó NADPH-oxidáz. A megfigyelés összhangban van a Doroshov munkacsoport korábban publikált tanulmányával. Az amerikai kutatócsoport 22 humán melanóma sejtvonalban vizsgálta a NOX5 expresszióját, és azt találták, hogy az UACC-257 sejtekben a legmagasabb a NOX5 mennyisége mRNS szinten (142). A TRPV4, mint egy lehetséges, a sejtekben kalcium jelet létrehozó csatorna, az UACC-257 sejtek szuperoxidtermelő képessége miatt van feltüntetve.

4. táblázat: A NADPH-oxidázok, a p22^{phox} és a TRPV4 fehérjét kódoló gének expressziós szintjei RNS-szekvenálási adatok alapján az UACC-257 sejtvonalban. Az egyes gének értéke az egymillió leolvasásra jutó kilobázisonkénti fragmentumokból (FPKM) származtatható. A kinyert adatok a CellMiner weboldalról érhetőek el.

Vizsgált gének	Expressziós szint (log ₂ (FPKM+1))
NOX1	0
NOX2 (CYBB)	0
NOX3	0
NOX4	0,651
p22 ^{phox} (CYBA)	5,704
NOX5	3,939
DUOX1	0,089
DUOX2	0,027
TRPV4	2,271

4.3.2 Endogén NOX5 fehérje detektálása az UACC-257 sejtekben Western blot technikával

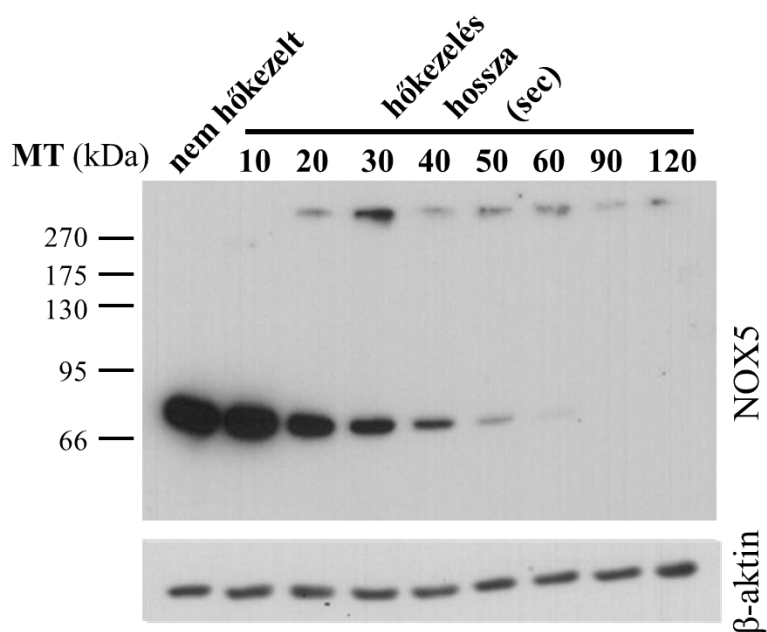
Mivel az UACC-257 sejtvonalonban kimagasló mennyiségben van jelen a NOX5 RNS-e, alkalmas lehet, hogy teszteljük rajta az új mAb-t. Első lépésként Western blot kísérletben mutattuk ki az endogén NOX5 fehérjét UACC-257 sejtizátumokban. Vizsgálandó, hogy az antitestünk specifikusan NOX5-t ismer-e fel, a sejteket 4 különböző NOX5 siRNS-sel transzfektáltam. Kontrollként kontroll siRNS-sel transzfektált sejtek izátumát használtam. Ahogy a 15. ábra is bemutatja, mind a négy NOX5 mRNA-t célzó siRNS csökkentette a detektált fehérje mennyiségét 2 nap kezelés után, míg a kontroll siRNS nem okozott érdemleges változást.



15. ábra: Az endogén NOX5 fehérje detektálása Western blot technikával az új monoklonális antitest segítségével UACC-257 sejtizátumban. A specifikusság ellenőrzése 4 különböző NOX5 siRNS-sel kezelt minta segítségével történt (NOX5 siRNS #1-#4). Kontrollként kontroll siRNS-sel transzfektált minta szolgált. A géncsendesítés hatására az új mAb kevesebb NOX5 fehérjét ismer fel a célzottan kezelt mintákban. (154). (Reprezentatív ábra 2 független kísérletből.)

A HEK293T sejtekben túltermeltetett NOX5 fehérjéhez hasonlóan megvizsgáltam, hogyan viselkedik az endogén NOX5 a hőkezelés hatására (16. ábra). A kísérleti felállás hasonló volt a korábban leírtakhoz, azonban ebben az esetben csupán rövidebb ideig

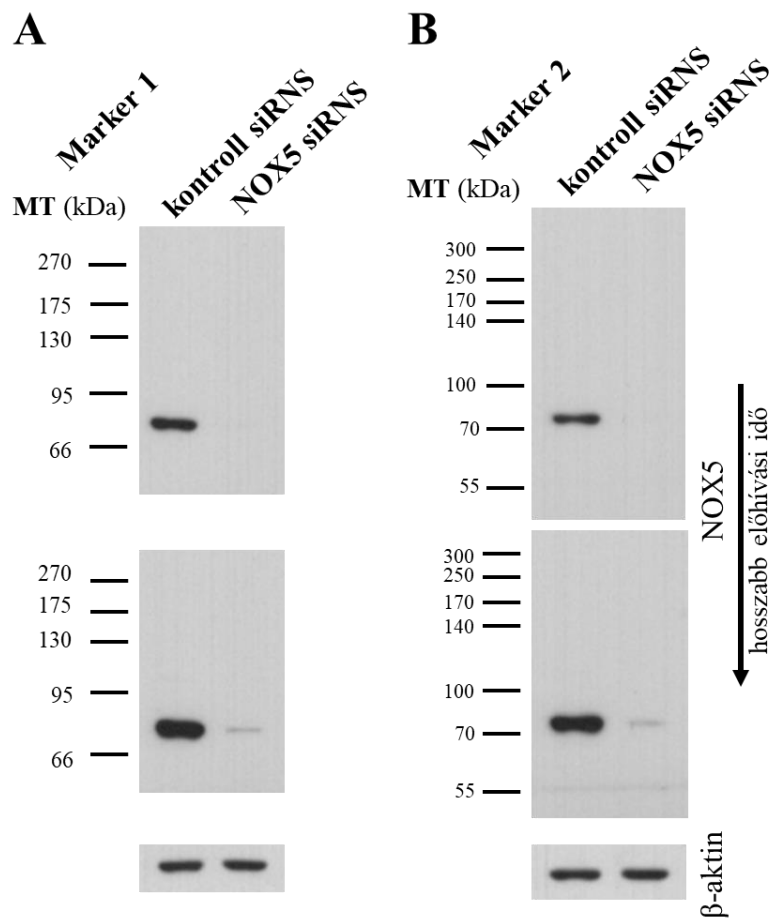
hőkezelttem 95 °C-on a fehérjeoldatokat. Az UACC-257 sejtekből származó jel még érzékenyebben reagált a melegítésre. A Western blot képen jól látható, ahogy egyre csökken a detektálható NOX5 mennyisége a megfelelő molekulatömeg-tartományban, míg a szeparálódni nem képes fehérje megjelenik a membrán tetején. A hődenaturációs kísérletekből azt a következtetést tudjuk levonni, hogy a NOX5 fehérje detektálhatósága meglehetősen hőérzékeny. A Western blot-ra felhasznált fehérjeminták előkészítése során nem szabad az oldatokat hőkezelésnek kitenni, különben elveszíthetjük a kimutatandó NOX5 jelet, amint azt a 11. és a 16. ábrák is szemléltetik. Feltehetőleg, a cégek által forgalmazott, hőkezelt humán szövetlizátumokban sem tudnánk detektálni a NOX5 fehérjét az antitestünkkel, ezért mindenképpen meg kell bizonyosodjunk afelől, hogy nem hőkezelt mintákkal dolgozunk.



16. ábra: Növekvő időtartamú hőkezelés hatása az endogén NOX5 kimutathatóságára az UACC-257 sejtekben. Minél hosszabb a 95 °C-os főzés, annál kevesebb NOX5 fehérje detektálható a megfelelő molekulatömeg-tartományban. (Reprezentatív ábra 3 független kísérletből.)

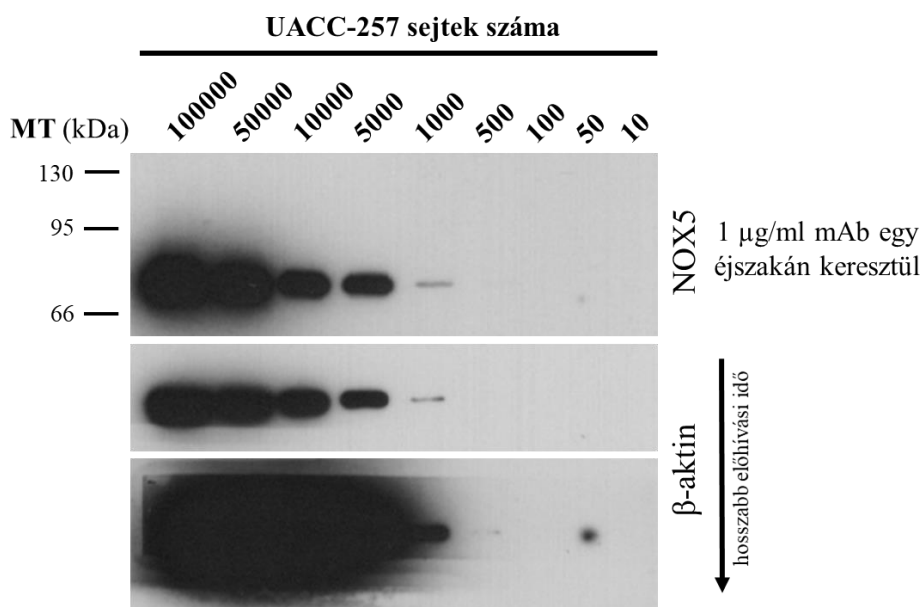
Az endogén NOX5 fehérje molekulatömegének a megbecsléséhez két különböző fehérjemarkert használtunk (17. ábra). Az egyik kevésbé jó felbontást biztosít (Marker 1, 17. ábra A), míg a másik jobb megítélhetőséget nyújt a kérdéses tartományban (Marker 2, 17. ábra B). A 2-es fehérjemarkertel leolvasható, hogy a melanóma sejtek endogén NOX5 fehérjére körülbelül 75 kDa méretű. Egy svájci kutatócsoport körülbelül 70 kDa

magasságában detektálta a NOX5-öt. Közleményükben kifejtik, hogy az oxidáz prediktált nagysága 82 kDa körül lenne, azonban a Western blot kísérletek eredményeként visszatérően egy 70 kDa körüli csíkot látnak (111). Eredményeink szintén az ő megfigyelésüket erősítik. Egy amerikai labor azonban Western blot vizsgálatában valóban körülbelül 82-86 kDa magasságában detektálták a különböző NOX5 izoformákat (155). Az ellentmondás feltehetően abból fakad, hogy a kísérletek folyamán különböző töménységű akrilamid gélek lettek felhasználva, jobban vagy rosszabbul lettek szeparálva a minták, illetve a denaturáció hatékonysága sem lehetett egyforma.



17. ábra: Az endogén NOX5 fehérje molekulatömegének vizsgálata UACC-257 sejtekben. Kétféle fehérjemarker segítségével igyekeztünk megbecsülni az endogén NOX5 fehérje nagyságát kontroll és NOX5 siRNA-sel transzfektált sejtekben. A Marker 1 kevésbé jó felbontást biztosít a kérdéses 70 kDa nagyságában (A). Ezzel szemben a Marker 2 rendelkezik egy 70 kDa-os standarddal (B), ami alapján a NOX5 75 kDa nagyságúnak becsülhető (154). (Reprezentatív ábra 3 független kísérletből.)

Megvizsgáltuk az új NOX5 mAb érzékenységét is. A kísérletben Neubauer-kamrában megszámolt sejtekből hígítási sort készítettem. A Western blot során azonos térfogatú, de csökkenő sejtszámú mintákat töltöttem be a gélbe. A NOX5 mAb-et 1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban alkalmaztam, egy éjszakán keresztül inkubáltam vele a membránt. Az eredményeket a 18. ábra szemlélteti.

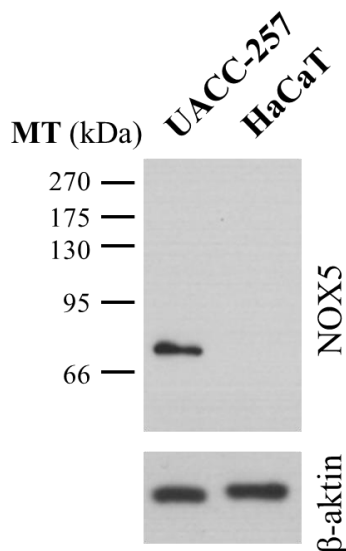


18. ábra: Az új NOX5 mAb érzékenységének a vizsgálata csökkenő sejtszámú UACC-257 sejtizátumok felhasználásával. A NOX5 mAb koncentrációja 1 $\mu\text{g/ml}$ volt, amelyet egy éjszakán keresztül inkubáltunk a mintákkal. Az antitest kevesebb, mint 1000 darab UACC-257 sejtben is képes felismerni a NOX5-öt (154). (Reprezentatív ábra 2 független kísérletből.)

A mAb már 1000 darab sejtben is képes felismerni a NOX5 fehérjét a fent említett paraméterek mellett. Fontos megjegyezni, hogy az UACC-257 sejtekben a NOX5 egyenletlen eloszlást mutat. A disszertációmban később bemutatott immunfestési eredményeinél látható a 20. és a 21. ábrán, hogy az adott vizsgálati körülmények mellett a sejtpopuláció nem mutat egyöntetű NOX5 pozitivitást. Ebből az érdekes jelenségből az szűrhető le a Western blot-ra vonatkoztatva, hogy az 1000 sejtből feltehetőleg csak kevesebb pozitív a NOX5-re. Így a valós sejtszám, amiben még ki tudjuk mutatni a NOX5 fehérjét, jóval alacsonyabb érték lehet, mint az 1000 darab sejt. Azonban fennállhat annak is a lehetősége, hogy az UACC-257 sejtek nagy részében olyan alacsony a NOX5 fehérje

kifejeződése, hogy az nem éri el az antitestünk detektálási határát, és ennek következtében látjuk a sporadikus NOX5 jelet a 20. és a 21. ábrákon.

Egy következő kísérletben megvizsgáltam, hogy a NOX5 mAb mennyire specifikus a NOX5 EF-hand régiójára. A NADPH-oxidázok családjában a NOX5, a DUOX1 és a DUOX2 fehérjék rendelkeznek EF-hand motívummal. Emiatt, ha az antitest keresztreakálna más NOX enzimmel, az várhatóan egy DUOX lenne. A Western blot kísérletekhez HaCaT sejtlizátumot kértem kollégámtól, Dr. Pató Annától. A HaCaT sejtekben nagy mennyiségben megtalálható a DUOX1 NADPH-oxidáz (156). Az antitestünk azonban nem detektált semmilyen jelet a HaCaT mintában. Pozitív kontrollként UACC-257 sejtlizátumot használtam. A DUOX1 jelet 170-180 kDa magasságában várnánk (19. ábra).

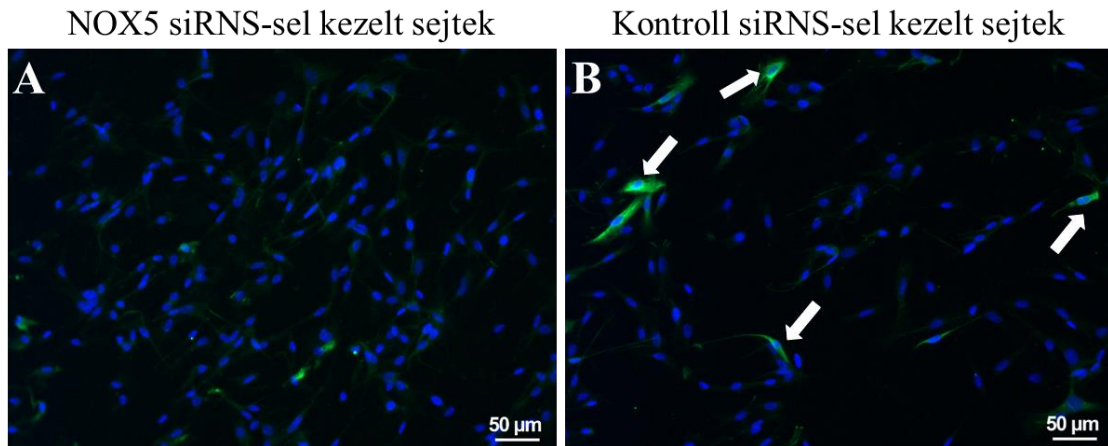


19. ábra: A NOX5 ellenes antitest NOX5 EF-hand specifitásának a vizsgálata a DUOX1 EF-hand-del szemben. A DUOX1 nagy mennyiségben fejeződik ki a HaCaT sejtekben. Pozitív kontrollként UACC-257 sejtek lizátumát használtam. Az antitest semmit sem detektál a HaCaT mintában. (Reprezentatív ábra 3 független kísérletből.)

4.3.3 Endogén NOX5 fehérje detektálása az UACC-257 sejtekben immunfestéssel

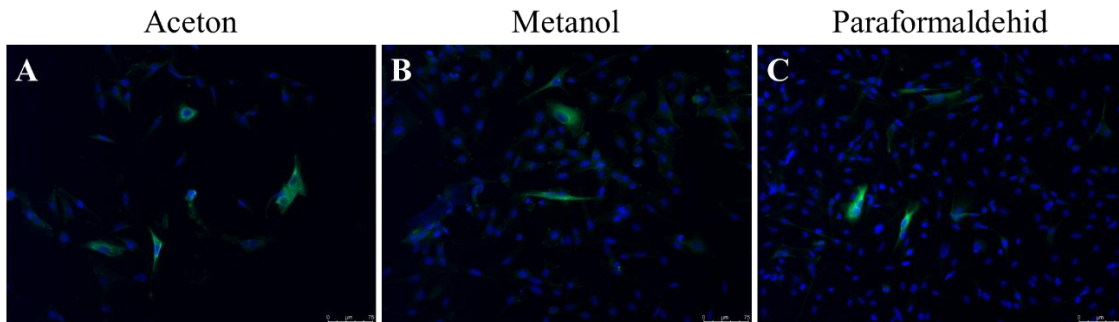
A Western blot eredmények alapján meggyőződünk arról, hogy a kifejlesztett antitest megbízhatóan detektálja az SDS-PAGE során denaturált, endogén NOX5-öt. A következő lépésként, a natívabb konformációt megőrző NOX5 fehérjét is detektálni terveztük immuncitokémiás eljárással. A kísérletben, hasonlóan a Western blothoz,

kontroll és NOX5 siRNS-sel transzfektált mintákat vetettünk össze (20. ábra). A kezelésekhöz az #1-es vagy a #4-es NOX5 siRNS-t használtam. Immunfestésben is kimutatható az új monoklonális antitesttel, hogy a NOX5 siRNS kezelés hatására kevesebb pozitív sejt van a látótérben, a NOX5 mennyisége csökkent a sejtekben.



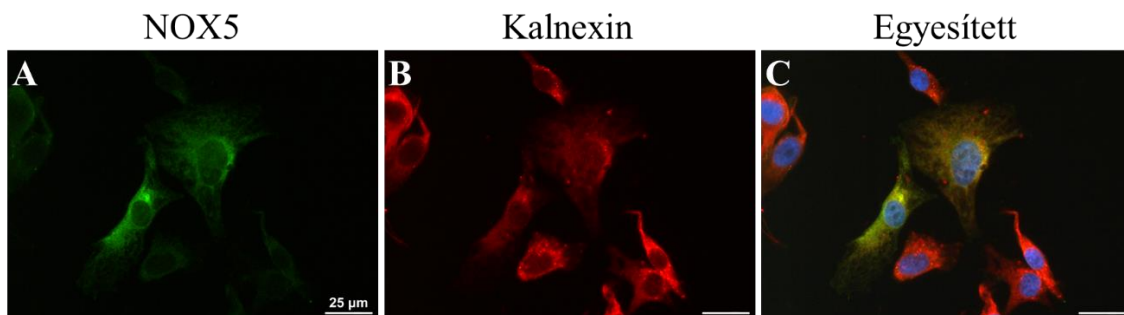
20. ábra: NOX5 fehérje detektálása az UACC-257 sejtekben immunfestéssel. A zöld szín a NOX5 ellenes antitest kötődését jelzi, míg a kézzel megjelenített DNS festék a sejtmagokat. (A) A NOX5 specifikus siRNS kezelés hatására csökkent jelölődést lehet megfigyelni a kontroll siRNS kezeléshez (B) képest (154). (Reprezentatív ábra 3 független kísérletből.)

Az antitestjellemzés során megvizsgáltam különböző fixálási technikákat is. Acetonnal, metanollal, illetve paraformaldehiddel történő fixálás után festettem meg az UACC-257 sejteket NOX5-re. Hatásmechanizmusában az aceton és a metanol eltávolítja a sejtekből a lipideket, a fehérjéket pedig precipitálja. Ezzel szemben a PFA keresztkötéseket hoz létre a makromolekulák között, így rögzítve azokat. Kísérleteim eredményéből az látszik, hogy mind a három ágenssel történő kezelés után felismeri az antitest a NOX5 fehérjét (21. ábra).



21. ábra: UACC-257 sejtek immunfestése NOX5-re különböző fixálási technikák után. Az acetonnal (A), metanollal (B) és paraformaldehyddel (C) fixált sejtekben is felismeri az új NOX5 mAb az antigénjét. Zöld színnel van jelölve a NOX5 fehérje, míg kék színnel a sejtmagok. (Reprezentatív ábra 3 független kísérletből.)

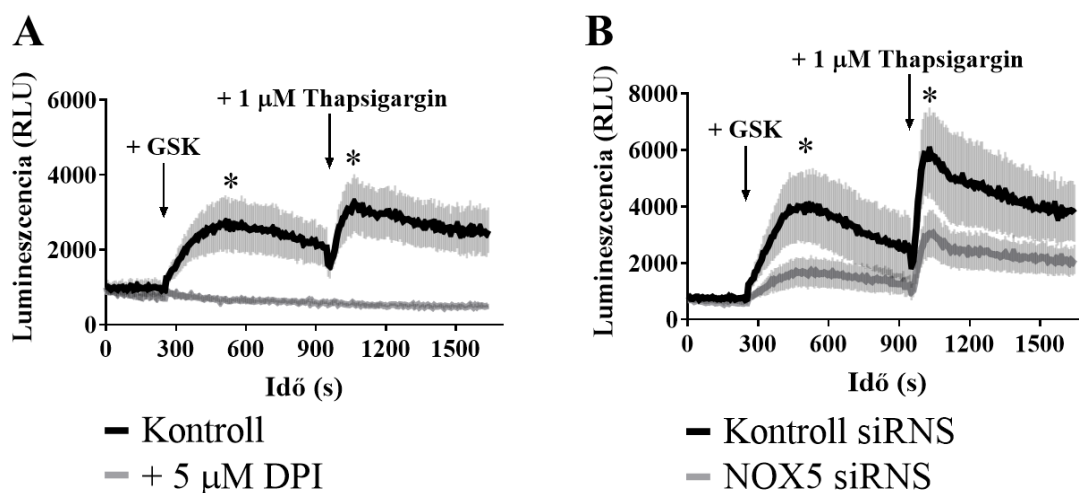
Koimmunfestéssel vizsgáltam a melanóma vonalban a NOX5 intracelluláris elhelyezkedését. A NOX5 mellett a kalnexin fehérjét jelöltem meg. A kalnexin egy transzmembrán ER chaperon, amely a glikozilált fehérjék megfelelő hajtogatásában vesz részt (157). A 22. ábra szemlélteti, hogy a zöld, NOX5, és a piros, kalnexin, jelek mintázatai között a kettősen pozitív sejtekben jelentős átfedés van (22. ábra C). Megállapítható, hogy a HEK293T sejtekben túltermeltetett NOX5-höz hasonlóan, az UACC-257 sejtekben az endogén NOX5 is ER és sejtmagmembrán elhelyezkedést mutat.



22. ábra: A NOX5 intracelluláris lokalizációjának tanulmányozása UACC-257 sejtekben. Zöld szignál (A) jelöli a NOX5 fehérjét, míg a piros (B) az ER-ban található kalnexint. Az egyesített képen (C) felfedezhető, amint a zöld és piros csatorna átfedő festést mutat, ezáltal megállapítható, hogy a NOX5 döntően ER elhelyezkedést mutat a sejtekben. A kék szín a sejtmagokat jelöli (154). (Reprezentatív ábra 3 független kísérletből.)

4.3.4 Endogén NOX5 fehérje aktivitásának a vizsgálata az UACC-257 sejtekben

A melanóma sejtek jó rendszernek bizonyultak ahhoz, hogy a kifejlesztett NOX5 ellenes antitestünket validáljuk és endogén NOX5-öt mutassunk ki. Azonban kíváncsiak voltunk arra is, hogy kalciummal aktiválható NOX5-öt tartalmaznak-e a sejtek, vagy inaktív formában, a szuperoxidtermelés képessége nélkül van jelen az oxidáz. Ezért funkcionális vizsgálatokat is terveztünk. Diogenes reagens felhasználásával megkíséreltük kimutatni a sejtekből kijutó O_2^- -ot. Az intracelluláris Ca^{2+} -szintet biztosan emelő stimulusként ez esetben is thapsigargin alkalmaztunk. Szerettük volna azonban egy receptor vagy ioncsatorna által közvetített úton is elérni az indukált O_2^- -termelést. A szuperoxidtermelés vizsgálatában az ADP, ATP, carbachol, H_2O_2 és mustárolaj (TRPA1 agonista) adása hatástalannak bizonyult. A CellMiner adatbázisból elérhető adatok alapján a TRPV4 kalcium permeábilis ioncsatorna expressziója megfelelőnek bizonyulhat (4. táblázat). A TRPV4 csatorna agonista GSK1016790A (GSK) adásával sikerült is áttörést elérnünk. A GSK hatását a szuperoxid termelésre a 23. ábra mutatja be.



23. ábra: UACC-257 sejtek GSK1016790A és thapsigargin hatására szuperoxidot termelnek. A sejtek 1,5 vagy 2 nM GSK-val, továbbá 1 μ M thapsigarginnal lettek stimulálva. (A) Kezeletlen, kontroll sejtek szuperoxidtermelésének összevetése a DPI kezelt, azaz NOX5 gátolt sejtekével. A DPI gyakorlatilag kivédte az agonisták által kiváltott szuperoxidtermelést. ($n=4$) (B) Kontroll kezeléshez képest a NOX5 siRNS-sel kezelt sejtek szuperoxidtermelése csökkent. ($n=6$) Az eredmények az átlag \pm SEM-et mutatják, *: $p < 0,05$ (154).

A kísérlek során kétféle megközelítéssel demonstráltuk, hogy a detektált O_2^- NOX5 eredetű. Egyrészt, NOX inhibitor DPI-t adtunk a sejtekhez a mérés kezdetén, és ahogy a 23. ábra A részén is jól látható, az oxidáz gátlása mellett egyáltalán nem tudunk O_2^- szignált detektálni. Másrészt, a 23. ábra B része szemlélteti, hogy a NOX5 specifikus siRNS (az #1-es vagy a #4-es) kezelés hatására csökkent az extracelluláris O_2^- mennyisége a kontroll siRNS-sel kezelt sejtekhez képest. Érdekes megfigyelni a DPI-vel történő kezelés esetében, hogy az UACC-257 sejteknek is van egy alacsony, bazális O_2^- kibocsájtása. A gátlószer hozzáadására, stimulus nélkül is csökken a detektálható szuperoxid mennyisége. Ezen eredmények alapján kijelenthető, hogy az UACC-257 melanóma sejtek kalcium jelet okozó agonistákkal aktiválható, O_2^- -termelésre képes NOX5 fehérjével rendelkeznek.

Látható, hogy az UACC-257 sejtek Tg kezelése után egy fenntartott O_2^- produkció jelenik meg (23. ábra). Ezzel szemben a NOX5 fehérjét túltermelő HEK sejteknél a csúcs elérése után a jel visszacsökken az alapvonal közelébe (13. ábra). Ez az érdekes különbség feltehetőleg azzal magyarázható, hogy a túltermeltetett fehérje a stimulus hatására olyan intenzíven oxidálja a sejt NADPH-ját, hogy azzal a NADPH előállítás megközelítőleg sem tud lépést tartani. Ezzel szemben a melanóma sejtek „fiziológiásabb” mennyiségben tartalmaznak NOX5-öt. A Tg stimulus hatására egy alacsonyabb és fenntartott O_2^- kibocsájtásba kezdenek, nem kimerítve a sejt NADPH regenerációs kapacitását.

4.4 NOX5 fehérje kimutatása humán szövetekben

A kifejlesztett monoklonális antitest működését heterológ és endogén NOX5 fehérjét kifejező rendszerekben teszteltük Western blot és immunfestési eljárásokkal. Eredményeink alapján úgy láttuk, hogy specifikusan és nagy érzékenységgel tudjuk kimutatni az oxidázt a különböző sejtes rendszerekben és különböző technikákkal. Ezért a következő kérdésnek az merült fel, vajon ki tudjuk-e mutatni a fehérjét NOX5 gént kifejező, egészséges humán szövetekben.

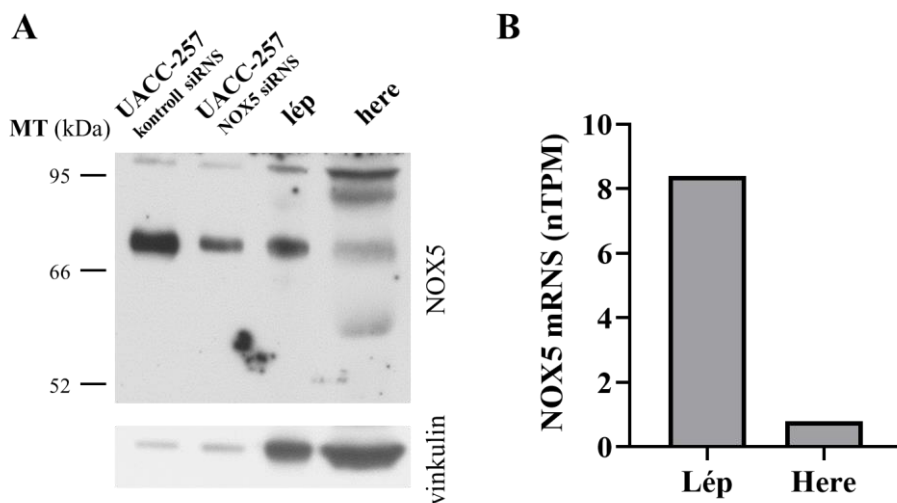
4.4.1 NOX5 fehérje kimutatása lép- és herelizátumokban

A NOX5-öt először 2001-ben írta le egy svájci és egy amerikai kutatócsoport. Northern blot technikával vizsgáltak számos különböző humán szervet a NOX5 RNS-e után kutatva. Eredményeik alapján a lép és a here tartalmazta a vizsgált szervek közül a

legtöbb NOX5 RNS-t (33, 92). Így a szöveti NOX5 fehérje kimutatása céljából egészséges emberi lépből és heréből származó fehérjeoldatokat vásároltunk.

Western blot kísérleteket végeztünk a fent említett humán mintákon az új NOX5 ellenes antitestünkkel. A specifikus NOX5 jel meghatározása céljából kontroll és NOX5 siRNS-sel kezelt UACC-257 sejtek lizátumait használtam. A mAb jelet adott a szövetszövetlízátumokban, amely azonos magasságban van az UACC-257 mintákban detektált, NOX5 siRNS kezelésre érzékeny jellel (24. ábra A). Mindezek alapján sikerült kimutatnunk a NOX5 fehérjét a fentebb nevezett mintákban. Eredményeink szerint az is kijelenthető, hogy a lépben érdemlegesen nagyobb NOX5 jel detektálható, mint a herében. A fehérjeszintű azonosítás mellett megnéztem, hogyan viszonyulnak egymáshoz a normalizált NOX5 mRNS értékek a fenti szövetekben a Humán Protein Atlas (HPA) adatbázisa alapján. A HPA adatai szerint, egyetértésben a 2001-ben megjelent közleményekkel, a lépben található meg a legnagyobb mennyiségben a NOX5 mRNS-e az emberi szervek közül

(<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000255346-NOX5/tissue>). A léphez képest, a herében mindössze a tized mennyiségű NOX5 mRNS detektálható (24. ábra B).

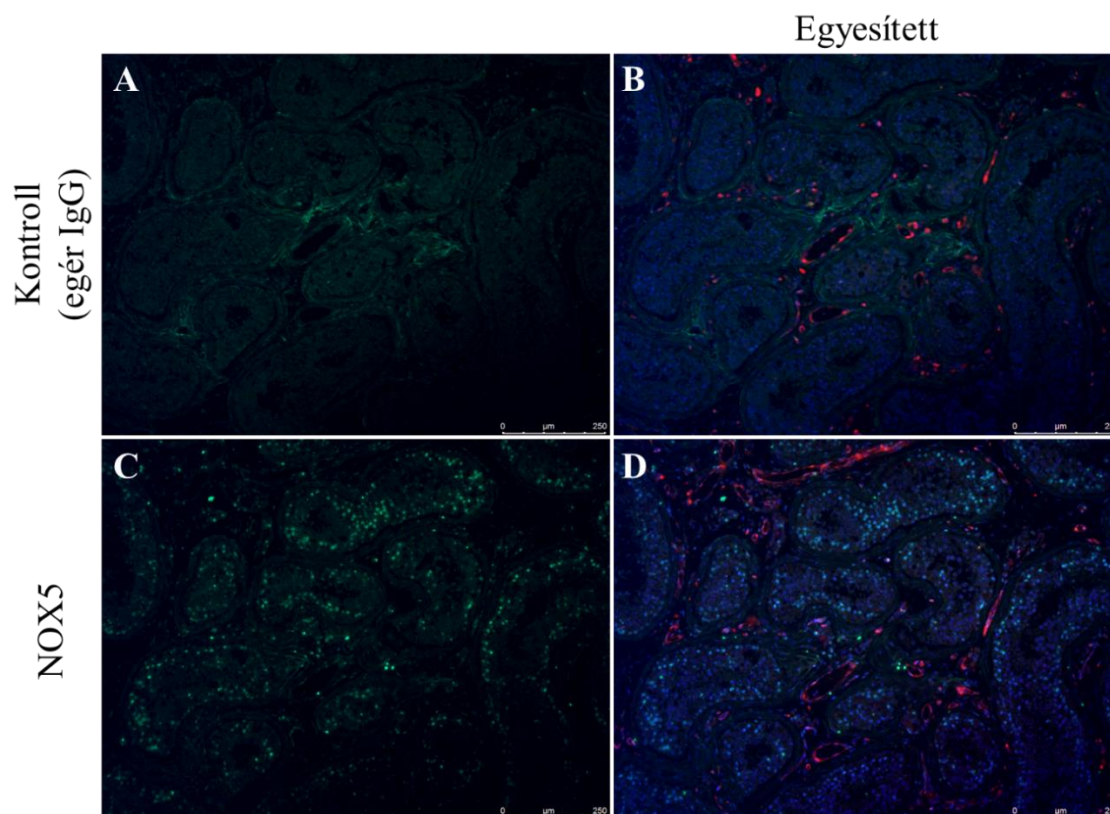


24. ábra: A NOX5 kifejeződése humán lépben és herében. (A) A NOX5 fehérje kimutatása emberi szövettizátumokban Western blot-tal. A NOX5-re specifikus jel meghatározásához kontrollként UACC-257 sejtizátumokat használtam. Mind a lépben, mind a herében látható NOX5 specifikus jel, amely a sejtizátumok NOX5 jelével azonos magasságban detektálható (154). (Reprezentatív ábra 3 független kísérletből.) (B) A NOX5 mRNA mennyiségének az összehasonlítása a lépben és a herében a HPA adatbázis alapján. A herében körülbelül tized annyi mennyiségű RNS-t azonosítottak, mint a lépben.

4.4.2 NOX5 fehérje kimutatása here szövetszöveten immunfestéssel

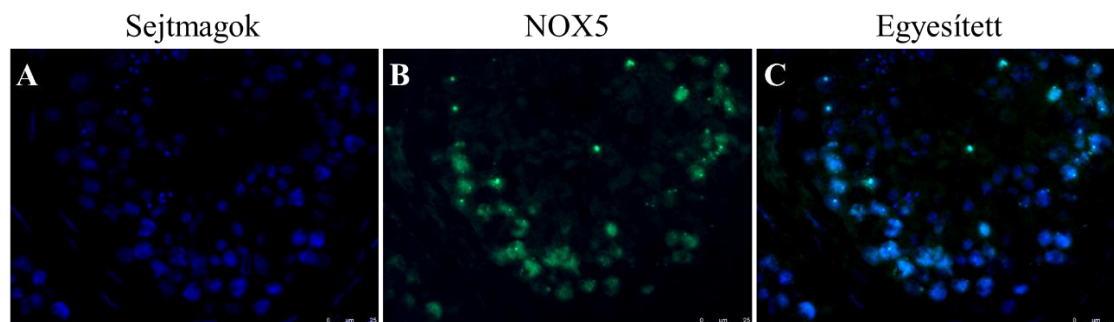
A Western blot-os kísérletet követően immunhisztokémiai eljárással is megkíséreltük kimutatni a NOX5-öt egészséges here szövetszöveten. Mivel NOX5 hiányos humán minta nem áll rendelkezésre, kontrollként egér IgG antitestet használtam első antitestként az aspecifikus kötődések megjelenítéséhez. Elősegítendő a változatos herestruktúrán belüli tájékozódást, a von Willebrand-faktor (vWF) fehérjét is megjelöltem (25. ábra B és D, piros szín). A vWF egy általános endotélsejt marker, megjelölésével a szövet szerkezetében kirajzolódik az érhálózat. Egészséges herében az erek a herecsatornák közötti intersticiális struktúrákban futnak.

Az egér IgG alapvetően csak egy aspecifikus háttérfestést ad (25. ábra A és B). Specifikus NOX5 festődés nagyobb részben a herecsatornáknál látható, kisebb részben az intersticiumban (25. ábra C és D). Az erek endotélsejtjei negatívak NOX5-re.



25. ábra: NOX5 fehérje immunhisztokémiai kimutatása humán here szövetmetszetében. Az egér IgG aspecifikus festését az (A) ábra szemlélteti, míg a NOX5 antitest specifikus betapadását a (C) ábra. Az egyesített ábrákon (B és D) a piros szín jelzi az endotélsejt marker von Willebrand-faktort, ezáltal kirajzolva az ereket, míg a kék szín a sejtmagokat jelöli. A NOX5 szignál elsősorban a herecsatornák falából, annak is inkább a bazálisabb régióiból, a fejlődő spermium előalakokból érkezik, kisebb részben pedig az interstícium sejtjeiből. (Reprezentatív ábra 2 független kísérletből.)

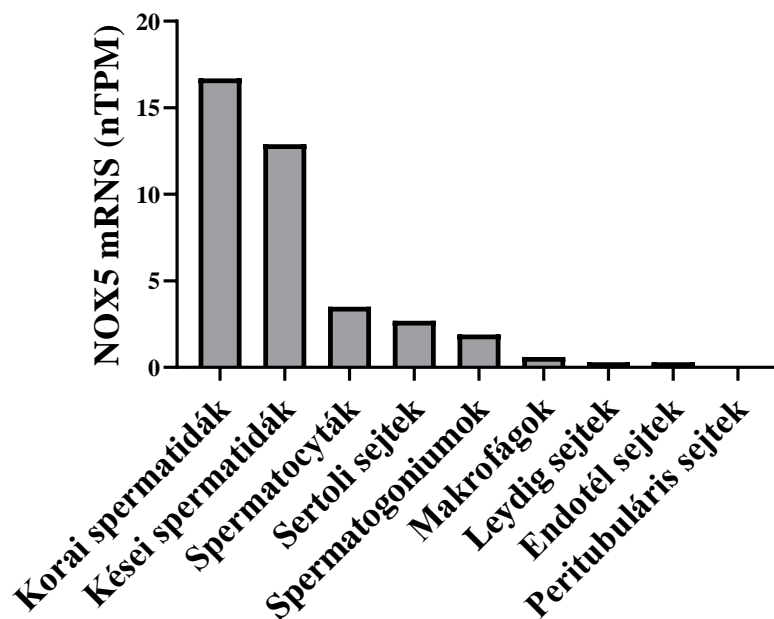
Az eredmények alaposabb értékelhetőségének céljából a 26. ábrán nagyobb nagyításban mutatom be a NOX5 festődést egy herecsatorna keresztmetszetén. A zöld NOX5 szignálok a sejtmagokhoz asszociáltak, a spermatogenezisben részt vevő különböző fejlődési alakoknál jelennek meg a herecsatornában. A lamina basalis-tól elindulva a herecsatorna lumene felé NOX5 pozitivitást mutatnak a spermatogoniumok, spermatocyták és spermatidák. Ezzel szemben a lumenben, a már kondenzált sejtmaggal rendelkező érett spermiumokban nem detektáltunk NOX5 jelet. Megfigyelhető, hogy a spermatogenezisben részt vevő sejteknek csak egy része fejez ki NOX5 fehérjét, nem a teljes populáció.



26. ábra: NOX5 immunfestés humán heremetszeten. Kék színnel vannak jelölve a sejtmagok (A), zöld színnel a NOX5 (B), míg az egyesített képen a két csatornából érkező jelek együtt láthatóak (C). A NOX5 jelölődés a spermatogenezisben részt vevő különböző fejlődési alakokhoz társul, míg az érett spermiumokban nem látjuk. A felvételek 630-szoros nagyításban készültek (154).

Az antitest jellemzése során megvizsgáltam a humán hereszöveten, hogy az antigén feltárás során a 6-os pH értékű, 10 mM-os nátrium-citrát vagy a 8-as pH értékű, 1 mM-os EDTA oldat használata vezet értékelhetőbb eredményhez. Az EDTA-s feltárás esetében erősen és aspecifikusan, zöldre festődött a herecsatornák kollagéntokja, míg a citrát esetében az RNS adatok alapján prediktált eloszlását láttuk a NOX5 jelnek. Így a későbbiekben csak a citrát oldatos feltárást alkalmaztam.

Megnéztem a HPA adatbázisban a NOX5-re vonatkozó egysejtes RNS-szekvenálási adatokat, és a herére vonatkozó értékeket a 27. ábrán tüntetem fel (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000255346-NOX5/single+cell+type>). RNS szinten kimagasló mennyiségben jelenik meg a NOX5 a korai és kései spermatidákban. Az RNS adatok jól korrelálnak az immunfestési eredményeinkkel, így RNS- és fehérjeszinten is megerősítettnek tekinthető a NOX5 jelenléte a spermatogenezisben részt vevő sejtekben. Kisebb mennyiségben, de ugyancsak számottevő lehet a NOX5 kifejeződése a spermatocytákban, Sertoli sejtekben és a spermatogoniumokban.

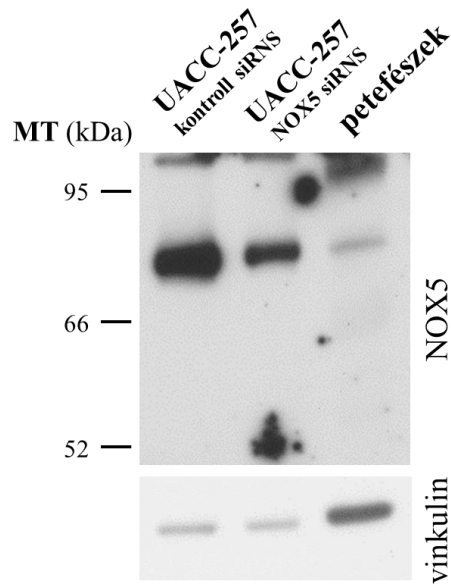


27. ábra: NOX5 mRNA eloszlása a herében különböző sejtípusok között egysejtes RNS-szekvenálás nyomán a HPA adatbázis szerint. RNS szinten az oxidáz legnagyobb mennyiségben a korai- és kései spermaticidákban jelenik meg.

4.4.3 NOX5 fehérje kimutatása a petefészekben

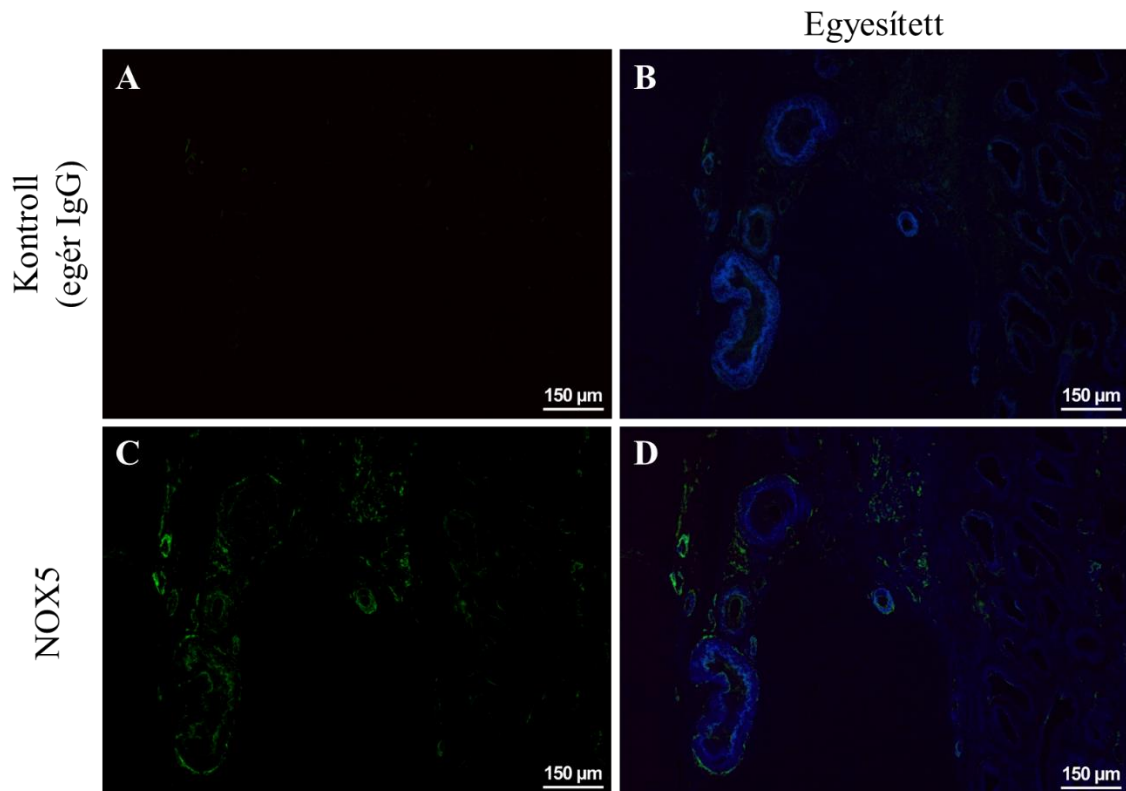
A Krause vezette svájci kutatócsoport eredményeit tanulmányozva, akik 2001-ben az elsők között írták le a NOX5-öt, arra lettünk figyelmesek, hogy a Northern blot eredményükben nem csak a kiemelt lép és here mintákban detektálták a NOX5 RNS-ét, hanem a prosztatában és a petefészekben is. Ugyanakkor, a közleményükben nem tárgyalták ezeket az eredményeket (92). Bő 20 évvel az eredeti felfedezés után arra lettünk figyelmesek a HPA RNS adatait tanulmányozva, hogy NOX5 mRNA expressziót írtak le a petefészekben. Hogy megvizsgáljuk a NOX5 jelenlétét a petefészekben, beszereztünk normál petefészek mintákat a NOX5 fehérje kimutatására.

Elsőként petefészek lizátumban igyekeztük kimutatni a fehérjét Western blot-tal. A kísérlethez kontrollként, hasonlóan a 24. ábrán bemutatott eredményekhez, UACC-257 sejtek lizátumát használtam. A kontroll és a NOX5 siRNA-sel transzfektált UACC-257 sejt-lizátumokban detektált NOX5-tel azonos magasságban megjelenő szignált fogadtuk el NOX5 jelnek a petefészek esetében is. Egy gyenge, de egyértelmű jelölődést tapasztaltunk a várt molekulaszúlynál az ováriumban (28. ábra).



28. ábra: NOX5 fehérje kimutatása normál, humán petefészeklizátumban. A NOX5 specifikus jel megállapításához kontroll és NOX5 siRNS-sel kezelt UACC-257 sejtek lizátumát használtuk (154). (Reprezentatív ábra 3 független kísérletből.)

Következő kísérletben immunhisztokémiás eljárásban szerettük volna kimutatni a NOX5 fehérjét normál petefészek szövetmetszeten. Kontrollként ezúttal is egér IgG első antitestet alkalmaztunk. Az új NOX5 mAb-tel a petefészek interstíciumában detektáltunk intenzívebb jelet, míg az egér IgG nem mutatott specifikus szignált (29. ábra).



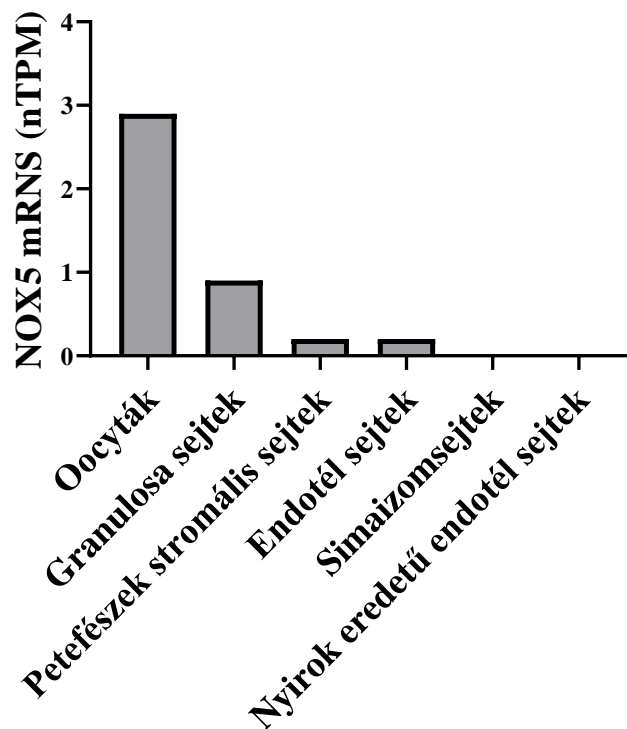
29. ábra: A NOX5 immunfestése humán petefészek metszetben. Kontroll jelölés egér IgG-vel a zöld csatornán detektálva (A), és kiegészítve a kékkel megjelenített sejtmagfestéssel (B). Jelölés az új NOX5 mAb-tel (zöld) (C), továbbá kék színnel jelölve a sejtmagok mellette (D).

A HPA egysejtes RNS-szekvenálási adatait kigyűjtve megnéztem, mely sejtípusokban találták meg a NOX5 mRNS-ét a petefészekben (30. ábra). Legnagyobb mennyiségben az oocytákban és a granulosa sejtekben detektálták, kisebb hányadban a stromális sejtekben és az endotélsejtekben

(<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000255346-NOX5/single+cell+type>).

A stromális sejteket alaposabban elemezve megállapítható, hogy ebben a populációban gyakorlatilag a theca sejtek és a fibroblasztok expresszálják a NOX5-öt

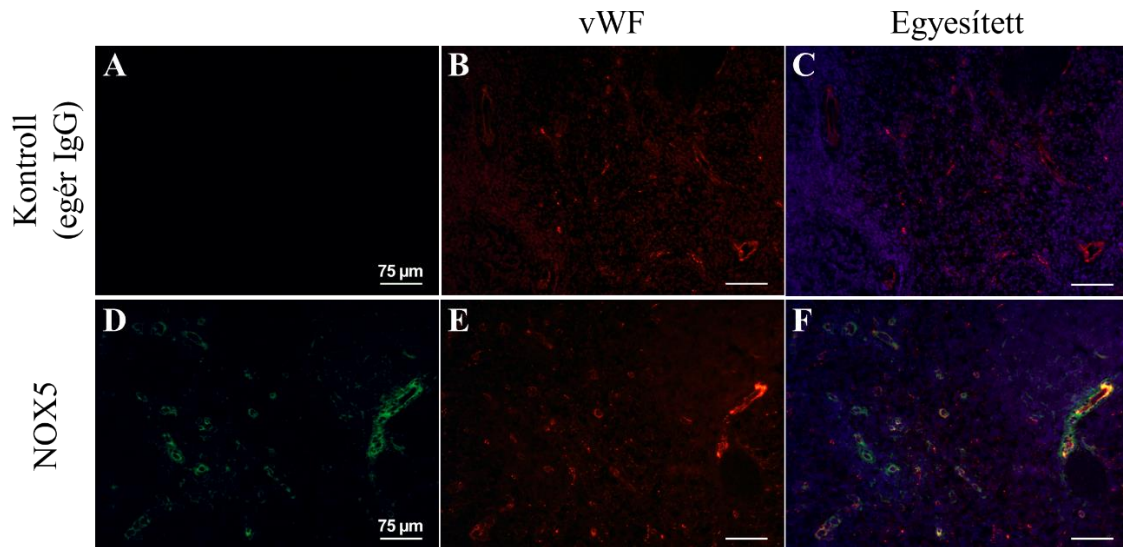
(<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000255346-NOX5/single+cell+type/ovary>).



30. ábra: NOX5 mRNS mennyisége különböző ovariális sejtípusokban a HPA adatbázisa alapján. Legnagyobb mennyiségben az oocytákban és a granulosa sejtekben találtak NOX5 mRNS-t.

4.4.4 NOX5 fehérje kimutatása lép metszeten immunfestéssel

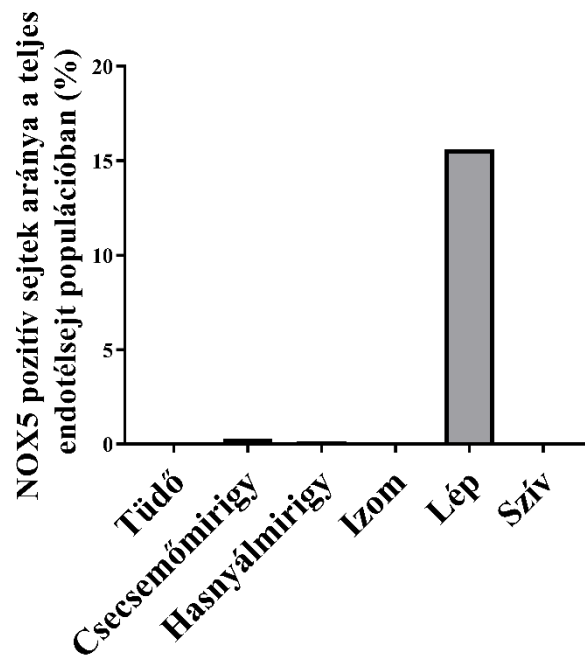
Kíváncsiak voltunk arra is, mit ismer fel az antitestünk a humán lép metszeten immunfestésben (31. ábra). Kontrollként továbbra is egér IgG-t használtam, mint első antitest (31. ábra A és C). Az érhálózat megjelenítésére ezúttal is az endotélsejtmarker vWF ellenes antitestet alkalmaztam (31. ábra B és E). Meglepetésünkre a zöld NOX5 szignál gyűrűszerű rajzolatokat mutatott a szövetben (31. ábra D és F), amely átfedést adott a vWF piros jelével. Az eredményeinkből arra a következtetésre jutottunk, hogy a humán lépben a NOX5-öt az endotélsejtek expresszálják. Ugyanakkor megjegyzendő, hogy nem az összes piros jelzésű érgyűrű mutat NOX5 pozitivitást is egyben. Az egér IgG használata nem eredményezett specifikus jelölést.



31. ábra: Humán lép immunfestése az új, monoklonális NOX5 ellenes antitesttel. Kontrollként egér IgG antitestet alkalmaztam, amely nem ad specifikus jelölést (A-C). A NOX5 mAb festődés (D-F) részleges átfedést mutat az endotélsejt marker vWF jelöléssel, amiből arra következtethetünk, hogy a humán lépben a NOX5 forrása egyes erek endotélje (154). (Reprezentatív ábra 2 független kísérletből.)

Felfedezésünket meg szeretnénk erősíteni RNS szintű adatokkal is. Azonban sajnos ehhez nem tudtuk a HPA adatait használni, mivel ott gyakorlatilag csak az immunsejtek adatait tartalmazza a lép adatbázis, és a feltöltött egysejtes RNS-szekvenálási eredmények között nem szerepelnek az endotélsejtek. Az viszont egyértelműen kiolvasható a meglévő eredményekből, hogy nem a lép immunsejtjei, a B- és T-limfociták, makrofágok vagy a plazmasejtek, tartalmazzák a NOX5 mRNS-t (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000255346-NOX5/single+cell+type/spleen>).

A továbbiakban ezért a Tabula Sapiens, számos szervet vizsgáló, egy sejt transzkriptomikai adatbázishoz fordultunk (151). Megvizsgáltuk néhány szerv esetében, hogy az endotélsejtek hány százaléka fejezi ki a NOX5 RNS-ét. A vizsgált szervek közül a lép endotélsejtjei emelkedtek ki, mint amelyek a legnagyobb mennyiségben hordozzák ezen NADPH-oxidáz mRNS-ét (32. ábra). Így további bizonyítékokat is találtunk, ami alátámasztja a NOX5 szignál döntően endoteliális eredetét a humán lépben.



32. ábra: A NOX5 pozitív endotélsejtek aránya a teljes endotélsejt populációban néhány szerv esetében a *Tabula Sapiens* tanulmány alapján. A lép endotélsejtjei között a legmagasabb a NOX5 pozitívak aránya. Az izom adatokba beletartoznak a harántcsíkolt és simaizmokból származó eredmények is (154).

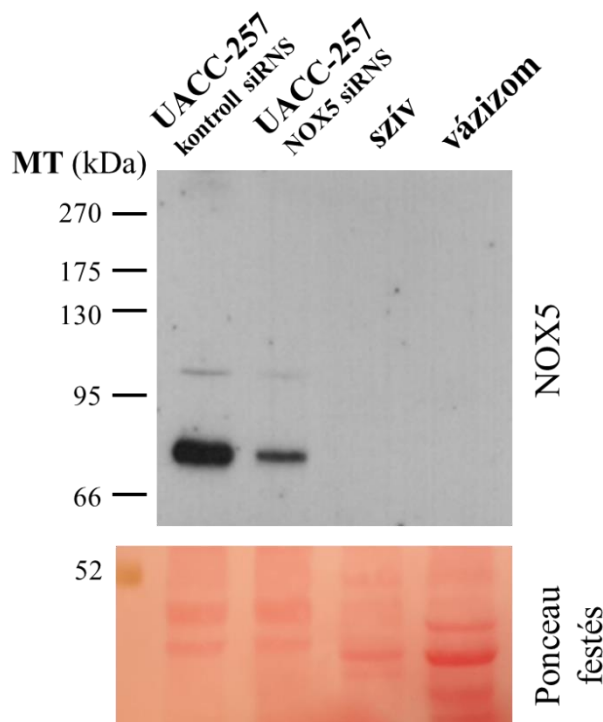
4.4.5 Kontroll kísérletek a NOX5 kimutatáshoz humán szövetekben

A kifejlesztett antitestet néhány olyan humán szöveten is teszteltem, amelyek nem expresszálják a NOX5 fehérjét. A megfelelő minták kiválasztásához, amelyek nem tartalmazzák a NOX5 mRNS-ét, a HPA adatbázist tanulmányoztam (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000255346-NOX5/tissue>). A célom az volt, hogy ellenőrizzem, antitestünk nem ismer-e fel másik fehérjét a kísérletekben. Humán szívizom és vázizom lízátumok álltak a rendelkezésünkre a lehetőségek közül a Western blot-hoz, és vázizom szövetmetszet az immunhisztokémiához.

A Western blot során pozitív kontrollként UACC-257 sejtlizátumokat alkalmaztam. Az izom mintákban semmilyen jelölődés sem tapasztalható a NOX5 mAb-tel (33. ábra). Ezen megfigyelést teljesen megerősíti a HPA adatbázisból elérhető RNS adatok is, ahol a szívben nem, a vázizomszövetben pedig minimális mennyiségben detektálták a NOX5 RNS-ét

(<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000255346-NOX5/single+cell+type/heart+muscle>;
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000255346-NOX5/single+cell+type/skeletal+muscle>).

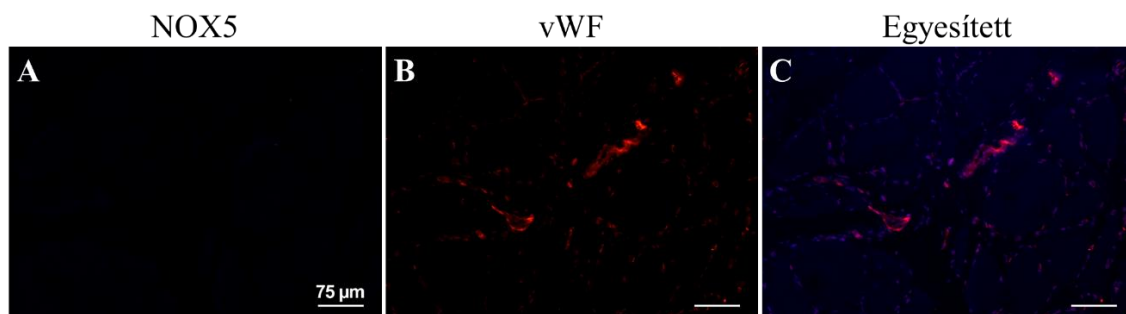
A fehérjemennyiségek ellenőrzése céljából ezúttal a Ponceau festék által festett membránképet helyeztem az ábrába, ugyanis az anti- β -aktin nem ismeri fel az izomszövetekben megtalálható aktin izoformát.



33. ábra: NOX5 mRNS-t nem expresszáló humán szív és vázizom Western blot vizsgálata az új NOX5 antitesttel. Az általunk kifejlesztett NOX5 ellenes antitest semmit sem detektál a vizsgált izomszövetekben az alkalmazott kísérleti körülmények között. A vizsgált fehérjeminták mennyiségi és minőségi viszonyait a Ponceau festés mutatja. (Reprezentatív ábra 3 független kísérletből.)

Az immunhisztokémiai kísérlet során humán vázizomszövetet festettem meg az új NOX5 ellenes antitesttel a lépszövet esetében is alkalmazott 7,5 $\mu\text{g/ml}$ -s antitestkoncentrációval. Az érhálózat kirajzolásához ez esetben is a vWF antitestet használtam. Elsősorban arra voltunk kíváncsiak, hogy immunfestésben nem festi-e aspecifikusan a NOX5 antitest az ereket. Amint a kísérlet eredményéből látszik, a mAb

nem ismert fel semmilyen antigént a vázizomszövet metszetén az adott körülmények között (34. ábra).

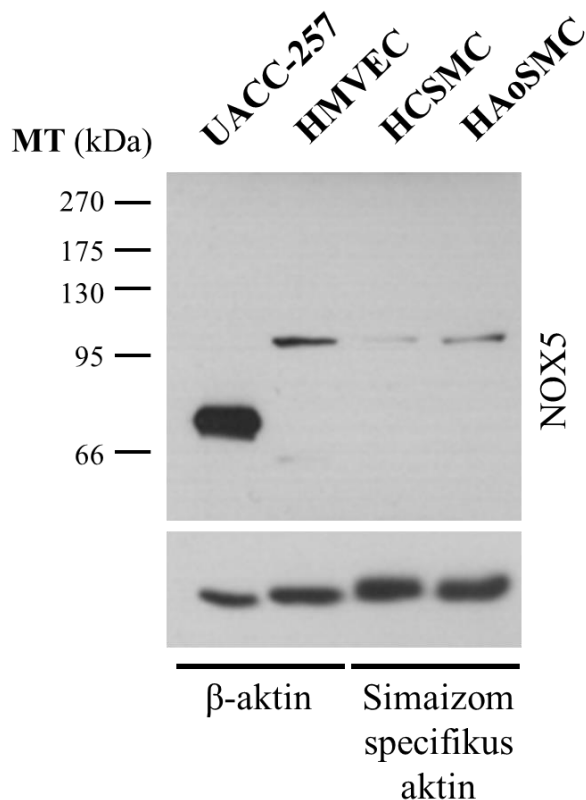


34. ábra: Immunfestés az új NOX5 ellenes antitesttel humán vázizom szövetmetszeten. A NOX5 antitest csak háttér jelölődést ad (A, zöld). Az endotélsejtek jelölése vWF antitesttel (B, piros). Az egyesített kép a NOX5 és vWF festésből, kiegészítve a kék sejtmagfestéssel (C) (154).

4.5 NOX5 kimutatása humán primer sejtekben

A NOX5 szakirodalmában több olyan közlemény is napvilágot látott már, ahol humán endotél- illetve simaizomsejtekben vizsgálták az oxidáz jelenlétét és szerepét. Ezen tanulmányokban a NOX5-öt PCR-ral, illetve antitestekkel detektálták (118, 158). Kíváncsiak voltunk ezért, vajon ki tudjuk-e mutatni a NOX5 fehérjét az új antitestünkkel ilyen sejtekben. Humán koronária simaizom sejtek (HCSMC), humán aorta simaizom sejtek (HAoSMC) és humán szív eredetű mikrovaszkuláris endotélsejtek (HMVEC) álltak a rendelkezésemre a kísérletekhez.

Először Western blot kísérletben vizsgáltam a fehérje jelenlétét a különböző sejtlizátumokban. Pozitív kontrollként UACC-257 mintát használtam. A simaizomsejtek identitásának az igazolásához simaizomra specifikus aktin antitestet alkalmaztam. A Western blot során az endotélsejt minta esetében kettő, a simaizomsejt minták esetében egy aspecifikus csíkot detektált a reagensünk. Ellenben semmilyen fehérjét nem ismert fel az antitest a vaszkuláris eredetű sejtekben az alkalmazott kísérleti körülmények között, ami a kontroll NOX5 jelölődés magasságában lett volna (35. ábra).

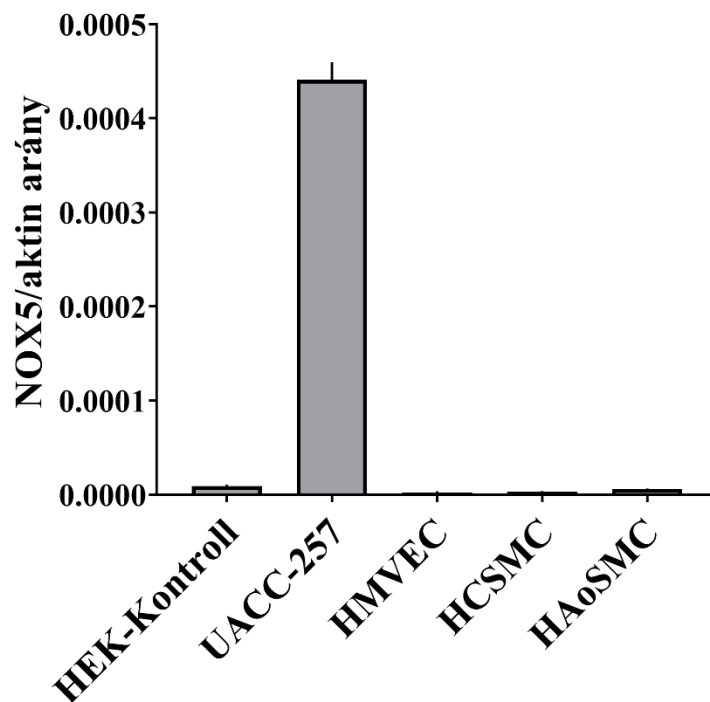


35. ábra: NOX5 vizsgálata humán primer vaszkuláris sejtekben az új monoklonális antitesttel. Humán szív eredetű mikrovaszkuláris endotélsejtekben (HMVEC), humán koronária simaizom sejtekben (HCSMC) és humán aorta simaizom sejtekben (HAoSMC) nem tudtuk kimutatni a NOX5 fehérjét az új antitesttel az alkalmazott kísérleti körülmények között. A simaizomsejtek identitásának ellenőrzésére simaizom specifikus aktin antitestet használtam, pozitív kontrollként pedig UACC-257 sejtek lizátumát (154). (Reprezentatív ábra 2 független kísérletből.)

A NOX5 fehérje jelenlétét nem tudtuk megerősíteni a vaszkuláris primer sejtekben, ezért következő lépésként RNS szinten vizsgáltuk meg a kérdést. A sejtekből RNS-t preparáltam, cDNS-t készítettem és qPCR technikával vizsgáltam a NOX5 mRNS mennyiségét a mintákban. Háztartási génnek az aktint választottuk és a NOX5/aktin arányt elemeztük.

RNS szinten is az UACC-257 sejtek tartalmazzák a legtöbbet a NOX5-ből. A HEK-Kontroll sejtek negatív kontrollként szerepeltették, míg az UACC-257 sejtek a biztos pozitívként. A három primer sejtvonalban detektálható NOX5 mRNS mennyisége azonos nagyságrendben mozog, mint amit a HEK-Kontroll sejtek esetében látunk (36. ábra). Következésképpen nem lehet meglepő, hogy fehérje szinten nem tudtuk kimutatni az

enzimet a primer sejtekből. Az UACC-257 sejtek kiugró értéke is figyelemre méltó, hiszen az immunfestési eredmények alapján tudjuk, hogy a NOX5 fehérje jelenléte meglehetősen sporadikus a sejt kultúrában. Továbbá megjegyzendő, hogy az általunk használt NOX5 Taqman próba oligonukleotid az összes ismert NOX5 izoformát felismeri, ezért kizárható, hogy esetleg valamelyik izoformát ne venné számításba a vizsgálat.



36. ábra: NOX5 mRNS kimutatása qPCR-ral különböző sejt vonalakban. A HEK-Kontroll sejtek negatív, míg az UACC-257 sejtek pozitív kontrollként szolgáltak a kísérletben. A vizsgált primer sejt vonalakban (humán szív eredetű mikrovaskuláris endotélsejtek = HMVEC, humán koronária simaizom sejtek = HCSMC, humán aorta simaizom sejtek = HAoSMC) a NOX5 mRNS mennyisége a negatív kontroll nagyságrendjében mozog, $n = 2-3$ (154).

Ha megvizsgáljuk a HPA adatbázis vaszkuláris sejtekre vonatkozó gyűjteményét, azt láthatjuk, hogy számos sejtípust számba véve, egy-kettőben detektálták csak elszórtan a NOX5 RNS-ét. Az egysejtes RNS-szekvenálási eredményekből is azt lehet kiolvasni, hogy a vaszkuláris sejt típusokban mennyiségileg nem meghatározó a NOX5 (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000255346-NOX5/single+cell+type/Vascular>). A HPA adatbázis eredményei tehát megerősítik a mi kísérletes megfigyeléseinket.

4.6 NOX5 hiányos nyúl „off-target” analízise NADPH-oxidázokra

PhD kutatómunkám során bekapcsolódtam a NOX5 hiányos nyulakkal végzett kísérletekbe is. A 2021-ben megjelent „Disruption of the NOX5 Gene Aggravates Atherosclerosis in Rabbits” című tanulmányban bírálói kérésre én végeztem el a nyúl NOX1, NOX2 és NOX4 gének „off-target” analízisét, azaz megvizsgáltam, hogy a CRISPR/Cas9 technikával létrehozott NOX5 hiányos nyúlban nem sérültek-e a NOX1, NOX2 és NOX4 gének (132).

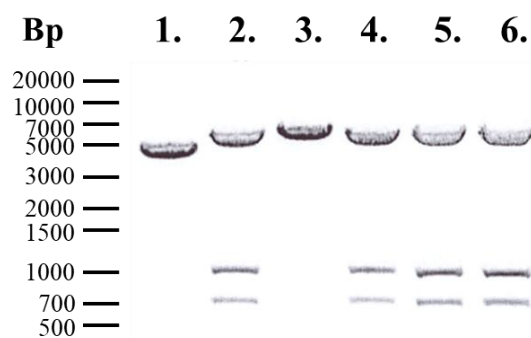
A munkához NOX5 hiányos nyulából izolált RNS mintákat kaptam a gödöllői együttműködő partnereinktől. A humán analógia alapján azokból a szövetekből preparáltak RNS-t, amelyekben az egyes NADPH-oxidázok a legnagyobb mennyiségben előfordulnak. Így a NOX1-hez a vastagbélből, a NOX2-höz a lépből, illetve a NOX4-hez a veséből készültek a minták.

Az RNS-ekből cDNS-t készítettem. Ezután PCR reakcióban Dream Taq polimeráz és a megfelelő primerek felhasználásával kiterjesztettem az egyes NOX izoformákat a cDNS-ből. 1 %-os agarózgélben elválasztottam a PCR termékeket, mind a NOX1-et, NOX2-t és NOX4-et kódoló DNS 2000 bázispár magasságában volt detektálható. A termékeket kivágtam a gélből, majd kipuoltam. A megtisztított DNS inzertet TA klónozással pcDNA3.1/V5-His-TOPO vektorba illesztettem. A reakcióterméket TOP10 *E. coli* törzsbe transzformáltam, végül a baktériumokat ampicillint tartalmazó agarózlemezre szélesztettem. A táptalajon csak azok a baktériumok éltek túl és hoztak létre telepeket, amelyek felvették a plazmidot és ezáltal ampicillin rezisztenciához jutottak. Másnap a kinőtt telepekből plazmidpreparálás céljából baktériumkultúrákat indítottam LB médiumban ampicillin jelenlétében. Az éjszakai növesztést követően a megklónozott plazmidot kinyertem a baktériumokból.

A klónozási munkákat követően restrikciós endonukleázokkal emésztettem a plazmidokat, hogy megállapítsam, sikeresen ki tudtam-e nyerni a NOX-okat a szövetekből. A megfelelő endonukleázok kiválasztásához megvizsgáltam a pcDNA3.1 vektor és a nyúl NOX izoformák nukleotidszekvenciáit a GenBank adatbázis nyomán (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Ezáltal az emésztési kép alapján meg tudtam határozni, hogy a kiperparált plazmid DNS hordozza-e a kívánt inzerteket, azaz a nyúl NOX1, NOX2 és NOX4 szekvenciákat. A NOX1-et hordozó plazmidokat BstXI-gyel, a NOX2-t EcoRI-gyel, a NOX4-et pedig HindIII enzimekkel kezeltem. Egy-egy ígéretes

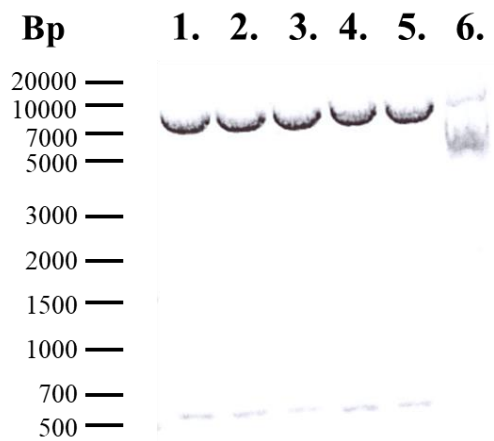
plazmidot szekvenálásra is elküldtem, hogy megbizonyosodjunk a pontos nukleotid sorrendről.

A BstXI-gyel vágott plazmidok esetében (NOX1 vizsgálata), ha megfelelő a DNS konstrukció, az enzim a vektort 2 helyen, az inzertet 4 helyen hasítja. Ennek megfelelően a várt nagyobb fragmentek körülbelül 5500, 950 és 650 bázispár (bp) magasságában jelennek meg. Három kisebb fragment 200 bp alatti méretű, ezek nem voltak láthatóak a gélképen (37. ábra). Az emésztés alapján 2., 4., 5. és 6. plazmidok megfelelőek lehetnek, ebből a 2. számút küldtem tovább szekvenálásra.



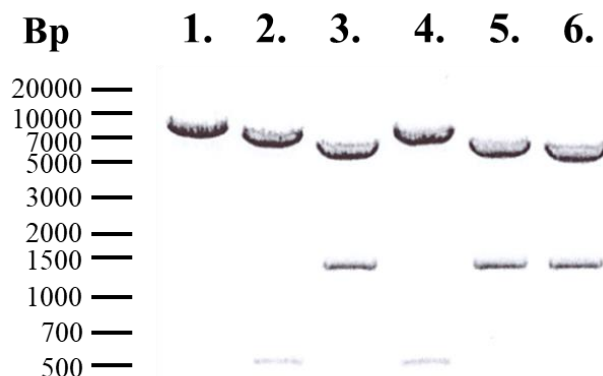
37. ábra: Nyúl NOX1 cDNS klónozási eredményének analízise BstXI restrikciós endonukleázzal. Az gélkép alapján a 2., 4., 5. és 6. plazmidok pozitívak, azaz a pcDNA3.1 vektorba beépült a nyúl NOX1 cDNS-e.

Az EcoRI-gyel emésztett plazmidok esetében (NOX2 vizsgálata) az enzim 2 helyen hasít az inzertben, azonban nem vágja a vektort. Ennek következtében egy 500 bp és egy több mint 7000 bp körüli fragment jelenik meg a gélen (38. ábra). A vizsgált plazmidok közül a 6-at leszámítva a többi öt megfelelőnek bizonyult, ezek közül az 1. küldtem el szekvenálásra.



38. ábra: Nyúl NOX2 cDNS klónozási eredményének analízise EcoRI restrikciós endonukleázzal. Az gékép alapján az 1., 2., 3., 4. és 5. plazmidok pozitívak, azaz a pcDNA3.1 vektorba beépült a nyúl NOX2 cDNS-e.

A HindIII-mal kezelt plazmidok esetében (NOX4 vizsgálata) az enzim egy helyen hasít a vektorban és egy helyen az inzertben. A TA klónozás eredményeként az inzert kétféle orientációban is csatlakozhat a vektorhoz, ennek megfelelően a HindIII-as emésztés eredményeként kétféle fragmentációs kép is kialakulhat (39. ábra). Ha az inzert az egyik orientációban ül be, akkor az emésztés következtében 2 fragmentet látunk 500 és 7000 bp környékén. Ha a másik orientációban kapcsolódik az inzert a vektorhoz, akkor 1500 és 6000 bp magasságában futnak a DNS darabok. A 2. és 4. minta mutatja az első esetet, míg a 3., 5. és 6. minta a második esetet. Az 1. minta sikertelen klónozás volt. A 2. plazmidot küldtem el szekvenálásra a 6 minta közül.



39. ábra: Nyúl NOX4 cDNS klónozási eredményének analízise HindIII restrikciós endonukleázzal. Az gékép alapján a 2., 3., 4., 5. és 6. plazmidok pozitívak, azaz a pcDNA3.1 vektorba beépült a nyúl NOX4 cDNS-e.

A visszaérkező szekvenálási eredményeket kiértékeltem, az összeillesztett szekvenciákra rákerestem a Standard Nucleotide BLAST felületen (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch). A NOX1 és NOX2 esetében 99,94 %-os szekvencia azonosságot talált a program, míg a NOX4 esetében 99,89 %-osat. A következő NCBI referencia szekvenciákkal vettem össze a szekvenálási eredményeket: NOX1: XM_002720381.4, NOX2: XM_051826875.1, NOX4: XM_002708641.4. Így tehát a nukleinsavak szintjén sikerült igazolni a NOX izoformák sértetlenségét. A szekvenálás során kapott nukleotidsorrend eredményeket, jelölve a fehérjekódoló szakaszokkal, a Függelékben helyeztem el.

A NOX izoformákat kódoló nukleinsav szekvenciákat az ExPASy weboldalon (<https://web.expasy.org/translate/>) lefordítottam fehérje szekvenciákká, majd a protein szekvenciákra szintén rákerestem, ezúttal a Standard Protein BLAST felületen (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>).

Mindhárom fehérjeszekvencia esetében megtalálta a Protein BLAST adatbázis a megfelelő nyúl fehérjéket. A NOX1-et 100 %-os azonossággal ismerte fel (referencia szekvencia: XP_002720427.1), a NOX2-t 99,82%-os azonossággal (referencia szekvencia: NP_001075569.1) a NOX4-et pedig 99,65 %-os egyezéssel (referencia szekvencia: XP_002708687.1). Ezen eredmények alapján, több szinten is ellenőrizve a különböző NOX izoformákat, kijelenthető, hogy a CRISPR/Cas9 technikával létrehozott NOX5 hiányos nyulakban nem sérültek a NOX1, NOX2 és NOX4 szekvenciái.

5. Megbeszélés

A NOX5-öt már több mint 20 éve felfedezték, azonban az élettani funkcióját mind a mai napig nem ismerjük. Ehhez nagyban hozzájárult, hogy a kutatásban széleskörben használt egér és patkány állatmodellek genomjában nem található meg az enzimet kódoló gén. További probléma, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható, és így széles kör számára elérhető, NOX5 ellenes antitestek NOX5 specifikusa a legtöbb esetben kétséges. A megbízhatatlan reagensek széles palettája miatt határoztunk úgy, hogy megkísérlünk kifejleszteni egy új, jól karakterizált, specifikus és kellően érzékeny monoklonális antitestet a humán NOX5 fehérje detektálására. Együttműködő partnernek az egér eredetű monoklonális antitestfejlesztésben már több éves tapasztalattal rendelkező Immunogenes Kft-t kértük fel. A hosszú tesztelési folyamatban végül a legeredményesebb klónnak, illetve antitestnek, az 1E10-es jelölésű bizonyult. Bemutatott kísérleteimet ennek az antitestnek a felhasználásával végeztem. A mAb jellemzése során fontos volt számunkra, hogy lépésről lépésre meghatározzuk az új antitestünk lehetséges alkalmazási területeit. Ezért először heterológ expressziós rendszerben, majd a fehérjét endogén módon kifejező UACC-257 sejtvonalban tanulmányoztuk a NOX5 detektálhatóságát és szubcelluláris eloszlását az antitestünkkel. Végezetül normál, humán szövetekben vizsgáltuk a NOX5 jelenlétét és a szöveten belüli elhelyezkedését. Fehérjealapú eredményeink alátámasztására pedig egysejtes RNS-szekvenálási adatbázisokból nyert információkat is felhasználtunk.

A heterológ expressziós rendszerben a HEK293T sejtek által túltermeltetett NOX5 fehérje tulajdonságait vizsgáltuk. Antitestünkkel kimutattuk a fehérjét Western blot-ban és immunfestésben is. Immuncitokémiai kísérleteinkkel mi is azt a több kutatócsoport által tett megállapítást erősítettük meg, hogy a túltermeltetett fehérje elsősorban a sejtmembránban és az ER-ban oszlik el (111, 116). A létrehozott HEK-Kontroll és HEK-NOX5 sejtvonalakon funkcionális méréseket is végeztünk. ATP hozzáadásával receptor mediált úton, thapsigargin révén pedig a SERCA pumpa gátlásával váltottuk ki az intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedését. Az extracelluláris szuperoxid detektálásával kimutattuk, hogy a HEK-NOX5 sejtekben a megemelkedett citoplazmatikus Ca^{2+} szint hatására megindul a szuperoxidtermelés. A szuperoxid anion termelődését NADPH-oxidáz inhibitor DPI jelenlétében gátolni tudtuk. Mivel a NOX5-öt a $[Ca^{2+}]_{ic}$ emelkedése aktiválja, megnéztük, hogy a képződött szuperoxidnak esetleg van-e bármilyen ráhatása

a megemelkedett Ca^{2+} -szintre. Méréseink során arra a megállapításra jutottunk, hogy a DPI-nak, és így a szuperoxid hiányának, nincs hatása a Ca^{2+} -jel lefutására a HEK-NOX5 sejtekben. Ebben a modellrendszerben tehát nem tapasztaltuk, hogy a NOX5 által termelt szuperoxid befolyásolta volna az intracelluláris Ca^{2+} -jel dinamikáját. Mindazonáltal, a jövőben endogén NOX5 expressziót mutató sejtekben érdemes lehet majd újra megvizsgálni a NOX5 által termelt ROS Ca^{2+} -jelre kifejtett esetleges hatását. Az irodalomban ugyanis számos, olyan Ca^{2+} homeosztázist befolyásoló kalciumcsatornát és kalciumpumpát leírtak, amelyek működését a ROS-ok képesek befolyásolni (159). A NOX5 funkciójának a szempontjából fontos lehet, ha sikerül azonosítani egy ilyen kalciumcsatornát vagy kalciumpumpát. Mindezek mellett megjegyzendő, hogy a HEK-NOX5 sejtek ROS termelése meglehetősen érzékenyen leköveti a citoplazmatikus Ca^{2+} változását. Az átlagos 100 nM körüli $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ már képes egy bazális szuperoxidtermelést előidézni. Azt, hogy a stimulusok hatására bekövetkező ROS termelésnek az intracelluláris kalciumszint emelkedése az oka, tovább bizonyítottuk az extracelluláris Ca^{2+} -ok elvonásával, amit EGTA alkalmazásával értünk el. Az extracelluláris térbe adott EGTA jelenlétében, mivel csökkent a sejtekben a kívülről érkező Ca^{2+} utánpótlás, jóval kisebb kalcium jelet és szuperoxidtermelést tudtunk csak kiváltani.

Az endogén NOX5 fehérje tanulmányozása már jóval nagyobb kihívással jár. A HPA adatai alapján csupán néhány humán eredetű tumor sejtvonalban található meg a NOX5 RNS-e nagyobb mennyiségben. Az 5. táblázatban összegyűjtöttem azt a 10 sejtvonalat, amelyekben a legnagyobb mennyiségben detektálták a NOX5 mRNS-t (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000255346-NOX5/cell+line>). Ezen sejtvonalak megfelelőek lehetnek arra, hogy kimutassuk bennük a NOX5 fehérjét, vizsgáljuk az enzim aktivitását és tulajdonságait, illetve felhasználjuk őket tesztrendszerként, például antitest fejlesztéséhez. Azonban ezek a sejtek, daganatos eredetük miatt, aligha lehetnek alkalmasak arra a célra, hogy megértsük a NOX5 élettani szerepét, noha az általuk nyert információk esetleg közelebb vihetnek a kérdés megválaszolásához.

5. táblázat: A 10 legtöbb NOX5 mRNS-t tartalmazó sejtvonal a HPA adatbázis alapján.

Rák típusa	Sejtvonal	nTPM
Bőrrák	K029AX	55,8
Hasnyálmirigyrák	PSN1	34,1
Tüdőrák	HCC461	20,8
Mellrák	SUM149PT	16,5
Tüdőrák	NCI-H1373	11,2
Hasnyálmirigyrák	Panc 02.03	8,8
Májrák	HuH-6	7,7
Limfóma	L-1236	4,7
Bőrrák	UACC-257	4,4
Limfóma	Ki-JK	3,3

Az antitestünk karakterizálására endogén NOX5 fehérje forrásaként UACC-257 melanóma sejtek álltak a rendelkezésünkre. A legtöbb technikai jellegű kísérletet ezzel a sejtvonallal végeztük. Western blot és immuncitokémiai kísérletekben NOX5 siRNS felhasználásával ki tudtuk mutatni, hogy az antitest specifikus NOX5 jelet ismer fel. Az immunfestési eredmények alapján arra a megállapításra jutottunk, hogy az endogén NOX5 fehérje is döntően az ER-ban és a sejtmagmembránban oszlik el. Ezzel igazoltuk a Doroshov munkacsoport korábbi megfigyelését a NOX5 intracelluláris lokalizációjáról ezen melanóma sejtekben (115). További egyezés az említett munkacsoport eredményeivel, hogy Western blot-ban mi is körülbelül 75 kDa magasságában látjuk az oxidázt (115). Megfigyeltük továbbá, hogy a Western blot minták hőkezelése rontja a NOX5 detektálhatóságát, ami alacsony NOX5 tartalmú fehérjeminták előkészítése esetében egy fontos tényező. Az új monoklonális antitesttel kevesebb, mint 1000 darab melanóma sejtben detektáltuk a NOX5-öt 1 µg/ml-es antitestkoncentrációval egész éjszakás inkubálást követően. Figyelembe véve az immunfestési eredményeinket, belátható, hogy a NOX5 jel háttérében álló valós sejtszám ennél jóval kisebb, hiszen a NOX5 igen sporadikusan fordul elő a sejtekben az alkalmazott kísérleti körülmények között. A Doroshov kutatócsoport arra a következtetésre jutott, hogy a melanóma vonalban a NOX5 a sejtek proliferációját befolyásolja. A túltermeltetett NOX5 fokozta, míg a lecsendesített NOX5 lassította a sejtek növekedését (142). Mi érdeemben nem vizsgáltuk ezt a kérdést, de lehetséges, hogy az immunfestésben NOX5 pozitivitást mutató sejtek proliferálnak, így az enzim emelkedett expressziója az osztódás egy

markereként vehető figyelembe UACC-257 sejtekben. Mivel az immunizálás a humán NOX5 EF-hand régiójával történt, és ezzel a szekvencia motívummal más NADPH-oxidázok is rendelkeznek, nevezetesen a DUOX1 és DUOX2, ezért ellenőriztük, hogy antitestünk felismeri-e a DUOX1 fehérjét. Western blot kísérletekben meggyőződünk arról, hogy az új mAb nem ismeri fel a DUOX1-et. Immunfestési kísérletekben bizonyította továbbá a mAb, hogy paraformaldehides, metanolos és acetonos fixálás után is képes felismerni a NOX5-t, ami szélesíti a reagens felhasználási lehetőségeit.

A Doroshov-csoporthoz hasonlóan mi is kimutattuk, hogy az UACC-257 sejtek aktív NOX5 enzimmel rendelkeznek (142). Tőlük eltérően azonban nem a mesterséges kalcium ionofor ionomycin alkalmazásával váltottuk ki a sejtek szuperoxidtermelését. Elsőként így nekünk sikerült endogén kalcium transzportok modulálásával, a TRPV4 csatorna agonista GSK1016790A és a SERCA inhibitor thapsigargin alkalmazásával szuperoxidtermelést kiváltani az UACC-257 sejtekben. A ROS jel NOX5 specifikusságát az általános NADPH-oxidáz inhibitor DPI-vel és NOX5-re specifikus siRNS-sel támasztottuk alá.

A fejlesztési folyamat utolsó fázisában teszteltük az antitestet normál humán szövetmintákon is. Felfedezésekor, a NOX5 RNS-ét a legnagyobb mennyiségben a lépben és a herében írták le (33, 92), ezért első körben ezeket a szerveket vizsgáltuk. Elsőként sikerült kimutatnunk a NOX5 fehérjét humán herelizátumban Western blot technikával. Heremetszeten is sikerült megjeleníteni az oxidázt. Az immunhisztokémiai eredményekből az látszik, hogy a NOX5 jele a herecsatornából, zömében a csatorna belső falához közelebb elhelyezkedő sejtekből származik. Ezek azok a sejtek, amelyek a spermatogenezisben vesznek részt. Egyenként nem azonosítottuk a különböző fejlődési alakokat, azonban eredményünket egysejtes RNS-szekvenálási adatokkal is alá tudtuk támasztani, miszerint a herében a spermatidák, spermatocták, spermatogóniumok és a Sertoli sejtek a NOX5 fő kifejezői. Fehérjealapú eredményünk összhangban van Bánfi és munkatársai korábbi *in situ* hibridizációs megfigyeléseivel, ahol ugyanezen sejtpopulációkban detektálták a NOX5 mRNS-ét (92). 2022-ben több közlemény is született, amelyben vaddisznó (160) és humán (161) spermiumok ROS termelését vizsgálták. Ezen tanulmányokban a NOX5-öt tették felelőssé a detektált szuperoxid forrásaként, azonban a fehérje jelenlétét nem mutatták ki. Korábban napvilágot láttak olyan kutatások is, ahol fehérjeszinten mutatták ki a NOX5-öt humán spermiumokban

(121, 162). Probléma azonban, hogy mindkét cikkben ugyanazt az antitestet alkalmazták és nem végezték el annak részletes karakterizálását. A humán spermiumok kérdését érintő kutatásokban a legjobb lenne olyan mintákat vizsgálni, amelyek NOX5 hiányos férfiakról származnak, azonban bizonyítottan NOX5 deficiens ember hiányában erre jelenleg nincsen lehetőség. Ezért mindenképpen esszenciális lenne egy megbízható antitesttel az oxidáz jelenlétét validálni az érett spermiumokban. Az immunhisztokémiai adataink nem támasztják alá az elmúlt években publikált tanulmányok által bemutatott eredményeket. Az érett spermiumok a herecsatornák közepén helyezkednek el, azonban az immunfestéseink során azok a területek negatívak maradtak, ugyanakkor a sejtmagfestés jelezte a spermiumok jelenlétét. Természetesen nem zárható ki, hogy a NOX5 olyan komplexben van jelen a spermiumokban, amelyhez nem fér hozzá az antitestünk, és esetleg ezért nem tudjuk kimutatni. Azonban vizsgálataink összességében inkább abba az irányba mutatnak, hogy a NOX5-nek a spermiumok érésében, a spermatogenezisben lehet fontos szerepe, nem pedig az érett spermiumban.

A NOX5 felfedezésekor a Krause munkacsoport közölte az eredményei között egy Northern blot képet, amelyen a petefészekben halványan detektálható volt a NOX5 mRNS-e. Közleményükben azonban nem fejtették bővebben ki ezt a megfigyelést (92). 2014-ben megjelent egy publikáció, amelyben granulosa sejt kultúrából RT-PCR technikával erősítették fel és mutatták ki a NOX5-öt (163). Ennél szélesebb körben nem vizsgálták a NOX5 szerepét a petefészekben. Mindazonáltal az RNS-szekvenálási adatok is azt demonstrálták, hogy az oxidáz jelen van az ováriumban. Ezért mi is végeztünk kísérleteket, hogy megvizsgáljuk az enzim ovarialis jelenlétét. Laborunk először mutatta ki a NOX5 fehérjét petefészek lizátumban Western blot-tal, illetve petefészek szövetmetszeten immunfestéssel. Az egysejtes RNS-szekvenálási eredményeket tanulmányozva megállapítható, hogy az oocyták, fibroblasztok, granulosa- és theca sejtek a NOX5 jel forrásai az ováriumban. A férfi és a női gonádokra vonatkozóan az állapítható meg, hogy detektálható mennyiségben megtalálható ezen szervekben a NOX5 fehérje, azonban az enzim élettani szerepének a feltérképezésére további kutatások szükségesek.

Munkánk egy másik fontos eredménye, hogy elsőként mutattuk ki a NOX5 fehérjét normál léplizátumban Western blot-tal. Immunfestések során is sikerült detektálnunk a NOX5 fehérjét, ahol azt vettük észre, hogy az eloszlása átfedést mutat az endotélsejt marker vWF fehérjével. Megfigyelésünket egysejtes RNS-szekvenálási eredményekkel

is alátámasztottuk. A Tabula Sapiens tanulmányból nyert információk alapján kiszűrtük, hogy a NOX5 RNS-e a lép endotélsejtjei között fordul elő a legnagyobb volumenben. Ezen észrevételünk ellentmondásban van Bánfi és munkatársai által közölt *in situ* hibridizációs kísérlettel. Eredményeikben a lép B- és T-limfocita gazdag régióiban látták megjelenni a NOX5 RNS-ét (92). A NOX5 expresszió hiányát limfocitákban alátámasztják a HPA adatbázis információi is, miszerint NOX5 mRNS-t nem detektáltak az immunsejtekben. Így Bánfiék feltehetőleg egy műterméket láthattak korábban. 2007-ben Görlach és munkatársai az endotél- és simaizomsejteket nevezték meg a NOX5 forrásaként a lép immunhisztokémiai elemzésében (158). Az általuk kifejlesztett antitesttel azonban a tüdő ereiben is detektálták a fehérjét, holott az RNS-szekvenálási adatok szerint a tüdő gyakorlatilag negatív a NOX5 RNS-re. Összegezve az eddig rendelkezésre álló eredményeket, ki lehet jelenteni, hogy a lépből származó NOX5 jel döntően endotélsejt eredetű.

Az eddig bemutatott eredmények kevés kivétellel összhangban voltak a NOX5-öt vizsgáló korábbi kutatásokból kinyerhető információkkal. Kimutattuk a túltermeltetett és az endogén NOX5 fehérjét, detektáltuk azokban az egészséges, humán szövetekben, amelyekben ismert módon a legnagyobb mennyiségben fordul elő. Azonban kísérletes eredményeinknek a NOX5 irodalom fősodrával leginkább ellentmondó része a primer humán sejtek vizsgálatából származik. Koronária és aorta simaizomsejtek, illetve szív eredetű mikrovaszkuláris endotélsejtek esetében minimális NOX5 mRNS-t mutattunk csak ki, fehérje szinten azonban egyáltalán nem láttunk NOX5 specifikus jelet az említett sejtekben. A qPCR reakció során pozitív kontrollként az UACC-257 mintát alkalmaztuk, és olyan NOX5 Taqman próba oligonukleotidot használtunk, amely mind a hat ismert humán NOX5 izoformát képes felismerni. Mégis, a legnagyobb mennyiségben a melanóma sejtekben láttuk a NOX5 mRNS-ét. A melanóma sejtekről viszont tudjuk, hogy szórványosan expresszálják a NOX5-öt. Azaz a qPCR-ban kimagasló jelet adó UACC-257 mintánál sem sok NOX5 pozitív sejtől származhat az RNS. Továbbá, a primer sejtekből nyert NOX5 mRNS mennyisége hasonló nagyságrendben mozog, mint amennyit a HEK-Kontroll minta esetében látunk. Mivel a HEK-Kontroll sejtekben ATP és thapsigargin stimuláció hatására nem volt kimutatható szuperoxid jel, valószínű, hogy a qPCR által primer sejtekben kimutatott NOX5 mRNS mennyisége nem elegendő funkcionálisan számottevő vagy akár detektálható mennyiségű fehérje képzéséhez. Így

tehát a kísérletes eredményeink alapján arra jutottunk, hogy az általunk vizsgált vaszkuláris sejtekben nem meghatározó a NOX5 jelenléte. Felvetésünket megerősítik a HPA adatbázis vaszkuláris sejtekre vonatkozó RNS adatai is, amelyben csak néhány sejtípus és csak elszórta mutat gyenge NOX5 pozitivitást (maximum 0,3 nTPM mennyiségben).

2007-ben jelent meg az első közlemény, amely a NOX5 szerepét taglalja simaizom- és endotélsejtekben (158). Később több olyan cikk született, amelyekben saját fejlesztésű antitesttel mutatták ki a vaszkuláris sejtekben a NOX5 fehérjét (118, 137, 158). Ezen cikkek azonban elmulasztották demonstrálni, hogy az alkalmazott NOX5 antitestük valóban felismeri a fehérjét. Továbbá több olyan tanulmány is megjelent, amiben csak PCR-rel (RNS szinten) detektálták az oxidáz jelenlétét a primer sejtekben (138, 164). Ez utóbbi esetben kérdéses, hogy pontosan mekkora a NOX5 expresszió és az mRNS-ből mennyi működőképes fehérje képződik az érintett sejtekben.

A korábbi és az általunk nemrégiben közölt (154) tanulmányok közti diszkrepancia feloldására több válasz is szóba jöhet. Először is, a vizsgált endotélsejteket nem ugyanabból a szervből preparálták ki. Mi szív eredetű endotéllel dolgoztunk, míg több tanulmányban is bőr eredetűvel végezték a kísérleteket (118, 158). Másrészt felmerülhet, hogy az egyes laborokban gondozott sejt kultúrák klonális különbséget mutatnak, azaz a fenntartott sejtekben le- vagy felszabályozódhatnak gének, befolyásolva ezzel a kísérletek eredményét. Harmadrészt, nem kizárható, hogy a vaszkuláris sejtekben lévő NOX5 mennyisége nem éri el az antitestünk detektálási küszöbét az alkalmazott kísérletes körülmények között, holott több kísérletben is bizonyítottuk az antitest érzékenységét és specifikusságát. Negyedrészt, mi fiziológias körülmények között tartottuk a primer sejteket. Egyes közlemények eredményei alapján az angiotenzin-II és az endothelin-I hatása fokozza a NOX5 expresszióját (118). Elképzelhető tehát, hogy normál fiziológias körülmények között nem dominás a NOX5 az erekben, azonban patológiás állapotokban megnőhet a mennyisége.

A NOX5 szerepét vizsgáló kísérletek tervezésénél alaposan meg kell fontolni, milyen rendszert választunk a megfelelő kontrollok biztosítása céljából. Sejt kultúrában lehet tanulmányozni a túltermeltetett fehérjét, vagy az endogént géncsökkentéssel szabályozni. Az állatmodellek megválasztása azonban nagyobb kihívást jelentenek a területen, mivel a kutatóhelyeken általánosan elérhető egerekben és patkányokban nem

található meg a NOX5 génje. Az utóbbi években készült több olyan transzgenikus egérvonal, amelybe bevitték a humán NOX5 génjét, majd ezekkel végeztek kísérleteket (119, 128, 165). Azonban felvetődik a kérdés, vajon mennyire jó ötlet bevinni egy Ca^{2+} -jelre szuperoxidot előállító enzimet egy olyan rendszerbe, amiben természetesen az nem fordul elő. A vaszkuláris sejteket például rendszeresen érik olyan behatások, aminek következtében megemelkedik az $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$, ennek következtében szuperoxidtermelésbe kezd az enzim. Ezért természetesen óhatatlanul kialakulnak olyan mértékű és/vagy mintázatú ROS hatások a sejtben és a környezetében, amelyek normálisan nem jelennének meg. Éppen ezért egy ilyen rendszerből következtetéseket levonni az enzim élettani funkciójára meglehetősen problémás. Az ilyen rendszerekben nyert eredményeket elengedhetetlen NOX5-öt endogéneen kifejező élettani vagy kóros rendszerben is megerősíteni.

Az állatmodellekre vonatkozó másik megközelítés a génkiütött, knock out (KO), állatok létrehozása és vizsgálata. Kutatócsoportunk ezt az utat választotta a NOX5 tanulmányozására, és a modelltől nyert információk segíthetnek majd a NOX5 emberi szervezetben betöltött szerepének megértésében. Kollégáim New-Zealand White típusú nyulakból CRISPR/Cas9 technika felhasználásával kiütötték a NOX5 génjét. A módosítás során a NOX5 gén 3. exonjában történt egy 10 bázispáros deléció. A génkiütést Western blot-tal is sikerült megerősíteni, ugyanis a KO állatból származó nyirokcsomó mintában nem detektálták a NOX5-öt, szemben a kontroll állatból származó mintával, amelynél 95 kDa körül jelent meg a fehérje (132). A Fulton munkacsoport nyúl heréből megklónozte a NOX5 enzimet. Szuperoxidtermelés vizsgálatával bizonyították, hogy a nyúl NOX5 enzim, a humán NOX5-höz hasonlóan, aktiválható ionomycinnel és PMA-val. COS-7 sejtekben vizsgálták a nyúl NOX5 expresszióját, és megállapították, hogy a megklónozott fehérje nagysága 90 kDa körüli (166). Így tehát két független tanulmány is bizonyítja, hogy a nyúlban kifejeződő NOX5 fehérje nagyobb, mint a humán NOX5 fehérje, amely 75-80 kDa nagyságú. Mivel a szakirodalomban felmerült a NOX5 szerepe a vaszkuláris sejtek működésében, ezért mi is megvizsgáltuk a kérdést a nyúlmodellünk segítségével. A kontroll és a NOX5 hiányos nyulakból preparált aortagyűrűkön elvégzett miográfiás mérésekben nem találtunk különbséget az erek válaszkészségében káliumion, adrenalin és acetil-kolin stimulusokra. Altatott állatok vérnyomásértékeiben úgyszintén nem láttunk különbséget. Felfedeztük azonban, hogy 8 hét aterogén diétát követően a

NOX5 hiányos nyulak aortáiban nagyobb területen képződtek plakkok, mint a kontroll nyulak esetében. Az eredményekből azt a következtetést vontuk le, hogy a NOX5-nek védő hatása van az érlemezés kialakulásával szemben (132). A jövőben érdemes lehet felderíteni, hogy milyen molekuláris mechanizmusokkal járul hozzá a NOX5 az erek védelméhez a zsírdús diétával szemben, illetve megvizsgálni, hogy mely jelátviteli pályákat befolyásolja a NOX5 által termelt szuperoxid hiánya a KO nyulakban. Hasznos lenne meghatározni, hogy milyen fehérjék expressziója változik a NOX5 hiányában, és az eredmények függvényében további kísérleteket tervezni az enzim tanulmányozására. Magam azzal kapcsolódtam be a NOX5 hiányos nyúl jellemzésébe, hogy megvizsgáltam, a NOX5 kiütés hatására nem sérültek-e a NOX1, NOX2 és NOX4 gének. Molekuláris klónozási technikákkal bizonyítottam, hogy a nevezett gének épek maradtak. A NOX5 KO nyulakkal végzett kutatómunkánk szempontjából különösen fontos a NOX4 sértetlensége. A NOX5 KO nyulakban számos, ereket érintő kísérletet végeztünk, s mint a bevezetőben is leírtam, a NOX4 a kardiovaszkuláris rendszer számos pontján megtalálható, ezért fontos volt megbizonyosodni a nevezett gén épségéről (69). Bízunk benne, hogy az újonnan létrehozott NOX5 hiányos nyúlmodellünk közelebb vihet bennünket az enzim humán élettani funkciójának a felderítéséhez.

6. Következtetések

A PhD kutatómunkám során elért eredmények alapján az alábbi következtetéseket tudom megállapítani:

- Kifejlesztettünk egy új, már kereskedelmi forgalomban is kapható, egér monoklonális antitestet, amely specifikusan felismeri a humán NOX5 fehérjét ELISA, Western blot és immunfestési eljárásokban.
- Az irodalmi adatokkal egyetértésben, a NOX5-öt túltermelő HEK293T sejtekben a NOX5 az endoplazmás retikulumban és a sejtmagmembránban helyezkedik el. Ugyanezen sejtekben úgy láttuk, hogy a NOX5 által termelt szuperoxid nem befolyásolta a sejtek Ca^{2+} -szintjét.
- Az irodalmi adatokkal megegyezően, az UACC-257 sejtekben az endogén NOX5 fehérje szintén az endoplazmás retikulumban és a sejtmagmembránban található meg. Elsőként sikerült stimulálnunk a sejtek NOX5 függő szuperoxidtermelését endogén kalciumtranszporterek befolyásolásával a SERCA inhibitor thapsigargin és a TRPV4 csatorna agonista GSK1016790A segítségével.
- Elsőként mutattuk ki a NOX5 fehérjét humán here, petefészek és lép mintákban Western blot és immunhisztokémia eljárásokkal. *In silico* módszerekkel azonosítottuk a NOX5-öt kifejező sejttypusokat az egyes szervekben.
- Eredményeink alapján arra a megállapításra jutottunk, hogy a humán herében döntően a spermatogenezisben részt vevő sejtek fejezik ki a NOX5-öt, nem pedig az érett spermiumok.
- Megállapítottuk, hogy a humán lépben az endotélsejtek a NOX5 forrásai.
- Az általunk vizsgált vaszkuláris eredetű primer sejtekben, az előzetes várakozásokkal ellentétben, nem detektálható a NOX5 fehérje.
- Megállapítottuk, hogy a CRISPR/Cas9 technikával létrehozott NOX5 hiányos nyulakban a génkiütés hatására nem sérültek a NOX1, NOX2 és NOX4 gének.

7. Összefoglalás

A NADPH-oxidázok családjában a NOX5-ről tudunk a legkevesebbet. Ismerjük az enzim megoszlását az emberi szervezetben, elsősorban a lépben és a herében fordul elő. Azonban a NOX5 fehérjeszintű detektálásához korábban nem állt rendelkezésre széles körben hozzáférhető, megfelelő minőségű antitest. Ezért kifejlesztettünk egy új, monoklonális, humán NOX5-öt felismerő antitestet, együttműködve az Immunogenes Kft-vel, és elvégeztük annak részletes jellemzését is. Az antitest immár kereskedelmi forgalomban is elérhető. Bízunk benne, hogy az általunk kifejlesztett antitest új lendületet ad a NOX5 elhelyezkedését és funkcióját vizsgáló kutatásoknak.

Létrehoztunk egy NOX5-öt stabilan expresszáló HEK293T sejtvonalat. A túltermeltetett fehérjét intracellulárisan döntően az ER-ban és a sejtmembránban láttuk. Szuperoxidmérésekkel igazoltuk, hogy a sejtek funkcióképes és kalciummal aktiválható enzimet fejeznek ki. Az endogén NOX5 tanulmányozására az UACC-257 melanóma sejtvonalat használtuk. Western blot és immunfestési eljárásokkal, NOX5 siRNS-sel kontrollált kísérletekben igazoltuk, hogy a kifejlesztett antitest felismeri az endogén NOX5 fehérjét. Az enzim ezen sejtekben is főként a fentebb említett kompartmentekben oszlik szét. Kalciumra átjárható TRPV4 csatorna aktivációjával (GSK1016790A) és a SERCA gátlásával (thapsigargin) kiváltottunk a sejtekben kalcium jelet, amit szuperoxidtermelés követett. A NOX-okat gátló DPI és NOX5 siRNS segítségével igazoltuk, hogy a mért ROS NOX5 eredetű.

Az új monoklonális antitesttel kimutattuk a NOX5 fehérjét normál, humán lépben, herében és petefészekben Western blot és immunhisztokémiai technikákkal. RNS adatbázisok elemzésével azonosítottuk az oxidáz celluláris forrásait a nevezett szövetekben, alátámasztva ezzel immunfestési eredményeinket. Herében a korai és kései spermaticidák, petefészekben az oocyták és granulosa sejtek, a lépben pedig az endotélsejtek az enzim fő kifejeződési helyei. A szakirodalommal ellentétben, de összhangban a mRNA adatbázisokkal, a lép endotél kivételével primer vaszkuláris sejtekben nem találtunk érdemi NOX5 kifejeződést.

Elvégeztük a laboratóriumunk által létrehozott NOX5 hiányos nyulak „off-target” analizisét egyéb NADPH-oxidázokra. Megállapítottuk, hogy a CRISPR/Cas9 technikával létrehozott nyulakban nem sérültek a NOX1, NOX2 és NOX4 gének a módosítás hatására.

8. Summary

In the family of NADPH oxidases, our knowledge about NOX5 is the least comprehensive. We know the distribution of enzyme in the human body, primarily expressed in the spleen and testes. However, there was previously no widely available, high-quality antibody for the detection of NOX5 at the protein level. Therefore, we developed a new monoclonal antibody that recognizes human NOX5, in collaboration with Immunogenes Ltd., and conducted its detailed characterization. The antibody is now commercially available. We hope that our developed antibody will give new momentum into research exploring the localization and function of NOX5.

We established a HEK293T cell line stably expressing NOX5. Predominantly, the overexpressed protein was observed intracellularly in the ER and the nuclear membrane. Through superoxide measurements, we confirmed that the cells express a functional enzyme that can be activated by calcium. To study endogenous NOX5, we used the UACC-257 melanoma cell line. Using Western blot and immunostaining procedures, along with NOX5 siRNA-controlled experiments, we demonstrated that the developed antibody recognizes the endogenous NOX5 protein. In these cells, the enzyme is mainly distributed in the compartments mentioned above. By activating the TRPV4 channel (with GSK1016790A) and inhibiting SERCA (with thapsigargin), we induced a calcium signal in the cells, followed by superoxide production. The origin of the measured ROS as NOX5-derived was confirmed with the use of NOX inhibitor DPI and NOX5 siRNA.

With the novel monoclonal antibody, we detected the NOX5 protein in normal human spleen, testes, and ovaries with the help of Western blot and immunohistochemistry techniques. By analyzing RNA databases, we identified the cellular sources of the oxidase in these tissues, supporting our immunostaining results. In the testes, early and late spermatids; in the ovaries, oocytes and granulosa cells; and in the spleen, endothelial cells were the primary sites of enzyme expression. Contrary to literature but in agreement with mRNA database findings, we found no significant expression of NOX5 in primary vascular cells, except in spleen endothelium.

We also conducted „off-target” analysis for other NADPH oxidases of NOX5-deficient rabbits created in our laboratory. We determined that the NOX1, NOX2, and NOX4 genes were not affected by the modifications in the rabbits generated using the CRISPR/Cas9 technology.

9. Irodalomjegyzék

1. Gulcin I. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol.* 2020;94(3):651-715.
2. Sinenko SA, Starkova TY, Kuzmin AA, Tomilin AN. Physiological Signaling Functions of Reactive Oxygen Species in Stem Cells: From Flies to Man. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:714370.
3. Sies H, Belousov VV, Chandel NS, Davies MJ, Jones DP, Mann GE, Murphy MP, Yamamoto M, Winterbourn C. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(7):499-515.
4. Mandl J. 6.4 Az oxigén tökéletlen redukciója. In: Ádám V, editor. *Orvosi biokémia.* Budapest: Semmelweis Kiadó; 2016. p. 137-142.
5. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(7):363-383.
6. Ristow M, Schmeisser K. Mitohormesis: Promoting Health and Lifespan by Increased Levels of Reactive Oxygen Species (ROS). *Dose Response.* 2014;12(2):288-341.
7. Checa J, Aran JM. Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes. *J Inflamm Res.* 2020;13:1057-1073.
8. Enyedi B, Várnai P, Geiszt M. Redox state of the endoplasmic reticulum is controlled by Ero1L-alpha and intraluminal calcium. *Antioxid Redox Signal.* 2010;13(6):721-729.
9. Lismont C, Revenco I, Fransen M. Peroxisomal Hydrogen Peroxide Metabolism and Signaling in Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20(15).
10. Shih JC, Wu JB, Chen K. Transcriptional regulation and multiple functions of MAO genes. *J Neural Transm (Vienna).* 2011;118(7):979-986.
11. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
12. Bortolotti M, Polito L, Battelli MG, Bolognesi A. Xanthine oxidoreductase: One enzyme for multiple physiological tasks. *Redox Biol.* 2021;41:101882.
13. Illés E, Mizrahi A, Marks V, Meyerstein D. Carbonate-radical-anions, and not hydroxyl radicals, are the products of the Fenton reaction in neutral solutions containing bicarbonate. *Free Radic Biol Med.* 2019;131:1-6.

14. Patra SG, Mizrahi A, Meyerstein D. The Role of Carbonate in Catalytic Oxidations. *Acc Chem Res.* 2020;53(10):2189-2200.
15. Augusto O, Goldstein S, Hurst JK, Lind J, Lyman SV, Merenyi G, Radi R. Carbon dioxide-catalyzed peroxyxynitrite reactivity - The resilience of the radical mechanism after two decades of research. *Free Radic Biol Med.* 2019;135:210-215.
16. Fleming AM, Burrows CJ. On the irrelevancy of hydroxyl radical to DNA damage from oxidative stress and implications for epigenetics. *Chem Soc Rev.* 2020;49(18):6524-6528.
17. Lennicke C, Cochemé HM. Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. *Mol Cell.* 2021;81(18):3691-3707.
18. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87(1):245-313.
19. Ali SS, Ahsan H, Zia MK, Siddiqui T, Khan FH. Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. *J Food Biochem.* 2020;44(3):e13145.
20. Montero D, Tachibana C, Rahr Winther J, Appenzeller-Herzog C. Intracellular glutathione pools are heterogeneously concentrated. *Redox Biol.* 2013;1(1):508-513.
21. Turell L, Zeida A, Trujillo M. Mechanisms and consequences of protein cysteine oxidation: the role of the initial short-lived intermediates. *Essays Biochem.* 2020;64(1):55-66.
22. Drazic A, Winter J. The physiological role of reversible methionine oxidation. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1844(8):1367-1382.
23. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med.* 2003;9(4):169-176.
24. Vermot A, Petit-Härtlein I, Smith SME, Fieschi F. NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(6).
25. Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, Newburger PE, Baehner RL, Cole FS, Curnutte JT, Orkin SH. Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature.* 1986;322(6074):32-38.

26. Teahan C, Rowe P, Parker P, Totty N, Segal AW. The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the beta-chain of cytochrome b-245. *Nature*. 1987;327(6124):720-721.
27. Nuno H, Rotrosen D, Gallin JI, Malech HL. Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors. *Science*. 1988;242(4883):1298-1301.
28. Volpp BD, Nauseef WM, Clark RA. Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. *Science*. 1988;242(4883):1295-1297.
29. Magnani F, Nenci S, Millana Fananas E, Ceccon M, Romero E, Fraaije MW, Mattevi A. Crystal structures and atomic model of NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(26):6764-6769.
30. Brandes RP, Weissmann N, Schröder K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med*. 2014;76:208-226.
31. Noreng S, Ota N, Sun Y, Ho H, Johnson M, Arthur CP, Schneider K, Lehoux I, Davies CW, Mortara K, Wong K, Seshasayee D, Masureel M, Payandeh J, Yi T, Koerber JT. Structure of the core human NADPH oxidase NOX2. *Nat Commun*. 2022;13(1):6079.
32. Sun J. Structures of mouse DUOX1-DUOXA1 provide mechanistic insights into enzyme activation and regulation. *Nat Struct Mol Biol*. 2020;27(11):1086-1093.
33. Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene*. 2001;269(1-2):131-140.
34. Sirokmány G, Donkó Á, Geiszt M. Nox/Duox Family of NADPH Oxidases: Lessons from Knockout Mouse Models. *Trends Pharmacol Sci*. 2016;37(4):318-327.
35. Segal AW, Jones OT. Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature*. 1978;276(5687):515-517.
36. Harper AM, Chaplin MF, Segal AW. Cytochrome b-245 from human neutrophils is a glycoprotein. *Biochem J*. 1985;227(3):783-788.
37. Wallach TM, Segal AW. Analysis of glycosylation sites on gp91phox, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation in vitro. *Biochem J*. 1997;321 (Pt 3)(Pt 3):583-585.
38. Dinauer MC, Pierce EA, Bruns GA, Curnutte JT, Orkin SH. Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and

mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Clin Invest.* 1990;86(5):1729-1737.

39. Stasia MJ, Bordigoni P, Martel C, Morel F. A novel and unusual case of chronic granulomatous disease in a child with a homozygous 36-bp deletion in the CYBA gene (A22(0)) leading to the activation of a cryptic splice site in intron 4. *Hum Genet.* 2002;110(5):444-450.

40. Sumimoto H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *Febs j.* 2008;275(13):3249-3277.

41. Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel JL, Hasenfuss G, Shah AM. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(12):2164-2171.

42. Ansari MA, Scheff SW. NADPH-oxidase activation and cognition in Alzheimer disease progression. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(1):171-178.

43. Adesina SE, Kang BY, Bijli KM, Ma J, Cheng J, Murphy TC, Michael Hart C, Sutliff RL. Targeting mitochondrial reactive oxygen species to modulate hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Free Radic Biol Med.* 2015;87:36-47.

44. Piccoli C, Ria R, Scrima R, Cela O, D'Aprile A, Boffoli D, Falzetti F, Tabilio A, Capitanio N. Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. Novel evidence of the occurrence of NAD(P)H oxidase activity. *J Biol Chem.* 2005;280(28):26467-26476.

45. Borregaard N, Heiple JM, Simons ER, Clark RA. Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J Cell Biol.* 1983;97(1):52-61.

46. Davies MJ. Myeloperoxidase: Mechanisms, reactions and inhibition as a therapeutic strategy in inflammatory diseases. *Pharmacol Ther.* 2021;218:107685.

47. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature.* 1999;401(6748):79-82.

48. Bánfi B, Maturana A, Jaconi S, Arnaudeau S, Laforge T, Sinha B, Ligeti E, Demaurex N, Krause KH. A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1. *Science.* 2000;287(5450):138-142.

49. Geiszt M. NADPH oxidases: new kids on the block. *Cardiovasc Res.* 2006;71(2):289-299.
50. Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nunoi H, Sumimoto H. Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem.* 2003;278(27):25234-25246.
51. Bánfi B, Clark RA, Steger K, Krause KH. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem.* 2003;278(6):3510-3513.
52. Geiszt M, Lekstrom K, Witta J, Leto TL. Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *J Biol Chem.* 2003;278(22):20006-20012.
53. Geiszt M, Lekstrom K, Brenner S, Hewitt SM, Dana R, Malech HL, Leto TL. NAD(P)H oxidase 1, a product of differentiated colon epithelial cells, can partially replace glycoprotein 91phox in the regulated production of superoxide by phagocytes. *J Immunol.* 2003;171(1):299-306.
54. Kawano M, Miyamoto K, Kaito Y, Sumimoto H, Tamura M. Noxa1 as a moderate activator of Nox2-based NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys.* 2012;519(1):1-7.
55. Chamulitrat W, Schmidt R, Tomakidi P, Stremmel W, Chunglok W, Kawahara T, Rokutan K. Association of gp91phox homolog Nox1 with anchorage-independent growth and MAP kinase-activation of transformed human keratinocytes. *Oncogene.* 2003;22(38):6045-6053.
56. Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CX, Laurindo FR. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2005;280(49):40813-40819.
57. Hilenski LL, Clempus RE, Quinn MT, Lambeth JD, Griendling KK. Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(4):677-683.
58. Kuwano Y, Kawahara T, Yamamoto H, Teshima-Kondo S, Tominaga K, Masuda K, Kishi K, Morita K, Rokutan K. Interferon-gamma activates transcription of NADPH oxidase 1 gene and upregulates production of superoxide anion by human large intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290(2):C433-443.
59. Aviello G, Knaus UG. NADPH oxidases and ROS signaling in the gastrointestinal tract. *Mucosal Immunol.* 2018;11(4):1011-1023.

60. Bánfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause KH. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem.* 2004;279(44):46065-46072.
61. Paffenholz R, Bergstrom RA, Pasutto F, Wabnitz P, Munroe RJ, Jagla W, Heinzmann U, Marquardt A, Bareiss A, Laufs J, Russ A, Stumm G, Schimenti JC, Bergstrom DE. Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes Dev.* 2004;18(5):486-491.
62. Nakano Y, Banfi B, Jesaitis AJ, Dinauer MC, Allen LA, Nauseef WM. Critical roles for p22phox in the structural maturation and subcellular targeting of Nox3. *Biochem J.* 2007;403(1):97-108.
63. Ueno N, Takeya R, Miyano K, Kikuchi H, Sumimoto H. The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators. *J Biol Chem.* 2005;280(24):23328-23339.
64. Cheng G, Ritsick D, Lambeth JD. Nox3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox. *J Biol Chem.* 2004;279(33):34250-34255.
65. Stasia MJ. CYBA encoding p22(phox), the cytochrome b558 alpha polypeptide: gene structure, expression, role and physiopathology. *Gene.* 2016;586(1):27-35.
66. Nakano Y, Longo-Guess CM, Bergstrom DE, Nauseef WM, Jones SM, Bánfi B. Mutation of the Cyba gene encoding p22phox causes vestibular and immune defects in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(3):1176-1185.
67. Kiss PJ, Knisz J, Zhang Y, Baltrusaitis J, Sigmund CD, Thalmann R, Smith RJ, Verpy E, Bánfi B. Inactivation of NADPH oxidase organizer 1 results in severe imbalance. *Curr Biol.* 2006;16(2):208-213.
68. Geiszt M, Kopp JB, Várnai P, Leto TL. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(14):8010-8014.
69. Montezano AC, Burger D, Ceravolo GS, Yusuf H, Montero M, Touyz RM. Novel Nox homologues in the vasculature: focusing on Nox4 and Nox5. *Clin Sci (Lond).* 2011;120(4):131-141.
70. Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, Hirai M, Hirakata H, Naito S, Hattori M, Sakaki Y, Sumimoto H. A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J Biol Chem.* 2001;276(2):1417-1423.

71. Guo S, Chen X. The human Nox4: gene, structure, physiological function and pathological significance. *J Drug Target*. 2015;23(10):888-896.
72. Gray SP, Shah AM, Smyrniak I. NADPH oxidase 4 and its role in the cardiovascular system. *Vasc Biol*. 2019;1(1):H59-h66.
73. Meitzler JL, Hinde S, Bánfi B, Nauseef WM, Ortiz de Montellano PR. Conserved cysteine residues provide a protein-protein interaction surface in dual oxidase (DUOX) proteins. *J Biol Chem*. 2013;288(10):7147-7157.
74. Lambeth JD, Kawahara T, Diebold B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(3):319-331.
75. Grasberger H, Refetoff S. Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent. *J Biol Chem*. 2006;281(27):18269-18272.
76. De Deken X, Wang D, Dumont JE, Miot F. Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H₂O₂-generating system. *Exp Cell Res*. 2002;273(2):187-196.
77. Grasberger H, De Deken X, Miot F, Pohlenz J, Refetoff S. Missense mutations of dual oxidase 2 (DUOX2) implicated in congenital hypothyroidism have impaired trafficking in cells reconstituted with DUOX2 maturation factor. *Mol Endocrinol*. 2007;21(6):1408-1421.
78. Hoste C, Dumont JE, Miot F, De Deken X. The type of DUOX-dependent ROS production is dictated by defined sequences in DUOXA. *Exp Cell Res*. 2012;318(18):2353-2364.
79. De Deken X, Corvilain B, Dumont JE, Miot F. Roles of DUOX-mediated hydrogen peroxide in metabolism, host defense, and signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(17):2776-2793.
80. Sirokmány G, Geiszt M. The Relationship of NADPH Oxidases and Heme Peroxidases: Fallin' in and Out. *Front Immunol*. 2019;10:394.
81. De Marco G, Agretti P, Montanelli L, Di Cosmo C, Bagattini B, De Servi M, Ferrarini E, Dimida A, Freitas Ferreira AC, Molinaro A, Ceccarelli C, Brozzi F, Pinchera A, Vitti P, Tonacchera M. Identification and functional analysis of novel dual oxidase 2 (DUOX2) mutations in children with congenital or subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(8):E1335-1339.

82. Grasberger H. Defects of thyroidal hydrogen peroxide generation in congenital hypothyroidism. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;322(1-2):99-106.
83. Yi RH, Zhu WB, Yang LY, Lan L, Chen Y, Zhou JF, Wang J, Su YQ. A novel dual oxidase maturation factor 2 gene mutation for congenital hypothyroidism. *Int J Mol Med.* 2013;31(2):467-470.
84. Ris-Stalpers C, Bikker H. Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to TPO mutations. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;322(1-2):38-43.
85. Faria CC, Fortunato RS. The role of dual oxidases in physiology and cancer. *Genet Mol Biol.* 2020;43(1 suppl. 1):e20190096.
86. Geiszt M, Witta J, Baffi J, Lekstrom K, Leto TL. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *Faseb j.* 2003;17(11):1502-1504.
87. Pató A, Bölskei K, Donkó Á, Kaszás D, Boros M, Bodrogi L, Várady G, Pape VFS, Roux BT, Enyedi B, Helyes Z, Watt FM, Sirokmány G, Geiszt M. Hydrogen peroxide production by epidermal dual oxidase 1 regulates nociceptive sensory signals. *Redox Biol.* 2023;62:102670.
88. Gattas MV, Forteza R, Fragoso MA, Fregien N, Salas P, Salathe M, Conner GE. Oxidative epithelial host defense is regulated by infectious and inflammatory stimuli. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(10):1450-1458.
89. Harper RW, Xu C, Eiserich JP, Chen Y, Kao CY, Thai P, Setiadi H, Wu R. Differential regulation of dual NADPH oxidases/peroxidases, Duox1 and Duox2, by Th1 and Th2 cytokines in respiratory tract epithelium. *FEBS Lett.* 2005;579(21):4911-4917.
90. Hill T, 3rd, Xu C, Harper RW. IFN γ mediates DUOX2 expression via a STAT-independent signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;395(2):270-274.
91. Linderholm AL, Onitsuka J, Xu C, Chiu M, Lee WM, Harper RW. All-trans retinoic acid mediates DUOX2 expression and function in respiratory tract epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010;299(2):L215-221.
92. Bánfi B, Molnár G, Maturana A, Steger K, Hegedûs B, Demareux N, Krause KH. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem.* 2001;276(40):37594-37601.

93. García JG, Ansorena E, Izal I, Zalba G, de Miguel C, Milagro FI. Structure, regulation, and physiological functions of NADPH oxidase 5 (NOX5). *J Physiol Biochem.* 2023;79(2):383-395.
94. Chen F, Wang Y, Barman S, Fulton DJ. Enzymatic regulation and functional relevance of NOX5. *Curr Pharm Des.* 2015;21(41):5999-6008.
95. Andueza A, Garde N, García-Garzón A, Ansorena E, López-Zabalza MJ, Iraburu MJ, Zalba G, Martínez-Irujo JJ. NADPH oxidase 5 promotes proliferation and fibrosis in human hepatic stellate cells. *Free Radic Biol Med.* 2018;126:15-26.
96. Bedard K, Jaquet V, Krause KH. NOX5: from basic biology to signaling and disease. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(4):725-734.
97. Nazari B, Jaquet V, Krause KH. NOX family NADPH oxidases in mammals: Evolutionary conservation and isoform-defining sequences. *Redox Biol.* 2023;66:102851.
98. Bedard K, Lardy B, Krause KH. NOX family NADPH oxidases: not just in mammals. *Biochimie.* 2007;89(9):1107-1112.
99. Fulton DJ. Nox5 and the regulation of cellular function. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(10):2443-2452.
100. Touyz RM, Anagnostopoulou A, Rios F, Montezano AC, Camargo LL. NOX5: Molecular biology and pathophysiology. *Exp Physiol.* 2019;104(5):605-616.
101. Prior KK, Leisegang MS, Josipovic I, Löwe O, Shah AM, Weissmann N, Schröder K, Brandes RP. CRISPR/Cas9-mediated knockout of p22phox leads to loss of Nox1 and Nox4, but not Nox5 activity. *Redox Biol.* 2016;9:287-295.
102. Kawahara T, Jackson HM, Smith SM, Simpson PD, Lambeth JD. Nox5 forms a functional oligomer mediated by self-association of its dehydrogenase domain. *Biochemistry.* 2011;50(12):2013-2025.
103. Smith D, Lloyd L, Wei E, Radmanesh P, Wei CC. Calmodulin binding to the dehydrogenase domain of NADPH oxidase 5 alters its oligomeric state. *Biochem Biophys Rep.* 2022;29:101198.
104. Jagnandan D, Church JE, Banfi B, Stuehr DJ, Marrero MB, Fulton DJ. Novel mechanism of activation of NADPH oxidase 5. calcium sensitization via phosphorylation. *J Biol Chem.* 2007;282(9):6494-6507.

105. Chen F, Yu Y, Haigh S, Johnson J, Lucas R, Stepp DW, Fulton DJ. Regulation of NADPH oxidase 5 by protein kinase C isoforms. *PLoS One*. 2014;9(2):e88405.
106. Pandey D, Fulton DJ. Molecular regulation of NADPH oxidase 5 via the MAPK pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300(4):H1336-1344.
107. Pandey D, Gratton JP, Rafikov R, Black SM, Fulton DJ. Calcium/calmodulin-dependent kinase II mediates the phosphorylation and activation of NADPH oxidase 5. *Mol Pharmacol*. 2011;80(3):407-415.
108. El Jamali A, Valente AJ, Lechleiter JD, Gamez MJ, Pearson DW, Nauseef WM, Clark RA. Novel redox-dependent regulation of NOX5 by the tyrosine kinase c-Abl. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(5):868-881.
109. Bánfi B, Tirone F, Durussel I, Knisz J, Moskwa P, Molnár GZ, Krause KH, Cox JA. Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *J Biol Chem*. 2004;279(18):18583-18591.
110. Bagur R, Hajnóczky G. Intracellular Ca(2+) Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. *Mol Cell*. 2017;66(6):780-788.
111. Serrander L, Jaquet V, Bedard K, Plastre O, Hartley O, Arnaudeau S, Demaurex N, Schlegel W, Krause KH. NOX5 is expressed at the plasma membrane and generates superoxide in response to protein kinase C activation. *Biochimie*. 2007;89(9):1159-1167.
112. Petrushanko IY, Lobachev VM, Kononikhin AS, Makarov AA, Devred F, Kovacic H, Kubatiev AA, Tsvetkov PO. Oxidation of Ca²⁺-Binding Domain of NADPH Oxidase 5 (NOX5): Toward Understanding the Mechanism of Inactivation of NOX5 by ROS. *PLoS One*. 2016;11(7):e0158726.
113. Qian J, Chen F, Kovalenkov Y, Pandey D, Moseley MA, Foster MW, Black SM, Venema RC, Stepp DW, Fulton DJ. Nitric oxide reduces NADPH oxidase 5 (Nox5) activity by reversible S-nitrosylation. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(9):1806-1819.
114. Yu P, Han W, Villar VA, Yang Y, Lu Q, Lee H, Li F, Quinn MT, Gildea JJ, Felder RA, Jose PA. Unique role of NADPH oxidase 5 in oxidative stress in human renal proximal tubule cells. *Redox Biol*. 2014;2:570-579.
115. Antony S, Wu Y, Hewitt SM, Anver MR, Butcher D, Jiang G, Meitzler JL, Liu H, Juhasz A, Lu J, Roy KK, Doroshov JH. Characterization of NADPH oxidase 5 expression in human tumors and tumor cell lines with a novel mouse monoclonal antibody. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:497-508.

116. Kawahara T, Lambeth JD. Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate modulates Nox5 localization via an N-terminal polybasic region. *Mol Biol Cell*. 2008;19(10):4020-4031.
117. Marzaioli V, Hurtado-Nedelec M, Pintard C, Tlili A, Marie JC, Monteiro RC, Gougerot-Pocidallo MA, Dang PM, El-Benna J. NOX5 and p22phox are 2 novel regulators of human monocytic differentiation into dendritic cells. *Blood*. 2017;130(15):1734-1745.
118. Montezano AC, Burger D, Paravicini TM, Chignalia AZ, Yusuf H, Almasri M, He Y, Callera GE, He G, Krause KH, Lambeth D, Quinn MT, Touyz RM. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced oxidase 5 (Nox5) regulation by angiotensin II and endothelin-1 is mediated via calcium/calmodulin-dependent, rac-1-independent pathways in human endothelial cells. *Circ Res*. 2010;106(8):1363-1373.
119. Zhao GJ, Zhao CL, Ouyang S, Deng KQ, Zhu L, Montezano AC, Zhang C, Hu F, Zhu XY, Tian S, Liu X, Ji YX, Zhang P, Zhang XJ, She ZG, Touyz RM, Li H. Ca²⁺-Dependent NOX5 (NADPH Oxidase 5) Exaggerates Cardiac Hypertrophy Through Reactive Oxygen Species Production. *Hypertension*. 2020;76(3):827-838.
120. Petsophonsakul P, Burgmaier M, Willems B, Heeneman S, Stadler N, Gremse F, Reith S, Burgmaier K, Kahles F, Marx N, Natour E, Bidar E, Jacobs M, Mees B, Reutelingsperger C, Furmanik M, Schurgers L. Nicotine promotes vascular calcification via intracellular Ca²⁺-mediated, Nox5-induced oxidative stress, and extracellular vesicle release in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2022;118(9):2196-2210.
121. Musset B, Clark RA, DeCoursey TE, Petheo GL, Geiszt M, Chen Y, Cornell JE, Eddy CA, Brzyski RG, El Jamali A. NOX5 in human spermatozoa: expression, function, and regulation. *J Biol Chem*. 2012;287(12):9376-9388.
122. Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol*. 2004;122(4):369-382.
123. Diebold BA, Wilder SG, De Deken X, Meitzler JL, Doroshov JH, McCoy JW, Zhu Y, Lambeth JD. Guidelines for the Detection of NADPH Oxidases by Immunoblot and RT-qPCR. *Methods Mol Biol*. 2019;1982:191-229.
124. Jiang Z, Wu L, van der Leeden B, van Rossum AC, Niessen HWM, Krijnen PAJ. NOX2 and NOX5 are increased in cardiac microvascular endothelium of deceased COVID-19 patients. *Int J Cardiol*. 2023;370:454-462.

125. Wang J, Xiao J, Meng X, Chu X, Zhuansun DD, Xiong B, Feng J. NOX5 is expressed aberrantly but not a critical pathogenetic gene in Hirschsprung disease. *BMC Pediatr.* 2021;21(1):153.
126. Huang Z, Su Q, Li W, Ren H, Huang H, Wang A. Suppressed mitochondrial respiration via NOX5-mediated redox imbalance contributes to the antitumor activity of anlotinib in oral squamous cell carcinoma. *J Genet Genomics.* 2021;48(7):582-594.
127. Jha JC, Dai A, Holterman CE, Cooper ME, Touyz RM, Kennedy CR, Jandeleit-Dahm KAM. Endothelial or vascular smooth muscle cell-specific expression of human NOX5 exacerbates renal inflammation, fibrosis and albuminuria in the Akita mouse. *Diabetologia.* 2019;62(9):1712-1726.
128. Montezano AC, De Lucca Camargo L, Persson P, Rios FJ, Harvey AP, Anagnostopoulou A, Palacios R, Gandara ACP, Alves-Lopes R, Neves KB, Dulak-Lis M, Holterman CE, de Oliveira PL, Graham D, Kennedy C, Touyz RM. NADPH Oxidase 5 Is a Pro-Contractile Nox Isoform and a Point of Cross-Talk for Calcium and Redox Signaling-Implications in Vascular Function. *J Am Heart Assoc.* 2018;7(12).
129. Holterman CE, Thibodeau JF, Towajj C, Gutsol A, Montezano AC, Parks RJ, Cooper ME, Touyz RM, Kennedy CR. Nephropathy and elevated BP in mice with podocyte-specific NADPH oxidase 5 expression. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(4):784-797.
130. García JG, Ansorena E, Milagro FI, Zalba G, de Miguel C. Endothelial Nox5 Expression Modulates Glucose Uptake and Lipid Accumulation in Mice Fed a High-Fat Diet and 3T3-L1 Adipocytes Treated with Glucose and Palmitic Acid. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5).
131. Powell SK, Rivera-Soto R, Gray SJ. Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity and expression in gene therapy. *Discov Med.* 2015;19(102):49-57.
132. Petheó 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, Kacskovics 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.
133. Juárez-Rojas L, Casillas F, López A, Betancourt M, Ommati MM, Retana-Márquez S. Physiological role of reactive oxygen species in testis and epididymal spermatozoa. *Andrologia.* 2022;54(4):e14367.

134. Vernet P, Fulton N, Wallace C, Aitken RJ. Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod.* 2001;65(4):1102-1113.
135. Cui XL, Chang B, Myatt L. Expression and distribution of NADPH oxidase isoforms in human myometrium--role in angiotensin II-induced hypertrophy. *Biol Reprod.* 2010;82(2):305-312.
136. Jha JC, Watson AMD, Mathew G, de Vos LC, Jandeleit-Dahm K. The emerging role of NADPH oxidase NOX5 in vascular disease. *Clin Sci (Lond).* 2017;131(10):981-990.
137. Guzik TJ, Chen W, Gongora MC, Guzik B, Lob HE, Mangalat D, Hoch N, Dikalov S, Rudzinski P, Kapelak B, Sadowski J, Harrison DG. Calcium-dependent NOX5 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase contributes to vascular oxidative stress in human coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52(22):1803-1809.
138. Jay DB, Papaharalambus CA, Seidel-Rogol B, Dikalova AE, Lassègue B, Griendling KK. Nox5 mediates PDGF-induced proliferation in human aortic smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(3):329-335.
139. Kleikers PW, Dao VT, Göb E, Hooijmans C, Debets J, van Essen H, Kleinschnitz C, Schmidt HH. SFRR-E Young Investigator Awardee NOXing out stroke: Identification of NOX4 and 5as targets in blood-brain-barrier stabilisation and neuroprotection. *Free Radic Biol Med.* 2014;75 Suppl 1:S16.
140. Ho F, Watson AMD, Elbatreek MH, Kleikers PWM, Khan W, Sourris KC, Dai A, Jha J, Schmidt H, Jandeleit-Dahm KAM. Endothelial reactive oxygen-forming NADPH oxidase 5 is a possible player in diabetic aortic aneurysm but not atherosclerosis. *Sci Rep.* 2022;12(1):11570.
141. Accetta R, Damiano S, Morano A, Mondola P, Paternò R, Avvedimento EV, Santillo M. Reactive Oxygen Species Derived from NOX3 and NOX5 Drive Differentiation of Human Oligodendrocytes. *Front Cell Neurosci.* 2016;10:146.
142. Antony S, Jiang G, Wu Y, Meitzler JL, Makhoulouf HR, Haines DC, Butcher D, Hoon DS, Ji J, Zhang Y, Juhasz A, Lu J, Liu H, Dahan I, Konate M, Roy KK, Doroshov JH. NADPH oxidase 5 (NOX5)-induced reactive oxygen signaling modulates normoxic HIF-1 α and p27(Kip1) expression in malignant melanoma and other human tumors. *Mol Carcinog.* 2017;56(12):2643-2662.

143. Ashizawa N, Shimizu H, Sudo M, Furuya S, Akaike H, Hosomura N, Kawaguchi Y, Amemiya H, Kawaida H, Inoue S, Kono H, Ichikawa D. Clinical Significance of NADPH Oxidase 5 in Human Colon Cancer. *Anticancer Res.* 2019;39(8):4405-4410.
144. Dho SH, Kim JY, Lee KP, Kwon ES, Lim JC, Kim CJ, Jeong D, Kwon KS. STAT5A-mediated NOX5-L expression promotes the proliferation and metastasis of breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 2017;351(1):51-58.
145. Li D, Cao W. Bile acid receptor TGR5, NADPH Oxidase NOX5-S and CREB Mediate Bile Acid-Induced DNA Damage In Barrett's Esophageal Adenocarcinoma Cells. *Sci Rep.* 2016;6:31538.
146. Roy K, Wu Y, Meitzler JL, Juhasz A, Liu H, Jiang G, Lu J, Antony S, Doroshow JH. NADPH oxidases and cancer. *Clin Sci (Lond).* 2015;128(12):863-875.
147. Höll M, Koziel R, Schäfer G, Pircher H, Pauck A, Hermann M, Klocker H, Jansen-Dürr P, Sampson N. ROS signaling by NADPH oxidase 5 modulates the proliferation and survival of prostate carcinoma cells. *Mol Carcinog.* 2016;55(1):27-39.
148. Fu X, Beer DG, Behar J, Wands J, Lambeth D, Cao W. cAMP-response element-binding protein mediates acid-induced NADPH oxidase NOX5-S expression in Barrett esophageal adenocarcinoma cells. *J Biol Chem.* 2006;281(29):20368-20382.
149. Ashizawa N, Shimizu H, Shoda K, Furuya S, Akaike H, Hosomura N, Kawaguchi Y, Amemiya H, Kawaida H, Sudo M, Inoue S, Kono H, Katsurahara K, Shiozaki A, Ichikawa D. NADPH oxidase 5 has a crucial role in cellular motility of colon cancer cells. *Int J Oncol.* 2021;59(2).
150. Laurent V, Toulet A, Attané C, Milhas D, Dauvillier S, Zaidi F, Clement E, Cinato M, Le Gonidec S, Guérard A, Lehuédé C, Garandeau D, Nieto L, Renaud-Gabardos E, Prats AC, Valet P, Malavaud B, Muller C. Periprostatic Adipose Tissue Favors Prostate Cancer Cell Invasion in an Obesity-Dependent Manner: Role of Oxidative Stress. *Mol Cancer Res.* 2019;17(3):821-835.
151. Jones RC, Karknias J, Krasnow MA, Pisco AO, Quake SR, Salzman J, Yosef N, Bulthaupt B, Brown P, Harper W, Hemenez M, Ponnusamy R, Salehi A, Sanagavarapu BA, Spallino E, Aaron KA, Concepcion W, Gardner JM, Kelly B, Neidlinger N, Wang Z, Crasta S, Kolluru S, Morri M, Pisco AO, Tan SY, Travaglini KJ, Xu C, Alcántara-Hernández M, Almanzar N, Antony J, Beyersdorf B, Burhan D, Calcuttawala K, Carter MM, Chan CKF, Chang CA, Chang S, Colville A, Crasta S, Culver RN, Cvijović I,

D'Amato G, Ezran C, Galdos FX, Gillich A, Goodyer WR, Hang Y, Hayashi A, Houshdaran S, Huang X, Irwin JC, Jang S, Juanico JV, Kershner AM, Kim S, Kiss B, Kolluru S, Kong W, Kumar ME, Kuo AH, Leylek R, Li B, Loeb GB, Lu WJ, Mantri S, Markovic M, McAlpine PL, de Morree A, Morri M, Mrouj K, Mukherjee S, Muser T, Neuhöfer P, Nguyen TD, Perez K, Phansalkar R, Pisco AO, Puluca N, Qi Z, Rao P, Raquer-McKay H, Schaum N, Scott B, Seddighzadeh B, Segal J, Sen S, Sikandar S, Spencer SP, Steffes LC, Subramaniam VR, Swarup A, Swift M, Travaglini KJ, Van Treuren W, Trimm E, Veizades S, Vijayakumar S, Vo KC, Vorperian SK, Wang W, Weinstein HN, Winkler J, Wu TTH, Xie J, Yung AR, Zhang Y, Detweiler AM, Mekonen H, Neff NF, Sit RV, Tan M, Yan J, Bean GR, Charu V, Forgó E, Martin BA, Ozawa MG, Silva O, Tan SY, Toland A, Vemuri VNP, Afik S, Awayan K, Botvinnik OB, Byrne A, Chen M, Dehghannasiri R, Detweiler AM, Gayoso A, Granados AA, Li Q, Mahmoudabadi G, McGeever A, de Morree A, Olivieri JE, Park M, Pisco AO, Ravikumar N, Salzman J, Stanley G, Swift M, Tan M, Tan W, Tarashansky AJ, Vanheusden R, Vorperian SK, Wang P, Wang S, Xing G, Xu C, Yosef N, Alcántara-Hernández M, Antony J, Chan CKF, Chang CA, Colville A, Crasta S, Culver R, Dethlefsen L, Ezran C, Gillich A, Hang Y, Ho PY, Irwin JC, Jang S, Kershner AM, Kong W, Kumar ME, Kuo AH, Leylek R, Liu S, Loeb GB, Lu WJ, Maltzman JS, Metzger RJ, de Morree A, Neuhöfer P, Perez K, Phansalkar R, Qi Z, Rao P, Raquer-McKay H, Sasagawa K, Scott B, Sinha R, Song H, Spencer SP, Swarup A, Swift M, Travaglini KJ, Trimm E, Veizades S, Vijayakumar S, Wang B, Wang W, Winkler J, Xie J, Yung AR, Artandi SE, Beachy PA, Clarke MF, Giudice LC, Huang FW, Huang KC, Idoyaga J, Kim SK, Krasnow M, Kuo CS, Nguyen P, Quake SR, Rando TA, Red-Horse K, Reiter J, Relman DA, Sonnenburg JL, Wang B, Wu A, Wu SM, Wyss-Coray T. The Tabula Sapiens: A multiple-organ, single-cell transcriptomic atlas of humans. *Science*. 2022;376(6594):eabl4896.

152. Cervenak J, Bender B, Schneider Z, Magna M, Carstea BV, Liliom K, Erdei A, Bosze Z, Kacs Kovics I. Neonatal FcR overexpression boosts humoral immune response in transgenic mice. *J Immunol*. 2011;186(2):959-968.

153. Schneider Z, Cervenak J, Baranyi M, Papp K, Prechl J, László G, Erdei A, Kacs Kovics I. Transgenic expression of bovine neonatal Fc receptor in mice boosts

immune response and improves hybridoma production efficiency without any sign of autoimmunity. *Immunol Lett.* 2011;137(1-2):62-69.

154. 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.

155. Pandey D, Patel A, Patel V, Chen F, Qian J, Wang Y, Barman SA, Venema RC, Stepp DW, Rudic RD, Fulton DJ. Expression and functional significance of NADPH oxidase 5 (Nox5) and its splice variants in human blood vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;302(10):H1919-1928.

156. Sirokmány G, Pató A, Zana M, Donkó Á, Bíró A, Nagy P, Geiszt M. Epidermal growth factor-induced hydrogen peroxide production is mediated by dual oxidase 1. *Free Radic Biol Med.* 2016;97:204-211.

157. Ou WJ, Cameron PH, Thomas DY, Bergeron JJ. Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature.* 1993;364(6440):771-776.

158. BelAiba RS, Djordjevic T, Petry A, Diemer K, Bonello S, Banfi B, Hess J, Pogrebniak A, Bickel C, Görlach A. NOX5 variants are functionally active in endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2007;42(4):446-459.

159. Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol.* 2015;6:260-271.

160. Reyes-San-Martin C, Hamoh T, Zhang Y, Berendse L, Klijn C, Li R, Llumbet AE, Sigaeva A, Kawałko J, Mzyk A, Schirhagl R. Nanoscale MRI for Selective Labeling and Localized Free Radical Measurements in the Acrosomes of Single Sperm Cells. *ACS Nano.* 2022;16(7):10701-10710.

161. Keshtgar S, Ghani E. Impact of calcium and reactive oxygen species on human sperm function: Role of NOX5. *Andrologia.* 2022;54(8):e14470.

162. Vatannejad A, Tavilani H, Sadeghi MR, Karimi M, Lakpour N, Amanpour S, Shabani Nashtaei M, Doosti M. Evaluation of the NOX5 protein expression and oxidative stress in sperm from asthenozoospermic men compared to normozoospermic men. *J Endocrinol Invest.* 2019;42(10):1181-1189.

163. Kampfer C, Saller S, Windschüttl S, Berg D, Berg U, Mayerhofer A. Pigment-Epithelium Derived Factor (PEDF) and the human ovary: a role in the generation of ROS in granulosa cells. *Life Sci.* 2014;97(2):129-136.
164. Mahbouli S, Der Vartanian A, Ortega S, Rougé S, Vasson MP, Rossary A. Leptin induces ROS via NOX5 in healthy and neoplastic mammary epithelial cells. *Oncol Rep.* 2017;38(5):3254-3264.
165. Jha JC, Banal C, Okabe J, Gray SP, Hettige T, Chow BSM, Thallas-Bonke V, De Vos L, Holterman CE, Coughlan MT, Power DA, Skene A, Ekinici EI, Cooper ME, Touyz RM, Kennedy CR, Jandeleit-Dahm K. NADPH Oxidase Nox5 Accelerates Renal Injury in Diabetic Nephropathy. *Diabetes.* 2017;66(10):2691-2703.
166. Chen F, Yin C, Dimitropoulou C, Fulton DJ. Cloning, Characteristics, and Functional Analysis of Rabbit NADPH Oxidase 5. *Front Physiol.* 2016;7:284.

10. Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció 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, Bósze Z, Geiszt M. Disruption of the NOX5 Gene Aggravates Atherosclerosis in Rabbits. *Circ Res.* 2021;128(9):1320-1322. IF: 23.218

11. Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom témavezetőimnek, Geiszt Miklósnak és Petheő Gábornak, az elmúlt években eltöltött közös munkáért. Kifogyhatatlan ötleteikkel és töretlen optimizmusukkal mindig bátran vágunk bele új kísérletekbe. Megbeszéléseink alkalmával volt lehetőségem elsajátítani a tudományos szemlélet és a kritikus gondolkodás alapjait. Kísérleteim során mindig számíthattam támogató, javító észrevételeikre, amelyekkel a fejlődésemet szolgálták. Szeretnék kiemelten köszönetet mondani azért, hogy az itt eltöltött évek alatt rutint szerezhettem a molekuláris biológia gyakorlásában.

Szeretném megköszönni a Geiszt labor minden tagjának a PhD hallgató éveim alatt nyújtott támogatását. Korábbi témavezetőmnek, Sirokmány Gábornak, amiért bevezetett és megszerettette velem a molekuláris biológia alapjait. Hálás vagyok Pató Annának, Kovács Hajnalnak, Veronika Pape-nak és Balázs Bernadettnek, amiért segítettek a mindennapi munkámat, megosztották velem tapasztalataikat és szakmai iránymutatásaikat. Szeretném megköszönni a munkáját Molnár Beátának, Bodor-Kis Barbarának, Tóth-Kun Reginának és Ludmán Eszternek. Alapjaiban járultak hozzá, hogy elkészüljön ez az értekezés, segítségükre mindig számíthattam.

Köszönöm Hunyady Lászlónak és Mócsai Attilának, az Élettani Intézet volt és jelenlegi igazgatóinak, hogy lehetővé tették a munkámat. Köszönöm továbbá Ligeti Erzsébetnek és Hunyady Lászlónak, hogy doktori programvezetőként, Enyedi Péternek pedig, hogy a Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola vezetőjeként segítettek munkámat.

Köszönöm az Élettani Intézet minden munkatársának a támogatását a munkámhoz. Egy olyan légkört teremtettek, amiben bárkitől nyugodtan kérhettem segítséget és a mindennapi kísérletezést megkönnyítették. Megtisztelő volt dolgozni egy ilyen ösztönző közösségben.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani a Családomnak. Támogatásuknak és türelmüknek, amelyekkel végig kísértek ezen az izgalmas és felfedezésekkel teli úton.

Függelék

```
GGTGATGGTGATGATGACCGGTACGCGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGGCTTA
CCTTCGAACCGCGGGCCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCACTGTGCTGGATATCTGCAGAATTGCCCT
TCGATGGGAAACTGGGTGGTTAATCACTGGTTCTCAGTTTTGATTCTGGTTATTTGGTTTGGACTCA
ACGTTTTCTTGTGTGCAAGCATTCTGCAATATGAGACGGACGACAAGTACTACTACACAAGGG
AAATCCTTGGGTCTGCATTGGCCTGGGCCCAGCCTCTGCTCGCTGCTTGAATTATAACAGCATGCT
GATCCTGGTTCCTGTGTGCAATCTGCTGCTCCTTCGTGAGGGGCACCTGCTCATTTCAGTCGA
ACACTGAGAAAGCCATTGGATCACAATCTGACCTTCCACAAGCTGGTGGCGTATATGATCTGCCTC
CTCACAGCTGTTATATAATCGCACACCTGTTAACTTTGAACGCTACAGCAGAAGCCGGCGGGCC
ACAGATGGATCCCTGGCCTCTGTTCTCTAACTATCTCATCATGGGAAGGAAGGAGATGCTTGG
CTAAATCCCATTCCATCCAGACACGACATTGTTGTATGTGACGTTTACCAGCATTGCTGGTCTCAC
AGGAGTTATTATCAGATAGCCTTGATTCTCATGGTAACTTCAGCTGTGGAGTTTATCCGGAAGCAT
TATTTGAGGTCTTCTGGTATACTACCACCTCTTCATCATCTATATCATTGGCTTAGTGATTATGGT
GTTGGTGGAAATTGTCGAGGTCAAACGAAGAAGAGCATGGAGGAGAGCCATCCTCATGAATGTGC
AGAATCTTTGAGAAAGTGGGATGATCCTGACCATCACTGTAGGCATCCTCAGTTTGAAGGGCACTT
CCCTCAGTCTTGGGAGTGGATCCTTGCACCATGCATTCTTATGCCTTTGAAAGGATCCTCCGTTCT
ATCGTCCCAGCAGAAGGTTGTGATTACCAAGGTGATCATGCACCCATCAAAGTTTTGGAATTGC
AGATGAAGAAGCGCGGTTTCAGCATGGAAGTGGGGCAGTACGTCTTCGTTAATTGCCCTCAATCT
CTTTCCTGGAGTGGCATCCCTTACTCTGACCTCTGCTCCAGAGGAAGATTTCTTCTCCATTATGTC
CGAGTAGCAGGGGACTGGACAGAAAACTCATCAAGGCTTTGAAACAACAGAAGTTACCACTACC
CAGAATTGAGGTAGATGGTCCCTTGGCACAGTCAGTGAGGATGTTTTCCAGTATGAGGTGGCTAT
GCTGATTGGAGCAGGAATTGGGGTCACTCCCTTGGCTTCATCTTCAAATCCATCTGGTACAAATC
CAGCGTGCTGACCACAACTCAAACCCAAAAGATCTATTTCTACTGGATCTGCAGGGAGACAGGT
GCCTTGCCTGGTTCAATGACCTGTTGAATCCCTGGAAAAGGAAATGGAGGAATTGGGCAAAGT
GGGTTTTCTAACTACCGTCTCTCCTCACCAGGATGGGATAGCAACATTGTTGGCCATGCAGCAATA
AACTTTGACAAGGCCACTGACATCTTGACAGGTTTGAACAGAAAACTCCTTGGGAGACCAATG
TGGGACAATGAGTTCTCTACTATAGCTACTGCCACCCAAAGTCTGTGGTGGGGTTTTCTTATGTG
GTCCTCAAGGTTTGGCAAAGAGCCTGCGCAAATGCTGTCAACGACACTCCAGTCTGGATCCTAGGA
AGGTTCAATTCTACTTCAACAAAGAAAATTTCTGAATTGCAGTAATGAGGATGGAAGGGCAATTCC
ACCACACTGGACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGC
```

1. ábra: Nyúl vastagbélből megklónozott NOX1 szekvenálási eredménye, kiemelve a fehérjekódoló szekvencia.

```
GTGATGGTGATGATGACCGGTACGCGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATA
GGCTTACCTTCGAACCGCGGGCCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCCACTGTGCTGGATAT
CTGCAGAATTGCCCTTATGGGGAAC TGGGTTGAGAATGAAGGACTCTCCATCTTCGTT
ATTTTCGTTTGGCTGGGGCTGAACGCTTCCCTCTTTGTGTGGTACTACTGGGTTTATGC
TTTTGAAAGAAGTATTATTATACTACAAAAC TCTTGGGGCAGCACTGCCATTGGCC
AGGGCCCCAGCAGCCTGCCTGAACTTCAACTGCCTGCTGATCCTGCTTCCAGTCTGTC
GAAATCTGCTCTCTTTTCTCAGGGGTTCCAGTGCCTGCTGCTCAACAAGAATTCGAAG
ACAAC TGGACAGAAATCTCACTTTTCA TAAAATGGTGGCATGGATGATTGCACTTCATT
CTGCGATTACACAATTGCACATCTATTCAATGTGGAGTGGTGTGTGAATGCCCGAGT
CAACAATTCTGATAGTTACTCGATAGCACTCTCTGAAATTGGGGACAAAAGAATGAA
ACTTACCTCAATTTTGTTCGAGAGAGAATCAAGAACCCTGAAGGAGGCCGTTAGTGG
CTGTAACGCGGTTGGCAGGCGTCACTGGAATTATCATCACACTGTGCCTCATACTTAT
CATCACATCCACCACAAAATCATCCGGAGGCTTACTTTGAAGTGT TTTGGTACACAC
ACCATCTCTTCGTCATA TTCCTTCA TTGGTCTTGCCATCCATGGAGCTGAACGAATTGTA
CGTGGGCAAAC TGAAGAGATTCTGAAGAAACATGATCCAGTGAATGTGTGAGCAACAT
ATCTCAGATTGGGGAAAGATAAAGGACTGCCCTGTCCCAGAA TTTCTTGAAACCCCTC
CTATGACCTGGAAATGGATAGTGGGTCCCATGTTCC TATACTCTGTGAGAGGTTGGT
CCGGTTTTGGCGATCTCAGCAGAAGGTGGTCA TCACCAAGGTGGTCACTCACCCTTTC
AAAACCA TTGAACTACAAA TGAAGAAGAAAGGATTCAAGATGGAGGTGGGACAATAT
ATTTTTGTCAAGTGCCCCACGGTGTCCAAGCTGGAATGGCACCC TTTACACTGACCT
CTGCCCTGAAAGAAGACTTCTTTAGCATCCATATCCGCATCGTGGGGGACTGGACAG
AGGGGCTGTTCAATGCTTGTGGCTGTGATAAGCAGGAGTTTCAAGATGCATGGAAACT
ACCTAAGATAGCAGTTGATGGGCCCTTTGGCACAGCAAGTGAAGATGTGTT CAGCTAT
GAGGTGGTGA TGTTAGTGGGAGCAGGAATTGGGGTCACGCCCTTTGCATCCATCCTC
AAGTCAGTCTGGTACAAATATTGTGACAATGCCACGAATCTGAGGCTCAAAAAGATCT
ACTTCTACTGGCTGTGCCGTGACACACATGCCTTTGAGTGGTTTGCAGACTTGC TGCA
GCTGCTGGAGACACAGATGCAGGAGAGGAACAATGCTGGCTTCCTCAGCTACAACAT
CTATCTCACCGGCTGGGATGAGTCCCAGGCCAATCACTTTGCTGTGCACCATGATGAG
GAGAAAGATGTGATCACAGGCTGAAACAAAAGACACTGTATGGACGACCCAACTGG
GATAATGAGTTCAAGACAATTGCAAGTCAACACCCTAATACCAGAA TAGGAGTTTTCC
TCTGTGGACCTGAAGCCTTGGCTGAAACCCCTCAGTAAACAGAGCATCTCCA ACTCTGA
GTCTGGCCCTCGGGGAGTGCAC TTCA TTTTCAACAAGGAAAAC TTTCTGATT CATCCCA
CTACGAGAAGGGCAATTCCACCACACTGGACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCT
ANN
```

2. ábra: Nyúl lépből megklónozott NOX2 szekvenálási eredménye, kiemelve a fehérjekódoló szekvencia.

```
NNAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATTGCCCTTGCATG
GATGTGTCCTGGAGAAGCTGGCTGGCCAACGAAGGGGTTAAACACCTCTGCCTGCTC
ATCTGGCTTTCCCTGAAATGGTCTGCTTTTCTGGAAAACCTTCCTGCTGTATAACCAAGG
GCCAGAGTACCATTACCTCCACCAGATGTTAGGCCCTAGGATTGTGCTAAGCAGAGCC
TCCGCATCTGTTCTTAACCTCAATTGCAGCCTCATCCTTTTACCCATGTGCCGAACACT
CCTGGCTTACCTTCGGGGATCCCAGAAGGTCCAAGCAGGAGAACAAGAAGAGTGT
GGATAAGAGCAGAACAATCCATATAACTTGTGGTGTCACTATCTGTATTTTCTCAGGTG
TGATGTGGCTGCCCATCTGGTGAATGCCCTCAACTTCTCAGTGAAC TACAATGAGGA
TTTTATTGAACTGAATGCAGCAAGATACCGAGATGAGGATCCTAGAAAGCTTCTCTTC
ACAAC TGTTCCTGGCCTGACAGGAGTCTGCATGGTAATGGTGTCTATTCCATGGTTA
CAGCTTCTACTTATGCAATAAGAGTTTCTAACTATGACATCTTCTGGTATACTCATAAC
CTCTTCTTTGCTTCTACATGCTGCTGATGTTGCATGTGTGTCAGGGGGGCTGCTGAAGTA
TCAAAC TAAATTTAGATACCCACCCTCCTGGCTGCATCAGTCTTAACCAAAC TACCATC
AAGACATTTCTCGCCATTGCATCACTCAGAACATTTGCCCTGGATCTTTCTGGGAGAA
TTTTCAA AACGAGAAGAACTTGCTCAGAACACATTCATGAAGATTTGTGTGGAAGGGC
CCAGATTCGAGCTACTTTTCCACAGACTTGGCTTTGGA TTTCTGGACCTTTGTGCC TA
TACTGTGCCGAAAGACTTTA TAGGTG TATTCGGAGCAATAAAC CAGTCACCATCCTCT
CAGTTATAAGTCATCCC TCAGATGTCA TGGAAA TCCGAATGGTCAAAGAAAATTTTAA
AGCAAGACCTGGCCAGTATGTTATTTCTGCATTGTCCCAGTGTGCTGCATTAGAAAAC
CATCCC TTTACCCTCACAATGTGTCTACAGAAAAAAAAGCAACATTTGGAGTCCATC
TTAAAATAGTAGGAGACTGGACAGAACGATTCCGAGATTTACTGCTGCCTCCATCTAG
TCAAGACTCTGAGATTCTGCCGTTCAATCAAAC TAGAAAATTACCCAAAGCTATACATA
GATGGTCCATTTGGAAGTCCATTTGAGGAGTCACTGAACTATGAGGTCAGCCTGTGCG
TGGCTGGAGGCATTGGAGTACTCCTTTTGCATCGATACTCAACACCCTGCTGGATGA
CTGGAAGCCGTACAAACTTAGAAGACTGTATTTTATTTGGGTGTGCAGAGACATCCAA
TCCTTCTGTTGTTTGCAGACTTACTCTGCATGTTATATAACAAGTTTTGGCAAGAGAA
CAGACCTGACTATGTCAACATCCAGCTGTACCTCAGTCAAACAGATGGGATTCAGAAG
ATAATTGGAGAAAAATACCATGCATTGAATTC AAGACTTTTTATTGGGCGTCTCAGTG
GAAACTTCTATTTGATGAAATAGCAAAAATATAACAGAGGGAAAACAGTTGGTGTCTTC
TGCTGCGGACCCAATTCAC TTTCCAAGATTCTTTCATAAACTGAGTAACCAAAGCAACT
CATATGGGACAAGATTTGAATACAATAAAGAATCTTT CAGCTGAAAATCTGAGAAGAAC
CAGGACTCTAAAGAAGGAATGTGTGCAAGGGCAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGG
CGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGCGGTT CGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTC
CTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTCATCATCACCATCACCAN
```

3. ábra: Nyúl veséből megklónozott NOX4 szekvenálási eredménye, kiemelve a fehérjekódoló szekvencia.