

## A DUOX1 FUNKCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA KERATINOCITA SEJTVONALBAN

Pató Anna, Geiszt Miklós, Sirokmány Gábor

Peroxidáz enzimek munkacsoport, Semmelweis Egyetem Élettani Intézet

Korábbi eredményeink szerint HaCaT humán keratinocita sejt kultúrában a NADPH oxidázok családjába tartozó fehérjék közül a dual oxidáz 1 (Duox1) fehérje van jelen legnagyobb mennyiségben. Ez az enzim felelős a sejtben kiváltott  $Ca^{++}$ -jelek által indukált hidrogén peroxid termelődésért. A Duox1 által termelt peroxid *in vivo*, légúti epitel sejtekben a laktoperoxidáz (LPO) enzimnek is szubsztrátja lehet. Célunk volt, hogy létrehozzunk egy genetikailag Duox1 hiányos, *knockout* keratinocita sejt vonalat. Ehhez a CRISPR nevű génszerkesztési technikát alkalmaztuk. A Duox1 módosításra tervezett CRISPR konstrukttal transzfektált sejteket a konstrukttal GFP expressziója alapján áramlási citometria alapú sejtválogatással azonosítottuk, a kiválasztott sejtekből klónokat növesztettünk. A klónokban a génszerkesztés megtörténtét Surveyor nukleáz elemzés segítségével ellenőriztük, a pozitív klónokból izolált genomiális DNS-t szekvenálással ellenőriztük. A sejt klónok Duox1 expressziójának meglétét vagy hiányát mRNS és fehérje szinten is ellenőriztük illetve megmértük a sejtek  $Ca^{++}$ -jelre mutatott  $H_2O_2$  termelését mind fluorimetriás, mind mikroszkópos, biotin-tyramid jelöléses technikákkal. Ezen mérésekkel Duox1 *knockout* sejt klónokat azonosítottunk, melyek működését a továbbiakban a génmódosítást nem tartalmazó, kontroll sejt vonallal összehasonlítva tudjuk elemezni. Ezáltal a Duox1 keratinociták jelátvitelében, autokrin és parakrin működéseiben játszott szerepét, illetve az LPO-val való együttműködését érthetjük meg.