

36. OTDK Biológia szekció

Transzgenikus Glyoxalase 1 túltermelő törzsek előállítása és az AGE-RAGE útvonal vizsgálata Drosophila Huntigton kór modellben

Generation of Glyoxalase 1 overexpressing transgenic lines and the analysis of the AGE-RAGE pathway in a Drosophila model of Huntington's disease

Borosta Roberta
Biológia BSc III. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Témavezető: Dr. Bodai László
tanszékvezető egyetemi docens

Szeged
2022

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	4
1.1 A Huntington-kór	4
1.2 Az AGE-RAGE útvonal.....	6
1.3 A <i>Glyoxalase 1</i> gén	8
2. CÉLKITŰZÉSEK	10
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	11
3.1. RNS izolálása <i>Drosophila melanogaster</i> mintából	11
3.2. Nukleinsav vizsgálat NanoDrop 1000 spektrofotométerrel	11
3.3. Reverz transzkripció.....	12
3.4. Primerek hígítása Polimeráz Láncreakcióhoz (PCR).....	12
3.5. Templát felsokszorosítása Polimeráz Láncreakcióval (PCR)	13
3.6. Agaróz gélelektroforézis	14
3.7. DNS tisztítása és koncentrálása.....	14
3.8. CloneJET PCR klónozás	15
3.9. <i>E. coli</i> sejtek transzformálása	15
3.10. <i>E. coli</i> sejtek szélesztése.....	15
3.11. <i>E. coli</i> folyadék kultúra indítása.....	16
3.12. Plazmid DNS tisztítás.....	16
3.13. Restrikciós emésztés	17
3.14. DNS izolálása gélből.....	17
3.15. DNS mennyiségének fluorometriás meghatározása:.....	18
3.16. DNS inszert ligálás.....	18
3.17. LR Rekombinációs reakció	19
3.18. Midi prep	19
3.19. <i>Drosophila</i> törzsek és fenntartásuk	20
3.20. Kvantitatív PCR	20

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	22
4.1 A <i>Glyoxalase 1 (Glo1)</i> gént túltermelő <i>Drosophila</i> törzsek létrehozása	22
4.1.1. A <i>Glo1</i> kódoló szekvenciájának klónozása pJET 1.2/blunt vektorba	22
4.1.2. A <i>Glo1</i> kódoló szekvenciájának klónozása pENTR3C vektorba.....	25
4.1.3. A <i>Glo1</i> kódoló szekvenciájának klónozása pTWF.attB vektorba.....	26
4.1.4. Transzgeikus pTWF.attB– <i>Glo1</i> konstrukciót hordozó <i>Drosophila melanogaster</i> létrehozása	27
4.2 Az AGE-RAGE útvonal jelátviteli komponenseinek transzkripció aktivitásának vizsgálata HD modellben	29
4.2.1. Htt-Q120 és Htt-Q25 cDNS minták előállítása.....	30
4.2.2. Az AGE-RAGE útvonalba eső gének transzkripció aktivitásának meghatározása	30
5. ÖSSZEFOGLALÁS.....	33
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	34
IRODALOMJEGYZÉK.....	35
FÜGGELÉK.....	37

1. BEVEZETÉS

1.1 A Huntington-kór

A Huntington-kór (*Huntington's Disease*, HD) egy ritka neurodegeneratív betegség, amelyet 1872-ben írt le először George Huntington^{1,2}. A betegséget a Huntingtin proteint kódoló *huntingtin* (HTT) gén kódoló szekvenciájában található CAG ismétlődés meghosszabbodása okozza, aminek eredményeképpen mutáns fehérje termelődik. Ez az idegrendszeri megbetegedés autoszómális domináns öröklődésű, a beteg egyén 50%-os eséllyel adja át a hibás allélt utódainak. Egy érdekes jelenség a kórhoz kapcsolódóan az, hogy a generációról generációra való öröklődés során (főleg ha a férfi a betegség hordozója) a betegség kialakulásának életkora egyre csökken.

A HD egy progresszív, felnőttkorban manifesztálódó betegség, általában 35 és 44 éves kor között jelentkeznek az első tünetei, ezután átlagosan 15-18 év múlva vezet a fokozatosan súlyosbodó betegség a beteg halálához. Az esetek 5-10%-ában beszélhetünk fiatalkori Huntington-kórrol is, ilyenkor az első tünetek már 20 éves kor előtt jelentkeznek, és gyakran súlyosabbak is az átlagnál.³ A betegséghez leginkább motoros, pszichiátriai és kognitív zavarok társulnak. Egyik jellegzetes tünete a chorea, melyet akaratlan izomrángások jellemeznek, amik a kor előrehaladtával egyre súlyosbodnak. A Huntington-kór első szakaszára a hiperkinézia fázisa jellemző, melynek során a beteg gyakran túlzott, és abnormális mozgásokat végez, aminek hátterében a kór sajátsága, a motoros funkciók zavarai állnak. Azonban az idő előrehaladtával a hiperkinézist bradikinézia váltja fel, hypokinézis, lelassultság, rigiditás, egyensúly-, és járászavarok jellemzik a beteget. Néha szemizom bénulás, hyperreflexia és beszédzavar is megfigyelhető az érintetteken.⁴ A prodromális szakaszban gyakoriak az enyhe változások, mint például a személy viselkedésének megváltozása, a kognitív és motoros funkciók enyhe romlása. Ez magyarázatot nyújt az új dolgok tanulásában való nehézségre, memóriazavarra illetve akaratlan arcmozgásokra, grimaszokra is. Apátia, depresszió, agresszió, és ingerlékenység, az egyén személyiségének megváltozása, később pedig pszichózis és szuicid hajlamok is gyakran előfordulnak, mint pszichiátriai tünetek a betegség során.^{5,6}

A Huntington-kór létrejöttéért a 4. kromoszómán található *huntingtin* (HTT) génben lévő CAG ismétlődés expanziója a felelős. Egészséges személyeknél a CAG ismétlődések száma 9-36 között változik, 36 és 39 ismétlődés között csökkent penetrancia jellemző, 39 ismétlődés fölött viszont a betegség biztos megjelenése figyelhető meg. Összefüggést lehet felfedezni a

poliglutamint kódoló CAG ismétlődések számának, és az első tünetek megjelenésének ideje között: minél hosszabb a poliglutamint kódoló ismétlődő régió, annál előbb fejeződik ki a kór a betegekben. A beteg génről mutáns *Huntingtin* fehérje (*mHTT*) fehérje termelődik, amely meghosszabbodott poliglutamin láncsal rendelkezik. Ez egy funkciónyeréses mutáció, mivel minél hosszabb az ismétlődések száma a génen, és ezáltal a poliglutamin lánc a fehérjében, a betegség lefolyása annál súlyosabb és gyorsabb.⁷ A mutáns *Huntingtin* fehérje hajlamos abnormális aggregátumokat képezni, és hatással van a sejtek proteosztázisára, transzkripciójára, transzlációjára, az axonális transzportra, illetve a mitokondriális és szinaptikus funkciókra is. Ezek mind olyan mechanizmusok, amelyek neuronális diszfunkcióhoz, és a betegség kialakulásával halálhoz vezetnek. A striátumban található közepes tüskés idegsejtek (medium spiny neurons; MSNs) szelektíven érzékenyek a mutáns *Htt* fehérje hatásaira. A betegség elején manifesztálódó hiperkinetikus fenotípust, és a későbbi szakaszra jellemző hypokinetikus fenotípust is az MSN-ek leépülése okozza.⁸ A betegség során továbbá nem csak a striátum, hanem a nagyagykéreg is sérül, itt a degeneráció főleg a motoros és premotoros területeken található agykérgi piramissejteket (cortical pyramidal neurons; CPNs) érinti. Fontos azonban megjegyezni, hogy a neuronális funkciókban történő változás jóval előbb megfigyelhető, mint az idegsejtek pusztulása, ami arra enged következtetni, hogy a korai tünetek hátterében ezek a megváltozott funkciók állnak.⁹

A vad típusú *Htt* fehérje valódi funkciói máig sincsenek teljesen feltérképezve, de annyi bizonyos, hogy *scaffold*-szerű funkciót tölt be, főleg az N terminálisán rendelkezik sok interakciós felülettel, és más fehérje komplexeket koordinál. Alapvetően egy citoplazmatikus fehérje, amely sok poszt-transzlációs módosításon esik át, és szerepet játszik a vezikuláris transzportban, gén transzkripcióban és kölcsönhat egyéb transzkripciós faktorokkal is.¹⁰

Sajnos a Huntington-kórt sem megelőzni, sem gyógyítani nem tudjuk, de kísérletek folynak a velejáró tünetek enyhítésére, esetleges terápiák létrehozására. A *Tetrabenazine* az egyik erre alkalmazott vegyület, amely ráadásul az egyetlen engedélyezett használatú gyógyszer a choreával szemben. Ez egy szinaptikus vezikuláris amintranszport gátlószer, amely valóban csökkenti az akaratlan mozgásokat, de súlyos mellékhatásokkal járhat, mint például a szerotonin lecsökkent mennyisége miatti depresszió, szorongás és az ezek miatti öngyilkosság. A *deutetrabenazine* a *Tetrabenazine* módosított változata, amely deutérium izotópokat tartalmaz, és szintén a choreát hívatott mérsékelni. Pozitívuma, hogy kevesebb mellékhatással jár, mint a *Tetrabenazine* (pl. aluszékonyság, depresszió). Ígéretesek még ezen

kívül a DNS és RNS célzott terápiák, melyeknek céljuk a mutáns Huntingtin fehérje szintjének csökkentése, a *mHtt* gén DNS vagy RNS-ének targetálásával.^{8,11}

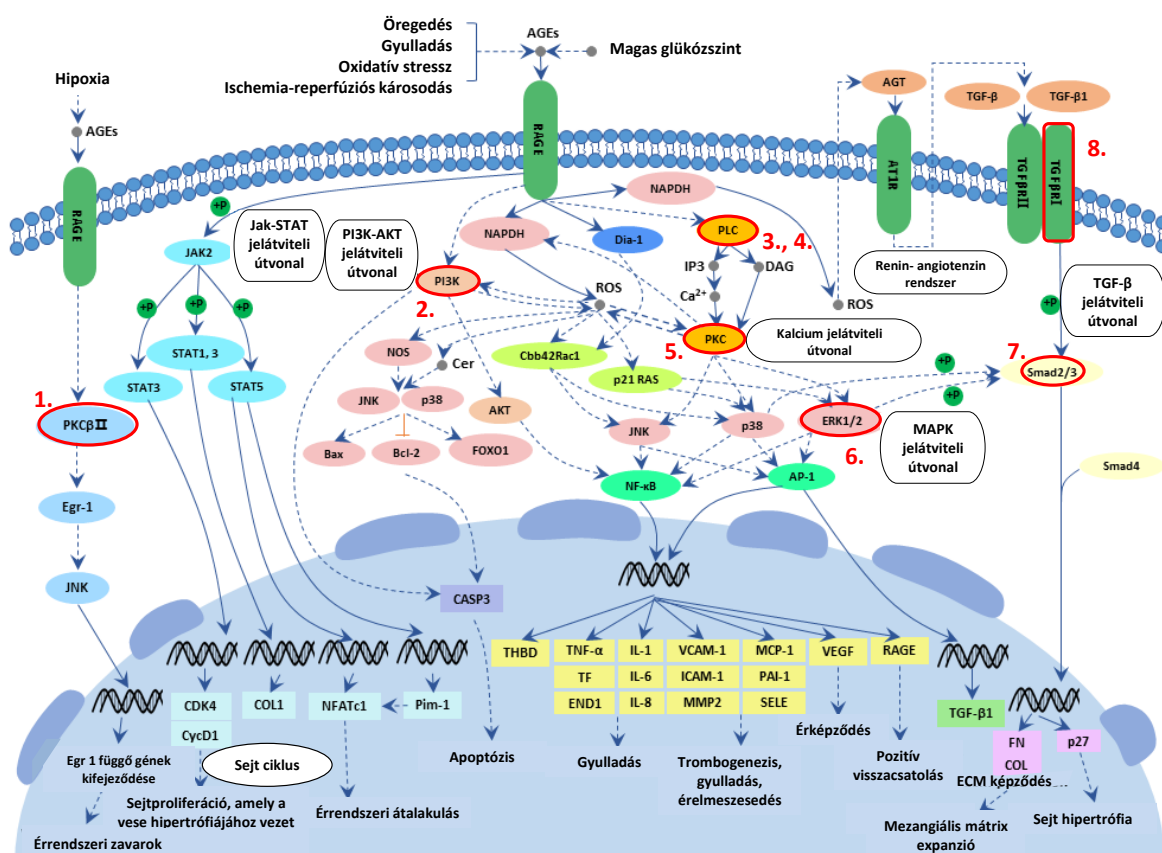
1.2 Az AGE-RAGE útvonal

Az öregedés során, az előrehaladott glikáció miatt felhalmozódnak az előrehaladott glikációs végtermékek (advanced glycation end products, AGEs). Változatos csoport, több mint 20 féle ilyen makromolekulát írtak már le. Az ismert molekulák közé tartozik például a karboxietil-lizin (CEL), és a karboximetil-lizin (CML) amely nem csak az első felfedezett, de az egyik leginkább vizsgált AGE-ek egyike is, a pentozidinnel együtt.¹² Az előrehaladott glikációs végtermékek külsőleg is bejuttathatóak (például egyes ételekkel, és dohánytermékekkel), de az élő szervezetben is folyamatosan termelődnek, a fehérjék és lipidek nem-enzimatis glikációja (Maillard reakció) során. A képződésük fel is gyorsul a korrallal, illetve neurodegeneráció, cukorbetegség, veseelégtelenség, gyulladás, és egyéb rendellenességek során is. A metilglioxál (MGO), amely az egyik fontos mellékterméke a glikolízisnek, a treonin-katabolizmusnak és a ketontest képződésnek, a reaktív oxigén származékok (ROS) egyik forrása, és felelős az AGE-ek képződéséért is.¹³

A RAGE (receptor for advanced glycation end products) az AGE-ek fő sejtfelszíni jelátviteli receptora, mennyiségüktől függően képes őket kötni. Az AGE-ek mellett Box1, Mac-1, és amyloid- β peptideket is köt, és főleg az oligomer formájukat. A gyulladáson és oxidatív stresszen kívül az AGE-ek a RAGE receptorhoz való kapcsolódása stimulálja a NADPH oxidázt, és így növeli a ROS termelődését. Az AGE-RAGE interakció ezen kívül génexpresszió modulálásért, és intracelluláris transzkripciós faktorok aktiválásáért is felelős. Ilyen faktor például a nuclear factor- κ B (NF- κ B) amely pedig gyulladáskeltő citokinek, és szintén ROS képződését indukálja.¹⁴ (1. ábra)

Alzheimer-kórban (*Alzheimer's disease*, AD) amyloid- β kötődik a RAGE receptorhoz. Az AD során a RAGE receptor kifejeződik a neuronokon, asztrocitákon és mikrogliaon is. Sejtkultúrákon vizsgálódva azt találták, hogy az amyloid- β és RAGE interakciója neurotoxikus hatású, indukálja a makrofág-kolónia stimuláló faktor (M-CSF) expresszióját, az NF- κ B és a kaszpáz 3 aktiválását, és a DNS fragmentációját is, amely aztán tartós mikroglia aktivációhoz, és a neuronok RAGE-függő apoptózisához vezet. Ezen kívül megfigyelték még az amyloid- β RAGE mediálta felhalmozódását is a vér-agy gáton keresztül.¹⁵ Az AGE, RAGE-hez való kötődése ezenkívül még számos más jelátviteli útvonalat aktivál, többek között a JAK-STAT, Pi3K-Akt, MAPK, NF- κ B, TGF- β és Kalcium jelátviteli útvonalakat is (1. ábra).¹⁶

Az AGE-RAGE a Huntington-kórban is közrejátszik, a betegség romlását idézi elő, mivel a glikáció a fehérjék aggregálódását és lerakódását eredményezi. Az AGE-ek korral járó felhalmozódása változást eredményez a fehérjék struktúrájában és funkciójában is, ezzel növeli a proteosztázis károsodásának kockázatát, és az életkorral összefüggő rendellenességek kialakulásának kockázatát is.¹⁷ HD betegekben, akárcsak az AD betegekben is, RAGE receptor fejeződik ki az asztrocitákon és a közepes tüskés projekciós neuronokon, a nucleus caudatus (CN) területén. A RAGE-ek eloszlása a neuronokon korrelál a betegség során megfigyelhető sejthalállal.¹⁵



1. ábra: Az AGE-RAGE jelátviteli útvonal sematikus ábrája.¹⁶

Az ábra az emberben megtalálható jelátviteli komponenseket tartalmazza, tehát az általunk vizsgált *Drosophila* gének orthológjait mutatja be. Az ezeknek megfelelő géneket ecetmuslincában az 1. táblázat tartalmazza.

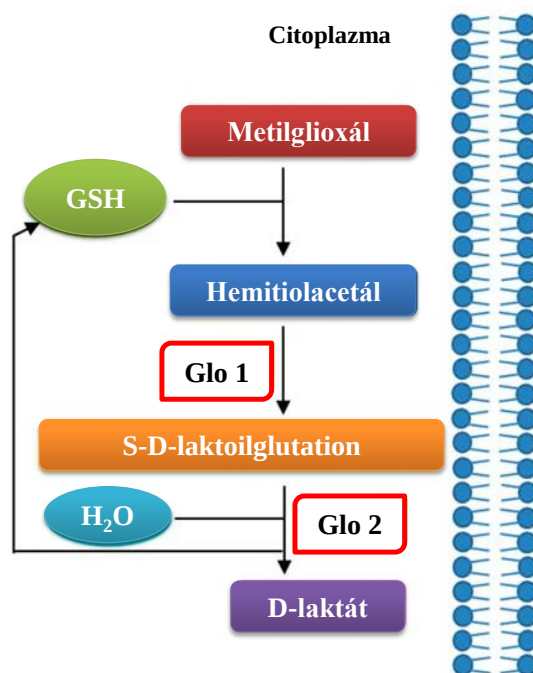
Munkánk során 9, az útvonalhoz kapcsolódó jelátviteli komponenst vizsgáltunk, melyek között található effektor fehérjét (*Glo1*), fehérje kinázokat (*rl*, *Pkc98E*, *inaC*), transzkripciós faktort (*Smox*), foszfatidil-inozitol 3-kináz katalitikus alegységet (*Pi3K92E*), foszfolipáz C bétát (*Plc21C*), I-es típusú receptort (*babo*), és foszfolipáz C enzimet (*norpA*) kódoló gén is.¹⁸

1.3 A *Glyoxalase 1* gén

A *Drosophila Glyoxalase 1 (Glo1)* gén a felnőtt egyedek minden vizsgált szövetében kifejeződik. A gén szekvenciájának elhelyezkedése a második kromoszómán: 2R:7393546..7395932 (2,39 Kb), a citológiai elhelyezkedése pedig: 43B2-43B2. Egy annotált transzkriptummal rendelkezik ami a 176 aminosav hosszúságú glioxaláz 1 (GLO1) fehérjét kódolja. A GLO1 molekuláris funkciói közé tartozik a laktoilglutation-liáz aktivitás és a fémion-kötés. A humán *Glyoxalase 1 (GLO1)* ortológja, ami összefüggésbe hozható autista rendellenességekkel, vesebetegségekkel, a cukorbetegség retinabetegségével, és az érrendszer egyes kóros állapotaival is.¹⁸

A GLO1 az AGE-RAGE útvonal egyik fő effektor fehérjéje. A glioxaláz 1 és a glioxaláz 2 (GLO2) két citoszolikus enzim, együtt alkotják a glioxaláz rendszert, melynek feladata a metilglioxál (MGO) és ROS detoxifikálása, az oxidatív stressz szabályozása (2. ábra). A GLO1 felelős az α -oxoaldehidekből, mint például a metilglioxál (MGO), és L-glutationból (GSH) spontán képződő hemitioacetálok katalitikus átalakításáért S-D-laktoilglutationná. A GLO2 ezután hidrolizálja az S-D-laktoilglutationt, mely bomlásnak D-laktát és regenerált GSH az eredménye, illetve a reakció melléktermékeként H_2O is keletkezik. A GLO1 sebességmeghatározó a reakció lefolyása során.

Az MGO felhalmozódása káros állapotot jelent a sejtek számára, felborul a homeosztázisuk, és az életképességükre is drasztikus hatással van. Az MGO egy elektrofil jellegű dikarbonil, amely képes kölcsön hatni fehérjékkel, RNS-sel, DNS-sel, és sejtmembránokkal is. A dikarbonilok rendkívüli reakcióképességük miatt felelősek az AGE-ek képződéséért. A glioxaláz enzimek, és egyéb detoxifikáló enzimek, például aldo-keto reduktázok, feladata a különböző dikarbonil vegyületek eltávolítása, mielőtt azok interakcióba lépnének a különböző molekuláris célpontjaikkal, és ezzel a sejt toxicitását okozva.¹⁹



2. ábra: A glioxaláz rendszer sematikus ábrája²⁰

A reaktív dikarbonilok kórosan magas szintje az agyban az Alzheimer-kór és más motoros, illetve kognitív rendellenességek során is megfigyelhető, mivel ezen vegyületek megnövekedett szintje olyan folyamatokat indít el amelyek a neurodegenerációért felelősek. Az általuk termelt előrehaladott glikációs végtermékek és a toxicitásuk az egyik okozója az AD tüneteként megjelenő amiloid plakkoknak és neurofibrilláris csomóknak. A glioxaláz rendszer, melynek a már ismertetett funkciója a dikarbonilok eltávolítása redukcióval, glutation függő. Bár a betegség első felében túlexpresszált a glioxaláz 1 enzim, később a glutation kimerül, és így nem képes hatékonyan működni a rendszer. Ennek okán a ψ -GSH megfelelő jelöltje lehet a gyógyszerfejlesztésnek, mivel a beadásával az amiloid β lerakódás és az oxidatív stressz mutatók drasztikusan csökkenthetőek, ezen felül pedig megakadályozza a kognitív zavarok kialakulását is, és nagy dózisban sincs toxicitása. Tehát az agyi glioxaláz-aktivitás helyreállítása, képes a neurodegeneráció javítására.²¹

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatócsoportunk a Huntington kór és az Alzheimer kór *Drosophila* modelljein végzett miRNS transzkriptomikai analízisek során azt a megfigyelést tette, hogy az AGE-RAGE jelátviteli útvonal komponensei feldúsultak a kifejeződésbeli változást mutató miRNS-ek targetjei között. Ebben a kutatási projektben ezért az volt a célunk, hogy egyrészt további genetikai vizsgálatokhoz előállítsuk az AGE-RAGE útvonal egyik effektor fehérjét, a glioxaláz 1 enzimet túltermelő transzgenikus *Drosophila* törzset; másrészt megvizsgáljuk az AGE-RAGE útvonal egyes elemeit kódoló gének kifejeződésének mértékét Huntington kór modellben.

Tételes célkitűzések:

Glyoxalase 1 transzgenikus *Drosophila* törzsek előállítása:

1. A *Drosophila* Glyoxalase 1 (*Glo1*) kódoló szekvenciájának klónozása.
2. *Glo1* szubklónozása helyspecifikus transzgenezist lehetővé tevő, fúziós protein taggal való jelölést biztosító expressziós vektorba.
3. Transzgenezis és UAS-*Glo1*.FLAG transzgenikus *Drosophila* törzsek előállítása.

AGE-RAGE útvonalat kódoló gének transzkripciójának vizsgálata:

1. RNS izolálása mutáns Huntingtint kifejező és kontroll *Drosophila* fejekből.
2. qPCR analízishez tervezett primerek tesztelése.
3. Az AGE-RAGE útvonal egyes komponenseinek transzkriptomikai vizsgálata mutáns Huntingtint kifejező és kontroll mintákban qPCR módszerrel.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. RNS izolálása *Drosophila melanogaster* mintából

Az RNS izolálását a Monarch Total RNA Miniprep Kit (*New England Biolabs*) segítségével végeztük el. A mellékelt protokoll szerinti centrifugálási lépések mindegyike 16.000 g-val történt. Mintánként 20-22 db ecetmuslicát széndioxiddal altattunk, és Eppendorf csőbe téve, folyékony nitrogénben fagyasztottuk őket. Ezután alaposan megvortexeltük a légy mintákat, így a fejeik elváltak a testüktől. (Ez azért volt lényeges lépés, hogy a neurális szöveten kívül csak kevés egyéb szövetet tartalmazzanak a mintáink.) Eppendorf csövekbe 300 µl 1X DNA/RNA Protection Reagenst mértünk, és ebbe az oldatba helyeztük a fejeket. Ezt követően pisztillus és rotor segítségével homogenizáltuk a mintánkat. A homogenizátumokhoz 30 µl Proteináz K Reaction puffert és 15 µl Proteináz K enzimet adtunk, vortexeltünk, majd 5 percre inkubáltuk a mintákat 55 °C-on. Ezt követően ismételtén vortexeltük a mintákat, majd 2 percre át centrifugáltunk. A felülúszót átpipettáztuk RNáz-mentes Eppendorf csövekbe, 300 µl RNA Lysis puffert adtunk hozzájuk, és újfent röviden vortexeltünk. Ezt követően gyűjtőcsőbe helyeztük a gDNS kötő oszlopokat, és rájuk mértük a lizátumok teljes térfogatát. A csöveket 30 másodpercre át centrifugáltuk, majd kidobtuk a gDNS kötő oszlopot, és az RNS-t tartalmazó átfolyóhoz 600 µl 100%-os etanolt adtunk. Ezt óvatosan, pipetta segítségével összekevertük. A mintákat két lépésben felmértük a gyűjtőcsőbe helyezett RNS kötő oszlopokra, és 30 másodpercre át centrifugáltuk. Ezt követően kiöntöttük az átfolyót, majd 500 µl RNA Wash puffert mértünk az oszlopra, és 30 másodpercig centrifugáltuk. Az átfolyót kiöntöttük a gyűjtőcsőből, majd 80 µl DNase I Reaction puffer és DNase I enzim 15:1 keverékét közvetlenül az oszlopra mértük, és inkubáltunk 15 percre át, szobahőmérsékleten. Az inkubációt követően 500 µl RNA Priming puffert mértünk az oszlopra, majd fél percig centrifugáltunk és kiöntöttük az átfolyót. Ezt követően 500 µl RNA Wash puffert mértünk az oszlopra, majd fél percre át centrifugáltuk. Megismételtük a mosást 500 µl RNA Wash pufferrel, de ezúttal 2 percre át centrifugáltunk, majd az oszlopot áthelyeztük egy steril Eppendorf csőbe, az átfolyót pedig kiöntöttük. Az eluálás 40 µl nukleáz-mentes vízben történt, amelyet felmértünk az oszlopra, és fél percig centrifugáltuk. Az átfolyónk tartalmazza az izolált RNS-t.

3.2. Nukleinsav vizsgálat NanoDrop 1000 spektrofotométerrel

A NanoDrop 1000 spektrofotométer alkalmas az általunk vizsgált nukleinsavak koncentrációjának és tisztaságának mérésére. Mivel a műszer az oldat teljes fényelnyelését

méri, figyelembe kell vennünk az esetleges fehérje szennyeződések jelenlétét. Míg a nukleinsavaknak 260 nm-en, a fehérjéknek 280 nm-en van a fényelnyelési maximumuk, így a két hányados különbségéből következtethetünk a DNS, illetve RNS tisztaságára. Ha az OD_{260}/OD_{280} hányados 1,8-2,0 illetve 1,9-2,1 között van, a DNS illetve RNS oldatunk tisztának tekinthető. A mérések során 10 mM Tris-HCl-t használtunk vakként, és 1,5 μ l nukleinsav oldatot használtunk a mérésekhez.

3.3. Reverz transzkripció

Az izolált RNS-ről szükséges cDNS készítése, mert a klónozás illetve a qPCR során használt DNS polimerázok ezt tudják csak templátként használni. Az RT-PCR-t LunaScript RT SuperMix Kit (New England Biolabs) és az alábbi protokoll használatával végeztük el:

• LunaScript RT SuperMix (5X)	4 μ l	
• RNS minta (max 1 μ g)		} 16 μ l
• RNáz-mentes H ₂ O:		
		20 μ l

A RNS mintákat mindig aszerint mértük be egy reakcióba, hogy azok mindegyike valóban 1 μ g RNS-t tartalmazzon, ezért reakciónként és mintánként eltért ennek a térfogata. Ebből kifolyólag pedig a DEPC vize is, amellyel 20 μ l-re egészítettük ki a végtérfogatot.

Az RT-PCR-t a Kyratec Supercycler Trinity PCR gépet beprogramozva végeztük el:

• Primer annealing:	25 °C	2 perc	} 1X
• cDNS szintézise:	55 °C	10 perc	
• Hő inaktiváció:	95 °C	1 perc	

3.4. Primerek hígítása Polimeráz Láncreakcióhoz (PCR)

A liofilizált primerekből először 100 μ M koncentrációjú oldatokat készítettünk úgy, hogy a gyártó által megadott anyagmennyiségű liofilizált DNS-hez nmol-onként 10 μ l térfogatú 10 nM Tris-HCl (pH 8,0) puffert adtunk, és alaposan oldottuk benne. Az így kapott 100 μ M primereket 10 nM Tris-HCl pufferben 5 μ M-ossá hígítottuk, és ezekkel a primer oldatokkal dolgoztunk a kísérleteink során. A hígítások elvégzésével vortexeltük, majd röviden lecentrifugáltuk, és a felhasználásukig -20 °C-on tároltuk a primereket (Függelék, 2. táblázat).

3.5. Templát felsokszorozítása Polimeráz Láncreakcióval (PCR)

A laboratóriumi munkánk során többféle enzimet alkalmaztunk, ezért a használt reakciómix tartalma eltért attól függően, hogy DreamTaq (5 U/μl, *Thermo Fisher Scientific*) vagy Q5 (2 U/μl, *New England Biolabs*) magas hűségű DNS polimerázt használtunk.

Master mixet készítettem alkalmanként több mintára, így ezek pontosan ugyanolyan összetételűek voltak, ezzel elkerülve a pipetázási hibából adódó eltéréseket. Az alábbiakban azonban a reakciómix tartalmát egy mintára (25 μl) vonatkozóan mutatom be:

	<u>DreamTaq:</u>	<u>Q5:</u>
• DNS polimeráz saját puffere:	2,5 μl	5 μl
• dNTP mix (10 mM):	2 μl	2 μl
• forward primer (5 μM):	1 μl	1,25 μl
• reverse primer (5 μM):	1 μl	1,25 μl
• DNS polimeráz:	0,3 μl	0,25 μl
• H ₂ O:	16,2 μl	14,75 μl

PCR csövekbe kimértem a Master mixből a templát nélküli mennyiségeket, majd ezután adtam hozzájuk a DNS mintát, így megkapva a teljes reakció térfogatot. A DNS mechanikai törésének elkerülése végett, az elegyeket csak óvatosan vortexeltük meg, és csak röviden centrifugáltunk. Ezután beprogramoztuk a PCR készüléket (*Kyratec Supercycler Trinity*).

PCR program DreamTaq enzimmel végrehajtott reakcióhoz:

• Kezdeti denaturáció:	95 °C	2 perc	} 35x
• Denaturáció:	95 °C	30 mp	
• Annealing:	T _m	30 mp	
• Elongáció:	72 °C	1 perc / kb	
• Végső elongáció:	72 °C	5 perc	
• Tárolás:	8 °C	∞	

PCR program Q5 enzimmel végrehajtott reakcióhoz:

• Kezdeti denaturáció:	98 °C	30 mp	} 35x
• Denaturáció:	98 °C	10 mp	
• Annealing:	T _m	30 mp	
• Elongáció:	72 °C	30 mp / kb	
• Végső elongáció:	72 °C	2 perc	
• Tárolás:	8 °C	∞	

3.6. Agaróz gélelektroforézis

A gélelektroforézishez 50 ml 1%-os agaróz gélét készítettem. A gél összetétele: 50 ml 1x TAE puffer (40 mM Tris-acetát, 1 mM EDTA), 0,5 g agaróz, 2,5 µl ECO Safe oldat (DNS kötő festék).

Az elkészítéshez a műanyag gélöntő tálca végeit lezártuk, és fésűt helyezünk a végébe, úgy hogy legalább 2-3 mm legyen a tálca alja és a fésű vége között. Kimértünk 0,5 g agarózt, és 50 ml 1x TAE pufferhez adtuk. Ezután mikrohullámú sütőben addig melegítettük, amíg az agaróz fel nem oldódott teljesen a pufferben. Az oldatot visszahűtöttük folyó hideg víz alatt, nagyjából 60 °C-ra, 2,5 µl ECO Safe DNS festék oldatot mértünk bele, majd a még folyékony agaróz oldatot a mintába öntöttük, és nagyjából 20-30 percet vártunk, hogy megszilárduljon. Ezt követően eltávolítottuk a fésűt, és a tálcát lezáró gumi végeket. Futatókádba helyeztük a gélét, úgy, hogy a gélben lévő zsebek, amelyekbe a mintáink fognak kerülni, a katód (-) felé legyenek elhelyezve, mivel a DNS semleges közegben negatív töltésű, ezért az anód (+) felé fog futni. A futatókádát feltöltöttük 1x TAE pufferrel, úgy hogy a gél is elfedje az oldat, legalább 1-2 milliméterrel, majd a gél első zsebébe 5 µl molekulasúly markert (Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder, *Thermo Fisher Scientific*) pipettáztam, a többi zsebbe pedig 15-15 µl-t vittem fel a saját mintáimból. A futatókádra ráhelyeztük a fedelét, majd 100 V-ra állítottuk a tápegységet, és 25-30 percig futtattuk, amíg a mintafelvívő puffer el nem érte a gél kétharmadát. A futtatást követően UV transzilluminátor felett vizsgáltuk a gélét.

3.7. DNS tisztítása és koncentráció

A DNS tisztításához és koncentrációhoz a Monarch PCR & DNA Cleanup Kit-et és az ahhoz tartozó, alábbi protokollt használtuk: 100 µl mintához 500 µl DNA Cleanup Binding puffert adtunk, majd fel-le pipetázással összekevertük. A tisztító oszlopot belehelyeztük a gyűjtőcsőbe, és felvittük az oszlopra a hígított DNS mintánkat. Ezután 16.000 g-vel centrifugáltunk 1 percen át, és kiöntöttük az átfolyót. Visszahelyeztük az oszlopot a gyűjtőcsőbe, és ráértünk 200 µl DNA Wash puffert, majd 1 percig centrifugáltunk 16.000 g-vel. Kidobtuk az átfolyót, majd az előző mosási lépést megismételtük. Ezt követően áthelyeztük az oszlopot egy tiszta Eppendorf csőbe, és ráértünk a szilika-membrán közepére 10 µl DNA Elution puffert úgy, hogy a puffer teljesen átnedvesítse azt. Egy perc inkubációt követően, 16.000 g-vel, 1 percen át centrifugáltunk, így megkaptuk a tisztított és koncentrált DNS eluátumot.

3.8. CloneJET PCR klónozás

A CloneJET PCR Cloning Kit (*Thermo Fisher Scientific*) segítségével pJET 1.2/blunt vektorba ligálhatunk 6 bp és 10 kb közötti tetszőleges DNS inszertet. A vektor ampicillin rezisztencia gént és *eco47IR* letális gént tartalmaz, utóbbit a DNS beépülése tönkreteszi, így kombinált negatív és pozitív szelekcióval kiválaszthatóak a rekombináns vektort tartalmazó sejtek, hiszen csak ezek lesznek képesek telepet képezni.

- Reakció mix tompa vég ligáláshoz:

• 2X reakció puffer:	10 µl
• tisztított cDNS:	1 µl
• pJET 1.2/blunt klónozó vektor (50 ng/ µl):	1 µl
• Nukleáz mentes víz:	7 µl
• T4 DNS ligáz:	1 µl
20 µl	

A jégen összeállított mixet vortex segítségével összekevertük, majd centrifugáltuk 5 másodpercig. Ezt követően szobahőmérsékleten (~22 °C) inkubáltuk az elegyet 25 percig. Ezután a ligátum egyből felhasználható transzformáláshoz.

3.9. *E. coli* sejtek transzformálása

Jégen hozzáadtunk 100 µl *Escherichia coli DH5α* kompetens sejthez 10 µl DNS ligátumot, és pipetta hegygel óvatosan összekevertük. Ezt követően 30 percet inkubáltuk az elegyet jégen, majd ennek letelte után 42 °C-os hőszekot alkalmaztunk 45 másodpercen keresztül, és ezután rögtön visszatettük az elegyet jégre. 900 µl LB tápoldatot (10 g tripton, 10 g NaCl, 5 g élesztő kivonat / liter) adtunk a sejtekhez, és 37 °C-os forgatóba helyeztük őket 1 óra előinkubációra. Ezt követően a sejteket kiülepítettük (3000 RPM-en, 5 percen át centrifugálunk), majd pipetta segítségével leszívtunk 900 µl folyadékot a sejtekről úgy, hogy a kiült pelletet ne keverjük fel. A maradék térfogatban (~100 µl) felfuszuspendáltuk a sejteket és szélesztettük őket.

3.10. *E. coli* sejtek szélesztése

A szélesztést minden esetben steril oltófülkében végeztük el. A szélesztés kezdete előtt meggyújtottuk a borszeszegőt, és etanolba mártottuk az üveg szélesztőbotot, majd leégettük az üvegbotról az etanolt, ezzel biztosítva a sterilitást. Először antibiotikumot szélesztettünk a 1,5% agaróz tartalmú LB táptalajra. Ha ampicillinnel (20 mg/ml) dolgoztunk, akkor 100 µl

került a felszínére, kanamicin (10 mg/ml) esetén pedig 200 µl. A szélesztőbot segítségével elterítettük az antibiotikumot a táptalaj teljes felületén. Ezt követően a sejteket is kiszélesztettük a csészékre. 100 µl transzformált sejtet két csésze között osztottunk szét úgy, hogy az egyikre 20 µl, a másikra 80 µl jusson. Így ha kevés kolónia jelenik meg, könnyebb válogatni a 80 µl-t tartalmazó csészéről, ha pedig túl sok, akkor a 20 µl-es csészén kevesebb az esély a kolóniák összenövésére. Ennek végétével 37 °C-os inkubátorba tettük a csészéket, és egy éjszakán át inkubáltuk őket.

3.11. *E. coli* folyadék kultúra indítása

A leoltást minden esetben steril oltófülkében végeztük el.

A leoltás steril félkémcsövekbe történt, és minden kolónia külön félkémcsőbe került. Első lépésként 3-3 ml LB tápoldatot tettünk minden félkémcsőbe. A félkémcső száját, és tetejét borszeszégő segítségével leégettük. A tápoldathoz ezután 3-3 µl tömény antibiotikum került (ampicillinből 100 µg/ml, kanamicinból 50 µg/ml). A Petri-csészén szelektív médiumon felnőtt *E. coli DH5α* kolóniákból kiválasztottunk egyet, a csésze közepéről, és csipesz segítségével, steril fogpiszkálót szúrtunk bele. A fogpiszkálót ezután az LB-t és antibiotikumot tartalmazó félkémcsőbe helyeztük, majd leégettük a száját, és a tetejét. A szúrást annyi kolónián végeztük el, ahány mintára szükségünk volt az adott kísérlet során. A félkémcsöveket ezután 37 °C-os forgatóba tettük, és hagytuk a sejteket nőni és osztódni, egy éjszakán át.

3.12. Plazmid DNS tisztítás

A Plazmid DNS tisztításához a ZR Plazmid Miniprep kit-et (*Zymo Research*) használtuk a gyártó által megadott protokoll szerint. Az eljárás során a centrifugálási lépések mind 13.000 g-vel történtek.

A 3 ml-es baktérium kultúrákból először 1,5 ml-t Eppendorf csövekbe pipetázunk, és centrifugáltuk őket 20 másodpercen át, 13.000 g-vel. A felülúszót leöntöttük, majd a kultúra másik felét ráengedtük a már kiült pelletre, és ismételtük a centrifugálást. Ezután lepipetázzuk az összes felülúszót. A pellethez hozzáadtunk 200 µl P1 puffert, és felszuszpendáltuk a kiült sejteket pipetázással. 200 µl P2 puffert is adtunk a mintához, és le forgatással óvatosan összekevertük, nem vortexeltük. Két percen át inkubáltunk, szobahőmérsékleten, ami alatt a sejtek teljesen lizáltak, az oldat lila színt vett fel.

Ezután 400 µl P3 puffer került a mintához, majd ismét óvatosan, de alaposan összekevertük. Újra két perces inkubációt végeztünk szobahőmérsékleten, amelynek során a lizátum

neutralizálódott, és sárga színt vett fel. Ezt követően centrifugáltuk a mintáinkat 3 percen át, és közben belehelyeztük a Zymo-Spin™ IIN oszlopot a gyűjtőcsőbe, és átpipettáztuk a centrifugálásból származó felülúszót az oszlopra. Ennek végeztével ismét centrifugáltunk, 30 másodpercen át, majd kidobtuk az átfolyót, és visszatettük az oszlopot ugyanabba a gyűjtőcsőbe. 200 µl Endo-Wash puffer vittünk fel az oszlopra és fél percig centrifugáltunk. Ezután 400 µl Plasmid Wash puffert is engedtünk rá, és egy percig, ismételten centrifugáltuk a mintáinkat. Ezt követően áthelyeztük az oszlopot egy tiszta Eppendorf csőbe, és hozzáadtunk 31 µl Rnáz tartalmú DNS elúciós puffert, a membrán közepére irányítva. Inkubáltunk szobahőmérsékleten 1 percig, végül 13.000 g-val történő, fél perc centrifugálás után, megkaptuk a tisztított plazmid DNS eluátumot.

3.13. Restriktációs emésztés

Tesztemésztést végeztünk azért, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy az izolált plazmid valóban tartalmazza-e, az általunk bevitt inszertet. Illetve emésztettük a plazmidokat azért is, hogy felnyissuk őket, egyik plazmidból később a másikba lehessen ligálni az inszertünket. Az emésztések során mindig EcoRI és KpnI Fast Digest (*Thermo Fisher Scientific*) enzimeket használtunk, mivel ezen enzimek hasító helyei mindegyik általunk használt plazmidon megtalálhatóak, és ezek közé került az inszertünk ligálásra.

Master mix:

• 10X green puffer:	2 µl
• plazmid DNS:	1 µl
• EcoRI:	1 µl
• KpnI:	1 µl
• MQ H ₂ O:	15 µl
20 µl	

Jégen összeállítottuk a master mixet, majd 37 °C-on, 15 percen át inkubáltunk. Ezt követően 80 °C-on, 5 percen keresztül hősokkoltuk a mintát, majd jégre tettük, és lehúztuk centrifugával az elegyet. Végül pedig gélelektroforézis segítségével megvizsgáltuk, hogy a gélképen a várt fragmentek láthatóak-e.

3.14. DNS izolálása gélből

Az izolálást a MN NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (*Macherey Nagel*) segítségével, és annak mellékelt protokollja alapján végeztük el. Az előzetesen gélelektroforézissel

megfuttatott, majd kivágott, DNS fragmentet tartalmazó gélkockának először lemértük a tömegét. Minden 100 mg agaróz gélhez adtunk 200 µl NTI puffert. A mintánkat ezt követően 50 °C-on inkubáltuk 10 percen át, közben 2-3 percenként vortexeltük. A gél teljesen feloldódott az inkubáció végére. A Nucleospin® Gel and PCR Clean-up oszlopot gyűjtőcsőbe helyeztük, és maximum 700 mikroliterenként ráengedtük az olvadt mintát. Centrifugáltunk 30 másodpercen át, 11.000 g-vel. Az átfolyót kidobtuk, és visszahelyeztük az oszlopot a gyűjtőcsőbe. Ha maradt még az olvadt mintánkból, megismételtük vele ezt a lépést. Ezután 700 µl NT3 puffert (mosó puffer) vittünk fel az oszlopra, és ismét centrifugáltunk 30 másodpercen keresztül, 11.000 g-vel. Kidobtuk az átfolyót, és ismételtük a mosást. Az oszlop szilika membránjának szárítását is centrifugálás közben végeztük el, üresen (1 perc, 11.000 g). Az etanol teljes eltávolítása érdekében, 70 °C-on, 5 percen át inkubáltunk. Végül tiszta Eppendorf csőbe helyeztük az oszlopot. Rápipettáztunk 15 µl NE puffert (elúciós puffer) és inkubáltuk egy percig szobahőmérsékleten. Amint lejárt az inkubáció, 11.000 g-vel, 1 percen át centrifugáltunk így megkapva a tisztított DNS-t.

3.15. DNS mennyiségének fluorometriás meghatározása:

DNS mennyiség meghatározására Qubit 2.0 fluorométert és Qubit dsDNA BR Assay Kit-et (*Thermo Fisher Scientific*) használtunk. Először elkészítettük a Working Solution-t, a Qubit reagens 1:200 Qubit pufferbe való keverésével. A két standard mintához (amelyek a kalibrációs görbe két végpontját adták), 190-190 µl Working Solution, és 10-10 µl Standard 1 illetve Standard 2 minta kellett. A saját mérésünkhöz 198 µl Working Solution-re, és 2 µl saját mintára (DNS) volt szükségünk. Az oldatokat 2-3 másodpercen keresztül vortexeltük, majd inkubáltuk őket 2 percen át, szobahőmérsékleten. Végül a csöveket behelyeztük egyesével (a standard mintákkal kezdve) a Qubit 2.0 Fluorometer-be, mértünk, és leolvastuk az adatokat.

3.16. DNS inszert ligálás

A *Glo1* inszert pENTR 3C vektorba való sticky end ligáláshoz T4 DNS ligáz enzimet (*Thermo Fisher Scientific*) és puffert használtuk.

- pENTR 3C: 3 µl
- *Glo1* fragmentum: 6,4 µl
- 10X T4 DNS ligáz puffer: 0,5 µl
- T4 DNS ligáz: 2 µl

A ligálási reakció végtérfogata 20 μ l volt, így kiegészítettük 8,1 μ l MQ vízzel, majd jégen összeállítottuk a reakciómixet és másfél órán át inkubáltunk, 22 °C-on.

3.17. LR Rekombinációs reakció

Az LR rekombinációs reakciót Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (*Invitrogen/Thermo Fisher Scientific*) felhasználásával végeztük el.

Master mix:

- pTWF-attB (destination vector): 1 μ l
- pENTR 3C-*Glo1* (entry clone): 0,6 μ l
- LR Clonase enzyme mix: 2 μ l
- TE puffer: 6,4 μ l

10 μ l

Összeállítottuk, az enzimet kivéve, a reakciót egy Eppendorf csőben. Az enzimet kétszer röviden megvortexeltük, majd a mixhez adtunk belőle 2 μ l-t. Pipetta segítségével összekevertük, nem használtunk vortexet. Ezután egy órán át inkubáltunk 25 °C-on. Végül hozzáadtunk 1 μ l Proteináz K-t a reakcióhoz, és inkubáltuk az elegyet 10 percen át, 37 °C-on. Ennek végeztével készen állt az elegy a transzformálásra.

3.18. Midi prep

A NucleoBond Xtra midi, Midi prep segítségével nagy tisztaságú, és koncentrált plazmid DNS nyerhető ki, amely az injektálás sikerességének szempontjából elengedhetetlen.

Először lecentrifugáltuk a plazmidot tartalmazó sejteket 4000 RPM-en, 10 percen át, majd a kiült pelletről leöntöttük a felülúszót. 8 ml Res puffert adtunk a mintához, felszuszpendáltuk a leült sejteket benne, majd vortexeltünk. Lysis pufferből is 8 ml került a sejtekhez, viszont már csak fel-le forgatással kevertük össze őket, nem vortexeltük a mintát. Az oszlopot falcon csőbe helyeztük, és aktiváltuk. Ezt 12 ml EQU (Equilibration) puffer segítségével tettük meg, amelyet úgy vittünk fel az oszlopra, hogy teljesen átnedvesítsük azt. Neutralizáltuk a sejteket NEU puffer segítségével, amelyből 8 ml került a lizátumhoz. Fel-le forgatással alaposan összekevertük az oldatot addig, amíg az eredetileg kék színe teljesen fehérré és csapadékossá vált. Háromszor még átforgattuk a mintát, majd felvittük az oszlopra. Ezután megvártuk, amíg a lizátum átfolyója teljesen lecsöpög a falcon csőbe. A mosási lépést is EQU pufferrel végeztük, ebből 5 ml került az oszlopra úgy, hogy átnedvesítse teljesen a filtert. Ezután vártunk hogy lecsöpögjön az átfolyó, amely tartalmazza az izolált plazmidot is. Az első

mosási lépés után kidobtuk a filtert, majd az oszlopon újabb mosási lépést végeztünk 8 ml Wash pufferrel. Ezt követően eluáltuk a plazmidot egy új falcon csőbe 50 °C-ra előmelegített, 5 ml ELU (Elution) puffer segítségével. A melegítést azért végeztük el, mert elősegíti a hatékonyabb elúciót. Kicsaptuk a plazmidot szobahőmérsékletű, 3,5 ml izopropanol segítségével. Az eluátumot ezután alaposan megvortexeltük, szétosztottuk Eppendorf csövekbe, majd 15.000 g-vel 30 percen át, 4 °C-on centrifugáltunk. A felülúszót ezt követően óvatosan eltávolítottuk. Eppendorf csőenként 1 ml 70%-os etanolt adtunk a pellethez, majd ismét 15.000 g-vel centrifugáltunk, de ezúttal szobahőmérsékleten. Ennek végeztével lepipettáztuk az etanolt, óvatosan hogy a kicsapott plazmid DNS-t ne hogy felszívjuk közben. Az esetleg mintán maradt etanolt pedig hagytuk elpárologni, 10 perc szobahőmérsékleten történő száradás alatt. A mintához ezután csőenként 50 µl injektáló oldat került, majd ebben reszuszpendáltuk a plazmid DNS-eket. Utolsó lépésként egyesítettük a mintákat egy közös Eppendorf csőbe, és röviden centrifugáltunk.

3.19. *Drosophila* törzsek és fenntartásuk

A transzgenezishez felhasznált $y\ w^* M(eGFP.vas-int.Dm)ZH-2A; P\{y^{+t7.7}=CaryP\}attP40$ (25C6 citológiai pozícióban, 2L:5.108.448) és $y\ w^* M(eGFP.vas-int.Dm)ZH-2A; P\{y^{+t7.7}=CaryP\}attP2$ (68A4 citológiai pozícióban, 3L:11.070.538) az ELKH SZBK *Drosophila* Injektáló Szolgálat a bocsátotta rendelkezésünkre. A $w; UAS-Httex1.Q25$ és $w; UAS-Httex1.Q120$ törzsek ²² Prof. J. Lawrence Marsh (University of California, Irvine, CA, USA) laboratóriumából származtak. A $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}$, w , $w; Sco/SM6b$ és $w; TM3, Sb/ TM6, Hu$ törzsek a Bloomington *Drosophila* Stock Centerből származnak.

A törzseket sztenderd *Drosophila* táptalajon (3% száraz élesztő, 4% kukoricadara, 2% búzaliszt, 9% glükóz, 0.7% agar, 0.15% Tegosept) 18 °C-on tartottuk fenn, a keresztezéseket ugyanezen a táptalajon, 25 °C-on végeztük.

3.20. Kvantitatív PCR

A kvantitatív valós idejű (real-time) PCR (qPCR) a templát relatív mennyiségének meghatározására alkalmazott eljárás. A reakciókat a Luminaris Color HiGreen qPCR reagenssel Piko-Real Real-Time PCR berendezéssel (*Thermo Fisher Scientific*) végeztük el. A 10 µl végtérfigatú reakciók tartalmaztak 2 µl cDNS templátot, 5 µl 2× tömény PCR mixet, forward és reverz primereket illetve ioncserélt vizet. A primereket minden esetben 500 nM koncentrációban használtuk a reakciók során, kivéve az α -tubulint, amellyel 200 nM koncentrációban dolgoztunk. Primerpáronként PCR master mixeket mértünk össze (templát

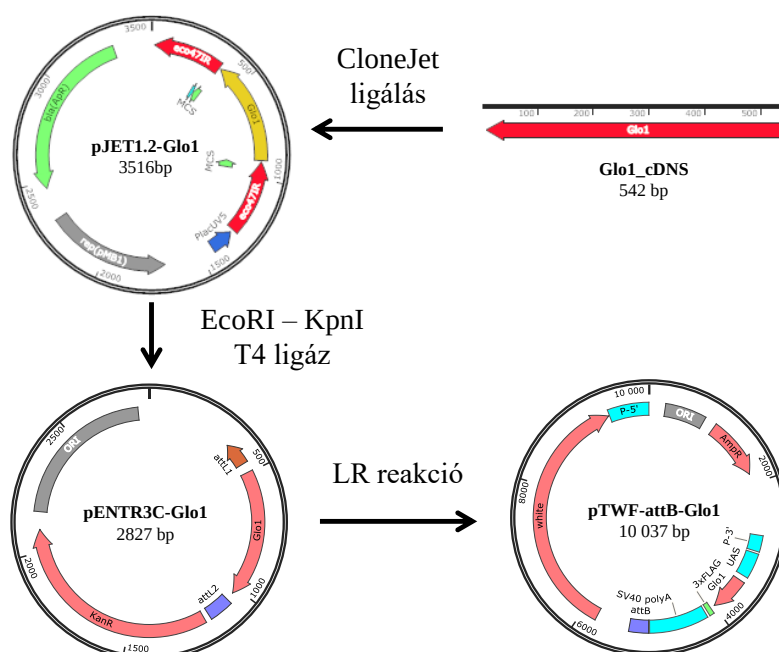
nélkül) és 8-8 µl-t felvittünk belőlük egy 96 lyukú PCR plate-re. Ezután 2-2 µl cDNS-t is hozzáadtunk a lyukakban lévő mixekhez, és pipettával alaposan összekevertük őket. Végül beprogramoztuk a PikoReal 96 Real-Time PCR System (*Thermo Fisher Scientific*) készüléket az alábbiak szerint:

• UNG aktiváció	50 °C	2 perc	
• Kezdeti denaturáció:	95 °C	10 perc	
• Denaturáció:	95 °C	15 másodperc	} 40x
• Annealing és elongáció:	60 °C	1 perc	
• Melting Curve:	60 – 95 °C		
• Tárolás:	20 °C	∞	

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKEKELÉSÜK

4.1 A *Glyoxalase 1 (Glo1)* gént túltermelő *Drosophila* törzsek létrehozása

A projekt során célunk volt olyan transzgenikus *Drosophila* törzsek előállítása, amelyekben a *Glo1* gén a GAL4/UAS expressziós rendszer segítségével FLAG peptid taggal jelölt formában túltermeltethető. Több klónozási lépést hajtottunk végre (3. ábra), hogy a *Glo1* gén kódoló szekvenciáját helyspecifikus transzgén integrációt biztosító pTWF.attB vektorba klónozzuk, majd e konstrukciók felhasználásával transzgenikus törzseket hoztunk létre.

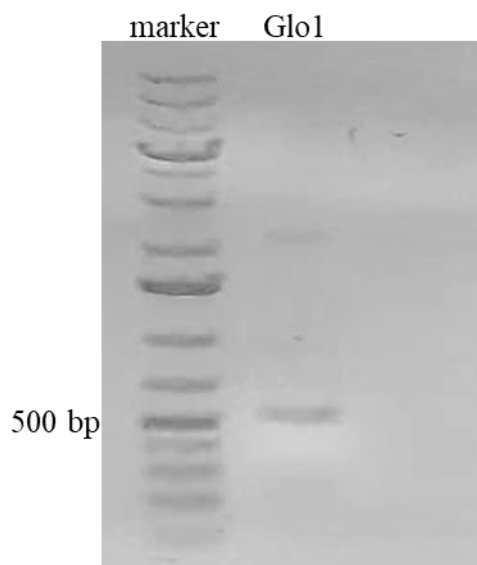


3. ábra: Klónozási terv

4.1.1. A *Glo1* kódoló szekvenciájának klónozása pJET 1.2/blunt vektorba

20 darab *Oregon-R* (vad típusú *Drosophila* törzs) nőtényből totál RNS-t izoláltunk Macherey-Nagel NucleosSpin RNA Plus kittel, majd abból reverz transzkripcióval egyes szálú cDNS-t állítottunk elő Taqman Reverse Transcription Reagents (*Thermo Fisher Scientific*) és random hexamer primerek felhasználásával. A *Glo1* gén kódoló régióját (az első ATG-től a stop kodont megelőző kodonig) a cDNS templátról polimeráz láncreakció (PCR) segítségével amplifikáltuk Q5 magas hűségű DNS polimeráz, valamint a *Glo1_E3C_F* és *Glo1_E3C_R* primerek felhasználásával. A *Glo1_E3C_F* primer erős Kozak szekvenciát (TACCATGG) és a klónozás elősegítése érdekében a génspecifikus résztől 5' irányba KpnI restrikciós enzim hasítóhelyet tartalmazott. A *Glo1_E3C_R* primer 5' végén EcoRI restrikciós enzim hasítóhelyet tartalmazott. A primerek megtervezésekor ügyeltünk arra, hogy a végső „destination” vektorban (pTWF.attB) a fúziós peptid tag megfelelő leolvasási keretbe

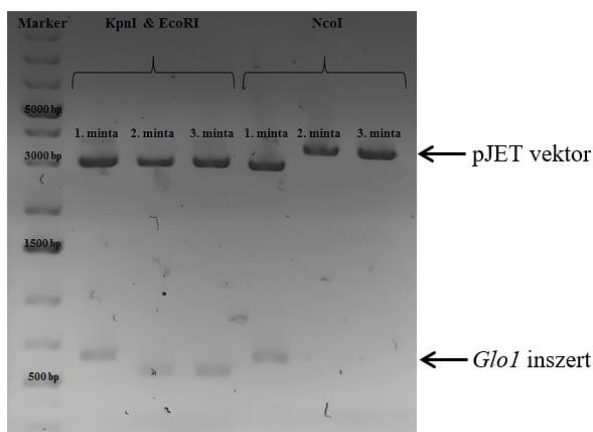
kerüljön. A PCR termék méretét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, a kapott fragmentum mérete megegyezett a gén-modell által várt 542 bp mérettel (4. ábra).



4. ábra: Glo1 amplikon gélelektroforézise.

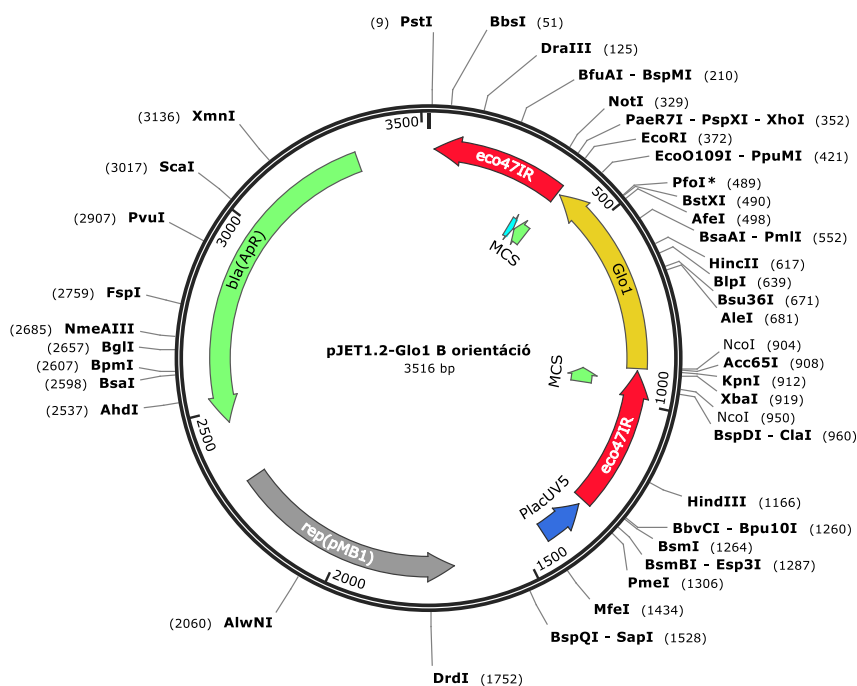
Az első sávban GeneRuler 1kb Plus DNS marker, a második sávban a cDNS templáton Glo1_E3C_F és Glo1_E3C_R primerekkel amplifikált PCR termék látható.

A Glo1 PCR amplikont Monarch PCR & DNA Cleanup Kit segítségével tisztítottuk és koncentráltuk, majd CloneJET PCR Cloning Kit felhasználásával ligáltuk pJET1.2/blunt vektorba. A vektor ampicillin rezisztencia gént (béta-laktamáz) és pozitív szelekcióhoz alkalmas letális gént (eco47IR) tartalmaz, ezért miután a ligátumot *E. coli DH5α* kompetens sejtekbe transzformáltuk, azokat ampicillinnel kiegészített táptalajt tartalmazó csészékre szélesztettük, és a megjelenő bakteriális sejttöbbségekből indítottunk folyadék kultúrákat. Az egyes kultúrákból készített plazmid preparátumokban a pJET1.2 vektorba ligált Glo1 jelenlétének igazolására, az inszert két végénél lévő KpnI és EcoRI hasítóhelyeket kihasználva, tesztelésztést végeztünk a két enzimmel, majd gélelektroforézissel vizsgáltuk az emésztett mintákat (5. ábra). Emellett tesztelésztést végeztünk NcoI enzimmel is annak érdekében, hogy meghatározzuk a vektorban a Glo1 inszert irányultságát. Ezt azért tehetjük meg, mert NcoI hasítóhelyből található egy a vektor multiklónozó helyében, és egy a Glo1 inszert egyik végén is. Az enzimmel való hasítás után tehát vagy egy kisebb, a Glo1 csak egy kis részét tartalmazó fragmentum (~40 bp), és egy nagyobb (~3500 bp), a Glo1 nagyobb részét is tartalmazó vektor fragmentum volt várható (5. ábra, 2. és 3. NcoI minta); vagy pedig egy nagyobb Glo1 fragmentum az eredmény, amely a vektor egy kis részét is tartalmazza (~600 bp), és egy vektor fragmentum (~2900 bp) volt várható (5. ábra, 1. NcoI minta).



5. ábra: pJET-Glo1 plazmidok teszt-emésztéseinek gélelektroforézise. Az első sávban GeneRuler 1kb Plus DNS marker, a következőekben KpnI és EcoRI, illetve NcoI enzimekkel emésztett plazmidok láthatóak.

A továbbiakban a 2. mintával dolgoztunk, melyben a Glo1 inszert a 6. ábrán bemutatott térképnek megfelelően helyezkedett el a pJET 1.2/blunt vektorban:

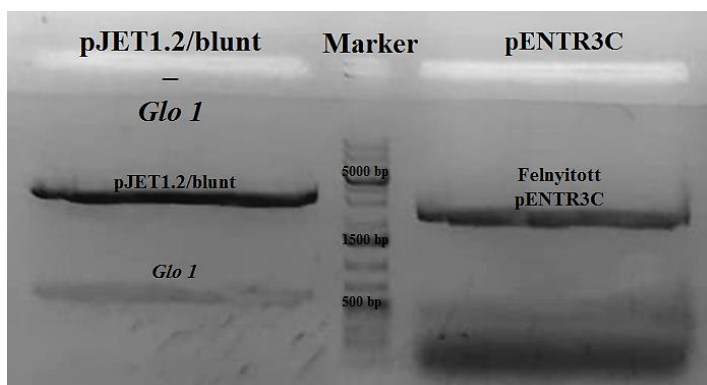


6. ábra: pJET 1.2-Glo1 konstrukció fizikai térképe.

A mintát megszekvenáltattuk (a szekvenálást a Delta Bio 2000 Kft végezte), hogy meggyőződjünk róla, hogy a folyamatok során nem történt változás (pl. pontmutáció) a Glo1 cDNS szekvenciájában. Az eredmény azt mutatta, hogy a Glo1 szekvenciájában a klónozás során nem történt változás.

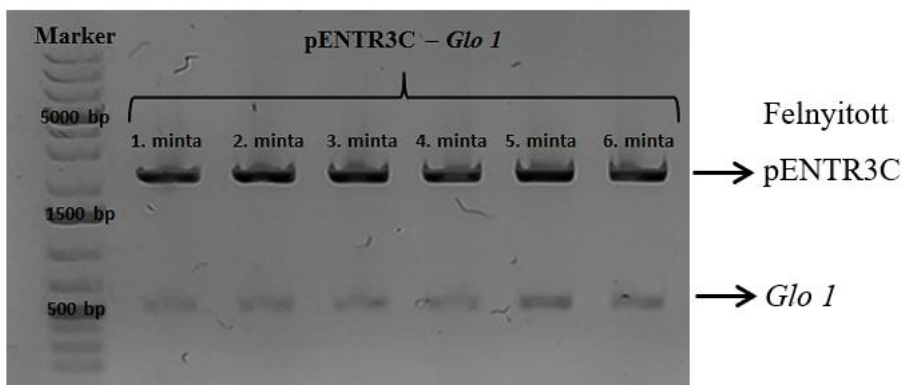
4.1.2. A *Glo1* kódoló szekvenciájának klónozása pENTR3C vektorba

A következő klónozási lépés sikerességéhez szükséges volt a pJET1.2-*Glo1* és pENTR3C DNS preparátumok koncentrációjának meghatározása, amit Qubit dsDNA BR Assay Kit segítségével, fluorometriásan határoztunk meg. A lemért adatok alapján a pJET1.2-*Glo1* koncentrációja ~100 ng/ µl, az pENTR3C minté ~130 ng/µl volt. Ezt követően a kiválasztott pENTR3C vektor mintát és a pJET1.2-*Glo1* konstrukciót KpnI és EcoRI restrikciós endonukleázok segítségével emésztettük, majd a termékeket gélelektroforézis segítségével elválasztottuk (7. ábra).



7. ábra: pJET1.2-*Glo1* konstrukció és pENTR3C vektor KpnI – EcoRI emésztése. A képen az első zsebben található a pJET1.2-*Glo1*, a harmadik zseb tartalmazza a GeneRuler 1kb Plus DNS markert, az ötödik pedig a pENTR3C vektort.

A termékek nagysága a vártnak megfelelő volt, mivel a *Glo1* 542 bp, a pENTR3C pedig a *ccdB* kazettája előtt és után tartalmazta a két enzim hasítóhelyeit, ez a régió pedig ~400 bp, így a felnyitott vektor ~2700 bp hosszú. A két fragmentumot ezután kivágtuk a gélből, és MN NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit segítségével izoláltuk belőlük a DNS-t. A ligálásukat T4 DNS ligáz segítségével végeztük el, figyelembe véve a koncentrációjukat is. A vektor kanamicin rezisztencia gént (*KanR*) és negatív szelekcióhoz alkalmas letális gént (*ccdB*) tartalmaz, mely a sikeres emésztés során kivágódik. Így tehát a ligátum *E. coli DH5α* kompetens sejtekbe transzformálása, majd kanamicines táptalajt tartalmazó csészékbe szélesztését követően kolóniákat biztosan olyan vektorokat tartalmazó sejtek képeznek, amelyekből kivágódott a letális gén, és rendelkeznek a *KanR* génnel is, vagyis a vektor tartalmazza a *Glo1* inszertet. Hat kolóniából indított kultúrából tisztítottunk plazmid DNS-t ZR Plasmid Miniprep kit-et használva, majd ismét ellenőrző tesztémésztést végeztünk EcoRI és KpnI enzimekkel, és a mintáinkat gélelektroforézissel vizsgáltuk (8. ábra).

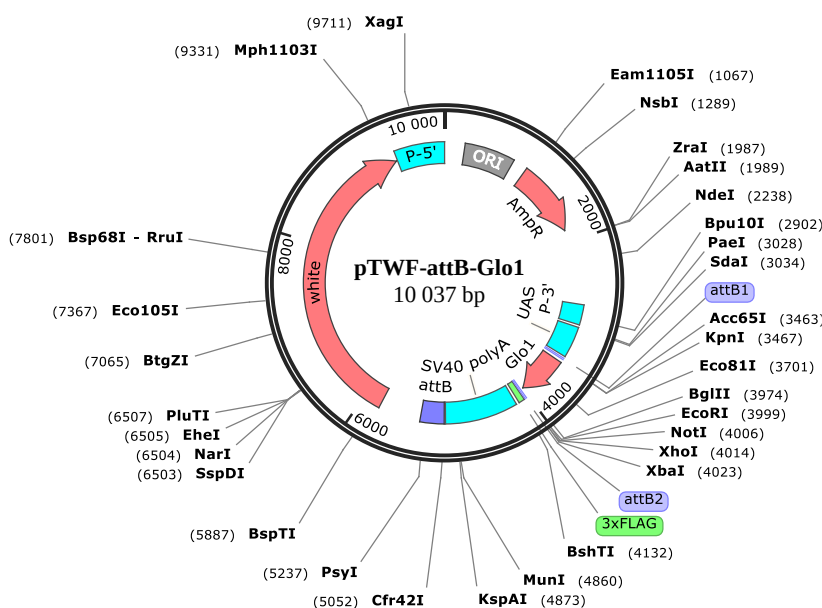


8. ábra: pENTR3C–Glo1 konstrukció tesztelésztése. Az első sáv a GeneRuler 1kb Plus DNS markert tartalmazza, a többi sávban pedig KpnI és EcoRI enzimekkel emésztett minták láthatóak.

A tesztelésztések alapján mindegyik pENTR3C–Glo1 konstrukció megfelelő volt, a továbbiakban az 5. mintával dolgoztunk tovább.

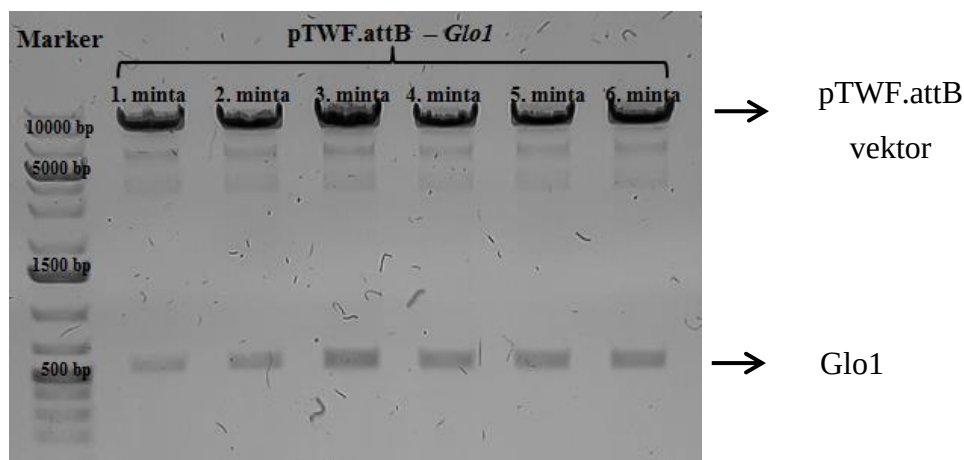
4.1.3. A *Glo1* kódoló szekvenciájának klónozása pTWF.attB vektorba

A pENTR3C vektorban Gateway klónozásra alkalmas attL1 és attL2 szekvenciákat is tartalmaz. Ezek azért szükségesek, hogy az ENTRY vektorba klónozott gén (esetünkben a *Glo1*) az attL1 és az attL2 helyek és a célvektorban (esetünkben pTWF.attB) található attR1 és attR2 helyek közti helyspecifikus rekombinációval a célvektorba klónozható legyen. Az LR rekombinációs reakciót Gateway LR Clonase Enzyme mix segítségével végeztük el. Ezután *E. coli* DH5 α kompetens sejteket transzformáltunk az így kapott pTWF.attB–Glo1 konstrukcióval (9. ábra).



9. ábra: A pTWF.attB–Glo1 konstrukció. A képen jól látszanak az attB1 és attB2 helyek, a *mini-white* markergén, az ampicillin rezisztencia gén, az UAS szekvencia, és a 3x FLAG-tag,

A pTWF.attB vektor ampicillin rezisztencia gént, és ccdB kazettát tartalmaz, ezért a transzformált sejteket ampicillines táptalajt tartalmazó csészékre szélesztettük. A felnőtt sejttelepek mindegyike tartalmazza a *Glo 1* inszertet, mivel az attR1 és attR2 helyek közrefogják a ccdB kazettát, így az inszert ennek a helyére rekombinálódik be, így elveszti a vektor a letális génjét. Az ampicillin rezisztencia gén megléte miatt pedig képesek megélni az antibiotikumos táptalajon is. Hat ilyen sejttelepből vettünk mintát, és ezekből folyadék kultúrákat indítottunk. Ezután plazmidot tisztítottunk belőlük, majd teszteltettünk KpnI és EcoRI endonukleázokkal, végül pedig gélelektroforézissel vizsgáltuk meg az emésztések eredményét (10. ábra).



10. ábra: pTWF.attB – Glo1 konstrukciók tesztelészése KpnI és EcoRI enzimekkel. Az első sáv tartalmazza a GeneRuler 1kb Plus DNS markert, a további hat sávban pedig a pTWF.attB –Glo1 minták találhatók.

A tesztelészése alapján mind a hat vizsgált minta megfelelő szerkezetűnek bizonyult, a gélkép alapján legkoncentráltabb 3. mintával folytattuk tovább a munkát.

4.1.4. Transzgeikus pTWF.attB–Glo1 konstrukciót hordozó *Drosophila melanogaster* létrehozása

Transzgenikus *Drosophila* törzseket a ϕ C31 integráz mediálta integrációra alkalmas, pTWF.attB-Glo1 konstrukciónak megfelelő attP dokkoló helyet tartalmazó embriókba való injektálásával kívántunk létrehozni. Az injektáláshoz nagy tisztaságú és koncentrált mintára volt szükségünk, melyet a NucleoBond Xtra Midi prep kit segítségével tisztítottunk 100 ml pTWF.attB-Glo1 hordozó DH5 α sejt kultúrából. NanoDrop 1000 spektrofotométer segítségével megmértük a plazmid koncentrációját, amely 1673 ng/ μ l volt és mivel a 260/280 értéke 1,92, a 260/230 értéke pedig 2,32 volt, teljesen tisztának tekinthettük az izolált

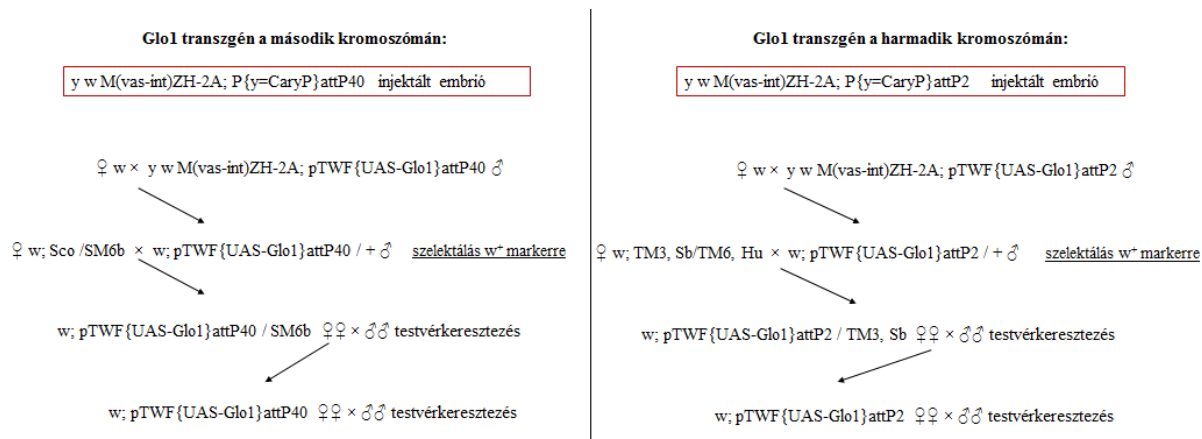
plazmidot. Hogy megbizonyosodjunk arról, hogy nem történt változás a szekvenciájában sem, szekvenálást végtettünk (Delta Bio 2000 Kft.) aminek eredménye arra utalt, hogy a szekvencia változatlan, nem történt pontmutáció a *Glo1*-ben, így a minta készen állt az injektálásra. Az injektálást az Szegedi Biológiai Kutatóközpont *Drosophila* Injektáló Szolgálat végezte, akik második kromoszómás (attP40), és harmadik kromoszómás (attP2) dokkoló helyet tartalmazó embriókba is beinjektálták a pTWF.attB-Glo1 konstrukciót. Ezért is a pTWF.attB volt a választott célvektorunk, mivel ez képes a kromoszómába helyspecifikusan integrálni a *Glo1* transzgént, ezen felül pedig túl is termeltethetjük azt az UAS/GAL4 rendszerrel, és a termelt fehérje FLAG-taggal fog rendelkezni a C-terminálisán. A pTWF.attB vektor tartalmaz *mini-white* markergént, amely narancssárga szemet eredményez, amely fenotípus biztosítja a transzgén jelenlétét.



11. ábra: *UAS-Glo1.flag* transzgenikus *Drosophila*. Baloldalon a pTWF.attB-Glo1 konstrukciót hordozó narancssárga szemű *w*; *UAS-Glo1.flag* transzgenikus hím, jobbra mellette nem transzgenikus (fehér szemű, *w*) testvére.

Ahhoz, hogy a *mini-white* markergén segítségével a transzgenikus muslicákat szelektálni tudjuk a narancssárga szemszín alapján, az injektált embriókból kikelt muslicákat (attP40: 36 db hímét és 44 db nőtényt, attP2: 68 db hímét és 81 db nőtényt) először fehér szemű *w*¹¹¹⁸ egyedekkel kereszteztük. Ez azért volt fontos, mert az injektált szülők a testi sejteikben nem termelik a transzgént, az csak a csíravonal sejteik némelyikében jelenik meg (mozaikosak). A domináns marker miatt azonban azokból a hímivarsejtekből és petesejtekből, amelyekben sikeres volt az injektálás, narancssárga szemű transzgenikus legyek lettek. Transzgenikus legyek attP40 hímek esetében 7, nőtények esetében 9 keresztezésben, attP2 hímek esetében 11, nőtények esetében pedig 20 keresztezésben jelentek meg (11. ábra). Ahhoz, hogy a *Glo1* transzgén jelenlétére homozigóta állatokat kapjunk, törzsbeállítás volt szükséges. Ezt az

alábbi ábra alapján (12. ábra), keresztezésekkel tettük meg. Ezzel sikerült olyan indukálható *UAS-Glo1.flag* transzgén hordozó törzseket létrehoznunk, amelyek segítségével később vizsgálni tudjuk majd a *Glo1* túltermelésének a neurodegeneratív folyamatokra kifejtett hatását HD modellben.



12. ábra: *UAS-Glo1.flag* transzgenikus törzsek létrehozásának keresztezési sémája.

4.2 Az AGE-RAGE útvonal jelátviteli komponenseinek transzkripciós aktivitásának vizsgálata HD modellben

A vizsgálatunk alapjául egy korábban Huntington-kór és Alzheimer-kór modellen elvégzett mikroRNS transzkriptomikai vizsgálat szolgált, melynek során azt figyeltük meg, hogy mely miRNS-ek mutatnak mennyiségi változást a betegség modellekben. A mennyiségi változást mutató miRNS-ek predikált mRNS célpontjainak elemzése azt mutatta, hogy a miRNS-ek számos olyan mRNS célponttal rendelkeznek, amelyek az AGE-RAGE jelátviteli útvonalhoz voltak köthetőek. Ennek okán vizsgáltuk ezután az útvonal egyes génjeit, köztük egy fő effektor fehérjét, és több jelátviteli komponenst kódoló gént is, hogy változik-e a transzkripciójuk a HD modellben (1. táblázat).

Gén neve	Jelölés	Humán orthológ	Szekvencia azonosság
<i>rolled</i>	<i>rl</i>	<i>ERK</i>	82%
<i>Phospholipase C at 21C</i>	<i>Plc21C</i>	<i>PLCB1</i>	40%
<i>inactivation no afterpotential C</i>	<i>inaC</i>	<i>PRKCA</i>	51%
<i>no receptor potential A</i>	<i>norpA</i>	<i>PLCB4</i>	50%
<i>Protein C kinase 98E</i>	<i>Pkc98E</i>	<i>PRKCE</i>	58%
<i>baboon</i>	<i>babo</i>	<i>TGFBR1</i>	54%
<i>Phosphatidylinositol 3-kinase 92E</i>	<i>pi3K92E</i>	<i>PIK3CD</i>	38%
<i>Smad on X</i>	<i>Smox</i>	<i>SMAD3</i>	60%
<i>Glyoxalase 1</i>	<i>Glo1</i>	<i>GLO1</i>	69%

1. Táblázat: A dolgozatban vizsgált AGE-RAGE útvonalban érintett *Drosophila* gének, rövidített jelölésük, humán orthológjuk, és az azzal való aminosav szekvencia azonosság.

4.2.1. Htt-Q120 és Htt-Q25 cDNS minták előállítása

A vizsgálatunkat egészséges (HttQ25, kontroll), illetve mutáns Huntingtin fehérjét (HttQ120) kifejező *Drosophila* állatokból származó mintákon végeztük. Ennek érdekében *w; UAS-HttQ25* és *w; UAS-HttQ120* törzsekből származó hímeket kereszteztünk *elav-GAL4* szűz nőstényekkel. Az idegsejt specifikus génkifejeződést biztosító *elav-GAL4* driver az utódok idegrendszerében indukálta a Huntingtin transzgének transzkripcióját. A *elav-GAL4/w; UAS-HttQ25/+* illetve *elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+* genotípusú nőstény állatokkal dolgoztunk tovább, 5 naposan gyűjtöttük és fagyasztottuk le őket folyékony nitrogén segítségével. Fejeikből ezután RNS-t izoláltunk, amit aztán LunaScript RT SuperMix Kit és random hexamer primerek segítségével átírtunk egyesszálú cDNS-sé. Hat ilyen cDNS mintánk készült így el, három Q25 és három Q120 minta, melyek mindegyike mintánként 20-22 fejből lett előállítva.

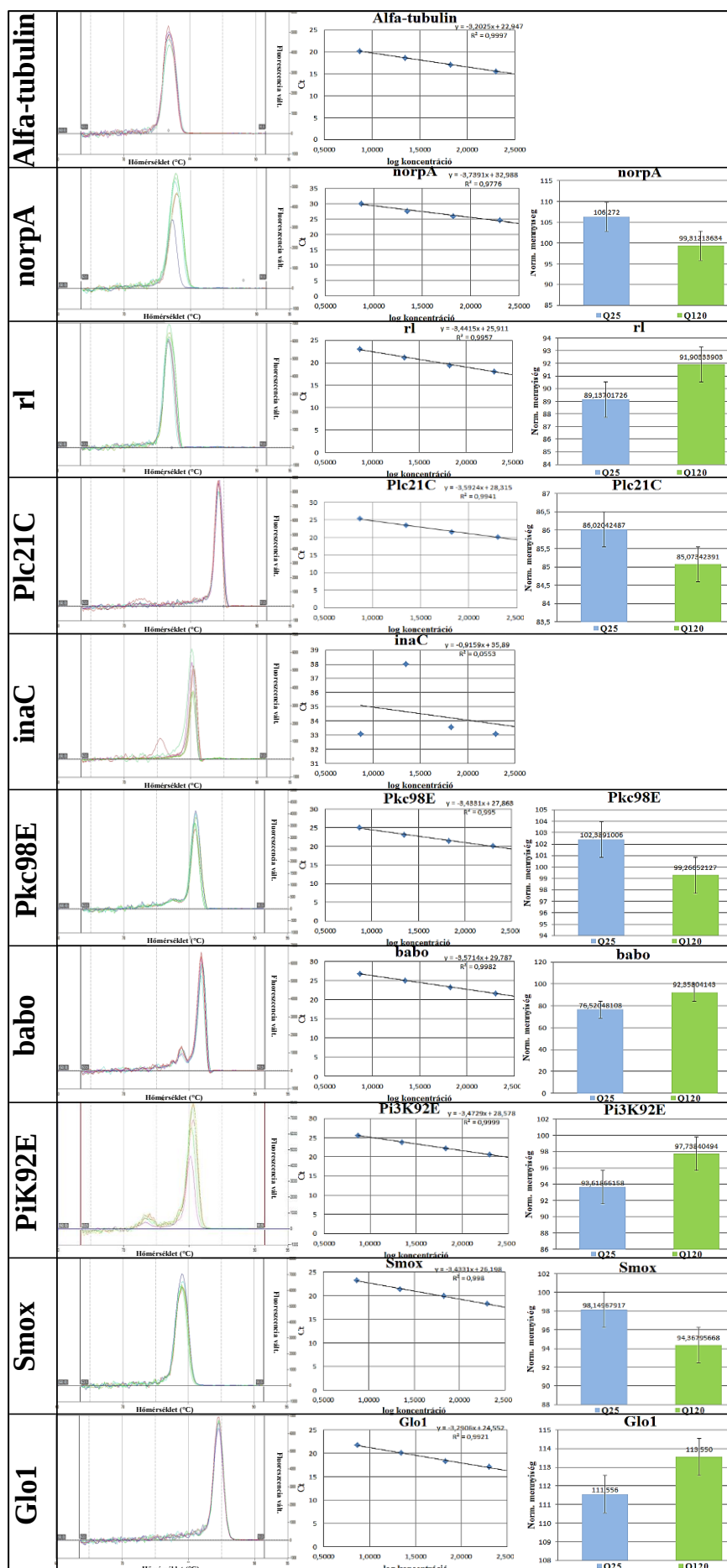
4.2.2. Az AGE-RAGE útvonalba eső gének transzkripciós aktivitásának meghatározása

Az egyes AGE-RAGE útvonalba eső génekről képződő transzkriptumok mennyiségét a cDNS átírást követően kvantitatív real-time PCR (qPCR) segítségével határoztuk meg. A vizsgálathoz szükséges volt cDNS pool és ebből készített hígítási sor, hígított cDNS minták és primer hígítások készítése is. A cDNS poolhoz mind a hat cDNS mintából 3 µl került, és az így kapott 18 µl-t hígítottuk 72 µl 10 mM Tris-HCl pufferrel, 5X hígítást kapva. Ebből négy lépcsős, 3x hígítású templát hígítási sort készítettünk (5x, 15x, 45x és 135x hígítások). Ez a kalibrációs egyenes elkészítéséhez volt szükséges, amit a későbbiekben ismertetek az értékelés során. A cDNS mintákból a qPCR reakciókhoz egyesével 10x hígításokat készítettünk. A primereket is hígítottuk, 5 µM koncentrációra, és 500 nM koncentrációban használtuk őket a qPCR reakciók során. Ez alól kivételt képez az *α-tubulin* háztartási gén, amelyet 200 nM koncentrációban használtunk, kontrollként. A használt primerek szekvenciáit a Függelék 2. táblázata tartalmazza. A qPCR vizsgálatokat SYBR Green fluoreszcens festék tartalmú Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix-el végeztük Piko-Real Real-Time PCR berendezésben. Minden vizsgált génre specifikus PCR reakciót elvégeztünk a cDNS templát hígítási soron, a Q25 és Q120 mintákon, valamint egy templát nélküli kontrollon. Az *α-tubulin* háztartási gén kontroll és a *Glo1* specifikus primerekkel a vizsgálat kétszer lett elvégezve. Az eredmények elemzését a qPCR berendezés által meghatározott Ct értékeket

(threshold cycle, az a ciklusszám ahol már detektálható az amplifikált termék) és olvadási görbe adatokat értékelve végeztük el (13. ábra).

Az olvadási görbe (fluoreszcencia intenzitás változása a hőmérséklet függvényében) alapján az határozható meg, hogy melléktermékes volt-e a mintánk, ami az *inaC*, a *babo* és a *Pi3K92E* esetében igaz volt (13. ábra). Ezeknél a géneknél egy a főtermék olvadáspontjánál (T_m) alacsonyabb olvadáspontú terméket jelző csúcs is megjelent a görbék lefutásán, így ezek a reakciók további optimalizálásra szorulnak.

A templát hígítási sor hígítási lépcsőinek C_t értékei alapján kalibrációs egyenest készítettünk. A különböző hígításokhoz különböző relatív koncentráció értékeket rendeltünk és kiszámoltuk azok logaritmusát. A kalibrációs egyenes meghatározásához mindegyik gén esetében ezt a log koncentráció értéket (x tengely), és a gép által mért C_t értékeket (y tengely) használtuk. Kiszámoltuk az egyenes korrelációs együtthatóját (R) és meredekségét, majd az egyenes meredeksége alapján a qPCR hatékonyságát is meghatároztuk (13. ábra és Függelék 3. táblázat). A determinációs együttható (R^2 , a korrelációs együttható négyzete) mely megmutatja, hogy a C_t érték összvarianciája milyen mértékben magyarázható a log koncentrációval való lineáris kapcsolattal, kísérleteinkben jellemzően 0,99-nél nagyobb érték volt, ez alól csak a *norpA* ($R^2=0,9776$) és az *inaC* ($R^2=0,0553$) jelentett kivételt. Az *inaC* esetében ez az alacsony R^2 érték nem teszi lehetővé az eljárás kvantitatív mérésre való felhasználását. A PCR reakciók hatékonysága 85-95% közötti volt, az *inaC* PCR reakció ebben az esetben is fals értéket (1135%) produkált. A Q25 és Q120 mintákban az egyes transzkriptumoknak megfelelő relatív templát mennyiséget a megfelelő kalibrációs egyenesek alapján számoltuk ki az Excel „Előrejelzés” függvénye segítségével. Normalizációs kontrollként az α -tubulin háztartási gént használtuk, melynek várhatóan nem történik változás a transzkripciójában. Minden más gén esetében a mintánkénti mennyiséget normalizáltuk az α -tubulin mintánkénti mennyiségével, így normalizált relatív mennyiségi értéket kapva. Az egyes gének expressziós szintjének megállapításához átlagoltuk a három Q25 és a három Q120 minta normalizált mennyiségi értékét, a minta átlagok statisztikai összehasonlítását t-teszttel végeztük. Eredményeink szerint egyik vizsgált gén transzkriptum szintjében sincs statisztikailag szignifikáns mértékű eltérés a Q25 és Q120 minták között. A legjelentősebb változást a *babo* mRNS szintjében találtuk (Q25: 76,5%, Q120: 92,4%), ám statisztikailag ez sem bizonyult szignifikánsnak ($P = 0,11$). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a mutáns huntingtin hatására a jelátviteli komponensek aktivitása nem transzkripcionálisan van szabályozva, azaz az AGE-RAGE útvonalban potenciálisan beálló változások nem a gének messenger RNS szintjében keresendők.



13. ábra: Az Age-RAGE útvonal egyes komponenseit kódoló gének transzkripciók aktivitásának vizsgálata RT-qPCR mód-szerrel. A sorokban az első oszlopban megadott génekkel kapcsolatos adatok láthatóak. A második oszlopban a PCR termékek olvadási görbéje, a harmadik oszlopban a templát hígítási sor alapján készített kalibrációs egyenes (felette jelölve az egyenes egyenlete és az R^2 érték), a negyedik oszlopban a vizsgált géneknek a Q25 és Q120 mintákban mért relatív expressziós szintje (átlag $\pm$ standard hiba) látható.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatómunkám középpontjában a Huntington-kór (HD), egy autoszómális domináns öröklődésű, neurodegeneratív megbetegedés molekuláris hátterének vizsgálat állt. Munkámat a betegség transzgenikus *Drosophila melanogaster* modelljében végeztem.

Laboratóriumunkban HD és Alzheimer-kór modell rendszereken korábban elvégzett mikroRNS transzkriptomikai vizsgálatok eredményei arra utaltak, hogy a két betegség modellben változást mutató miRNS-ek targetjei között dúsulást mutatnak az AGE-RAGE jelátviteli útvonalba tartozó gének. TDK dolgozatomban erre alapozva célul tűztem ki, hogy megvizsgáljam, hogy az AGE-RAGE útvonal egyes jelátviteli komponenseit, illetve az útvonal kulcsfontosságú effektor fehérjéjét, a glioxaláz 1 enzimet kódoló gének mutatnak-e transzkripció változást is HD modellben. Ehhez kvantitatív RT-PCR-rel vizsgáltam e gének mRNS szintjét mutáns Huntingtint (Htt-Q120) kifejező, illetve egészséges kontroll (Htt-Q25) *Drosophila* mintákban. Kutatásom eredményeképpen azt találtam, hogy a *Glyoxalase 1* gén és az útvonal jelátviteli komponensei nem mutatnak mRNS szintbeli eltérést az eltérő genotípusú egyedek között, így mutáns Huntingtin hatására az AGE-RAGE útvonal génjeinek kifejeződése a transzkripció szintjén nem szabályozott.

Terveink között emellett szerepelt még a glioxaláz 1 enzimet kódoló *Glyoxalase 1* (*Glo1*) gén klónozása és transzgenikus *Glo1* túltermelő *Drosophila* törzs előállítása is. Ezzel célunk az volt, hogy a későbbiekben vizsgálni tudjuk a glioxaláz 1 fehérje túltermelésének hatását az HD modellünkben. Ehhez a *Glo1* kódoló régióját cDNS-ről PCR-rel amplifikáltuk, majd egy többlépéses klónozási eljárással beklónoztuk *Drosophila* transzformáló vektorba. Olyan vektort választottunk (pTWF.attB), amely lehetővé teszi a transzgén helyspecifikus integrációját a kromoszómába, túltermelését az UAS/GAL4 rendszer segítségével, valamint a termelődő fehérje C terminálison való jelölését FLAG-taggel. Az előállított konstrukcióval sikerült a *Glo1* transzgént a második kromoszómán, illetve a harmadik kromoszómán hordozó transzgenikus vonalakat is előállítanunk.

kulcsszavak: Huntington kór, neurodegeneráció, AGE-RAGE útvonal, *Glo1*, klónozás, *Drosophila* modell

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, **Dr. Bodai Lászlónak**, hogy lelkiismeretesen és hozzáértően végezte a szakdolgozói témavezetésemet. Köszönet illeti a sok segítségért, az átadott magas szintű szakmai tudásért, az időért, amelyet bármikor készségesen rám fordított, és a türelméért, mellyel minden felmerülő kérdésemet és problémámat kezelte. Szeretném megköszönni az egész kutatócsoportunknak, kiváltképp **Dr. Zsindely Nórának**, **Siági Fruzsínának**, és **Farkas Anitának**, hogy megosztották velem a tapasztalatikat, jó tanácsokkal láttak el, bíztattak, illetve **Nagy Gáborral** együtt, végig a segítségemre voltak bármiben.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Bhattacharyya, K. B. The story of George Huntington and his disease. *Ann. Indian Acad. Neurol.* **19**, 25–28 (2016).
2. On Chorea. <https://neuro.psychiatryonline.org/doi/epub/10.1176/jnp.15.1.109>
doi:10.1176/jnp.15.1.109.
3. Caron, N. S., Wright, G. E. & Hayden, M. R. Huntington Disease. in *GeneReviews®* (eds. Adam, M. P. et al.) (University of Washington, Seattle, 1993).
4. Hyperkinesia - an overview | ScienceDirect Topics.
<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/hyperkinesia>.
5. Craufurd, D., Thompson, J. C. & Snowden, J. S. Behavioral changes in Huntington Disease. *Neuropsychiatry. Neuropsychol. Behav. Neurol.* **14**, 219–226 (2001).
6. Brandt, J. Behavioral Changes in Huntington Disease. *Cogn. Behav. Neurol. Off. J. Soc. Behav. Cogn. Neurol.* **31**, 26–35 (2018).
7. Anderson, K. E. Chapter 2 - Huntington's disease. in *Handbook of Clinical Neurology* (eds. Weiner, W. J. & Tolosa, E.) vol. 100 15–24 (Elsevier, 2011).
8. McColgan, P. & Tabrizi, S. J. Huntington's disease: a clinical review. *Eur. J. Neurol.* **25**, 24–34 (2018).
9. Blumenstock, S. & Dudanova, I. Cortical and Striatal Circuits in Huntington's Disease. *Front. Neurosci.* **14**, 82 (2020).
10. Ross, C. A. & Tabrizi, S. J. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol.* **10**, 83–98 (2011).
11. Wyant, K. J., Ridder, A. J. & Dayalu, P. Huntington's Disease-Update on Treatments. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **17**, 33 (2017).
12. Henning, C. & Glomb, M. A. Pathways of the Maillard reaction under physiological conditions. *Glycoconj. J.* **33**, 499–512 (2016).

13. Hollenbach, M. Impact of Glyoxalase-I (Glo-I) and Advanced Glycation End Products (AGEs) in Chronic Liver Disease. Liver Cirrhosis - Update and Current Challenges (IntechOpen, 2017). doi:10.5772/intechopen.68417.
14. Senatus, L. M. & Schmidt, A. M. The AGE-RAGE Axis: Implications for Age-Associated Arterial Diseases. *Front. Genet.* **8**, (2017).
15. Ma, L. & Nicholson, L. F. B. Expression of the receptor for advanced glycation end products in Huntington's disease caudate nucleus. *Brain Res.* **1018**, 10–17 (2004).
16. AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications - Cusabio. <https://www.cusabio.com/pathway/AGE-RAGE-signaling-pathway-in-diabetic-complications.html>.
17. Brás, I. C., König, A. & Outeiro, T. F. Glycation in Huntington's Disease: A Possible Modifier and Target for Intervention. *J. Huntingt. Dis.* **8**, 245–256.
18. Larkin, A. *et al.* FlyBase: updates to the Drosophila melanogaster knowledge base. *Nucleic Acids Res.* **49**, D899–D907 (2021).
19. Honek, J. F. Glyoxalase biochemistry. *Biomol. Concepts* **6**, 401–414 (2015).
20. Antognelli, C. & Talesa, V. N. Glyoxalases in Urological Malignancies. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 415 (2018).
21. More, S. S., Vartak, A. P. & Vince, R. Restoration of glyoxalase enzyme activity precludes cognitive dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *ACS Chem. Neurosci.* **4**, 330–338 (2013).
22. Barbaro, B. A. *et al.* Comparative study of naturally occurring huntingtin fragments in Drosophila points to exon 1 as the most pathogenic species in Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 913–925 (2015).

FÜGGELÉK

2. táblázat: A felhasznált primer szekvenciák:

Primer	Primer szekvencia	bp
Glo1-E3C-F	GGTACCATGGGCGACGTGACAGGA	24
Glo1-E3C-R	GAATTCAAGACGGAGTGTGCATTGAA	26
Glo1-qF	GCTGTACTTTCTGGGGTACGAG	22
Glo1-qR	TGGGTCAACTCAATGGTGGC	20
rl-qF	CAAATGCTGATGCGTTGGCT	20
rl-qR	TTCAGCGACAGGCTCATCTC	20
Plc21C-qF	ATCTCTCCAAGTCGTGTGGC	20
Plc21C-qR	GCTATCTTCTCCCCTTCCGC	20
inaC-qF	GGCAGCTAACCTCATTCCCA	20
inaC-qR	GCGGCTGCAACTCAAAAGTA	20
norpA-qF	AAGCTTCAAAAGAGAGACAAGAGC	24
norpA-qR	TATTTAGCTCACAGCCACTTAGA	24
Pkc98E-qF	TTTGGGTCAACCCACCTTCT	20
Pkc98E-qR	TTTGGCTGGCTGCTCATCTC	20
babo-qF	CGCGAAAAAGCCAGAAAACAAG	22
babo-qR	CCCGGCGGAAAGATTTGAGA	20
Pi3K92E-qF	ACAGACGCTTAACAGCACGA	20
Pi3K92E-qR	GCACGCCAATCTCTTTGATTCT	22
Smox-qF	GCCGGTACCGTTACAGATCA	20
Smox-qR	GGGACTGGGAAGTGGAAGTG	20

3. táblázat: qPCR adatok

Primer	R²	Meredekség	Hatékonyság %	Olvadáspont átlag (°C)
Glo1	0,9921	-3,2906	101,3255	84,59
rl	0,9957	-3,4415	95,2420	76,8317
Plc21C	0,9941	-3,5924	89,8310	84,2283
inaC	0,0553	-0,9159	1135,4087	80,3200
norpA	0,9776	-3,7391	85,1163	77,7367
Pkc98E	0,9950	-3,4331	95,5613	80,9350
babo	0,9982	-3,5714	90,5464	81,8233
Pi3K92E	0,9999	-3,4729	94,0630	80,4250
Smox	0,9980	-3,4331	95,5613	78,9900
tubulin	0,9997	-3,2025	105,2353	76,9217