

37. OTDK Biológia Szekció

A Glioxaláz rendszer neurodegenerációra gyakorolt hatásának vizsgálata Huntington-kór és Alzheimer-kór modellekben

Study of the effects of the Glioxalase system in Huntington's disease and Alzheimer's disease models

Borosta Roberta
Molekuláris biológia MSc II. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Témavezető: Dr. Bodai László
tanszékvezető egyetemi docens

Szeged
2024

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	4
1.1. A Huntington-kór	4
1.2. Az Alzheimer-kór.....	6
1.3. Az AGE-RAGE útvonal.....	7
1.4. A glioxaláz 1	9
2. CÉLKITŰZÉSEK	11
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	12
3.1. <i>Drosophila</i> törzsek és fenntartásuk	12
3.2. Transzgenikus <i>Drosophila UAS-Glo1.flag</i> törzs létrehozása(30)	12
3.2.1. pTWF.attB- <i>Glo1</i> konstrukció létrehozása.....	12
3.2.1.1. Klónozás pJET1.3/blunt vektorba	12
3.2.1.2. Szubklónozás pENTR3C vektorba.....	13
3.2.1.3. Szubklónozás pTWF.attB vektorba.....	14
3.2.2. Transzgenikus <i>UAS-Glo1.flag Drosophila</i> törzsek létrehozása	14
3.3. Immunoblot assay	15
3.4. <i>Drosophila</i> keresztezések.....	16
3.5. <i>Drosophila</i> vizsgálati módszerek	17
3.5.1. Életképesség vizsgálat.....	18
3.5.2. Élettartam vizsgálat	18
3.5.3. Motoros funkciók vizsgálata	18
3.5.4. Idegsejt degeneráció vizsgálata	19
3.6. RNS izolálás <i>Drosophila</i> mintákból és RNS koncentráció meghatározás.....	19
3.7. RT-kvantitatív PCR.....	20
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	20
4.1. A <i>Glo1</i> klónozása és <i>Glo1</i> túltermelő <i>Drosophila</i> törzsek létrehozása.....	20
4.2. A <i>Glyoxalase 1</i> túltermelő törzsek validálása	22
4.3. A <i>Glo1</i> funkciónyerés hatása HD (<i>Htt-Q25</i> és <i>Htt-Q120</i>) modellben	23

4.4. A <i>Glo1</i> funkcióvesztés hatása HD (<i>Htt-Q25</i> és <i>Htt-Q120</i>) modellben	25
4.5. A <i>Glo1</i> túltermelés hatása HD (<i>HttQ96-Cerulean</i>) modellben.....	27
4.6. A <i>Glo1</i> funkciónyerés hatása AD modellben.....	28
4.7. A <i>Glo1</i> funkcióvesztés hatása AD modellben.....	30
4.8. A <i>Glyoxalase 1</i> transzkripció aktivitásának vizsgálata túltermelő törzsekben.....	32
4.9. A <i>Glo1</i> túltermelés hatása a mHtt szolubilis és aggregált formáira	33
5. ÖSSZEFOGLALÁS.....	35
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	36
IRODALOMJEGYZÉK.....	37
FÜGGELÉK.....	39
TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS	40

1. BEVEZETÉS

1.1. A Huntington-kór

A Huntington-kórt (*Huntington's Disease*, HD) George Huntingtonról nevezték el, aki 1872-ben elsőként írta le megfigyeléseit a betegséggel kapcsolatban, „On Chorea” (A Choreáról) címmel, utalva a betegség legismertebb tünetére, a táncszerű, akaratlan mozgásokra.(1),(2) Bár a Huntington-kór a legismertebb monogén neurodegeneratív betegség, előfordulása ennek ellenére ritka, az Európai populációban az előfordulási gyakoriság körülbelül 9.71-17:100,000.(3),(4)

A betegség autoszómális domináns öröklődésű, kialakulása hátterében a négyes kromoszóma rövid karján (4p16.3) lévő *huntingtin* (*HTT*) gén polyglutamin domént kódoló szakaszában történő mutáció (expanzió) áll. A gént 1993-ban azonosították(5), nagyjából 180 kbp kiterjedésű, és 67 exont tartalmaz(6). Az erről képződő Huntingtin (Htt) fehérje nagyjából 350 kDa nagyságú.(7) Pontos funkciója nem ismert, feltételezések szerint azonban többek között a neuronális és gliális funkciókat szabályozza, számos effektor fehérjével lép kapcsolatba, és szerepet játszhat neuronokon belüli transzkripciós szabályozásban.(7) A *Htt* génjének N-terminusán (első exon) található, polyglutamin domént kódoló CAG ismétlődések száma egészséges egyének esetében ≤ 26 . 36-39 CAG ismétlődés esetén a penetrancia nem teljes, de az ennél hosszabb ismétlődések már a betegség teljes penetranciáját okozzák.(3)

A Huntington-kór egy progresszív betegség, átlagosan 35-44 éves korban jelentkezik, az érintettek átlagosan 15-18 évig élnek a megjelenése után. A vele járó tünetek motoros, kognitív és pszichiátriai zavarokat is jelentenek.(4) Érdekes jelenség a betegséghez fűződően, hogy a 28-at meghaladó CAG ismétlődések instabilak replikációkor, és az esetek többségében további expansió történik ilyenkor a poliglutamin (polyQ) doménban. Az instabilitás a spermatogenezis során jelentősebb mértékű, így főleg ha az apától öröklődik, a betegség kialakulása generációról-generációra fiatalabb életkorban történik. Ez az anticipáció jelensége.(8) Ennek oka, hogy az átadott CAG ismétlődés hossza erősen, és fordítottan korrelál a betegség kezdetének életkorával. 40-50 ismétlődésnél felnőttkori, 50-120 ismétlődésnél azonban fiatalkori megjelenés (~20 éves korban) várható, mely súlyosabb tünetek megjelenésével is jár (pl. Parkinson szerű rigiditás, súlyos szellemi leépülés, a legfiatalabbaknál akár epilepszia).(7),(4)

Az első tünetek már jóval a betegség kialakulása előtt megmutatkozhatnak, a prodromális

fázisban finom változások figyelhetők meg az érintettek személyiségében, kogníciójában és motoros készségeiben. Ezt követően jelentkeznek általában a mozgászavarok, először csak „ügyetlenség”, ekkor romlik a finom motoros kontroll, majd megjelenik a már említett chorea, de a betegség előrehaladtával más önkéntelen mozgások is bekövetkezhetnek: bradikinézia, rigiditás, disztónia.(4) Ahogy romlik a beteg állapota, a hiperkinéziát hipokinézia váltja fel, amely fázisban egyre inkább, és progresszíven romlik a kogníció, és egyre gyakoribbak a hangulatingadozások is. A tanulás és tervezés képessége is károsodik, emellett memóriazavar és apátia léphet fel.(3) A betegséggel járó különböző pszichiátriai tünetek közé tartozik például az ingerlékenység, agresszió, kényszeres viselkedés, ritkábban a pszichózis is. A betegség második leggyakoribb halálozási oka az öngyilkosság, melynek kockázata a betegség tüneteinek súlyosbodásakor, illetve az önállóság elvesztésekor a legmagasabb.(9)

Az expresszáladó mutáns Huntingtin (mHtt) fehérjére az agy több régiója is érzékeny. A legszembetűnőbb változás a striátumban történik, itt a GABAerg közepes tüskés neuronok (MSN-ek) tömeges elhalása figyelhető meg.(3) Degenerálódnak továbbá a striátumba vetülő agykérgi piramis sejtek, de a globus pallidus, a subthalamicus mag, a thalamus, a hypothalamus, a substantia nigra, és a hippocampus idegsejtjeinek elvesztése is megfigyelhető a betegség során.(4),(7),(9) A betegség neuropatológias jellemzője továbbá a kialakuló, Huntingtin fehérje tartalmú nukleáris és citoplazmatikus zárványok (makroaggregátumok). Egyre több kutatásból az derül ki azonban, hogy az aggregátumokkal rendelkező sejtek tovább élnek, így valószínűsíthető hogy nem ez a toxikus formája a fehérjének, hanem a szolubilis oligomer. Egy olyan szer, amely az oligomerek aggregációját idézi elő, valószínűleg csökkentheti a neuropatológias tüneteket.(8),(10)

Jelenleg a Huntington-kór sajnos nem megelőzhető, és egyelőre nem létezik betegségmódosító terápia, de számos kísérlet folyik a betegség gyógyítására (antiszensz oligonukleotid terápia, géncsendesítés, célzott kismolekulás terápiák stb), illetve tüneti kezelésként, különböző gyógyszerek állnak rendelkezésre. A tetra benzín, amely az egyetlen engedélyezett gyógyszer a chorea kezelésére, egy dopamin-csökkentő szer, amely azonban depressziót válthat ki, vagy súlyosbíthatja azt. Jelenleg használt szerek még az olanzapin, riszperidon és a kvetiapin, amelyek atipikus neuroleptikumok, amelyek az irritáltság és fellépő szorongás esetén lehetnek hasznosak. Sok egyéb gyógyszer is rendelkezésre áll a betegségben szenvedők tüneteinek enyhítésére. Fontos megjegyezni azonban, hogy a nem gyógyszeres kezelések, mint például a fizioterápia, pszichiátriai ellátás stb. is kiemelkedő jelentőségűek a betegség során.(3),(4),(9)

1.2. Az Alzheimer-kór

Az Alzheimer-kór (*Alzheimer's Disease*, AD) a demencia létrejöttének leggyakoribb oka, az esetek kétharmadáért felelős, előfordulási gyakorisága folyamatosan nő.(11),(12) A betegséget elsőként Alois Alzheimer írta le, 1907-ben.(13) Az AD egy fokozatos és progresszív neurodegeneratív betegség, amely főleg az idősebb korosztályt érinti (65 év felettieket). Az AD legismertebb tünetei a kognitív funkciók hanyatlása és a memóriavesztés.(12)

A betegség kezdetén a rövidtávú memória sérül, majd károsodást szenved az ítélőképesség, a problémamegoldás, a perceptuális megkülönböztetés, a végrehajtó funkciók, stb., amelyek az absztrakt gondolkozás és a „multitasking”, a megosztott figyelem romlásában mutatkoznak meg. Ezt követik a nyelvi zavarok, neuropszichiátriai tünetek (pl. apátia, depresszió, pszichózis), és a tanult motoros feladatok végrehajtásának képtelensége.(12),(13) A késői fázisban a betegek parkinsonos tüneteket mutathatnak, visszatérnek a primitív reflexek, inkontinencia alakul ki, és a beteg teljesen függővé válhat gondozójától.(12)

A betegség lehet öröklődő (familiáris), ez a kevésbé elterjedt forma, a tünetek ebben az esetben már 65 éves kor előtt jelentkeznek, a kialakulás okai pedig az *APP* (az amiloid prekursor proteint kódolja), a *presenilin 1* (gamma-szekretáz alegységet kódol) és a *presenilin 2* (gamma-szekretáz alegységet kódol) gének mutációi lehetnek, amelyek abnormális APP fehérje fragmentumok képződését okozzák. Sporadikus formája gyakoribb, ebben az esetben a betegség 65-70 éves kor között alakul ki, és bár a kialakulás okai nem teljesen tisztázottak, valószínűleg egyes genetikai (pl. *APOEε4* allél jelenléte), környezeti és életmóddal kapcsolatos tényezők (pl. cukorbetegség) kombinációja is fokozhatja a megjelenés kockázatát.(14)

Az Alzheimer-kór jellemzői az agyban felhalmozódó abnormális neuritikus amiloid-β (Aβ) plakkok és neurofibrilláris kötegeket létrehozó hiperfoszforilált tau (p-tau) jelenléte. A toxikus Aβ létrejötte a betegség patogenezisének kulcsfontosságú lépése. Az Aβ az amiloid prekursor fehérjéből (APP) jön létre. Ha az alfa- vagy a béta-szekretáz hasítja APP-t, a keletkező kis fragmentumok nem toxikusak az idegsejtekre. Ha azonban a béta-, és gamma-szekretáz egymást követően hasítja az APP-t, a 42 aminosavból álló amiloid-β peptid keletkezik, amely felhalmozódik és extracelluláris plakkokat képez. Az amiloid-β túltermelődése bizonyítottan szerepet játszik betegség kialakulásában, azonban kimutatott, hogy a neurotoxikus hatást nem az aggregált formák (plakkok) okozzák, hanem sokkal inkább a szolubilis oligomerek, mivel plakkok jelenlétét már olyan egyéneknél is detektáltak, akik a

nem voltak demensek.(11)(12) Míg a plakkok leginkább a szürkeállomány, neocortex és agyhártya területén fordulnak elő, a neurofibrilláris kötegek először a hippocampusz, majd az egész agykéreg területén megfigyelhetők, és ez a megfigyelt tau patológia szorosabban kapcsolódik a klinikai és kognitív hanyatláshoz, mint az amiloid-kórtan. A betegség során az agy mediális temporális területén található neuronok (pl. hippocampális piramissejtek, entorhinális kéreg) sérülnek főleg, de a Meynert-féle nucleus basalis-ban is detektáltak idegsejt elhalást.(12),(13)

A betegségnek egyelőre nincs gyógymódja, de a tünetek enyhítésére gyógyszeres kezelések elérhetők. Ennek érdekében kétféle gyógyszercsoport is engedélyezett: a kolinészteráz-gátlók (növelik az acetil.kolin szintet, segítik a neuronok közötti kommunikációt) és a részleges N-metil-D-aszpartát (NMDA) antagonisták (blokkolják a NMDA-receptorokat, emellett lassítják az intracelluláris kalciumfelhalmozódást).(12)

1.3. Az AGE-RAGE útvonala

Az előrehaladott glikációs végtermékek (advanced glycation endproducts, AGEs) a különböző makromolekulák (fehérjék, lipidek, nukleinsavak) szacharidokkal (glükóz, fruktóz, pentóz) való módosításával keletkeznek. Ezt nevezik Maillard reakciónak, amely egy nem-enzimatis glikáció.(15) AGE-ek bevitelűek a szervezetbe különbözű ételekkel, vagy dohánytermékekkel, de endogén módon is folyamatosan termelűdnek. Keletkezésűk felgyorsulhat, illetve fel is halmozódhatnak az öregezés, illetve egyéb kóros folyamatok, mint például cukorbetegség, gyulladás, szív- és érrendszeri betegségek, neurodegeneratív rendellenességek és rákos megbetegedések során.(16),(17)

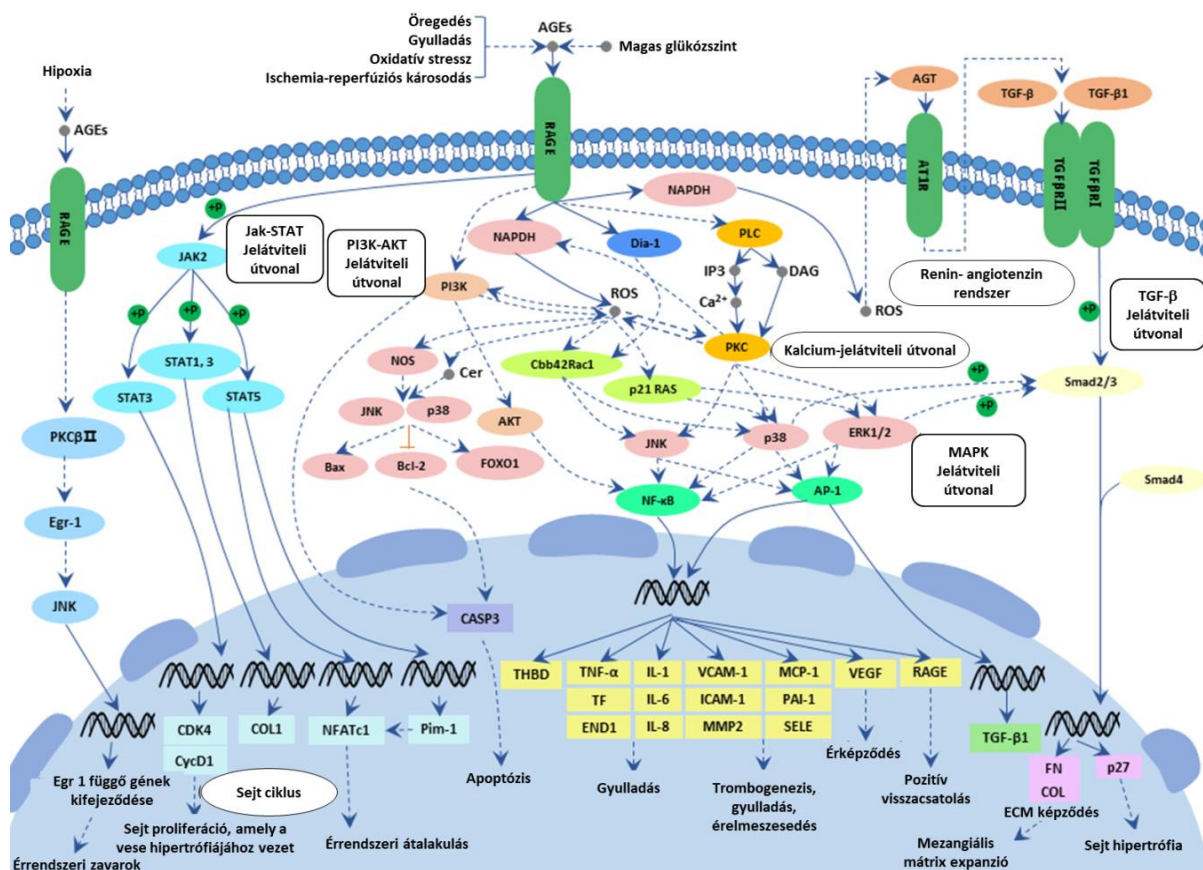
A képzűdés komplex mechanizmusai, illetve a prekursorok sokfélesége miatt számos AGE molekula létezik, melyek közül emberi vérbűl, szűvetekbűl, élelmiszerekbűl többet is sikeresen azonosítottak már. Ezek forrásuk (endogén vagy exogén), prekursoruk, kémiai szerkezetűk és fluoreszcenciára való képességűk, illetve molekulasűlyuk és toxicitásuk szerint is csoportosíthatóak.(18) Az egyik jelentűs prekursor az AGE képzűdésben a metilglioxál (MGO), amely a glikolízis, a treonin-katabolizmus és a ketontest képzűdés egyik fontos mellékterméke. Maga a metilglioxál is a reaktív oxigén származékok (ROS) egyik forrása, de a létrejűtt AGE-ek kapcsolódása receptorukhoz, a RAGE-hez (receptor for advanced glycation endproducts) pl. nukleáris faktor- κ B-t (NF- κ B) aktivál, amely további ROS, és pro-inflammatorikus citokinek képzűdését indukálja.(19) Ezen kívűl pedig az interakció hatására a

JAK-STAT, PI3K-Akt, MAPK és kalcium jelátviteli útvonalak is aktiválódhatnak. A JAK-STAT és PI3K-Akt bekapcsolásának hatására aktiválódó NADPH oxidáz pedig részt vesz a ROS termelés elősegítésében, a kaszpáz-3 aktiválásában és nukleáris DNS degradációjában, amely az idegsejtek károsodáshoz illetve apoptózisukhoz vezet (1.ábra).(20)

A RAGE emellett gyulladást is közvetít, illetve a TNF- α citokin expresszióját, és oxidatív stresszt szabályoz kettes típusú cukorbetegségben. A RAGE egy multiligand receptor, az AGE-ek mellett kölcsönhatásba léphet amiloid- β peptid prekúrral (ABPP), mononukleáris fagocitákkal és limfocitákkal, S100/calgranulinokkal, amfoterinnel, ezzel pedig aktiválja az ERK1/2 és p53 útvonalakat, valamint a mitogén-aktivált protein kinázokat (MAPK-k) is.(18)

Alzheimer-kórban az A β oligomerek a RAGE receptorhoz kapcsolódnak, ami tehát a pro-inflammatorikus útvonalak aktiválásához és ROS termeléséhez vezet. Az amyloid- β RAGE-el való kölcsönhatása lehetővé teszi annak bejutását az agyba a vér-agy gáton át. Az A β agyban való lerakódása fokozza a gyulladásos választ, illetve a RAGE-el való fokozott kötődés, mind az A β , mind a RAGE felülszabályozását eredményezheti, amely fokozott ROS termelést és amyloid-béta plakkképzést okoz. A RAGE felülszabályozása ezen kívül a tau fehérje foszforilációját is súlyosbíthatja, ezzel elősegítve a neurofibrilláris kötegek képzését is.(21)

Huntington kór esetén is hozzájárulhat a betegség progressziójához a fokozott glikáció, mivel, akár az AD esetében, elősegítheti a mutáns fehérje aggregációját illetve lerakódását is.(22)



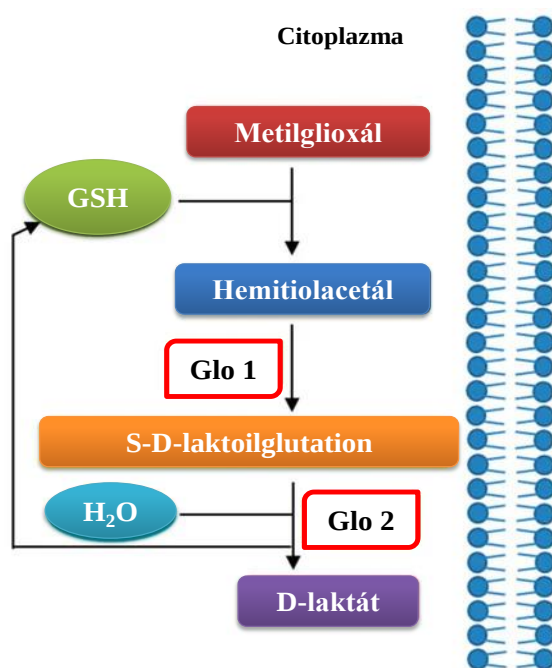
1. ábra: Az AGE-RAGE jelátviteli útvonala sematikus ábrája(20)

1.4. A glioxaláz 1

A glioxaláz 1 (Glo1) enzimét *Drosophilában* a *Glyoxalase 1 (Glo1)* gén kódolja. A 2,39 kbp kiterjedésű gén a második kromoszómán, a 2R:7,393,546..7,395,932 pozícióban helyezkedik el, citológiai elhelyezkedése pedig 43B2-43B2. A gén egy annotált transzkripttel rendelkezik és egy polipeptidet kódol, ez a 176 aminosav hosszúságú Glo1 fehérje. Ez a fehérje az állatok minden vizsgált szövetében expresszálódik. Molekuláris funkciói a fémion-kötés és laktoilglutacion-liáz aktivitás, de részt vehet az inzulinreceptor jelátviteli útvonala szabályozásában is. Humán ortológja a GLO1 (glioxaláz I), mely szerepet játszik autista rendellenességben; diabéteszes retinopátiában; végstádiumú vesebetegségben; 2-es típusú diabetes mellitusban; és érrendszeri betegségekben is.(23)

A Glo1 a glioxaláz rendszer része, melynek tagja még a glioxaláz 2 (Glo2) illetve a redukált glutation (GSH) is. Feladatuk, a már említett metilglioxál (MGO) és más endogén, káros metabolitok detoxifikálása, és átalakítása D-laktáttá.(24) Átalakításuk során, először a reaktív MGO-ból, és a GSH-ból spontán hemitioacétál keletkezik. Ez aztán a Glo1 katalizálta

izomerizációval, amely egy kulcsfontosságú sebességhatározó lépés, átalakul S-D-laktoilglutationná. A Glo2 pedig ennek a vegyületnek a hidrolízisét katalizálja, amely során a GSH regenerálódik, és D-laktát jön létre (2. ábra). Így csökkenti a toxikus és reaktív MGO koncentrációt.(25)(26) A MGO egy erősen reaktív α -oxoaldehid, és amint arról már szó volt, glikolízis melléktermékeként keletkezik, emellett szerepet játszik az AGE-ek kialakulásában. Ha fehérjemaradványokkal, vagy nukleinsavakkal reagál az MGO, azok funkcióját elrontja, és ebből a módosításból képződnek az előrehaladott glikációs végtermékek.(24) Az AGE-ek felhalmozódását pedig számos kóros folyamat, köztük a ROS képződés és gyulladás is kíséri, de ezen kívül elősegíthetik az egyes betegségek, pl. a neurodegeneratív betegségek progresszióját is.(17)(21)(22)



2. ábra: A glioxaláz rendszer sematikus ábrája(26)

Alzheimer-kór esetén az MGO szintje növekszik, míg a Glioxaláz 1 expressziója lecsökken. Ez az emelkedett MGO szint növeli a proapoptotikus Bax fehérje aktivitását, és csökkenti az antiapoptotikus Bcl-2 expresszióját neuroblastoma sejtekben, ami több apoptotikus sejtet eredményez, ezzel fontos szerepet játszik az Alzheimer-kór kialakulásában. A magas MGO szint továbbá az agyi mitokondriumok oxidatív állapotát is károsítja, ezzel elősegíti az Alzheimer-kór patogenezisét. Emellett, az Alzheimer-kórban szenvedő betegekben a GSH kimerülése is megfigyelhető a glioxaláz rendszer elégtelen működése mellett, ami növeli a GSSG/GSH arányt, ez pedig összefüggésbe hozható a betegség súlyosságával.(24)

Huntington-kór esetén a MGO növeli az intracelluláris mutáns Huntingtin szintjét, aggregációját, illetve a sejtek toxicitását. A *Glo1* gén kiütésével élesztőmodellben azt találták,

hogy az MGO szintje jelentősen megnövekedett, a mutáns Huntingtin aggregálódott, *Drosophila* modellen vizsgálódva pedig a Glo1 csendesítése neurotoxicitást, élettartam rövidülést, és csökkent túlélést eredményezett.(27)

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatócsoportunk, a korábban Huntington kór és az Alzheimer kór *Drosophila* modelljein végzett miRNS transzkriptomikai vizsgálatok során azt a megfigyelést tette, hogy a betegség modellekben diszregulált miRNS-ek prediktált mRNS targetjei között felülreprezentáltak voltak az AGE-RAGE jelátviteli útvonal egyes komponenseihez köthetőek. Ebben a kutatási projektben ezért az volt a célunk, hogy egyrészt előállítsunk az AGE-RAGE útvonal egyik fő effektor fehérjéjét, a Glioxaláz 1 enzimet túltermelő transzgenikus *Drosophila* törzseket; másrészt fenotípus vizsgálatokat végezzünk arra nézve, hogy az így létrehozott törzsek menekítő hatást biztosítanak-e a HD és AD betegségmodelljeinkben. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy ezzel szemben, a *Glo 1* heterozigóta génkiütött, funkcióvesztéses törzsek hogyan viselkednek a fenotípusos vizsgálatok során. Végül pedig azt vizsgáltuk, hogy a Glioxaláz 1 overexpresszió milyen mértékben emeli meg a transzkriptumszintet, és hogy a HD állapotban az emelkedés hatással van-e a mutáns Huntingtin fehérje különböző formáinak mennyiségére.

Tételes célkitűzések:

***Glioxaláz 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.

***Glioxaláz 1* túltermelő törzs fenotípusos vizsgálata betegségmodellekben:**

1. *UAS-Glo1.FLAG* transzgén neuronális túltermelésének hatásának jellemzése céljából az *UAS-Glo1.FLAG* transzgént, és a *w*; *UAS-Httex1.Q25* , *w*; *UAS-Httex1.Q120* , *w**; *P*{*w*^{+mC} = *UAS-Htt.96Q.Cerulean*}2, illetve a *w**; +; *PBac*{*w*^{+mC} = *UAS-Abeta.1-42*}VK00033 transzgéneket ko-expresszáló muslicák, valamint megfelelő kontrollok előállítása keresztezésekkel.
2. Életképesség, élettartam, motoros funkciós és idegsejt degenerációs tesztek elvégzése.

A *Glo 1* funkcióvesztésének az AD és HD betegségmodellekre gyakorolt hatásának vizsgálata:

1. *Glo1*^{KO} mutációra nézve heterozigóta, a *w*; *UAS-Httex1.Q25*, *w*; *UAS-Httex1.Q120*, illetve *w**; +; *PBac{w^{+mC} = UAS-Abeta.1-42}VK00033* transzgéneket túltermelő muslicák és megfelelő kontrollok előállítása keresztezésekkel.
2. Életképesség, élettartam, motoros funkciós és idegsejt degenerációs tesztek elvégzése.

A *Glo 1* transzgén neuronális túltermelésének a *Glo1* és az *mHtt* mennyiségére gyakorolt hatásának vizsgálata:

1. A *Glo1* mRNS szintjének meghatározása RT-qPCR felhasználásával.
2. A mutáns Htt fehérje mennyiségének meghatározása immunoblot eljárással.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. *Drosophila* törzsek és fenntartásuk

A *w*; *UAS-Httex1.Q25* és *w*; *UAS-Httex1.Q120* törzsek(28) Prof. J. Lawrence Marsh (University of California, Irvine, CA, USA) szíves ajándékai voltak. A transzgenézishez 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) genotípusú állatok az ELKH SZBK *Drosophila* Injektáló Szolgálatától biztosították számunkra. A Bloomington Stock Centerből származtak a következő törzsek: *w¹¹¹⁸*, *P{GawB}elav^{C155}*, *w**; *P{w^{+mC} = UAS-Htt.96Q.Cerulean}2*; +, *w**; +; *PBac{w^{+mC} = UAS-Abeta.1-42}VK00033*. A *w*; *Glo1*^{KO}; + állatok(29) Aurelio A. Teleman laborjából származtak, míg a *w*; +; *UAS-Glo1.flag* állatokat laborunk hozta létre.

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

3.2. Transzgenikus *Drosophila* *UAS-Glo1.flag* törzs létrehozása(30)

3.2.1. pTWF.attB-*Glo1* konstrukció létrehozása

3.2.1.1. Klónozás pJET1.3/blunt vektorba

Macherey-Nagel NucleosSpin RNA Plus kit segítségével totál RNS-t izoláltunk 20 darab *Oregon-R* (vad típusú *Drosophila* törzs) nőstényből, majd abból egyes szálú cDNS-t állítottunk elő reverz transzkripcióval, Taqman Reverse Transcription Reagents (*Thermo*

Fisher Scientific, TFS) és random hexamer primerek alkalmazásával. A *Glo1*-et kódoló régiót (az első ATG-től a stop kodont megelőző kodonig) a kapott cDNS-ről Q5 magas hűségű DNS polimeráz (2 U/μl, *New England Biolabs, NEB*), valamint a *Glo1_E3C_F* és *Glo1_E3C_R* primerek alkalmazásával (Függelék, 1. táblázat) polimeráz láncreakcióval (PCR) amplifikáltuk. A *Glo1_E3C_F* primer erős Kozak szekvenciát, illetve a génspecifikus résztől 5' irányba *KpnI* restrikciós enzim hasítóhelyet tartalmazott; míg a *Glo1_E3C_R* primer 5' végén *EcoRI* restrikciós enzim hasítóhely volt elhelyezve. A hasítóhelyek a későbbi klónozás elősegítése érdekében voltak megtalálhatóak az általunk használt primerekben. Ügyeltünk arra a primerek megtervezésekor, hogy a „destination” vektorban (pTWF.attB) a fúziós peptid tag megfelelő leolvasási keretbe kerüljön a későbbiekben. Az 542 bp méretű PCR amplikont Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (*NEB*) segítségével tisztítottuk és koncentráltuk, majd CloneJET PCR Cloning Kit (*TFS*) felhasználásával ligáltuk pJET1.2/blunt vektorba. Az elkészült ligátumot *E. coli DH5α* kompetens sejtekbe transzformáltuk, ezt követően a transzformáns sejtekből plazmidot izoláltunk a ZR Plasmid Miniprep kit (*Zymo Research, ZR*) segítségével. Ezután tesztelésztést végeztünk *KpnI* és *EcoRI* Fast Digest enzimek (*TFS*) alkalmazásával, majd miután ezzel igazoltuk az inszert jelenlétét, az egyik mintát megszekvenáltattuk (a szekvenálást a Delta Bio 2000 Kft végezte), melynek eredményeként megbizonyosodhattunk arról, hogy a klónozás során nem történt változás (pl. pontmutáció) a *Glo1* cDNS szekvenciájában.

3.2.1.2. Szubklónozás pENTR3C vektorba

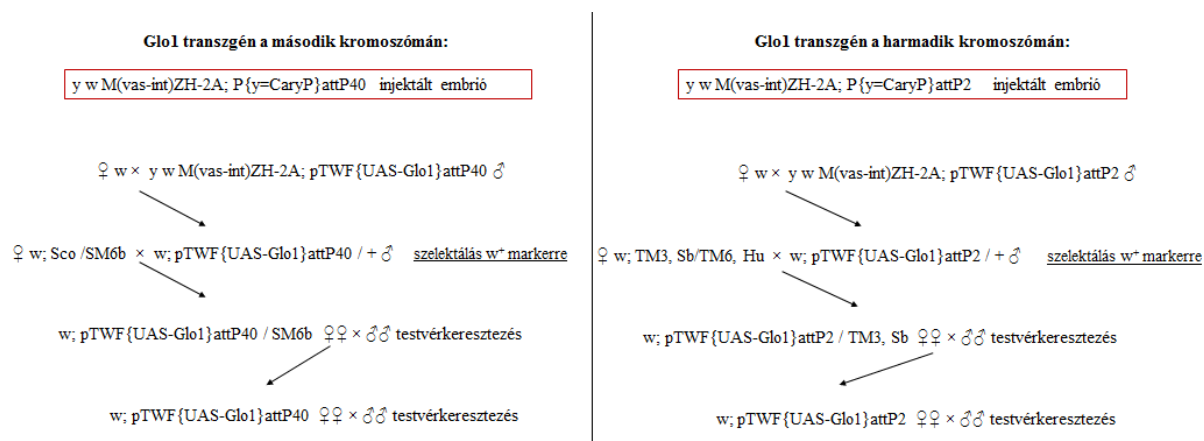
Qubit dsDNA BR Assay Kit (*TFS*) segítségével fluorometriásan meghatároztunk a pENTR3C plazmid minta (~130 ng/μl) és a kiválasztott pJET1.2-Glo1 (~100 ng/ μl) konstrukció koncentrációját, majd a két mintát *KpnI* és *EcoRI* restrikciós endonukleázok segítségével emésztettük, és gélelektroforézissel elválasztottuk. Kivágtuk a gélből a felnyitott pENTR3C vektort (~2700 bp, a *ccdB* letális kazetta kivágódott), illetve a *Glo1* szekvenciát (542 bp), tartalmazó részt, majd MN NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (*Macherey Nagel, MN*) segítségével izoláltuk belőlük a DNS-t. Ezt követően T4 DNS ligázt (*TFS*) használva ligáltuk a két fragmentumot, a koncentrációjukat is figyelembe véve. *E. coli DH5α* kompetens sejtekbe transzformáltuk a ligátumot, a felnövő transzformáns telepekből pedig ZR Plasmid Miniprep kit-et (*ZR*) használva plazmid DNS-t tisztítottunk, és ismét tesztelésztést végeztünk, a már ismertetett módon.

3.2.1.3. Szubklónozás pTWF.attB vektorba

A pENTR3C vektorban Gateway klónozásra alkalmas, attL1 és attL2 szekvenciákat találunk. Ezek, illetve a célvektorban (esetünkben pTWF.attB) található attR1 és attR2 helyek között a beklónozott *Glo1* gén helyspecifikusan rekombináltható. Az LR rekombinációs reakciót Gateway LR Clonase Enzyme mix (*Invitrogen/TFS*) alkalmazásával végeztük el, majd a kapott pTWF.attB-Glo1 konstrukcióval ismét *E. coli DH5α* kompetens sejteket transzformáltunk.

3.2.2. Transzgenikus *UAS-Glo1.flag Drosophila* törzsek létrehozása

Az injektáláshoz szükséges nagy tisztaságú és koncentrációjú plazmid DNS-t NucleoBond Xtra Midi prep kit (MN) segítségével izoláltunk 100 ml pTWF.attB-Glo1 hordozó DH5α sejt kultúrából. A transzgenikus *Drosophila* törzsek létrehozásához szükséges injektálást a Szegedi Biológiai Kutatóközpont *Drosophila* Injektáló Szolgálatát végezte. Ehhez φC31 integráz mediálta integrációra alkalmas, második (attP40) vagy harmadik (attP2) kromoszómás, a konstrukciónknak megfelelő, attP dokkoló helyekkel rendelkező embriókat alkalmaztak. A kikelő állatokat (attP40: 36 db hím és 44 db nőstényt, attP2: 68 db hím és 81 db nőstényt) fehér szemű w^{1118} egyedekkel kereszteztük, így az injektált szülők, akik csak mozaikosan tartalmazzák a transzgént, átadhatták azt utódaiknak, akik már a minden sejtjükben tartalmazzák azt. Ezeknek a transzgenikus állatoknak a szeme a *mini-white* markergén következtében narancssárga volt. Ahhoz, hogy a *UAS-Glo1.flag* transzgén jelenlétére homozigóta vonalakat kapjunk, ezekkel az állatokkal törzsbeállítást végeztünk az alábbi keresztezések elvégzésével (3. ábra). Így létrehoztunk olyan törzseket, melyek képesek kifejezni az *UAS-Glo1.flag* konstrukciót, és amelyek így alkalmassá váltak a *Glo1* túlermelés hatásának vizsgálatára, HD és AD neurodegeneratív betegségmodellekben.



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

3.3. Immunoblot assay

Transzgenikus fehérje termelésének validálására és a fehérjemennyiség meghatározására alkalmaztunk western blot assay eljárást. A fehérjemintákat *Drosophila* egyedek fejéből izoláltuk. Ehhez folyékony nitrogénben fagyasztottuk az Eppendorf csőbe helyezett, altatott állatokat, és erőteljesen vortexeltük őket a fejek eltávolításához. Egy mintához 10 fejet használtunk fel, ezekhez mintánként 13 µl szonikációs puffert adtunk, majd a fejeket pisztillus és rotor segítségével homogenizáltuk. A gélre 20 µg fehérjét terveztünk felvinni mintánként, ezért a homogenizátumok koncentrációit Qubit Protein Assay kit (TFS) segítségével meghatároztuk, és kiszámoltuk hány µl-re van szükségünk ehhez az egyes mintákból. A számolásnál figyelembe vettük a 2x SDS-loading puffer okozta hígulást is, amelyet ezt követően minden mintához hozzáadtunk, a mintatérfogatoknak megfelelően. A homogenizátumokat ezután 98°C-on, 10 percen át forraltuk, jégen hűtöttük, végül 4°C-on, 13000 g-n centrifugáltuk őket. A méret szerinti elválasztást SDS-PAGE (poliakrilamid gélelektroforézis) segítségével végeztük el. Ehhez 10%-os akrilamid gélét készítettünk, amely felül stacking, alul szeparáló gélből állt, illetve a folyamathoz 5x SDS-PAGE puffert is alkalmaztunk. A zsebekbe 10-10 µl került a mintákból, majd szobahőmérsékleten végeztük el a gélelektroforézist, 100 V-on, 60 perc alatt. A blottolás 0,45 µm pórusméretű nitrocellulóz membránra (*GE Healthcare Life Sciences*) történt. Az elektroblottolást transzfer pufferben, 100 V-os feszültség alkalmazásával 90 percen át végeztük, 4°C-on. Ezután blokkolás következett, melynek során a membránt 5%-os tejport tartalmazó TBST oldatba helyeztük egy éjszakára, 4°C-ra. A membránt másnap 1x5 percen át TBST oldatban mostuk, majd 1%-os tejport tartalmazó TBST oldatban hígított elsődleges ellenanyaggal 2 órán át, szobahőmérsékleten inkubáltuk. A *Glo1* transzgenikus törzsek validálásához egérben termeltetett E7 anti-tubulin (DSHB, 1:500) és M2 anti-FLAG (Sigma-Aldrich F3165, 1:4000) elsődleges ellenanyagot használtunk, míg a mutáns HttQ96-Cerulean kimutatására a *Glo1* túltermelés hatására, nyúlban termeltetett anti-H3 (*Abcam*, #ab1791, 1:5000) és anti-GFP (*Invitrogen*, A-6455, 1:2000) elsődleges ellenanyagokat alkalmaztunk. Az inkubálás végeztével 3x10 percig mostuk a membránt 1x TBST oldattal, majd ráhelyeztük a torma peroxidázzal kapcsolt másodlagos ellenanyagot. Ez egér elleni másodlagos ellenanyag (RAM-HRP – *Dako*, 1:5000) illetve nyúl elleni másodlagos ellenanyag (GAR-HRP – *Dako*, 1:5000), volt, amelyek mindegyikét 1%-os tejport tartalmazó TBST-ben hígítottunk, és egy órán át ráztuk a membránt bennük. Ennek lejártaival, 1x15 percen át, majd 2x5 percen át mostunk a membránunkat 1x TBST oldattal, majd 5 percen át sötétben inkubáltuk MILLIPORE Immobilon™ Western HRP szubsztrát reagenssel. Híváshoz a LI-COR C-

DiGit Blot Scanner műszert alkalmaztuk, amely a képződő kemilumineszcens jel detektálására alkalmas. A kapott intenzitásértékeket a gép saját programjának segítségével értékeltük ki.

A kísérletekhez felhasznált pufferek:

- *Szonikációs puffer*: 50 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 1x PIC, 10 Mm nátrium-butirát
- *Szeparáló gél*: 8 ml 29:1 AA:bisAA, 6 ml 4x szeparáló puffer (1,5 M Tris pH 8.8, 0,4% SDS), 10 ml H₂O, 96 µl 10% APS, 48 µl TEMED
- *Stacking gél*: 3 ml H₂O, 1,25 ml 4x stacking gél puffer (0,5M Tris pH 6.8), 0,6 ml 29:1 AA:bisAA, 40 µl 10% APS, 20 µl TEMED,
- *5x SDS PAGE puffer*: 10 g SDS, 15,1 g Tris, 94 g glicin, 1 l H₂O
- *transzfer puffer*: 25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,01% SDS, 850 ml H₂O, 150 ml metanol
- *fehérje marker*: 0,05 µl Chemiluminescent marker, 4 µl ProSieve látható fehérjemarker, 5 µl 2x SDS loading+ β-mercaptoethanol
- *5 % tejpor 1× TBST-ben*: 2,5 g tejpor - 50 ml 1× TBST-ben (5 mM Tris, 15 mM NaCl, 7.4 pH, 0,05% Tween-20) oldva

3.4. *Drosophila* keresztezések

A *Glo1* transzgén illetve *Glo1* mutáns allél hatásait úgy tudtuk vizsgálni *Drosophila* HD és AD modelleken, hogy a *Glo1* törzseket először az X kromoszómán *elav*-GAL4 drivert, a 2. vagy 3. kromoszómán pedig domináns markereket hordozó törzsekkel kereszteztük (egy keresztezéshez 5-10 hímét és nőtényt használtunk fel, a keresztezések 25°C-on történtek). Ez azért volt fontos, mivel így keletkeztek olyan utódok, amelyek a *Glo1* transzgént egy domináns markerrel transzheterozigóta formában hordozták, ezek utódai között aztán a domináns marker segítségével tudtuk meghatározni, mely utódok rendelkeznek a *Glo1* transzgénnel vagy a mutációval. Ahhoz, hogy a túltermelés HD-ra és AD-ra kifejtett hatását vizsgálni tudjuk, az *elav*-GAL4; *Glo1*/marker gén genotípusú hímeket az adott betegségnek megfelelő fehérjét (mHtt vagy Aβ₁₋₄₂) expresszáló szűzekkel kereszteztünk. Az utódok közül a nőtények, akik X kromoszómájukon *elav*-GAL4 driverrel rendelkeznek, (ezért termelik a betegséget kiváltó fehérjét) álltak a vizsgálat középpontjában, míg a nem expresszáló (*elav*-GAL4-et nem hordozó) hímek kontrollként szolgáltak a vizsgálatok során.

Funkciónyeréses keresztezések:

Ahhoz, hogy vizsgálni tudjuk a *Glo1* túltermelés hatását HD és AD modelleken, a fent leírt sémát alkalmaztuk. Ehhez először *elav-GAL4*; +; *Sb/TM6 Ubx* szűz nőtényeket kereszteztünk *w*; +; *UAS-Glo1.flag/7* genotípusú hímekkel, és a *elav-GAL4*; +; *UAS-Glo1.flag/Sb* hím utódokkal dolgoztunk tovább. HD modellben a második keresztezéshez szükséges szüzeket kísérlettől függően a következő genotípusú törzsekből gyűjtöttük: *w*; *UAS-Httex1.Q25*; + (egészséges kontroll) , *w*; *UAS-Httex1.Q120*; + (expresszálja a humán mutáns Htt fehérje 120 glutamin ismétlődést kódoló első exonját) , *w**; *P{w^{+mC} = UAS-Htt.96Q.Cerulean}2*; + (a kódolt mutáns Htt fehérje 96 glutamin ismétlődéssel rendelkezik és fuzionáltatva van Cerulean fluoreszcens fehérjével). AD modellben a szüzeket vagy *w¹¹¹⁸* (kontroll), vagy *w**; +; *PBac{w^{+mC} = UAS-Abeta.1-42}VK00033* ♀ (expresszálja a humán amiloid béta peptid (Aβ), 1-42 aminosavait) törzsek adták. Az utódok közül az *elav-GAL4* neuronális driverrel rendelkező nőtényeket vizsgáltuk tovább.

Funkcióvesztéses keresztezések:

Huntington-kór modellben való kísérleteinkhez először *elav-GAL4*; *Sp/SM6b*; + ♀ szűz nőtény egyedeket kereszteztünk *w*; *Glo1^{KO}*; + ♂ hímekkel, majd az *elav-GAL4*; *Glo1^{KO}/Sp*; + hím utódokkal folytattuk tovább a keresztezést. HD modellben való vizsgálatainkhoz vagy *w*; *UAS-Httex1.Q25*; + (kontroll) vagy *w*; *UAS-Httex1.Q120*; + ♀ (beteg) szűz nőtényeket, míg AD modellben történő kísérleteinkhez *w¹¹¹⁸* (kontroll) vagy *w**; +; *PBac{w^{+mC} = UAS-Abeta.1-42}VK00033* (beteg) szüzeket vittünk keresztezésbe, és a kikelő nőtény utódokon végeztük kísérleteinket.

3.5. *Drosophila* vizsgálati módszerek

HD *Drosophila* modellünkben meghosszabbodott, mutáns Huntingtint (mHtt) expresszáló Httex1.Q120 egyedek, illetve az AD *Drosophila* modellünkben, az amiloid-béta (Aβ₁₋₄₂) peptidet expresszáló Aβ₁₋₄₂ legyek csökkent életképességet, rövidebb élettartamot, csökkent motoros aktivitást és idegsejtjeik degenerációt mutatnak. Ezen vizsgálatok során azt volt célunk megfigyelni, hogy az *UAS-Glo1.flag* transzgén túltermelése, vagy a *Glo1^{KO}* allél heterozigóta formában való jelenléte, jár-e fenotípus változással a különböző betegségmodellekben.

3.5.1. Életképesség vizsgálat

Betegségmodelltől függően 10-30 párhuzamos keresztezést állítottunk össze a 3.4 pontban leírtak szerint, amelyeket aztán 25°C-on tartottunk. A keresztezésekből kikelő, különböző nemű, és genotípusú egyedeket 5 napon keresztül számoltuk, illetve az *elav-GAL4* drivert hordozó nőtényeket (genotípusonként) le is gyűjtöttük, úgy hogy egy fiolába maximum 30 állat került. A következőekben leírt tesztekert rajtuk végeztük el, mivel ők hordozták az *elav-GAL4* drivert, mely a transzgenek expresszióját biztosította. Az expresszázó és nem expresszázó (hím) testvér egyedek számaiból százalékos-, illetve relatív kikelési arányt számoltunk fiolánként, a kapott eredményeinkre pedig χ^2 -próbát, illetve t-tesztet végeztünk.

3.5.2. Élettartam vizsgálat

A keresztezésekből legyűjtött nőtény állatok élettartamát követtük 25°C-on. Vizsgálataink során az állatokat 2-3 naponta friss fiolába átráztuk, hogy csökkentsük annak az esélyét, hogy a fiolánk elfertőződjene, vagy az egyedek a táptalajba ragadjanak. Genotípusonként legalább 200-250 db állat élettartamát vizsgáltuk úgy, hogy naponta néztük, és vezettük, hogy az egyes fiolákban (max. 30 állat fiolánként) aznap hány halott egyedet találtunk. Az adataink kiértékelése az OASIS 2 (online application for survival analysis 2)(31) program segítségével történt. Az OASIS 2 Kaplan-Meier nem parametrikus módszert alkalmaz az élettartam görbék becslésére, segítségével megkaptuk a vizsgált egyedek átlagos élettartamát, a medián élettartamukat, és az idő függvényében a túlélő egyedek százalékos arányait is. Összehasonlítást is végez a program, Log-rank nem parametrikus teszt alkalmazásával a kísérleti, és a kontroll állatok túlélési görbéjét vetette össze a teljes élettartamra vonatkozó adatokon keresztül, és P értékeket szolgáltatott rájuk.

3.5.3. Motoros funkciók vizsgálata

A vizsgálathoz a keresztezésekből legyűjtött, 25°C-on tartott egyedeket használtuk. A különböző betegségmodellek esetén különbözött a vizsgált állatok életkora, ami az élettartamok közötti jelentős különbséggel magyarázható. Mind a HD, mind pedig az AD modell esetében elmondható azonban, hogy a motoros funkciók vizsgálatának elvégzése a medián életkor előtt történt. Ekkor a vizsgált állatok több mint fele még életben volt minden genotípus esetében, viszont a betegségek fenotípusai már megjelentek, a halálozások már elkezdődtek a kísérleti csoportban. Az alkalmazott mászás teszt a *Drosophila melanogaster* természetes negatív geotaxisán alapul. Elvégzéséhez a vizsgált állatokat táptalajt nem tartalmazó, üres fiolákba ráztuk át, és egy keretben rögzítettük a fiolákat. A keret segítségével

a fiolákat egyszerre leráztuk, majd 15 másodpercen át követtük az állatok mozgását, amit videóra is vettünk. Egy mérés alkalmával ~30-50 állatot vizsgáltunk genotípusonként. A kísérleti csoportot a lerázást követő 5. másodpercben, míg a kontroll állatokat a 2. másodpercben vizsgáltuk. Ehhez, az adott másodpercben kivágott képen egyenes vonalat húztunk a fiolák aljánál, és ettől a vonaltól lemértük a fiolákban található minden egyed mászási távolságát pixelben, az Online Ruler(32) eszköz segítségével. Lemértük a fiolákat is pixelben, a távolságokat átváltva pedig kiszámoltuk az állatok sebességét. Statisztikai analízisként Mann-Whitney U (két csoport vizsgálatakor) és Kruskal-Wallis (három vagy több csoport vizsgálatakor) nem-parametrikus tesztekkel végeztünk a kapott adatokon.

3.5.4. Idegsejt degeneráció vizsgálata

Az idegsejtek degeneráltságának mértékét pseudopupil assay segítségével tanulmányoztuk. Ehhez genotípusonként 10 db altatott állatot dekapitáltunk csipesz segítségével. A fejeket tárgylemezre, átlátszó körömlakk cseppbe helyeztük féloldalasan, hogy a szemük jól látszódjon a későbbiekben. A fixált mintákra immerziós olajat cseppentettünk, és *Nikon Eclipse 80i* mikroszkóp 50x nagyítású objektíve segítségével vizsgáltuk őket. A *Drosophila melanogaster* összetett szemét ommatídiumok sokasága alkotja. Egy ommatídium nyolc fotoreceptor neuronból, melyek mindegyike egy rhabdomerrel (fénygyűjtő struktúra) rendelkezik. Mivel a 7-es rhabdomer térben a 8-as felett helyezkedik el, mikroszkópban csak hetet tudunk megkülönböztetni.(33) Munkánk során fejenként 20 db ommatídium rhabdomerjeit számoltuk, melyeknek hiánya (ha egy ommatídiumban 7-nél kevesebb rhabdomer látható) összefüggésben áll a neurodegenerációval. A kapott adatokat fejenként átlagoltuk, és statisztikai analízisként t-tesztet végeztünk a genotípusok között.

3.6. RNS izolálás *Drosophila* mintákból és RNS koncentráció meghatározás

RNS izolálásra az expressziós vizsgálatokhoz volt szükség. A kivonáshoz széndioxiddal altatott, 3 napos életkorú ecetmuslincákat használtuk fel. Egy minta minimum 20 fejből (~4 mg szövet) készült, egy kísérlethez pedig minimum 3 párhuzamos biológiai replikátumot készítettünk. Az izolálást RNáz mentesítővel kezelt elszívó fülke alatt, sterilen végeztük. Mintáinkhoz 100-100 µl TRIzol™ reagenst (*TFS*) adtunk, ebben pisztillus és rotor segítségével homogenizáltuk a fejeket. Az izolálást a gyártó által kiadott protokoll alapján végeztük, és annak végétével 25 µl RNáz-mentes vízbe oldottuk fel a kicsapott RNS-t. A kivont RNS koncentrációját és tisztaságát NanoDrop 1000 spektrofotométer segítségével határoztuk meg. A műszer 260 nm-en, az RNS fényelnyelési maximumán RNS koncentrációt

mér; a 260 nm-en és 280 nm-en mért OD értékek hányadosából az izolált RNS tisztaságára következtethetünk. Ha az OD_{260}/OD_{280} hányados értéke 1,9-2,1 között volt, akkor az RNS oldatunkat tisztának tekintettük. A méréshez RNáz-mentes vizet használtunk mosásra, illetve vakként, az izolált RNS oldatokból pedig 1-1 µl-t használtunk fel.

3.7. RT-kvantitatív PCR

A valós idejű kvantitatív PCR ((real-time) qPCR) során használt Taq DNS polimerázok csak DNS-t képesek templátként használni, ezért az izolált RNS-ekről cDNS másolatot készítettünk. Ennek előkészítő lépéseként, a gyártó által ajánlott módon RNáz-mentes DNáz I endonukleáz (*TFS*) kezelésnek vetettük alá az RNS mintáinkat, hogy eltávolítsuk az esetleges DNS szennyeződéseket. Ezt követően, LunaScript RT SuperMix Kit (*NEB*) segítségével elvégeztük a reverz transzkripciót, a gyártó által biztosított protokoll alapján. A cDNS mintákban a vizsgált mRNS-eknek megfelelő cDNS-ek mennyiségi meghatározását qPCR-ral végeztük el. Ehhez Luminaris Color HiGreen qPCR reagenst (*TFS*), specifikusan a vizsgált génekre tervezett primereket (Függelék, 2. táblázat) és a Piko-Real™ Real-Time PCR System műszert (*TFS*) alkalmaztunk, az alábbi beállításokkal:

• 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	∞	

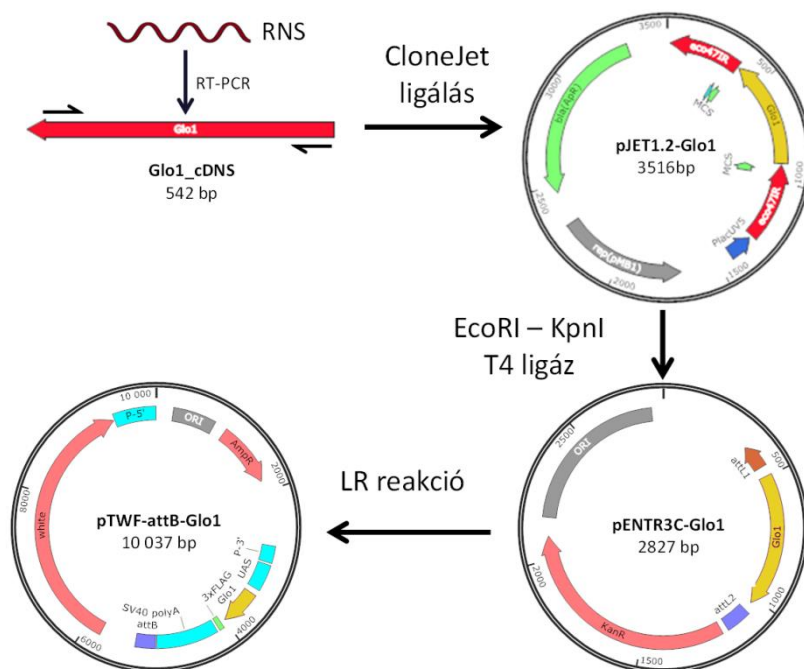
Adataink kiértékeléséhez 4 lépcsős templát hígítási sort készítettünk, melynek Ct értékeiből kalibrációs egyenest vettünk fel. A kalibrációs egyenes segítségével meghatároztuk a templátmennyiségeket az egyes mintákban, majd ezeket *α-tubulin* háztartási gén kontrollra normalizáltuk, hogy megkapjuk a relatív mennyiségi értékeket.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

4.1. A *Glo1* klónozása és *Glo1* túltermelő *Drosophila* törzsek létrehozása

A projekt során célunk volt a *Glo1* gént a GAL4/UAS expressziós rendszer segítségével, FLAG peptid taggal jelölt formában túltermeltetni *Drosophila* egyedekben. Ehhez létrehoztunk olyan transzgenikus törzseket, melyek a második vagy a harmadik kromoszómájukon hordozzák az *UAS-Glo1.flag* transzgént (30). Ezt több klónozási lépés

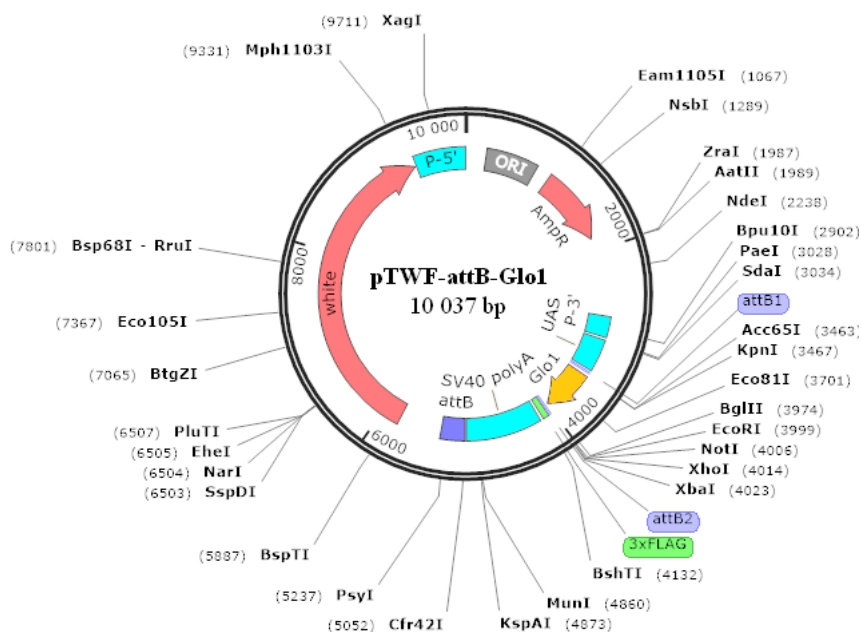
segítségével hajtottuk végre (4. ábra), melynek során a célvektorunk a pTWF.attB vektor volt, amely helyspecifikus transzgén integrációt képes biztosítani.



4. ábra: Klónozási terv

A *Glo1* kódoló szekvenciájának klónozásához első lépésként totál RNS-t izoláltunk 20 darab *Oregon-R* (vad típusú *Drosophila* törzs) nőstényből, majd abból reverz transzkripcióval egyesszálú cDNS-t állítottunk elő. A kapott cDNS-ről Q5 magas hűségű DNS polimeráz, valamint a *Glo1*_E3C_F és *Glo1*_E3C_R primerek alkalmazásával amplifikáltuk a *Glo1*-et kódoló génszakaszt. A primerek KpnI illetve EcoRI restrikciós enzim hasítóhelyekkel voltak ellátva, a későbbi klónozási lépések elősegítése érdekében. A *Glo1* PCR amplikont először a pJET1.2/blunt vektorba ligáltuk, majd szubklónoztuk Gateway klónozást lehetővé tevő pENTR3C vektorba, a már említett KpnI és EcoRI endonukleázok, illetve T4 DNS ligáz segítségével. Végül Gateway klónozás (rekombináció mediálta klónozás) alkalmazásával a *Glo1* kódoló szekvenciát átrekombináltattuk a pTWF.attB célvektorunkba. A pTWF.attB tartalmazza a ϕ C31 fágnak megfelelő attB helyet, így a *Drosophila* genomba épített attP dokkoló helyekre a ϕ C31 integráz jelenlétében helyspecifikusan integrálható. Ezen felül, biztosítja a beklónozott gén indukálható expresszióját a Gal4-UAS rendszer segítségével, valamint a transzgén által kódolt fehérje C-terminálisára FLAG fehérje jelölő is kerül. Ezek mellett a vektor *mini-white* marker gént is tartalmaz, amely a transzgenikus törzsek szelektálásánál volt segítségünkre (5. ábra). A pTWF.attB-*Glo1* konstrukciót ϕ C31 integráz mediálta integrációra alkalmas második (*y w M(vas-int)ZH-2A; P{y=CaryP} attP40*) és

harmadik (y w $M(vas-int)ZH-2A$; $P\{y=CaryP\}$ attP2) kromoszómás attP dokkolóhellyel rendelkező fehérszemű *Drosophila* embriókba injektáltattuk. Végül a kikelő embriók további keresztezéseivel, a *mini-white* markergénre történő szelektálással, létrehoztuk az *UAS-Glo1.flag* konstrukciót a második, illetve a harmadik kromoszómán hordozó homozigóta transzgenikus törzseket.



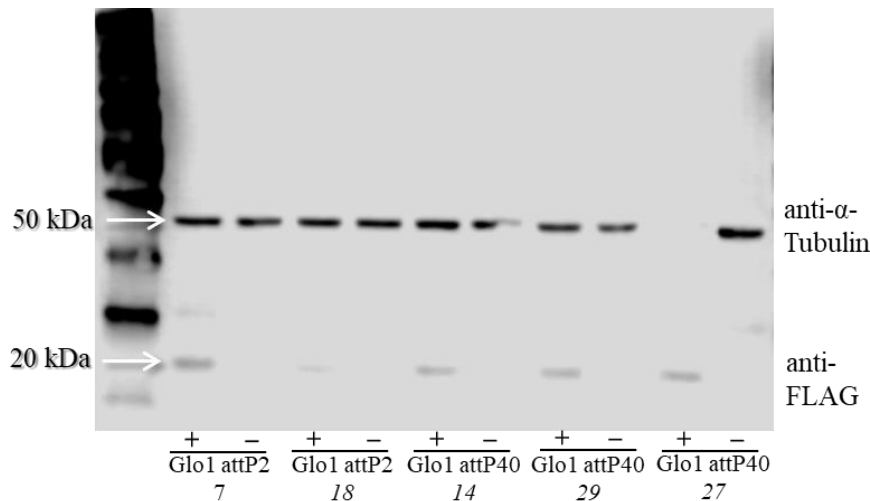
5. ábra: A pTWF.attB-Glo1 konstrukció.

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.

4.2. A *Glyoxalase 1* túltermelő törzsek validálása

A validálást western blot segítségével végeztük el. Ehhez a létrehozott w ; +, *UAS-Glo1.flag*, és w ; *UAS-Glo1.flag*; + törzseinket *elav-GAL4* neuronális driver gént hordozó törzsszel kereszteztük. A keresztezést úgy terveztük meg, hogy az utódok közül csak a nőstények örököljék a driver gént, így a neuronálisan indukált *Glo1* overexpresszió csak bennük valósult meg, a hím testvéreik pedig nem expresszáló kontrollként szolgáltak az immunoblot során.

A vizsgálat felvivő (loading) kontrolljaként α -tubulin referencia fehérjét az ellene termeltetett anti- α -tubulin ellenanyagot felhasználva detektáltuk. Mivel az a α -tubulin egy háztartási gén, ez minden egyedben jelen van (a *Glo1 attP40* 27-es mintánkban technikai hiba miatt nem jelent meg). Az *UAS-Glo1.flag* konstrukció detektálására anti-FLAG ellenanyagot alkalmaztunk. Ahogy az ábra mutatja (6. ábra), az összes vizsgált törzsünkben detektálható volt a transzgénről termelődő Glo1.FLAG fehérje, így alkalmasak voltak a HD és AD *Drosophila* betegségmodellekben való további vizsgálatok elvégzésére.



6. ábra: *UAS-Glo1* törzsek western blot vizsgálata

4.3. A *Glo1* funkciónyerés hatása HD (*Htt-Q25* és *Htt-Q120*) modellben

Miután megbizonyosodtunk arról, hogy a *Glo1* overexpressziót biztosító *UAS-Glo1.flag* konstrukció jelen van, és funkcionális az injektált törzsekben, kíváncsiak voltunk arra, hogy túltermelése milyen hatással van a mutánsnak (*Htt-Q120*) és egészségesnek (*Htt-Q25*) megfelelő hosszúságú poliglutamin domént tartalmazó Huntingtint kifejező egyedekre. Ehhez *elav-GAL4* drivert alkalmaztunk, amely biztosította a *Htt-Q25*, a *Htt-Q120* illetve a *Glo1* neuronális kifejeződését is. Egy vizsgálatban a nőstény utódok között két genotípus jelenhetett meg, az egyik csak a megfelelő *Htt* transzgént expresszált (*Sb* marker mellett), míg a másik ko-expresszált a *Htt* és *Glo1* transzgeneket. A vizsgálat során kontrollnak alkalmaztuk a *Htt-Q25* egyedeket, illetve a nem expresszáló hímekeket is.

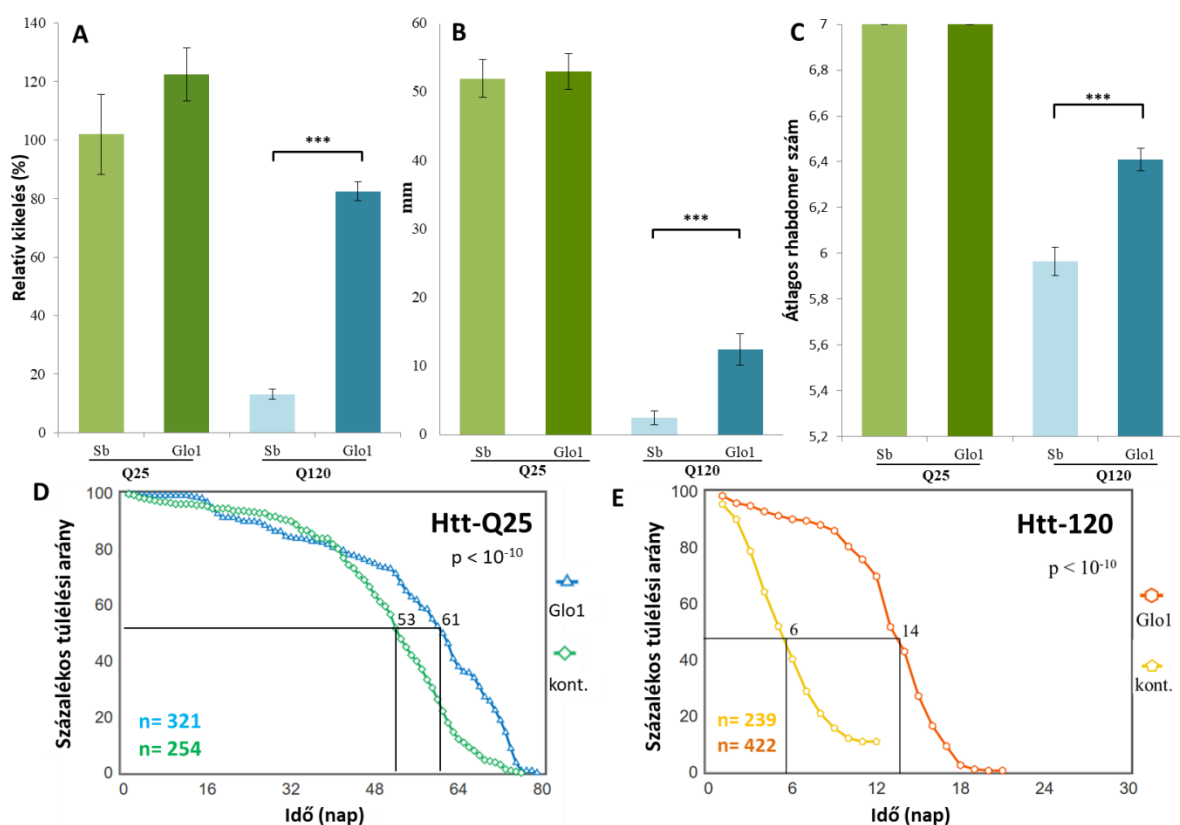
A keresztezések utódai között a *Htt-Q120* expresszáló nőstények a nem-expresszáló kontroll utódokhoz képest jelentősen kisebb arányban jelennek meg, azaz kevésbé életképesek. A *Glo1* túltermelése szignifikáns mértékben növelte a *Htt-Q120*-at expresszáló legyek életképességét (relatív kikelését), míg a *Htt-Q25* expresszáló nőstények esetében a *Glo1* ko-expressziójának nem volt jelentős hatása az életképességre (7. ábra, A).

Az életképesség vizsgálat során kikelt nőstényeket legyűjtöttük, és élettartamukat 25°C-on vizsgáltuk. A *Htt-Q120* nőstények élettartama jelentősen redukált a *Htt-Q25* egészséges kontrollok élettartamához képest. A *Glo1* overexpressziója mind a *Htt-Q25*, mind a *Htt-Q120* állatok esetében szignifikáns élettartam növekedést eredményezett (7. ábra, D és E).

A *Htt-Q120* állatok szemében megfigyelhető a fotoreceptor neuronok degenerációja, amely az ommatidiumokban található rhabdomerek számának csökkenésével jár. Az idegsejt degenerációs vizsgálatot ú. n. pseudopupil assay segítségével végeztük el három napos, vagy

kizárólag a megfelelő *Htt* transzgént, vagy a *Htt* és a *Glo1* transzgéneket együttesen kifejező nőstény egyedeken. A *Htt*-Q25 kontroll állatoknál nem tapasztaltunk neurodegenerációt, azonban a *Htt*-Q120 állatoknál megfigyelt idegsejt degeneráción a *Glo1* overexpresszió jelentősen javított (7. ábra, C)

A *Htt*-Q120 állatok motoros aktivitása leromlik, ami nyomon követhető a vertikális mászási sebesség meghatározásával. A motoros funkciók vizsgálatát öt napos, *elav*-Gal4 által hajtott transzgéneket expresszáló nőstény egyedeken végeztük. Ekkor, még a medián élettartam előtt, a *Htt*-Q120 állatok több mint fele életben volt, de a betegség okozta fenotípusuk már elég erős volt, így lehetőség adódott az esetleges *Glo1* overexpresszió általi menekítés detektálására. A *Htt*-Q25 kontroll állatoknál nem találtunk változást a motoros képességekben, de a *Htt*-Q120 egyedeknél a *Glo1* transzgén indukálta túltermelés szignifikánsan javította a mozgás sebességét (7. ábra, B).



7. ábra: A *Glo1* funkciónyerés hatása *Htt*-Q25 és *Htt*-Q120 expresszáló egyedekben. (A) Életképesség vizsgálat, a kikelt *Htt*-Q25 vagy *Htt*-Q120 expresszáló egyedek számát a nem-expresszáló hím testvéreik számához viszonyítottuk ($\pm$ standard hiba, t-teszt). **(B)** A mászási aktivitás megállapítására mászási sebességet mértünk (megtett függőleges út/ 5 mp; átlag $\pm$ standard hiba; Mann-Whitney U és Kruskal-Wallis nem parametrikus tesztek). **(C)** A

neurodegeneráció meghatározására a rhabdomervesztést vizsgáltuk (átlag ép rhabdomer szám / ommatidium, $\pm$ standard hiba; t-teszt). (**D** és **E**) Az élettartam vizsgálatok kiértékelésénél az élettartam görbék kerültek összevetésre (Log-rank nem parametrikus tesztek). (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Elmondható, hogy a *Glo1* funkcióvesztés a *Htt-Q120* Huntington-kór *Drosophila* modellben szignifikánsan növelte az állatok életképességét és élettartamát, csökkentette az idegsejt degeneráció mértékét, illetve szignifikánsan megnövelte az állatok mozgási sebességét, a nem-expresszálo testvéreikhez képest. A *Glo1* túltermelése még a kontroll csoportban (*Htt-Q25*) is szignifikáns hatású volt az állatok élettartamának megnövelésében.

4.4. A *Glo1* funkcióvesztés hatása HD (*Htt-Q25* és *Htt-Q120*) modellben

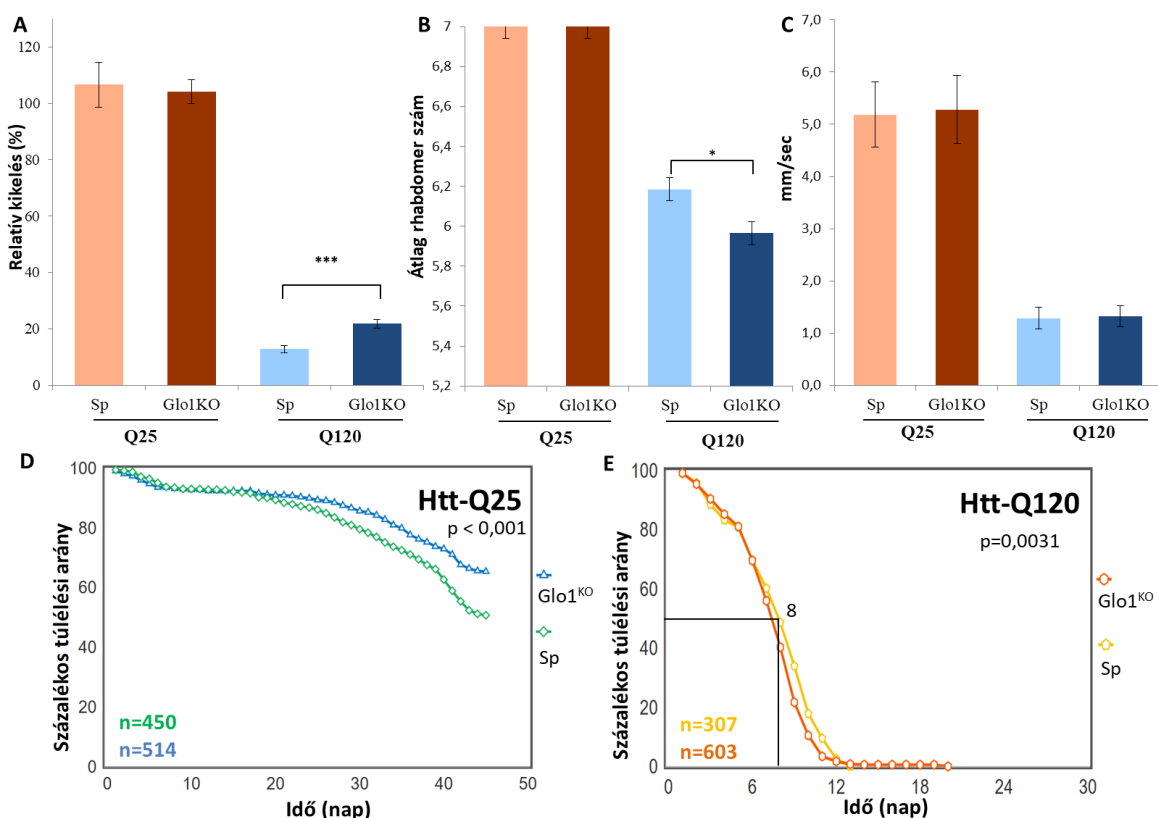
Mivel eddigi vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a *Glo1* transzgén túltermelése szignifikánsan javította a *Htt-Q120* kiváltotta fenotípusokat az összes tesztben, kíváncsiak voltunk az ellentétes hatásra, azaz hogy a gén heterozigóta formában történő kiütése következtében milyen változások következnek be a vizsgált HD nőstény állatainkon. Vizsgálataink során ismét a *Htt-Q25* genotípusú állatokat használtunk kontrollként, illetve a nem-expresszálo *Htt-Q120* hímeket.

A keresztezésekből kikelő összes utódot leszámloltuk, a nőstényeket pedig összegyűjtöttük a további vizsgálatokhoz. A nőstények mindegyike *Htt* transzgénnel, és az azt meghajtó neuronális *elav-GAL4* driverrel rendelkezett, ezen kívül pedig egy részük heterozigóta formában tartalmazta a *Glo1^{KO}* null mutációt. Meglepően, a *Htt-Q120 Glo1^{KO/+}* egyedek relatív kikelése a vizsgálat során szignifikánsan jobbnak bizonyult, mint a *Glo1* vad típusú alléljára (*Glo1⁺*) homozigóta testvéreiké. A *Htt-Q25* kontroll csoportban ugyan némileg jobb volt a *Glo1⁺* egyedek relatív életképessége, mint a *Glo1^{KO/+}* testvéreiké, ám ez a különbség közel sem volt szignifikáns (8. ábra, A).

Az élettartam vizsgálat során, a *Htt-Q120* kísérleti csoportok esetében kapott eredményeink azt mutatták, hogy bár a medián élettartam a *Glo1^{KO/+}*, és a homozigóta *Glo1⁺* csoportnál megegyezik (~8 nap), a *Glo1^{KO/+}* csoport maximális élettartama enyhén nagyobb (8. ábra, E). A *Htt-Q25* kontroll csoportok élettartamát a TDK dolgozat leadásakor még figyelemmel követtük, a dolgozat írásakor azonban a legidősebb egyedek 45 naposak voltak, de a tömeges elhullásuk ekkor még nem kezdődött el, élettartamuk mediánját még nem érték el, ez a görbéjük eddigi lefutásából is látható (8. ábra, D).

A *Htt-Q25* kontroll csoportok esetében az idegsejtek degenerációját egyáltalán nem észleltük. A három napos *Htt-Q120 Glo1^{KO}/+* kísérleti csoportoknál viszont szignifikánsan fokozódott a neurodegeneráció mértéke a *Htt-Q120 Glo1⁺* kontrollhoz viszonyítva (8. ábra, B).

Végül a motoros képességek vizsgálatára mászás tesztek is végeztünk 5 napos egyedeken, azonban az aktivitások között sem a kontroll, sem a kísérleti csoporton belül nem találtunk szignifikáns különbséget (8. ábra, C)



8. ábra: A *Glo1* részleges funkcióvesztésének hatása HD modellben. (A) Életképesség vizsgálat, a kikelt *Htt-Q25* vagy *Htt-Q120* expresszáló egyedek számát a nem-expresszáló hím testvéreik számához viszonyítottuk ($\pm$ standard hiba; t-teszt). (B) A neurodegeneráció meghatározására a rhabdomervesztést vizsgáltuk (ommatidiumonkénti ép rhabdomerek átlagos száma $\pm$ standard hiba; t-teszt). (C) A motoros aktivitás megállapítására sebességet mértünk (megtett függőleges út/ 5 mp; átlag $\pm$ standard hiba; Mann-Whitney U és Kruskal-Wallis nem parametrikus tesztek). (D és E) Az élettartamok kiértékelésénél az élettartam görbék kerültek összevetésre (Kaplan-Meier, és Log-rank nem parametrikus tesztek). (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

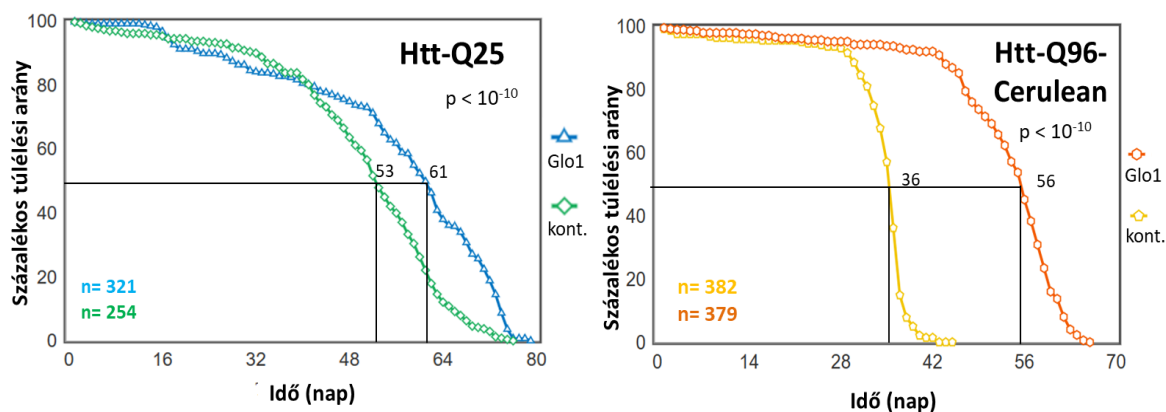
A *Glo1* gént csak heterozigóta formában hordozó, *Htt-Q120 Glo1^{KO}/+* egyedeken végzett fenotípusos tesztek eredményei csak az idegsejt degeneráció során mutatták a vártnak

megfelelő, a *Glo1* túltermeléssel ellentétes (rontó) hatást. Ebben az esetben káros hatása volt a génkiütésnek, mivel a neurodegeneráció mértéke szignifikánsan nőtt a *Glo1^{KO/+}* csoportban. Azonban, míg a motoros aktivitásban nem figyeltünk meg jelentős különbségeket, a *Glo1^{KO/+}* állatok életképessége és élettartama is növekedett a *Glo1* gént homozigóta formában hordozó testvéreikhez képest. A kontroll csoportok esetén nem detektáltunk különbséget a tesztek során, bár az élettartam vizsgálat még jelenleg is folyik.

4.5. A *Glo1* túltermelés hatása HD (*httQ96-Cerulean*) modellben

Mivel terveinkben többek között szerepelt a *httQ96-Cerulean* modellen elvégzett immunoblot vizsgálat is, először a genetikai interakciós vizsgálatokat végeztünk, hogy lássuk, jár-e menekítő hatással a *Glo1* túltermelése ebben a HD betegségmodellben. Vizsgálatainkat a *httQ96-Cerulean* és az *UAS-Glo1.flag* törzsekkel elvégzett interakciós keresztezések *elav-GAL4* driveres nőstény utódjain végeztük.

A *httQ96-Cerulean* nőstények élettartama jelentősen redukált a *htt-Q25* egészséges kontrollok élettartamához képest. Az életképesség vizsgálat során a kísérleti csoportban (*htt-Q96*) azonban a *Glo1* transzgént overexpresszáló, és nem overexpresszáló csoportok kikelése között nem találtunk szignifikáns eltérést ($p=0,432$). Pseudopupil assay segítségével a neurodegenerációt is szeretnénk volna vizsgálni, ám azt találtuk (1 és 2 hetes állatokat vizsgálva), hogy nem történt idegsejt degeneráció egyik vizsgált csoportban sem. A motoros aktivitás mérésére használt mászás teszt során is hasonló megfigyeléseket tettünk, sem a kontroll, sem pedig a kísérleti csoportok között nem figyeltünk meg szignifikáns eltérést. Az állatok élettartamát vizsgálva azonban jelentős különbségeket találtunk mindkét csoport esetében, amelyet a *htt-Q25* kontroll állatok vonatkozásában már korábban ismertettem. A *htt-Q96* kísérleti csoportban a *Glo1* túltermelés okozta jelentős javító hatás volt megfigyelhető, melynek eredményeként a medián élettartam 36 napról 56 napra tolódott ki, és ezek az egyedek jóval tovább is maradtak életben (9. ábra)



9. ábra: A *Glo1* overexpresszió okozta élettartam növekedés a kontroll (*Htt-Q25*) és a kísérleti (*Htt-Q96-Cerulean*) csoport esetében. (Kaplan-Meier, és Log-rank nem parametrikus tesztek).

Az elvégzett vizsgálatok alapján tehát elmondható, hogy a *Glo1* overexpresszió a *Htt-Q96-Cerulean* állatok esetén szignifikáns élettartam növekedést eredményezett a nem-overexpresszáló csoporthoz képest. Életképesség, neurodegeneráció, és mászási aktivitás tesztek során a két kísérleti csoport között nem találtunk jelentős különbségeket.

4.6. A *Glo1* funkciónyerés hatása AD modellben

Vizsgálatainkat az ide tartozó interakciós keresztezések *elav-GAL4*-et expresszáló nőstény utódjain végeztük el, melyeknek egy része csak a béta-amiloid peptidet, a másik része pedig a *Glo1* transzgén is expresszálta. Vizsgálataink során ezeknek az egyedeknek a nem expresszáló hím testvéreit, továbbá *Abeta* transzgén nem hordozó nőstényeket is használtunk kontrollként.

Célunk volt, hogy kiderítsük, hogy az $A\beta_{1-42}$ peptid expressziója által létrehozott, beteg fenotípust (életképességre, élettartamra, idegsejtek integritására és mozgásra gyakorolt negatív hatás) képes-e menekíteni a *Glo1* túltermelése.

Ebben a betegség modellben is elvégeztük a fenotípusos teszteket, az élettartam vizsgálat kivételével, mivel az *Abeta* transzgén expressziója nem okoz olyan mértékű toxikus hatást 25 °C-on, mint az mHtt: az egyedek élethossza, bár szignifikánsan csökken, de közelít a vad típuséhoz. Hasonló okok miatt a vizsgálatainkat nem pár napos, hanem 1 és 2 hetes korú egyedeken végeztük el, mivel a tünetek progressziója miatt ekkor már detektálhatóak a többi tesztben vizsgált, az $A\beta_{1-42}$ okozta fenotípusok.

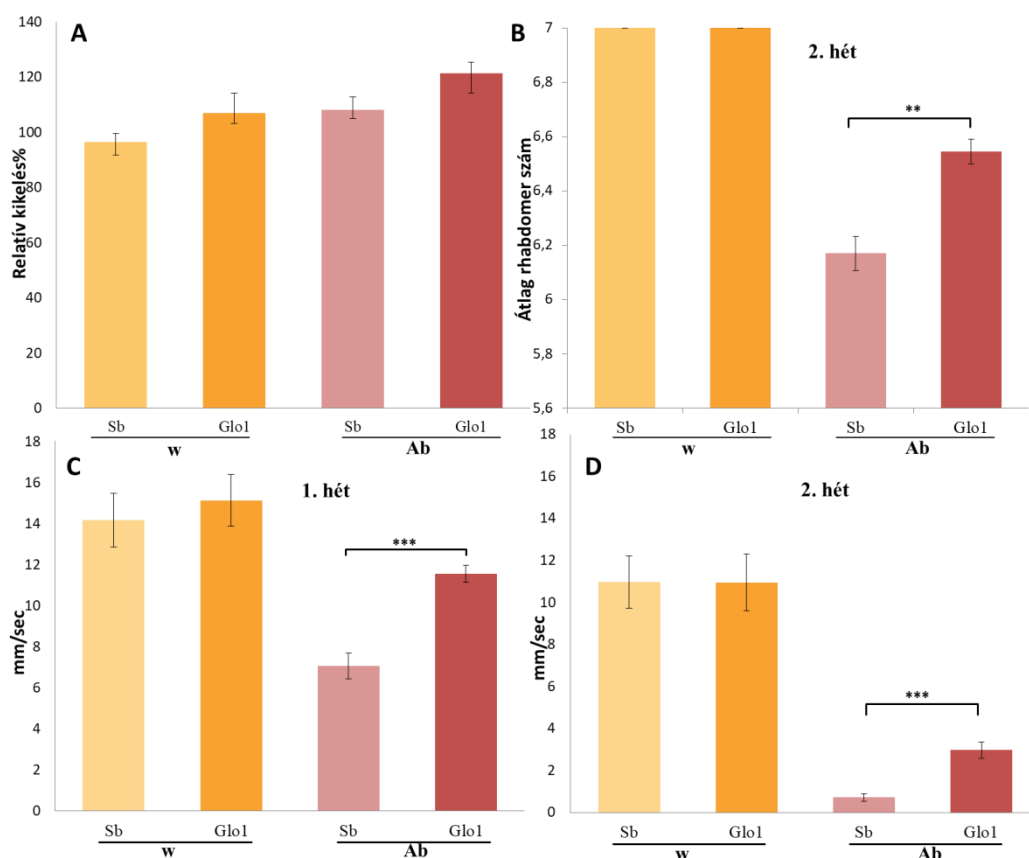
Az életképesség vizsgálatok során azt találtuk, hogy bár a *Glo1* transzgén hatására mind az $A\beta_{1-42}$ túltermelő kísérleti, mind az *Abeta* transzgén nélküli kontroll csoportban megnőtt az

egyedek száma, ez a különbség egyik esetben sem volt szignifikáns (w kontroll: $p=0,106$; Abeta: $p=0,11$) (10. ábra, A).

A neurodegeneráció mértékét is meghatároztuk a csoportoknál, ezt pseudopupil assay alkalmazásával vittük végbe. Az egy hetes életkorú állatok esetében még nem volt különbség a vizsgált csoportok között, azonban a kéthetes állatoknál a *Glo1* túltermelő AD legyek esetében szignifikánsan kisebb mértékű neurodegeneráció volt detektálható (10. ábra, B).

Végül pedig mászás teszt segítségével az állatok motoros aktivitását is megvizsgáltuk, melynek eredményeként azt kaptuk, hogy mind az egy-, mind a két hetes életkorú állatok esetén a kísérleti csoportban jelentősen jobban teljesítettek a *Glo1* transzgént hordozó egyedek (10. ábra, C és D)

A *Abeta* transzgént nem hordozó kontroll egyedek esetében egyik vizsgálat során sem tapasztaltunk jelentős változást.



10. ábra: A *Glo1* túltermelés hatása AD modellben. (A) Életképesség vizsgálat, a kikelt Abeta nélküli kontroll (w) és az *Abeta* expresszáló nőstény egyedek számát a nem expresszáló hím testvéreik számához viszonyítottuk ($\pm$ standard hiba; t-teszt). (B) Idegsejt degeneráció (ommatidiumonkénti ép rhabdomerek átlagos száma ($\pm$ standard hiba; t-teszt). (C és D) 1 és 2 hetes életkorú állatokon végzett motoros aktivitás tesztek (megtett függőleges út/ 5 mp; átlag

± standard hiba; Mann-Whitney U és Kruskal-Wallis nem parametrikus tesztek). (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Az adatok értékelése után kijelenthetjük, hogy a *Glo1* túltermelése az $A\beta_{1-42}$ peptidet expresszáló utódokban (Alzheimer-kór *Drosophila* modell), szignifikánsan csökkentette az idegsejt degeneráció mértékét 2 hetes korban, és jelentősen növelte a mászási sebességet 1 és 2 hetes korú állatok esetén is, a nem-túltermelő, $A\beta_{1-42}$ expresszáló utódokhoz képest. Az életképesség vizsgálat során, bár nagyobb arányban keltek ki az $A\beta_{1-42}$ expresszáló csoportok közül a *Glo1* túltermelő utódok, a detektált különbség nem bizonyult szignifikánsnak.

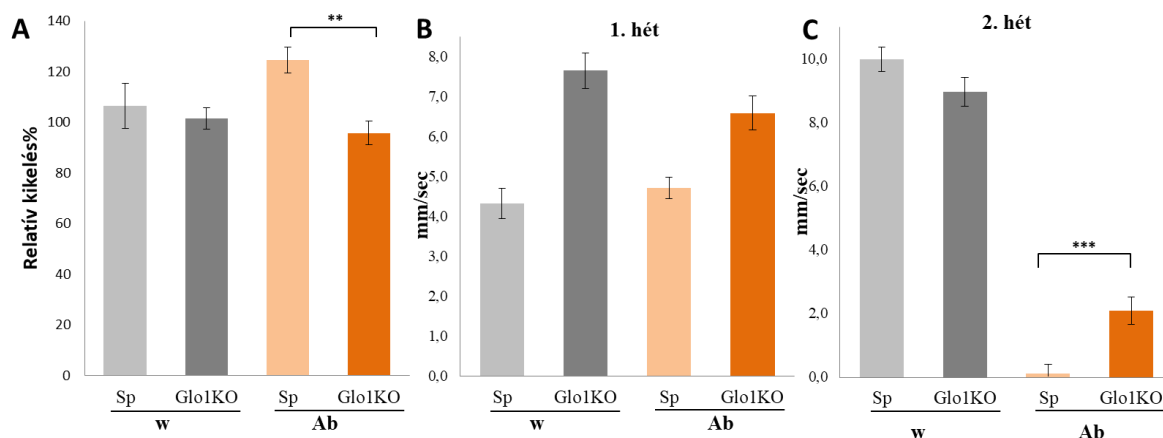
4.7. A *Glo1* funkcióvesztés hatása AD modellben

Az AD legyekben végzett *Glo1* funkciónyeréses vizsgálatok pozitív eredményei miatt kíváncsiak voltunk, hogy milyen fenotípusos változást okoz a betegségmodellben a *Glo1* heterozigóta nullmutációja. A vizsgálatokhoz az interakciós keresztezések nőstény utódjait használtuk fel, melyek mindegyike *Abeta* transzgénnel, és az ezt meghajtó *elav*-GAL4 driverrel rendelkezett, illetve vagy homozigóták voltak a $Glo1^+$ vad típusú allélra, vagy heterozigóta formában tartalmazták a $Glo1^{KO}$ mutációt. Tesztjeink során ismét a nem-expresszáló hím testvérek, illetve *Abeta* transzgént nem hordozó (w^{118} -al végzett keresztezésekből származó) nőstények szolgáltak kontrollként.

Az életképesség vizsgálat során azt találtuk, hogy az *Abeta* kísérleti csoportban a várakozásinknak megfelelően, a heterozigóta $Glo1^{KO}$ állatok kisebb arányban keltek ki, mint a $Glo1^+$ allélt homozigóta formában hordozó testvéreik. Enyhe csökkenés volt megfigyelhető a kontroll csoportnál is a génkiütés hatására, ez az érték azonban közel sem szignifikáns (11. ábra, A).

A neurodegeneráció mértékét is vizsgáltuk a különböző csoportokban 1 és 2 hetes állatokon. Az egészséges kontroll állatoknál egyáltalán nem volt degenerációra utaló jel, míg az AD állatoknál már detektálható volt a neurodegeneráció, de a két genotípus ($Glo1^{KO/+}$ és $Glo1^+$) között nem találtunk szignifikáns különbséget (1. hét: $p=0,412$, 2. hét: $p=0,575$).

A motoros aktivitás vizsgálatára végzett mászás teszt során, az egy hetes csoportoknál azt kaptuk eredményül, hogy az AD állatok esetén nem detektálható szignifikáns csökkenés a mászási sebességben (11. ábra, B). Két hetes korukra azonban az AD állatok gyakorlatilag mozgásképtelenné váltak, a *Glo1* részleges funkcióvesztése pedig szignifikánsan növelte az AD állatok mászási sebességét (11. ábra, C).



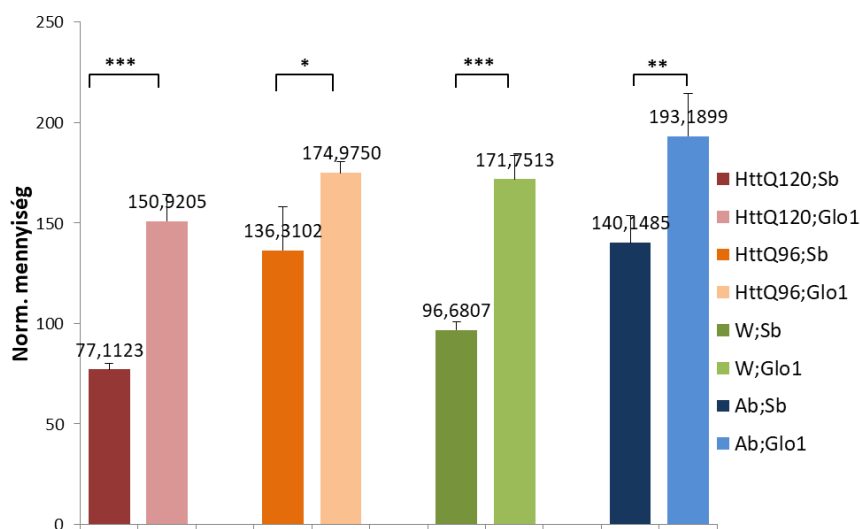
11. ábra: A *Glo1* funkcióvesztés hatása *Drosophila* AD modellben. (A) Életképesség vizsgálat ($\pm$ standard hiba; t-teszt), (B és C) 1 és 2 hetes életkorú állatokon végzett mászás tesztek (megtett függőleges út/ 5 mp; átlag $\pm$ standard hiba; Mann-Whitney U és Kruskal-Wallis nem parametrikus tesztek). (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Eredményeink alapján, a *Glo1* heterozigóta nullmutációja *Abeta* transzgén expresszáló egyedekben, akár csak a HD modellben, nem minden esetben mutatta a vártak megfelelő, *Glo1* túltermeléssel ellentétes (rontó) hatást. Káros hatása a heterozigóta géniütésnek az állatok életképességének vizsgálatánál volt detektálható, mivel ezek az állatok sokkal kisebb arányban keltek ki, a *Glo1* gént homozigóta formában hordozó testvéreikhez képest. Ezzel ellentétben, a motoros aktivitás mérése során azt találtuk, hogy már egyhetes korukban jobban teljesítettek a *Glo1*^{KO/+} egyedek, amely különbség a második hétre már szignifikánsan megnőtt, a *Glo1*⁺ állatok mozgásképtelenné válásával.

Összegezeként, a *Glo1* funkciónyerés és funkcióvesztés vizsgálata során kapott eredményeink részben ellentmondásra vezettek mind a HD, mind az AD modellben, amely felveti, hogy a transzgénünknek vagy van valamilyen általunk nem vizsgált hatása, vagy többféle úton fejtheti ki hatását. A *Glo1* túltermelés esetén azért várható a menekítő hatás, mivel a glioxaláz 1 egy detoxifikáló fehérje, ha túltermeljük, elméletben több, az AGE-ek keletkezéséért felelős reaktív aldehidet tud semlegesíteni. Csökkent glioxaláz 1 szintnél elképzelhető azonban, hogy a mutáns Huntingtin és A β ₁₋₄₂ toxikus oligomerek a megnövekedett glikatív stressz hatására fokozottan aggregálódnak, amely mindkét fehérje esetén a nem, vagy kevésbé toxikus formát eredményezi(11)(10). Ezzel pedig elősegíthetik a vizsgálatok során tapasztalt javító hatásokat. Annak kiderítésére, hogy melyik hatás érvényesül, további kísérletek elvégzése szükséges.

4.8. A *Glyoxalase 1* transzkripció aktivitásának vizsgálata túltermelő törzsekben

A fenotípusos vizsgálatok során kapott, a túltermelés okozta pozitív eredmények hatására, kíváncsiak voltunk arra is, hogy a bevitt transzgénünk milyen mértékben emeli meg a *Glo1* transzkriptum szintet. A vizsgálatunkat 3 napos állatokon, HD és AD *Drosophila* modellben is elvégeztük. Mintaként 20 db, az interakciós keresztezésekből kapott utódokat használtuk, tehát *elav-GAL4* drivert hordozó *Htt-Q120; +/Sb* és *Htt-Q120; Glo1/+*, *HttQ96-Cerulean; +/Sb* és *HttQ96-Cerulean; Glo1/+*, *w; +/Sb* és *w; Glo1/+*; valamint *Abeta/Sb* és *Abeta/Glo1* genotípusú állatokat. Bennük, a *Glo1* génről átíródó transzkriptum szintet RNS izolálást, majd cDNS átírást követően, kvantitatív PCR segítségével határoztuk meg. Ehhez 3 vagy 4 biológiai, és biológiai replikátumonként két technikai replikátumot alkalmaztunk. A reakciók során 200 nM α -tubulin és 500 nM koncentrációjú *Glo1* primereket használtunk, és 10x hígított cDNS templátokat alkalmaztunk. A reakciókat négy lépcsős, 3x hígítású templát hígítási sor (5x, 15x, 45x, 135x) mellett végeztük, ennek adatai alapján kalibrációs egyenest vettünk fel, kiszámoltuk a korrelációs együtthatóját (R), a meredekségét, és a qPCR futások hatékonyságát is (108,78% és 108,01%). Továbbá a kalibrációs egyenes segítségével kiszámoltuk az egyes mintákban lévő relatív templát mennyiségeket is, amelyeket aztán α -tubulin háztartási génkontrollra normalizáltunk.



12. ábra: A *Glo1* gén expressziója *UAS-Glo1.flag* túltermelő, és kontroll csoportokban.

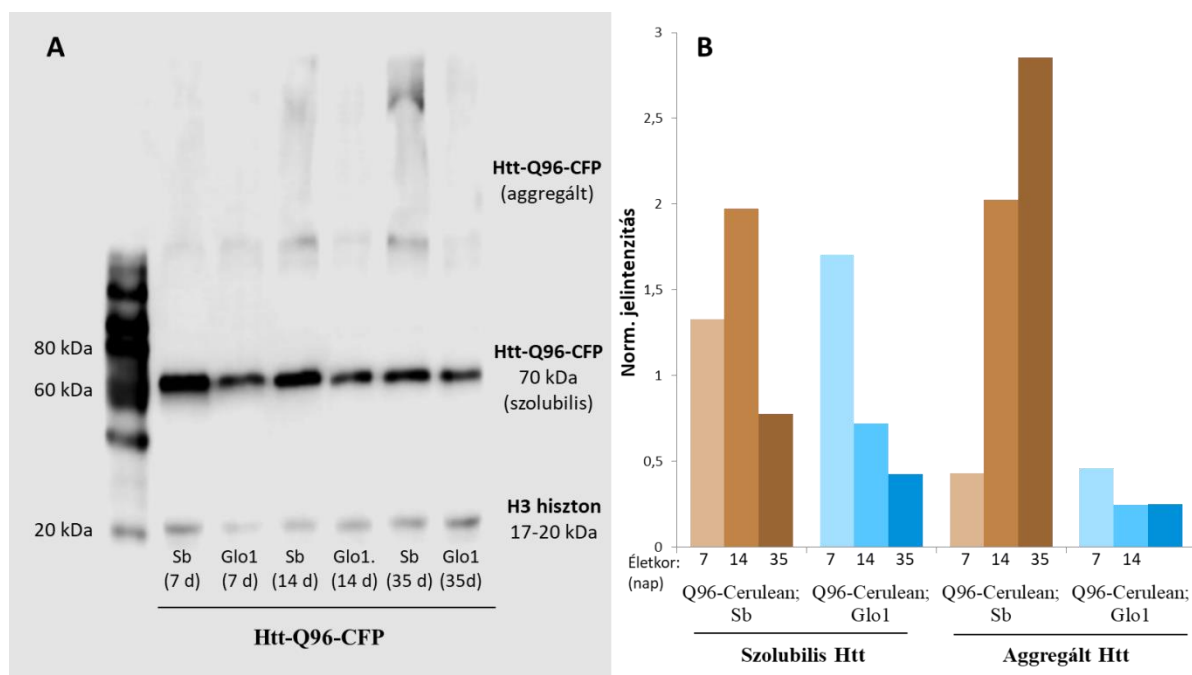
Az ábrán az egyes genotípusokban a *Glo1* gén relatív expressziós szintje látható (α -tubulinra normalizált átlag $\pm$ standard hiba; t-teszt). (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

A kapott eredményeink arra mutatnak, hogy a *Glo1* transzkriptum szintje, a bevitt transzgén hatására, szignifikánsan megnő az összes általunk vizsgált csoportban (12. ábra). Ez az eredmény alátámasztja a fenotípusos vizsgálatok során megfigyelt menekítő hatást a betegségmodellek túltermelő állatai esetében.

4.9. A *Glo1* túltermelés hatása a mHtt szolubilis és aggregált formáira

Projektünk végén azt vizsgáltuk, hogy a *Glo1* overexpresszió hatására bekövetkezik-e változás az mHtt különböző formáinak mennyiségében. Ennek elvégzésére immunoblot analízist alkalmaztunk. A vizsgálatot 7, 14, és 35 napos *elav-GAL4/+; HttQ96-Cerulean/+; +/Sb* és *elav-GAL4/+; HttQ96-Cerulean/+; Glo1/+* genotípusú állatokon végeztük el, mivel a *HttQ96-Cerulean* törzs és anti-GFP ellenanyag használatával detektálni tudtuk a Htt fehérje különböző formáit. Eddigi munkánk során genotípusonként 3 biológiai replikátumot készítettünk el, melyek közül az első sorozattal végeztük el az immunoblot analízist. Mintáinkhoz egyenként 10-10 fejet használtunk fel. Referencia fehérjének használtuk a vizsgálat során a H3 hiszton fehérjét (~17-20 kDa), amely mindegyik állatunkban jelen van, és megjelenik, ha jól működött az immunoblot.

A szolubilis Huntingtin fehérje fragmentum ~70 kDa nagyságú, míg az aggregált formája ugyanennek a fehérjének a nagy mérete miatt a stacking gélben kialakított zsebekben marad, így az elektroblottolás során az egész géllal dolgoztunk, hogy biztosan detektálni tudjuk az aggregált formát is (13. ábra, A).



13. ábra: A Htt fehérjemennyiség változása *Glo1*-et overexpresszáló állatokban. (A)

Glo1 túltermelő és normál *Htt-Q96-Cerulean* mintákból készült western blot képe, a különböző Htt formákkal feltüntetve. **(B)** Az immunoblot során kapott, H3 hisztonfehérjére normalizált jelintenzitás értékek a különböző formák esetén *Htt-Q96-Cerulean* túltermelő, a *Glo1*-et ko-expresszáló illetve *Glo1* transzgén nélküli kontroll (*Sb*) egyedeknél.

A hívás után kapott képet a LI-COR C-DiGit Blot Scanner saját programjával értékeltük. A minták intenzitásjeleit, a hozzájuk tartozó H3 hisztonról kapott intenzitásjelre normalizáltuk. A kiértékelés során készített ábráról jól leolvasható (13. ábra, B), hogy normál állapotban a szolubilis Htt mennyiségében nincs jelentős változás, csak enyhe ingadozás látszik a kor előrehaladtával. Az aggregált formák azonban egyértelműen növekednek az öregedés hatására. A *Glo1* túltermelő állatok esetén a szolubilis formák a kezdeti időpontban nem mutatnak eltérést a kontrollhoz képest, ám a kor előrehaladtával a mennyiségük látványosan csökken. Az aggregált formák az overexpresszáló egyedek esetén pedig már fiatalon is csökkent mennyiségben vannak jelen. Ahhoz, hogy biztos következtetéseket vonhassuk le, a vizsgálat további ismétlései szükségesek a többi biológiai replikátumon.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatómunkám középpontjában a Huntington-kór (HD), egy autoszómális domináns öröklődésű, neurodegeneratív megbetegedés, illetve a jellemzően sporadikus Alzheimer-kór molekuláris hátterének vizsgálat állt. Munkámat a betegségek transzgenikus *Drosophila melanogaster* modelljeiben végeztem.

A csoportunk által korábban HD és Alzheimer-kór modell rendszereken végzett mikroRNS transzkriptomikai vizsgálatok eredményei arra utaltak, hogy a két betegségmodellben változást mutató miRNS-ek targetjei között feldúsulnak az AGE-RAGE jelátviteli útvonalhoz köthető gének mRNS-ei. TDK dolgozatomban ezért célul tűztem ki az útvonalhoz köthető egyik fő detoxifikáló fehérjét, a glioxalázt kódoló *Glyoxalase 1 (Glo1)* gén klónozását, és transzgenikus, *Glo1* túltermelő *Drosophila* törzsek létrehozását. Az előállított *UAS-Glo1.flag* transzgenről történő expressziót western blot analízissel is ellenőriztük. Ezt követően HD és Alzheimer modellben is vizsgáltuk a *Glo1* túltermelésének hatását az állatok életképességére, élettartamára, idegsejt degenerációjára és mozgására vonatkozóan. Eredményeink azt mutatják, hogy a túltermelés a HD modellben az összes vizsgált tesztben javította a betegség fenotípusát, míg az AD modellben az életképességre nem volt hatással, de a további tesztek esetében menekítő hatást tapasztaltunk. Továbbá fenotípusos vizsgálatot végeztünk egy Cerulean fluoreszcens fehérjével kapcsolt mutáns huntingtint (Htt.Q96-Cerulean) expresszázó HD modellen is. Ebben az esetben az élettartamok között találtunk szignifikáns eltérést a *Glo1* overexpresszió hatására. Ezt a törzset használtuk arra is, hogy megfigyeljük, a *Glo1* túltermelése hatására megváltozik-e a mutáns huntingtin fehérje western blottal kimutatható szolubilis formájának; illetve a stacking gélben lévő aggregált formáknak a mennyisége. A *Glo1* mRNS szintjének növekedését a kísérleti csoportokban kvantitatív RT-PCR alkalmazásával igazoltuk.

A *Glo1* túltermelés hatásának jellemzése mellett *Glo1* funkcióvesztéses mutáns alléljének felhasználásával vizsgáltuk a csökkent *Glo1* szint hatását a *Drosophila* HD és AD modellekben.

kulcsszavak: Huntington-kór, Alzheimer-kór, neurodegeneráció, *Drosophila* modell, *Glo1*, túltermelés, menekítő hatás

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Bodai Lászlónak**, hogy a laboratóriumában dolgozhattam, és az ő keze alatt készíthettem el a második dolgozatomat is. Hálás vagyok az átadott magas szintű tudásáért, lelkiismeretes munkájáért, és idejéért, amit a szakdolgozói témavezetésembe fektetett.

Köszönet illeti a kutatócsoportunk minden tagját, **Dr. Zsindely Nórát, Farkas Anitát, Kovács Mercédeszt, Siági Fruzsínát és Nagy Gábort**, akik mindig készségesen és szívesen segítettek a munkám során, emellett pedig rengeteg hasznos szakmai tanáccsal láttak el.

IRODALOMJEGYZÉK

1. K. B. Bhattacharyya, *Ann Indian Acad Neurol.* **19**, 25–28 (2016).
2. G. Huntington, *JNP.* **15**, 109–112 (2003).
3. T. B. Stoker *et al.*, *Practical Neurology.* **22**, 32–41 (2022).
4. N. S. Caron, G. E. Wright, M. R. Hayden, in *GeneReviews®*, M. P. Adam *et al.*, Eds. (University of Washington, Seattle, Seattle (WA), 1993; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1305/>).
5. *Cell.* **72**, 971–983 (1993).
6. C. M. Ambrose *et al.*, *Somat Cell Mol Genet.* **20**, 27–38 (1994).
7. J. Schulte, J. T. Littleton, *Curr Trends Neurol.* **5**, 65–78 (2011).
8. F. O. Walker, *The Lancet.* **369**, 218–228 (2007).
9. R. Ghosh, S. J. Tabrizi, in *Polyglutamine Disorders*, C. Nóbrega, L. Pereira de Almeida, Eds. (Springer International Publishing, Cham, 2018; https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1_1), pp. 1–28.
10. M. Arrasate, S. Finkbeiner, *Exp Neurol.* **238**, 1–11 (2012).
11. U. Sengupta, A. N. Nilson, R. Kayed, *EBioMedicine.* **6**, 42–49 (2016).
12. A. Kumar, J. Sidhu, A. Goyal, J. W. Tsao, in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2023; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499922/>).
13. M. W. Bondi, E. C. Edmonds, D. P. Salmon, *Journal of the International Neuropsychological Society.* **23**, 818–831 (2017).
14. K. Ahmad *et al.*, *Curr Alzheimer Res.* **14**, 1190–1197 (2017).
15. C.-Y. Shen *et al.*, *Molecules.* **25**, 5591 (2020).
16. B. N. Waghela *et al.*, *Mol Cell Biochem.* **476**, 585–598 (2021).
17. L. M. Senatus, A. M. Schmidt, *Front. Genet.* **8** (2017), doi:10.3389/fgene.2017.00187.
18. A. Twarda-Clapa, A. Olczak, A. M. Białkowska, M. Koziolkiewicz, *Cells.* **11**, 1312 (2022).
19. M. Hollenbach, (2017).
20. AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications - Cusabio, (available at <https://www.cusabio.com/pathway/AGE-RAGE-signaling-pathway-in-diabetic-complications.html>).
21. Y. Kong *et al.*, *Front Aging Neurosci.* **12**, 227 (2020).

22. I. C. Brás, A. König, T. F. Outeiro, *J Huntingtons Dis.* **8**, 245–256 (2019).
23. L. S. Gramates *et al.*, *Genetics*. **220**, iyac035 (2022).
24. Y. He *et al.*, *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **131**, 110663 (2020).
25. P. J. Thornalley, *Biochemical Society Transactions*. **31**, 1343–1348 (2003).
26. C. Antognelli, V. N. Talesa, *Int J Mol Sci*. **19**, 415 (2018).
27. H. Vicente Miranda *et al.*, *Sci Rep*. **6**, 36798 (2016).
28. B. A. Barbaro *et al.*, *Hum Mol Genet*. **24**, 913–925 (2015).
29. A. Moraru *et al.*, *Cell Metabolism*. **27**, 926-934.e8 (2018).
30. R. Borosta, Transzgenikus Glyoxalase 1 túltermelő törzsek előállítása és az AGE-RAGE útvonal vizsgálata *Drosophila* Huntigton kór modellben (2022).
31. S. K. Han *et al.*, *Oncotarget*. **7**, 56147–56152 (2016).
32. Online Ruler | On screen pixel image ruler, (available at <https://www.rapidtables.com/web/tools/pixel-ruler.html>).
33. R. Cagan, *Curr Top Dev Biol*. **89**, 115–135 (2009).

FÜGGELÉK

1. táblázat: A klónozáshoz felhasznált primer szekvenciák:

Primer	Primer szekvencia	bp
Glo1-E3C-F	GGTACCATGGGCGACGTGACAGGA	24
Glo1-E3C-R	GAATTCAAGACGGAGTGTGCATTGAA	26

2. táblázat: Az RT-qPCR-hoz felhasznált primer szekvenciák:

Primer	Primer szekvencia	bp
Glo1-qF	GCTGTACTTTCTGGGGTACGAG	22
Glo1-qR	TGGGTCAACTCAATGGTGGC	20
tubulin_qF	TGTCGCGTGTGAAACACTTC	20
tubulin_qR	AGCAGGCGTTTCCAATCTG	19

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Borosta Roberta** nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott „**A Glioxaláz rendszer neurodegenerációra gyakorolt hatásának vizsgálata Huntington-kór és Alzheimer-kór modellekben**” című dolgozatomban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán jellemezve)
<i>Glo1</i> klónozás	5
<i>Drosophila</i> genetikai módszerek	4
Western blot	1
RNS izolálás	5
RT-qPCR	5
Adatelemzés	5

Kelt: 2024.04.15

Borosta Roberta

Pályamunkát benyújtó hallgató (*Borosta Roberta*)
aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:

Bodai László

Témavezető (*Dr. Bodai László, tanszékvezető egyetemi docens, SZTE TTIK Biokémiai és Molekuláris Biológiai tanszék*) aláírása