

37. Biológia OTDK Pályamunka

MiR-137 és miR-219 túltermelés hatásának vizsgálata *Drosophila* Alzheimer kór modellben

Research on the effects of miR-137 and miR-219 overexpression in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease

Nagy Éva Zsuzsanna

III. évfolyamos Biológia BSc szakos hallgató

Témavezető: Dr. Bodai László
tanszékvezető egyetemi docens

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

2024

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3
2. Irodalmi áttekintés.....	4
2.1. Az Alzheimer kór	4
2.2. A mikroRNS-ek biogenezeise és funkciója.....	6
2.3. A miR-137	7
2.4. A miR-219	8
3. Anyagok és módszerek:	9
3.1. Felhasznált <i>Drosophila</i> törzsek, fenntartásuk és keresztezések	9
3.2. Kikelési arányok vizsgálata:	10
3.3. Mászási tesztek:	10
3.4. Pseudopupil analízis:	11
3.5. RNS izolálás <i>Drosophila</i> fejekből	11
3.6. RNS spektrofotometriás kvantitálása és hígítása.....	12
3.7. DNáz I kezelés.....	12
3.8. Reverz transzkripció:	13
3.9. cDNS templát hígítási sor előállítása kalibrációs görbéhez	13
3.10. RT-qPCR:	13
3.11. Bioinformatikai vizsgálatok	14
4. Célitűzések:	15
5. Eredmények és értelmezésük:	16
5.1. A miR-137 és a miR-219 túltermelésének hatása az életképességre.....	16
5.2. A miR-137 és a miR-219 túltermelésének hatása a motoros aktivitásra	19
5.3. A miR-137 és a miR-219 túltermelésének hatása a fotoreceptor neuronok degenerációjára AD modellben	22
5.4. Az <i>UAS-Abeta</i> transzgén transzkriptum szintjének vizsgálata.....	25
5.4. Bioinformatikai vizsgálatok	27
5.4.1. Géndúsulás analízis.....	27
5.4.1. Komplementaritás vizsgálat:.....	32
6. Diskusszió.....	33
Köszönetnyilvánítás:	36
Irodalom jegyzék.....	37

1. Bevezetés

Az Alzheimer kór a demencia leggyakoribb okaként ismert gyógyíthatatlan neurodegeneratív betegség, melynek fő rizikófaktor a életkor. A betegség előrehaladtával az agyban neuropatológiás elváltozások jelentkeznek, így hippocampális atrófia, valamint extracelluláris amiloid plakkok és intracelluláris neurofibrilláris kötegek figyelhetők meg. Emellett az Alzheimer kór patogenezise során egyéb, mikroszkóppal nem kimutatható molekuláris változások is bekövetkeznek, ilyenek például a nem kódoló, rövid, konzervált szekvenciájú mikroRNS-ek génexpressziójában beálló változások. Egyes miRNS-ek kifejeződésének megváltozásával mennyiségük is megváltozik az idegszövetben, szintjük eltér az egészséges emberek idegszövetében mérhetőtől. Mivel a miRNS-ek posztranszkripciós szinteken befolyásolják a génkifejeződést, ezért mennyiségbeli változásaik az adott sejtekben zajló fehérjeszintézisre is jelentős hatást gyakorolhatnak. A miR-137 és miR-219 olyan mikroRNS-ek, amelyek expressziós változásai több kutatás során is összefüggésbe kerültek az Alzheimer kórral, illetve egyéb neurodegeneratív betegségekkel is. Ezen miRNS-ek funkciói között az idegi metabolikus folyamatok befolyásolása is szerepel, ezért a megváltozott kifejeződésük az idegrendszerben is változásokat idéz elő. Vizsgálataink során éppen ezért ez a két mikroRNS és az általuk okozott változások kerültek fókuszba. A kísérletek során a miRNS-ek túltermelésének hatását *Drosophila* Alzheimer kór modellben, valamint vad típusú (egészséges) muslicákban is vizsgáltuk. Az Alzheimer kór általunk használt transzgenikus modelljében a neurodegenerációt az amiloid-béta₁₋₄₂ peptid (Aβ) neuronális expressziója indukálta. Mivel beteg és egészséges egyedeket egyaránt vizsgáltunk, egyszerre figyelhettük meg a miRNS-ek hatását önmagukban, valamint az amiloid béta kiváltotta tünetekre nézve. A miRNS túltermeltetés hatásának vizsgálata három módon történt, kettő a neurodegeneráció mértékére utal, egy pedig a miRNS-ek toxicitására. Az idegi károsodást mászási tesztekkel és pseudopupil analízissel, a toxicitást pedig a kikelési arányokkal határoztuk meg. Az idegsejteket ért károsodásokat funkcionális és morfológiai teszttel is vizsgáltuk: a mászási tesztek az idegi aktivitás változást mutatják ki, míg a pseudopupil analízissel az ép idegsejtek számát vizsgáltuk, amiből az idegsejt elhalás mértékére lehet következtetni. A miRNS-ek hatásának vizsgálatait követően RT-qPCR módszerrel meghatároztuk az amiloid béta túltermeléséért felelős transzgen kifejeződésének mértékét. Az eredmények nagyobb rálátást tesznek lehetővé a kór patológiás folyamatainak megértéséhez, mind pedig betekintést engednek a mikroRNS-ek széleskörű hatásmechanizmusába.

Kulcsszavak: Alzheimer kór, miR-137, miR-219, neurodegeneráció

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az Alzheimer kór

Az Alzheimer kór (*Alzheimer's Disease*, AD) egy neurodegeneratív betegség, mely emlékezetzavarral, afáziával és a problémamegoldó képesség erős romlásával jár, a demencia fő okaként ismert (Khan S., és mtsai., 2020). A világszerte egyre emelkedő diagnosztizált esetek száma miatt a betegség vizsgálatának relevanciája is növekszik. Ez a tendencia összefüggésben áll a növekvő várható élettartammal, ugyanis a demencia a kor előrehaladtával egyre nagyobb valószínűséggel jelentkezik, ez az AD legjelentősebb rizikófaktor. A betegségben szenvedők számának emelkedése társadalomra is egyre növekvő terhet ró, nem csak az anyagi vagy munkaerőpiaci vonzata miatt, hanem az egészségügyi ellátás biztosítása okán is. (Miller, és mtsai., 2022) Bár a betegség és annak patológiai mechanizmusainak feltárását Alois Alzheimer ideggyógyász több mint száz éve kezdte meg, és megfigyelései még a mai napig meghatározók, emellett stabil alapot biztosítanak a további kutatásokhoz, mégsem sikerült azóta sem gyógymódot, sem pedig biztos megelőző módszereket találni a fokozatosan egyre nagyobb teret nyerő kórra. Éppen ezért a betegség minél részletesebb és átfogóbb megismerése hatalmas jelentőséggel bír napjainkban is. (Small D.H. és Cappai R., 2006)

A betegség korai diagnosztizálása azért nem egyszerű, mert a patogenezis molekuláris folyamatai már az észlelhető, viselkedésbeli tünetek előtt jóval, akár 10-20 évvel is megkezdődhetnek (Ballard C. és mtsai, 2011). Az Alzheimer kór lefolyása négy fő szakaszra osztható. Az első szakaszban jelenik meg az enyhe szellemi hanyatlás (Mild Cognitive Impairment/MCI) amely a mindennapi feladatok ellátását még nem akadályozza, de a rövidtávú memória romlása már megkezdődik, viszont ezeket a tüneteket még gyakran csupán az öregedés jeleinek tartják. A második szakasz egy enyhe korai szakasz, a páciens még független, de szavakat, neveket vagy tárgyak helyét elfelejti, ekkor már észrevehető és diagnosztizálható a betegség a tünetek alapján. A harmadik szakasz a leghosszabb szakasz, a beteg egyre inkább segítségre szorul. A memória problémák erősödnek és kiterjednek a hosszútávú emlékezetre is, a beteg már saját életeseményeire sem mindig képes visszaemlékezni, és az őt körülvevők nevét is elfelejti. Emellett viselkedésbeli változások is megjelennek többek között zavartság vagy akár váratlan agresszivitás, a beteg elkóborolhat, téveszméi lehetnek, és alvási nehézség lép fel a cirkadián óra zavara miatt. Ekkor már kifejezett idegi károsodás is bekövetkezik, és inkontinencia is jelentkezhet. A negyedik, súlyos szakaszban a páciens folyamatos segítségre szorul, az állapota egyre romlik, nem csak szellemi, hanem testi leépülés is megfigyelhető, a mozgás és a kommunikáció erősen korlátozódik, míg végül megszűnik. A beteg

immunrendszere ebben a szakaszban jelentősen legyengül, fogékonyra válik a fertőzésekre, amelyek a vezető halálozási ok a kórban szenvedők körében. (Alzheimer's Association, 2024)

A betegség során az agyban amiloid plakkok halmozódnak fel és neurofibrilláris kötegek keletkeznek (Serý O. és mtsai., 2013). Ez a két neuropatológiai elváltozás sejten belüli neurofibrilláris kötegekként (NFT) és sejten kívüli szenilis plakkokként jelentkezik, ezek fontos markerként is szolgálnak a betegség azonosításában. Az NFT-ket főleg a hiperfoszforilált tau (tubulin asszociált) fehérjék, a szenilis plakkokat pedig kóros másodlagos szerkezettel rendelkező β -amiloid ($A\beta$) peptidek alkotják, amely az amiloid prekursor protein (APP) rendellenes hasításakor keletkezik. (Kovács T., 2009)

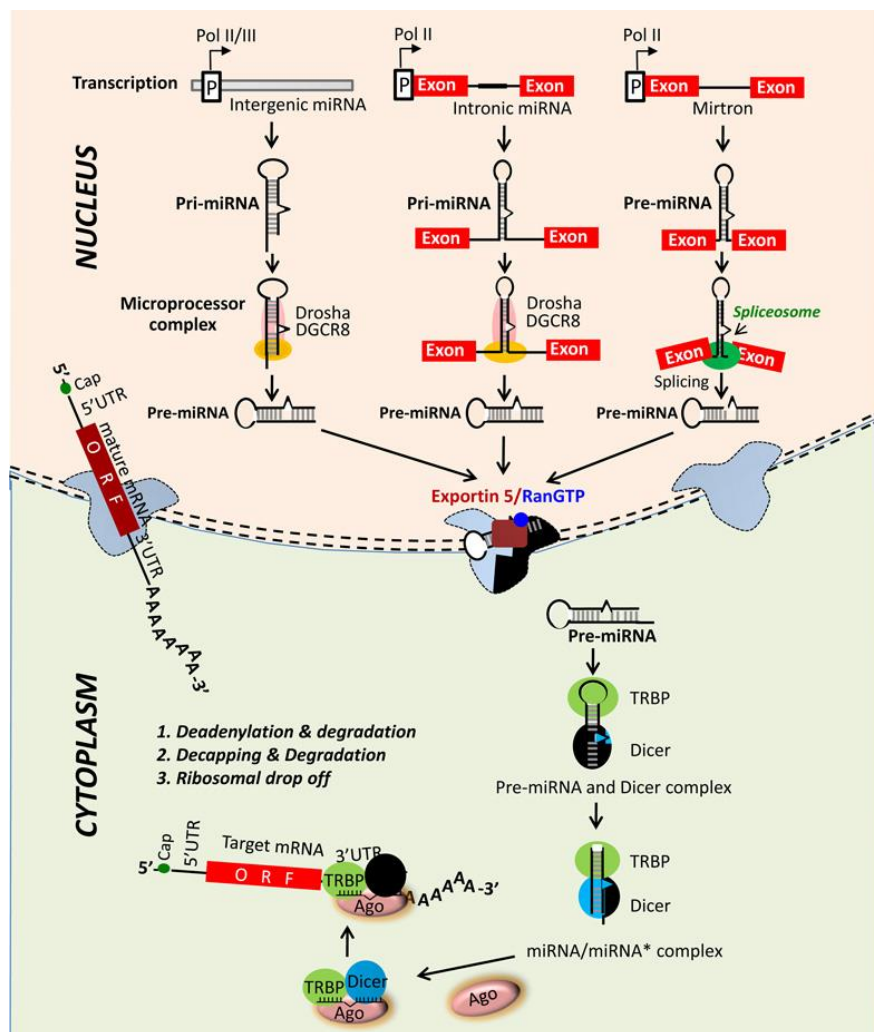
A kutatások során kiderült, hogy a betegség kialakulásához számos genetikai és életmódbeli tényező is hozzájárulhat, és a kór lefolyásáról több hipotézis is született, a betegség megjelenésének kezdőlépését azonban egyik sem azonosította pontosan. Napjainkban az egyik legelfogadottabb és legátfogóbbnak bizonyuló hipotézis az APP - β -amiloid hipotézis. A hipotézis szerint a folyamatot egy külső vagy belső tényező hatására az agyban kialakuló növekvő APP termelés indítja be. Ezzel párhuzamosan az APP enzim lebontása is folyik, mely során $A\beta$ peptidek keletkeznek. Az $A\beta$ ezután toxikus aggregátumokat képezhet, koncentrációja pedig a sejteken kívül nő. Az $A\beta$ Ca^{2+} beáramlást idéz elő az idegsejtekben a sejtmembrán transzporterein keresztül, ennek hatására pedig a tau-fehérjék hiperfoszforilációja fokozódik, a mikrotubuláris rendszer pedig összeomlik. A tartósan emelkedett Ca^{2+} -szint gátolja az idegsejtek megfelelő működését és lassú sejthalálhoz vezet. (Zádori D. és mtsai. 2007)

A mikrotubuláris rendszer összeomlásának is ismertek a lépései. A folyamatban a fő szerepet a tau fehérje játssza, amely a mikrotubulusokhoz kötve stabilizálja azok szerkezetét. A tau fehérje mikrotubulus és aktin kötőhelyet is tartalmaz. A fehérje N-terminális része a mikrotubulusok közötti távolság kialakításáért felelős, míg az aktinhoz való kihorgonyzás a C-terminális részen történik. A folyamat a tau fehérje túlzott foszforilációjával indul. A hiperfoszforiláció hatására a fehérje leválik az idegsejt axonjában és sejttestjében lévő mikrotubulusokról, ezzel szerkezetük destabilizálódik, az aktinhoz való kihorgonyzás megszűnik, a közöttük lévő távolság szintén megváltozik, bekövetkezik a rendszer összeomlása. A levált tau fehérje proteolízis során kisebb szakaszaira bomlik. A kis méretű fragmentumok ezután oldhatatlan kötegeket és duplahélix szerkezetű filamentumokat képeznek. A betegségben szenvedők idegszövetét mikroszkóppal vizsgálva a neurofibrilláris kötegek mennyiségéből következtethetünk a demencia előrehaladottságára. (Grundke-Iqbal I. és mtsai., 1986)

2.2. A mikroRNS-ek biogenezise és funkciója

A mikroRNS-ek (miRNS) olyan poszttranszkripciószabályozó hatással rendelkező, nem kódoló RNS-ek, amelyek a génkifejeződést a transzláció blokkolásával szabályozzák. Ezek a rövid, evolúciósan konzervált molekulák szövetspecifikusak és mennyiségi változásuk gyakran különböző megbetegedésekre utal, tehát biomarkerekként is használhatók. (van Rooij E., 2011) Az éretlen miRNS molekulákat az RNS polimeráz II vagy III enzim írja át, saját intergenikus miRNS génjéről vagy más RNS-ek intronjaként. Érésük után a miRNS egyik szála a RISC komplexbe (RNA Induced Silencing Complex) kerülve alkot egy regulátor funkciót ellátó fehérje-RNS komplexet. A RISC a miRNS által meghatározott mRNS-t ismeri fel, majd a bázispárosodás mértékének megfelelően az mRNS megkötésével vagy hasításával gátolja a transzlációt. (de Planell-Saguer M. és Rodicio M. C., 2011)

A miRNS-ek érése egy többlépcsős folyamat, ahogyan az az 1. ábrán is végigkövethető. A folyamat az intergenikus illetve az intronokban elhelyezkedő miRNS-ek esetében különbözően kezdődik. Az intergenikus miRNS-eket az RNS polimeráz II vagy III enzim írja át, ekkor keletkezik az éretlen, egy szálból álló, „stem-loop” szerkezetet tartalmazó pri-miRNS, amelyről egy endonukleáz is tartalmazó mikroprocesszor nevű komplex hasítja le az 5' végéről a 7-metil-guanin-sapkát, a 3' végéről pedig a poliadenin farkat, így keletkezik a még mindig egy szálból álló hajtűszerkezetű ~60-70 bázispár hosszúságú pre-miRNS. A mirtronokat, azaz az intronokban elhelyezkedő miRNS-eket az RNS polimeráz II enzim írja át a pre-mRNS részeként, ebből két úton keletkezhet pre-miRNS: vagy a splicing során hasad ki az intronból a pre-miRNS, vagy az intronból csak a pri-miRNS forma hasad ki amiből az intergenikus miRNS-ekhez hasonlóan keletkezik a pre-miRNS forma. A pre-miRNS további érése ezután mindkét esetben ugyanazon az úton megy tovább. A pre-miRNS a sejtmagból exportin fehérjék segítségével a citoplazmába jut, ahol a Dicer RNáz hasítja egy 20-25 bázispárból álló RNS duplexé, amely tartalmazza a miRNS érett formáját. A Dicer enzim emberben egy izoformában van jelen és vesz részt a miRNS és siRNS érésben, míg *Drosophilában* a két folyamatban két külön izoforma működik. Az átmeneti duplex forma egyik szála az érett miRNS, a másik szál pedig a komplementer szál, tehát csak a duplex egyik szála kapcsolódik majd a RISC komplexbe. A működésbe lépéshez a duplex két szálát szét kell választani, és a megfelelő szálnak kapcsolódnia kell a RISC komplexbe, így aktiválódhat a komplex és megindulhatnak a szabályozó folyamatok. Minden miRNS a neki megfelelő (vele részlegesen komplementer szekvenciájú) mRNS-t fogja kötni, így szabályozva annak transzlációját. (Macfarlane L. A. és Murphy P.R., 2010) (Yeo J. H. és Chong M. M., 2011)



1. ábra: A miRNS-ek érésének sematikus ábrája (Shukla G. C. és mtsai., 2011)

2.3. A miR-137

A miR-137, akárcsak más mikroRNS-ek is, szintén szövetspecifitást mutat, az agyi idegsejtekben nagyobb mennyiségben van jelen, mint más szövetekben. A génexpresszió szabályozásával jelentős szerepe van az embrionális idegrendszer fejlődésében, a neurális őssejtek (Neural stem cells/NSCs) differenciációjában, az idegsejtek proliferációjában és a szinaptikus fejlődésben, ezek mellett felnőttkorban szintén több neurális folyamatban van regulátor szerepe. A miR-137-et több vizsgálatban is összefüggésbe hozták mentális vagy idegrendszeri megbetegedésekkel. Diszregulációja génexpressziós változásokat okoz poszttranszkripció szinten, így jelentős hatást gyakorol az idegsejtek fehérjeszintézisére, ez idővel akár betegségek kialakulásához is vezethet. (Yin J. és mtsai., 2014) A skizofrénia mellett az Alzheimer kórt is gyakran összefüggésbe hozzák a miR-137 expresszió megváltozásával. Viszont egy erre irányuló kutatás alapján, ha megfelelő a szintje az idegsejtekben, akkor akadályozhatja a tau fehérje túlzott foszforilációját. (Jiang Y. és mtsai., 2018)

2.4. A miR-219

A miR-219-nek a miR-137-hez hasonlóan szintén az agyban magasabb a kifejeződése. A miR-219 egy erősen konzervált mikroRNS, amely több fajban is az emberivel teljesen megegyező szekvenciával van jelen. Két különböző prekuzora ismert, ezekből ugyanolyan miR-219-5p miRNS keletkezik, de a miR-219-3p szakaszok különböznek. A neuronokat érintő folyamatok vizsgálatai az miR-219-5p szál hatásaira koncentrálnak. A miR-219-nek fontos szerepe van a neuronok differenciációjában, az axonális fejlődésben, emellett egyik targete a tau-fehérje mRNS-e, éppen ezért az Alzheimer kór kialakulásában is szerepe lehet. A vizsgálatok szerint Alzheimeres betegekben az agyi idegsejtekben mennyisége csökkent az egészséges mintákhoz képest. A miR-219 a tau-fehérje szintézisét poszttranszkripció szinten befolyásolja, az mRNS translációjának blokkolásával, ezért a túltermelésével Alzheimer kór modellekben csökken a tau fehérje toxicitása. A miR-219 emellett túltermeltetve a betegség modellekben a tau fehérje foszforiláltságát is csökkentette, ezzel is javítva a betegség tüneteit. (Li J. és mtsai. 2019) (Santa-Maria I. mtsai., 2015)

3. Anyagok és módszerek:

3.1. Felhasznált *Drosophila* törzsek, fenntartásuk és keresztezések

A keresztezésekhez felhasznált *Drosophila melanogaster* törzsek közül a következők a Bloomington Drosophila Stock Centerből származnak: a 458-as törzsközpont azonosítója $P\{w^{+mWhs}=GawB\}elav^{C155}$ (ezt követően *elav-GAL4*), a 59882-es törzsközpont azonosítója w^* ; $M\{w^{+mC}=UAS-mir-137.S\}ZH-86Fb$ (ezt követően *UAS-mir-137*), az 59890-es törzsközpont azonosítója w^* ; $M\{w^{+mC}=UAS-mir-219.Sb\}ZH-86Fb$ (ezt követően *UAS-mir-219*), az 64216-os törzsközpont azonosítója w^* ; $PBac\{y^{+mDint2} w^{+mC}=UAS-Abeta.1-42\}VK00033$ (ezt követően *UAS-Abeta*), és a 3605 törzsközpont azonosítója w^{1118} (ezt követően *w*). A keresztezésekhez használtuk még a laboratóriumunkban előállított *elav-GAL4*; *Sb/TM6 Ubx* törzset.

A genetikai interakciós keresztezések első lépése során az *elav-GAL4*; *Sb/TM6 Ubx* genotípusú a neuronokban GAL4 aktivátor fehérjét expresszáló törzsből kiválogatott szűz nőtényeket kereszteztük egyik esetben *UAS-mir-137* genotípusú, a másik esetben *UAS-mir-219* genotípusú törzsből kiválogatott hímekkel. A második keresztezéshez az első keresztezésből származó *Stubble* (*Sb*) fenotípusú, *elav-GAL4*; *UAS-mir/Sb* hímeket kereszteztük be *UAS-Abeta* genotípusú, humán A β_{1-42} peptidet kódoló, azt az UAS elem kontrollja alatt kifejezni képes transzgént hordozó szűz nőtényekkel, illetve egészséges kontrollként *w* szűz nőtényekkel. A második keresztezés négy féle genotípusú utódokat eredményez: *elav-GAL4/w*; *UAS-mir/UAS-Abeta* nőtényeket (*UAS-mir-137*-eset és *UAS-mir-219*-eset a megfelelő keresztezésekben), *elav-GAL4/w*; *Sb/UAS-Abeta* nőtényeket, *w/Y*; *UAS-mir/UAS-Abeta* hímeket (szintén *mir-137* vagy *mir219*-eset) és *w/Y*; *Sb/UAS-Abeta* hímeket. A nőtényekben jelen van az *elav-GAL4* driver, ezért bennük meg vannak hajtvva az *UAS-miR-137*, *UAS-mir-219*-et és/vagy *UAS-Abeta* túltermelő transzgenek, míg a hímek nem-expresszáló kontrollok.

Az ecetmuslicákat standard *Drosophila* táptalajon, 25 °C-on tartottuk fenn és kereszteztük, amely 9% glükózt, 4% kukoricadarát, 3% száraz élesztőt, 2% búzalisztet, 0,7% agart és 0,15% Tegoseptet tartalmaz.

3.2. Kikelési arányok vizsgálata:

A kikelési arányokat a második (utolsó) keresztezésből kikelő utódgeneráción vizsgáltuk, az utódok lehetséges genotípusai az 1. táblázatban találhatók:

<i>w × elav-GAL4; mir-137/Sb</i>		<i>w × elav-GAL4; mir-219/Sb</i>	
genotípus	jelölés	genotípus	jelölés
elav-GAL4/w; w/UAS-mir 137	elav-GAL4 mir137	elav-GAL4/w; w/UAS-mir-219	elav-GAL4 mir219
Y/w; w/UAS-mir-137	w mir137	Y/w; w/UAS-mir-219	w mir219
elav-GAL4/w; w/Sb	elav-GAL4 Sb	elav-GAL4/w; w/Sb	elav-GAL4 Sb
Y/w; w/Sb	w Sb	Y/w; w/Sb	w Sb
<i>UAS-Abeta × elav-GAL4; mir-137/Sb</i>		<i>UAS-Abeta × elav-GAL4; mir-219/Sb</i>	
genotípus	jelölés	genotípus	jelölés
elav-GAL4/w; Abeta/UAS-mir-137	AD mir137	elav-GAL4/w; Abeta/UAS-mir-219	AD mir219
Y/w; Abeta/UAS-mir-137	mir137	Y/w; Abeta/UAS-mir-219	mir219
elav-GAL4/w; Abeta/Sb	AD Sb	elav-GAL4/w; Abeta/Sb	AD Sb
Y/w; Abeta/Sb	Sb	Y/w; Abeta/Sb	Sb

1. táblázat: A négyféle keresztezésből származó utódok 16 féle lehetséges genotípusa és azok továbbiakban használt jelölése. A táblázat a 16 féle lehetséges utód genotípusa a második keresztezésből és azok továbbiakban használt jelöléseit tartalmazza.

A mikroRNS-enként négy lehetséges genotípusú muslica megkülönböztetése nemük és a Sb markerként használt fenotípus alapján történt. A kikelési arányokból a mikroRNS-ek túltermelésének toxikus hatásaira lehet következtetni. A vizsgálat a kikelés kezdetétől öt napig tartott, minden nap egyszer leszámolva a négy különböző genotípusú egyedeket, és azt fiolánként feljegyezve. A nőstényeket ezután új fiolákba legyűjtöttük a további vizsgálatokhoz.

3.3. Mászási tesztek:

A mászási teszteket egy- és kéthetes nőstény muslicákon (összesen 8 genotípuson) végeztük. Hetente genotípusonként 40 ± 2 db állat mászási képességét vizsgáltuk, ami a neuromuszkuláris rendszer idegsejtjeinek funkcionális állapotára engedett következtetni. A tesztekhez a muslicákat 88mm magasságú, azonos átmérőjű, üres fiolákba helyeztük, a fiolák tetejét szivacs

dugóval lezártuk, majd a fiolákat egy tartó keretbe raktuk, mert így egyszerre több genotípus párhuzamos megfigyelésére volt lehetőség. A vizsgálatot videófelvételen rögzítettük. A felvétel kezdetén a keret segítségével egy határozott mozdulattal a muslicákat a fiola aljára ráztuk, ezután 15 másodpercig hagyjuk, hogy a fiola falán felmásszanak, majd újabb lerázás következik. A felvételekből azt a 15 másodperces sávot használtuk fel az elemzéshez, ahol a lerázáskor az összes állat a fiola aljára került. A megfelelő 15 s-os sáv kiválasztása után a felvétel lerázás utáni 5. másodpercről képernyőképet készítettünk, a pillanatképen a muslicák által vertikálisan megtett utat Paint 3D számítógépes alkalmazás segítségével elemeztük.

3.4. Pseudopupil analízis:

A pseudopupil analízishez szintén egy- és kéthetes nőstényeket (összesen 8 genotípust) használtam fel. Ez egy invazív eljárás, mely során az állatok idegsejtjeinek morfológiáját vizsgáljuk. Az analízishez a széndioxiddal elaltatott állatok fejét óvatosan eltávolítjuk, majd a tárgylemezre átlátszó körömlakk segítségével rögzítjük, úgy, hogy a szem jól látható legyen. A vizsgálat során az állatok összetett szemek ommatídiumaiban elhelyezkedő idegsejtek rhabdomereit (a fotoreceptor neuronok fénygyűjtő struktúrái, egészséges állatokban a számuk ommatídiumonként mindig 7) számoljuk mikroszkóp segítségével. Genotípusonként 10 állatot vizsgáltunk, állatonként 20 db ommatídiumban számoltuk a rhabdomereket Nikon Eclipse 80i mikroszkóppal, 50x nagyítású immerziós objektívvel.

3.5. RNS izolálás *Drosophila* fejekből

Az RNS izolálást TRIzol reagenssel (Thermo Fisher Scientific, TFS) végeztük, az általuk ajánlott protokoll alapján. Az izoláláshoz 18-22 db háromhetes nőstényt (4 genotípus, csak az A β -s keresztezésekből, genotípusokként 3 párhuzamos minta, összesen 12 minta) kialtatás után Eppendorf-csőbe helyezve folyékony nitrogénben fagyasztottunk, majd vortexeléssel leválasztottuk a fejeket. Az elkülönített fejeket pisztallus és rotor segítségével 100 μ l TRIzol reagensben homogenizáltuk. A lizátumot 5 percig centrifugáltuk 12000 $\times$ g-n 4 °C-on, majd a felülúszót új Eppendorf-csőbe raktuk, és azzal dolgoztunk tovább. A centrifugálást 5 perc inkubáció követte, majd 20 μ l kloroform-ot adtunk a mintákhoz (100 μ l TRIzolonként), a keverés után újabb 2-3 perc inkubáció következett. Ezután 15 percig centrifugáltuk a mintákat 12000 $\times$ g-n 4 °C-on, a felső vizes részt a benne oldott RNS-el leszívtuk, új csőbe raktuk, a

szerves fázist kidobtuk. Ezt követően 0,5 µl 20 mg/l-es RNáz-mentes glikogént (TFS) és 50 µl izopropanolt adtunk a mintához, amit 10 perc inkubálás követett 4 °C-on. Ezután 12000×g-n 4 °C-on 10 percig centrifugáltuk a mintákat, majd a felülúszó eltávolítása után a pelletet 100 µl 75%-os etanolban (100 µl TRIzolhoz) átmostuk. A vortexelés után 5 percig 7500×g-n 4 °C-on centrifugáltuk a mintákat, majd a felülúszó eltávolítása után az RNS pelletet 5-10 percig levegőn szárítottuk. Ezt az átmosási folyamatot a minták megfelelő tisztasága érdekében még egyszer megismételtük. A száradást követően a pelletet 25 µl RNáz mentes vízben reszuszpendáltuk, 10 percig 60 °C-on inkubáltuk és végül -70 °C-on tároltuk felhasználásig.

3.6. RNS spektrofotometriás kvantitálása és hígítása

A tisztított 12 db RNS minták koncentrációjának és tisztaságának meghatározásához NanoDrop 1000 spektrofotométert használtunk. A tisztaság megállapítása azért is szükséges, mert a fotométer az oldat teljes fényelnyelését méri, és abból számol koncentrációt, ami, ha a minta fehérjével szennyezett nem fog megfelelni a valódi RNS tartalomnak. A nukleinsavaknak 260 nm-en van fényelnyelési maximumuk, míg a fehérjéknek 280 nm-en. Az RNS oldat akkor tekinthető tisztának, ha az OD₂₆₀/OD₂₈₀ érték 1,9 és 2,1 között mozog. A méréshez 1,5 µl RNS oldatot használtunk, vak mintának pedig RNáz mentes vizet.

A 12 db RNS minta mind különböző koncentrációjú RNS-t tartalmazott, ezért úgy kellett őket kihígítani, hogy a további eljárásokhoz szükséges 8 µl oldatban minden minta esetében ugyanannyi RNS legyen. A hígításhoz a mért koncentráció alapján kiszámoltam, hogy hány mikroliternyi mintában van 1 µg RNS, majd ennek megfelelően a maradék térfogatot RNáz mentes vízzel egészítettem ki 8 µl-re, így a későbbiekben egységes koncentrációjú mintákkal lehet tovább dolgozni.

3.7. DNáz I kezelés

A DNáz kezelésre azért van szükség, hogy a mintáink tisztán RNS tartalmú oldatok legyenek, az esetleges oldatban maradt DNS szennyeződés lebomoljon, és ne befolyásolja a további méréseinket. A kezeléshez mind a 12 mintából felhasználtuk a hígítás során készített 8 µl 125 ng/µl koncentrációjú RNS oldatot, amihez 1 µl 10x DNáz I. reakciópuffert és 1 µl 2 U (RNáz mentes) Dnáz I.-et (TFS) adtunk. Ezután 37 °C-on 30 percig inkubáltuk a reakciót, majd végül 1 µl 50 mM-os EDTA-t adtunk hozzá és 65 °C-on 10 percig inkubáltuk az enzimet. Így a DNáz kezelt minta 11 µl-je tartalmaz 1 µg RNS-t.

3.8. Reverz transzkripció:

A reverz transzkripcióhoz minden mintára (12 db minta) 20 µl-es reakciókat mértünk össze, a reakcióelegyhez 2 µl 10x RT puffert, 1,4 µl 25 mM-os MgCl₂ oldatot, 4 µl 10 mM-os dNTP mixet, 1 µl 100 mM-os DTT oldatot, 1 µl RNáz inhibitor, 1 µl 50 U/µl-os MultiScribe Reverse Transcriptase enzimet (TFS), 1 µl 50 mM-os random hexamer keveréket és 3,1 µl RNáz mentes vizet, végül pedig 5,5 µl 0,5 µg RNS tartalmú oldatot használtunk fel. A reverz transzkripciót Biometra TONE PCR gépben végeztük el, a PCR gépet 25 °C 10 perc, 37 °C 30 perc, 95 °C 5 perc inkubációkra, majd 4 °C tárolásra programoztuk. Az első szakasz a primer annealinget segíti elő az RNS-hez, a második a cDNS szintézisét az RNS-ről, a harmadik pedig az RT enzim hő inaktivációja.

3.9. cDNS templát hígítási sor előállítása kalibrációs görbéhez

1x cDNS pool-t készítettünk a 12 RNS minta keverékéből, mintánként 3 µl mértünk be a keverékbe, amelynek így végső térfogata 36 µl lett. Ezután az 1x pool egészét 5x-re hígítottuk, 4,5 µl 40x Yellow Sample Buffer (TFS R1381-es katalógus számú) és 139,5 µl MQ vízzel. Ezután az 5x híg poolból 3x hígítási léptékű, négy lépcsős hígítási sort készítettünk. Az 5x híg poolból kivettünk 30 µl-t és ahhoz 60 µl 1x Yellow puffert adtunk (40x Yellow puffer 40x-re hígítva), így 15x híg poolt kapunk. Majd a 15x híg poolból kivettünk 30 µl-t és ahhoz 60 µl 1x Yellow puffert mértünk, így 45x híg poolt kapunk. Végül a 45x híg poolból kivettünk 30 µl-t és ahhoz 60 µl 1x Yellow puffert adtunk, így 135x híg poolt kapunk.

3.10. RT-qPCR:

A cDNS mintákat (12db minta) 10x-re hígítottuk (18 µl víz + 2 µl cDNS-oldat), a kalibrációs egyeneshez pedig az előzőleg előállított cDNS templát hígítási sort használtuk, a 3.9. pontban leírt koncentrációkban. Emellett templát nélküli mintákat is vizsgáltunk kontrollként. Mintánként 10 µl-es reakció mixekhez 5 µl Luminaris Color HiGreen qPCR master mix (2x) - et (TFS), 0,4 µl 5 µM-os forward primer-t (az α-tubulin kimutatásnál tub qF, az Aβ kimutatásnál Abeta pUAST qF), 0,4 µl 5 µM-os reverz primer-t (az α-tubulin kimutatásnál tub qR, az Aβ kimutatásnál Abeta pUAST qR), 2 µl 10x híg cDNS-t és 2,2 µl MQ vizet mértünk be. A méréshez PikoReal Real-Time PCR System (TFS) berendezést használtunk, amelyen a következő két lépéses PCR protokollt állítottuk be: 50 °C 2 percig, majd a kezdeti denaturációs

szakasz: 95 °C 10 percig, ezt 40 db ciklus követte, melyben denaturációs lépésként 95 °C 15 másodperc, majd annealing és elongációs lépés egyben 60 °C 1 perc, az utolsó ciklus után pedig egy végső elongációs lépés következett: 60 °C 30 másodperc. Ezután következett a melting curve (olvadásgörbe) analízis: 60 °C kezdőhőmérséklettel, 95 °C véghőmérsékletig, majd tárolás 4 °C-on. Az PCR tesztekhez kontrollként Abeta₁₋₄₂-t nem kifejező mintákat és templat nélküli kontrollt használtunk.

3.11. Bioinformatikai vizsgálatok

A bioinformatikai vizsgálatokat két okból végeztük, egyrészt részletesebben meg akartuk ismerni a mikroRNS-ek által befolyásolt folyamatokat és azok összefüggéseit az általunk tapasztalt változásokkal a túltermelésük hatására, másrészt pedig az RT-qPCR-nál megjelenő különbségre kerestünk választ a komplementaritás vizsgálatával. A tesztekhez első lépésként a mikroRNS-ek által befolyásolt géneket kellett összesíteni. A mikroRNS-ek targeteit a TargetScanFly 7.2-es verziójával (https://www.targetscan.org/fly_72/) összesítettük. Ezután a FlyEnrichr (<https://maayanlab.cloud/FlyEnrichr/>) segítségével dúsulás analízist végeztünk (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA), így láthatóvá vált, hogy gyakoriság szerint milyen folyamatokat befolyásolásában vesznek részt a vizsgált mikroRNS-ek. Emellett szekvencia komplementaritást vizsgáltunk a miR-137 és az UAS-A β transzgén között, ehhez a miRBase-en (<https://www.mirbase.org/>) megtalálható dme-miR-137-es és az A β ₁₋₄₂-t kifejező konstruktról szóló Jonson M. és mtsai. (2015) által publikált cikkben található szekvenciákat vetettük össze az NCBI online BLAST alkalmazása (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) segítségével. Ha a két szekvencia között van olyan rész, amely antiparalel állású, és megfelel valamelyik kanonikus kötőhelynek, akkor nagy valószínűséggel a valódi miRNS mediálta génexpressziós befolyásolásról beszélhetünk. (Bartel D. P., 2018)

4. Célitűzések:

Kutatócsoportunk előzetes vizsgálatok során a Huntington kór *Drosophila* modelljében a miRNS-ek túltermelésének hatásait tanulmányozta. Megfigyeléseik alapján a miR-219-e és miR-137-es mikroRNS-ek túltermelése szignifikáns változásokat idézett elő a betegség során tapasztalható neurodegeneráció hatására kialakuló tünetekben (Zsindely N. és mtsai., 2023). Ezért kerültek ezek a mikroRNS-ek a kutatásunk fókuszába. Ebben a projektben az volt a célunk, hogy ezúttal az Alzheimer kór *Drosophila* modellben vizsgáljuk a miR-137 és a miR-219 túltermelésének következményeit, így bővítve ismereteinket e mikroRNS-eknek az Alzheimer kór patogenezisére gyakorolt esetleges hatásáról. A kutatás célja, hogy a miR-137 és miR-219 túltermelésének hatását vizsgáljuk az egészséges és az Alzheimer kór modell állatok fenotípusaira nézve.

Tételes célkitűzések:

miR-137 vizsgálata

- Megvizsgáljuk a miR-137 túltermelésének hatásait vad típusú állatokban.
- Megvizsgáljuk a miR-137 túltermelésének hatásait az $A\beta_{1-42}$ -t peptidet az idegrendszerben kifejező AD modell muslincákban. Vizsgáljuk az állatok életképességét (kikelési arányait), mászási képességét és az idegsejtek állapotát mérjük fel.
- Meghatározzuk, hogy az *UAS-mir-137* transzgén jelenléte befolyásolja-e az *UAS-A β* transzgén transzkripció aktivitását.
- Dúsulás analízissel azonosítjuk a miR-137 által feltételezhetően szabályozott biológiai folyamatokat.

miR-219 vizsgálata

- Megvizsgáljuk a miR-219 túltermelésének hatásait vad típusú muslincákban.
- Meghatározzuk a miR-219 túltermelésének hatásait az AD modell muslincákban. Vizsgáljuk az állatok életképességét (kikelési arányait), mászási képességét és az idegsejtek állapotát mérjük fel.
- Meghatározzuk, hogy az *UAS-mir-219* transzgén jelenléte befolyásolja-e az *UAS-A β* transzgén transzkripció aktivitását.
- Dúsulás analízissel azonosítjuk a miR-219 által feltételezhetően szabályozott biológiai folyamatokat.

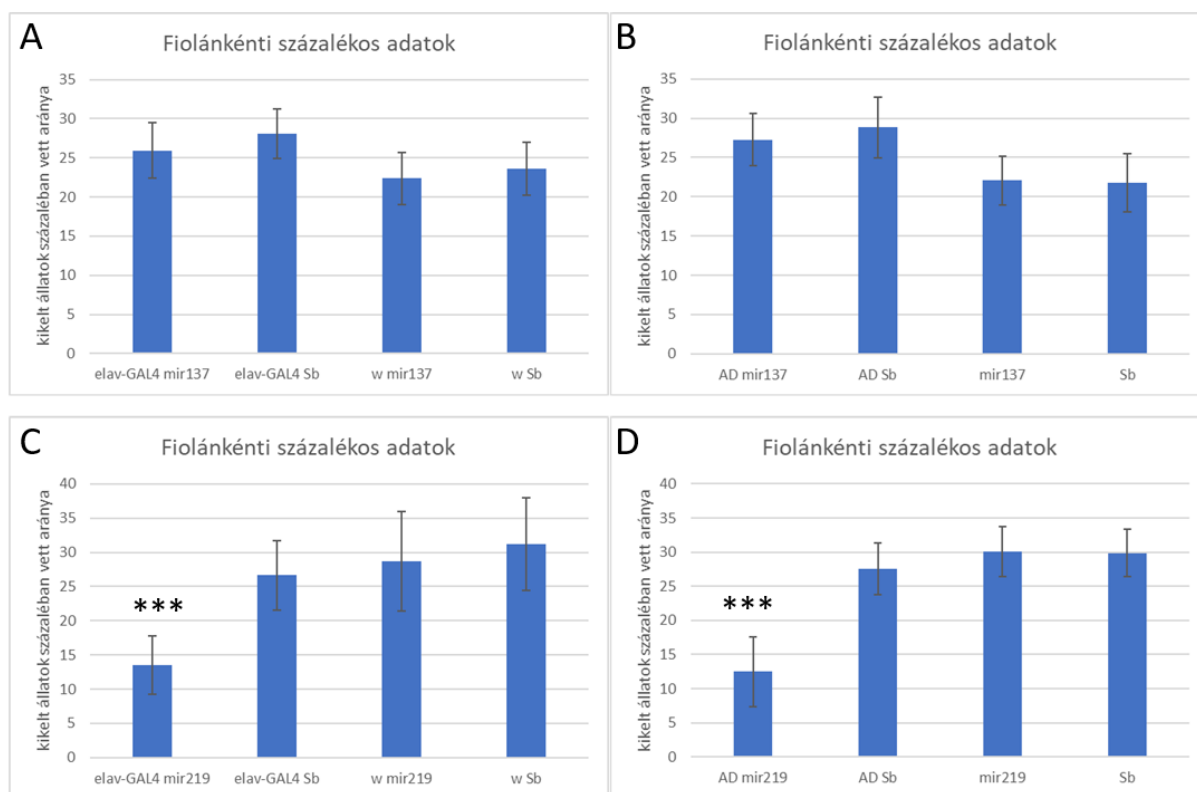
5. Eredmények és értelmezésük:

5.1. A miR-137 és a miR-219 túltermelésének hatása az életképességre

A miR-137, illetve miR-219 miRNS-ekkel AD modellben végzett és kontroll ($A\beta$ -t nem expresszáló) genetikai interakciós keresztezésekől származó genotípus kategóriák kikelési arányaival a túltermeltetett mikroRNS-ek toxicitását vizsgáltuk. Ha valamelyik genotípus kikelési arányai szignifikánsan alacsonyabb a kontrolljától, akkor a mikroRNS feltehetőleg toxikus. A toxicitás vizsgálatokat amiloid-béta₁₋₄₂-t termelő és egészséges egyedekben is vizsgáltuk. Tekintve, hogy nem minden fiolából azonos mennyiségű utód kelt ki, a négy genotípus egymáshoz való arányaival végeztük a számításokat fiolánként külön, majd ezeket az adatokat összesítettük a 2. táblázatban látható módon és ezután vontuk le a következtetéseket. A kikelési arányokat emellett jól szemlélteti a 2. ábra.

<i>w × elav-GAL4; mir-137/Sb</i>				<i>UAS-Abeta × elav-GAL4; mir-137/Sb</i>				
elav-GAL4 mir 137	elav- GAL4 Sb	w mir 137	w Sb	AD mir 137	AD Sb	mir 137	Sb	
25,942	28,073	22,387	23,598	27,287	28,824	22,076	21,813	átlag
3,518	3,198	3,31v2	3,388	3,325	3,893	3,120	3,724	szórás
0,173		T-teszt		0,816		T-teszt		
<i>w × elav-GAL4; mir-219/Sb</i>				<i>UAS-Abeta × elav-GAL4; mir-219/Sb</i>				
elav-GAL4 mir 219	elav- GAL4 Sb	w mir 219	w Sb	AD mir 219	AD Sb	mir 219	Sb	
13,496	26,629	28,679	31,196	12,501	27,539	30,099	29,861	átlag
4,289	5,100	7,267	6,796	5,133	3,791	3,684	3,461	szórás
0,000022		T-teszt		0,000003		T-teszt		

2. táblázat. Kikelési arányok a négy féle keresztezésből. A táblázatban a kikelések fiolánkénti százalékos megoszlásainak átlaga látható a négy keresztezésből, genotípusonként, az átlaghoz tartozó szórás feltüntetésével, a t-teszt az $A\beta_{1-42}$ -t termelő miRNS-eket túltermelő és Sb állatok megoszlási különbségének szignifikanciájára próba: a t-tesztet mind a négy esetben a nőstények fiolánként kikelt százalékos arányaiból számoltuk, a 0,05 alatti értéknél a különbségek szignifikánsnak tekinthetők.



2. ábra. A fiolánként kikelő egyedek százalékos arányának átlagai genotípusokként, a szórás feltüntetésével. A *mir-137* túltermelés hatása egészséges kontroll állatokban (A) és az AD modellben (B) és a *mir-219* túltermelés hatása egészséges kontroll állatokban (C) és az AD modellben (D). Az ábrákról jól látszik a *miR-219* toxikus hatása a túltermelő állatokban az *Abeta* transzgén jelenlétében és hiányában is. ***: $P < 0,001$.

Az eredmények értékeléséhez először minden fiola esetében összesítettük az egy genotípusba tartozó öt nap alatt kikelt állat mennyiségét. Ezután a fiolánkénti négy értéket százalékos eloszlásra alakítottuk át, majd ezeket az adatokat genotípusonként átlagoltuk, szórást számoltunk belőle. A százalékos értékek közötti eltérés szignifikanciáját t-teszttel, a genotípusokkénti összes kikelt állatok számában lévő különbségeket pedig X^2 -próbával vizsgáltuk, a *miR-219*-es keresztezésekre vonatkozó szignifikancia tesztek eredményei a 3. táblázatban találhatóak.

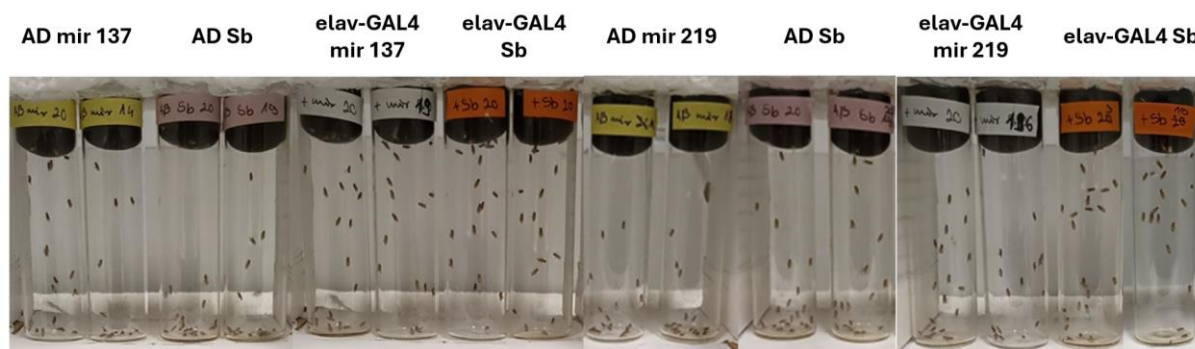
<i>w × elav-GAL4; mir-219/Sb</i>			<i>UAS-Abeta × elav-GAL4; mir-219/Sb</i>		
Megfigyelt	elav-GAL4	Y	Megfigyelt	elav-GAL4	Y
mir219	143	304	mir219	110	270
Sb	277	325	Sb	248	268
össz. kikelt		1049	össz. kikelt		896
Várt	elav-GAL4	Y	Várt	elav-GAL4	Y
mir219	178,97045	268,0296	mir219	151,83036	228,1696
Sb	241,02955	360,9704	Sb	206,16964	309,8304
P(chi²)	4,57E-06		P(chi²)	7,786E-09	

3. táblázat. A miR-219 túltermelő állatok kikelésbeli különbségének szignifikancia vizsgálata. A táblázatban szereplő szignifikancia értékeket χ^2 -próbával, az összes kikelt állat feltüntetésével genotípusokként: a khi-próba mindkét esetben 0.05 alatti értéket mutat, ami azt jelenti, hogy a miR-219-es transzgén nem önmagában okoz változást, csak akkor, ha az elav-GAL4 rendszer által meg van hajtva.

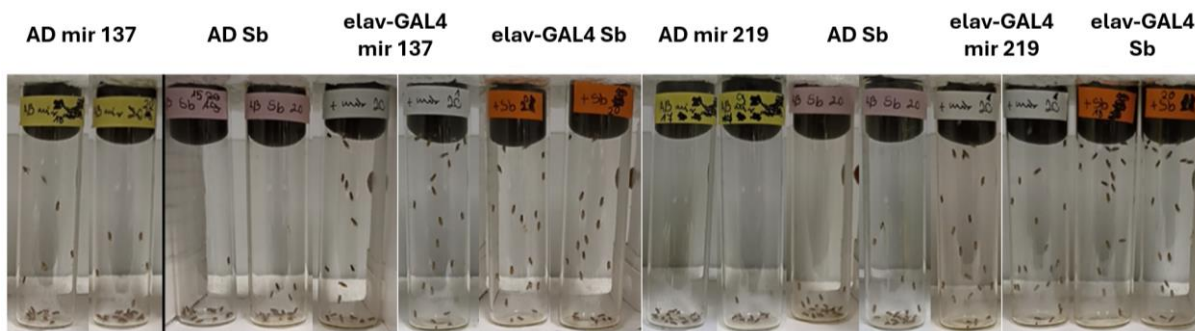
A miR137-et túltermelő állatok esetében sem az A β ₁₋₄₂-t termelő, sem az egészséges egyedeknél nem volt szignifikáns eltérés a kikelési arányokba, ami arra enged következtetni, hogy a miR-137 túltermelése nincs jelentős hatással a muslicák életképességére. Ezzel szemben a miR-219-et túltermelő egyedek esetében mind az A β ₁₋₄₂, mind pedig az egészséges állatok életképessége jelentős romlást mutatott. Tekintve, hogy a miR-219-et nem túltermelő kontrollok közül egyik sem mutatott változást a kikelésben, valóban a miRNS túltermelés okozhatta azt, nem pedig a GAL4-fehérje kifejeződése önmagában, sem pedig az A β ₁₋₄₂ termelése és nem is a miR-219 transzgén önmagában. A fiolánkénti kikelési átlagok normális eloszlást mutatnak a Shapiro-Wilk-próba alapján és szórásaik nem térnek el szignifikánsan az F-próba alapján, tehát a romlás szignifikanciájának ellenőrzésére t-tesztet használhattunk az azonos keresztezésből kikelt nőstények életképességének összehasonlítására. A kétszélű, kétmintás, egyenlő varianciájú, párosítatlan t-próba alapján (2. táblázat) a miR-137 túltermelésénél tapasztalt kisebb eltérések valóban nem tekinthetők számottevőnek, viszont a miR-219 túltermelése tényleges toxikus hatással van a muslicákra nézve.

5.2. A miR-137 és a miR-219 túltermelésének hatása a motoros aktivitásra

A miR-137, illetve miR-219 túltermelésének a motoros aktivitásra gyakorolt hatását mászás tesztekkel vizsgáltuk. Ennek során vizsgáltuk a kétféle miRNS túltermelésének következményeit egyhetes és kéthetes korú AD-s és egészséges kontroll nőstények esetében. A 3. és 4. ábrán látható mászási tesztek elemzéséhez megmértük a fiola magasságát és a fiolában lévő legyek távolságát a fiola aljától, képpontokban mérve. Majd ezeket az eredményeket a fiola magasságával (88 mm) aránypárba állítva és átlagolva megkaptuk a muslicák által 5 másodperc alatt megtett átlagos vertikális mászási távolságot mm egységben. Az átlagokat ezután a genotípusok között összevetettük, és mindezekből következtettünk a különböző genotípusú állatok idegi épségére.



3. ábra. Képek az első hetes mászástesztről: balról jobbra az első nyolc fiolában miR-137-es, a második nyolc fiolában miR-219-es keresztezésekben származó nőstény utódok vannak. A fiolákban változatos számú muslica van, a kép arányaiban szemlélteti a megfigyelt különbségek mértékét.



4. ábra. Képek az második hetes mászásról: balról jobbra az első nyolc fiolában miR-137-es, a második nyolc fiolában miR-219-es keresztezésekben származó nőstény utódok vannak. A fiolákban változatos számú muslica van, a kép arányaiban szemlélteti a megfigyelt különbségek mértékét.

A 4. táblázatban látható összehasonlításához genotípusokként átlagoltuk a muslicák mm-ben vett mászási távolságát, majd vizsgáltuk a két hét alatt bekövetkező romlást genotípuson belül, és összevetettük a túltermelő állatok értékeit a kontrollokéval. A mászás értékei a Shapiro-Wilk-próba alapján nem normál eloszlásúak, ezért ahol különbséget tapasztaltunk, ott Mann Whitney U teszt segítségével határoztuk meg, hogy az eltérés valóban szignifikáns-e.

A	AD mir 137 1. hét	AD mir 137 2. hét	AD Sb 1. hét	AD Sb 2. hét	elav-GAL4 mir 137 1. hét	elav-GAL4 mir 137 2. hét	elav- GAL4 Sb 1. hét	elav- GAL4 Sb 2. hét
átlag (mm)	27,719	11,485	9,383	0,754	34,029	36,221	47,560	25,750
szórás	21,586	15,692	12,744	1,747	25,402	23,756	22,211	22,111
B	AD mir 219 1. hét	AD mir 219 2. hét	AD Sb 1. hét	AD Sb 2. hét	elav-GAL4 mir 219 1. hét	elav-GAL4 mir 219 2. hét	elav- GAL4 Sb 1. hét	elav- GAL4 Sb 2. hét
átlag (mm)	6,436	1,174	13,645	4,304	28,850	24,029	34,999	24,864
szórás	11,789	3,713	15,146	8,626	20,785	20,081	18,720	20,564

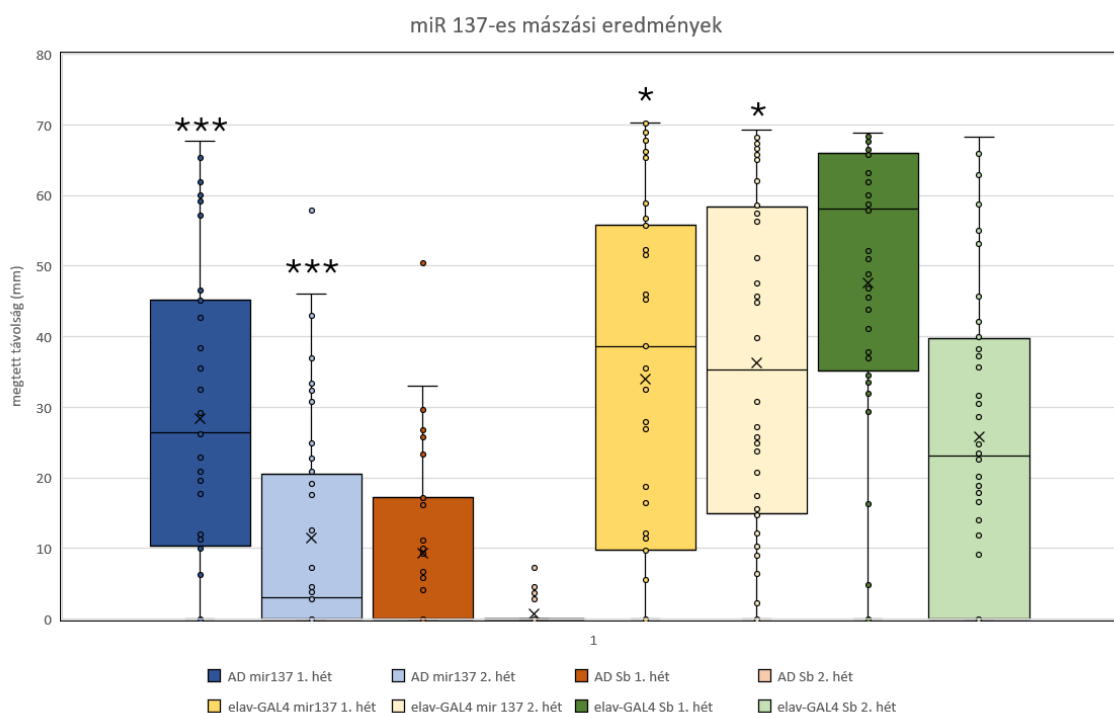
4. táblázat. A mászás tesztek eredményei. A táblázatban a miR-137-es (A) és a miR-219-es (B) keresztezésekből származó állatokkal végzett mászás tesztek eredményeinek átlaga található (5 másodperc alatt megtett út mm-ben kifejezve) genotípusokként, az első és a második héten, szórással.

AD mir 137 1. hét ↔ AD Sb 1. hét	AD mir 137 2. hét ↔ AD Sb 2. hét	elav-GAL4 mir 137 1. hét ↔ elav-GAL4 Sb 1. hét	elav-GAL4 mir 137 2. hét ↔ elav-GAL4 Sb 2. hét
0,00002853	0,000161	0,02125	0,04375
AD mir 219 1. hét ↔ AD Sb 1. hét	AD mir 219 2. hét ↔ AD Sb 2. hét	elav-GAL4 mir 219 1. hét ↔ elav-GAL4 Sb 1. hét	elav-GAL4 mir 219 2. hét ↔ elav-GAL4 Sb 2. hét
0,01843	0,0204	0,1761	0,8769

5. táblázat. A mászás tesztekben eredményein végzett statisztikai tesztek eredményei. A táblázatban látható P értékek a Mann Whitney U tesztek eredményei, melyek a mikroRNS-t túltermelő és a megfelelő kontroll genotípusokra vonatkoznak, egy- és kéthetes állatokon. Ahol a teszt eredménye 0,05-nél alacsonyabb, ott szignifikánsnak számít a különbség.

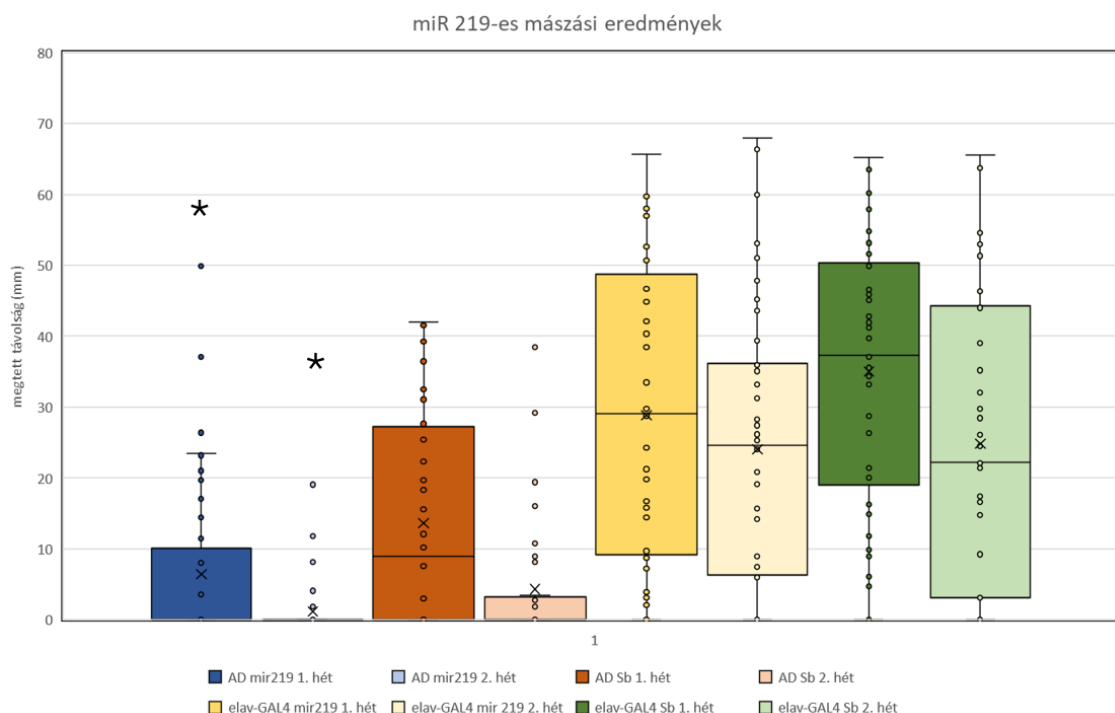
A mászási tesztek átlagai és az 5. táblázatban feltüntetett U-tesztek eredményei alapján megállapítható, hogy a miR-137 túltermelése az A β ₁₋₄₂-t kifejező egy- és kéthetes állatok esetében is jelentősen javítja a mászási képességet (5. ábra). Az egészséges állatokban, a mérések alapján az első hét során a miR-137-et túltermelő állatok rosszabbul teljesítenek, viszont nem romlanak le, míg a miR-137-et nem túltermelők az első héten aktívabbak, ez

viszont a második hétre jelentősen romlik. A miR-219 túltermelése csak az AD-s állatoknál okozott szignifikáns változást az aktivitásukban (6. ábra). A miR-219-et túltermelő AD-s állatok mindkét héten jelentősen rosszabbul teljesítettek a mászási tesztek során, mint a mikroRNS-t nem túltermelő kontrolljaik.



5. ábra. A mir-137 keresztezésekből származó utódok mászás tesztjeinek eredményei.

A boxplotok a 25 és 75 percentilis értékét, valamint a mediánt adják meg, a hibasávok a maximum és minimum értékeket jelölik a kiugró értékek figyelmen kívül hagyásával. Az × az átlagértéket, a körök az egyedi mérési értékeket mutatják. A *-ok a szignifikanciát jelölik a következőképpen: *: $P < 0,05$ és ***: $P < 0,001$



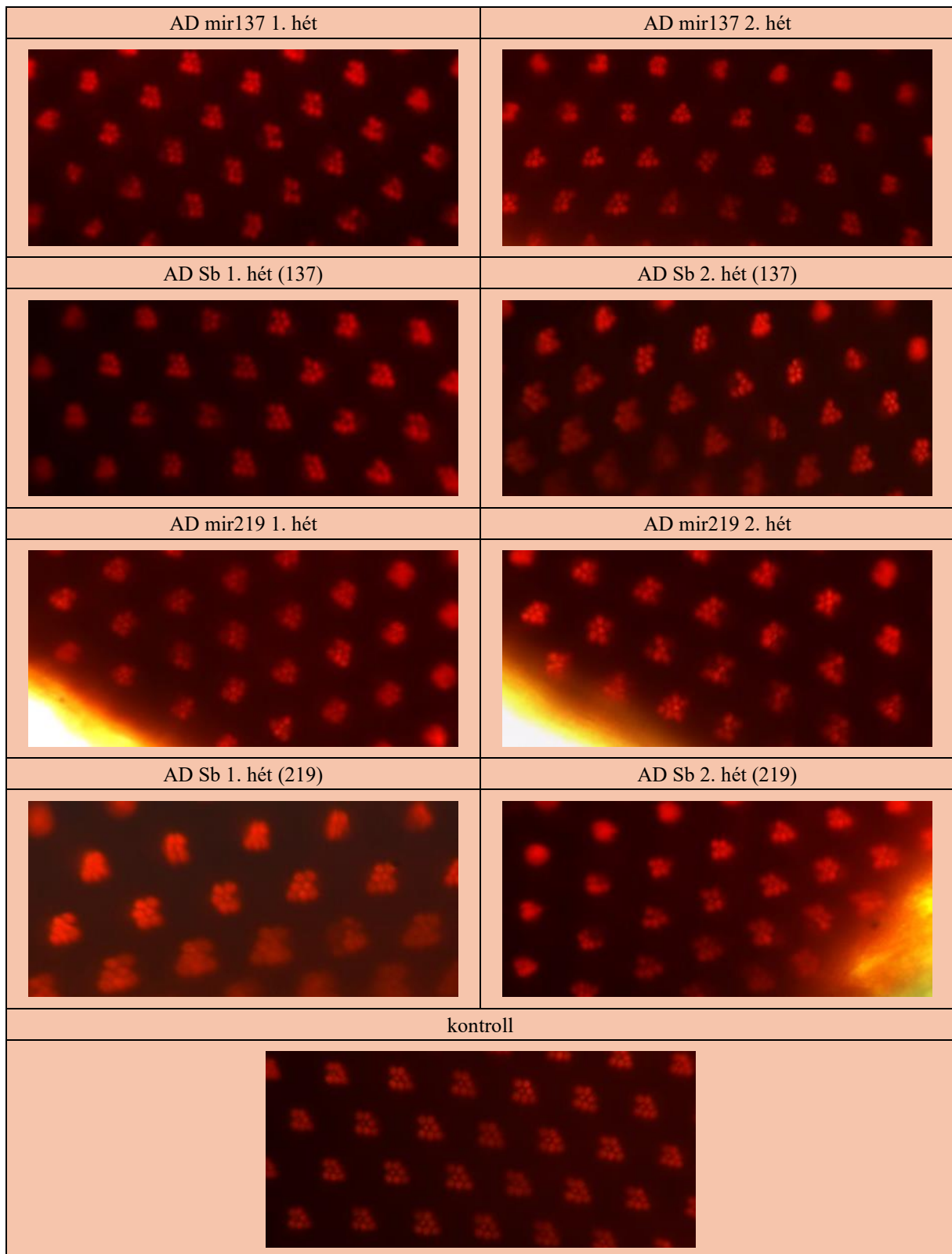
6. ábra: A miR-219 keresztezésekből származó utódok mászás tesztjeinek eredményei.

A boxplotok a 25 és 75 percentilis értékét, valamint a mediánt adják meg, a hibasávok a maximum és minimum értékeket jelölik a kiugróértékek figyelmen kívül hagyásával. Az × az átlagértéket, a körök az egyedi mérési értékeket mutatják. A * a szignifikanciát jelöli a következőképpen: *: $P < 0,05$

Összességében az eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy a miR-137 és a miR-219 is az Alzheimer kór modellben gyakorolt jelentős hatást a motoros aktivitásra. Az idegsejtek funkcionális állapota javult a miR-137 túltermelésének hatására, míg a miR-219 túltermelésére romlást mutatott.

5.3. A miR-137 és a miR-219 túltermelésének hatása a fotoreceptor neuronok degenerációjára AD modellben

A miR-137, illetve miR-219 túltermelésének a neurodegenerációra gyakorolt hatását az AD modellben ú.n. pseudopupil eljárással vizsgáltuk, mellyel az összetett szemben található fotoreceptor neuronok épsége állapítható meg és számszerűsíthető. A pseudopupil vizsgálatok során a genotípusokként és életkoronként 20 állat, állatokként 10 ommatídiumban feljegyzett rhabdomerek (a fotoreceptor neuronok fénygyűjtő struktúrái) számát átlagoltuk állatokra, majd genotípusra nézve. Ezen értékek alapján határoztuk meg a mikroRNS-ek túltermelésének hatásait az idegsejtek épségére nézve egyhetes és kéthetes életkorú AD-s és egészséges kontroll állatokban egyaránt. A pseudopupil analízis során látottakat a 7. ábra szemlélteti.

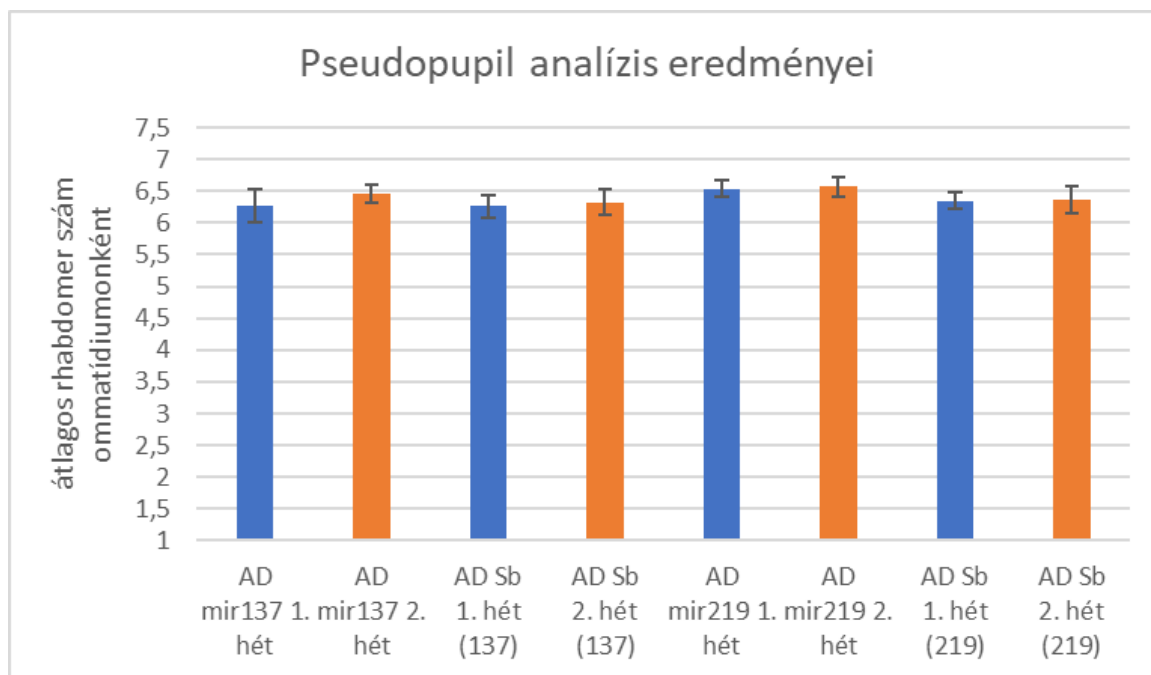


7. ábra. A pseudopupil vizsgálat során készített fénymikroszkópos felvételek a vizsgált *Drosophilák* összetett szeméről. A képeken a miR-137, illetve miR-219 mikroRNS-eket túltermelő és nem túltermelő $A\beta_{1-42}$ -t kifejező állatok rhabdomerei láthatók, összehasonlításban az egészséges kontroll állatokéval.

A pseudopupil analízis 6. táblázatban látható eredményei egyedenként az ommatidiumokban található rhabdomerek átlagos számát mutatják (ez az érték egészséges egyedekben mindig 7), melyet genotípusonként átlagoltuk, és rajtuk statisztikai vizsgálatokat végeztünk. Az A β ₁₋₄₂ peptidet termelő állatok átlagait a 8. ábrán látható diagramon jelenítettük meg. Az egészséges állatoknál nem tapasztaltunk változást az idegsejtek morfológiájában egyik mikroRNS túltermelésének hatására sem, a rhabdomerszám változatlanul minden esetben 7 volt, akár csak a nem túltermelő kontrollokban. Az AD-s egyedek átlagaival az eloszlásuk normalitásának megállapítására Shapiro-Wilk-próbát végeztünk. A próba alapján csak egy túltermelő-kontroll pár esetén kellett Mann Whitney U tesztet végezni, a többi esetben a normális eloszlás és az F-teszttel mért azonos szórások lehetővé tették a kétmintás, kétszélű, egyenlő varianciájú párosítatlan t-próba használatát a szignifikancia kimutatásához.

egyedek	AD mir 137 1. hét	AD Sb 1. hét	AD mir 137 2. hét	AD Sb 2. hét	AD mir 219 1. hét	AD Sb 1. hét	AD mir 219 2. hét	AD Sb 2. hét
1.	5,800	6,588	6,500	6,350	6,400	6,400	6,450	6,550
2.	6,700	6,588	6,250	6,550	6,650	6,600	6,300	6,600
3.	6,350	6,118	6,050	6,250	6,700	6,650	6,350	6,400
4.	6,000	6,353	6,400	6,500	6,600	6,300	6,100	6,450
5.	6,400	6,647	6,200	6,300	6,500	6,800	6,200	6,200
6.	6,300	6,353	6,200	6,500	6,450	6,650	6,350	6,450
7.	6,350	6,529	6,300	6,450	6,550	6,700	6,450	6,250
8.	6,100	6,471	5,950	6,050	6,300	6,550	6,350	5,900
9.	6,400	6,176	6,350	6,350	6,550	6,450	6,400	6,500
10.	6,300	6,588	6,400	5,950	6,700	6,650	6,550	6,300
átlag	6,270	6,465	6,260	6,325	6,540	6,575	6,350	6,360
szórás	0,249	0,145	0,168	0,198	0,131	0,151	0,129	0,207
standard hiba	0,079	0,046	0,053	0,062	0,041	0,048	0,041	0,065
P érték	0,07346		0,43832		0,58693		0,89815	

6. táblázat. A pseudopupil analízis eredményei. A táblázatban látható az egyedenként vizsgált 20 db ommatidiumban lévő rhabdomerek számának átlaga, szórás és standard hiba feltüntetésével, illetve az egyes összehasonlításokban a statisztikai szignifikancia értéke, melyek közül egyik sem kisebb, mint 0,05, ami azt jelenti, hogy egyik különbség sem szignifikáns.



8. ábra. A pseudopupil analízis eredményei. Az oszlopok az ommatidiumonkénti átlagos rhabdomerszámot mutatják, a standard hiba feltüntetésével.

A statisztikai vizsgálatok után megállapítható, hogy sem a miR-137 sem pedig a miR-219 túltermelése nem okoz további romlást az idegsejtek épségében az AD-s állatokban sem, azokhoz képest, amelyek nem termelik túl azokat.

5.4. Az *UAS-Abeta* transzgén transzkriptum szintjének vizsgálata

Kíváncsiak voltunk arra, hogy a miR-137, illetve a miR-219 miRNS-ek túltermelése hatással van-e a *UAS-Abeta* transzgénről termelődő mRNS mennyiségére, ezért ennek megállapítására reverz transzkripció kvantitatív (real-time) PCR analízist (RT-qPCR) végeztünk. Genotípusokként három párhuzamos biológiai replikátumon végeztük a vizsgálatokat és minden biológiai replikátumból két technikai replikátumot készítettünk. A vizsgálathoz elsőként a megfelelő genotípusú *Drosophilák* fejéből nyertük ki az RNS-t. A kinyert RNS-ek koncentrációjának lemérése után annak megfelelően hígítottuk a reverz transzkripcióhoz. A reverz transzkripciót követően háztartási gén kontrollként az α -tubulin mRNS-ére végeztünk el egy qPCR-t, ezt használva ellenőrzésnek, hogy a cDNS-ek templát szintézise valóban megtörtént. Ezután az *Abeta* transzgénről átíródott mRNS-nek megfelelő cDNS-hez kötődő primerekkel végeztünk PCR-t. A mintákban a cDNS templát (és ezen keresztül áttételesen a mRNS-ek) koncentrációját akartuk meghatározni, hogy ebből következtethessünk a

génkifejeződés mértékére. Az *Abeta* templát koncentrációkat az arányaiban ismert koncentrációjú kalibrációs mintáink ciklusszámából az Excel *előrejelzés* függvénye segítségével határoztuk meg, az egyes biológiai mintákhoz tartozó technikai replikátumok értékeit átlagoltuk, és az *α -tubulin* kontroll értékeivel normalizáltuk (7. táblázat). Az egyes genotípusokban a templát koncentráció értékeket mintánként átlagoltuk, valamint statisztikai analízist végeztünk kétmintás, kétszélű t-próbával. A miR-137-et túltermelő AD-s legyek esetében az *Abeta* expressziós szintje szignifikánsan ($P=0.048$) alacsonyabb volt, mint a miR-137-et nem túltermelő AD-s kontrolljaik között. Ez a különbség azt jelzi, hogy a mikroRNS valamilyen módon befolyásolja az *Abeta*₁₋₄₂ kifejeződését. Ennek további vizsgálatára bioinformatikai tesztek végeztünk. A miR-219 esetében nem volt szignifikáns különbség az *Abeta* transzkriptum szintjében a két vizsgált genotípus között.

	cc	logcc	tub ct1	tub ct2	tub átlag	cc	logcc	Abeta ct1	Abeta ct2	Abeta átlag	norm. cc.	szign.	átlag és sd
5x	135,0	2,130	20,59	20,50	20,545	135,0	2,130	23,51	23,40	23,455			
15x	45,0	1,653	22,33	22,18	22,255	45,0	1,653	25,02	25,01	25,015			
45x	15,0	1,176	23,67	23,49	23,580	15,0	1,176	26,46	26,46	26,460			
135 x	5,0	0,699	25,15	25,04	25,095	5,0	0,699	27,62	27,91	27,765			
ADmir 219 1.	61,118	1,786	21,82	21,58	21,700	67,371	1,828	24,41	24,44	24,425	1,102	f- teszt: 0,029	átlag: 1,070
ADmir 219 2.	101,646	2,007	20,93	21,08	21,005	108,127	2,034	23,83	23,78	23,805	1,064		szórás: 0,030
ADmir 219 3.	72,059	1,858	21,43	21,52	21,475	75,253	1,877	24,24	24,32	24,280	1,044		
ADSb 219 1.	98,352	1,993	21,05	21,05	21,050	135,423	2,132	23,61	23,41	23,510	1,377	t- teszt: 0,299	átlag: 1,263
ADSb 219 2.	93,783	1,972	21,17	21,06	21,115	92,470	1,966	24,01	24,01	24,010	0,986		szórás: 0,242
ADSb 219 3.	49,792	1,697	21,95	22,01	21,980	71,067	1,852	24,32	24,39	24,355	1,427		
ADmir 137 1.	88,126	1,945	21,15	21,25	21,200	20,645	1,315	25,90	26,05	25,975	0,234	f- teszt: 0,028	átlag: 0,309
ADmir 137 2.	125,223	2,098	20,71	20,73	20,720	39,491	1,597	25,18	25,07	25,125	0,315		szórás: 0,072
ADmir 137 3.	85,583	1,932	21,22	21,26	21,240	32,385	1,510	25,44	25,33	25,385	0,378		
ADSb 137 1.	40,270	1,605	22,27	22,27	22,270	55,247	1,742	24,75	24,62	24,685	1,372	t- teszt: 0,048	átlag: 1,808
ADSb 137 2.	41,013	1,613	22,28	22,21	22,245	63,867	1,805	24,45	24,54	24,495	1,557		szórás: 0,602
ADSb 137 3.	30,049	1,478	22,56	22,78	22,670	74,966	1,875	24,38	24,19	24,285	2,495		

7. táblázat. Az RT-qPCR vizsgálat eredményei. A táblázatban a ct-értékek a ciklusszámot jelöli, amelyben a minták fluoreszcenciája elérte a mérési küszöböt, a logcc-t a kalibrációs minták alapján számoltuk ki az Excel előrejelzés függvényével, majd ebből tudtuk megállapítani a koncentrációt, az *Abeta* koncentráció normalizálása az *α -tubulin* koncentrációra történt.

5.4. Bioinformatikai vizsgálatok

5.4.1. Géndúsulás analízis

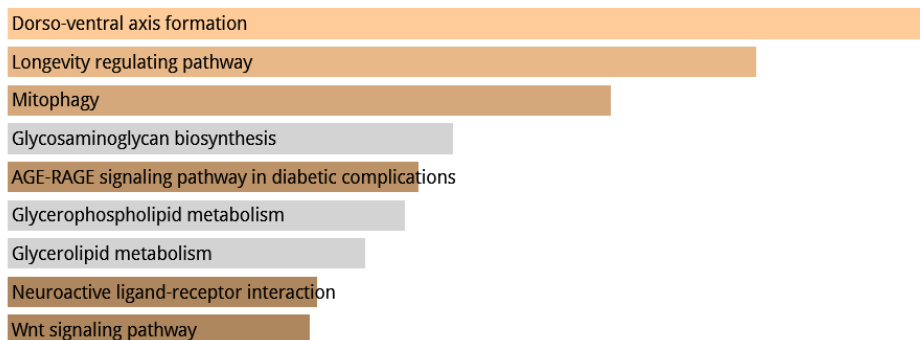
A mikroRNS-ek által feltételezhetően befolyásolt folyamatokat géndúsulás analízissel (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) azonosítottuk. Az eredmények alapján láthattuk, hogy az általunk vizsgált mikroRNS-ek által szabályozott gének melyik molekuláris útvonalak mely lépéseiben vesznek részt. Ezek alapján lehet következtetni, arra, hogy az általunk megfigyelt változások az egészséges és az Abeta₁₋₄₂-t termelő állatokban, hogyan következhetek be a mikroRNS-ek túltermelésének hatására.

A mikroRNS-ek által szabályozott folyamatokat a KEGG 2019-es útvonal adatbázis alapján Flyenrichr programmal összegeztük. A KEGG 2019 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) egy adatbázis, amely a szervezetekben működő folyamatok átlátását és megértését segíti elő, molekuláris információk felhasználásával. (Kanehisa M, Goto S., 2000) A GSEA segítségével a géndúsulási adatok alapján összegezve, sorrendben kaphattuk meg a biológiai útvonalakat, melyeket a vizsgált mikroRNS-eink által szabályozott gének befolyásolnak. A sorrend kialakítása a z- és p-érték kombinálása alapján történt, a z-érték a mikroRNS által előidézett változás mértékét, a p-érték pedig géndúsulás alapján számított statisztikai szignifikanciát hivatott kifejezni.

A 9. ábrán a miR-137 által befolyásolt molekuláris útvonalak a kombinált p- és z-értékek szerint vannak sorrendben ábrázolva, a 8. táblázatban pedig a pontos értékek láthatók. Az ábra és a táblázat alapján összefoglalva a miR-137 három folyamatot befolyásol szignifikánsan, a dorso-ventrális tengely kialakítását, a neuroaktív ligand-receptor interakciókban és a Wnt szignál útvonalban van, de arra már kisebb a hatása.

Click the bars to sort. Now sorted by **combined score ranking**.

SVG PNG JPG



9. ábra. A miR-137 funkciói a KEGG 2019 útvonal analízis alapján. Az ábrán színessel láthatók a *p*-értékük alapján szignifikáns útvonalak, viszont korrigált *p*-érték alapján ezek közül nem mindegyik tekinthető valóban szignifikáns eredménynek.

Név	Korrigált <i>p</i> -érték	Z-érték	kombinált érték
Dorzo-ventrális tengely kialakítása	0,01180	-47,18	338,02
Élettartam szabályozási útvonal	0,07942	-67,75	283,39
Mitofágia	0,07942	-56,73	238,73
Glükózaminoglikán bioszintézis	0,2378	-70,00	189,97
AGE-RAGE szignál útvonal a diabétikus szövödményekben	0,1849	-59,20	179,14
Glicerofoszfolid anyagcsere	0,2937	-71,51	174,89
Glicerolipid anyagcsere	0,3063	-70,75	162,62
Neuroaktív ligand-receptor interakciók	0,01105	-19,65	147,73
Wnt szignál útvonal	0,0003161	-11,97	145,71

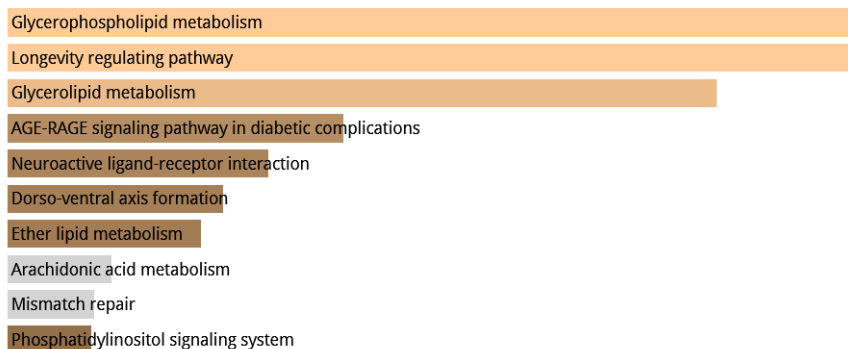
8. táblázat. A miR- 137 géndúsítás eredményei a KEGG 2019-es útvonal analízis alapján.

A táblázatban a *p*-érték korrigált értéke látható, ugyanis ez mutatja a valós szignifikanciát. Emellett a diagramhoz számolt korrigált érték és az ahhoz szükséges *z*-érték van feltüntetve.

A 10. ábrán a miR-219 által befolyásolt útvonalak a kombinált *p*- és *z*-értékek szerinti sorrendben láthatók, a 9. táblázatban pedig a KEGG 2019 útvonal segítségével kapott pontos értékek láthatók. Az ábra és a táblázat alapján összegezve a miR-219 négy folyamatot befolyásol szignifikáns mértékben, ezek a glicerofoszfolid anyagcsere, az élettartam szabályozási útvonal, illetve kisebb mértékben a neuroaktív ligand-receptor interakciók és a foszfatidilinozitol szignál hálózat

Click the bars to sort. Now sorted by **combined score**.

SVG PNG JPG



10. ábra. A miR-219 funkciói a KEGG 2019 útvonal alapján. Az ábrán színessel láthatók a *p*-értékük alapján szignifikáns útvonalak, viszont korrigált *p*-érték alapján ezek közül nem mindegyik tekinthető valóban szignifikáns eredménynek.

Név	Korrigált <i>p</i> -érték	Z-érték	kombinált érték
Glicerofoszfolid anyagcsere	0.04420	-82.05	420.13
Élettartam szabályozási útvonal	0.04420	-74.68	418.71
Glicerolipid anyagcsere	0.07641	-81.30	356.95
AGE-RAGE szignál útvonal a diabetikus szövődményekben	0.1656	-63.37	190.83
Neuroaktív ligand-receptor interakciók	0.01424	-20.00	157.22
Dorzo-ventrális tengely kialakítása	0.1514	-42.89	137.09
Éter lipid anyagcsere	0.1265	-36.57	127.29
Arachidonsav anyagcsere	0.3822	-50.80	87.52
Mismatch repair	0.3822	-50.72	79.98
Foszfatidilinozitol szignál hálózat	0.04420	-15.37	78.71

9. táblázat. A miR- 219 géndúsítás eredményei a KEGG 2019-es útvonal analízis alapján.

A táblázatban a *p*-érték korrigált értéke látható, ez mutatja a valós szignifikanciát, ezen kívül a diagramhoz számolt korrigált érték és az ahhoz szükséges *z*-érték is fel van tüntetve.

A géndúsítási vizsgálatok során a GO (Gene Ontology) Biological Process 2018-as változata által is összegeztük a biológiai folyamatokat. A GO adatbázis egy olyan rendszer, mely átlátható információforrásként használható a gének funkcióinak felderítésében. (Harris M.A., 2004) A táblázatokban a folyamatok mellett látható kód a folyamat saját azonosító kódja.

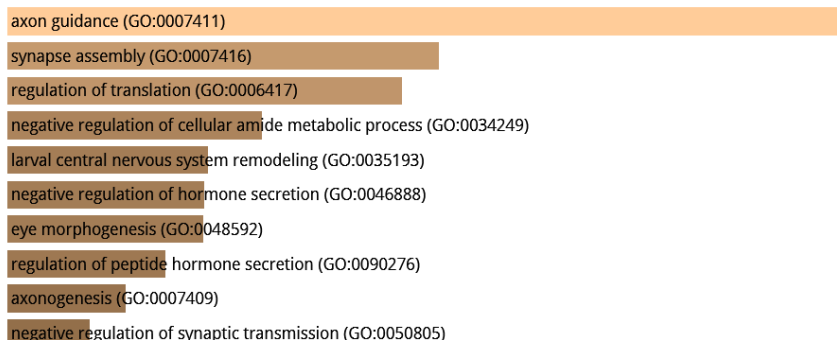
A GO Biological Process géndúsításos analízis eredményei alapján, melyek a 11. ábrán és a hozzá tartozó 10. táblázatban láthatók, a miR-137 több folyamatban is szignifikáns mértékben részt vesz. A vizsgálat eredményei alapján összességében elmondható, hogy nagy szerepet játszik az idegrendszer fejlődésében, a szinapszisok működésében és egyéb anyagcsere folyamatokban.

GO Biological Process 2018

Bar Graph Table  

Click the bars to sort. Now sorted by **combined score**.

SVG PNG JPG



11. ábra. Azon biológiai folyamatok, amelyben a miR-137 által szabályozott gének felülreprezentáltak a GO Biological Process 2018 alapján. Az eredmények a p - és z -érték kombinált értéke alapján vannak sorba rendezve.

Név	Korrigált p -érték	Z -érték	kombinált érték
Axon irányítás (GO:0007411)	4,444e-13	-1,06	38,00
Szinapszis keletkezés (GO:0007416)	0,0001942	-2,66	33,95
Transzláció szabályozás (GO:0006417)	2,492e-8	-1,43	33,59
A sejt amid anyagcsere folyamatának negatív szabályozása (GO:0034249)	0,00002094	-2,10	32,20
Lárvális központi idegrendszer átalakítása (GO:0035193)	0,008653	-4,27	31,65
Hormon szekréció negatív szabályozása (GO:0046888)	0,006397	-3,98	31,62
Szem morfogenezise (GO:0048592)	0,00003145	-2,13	31,61
Peptid hormon szekréció szabályozása (GO:0090276)	0,001739	-3,19	31,24
Axonogenezis (GO:0007409)	3,530e-10	-1,09	30,84
A szinaptikus transzmisszió negatív szabályozása (GO:0050805)	0,0002059	-2,42	30,48

10. táblázat. A miR-137 által szabályozott gének dúsulás analízise GO Biological Process 2018 adatbázis kategóriák alapján. A táblázatban a korrigált p -érték mutatja a szignifikanciát, a z -érték a mikroRNS szerepének mértékét jelzi. A táblázat elemei a korrigált p -érték alapján vannak sorba rendezve.

A miR-219 GO Biological Process géndúsításos vizsgálat, melyek eredményei a 12. ábrán és a hozzá tartozó 11. táblázatban láthatók, szintén több folyamatot sorol fel, melyet a miR-219 befolyásolhat. Az analízis alapján összegezve elmondható, hogy a miR-219-nek jelentős szerepe van az idegrendszeri folyamatokban, a szinaptikus jelátvitelben és egyéb szignál útvonalakban.

GO Biological Process 2018

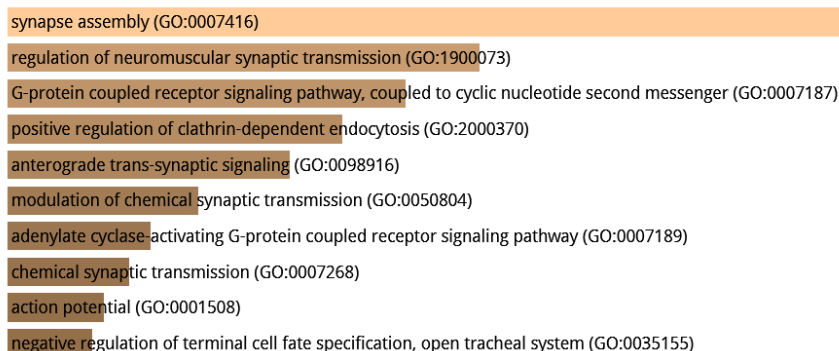
Bar Graph

Table



Click the bars to sort. Now sorted by **combined score**.

SVG PNG JPG



12. ábra. Azon biológiai folyamatok, amelyben a miR-219 által szabályozott gének felülreprezentáltak a GO Biological Process 2018 alapján. Az eredmények a p- és z-érték kombinált értéke alapján vannak sorba rendezve.

Név	Korrigált p-érték	Z-érték	kombinált érték
Szinapszis keletkezés (GO:0007416)	0,000002216	-2,69	49,63
Neuromuszkuláris szinaptikus transzmisszió szabályozás (GO:1900073)	0,00004445	-2,47	37,58
G-protein kapcsolt receptor szignál útvonal, ciklikus nukleotid másodlagos hírvivőkhöz kapcsolva (GO:0007187)	0,0001624	-2,60	35,29
Klatrin-függő endocitózis pozitív szabályozás (GO:2000370)	0,009982	-3,98	33,35
Anterográd transz-szinaptikus jelátvitel (GO:0098916)	1,979e-7	-1,47	31,71
Kémiai szinapszisok transzmisszió moduláció (GO:0050804)	0,000002181	-1,54	28,89
Adenilát cikláz aktiváló G-protein kapcsolt receptor szignál útvonal (GO:0007189)	0,0001246	-1,96	27,42
Kémiai szinaptikus transzmisszió (GO:0007268)	2,635e-8	-1,10	26,76
Akciós potenciál (GO:0001508)	0,004601	-2,62	25,95
Terminális sejt specifikáció negatív szabályozása a nyílt tracheális rendszerben (GO:0035155)	0,04466	-4,32	25,62

11. táblázat. A miR-219 által szabályozott gének dúsulásanalízise GO Biological Process 2018 adatbázis kategóriák alapján. A táblázatban a korrigált p-érték mutatja a szignifikanciát, a z-érték a mikroRNS szerepének mértékét jelzi. A táblázat elemei a korrigált p-érték alapján vannak sorba rendezve.

5.4.1. Komplementaritás vizsgálat:

Az RT-qPCR eredményeiből kiderült, hogy a miR-137 túltermelése befolyásolja az Abeta₁₋₄₂ kifejeződését, ami feltehetőleg magyarázatul szolgálhat a megfigyelt javulásra a modellben. Emiatt szekvencia komplementaritás tesztet végeztünk a miR-137 érett formája és az Abeta transzgén szekvenciája között. A teszt segítségével, kideríthetjük, hogy a mikroRNS rendelkezik-e kanonikus kötőhellyel az Abeta mRNS-e, és így feltételezhetően transzláció gátláson keresztül megvalósuló downreguláció történik. Amennyiben ilyen kötőhelyet nem találunk, alternatív hipotézisként elképzelhető, hogy a miR-137 transzgénje mellett az *Abeta* transzgén transzkripció szintje alacsonyabb, esetlegesen amiatt, mert a GAL4 fehérjének nagyobb lehet az affinitása a mikroRNS transzgén felé.

Sequence ID: **Query_7059641** Length: **22** Number of Matches: **2**

Range 1: 12 to 18 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	0.60	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Minus

```
Query 373 GTGTATT 379
      |||||
Sbjct 18  GTGTATT 12
```

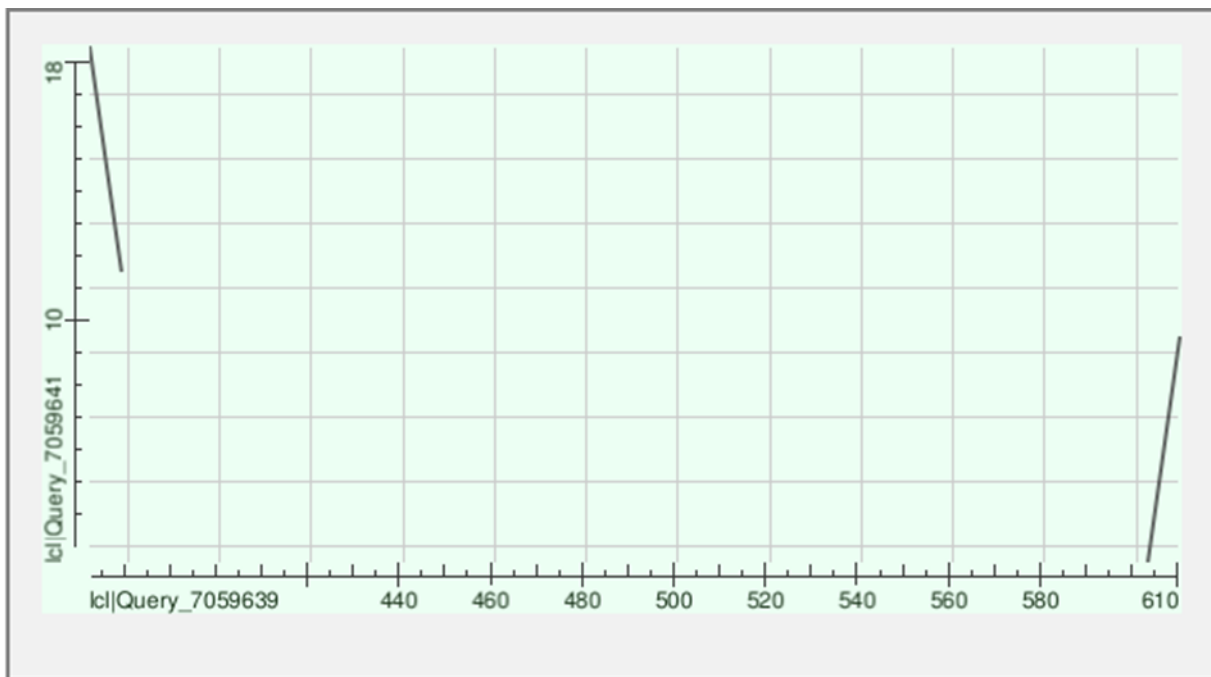
Range 2: 3 to 9 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#) [▲ First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	0.60	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Plus

```
Query 604 TTGCTTG 610
      |||||
Sbjct 3   TTGCTTG 9
```

13. ábra: A BLAST vizsgálat során talált komplementer szakaszok: A *subject* a miR-137-3p szekvenciája, a *query* az Abeta transzgén szekvenciája a hsp70 promótertől az SV40 polyA szignál szekvenciáig.



14. ábra. A BLAST analízis grafikus megjelenítése. A grafikon a *mir-137* szekvencia részletek (Y tengely) elhelyezkedését mutatja az *Abeta* transzgén szekvencián (X tengely).

A 13.-es és 14.-es ábrán látható BLAST vizsgálatok két helyen is komplementaritást mutatnak. A komplementer részek közül, viszont az első (Range 1: 12-18) nem a mikroRNS seed-régiójában helyezkedik el, így nem tekinthető kanonikus helynek, a második (Range 2: 3-9) pedig nem antiparallel állású, ami miatt szintén nem tekinthetünk rá potenciális kötőhelyként. Ahhoz, hogy biztosan kizárhassuk, hogy a miR-137 poszttranszkripció gátlással befolyásolta az Abeta_{1-42} csökkent termelődését, további vizsgálatokra lenne szükség.

6. Diskusszió

A vizsgálatok alapján összegezve, a miR-137 túltermelése sem a kikelési sem a pseudopupil vizsgálatokban nem okozott szignifikáns változást, a mászási tesztek során viszont az $\text{A}\beta_{1-42}$ -t kifejező állatokban javulást eredményezett, míg az egészséges egyedekben összességében nem értelmezhető hetenként eltérő változást okozott, az első héten ugyanis rontotta, a másodikon viszont javította az eredményeket. Az RT-qPCR során viszont a miR-137-et túltermelő állatokban változást tapasztaltunk az Abeta_{1-42} kifejeződésében a nem túltermelőkhöz képest, a csökkenés biztos okát a bioinformatikai vizsgálatok során nem sikerült megállapítani, ehhez további vizsgálatokra lenne szükség. Emiatt a mászási tesztek során tapasztalt javulás nem

értelmezhető a miR-137 saját funkcionális hatásaként. Ehhez képest a miR-219 túltermelése az RT-qPCR során is megerősített, egyértelmű változásokat okozott, egészséges állatokban a kikelési arányokban romlást idézett elő a túltermelése, a mászási és pseudopupil analízisen nem változtatott, míg beteg állatokban szintén rontotta a kikelést, azaz túltermelése toxikus, és a mászási eredményeket is rontotta, a pseudopupil analízis eredményein viszont itt sem változtatott.

Az idegrendszer működésében lejátszódó folyamatok befolyásolása miatt az általunk vizsgált mikroRNS-ek több neurodegeneratív betegség vizsgálata során fókuszba kerültek. Így például Parkinson kór *Drosophila* modellben végzett vizsgálatok során kiderült, hogy a miR-137 szintje megemelkedett a kóros folyamatok kialakulásának korai szakaszában és ez kötőhelyei révén összefüggésbe hozható a kór során tapasztalt patológiás folyamatokkal, mint például a neuroaktív receptorok megváltozott működésével. (Kong Y.,2015) Emellett a miR-137 megváltozott termelődést mutat a HIV asszociált demenciában szenvedő betegek agyi szöveteiben. A miR-137 megváltozott termelődése hatással van a downstream szignál útvonalak működésére és egyéb idegi folyamatokra, amelyek emiatt szintén patológiás elváltozásokat mutathatnak. (Zhou L. és mtsai., 2012)

A kutatócsoportunk Alzheimer kór előtt a Huntington kór modellben vizsgálta a mikroRNS-ek hatását. Mivel Zsindely N. és mtsai. (2023) ugyanazon vizsgálatokat végezték a kutatás során, ezért az eredmények könnyedén összehasonlíthatók. A miR-137 a kutatásaik során nem eredményezett változást az egészséges egyedeken végzett vizsgálatok során, amely egyezik az általunk tapasztaltakkal, bár Huntington kór modellben a kikelést és a mászást szignifikánsan javította, de ezeket az eredményeket nem vethetjük össze a mi vizsgálataink során találtakkal, ugyanis az az RT-qPCR eredmények alapján nem értelmezhetőek. A miR-219 túltermelés vizsgálatai viszont érdekes párhuzamot mutatnak a két kutatás eredményei között. Zsindely N. és mtsai. (2023) ugyanis vizsgálataik során az egészséges állatokban mind a három vizsgálatnál romlást tapasztaltak a miR-219-et túltermelő állatokban, míg a betegségmodellben csak a pseudopupil analízis során nem volt szignifikáns változás, a mászási tesztek és a kikelési arányok itt is romlást mutattak. A két kutatás során talált hasonlóságokat a 12. táblázatban van összegezve.

miR-219	egészséges		betegség modell	
	Alzheimer kór kutatás	Huntington kór kutatás	Alzheimer kór kutatás	Huntington kór kutatás
kikelési arányok	romlik	romlik	romlik	romlik
mászási tesztek	változatlan	romlik	romlik	romlik
pseudopupil analízis	változatlan	romlik	változatlan	változatlan

12. táblázat. A Huntington kór és az Alzheimer kór kutatások során kapott eredmények összehasonlítása. *A táblázatban zölddel vannak kijelölve az egyező megfigyelések.*

Mindkét kutatás alapján tapasztalt változásokat magyarázhatják a bioinformatikai vizsgálatok eredményei, ugyanis mindkét vizsgált mikroRNS jelentős szerepet játszik az idegrendszer működésében és a jelátvitelben, ezért megváltozott termelésük ezekre a folyamatokra is jelentős hatást gyakorolhat.

Köszönetnyilvánítás:

Elsősorban köszönetet szeretnék mondani a témavezetőmnek, Dr. Bodai Lászlónak, aki a betanulásom első perceitől folyamatosan figyelemmel követte végig a munkám, és közben önállóságra biztatott. Szeretném megköszönni, hogy szaktudása fáradhatatlan átadásával tanított, türelmesen válaszolta meg az összes kérdésemet, és segítőkészen kezelte a felmerülő problémákat. Emellett szeretném megköszönni a kutatócsoportunk minden tagjának Farkas Anitának, Siági Fruzsínának, Kovács Mercédesznek, Borosta Robertának és Nagy Gábornak, hogy tapasztalataik és jó tanácsaik megosztásával rengeteget segítettek a fejlődésemben. Köszönet illeti Kóra Zitát, amiért bármikor segítségül hívhattam a pseudopupil vizsgálatok feljegyzéséhez, ami sokat lendített a haladásomon. Nem utolsó sorban, pedig köszönöm a családomnak és a barátaimnak, hogy kitartóan támogattak, biztattak és töretlenül hittek bennem.

Irodalom jegyzék

- Khan S, Barve KH, Kumar MS. Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol*. 2020;18(11):1106-1125. doi: 10.2174/1570159X18666200528142429. PMID: 32484110; PMCID: PMC7709159.
- Miller, Owen & Georges, Jean. (2022). Dementia in Europe Yearbook 2021 Dementia-inclusive Communities and Initiatives across Europe.
- Small DH, Cappai R. Alois Alzheimer and Alzheimer's disease: a centennial perspective. *J Neurochem*. 2006 Nov;99(3):708-10. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04212.x. PMID: 17076655.
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2011 Mar 19;377(9770):1019-31. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61349-9. Epub 2011 Mar 1. PMID: 21371747.
- Alzheimer's assosiation honlapja: Stages of Alzheimer's <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/stages> megtekintve: 2024.03.20.
- Serý O, Povová J, Míšek I, Pešák L, Janout V. Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia Neuropathol*. 2013;51(1):1-9. doi: 10.5114/fn.2013.34190. PMID: 23553131.
- Kovács T. Az alzheimer-kór terápiája [Therapy of Alzheimer disease]. *Neuropsychopharmacol Hung*. 2009 Mar;11(1):27-33. Hungarian. PMID: 19731816.
- Zádori D, Datki Z, Penke B. A krónikus agyi hipoperfúzió szerepe az Alzheimer-kór kialakulásában--tények es hipotézisek [The role of chronic brain hypoperfusion in the pathogenesis of Alzheimer's disease--facts and hypotheses]. *Ideggyogy Sz*. 2007 Nov 30;60(11-12):428-37. Hungarian. PMID: 18198789.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Jul;83(13):4913-7. doi: 10.1073/pnas.83.13.4913. PMID: 3088567; PMCID: PMC323854.
- van Rooij E. The art of microRNA research. *Circ Res*. 2011 Jan 21;108(2):219-34. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.227496. PMID: 21252150.
- de Planell-Saguer M, Rodicio MC. Analytical aspects of microRNA in diagnostics: a review. *Anal Chim Acta*. 2011 Aug 12;699(2):134-52. doi: 10.1016/j.aca.2011.05.025. Epub 2011 May 20. PMID: 21704768.
- Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*. 2010 Nov;11(7):537-61. doi: 10.2174/138920210793175895. PMID: 21532838; PMCID: PMC3048316.
- Yeo JH, Chong MM. Many routes to a micro RNA. *IUBMB Life*. 2011 Nov;63(11):972-8. doi: 10.1002/iub.524. PMID: 22031495.
- Shukla GC, Singh J, Barik S. MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions. *Mol Cell Pharmacol*. 2011;3(3):83-92. PMID: 22468167; PMCID: PMC3315687. (Figure 1)
- Yin J, Lin J, Luo X, Chen Y, Li Z, Ma G, Li K. miR-137: a new player in schizophrenia. *Int J Mol Sci*. 2014 Feb 21;15(2):3262-71. doi: 10.3390/ijms15023262. PMID: 24566148; PMCID: PMC3958910.
- Jiang Y, Xu B, Chen J, Sui Y, Ren L, Li J, Zhang H, Guo L, Sun X. Micro-RNA-137 Inhibits Tau Hyperphosphorylation in Alzheimer's Disease and Targets the CACNA1C Gene in Transgenic Mice and Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Med Sci Monit*. 2018 Aug 13;24:5635-5644. doi: 10.12659/MSM.908765. PMID: 30102687; PMCID: PMC6104547.

- Li J, Chen W, Yi Y, Tong Q. miR-219-5p inhibits tau phosphorylation by targeting TTBK1 and GSK-3 β in Alzheimer's disease. *J Cell Biochem*. 2019 Jun;120(6):9936-9946. doi: 10.1002/jcb.28276. Epub 2018 Dec 16. PMID: 30556160.
- Santa-Maria I, Alaniz ME, Renwick N, Cela C, Fulga TA, Van Vactor D, Tuschl T, Clark LN, Shelanski ML, McCabe BD, Crary JF. Dysregulation of microRNA-219 promotes neurodegeneration through post-transcriptional regulation of tau. *J Clin Invest*. 2015 Feb;125(2):681-6. doi: 10.1172/JCI78421. Epub 2015 Jan 9. PMID: 25574843; PMCID: PMC4319412.
- Jonson M, Pokrzywa M, Starkenberg A, Hammarstrom P, Thor S. Systematic A β Analysis in *Drosophila* Reveals High Toxicity for the 1-42, 3-42 and 11-42 Peptides, and Emphasizes N- and C-Terminal Residues. *PLoS One*. 2015 Jul 24;10(7):e0133272. doi: 10.1371/journal.pone.0133272. PMID: 26208119; PMCID: PMC4514787.
- Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell*. 2018 Mar 22;173(1):20-51. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.006. PMID: 29570994; PMCID: PMC6091663.
- Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000 Jan 1;28(1):27-30. doi: 10.1093/nar/28.1.27. PMID: 10592173; PMCID: PMC102409.
- Harris MA, Clark J, Ireland A, Lomax J, Ashburner M, Foulger R, Eilbeck K, Lewis S, Marshall B, Mungall C, Richter J, Rubin GM, Blake JA, Bult C, Dolan M, Drabkin H, Eppig JT, Hill DP, Ni L, Ringwald M, Balakrishnan R, Cherry JM, Christie KR, Costanzo MC, Dwight SS, Engel S, Fisk DG, Hirschman JE, Hong EL, Nash RS, Sethuraman A, Theesfeld CL, Botstein D, Dolinski K, Feierbach B, Berardini T, Mundodi S, Rhee SY, Apweiler R, Barrell D, Camon E, Dimmer E, Lee V, Chisholm R, Gaudet P, Kibbe W, Kishore R, Schwarz EM, Sternberg P, Gwinn M, Hannick L, Wortman J, Berriman M, Wood V, de la Cruz N, Tonellato P, Jaiswal P, Seigfried T, White R; Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jan 1;32(Database issue):D258-61. doi: 10.1093/nar/gkh036. PMID: 14681407; PMCID: PMC308770.
- Kong Y, Liang X, Liu L, Zhang D, Wan C, Gan Z, Yuan L. High Throughput Sequencing Identifies MicroRNAs Mediating α -Synuclein Toxicity by Targeting Neuroactive-Ligand Receptor Interaction Pathway in Early Stage of *Drosophila* Parkinson's Disease Model. *PLoS One*. 2015 Sep 11;10(9):e0137432. doi: 10.1371/journal.pone.0137432. PMID: 26361355; PMCID: PMC4567341.
- Chen Y, Mateski J, Gerace L, Wheeler J, Burl J, Prakash B, Svedin C, Amrick R, Adams BD. Non-coding RNAs and neuroinflammation: implications for neurological disorders. *Exp Biol Med* (Maywood). 2024 Feb 28;249:10120. doi: 10.3389/ebm.2024.10120. PMID: 38463392; PMCID: PMC10911137.
- Zhou L, Pupo GM, Gupta P, Liu B, Tran SL, Rahme R, Wang B, Rua R, Rizos H, Carroll A, Cairns MJ, Saksena NK. A parallel genome-wide mRNA and microRNA profiling of the frontal cortex of HIV patients with and without HIV-associated dementia shows the role of axon guidance and downstream pathways in HIV-mediated neurodegeneration. *BMC Genomics*. 2012 Nov 28;13:677. doi: 10.1186/1471-2164-13-677. PMID: 23190615; PMCID: PMC3560210.
- Zsindely N, Nagy G, Siági F, Farkas A, Bodai L. Dysregulated miRNA and mRNA Expression Affect Overlapping Pathways in a Huntington's Disease Model. *Int J Mol Sci*. 2023 Jul 26;24(15):11942. doi: 10.3390/ijms241511942. PMID: 37569316; PMCID: PMC10419151.

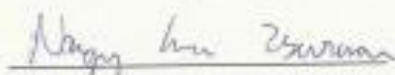
A 37. OTDK
BIOLÓGIA SZEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK
2. SZÁMÚ MELLÉKLETE

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Nagy Éva Zsuzsanna** nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott **MiR-137 és miR-219 túltermelés hatásának vizsgálata *Drosophila* Alzheimer kór modellben** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat	A részvétel mértéke (öt fokozatú skálán jellemezve)
A felhasznált <i>Drosophila</i> törzsek fenntartása és keresztezése	5
Kikelési arányok vizsgálata	5
Mászási tesztek	5
Pszeudopupil analízis	4
RNS izolálás <i>Drosophila</i> fejekből	4
RNS spektrofotometriás kvantitálása és hígítása	5
DNáz I. kezelés	5
Reverz transzkripció	5
cDNS templát hígítási sor előállítása kalibrációs görbéhez	5
RT-qPCR	5
Bioinformatikai vizsgálatok	4
Az adatok statisztikai feldolgozása	5

Kelt: 2024.04.15.



Pályamunkát benyújtó hallgató (Nagy Éva
Zsuzsanna)
aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Témavezető (Dr Bodai László, SZTE TTIK Biokémiai
és Molekuláris Biológiai Tanszék)
aláírása