

A projekt célja a de- és remyelinisatio posztranszkripció szabályozásának vizsgálata volt. Erre a cuprizon (CPZ) modellt alkalmaztuk, mely a corpus callosumban okoz demyelinistiót, majd a CPZ felfüggesztését követően spontán remyelinistiót. 1-2-3-4-5-6 hétig adaholtuk a CPZ-t csoportonként 7 egerrel: ily módon indukáltunk kísérletes demyelinistiót. Minden csoporthoz 5 további egeret alkalmaztunk kontrollként. Minden egyes demyelinistió csoporthoz két remyelinistió csoporthoz is felállítottunk a korai és késői remyelinistió vizsgálatára: az 1-2-3-4-5-6 hetes demyelinistió indukció után minden csoportban 2 napig vagy 2 hétig az állat normál tápot kapott, ezzel a spontán beinduló remyelinistiót kívántuk vizsgálni korai akut, és késői krónikus fázisban. A két remyelinistió csoporthoz mind a hat időpontban 7 egerből állt, valamennyi csoporthoz szintén 5 kontroll egeret alkalmaztunk. A terminálást követően fagyasztásra került a teljes agy, valamint izom, vese, máj, thymus és lép.

A corpus callosumot mikroszkóp alatt eltávolítottuk a fagyasztott teljes agyból. RNS-t izoláltunk, majd a 4 hetes CPZ csoportban a demyelinistált és a korai és késői remyelinistált mintákból elvégeztük a miRNS array-t. Az array alapján 3 miRNS-t azonosítottunk, melyek időben differenciáltan expresszálódtak, és a kontroll mintától is különböztek. Az egyik miRNS humán homológja schizofren betegek temporalis kérgében mutat változást, glioblastomában down-regulálódik, és tumor szuppressorként funkcionálhat. Egy másik miRNS gyulladással asszociálódik experimentális és humán temporalis leány epilepsziában, és a mikroglia aktivációval függhet potenciálisan össze. A harmadik miRNS funkciójára vonatkozóan gyakorlatilag nincsenek adatok.

Ezt követően beállítottuk a 3 miRNS validálására a real-time PCR-t, majd a 4 hetes minták validálását követően a többi időpontban és mintában is elvégeztük a 3 miRNS expresszió vizsgálatát. Az eredmények azt jelzik, hogy már az egy hetes demyelinistiót követően csökken mindhárom miRNS expressziója, majd a 2 hetes remyelinistió során tér vissza a kontrollnak megfelelő expressziós szintre; valamennyi időpontban vett mintában ugyanezen expressziós profil észlelhető.

Majd a következő lépésben megvizsgáltuk, hogyan változik a 3 miRNS expressziója az ontogenetikus myelinistió során. A cél a mikroarray alapján cuprizonnal indukált de- és remyelinistió során változást mutató mikroRNS-ek visszamérése volt a fiziológiás myelinistió során. Postnatalis 1 napos, 3 napos, 5 napos, 7 napos, 10 napos és 14 napos egerek agyából izoláltuk a corpus callosumot, és vizsgáltuk a 3 miRNS expresszióját.

Az egyik, kóros demyelinistiót követő remyelinistió során emelkedést mutató miRNS (a fiziológiás myelinistió során is folyamatos emelkedést mutatott, jelezve, hogy a remyelinistió és myelinistió génexpressziós szabályozásában ez a miRNS feltehetően szerepet játszik).

Megtörtént a kontroll szervekből (vese, lép, máj, izom, thymus) is az RNS izolálás, elvégeztük real-time PCR módszerrel a 3 miRNS expressziójának vizsgálatát. Ez a kontroll csoport arra ad felvilágosítást, hogy az észlelt miRNS változások az idegrendszerre, azaz a de- és remyelinistióra specifikusak-e. Mindhárom miRNS az adott szervekre jellemző, és differenciált expressziót mutat, mely a cuprizon hatására nem változik, egy szervet kivéve: a thymusban a cuprizon adagolást követően az egyik miRNS differenciáltan expresszálódik. Ezért megvizsgáltuk a thymus patológiát, és azt találtuk, hogy cuprizon adagolás után már egy héttel a thymus szignifikáns atrófiája alakul ki. Flow cytometriás méréssel ezért elemeztük a CD3-CD4-CD8- (DN), CD3+CD4+CD8+ (DP), és a CD3+CD4+CD8- illetve CD3+CD4-CD8+ (SP) sejtek arányát: a cuprizon kifejezetten deletálta a DP sejteket. Immunhisztokémiát alkalmazva, a cuprizon hatását vizsgáltuk az epiteliális sejtekre is, és bár valamennyi sejtípus

érintettségét észleltük, a változás legkifejezettebb volt a DP sejtek vonatkozásában. Ez arra utalhat, hogy a cuprizon befolyásolja a T sejt szelekciót, mely magyarázatot adhat arra, miért nyújt védelmet a kísérletes agyvelőgyulladás (EAE) ellen. Ez irányban további kísérleteket tervezünk, hiszen az eredmények felvetik annak a lehetőségét is, hogy az észlelt miRNS a T sejt szelekcióban szerepet játszhat. Tervezzük myasthenias thymusok vizsgálatát is.

A szervek analízise mellett megvizsgáltuk a cuprizon hatását nemcsak a demyelinizált, hanem az épnek tűnő agyi fehérállományban is. A 3 miRNS a demyelinizációhoz hasonló differenciált expressziót mutatott itt is, jelezve, hogy a cuprizon molekuláris hatása itt is érvényesül, de nem következik be oligodendrocyta pusztulás. Ez arra utalhat, hogy a különböző agyi területekn az oligodendrocyták érzékenysége a szöveti stresszel, mitochondriális hatásokkal szemben különbözik. Jelenleg zajlik a kérgi területek vizsgálata.

Kigyűjtöttük öt adatbázis (MiRanda, MiRDB, MiRWalk, PICTAR, Targetscan) alapján a 3 miRNS lehetséges mRNS célpontjait, majd egységesítettük az adatbázisokat, és megvizsgáltuk, milyen potenciális target mRNS-ek szerepelnek legalább 4 adatbázisban. Az egyik miRNS vonatkozásában 43 potenciális célpont szerepelt legalább 4 adatbázisban; útvonal elemzés a p53 jelátvitel, onkogének, Wnt útvonal szerepét jelezték. Erről a miRNS-ről egyelőre adat nem áll rendelkezésre. Egy másik miRNS target útvonalainak értékelése az axon guidance-ban való részvételt sugallja.

Az adatbázis értékelés mellett egy másik módon is elindítottuk az észlelt, de- és remyelinisatioval összefüggő miRNS-ek target mRNS értékelését: a de- és remyelinisált corpus callosumokból mRNS-t izoláltunk, majd elvégeztük a gén expressziós arrayt. Az előzetes eredmények számos gén differenciált down-regulációját jelzik a demyelinisatio fázisban, mely a 2 hetes remyelinisatiós mintákban már a kontrollhoz hasonló szintet éri el. A sejt-specifikus RNS változás a mikroglia és oligodendrocita prekursor sejtek interakcióját sugallhatja, melyet vizsgálni fogunk.

Elvégeztük a de- és remyelinisált corpus callosumban a 3 miRNS in situ hybridizációját, ennek értékelése jelenleg zajlik.

Egy PhD hallgató jelenlegi munkája a funkcionális kísérletek elvégzése (silencing): arra a miRNS-re koncentrálnak elsősorban, melynek funkciója eddig nem ismert, és a fejlődés során a postnatalis corpus callosumban is differenciált expresszióját észleltük. A csendesítést első lépésben oligodendrocyta sejtvonalon végezzük.

Szintén zajlik az CPZ, EAE és humán agyi plakkok génexpressziós array eredményeinek összehasonlítása külföldi kollaborációban, melynek célja olyan degeneratív és gyulladós biomarkerek azonosítása, melyeket az SM hosszú távú prognózis becslésében alkalmaznánk.

Valamennyi publikációban, mely az OTKA kísérleteken alapul, az OTKA támogatást feltüntetjük.