

MikroRNA:n muutokset Alzheimerin taudissa

Janne Huttunen
Syventävien opintojen kirjallinen työ
Lääketieteen koulutusohjelma
Itä-Suomen yliopisto
Terveystieteiden tiedekunta
A.I.Virtanen -Instituutti
Syyskuu 2020

TIIVISTELMÄ

TIIVISTELMÄ ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen laitos

Lääketieteen koulutusohjelma HUTTUNEN, JANNE: MikroRNA:n muutokset Alzheimerin taudissa

Opinnäytetutkielma, 40 sivua,

Tutkielman ohjaajat: Postdoctoral Research Associate Sanna Loppi, Molekulaarisen neurobiologian professori Tarja Malm.

Syyskuu 2020

Alzheimerin tauti on globaalisti suurin dementian aiheuttaja, joka on taustalla noin 50-70 % kaikista dementiatapauksista. Alzheimerin taudille tyypillisiä piirteitä ovat ekstrasellulaaritilaan muodostuvat A β -plakit, fosforyloitunut tau ja neuroinflammaatio. Taudin patologiassa on tyypillistä myös keskushermoston immuunipuolustuksesta vastaavien mikroglia-solujen kertyminen plakkien ympärille. Mikroglia-solut eivät kuitenkaan kykene tehokkaasti poistamaan tätä ylimääräistä plakkia. Lisäksi näiden solujen tuottamat sytokiinit saavat aikaan neuroinflammaatiota, joka pahentaa hermosolujen vaurioita ja heikentää niiden fysiologista toimintaa.

MikroRNA, eli miRNA, on nimitys RNA-juosteille, jotka vaikuttavat solun geenien ilmentymiseen transkription jälkeen. Tämän ne tekevät estämällä geenien ilmentymistä erilaisten inhiboivien mekanismien kautta.

Tässä opinnäytetyössä tutkittiin mikroglia-solujen tuottamien miRNA- molekyylien pitoisuuksien muutoksia, ja missä solutyypeissä ne tutkimuksessa käytettyjen hiirimallien aivokudoksessa ilmentyvät.

Avainsanat: MikroRNA, Alzheimerin tauti, mikroglia, neuroinflammaatio

ABSTRACT

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND, Faculty of Health Sciences
School of Medicine

Huttunen, Janne: MicroRNA changes in Alzheimer's Disease

Thesis, 40 Pages.

Tutors: Postdoctoral Research Associate Sanna Loppi, Professor in Molecular Neurobiology Tarja Malm

September 2020

IN ENGLISH:

Alzheimer's disease is the biggest cause of dementia globally. It causes 50-70 % of all dementia cases. Extracellular amyloid beta plaques and neuroinflammation are characteristic for Alzheimer's disease. One typical feature is gathering of microglia immune cells around the plaques. Microglia are not able to effectively dispose this excessive plaque. Also cytokines released by microglia cause neuroinflammation which aggravate damage to neurons and impair their physiological activity.

MicroRNA, or miRNA, is RNA strand which impacts gene expression after transcription. They do this gene silencing by different kinds of inhibiting mechanisms.

In this thesis we investigated specific miRNA concentrations and their changes in different cell types. We also studied where these miRNAs are expressed in specific mouse models brain tissues.

Keywords: MicroRNA, Alzheimer's Disease, microglia, neuroinflammation.

Sisällys

1 JOHDANTO	5
2 MITÄ MIKRORNA ON?	7
2.1 Kuinka miRNA:t säätelevät geenien ilmentymistä?	8
3 ALZHEIMERIN TAUTI	9
3.1 Epidemiologia	9
3.2 Etiologia ja patogeneesi	10
3.3 Oireilu ja ennuste	12
4 MIKROGLIA	13
4.1 Mikroglia ja Alzheimerin tauti	14
5 TUTKIELMAN TARKOITUS	17
6 KOKEELLINEN OSUUS	18
7 TULOKSET	26
7.1 miRNA 466C-5p ilmentyminen	26
7.2 miRNA 669C-3p ilmentyminen	29
8 POHDINTA	32
9 LÄHTEET	34

1 JOHDANTO

Alzheimerin taudille tyypillisiä piirteitä ovat ekstrasellulaaritilaan muodostuvat A β - plakit, fosforyloitunut tau ja neuroinflammaatio. Taudin patologiassa on tyypillistä myös keskushermoston mikroglia- immuunisolujen kertyminen plakkien ympärille. (Scheltens et al. 2016; Malm, Jay ja Landreth 2015)

Mikroglia tarkkailevat aivojen parenkyymiä prosesseillaan, joita ne jatkuvasti laajentavat ja supistavat. Ne ovat samalla yhteydessä naapurisoluihin, kuten astrosyytteihin ja neuroneihin, mahdollistaen esimerkiksi neuronien synapsien toiminnan tarkkailun (Nimmerjahn et al. 2005). Tämän synaptisen toiminnan on havaittu olevan tärkeässä roolissa komplementtivälitteisessä synapsien karsinnassa, joka liittyy sekä kehitykseen että oppimiseen (Ransohoff et al. 2011). Jatkuva tarkkailu mahdollistaa myös mikroglion nopean vasteen erilaisille vaurioille. Mikroglia vaeltavat vauriopaikalle ja aloittavat kudosten korjauksen, kuten kuolleiden solujen ja muun jätteen fagosytoinnin. (Malm, Jay ja Landreth 2015)

Alzheimerin taudin kannalta mikroglion merkitys on niiden kykenemättömyydessä poistaa syntyviä beta-amyloidi plakkeja ja toisaalta näiden plakkien indusoimassa mikroglion muuttumisessa proinflammatorisempaan fenotyyppiin. (Ferrera et al. 2014) Mikroglion tapahtuu tällöin morfologisia muutoksia, kuten sooman kasvamista ja prosessien paksuuntumista. Lisäksi solut lisäävät inflammatoristen välittäjäaineiden tuotantoa ja niiden solukalvon reseptorien ilmentymisessä tapahtuu muutoksia. (Malm, Jay ja Landreth 2015)

Alzheimerin tautiin sairastuneilla potilailla on havaittu myös inflammatoristen sytokiiniinien pitoisuuksien kasvua. On myös esitetty väitteitä, että neuronien kuoleman taustalla olisivat mikroglia- välitteiset sytokiinit. (Liao et al. 2004) Joka tapauksessa liiallinen inflammatoristen välittäjäaineiden tuotanto nostaa beta-amyloidi tasoja sekä lisäämällä amyloidi -prekursori proteiinin tuotantoa että vähentämällä beta-amyloidia hajottavien entsyymien pitoisuuksia. (Malm, Jay ja Landreth 2015)

Mikroglia-solut eivät pysty poistamaan beta-amyloidia tehokkaasti aivoista, mikä johtaa kehittyvään ekstrasellulaariseen akkumulaatioon. On vielä epäselvää, miksi mikroglia ei kykene poistamaan tätä kasautuvaa toksista plakkia pois aivoista. (Malm, Jay ja Landreth 2015)

Mikroglia-aktivoitumisen kaksi pääfenotyyppiä on klassisesti aktivoitunut (M1) ja vaihtoehtoisesti aktivoitunut (M2). M1- mikroglia erittävät useita erilaisia proinflammatorisia sytokiineja, kuten

TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, typpioksidia ja prostaglandiineja. Kuitenkin niiden fagosytoosikyky toimii verraten huonosti. M2- mikroglia taas on päinvastainen fenotyyppi, erittäen anti-inflammatorisia sytokiinejä, kuten IL-4, IL-10, IL-13 ja TGF β , tämän lisäksi ne ovat hyvin potentteja fagosyyttejä. On kuitenkin syytä huomata tämän jaon olevan yksinkertaistus, sillä fenotyypierittely on tehty tutkimuksissa perifeerisillä makrofageilla. (Malm, Jay ja Landreth 2015) Nykyisin ajatellaan mikroglion M1/M2 polarisaation olevan pikemminkin jatkumo, jossa toisessa päässä ovat M1 - proinflammatoriset ja toisessa taas anti-inflammatoriset M2-mikroglia. Näiden välille mahtuu myös molempia fenotyyppisiä ilmentäviä soluja. (Franco ja Fernandez-Suarez 2015) Mikroglion fagosytoosikykyä ja inflammatorista aktiivisuutta pystytään vaihtamaan erilaisilla stimulaatioilla. Yksi tällainen on heterodimeeristen tyypin II tumareseptorien aktivaatio, erityisesti PPAR γ :RXR (peroxisome proliferator activated receptor: Retinoid X receptor), PPAR δ :RXR ja LXR:RXR (Liver X Receptor) reseptoriaktivaatioiden kautta. (Savage et al. 2015)

2 MITÄ MIKRORNA ON?

MikroRNA:ksi (MiRNA) sanotaan RNA-juosteita, jotka ovat karkeasti 22-nukleotidin kokoisia ja joita ei itsessään lueta translaatiossa proteiineiksi, vaan ne vaikuttavat geenien ilmentymiseen transkription jälkeen. MiRNA:n biogeneesiin sisältyy monta eri vaihetta ja useita eri entsyymejä. Primääri miRNA (pri-MiRNA) valmistetaan eli transkriptoidaan kyseisen miRNA:n informaation sisältämän geenin intergeeniseltä tai introgeeniselta alueelta. Tämä tapahtuu joko RNA polymeeraasi II:n tai III:n avustamana. Tämä transkriptoitu pri-miRNA pilkotaan tumassa RNAasi III- proteiineihin kuuluvan endoribonukleaasi Droshan toimesta. Pri-miRNA:sta tulee tällöin noin 70-nukleotidin kokoinen hiuspinni -lenkin sisältävä prekursori -miRNA (pre-miRNA). Tämä pre-miRNA siirretään tumasta sytoplasmaan exportin5-Ran-GTP- kompleksin avustamana ja muokataan sitten RNAasi III- proteiineihin kuuluvan Dicer:n kautta noin 22 emäsparia sisältäväksi MiRNA/MiRNA dupleksiksi. Yleensä tästä MiRNA/MiRNA- dupleksista ohjaava MiRNA- juoste, eli se, jolla pienempi termodynaaminen vakaus, tulee selektiivisesti upotetuksi argonautti- proteiiniin (AGO). Tällöin muodostuu miRNA-induced silencing protein complex (miRISC), jonka kolmantena osana toimii GW182 (182 KDa:n glysiini-tryptofaani –proteiini). Syntynyt miRISC sitoutuu kohteena olevaan mRNA:han (Lähetti-RNA) epätäydellisellä emäspariutumisella, jolloin pre-miRNA:n matkustaja-juoste hajoaa. (Cao, Li ja Chan 2016)

Jos kohde mRNA:ta ei ole ollenkaan ilmentynyt tai sitä on hyvin vähän, ylimääräiset miRNA:t irtoavat miRISC:stä ja hajoavat. MiRNA:n pitoisuus siis säätyy sekä niiden biogeneesin, että hajoamisen nopeuden kautta. Huomattava on myös valmiin miRNA:n ilmentymisen vaihtelun solujen elämän eri vaiheissa olevan varsin harvinaista, sillä pitoisuuden vaihteluja ei tapahdu pri-miRNA:lla eikä pre-miRNA:lla. Neuroneilla valmiin miRNA:n hajoamisen on huomattu olevan vaihtelevampaa kuin muilla solutyypeillä. MiRNA:n nopea hajoaminen erilaisille fysiologisille ärsykkeille, kuten valaistuksen muutoksille ja synaptisille ärsykkeille, voi antaa viitteitä MiRNA-metabolian osallistumisesta neuronien toimintaan ja plastisuuteen. (Cao, Li, and Chan 2016)

2.1 Kuinka miRNA:t säätelevät geenien ilmentymistä?

MiRNA:jen on havaittu säätelevän ainakin osittain kantasolujen erilaistumisen aikaista geenien ilmentymistä. Yleisesti ajatellaan yksittäisen miRNA:n kykenevän sitoutumaan jopa tuhansiin eri mRNA:hin, kunhan vain miRNA:n 5'-pää ja mRNA:n transloitumaton 3'-pään sekvenssit ovat toisiinsa nähden komplementaarisia. MiRNA:n tiedetään säätelevän geenien ilmentymistä inhiboimalla sitä kolmella tapaa: 1.) indusoimalla mRNA:n deadenylaatiota. 2.) indusoimalla mRNA:n hajoamista ja 3.) indusoimalla translaation repressiota. Kun miRNA on ohjannut miRSIC:n kohteena olevan mRNA:n luo, AGO pilkkoo mRNA:n, mikäli emäspariutuminen on täydellinen. Mikäli emäspariutuminen jää epätäydelliseksi, tapahtuu deadenyyloituminen ja dekapitaatio, jossa mRNA:n poly(A) -häntä häviää ja 5'-pää hatutetaan. Tämä mRNA lopulta hajotetaan joko eksonukleaasien tai endonukleaasien toimesta. (Cao, Li, ja Chan 2016)

Vaihtoehtoisesti miRNA:t voivat estää translaation tapahtumista AGO:n ja translaation initiaattoreiden vuorovaikuttaessa toistensa kanssa. Lisäksi proteiini GW182 (182 kDa:n glysiini-tryptofaani -proteiini) on havaittu olevan mukana miRSIC:ssä, vuorovaikuttaen PABP (poly(A)-binding protein) kanssa. Tällöin rekrytoituu useita avustavia proteiineja, jotka yhdessä inhiboivat translaation käynnistymistä. Esimerkiksi miRSIC:n sitoutuessa mRNA:aan, se estää mRNA:n translaatiolle tärkeän eIF4F -kompleksin ja 43SPIC:n (43S Pre-initiation complex) muodostumisen, jolloin mRNA:n translaatio estyy. Jos PABP:a ei ole, miRSIC toteuttaa translationaalisen aktivoitumisen toiminnon, jolloin GW182 ei vuorovaikuta AGO2:n kanssa ja antaa FXR1 -proteiinin (Fragile X mental retardation protein 1) muodostaa microRNP (Micro-ribonucleoprotein) kompleksin käyttäen sen translationaalista aktivaatiota. MiRSIC:n on näytetty myös estävän mRNA:n translaatiota tehostamalla P-bodien toimintaa. Nämä P-bodyt eristävät kohteena oleva mRNA:n translaatiokäsittelystä ja joko tuhoavat tai säilyttävät myöhempää käsittelyä varten. (Cao, Li, ja Chan 2016)

Edellä esitelty tapa miRNA:n vaikutuksesta on tiedetty jo verraten pitkään ja osoitettukin, mutta se ei näyttäisi olevan ainoa vaikutusmekanismi, sillä myös erilaisia sääntelymekanismeja miRNA:lle on löydetty. Edellisessä kappaleessa kerroin mRNA:ssa sitoutumiskohteena miRSIC:lle olevan 3' UTR-pää. Mahdollista on myös miRSIC:n sitoutuminen 5'UTR-päähän, promoottorialueelle, sekä koodaavalle sekvenssille. (Cao, Li ja Chan 2016)

Tavanomainen miRNA:jen vaikutustapa geenien ilmentymiseen näyttäisi olevan inhibitorinen, mutta MiRNA:lla näyttäisi olevan myös päinvastainen vaikutus, eli niillä näyttäisi olevan osansa myös translaation aktivoinnissa. (Cao, Li ja Chan 2016)

3 ALZHEIMERIN TAUTI

Alzheimerin taudin kuvasi ensimmäistä kertaa neuropatologi Alois Alzheimer, hänen kuvatessaan aivokudoksessa havaitsemansa histopatologiset muutokset vuonna 1906. (Lage 2006.) Nykyisin Alzheimerin tauti on tavallisin etenevä muistisairaus, joka aiheuttaa noin 60 % kaikista dementiatapauksista. Muita yleisimpiä muistisairauksia ovat Lewyn kappale-tauti, vaskulaarinen enkefalopatia, frontotemporaalinen degeneraatio, alkoholidementia ja Wernicken oireyhtymä. (Duodecim Muistisairaudet 2015) Alzheimerin tauti on yleisin muistisairaus käsittäen 50-70 % maailmanlaajuisista tapauksista. Sairauden yleisimpänä ensioireena on vaikeus muistaa äskettäisiä tapahtumia. Taudin kehittyessä oireina voi olla disorientaatiota, mielialanvaihtelua, sekavuutta, vakavampia muistihäiriöitä, käyttäytymisen muutoksia, vaikeuksia puheessa ja nieltäessä, ja ongelmia kävelemisessä. Sairauden edetessä potilaan kognitiivinen toiminta heikkenee, täten vaikeuttaen päivittäistä selviytymistä niin itsenäisesti, kuin sosiaalisessa ympäristössäkin. Alzheimerin taudin maailmanlaajuisten kustannusten arveltiin olevan vuonna 2015 noin 818 miljardia Yhdysvaltain dollaria. Tautiin ei tällä hetkellä ole taudinkulkua palauttavaa, tai estävää hoitoa. (Winblad et al. 2016)

3.1 Epidemiologia

Alzheimerin taudin esiintyvyys kasvaa nopeasti ihmisen vanhetessa, ja se on myös suurin riskitekijä Alzheimerin taudille. (Winblad et al. 2016) On arvioitu, että vuonna 2015 dementiaa sairasti noin 46.8 miljoonaa ihmistä, ja määrän ennustetaan nousevan 74.7 miljoonaan vuoteen 2030, ja vuonna 2050 dementiaa sairastavia arvioidaan olevan jo 131.5 miljoonaa, jolloin määrällisesti suurin lisäys tapahtuu pieni- ja keskituloisissa maissa. (Prince M. et al. 2016) Alzheimerin tauti on nykyisin globaalisti dementian pääasiallinen aiheuttaja käsittäen noin 50-70 % kaikista dementiatapauksista. (Winblad et al. 2016.)

Kahdella prosentilla 65- vuotiaista on Alzheimerin tauti, mutta tautia sairastaa yli 85 -vuotiaista jo 25 %. Vuonna 2010 Alzheimer potilaita oli Suomessa noin 55 000. (Duodecim Geriatria 2016)

3.2 Etiologia ja patogeneesi

Alzheimerin taudissa tyypillisiä neuropatologia löydöksiä ovat poikkeavasti laskostuneen beta-amyloidin ja tau -proteiinin kertyminen amyloidiplakkeihin ja neurofibrillimuutoksiin. (Scheltens et al. 2016)

Vuosikymmeniä vallalla olleen perinteisen amyloidikaskadi -hypoteesin mukaan neurodegeneraation aiheuttajana on näiden proteiinien kertymisen jälkeen erityisesti beta-amyloidin kertyminen. Se käynnistää tapahtumaketjun, joka aiheuttaa muutoksia neurosäievytyhtien muodossa, yleisessä synaptotoksisuudessa, mitokondrioiden toiminnassa ja neuroinflammaation synnyssä johtuen tilanteeseen nähden poikkeavasta mikrogliojen sekä astroosyyttien aktivaatiosta. (De Stoojer ja Karran 2016) Beta-amyloidi itsessään muodostuu amyloidin esiaste proteiinista (amyloid precursor protein (APP)) Beta- ja gamma -sekretaasien proteolyysin seurauksena. (Zhang et al. 2011) APP:n fysiologista merkitystä ei vielä tiedetä, mutta sillä vaikuttaisi olevan merkitystä kalsiumin metaboliassa, aksonaalisisessa proteiinien kuljetuksessa, transmembraani -signaalin transduktiossa sekä neuronien aksonien ja dendriittien kasvussa. Beta-amyloidin vähentämisen on ajateltu mahdollisesti hidastavan tai jopa pysäyttävän taudinkulun siihen ajoissa puuttuttaessa, mutta toistaiseksi kokeet beta-amyloidin pysäyttämiseksi eivät ole onnistuneet. Täten katset ovat kääntyneet myös muihin patogeneesin mekanismeihin, kuten synapsien toimimattomuuteen, Taun hyperfosforylaatioon ja aggregaatioon, sekä neuroinflammaatioon. (Marttinen et al. 2018)

Hermosolujen synapsien epäillään nykytietämyksen mukaan olevan ensimmäisiä kohteita, joissa Alzheimerin taudille tyypillinen patologia näkyy. Alentuneen synaptisen aktiivisuuden on huomattu parhaiten korreloivan kognition heikentymisen kanssa Alzheimerin taudissa (Coleman ja Yao 2003). Kuitenkin beta-amyloidin ajatellaan sopivina pitoisuuksina olevan välttämätöntä presynaptiselle säätelylle (Abramov et al. 2009). Synapsien aktiivisuudella näyttäisi olevan vaikutusta beta-amyloidin pitoisuuksiin. Synapsien lisääntyneen aktiivisuuden epäillään lisäävän APP:n endosytoosia, mikä mahdollistaa beta-amyloidin kasvaneen tuotannon samalla lisäten beta-amyloidin eritystä (Cirrito et al. 2008). Tämän pienen beta-amyloidi pitoisuuden kasvun on huomattu lisäävän synaptisten vesikkelien kierrätystä, joka todennäköisimmin johtuu alfa7-nikotiiniasetyylikoliini-reseptorin aktivaatiosta (Lazarevic et al. 2017).

Beta-amyloidin aikaansaama eksitotoksisuus näyttäisi johtuvan poikkeavasta N-Metyyli-D-Aspartaatti -reseptorien (NMDAR) stimulaatiosta (Li et al. 2011). Synapsiraon liiallinen glutamaattipitoisuus voi totuttaa NMDAR:t, mikä estää riittävän Ca²⁺-ionien sisäänvirtauksen ja Long-term potentiation (LTP) -ilmiön induktion. (Shankar et al. 2007) Liialliset glutamaatti-

pitoisuudet voivat saada aikaan NMDAR:n ylistimulaation, joka johtaa redox- reaktioiden säätelemien reaktioiden poikkeavaan aktivaatioon, kuten Ca²⁺-ionien homeostaasista poikkeavaan tilaan (Hardingham ja Bading 2010). NMDAR:n ylistimulaation merkitystä Alzheimerin taudissa tukevat tutkimukset, joissa osittaisilla NMDAR antagonisteilla estettäessä NMDAR:n ylistimulaatio, huomattiin neurodegeneraation eläinmalleissa lievenevän (Rönicke et al. 2011). Juuri tämän osittaisen NMDAR-antagonismin epäillään olevan lääkeaine memantiinin kliinisten tulosten yksi syy (Danysz et al. 2000).

Tau- proteiini normaaliolosuhteissa translokoidaan dendriittistä postsynaptisiin alueisiin synapsien aktivaatiossa. Samanaikaisesti Fyn kinaasi fosforyloi postsynaptisessa osassa NMDAR:n. Tämä johtaa post-synaptic density protein 95:n (PSD-95:n) ja NMDAR:n vuorovaikutukseen ja siten NMDAR:n stabilisaatioon. Tämä NMDAR:n stabilisaatio vaikuttaisi olevan välttämätön LTP:hen liittyvään synaptiseen potentoitumiseen. Beta-amyloidi pitoisuuden kasvu lisää taun, Fyn ja PSD-95 esiintymistä postsynaptisissa osissa, riippumatta synaptisesta aktivaatiosta. Päinvastoin kasvanut beta-amyloidi pitoisuus taas heikentää Taun, Fyn ja PSD-95:n translokaatiota synaptisen aktivaation aikana, ja voi mahdollisesti häiritä LTP- riippuvaista synaptista potentiaatiota. (Franses et al. 2014)

Tau/Fyn/PSD-95/NMDAR- kompleksi näyttäisi välittävän beta-amyloidiin liittyvää eksitotoksisuutta (Ittner et al.2010). Oligomeerisen beta-amyloidin lisääntymisen on osoitettu vähentävän taun tretoniini 205 (T205) fosforylaatiota, joka on -kompleksin stabiliteetin tärkein fosforylointikohde. Normaalisissa synapsien aktivaatiossa post-synaptisesti sijoittunut tau fosforyloituu tretoniini 205:een P38γ vaikutuksesta, erottaen PSD-95/Tau/Fyn/NMDAR -kompleksin. Kun taas beta-amyloidia on runsaasti, tuo P38γ välitteinen taun fosforylaatio vähenee suuresti. (Ittner et al. 2016) Beta-amyloidi voi olla välttämätön synapsien tiedonvälitykselle, mutta sen liiallisen kertymisen aikaansaamat muutokset NMDAR:n aktivaatiossa ja dendriittien Tau-proteiinin translokaatiossa ja fosforylaatiossa johtavat lopulta LTP/LTD induktion säätelyn vääristyneeseen toimintaan. (Martinen et al. 2018)

3.3 Oireilu ja ennuste

Tutkimusten mukaan odotettavissa oleva elinikä 65- ikävuoden jälkeen diagnosoidulla taudilla on 3-9 vuotta. Kuitenkin osa sairastuneista elää tätäkin pidempiä aikoja, jopa 20 vuotta sairastumisestaan. WHO:n mukaan taudin kehittyminen voidaan jakaa kevyeen vaiheeseen (unohtelu, joitakin kielellisiä ongelmia, ja mielialanvaihteluita), keskivaikeaan (vaikea unohtelu, lisääntyneitä ongelmia puheentuotossa ja avuntarve arkipäivän selviytymisessä) ja vaikeaan (vakavia muistiongelmia, ja täydellinen tai lähes täydellinen riippuvaisuus huolenpidosta). Kungsholmen- projektista saatujen tulosten mukaan hyvin lievien oireiden vaihe kesti muutaman kuukauden, lievien oireiden 2 vuotta, keskivaikeat oireet 1-2 vuotta ja vaikeat oireet noin vuoden ajan. Naiset näyttäsivät elävän diagnoosin jälkeen pidempään kuin miehet, heidän vaikean vaiheen elinaikansa ollessa pidempi kuin miehillä. (Winblad et al.2016)

On myös syytä huomata, ettei Alzheimerin tauti ja dementia ole vääjäämätön lopputulos vanhenemisen seurauksena. Yhdysvaltalaisessa 90+ -tutkimuksessa, jossa tutkittiin yli 90- vuotiaiden aivoja, huomattiin että lähes puolella dementiapotilaista neuropatologiset muutokset aivoissa olivat niin vähäisiä, ettei niillä voi selittää kognitiivisia oireita. Lisäksi kolmasosalla 90 vuotiaista havaittiin keskimääräistä enemmän Alzheimerin taudille tyypillisiä patologisia oireita ilman vaikutusta kognitiivisiin kykyihin. Samaisessa tutkimuksessa huomattiin Alzheimerin tautiin sopivan patologian olevan vähemmän yhteydessä varsinaiseen Alzheimerin tautiin, mitä vanhempana Alzheimerin taudille tyypillistä neuropatologiaa ilmeni. (Winblad et al. 2016.)

4 MIKROGLIA

Mikroglia solut ovat keskushermoston paikallisia makrofageja ja ne pitävät yllä hermokudoksen homeostaasia. Mikroglia soluja on keskushermoston soluista vain yksi kahdeskymmenesosa, mutta niillä on silti merkittävä rooli hermokudoksen tukemis-, puolustus- ja muokkaustehtävissä. (Grubman et al. 2016) Mikroglia solut ovat peräisin ruskuaispussin myeloidisesta solulinjasta. Muut aivojen solut ovat peräisin hermoston kantasoluista. (Grubman et al. 2016) Kehittyviin aivoihin ne kulkeutuvat leptomeningeaalaisesti ja lateraaliventrikkeliä kautta. Tämä siirtyminen tapahtuu ennen keskushermoston muiden solujen erilaistumista. Mikroglia solut viettävät koko elinaikansa aivojen alueella rajautuneena veriaivoesteen taakse ja ne uusiutuvat jakautumalla. (Grubman et al. 2016)

Aivojen mikroympäristö vaikuttaa suuresti mikroglia kypsymiseen, fenotyyppiin ja toimintoihin. Tiettyjen molekyylien tiedetään vaikuttavan mikroglia tulevaan fenotyyppiin ja sitä kautta toimintoihin. Näitä ovat mm. CSF-1R (Colony Stimulating factor 1 receptor) ja TGF β (Transforming growth factor β). (Grubman et al. 2016) TGF β :n on havaittu olevan välttämätön mikroglia fenotyypin esiasteiden muutoksille. (Gosselin et al. 2014)

Terveissä aivoissa mikroglia solut ovat liikkeellä jatkuvasti etsien ympäristöstään merkkejä hajoamistuotteista, vaurioista tai synaptisesta toiminnasta. Solujen pinnalla on lukuisia molekyyliä, joiden avulla ne vastaavat nopeasti ympäristössä tapahtuviin muutoksiin. Immuunisoluina ne eivät kuitenkaan pelkästään ole aktiivisia infektioissa ja kudonsvaurioissa, jotka ne aistivat sytokiiniin avulla, vaan ovat lisäksi myös osallisia verisuonten muodostumisessa ja ylläpidossa, sekä kuona-aineiden, kuten myös vaurioituneiden, kuolevien tai liiallisten solujen fagosytoinnissa. (Grubman et al. 2016)

Mikroglia soluilla on keskeinen rooli neurogenesissä, synapsien kehittämisessä, kypsymisessä, aktiivisuudessa ja synapsien liittämisessä. Kehittyvässä keskushermostossa mikroglia kontrollivat hermoston tiheyttä ja avaruudellista kuviointia, myelinaatiota ja hermoverkkojen muodostumista ja kokemuksesta riippuvaista uudelleenmuokkautumista. (Grubman et al. 2016) Synapseja muodostuu ylimäärin yksilön kehityksen aikana ja Mikroglia fagosytoivat pois turhat synapsit (Grubman et al. 2016). Jos tämä toiminta on heikentynyt, on eri tutkimuksissa havaittu merkkejä heikosta synapsien transmissiosta ja alentuneesta toimivien aivojen verkottuneisuudesta, kuin myös puutoksia sosiaalisessa kanssakäymisessä (Zhan et al. 2014.) Mikrogliaojen synapsien kappaleiden fagosytointi jatkuu koko ihmisen ajan ja mikroglia ovatkin suorassa dynaamisessa kontaktissa synapseihin.

(Wake et al. 2009; Tremblay et al. 2010) Korkeasta neuronien aktiivisuudesta vapautuvalla ATP:llä vaikuttaisi olevan suurin vaikutus mikroglial solujalkojen ympäristön tunnustelun lisääntymiseen. Näiden lisäksi terveellä yksilöllä mikroglia vaikuttavat säätelevän pitkäkestoista neuronien potentiaatiota ja basaalista neurotransmissiota. Aktiivisuudesta riippuvaista synapsien voimakkuuden muokkausta mikroglia näyttäisivät säätelevän kemokiinireseptori CX3CR1:n, sekä BDNF signaaloinnin kautta. (Grubman et al. 2016)

Mikroglia solujen ylläpitämään homeostaasiin näyttäisi vaikuttavan myös elimistön oma mikrobiomi. Hiirillä, jotka elivät steriileissä olosuhteissa, oli tiheämmin mikroglia -soluja, ja ne olivat kehittymättömpiä. Tämä viittaisi myös periferian signaalien vaikuttavan mikroglial kypsymiseen. (Erny et al. 2015)

Mikroglia soluilta on tunnistettu geenejä, joiden tiedetään vaikuttavan Alzheimerin taudin kehittymisen riskiin. Näistä tunnetuimmat ovat apolipoproteiini E4 (APOE4) ja Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2 (TREM2). Apolipoproteiinista tunnetaan kolme eri alleelia; E2, E3 ja E4. APOE4:n kantajilla on havaittu suurempi riski Alzheimerin tautiin, sekä taudin puhkeamisen aikaistumiseen. E2- alleelin on taas havaittu pienentävän riskiä sairastumiseen. TREM2 on myös liitetty vahvasti Alzheimerin tautiin. TREM2 geenin koodaama transmembraaniproteiini edistää solun fagosytoosia. Sen yleisin geenimuunnos (R47H) vaimentaa TREM2 toimintaa, ja sen on havaittu korreloivan taudin hankaluuden kanssa. APP23- mallin hiirillä TREM2 ilmentyminen kasvoi beta-amyloidi plakkien ympärillä olleissa myeloidisissa soluissa, ja In Vitro -tutkimuksessa lisäsi beta-amyloidin puhdistumista. (Mhatre et al. 2015)

4.1 Mikroglia ja Alzheimerin tauti

Alzheimerin taudille tyypillisen neuroinflammaation tärkein aiheuttaja ovat mikroglia solut, jotka ovat painottuneet proinflammatoriseen M1- fenotyyppiin. Beta-amyloidi -oligomeerit ja -säikeet kykenevät mikroglial reseptorien kautta virittämään mikroglia solut tuottamaan inflammatorisia sytokiinejä ja kemokiinejä, kuten interleukiini-1, interleukiini-6, tuumorinekroositekijä alfa (TNF-alfa), C1q, jne. Lisäksi ne tekevät mikroglia soluista herkempiä sekundaarisille ärsykkeille, mikä myös nostaa mikroglia solujen aktiivisuutta. (Heppner et al. 2015) Beta-amyloidin kertyminen johtaa lopulta mikroglia solujen krooniseen aktivaatioon, joka edesauttaa inflammatoristen sytokiinien ja kemokiinien tuotantoa, joka taas lisää edelleen virittyneiden mikroglia solujen aktiivisuutta (Stewart et al. 2010).

Mikroglial vapauttamat ASC -hiukkaset (Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (Caspase activation and recruitment domain)) kiihdyttävät beta-amyloidin aggregaatiota ja leviämistä, sekä näyttäisivät ylläpitävän toiminnassa olevaa immunologista reaktiota aktivoimalla ympäröiviä immuunipuolustuksen soluja. (Venegas et al. 2017)

Komplementtijärjestelmän proteiini C1q:n pitoisuuden on osoitettu nousevan jopa 80 -kertaiseksi Alzheimerin tautia sairastavien potilaiden aivoissa ja aktivoivan komplementtikaskadin beta-amyloidi -oligomeerien vaikutuksesta. (Kolev et al. 2009) Alzheimerin taudin hiirimalleilla komplementtijärjestelmä käynnistyy joko klassista-, lektiini- tai vaihtoehtoista reittiä pitkin, mikä aiheuttaa C3 jakautumisen, mikrogliaosolulle spesifisen synapsien peittymisen, mikroglial inflammatorisen signaloinnin aktivoitumisen ja synapsien tuhoutumisen C5b-C9 membraanihyökkäys -kompleksin (membrane attack complex) kautta. (Hong et al. 2016) Tämä johtaa mikroglia välitteiseen synapsien tuhoutumiseen, mikä lisää neurodegeneraatiota. Iäkkäillä beta-amyloidi transgeenisillä APP/PS1 hiirillä C3- osan poistaminen suojasi neurodegeneraatiolta (Shi et al. 2017). Lisäksi Britschgi ja kumppanit havaitsivat ikääntyneillä P301L tau -transgeenisillä hiirillä tehdyssä tutkimuksessaan CD59- proteiinin poistamisen lisäävän taun patologiaa. CD59- proteiini inhiboi C5b-C9 membraanihyökkäys -kompleksia. (Britschgi et al. 2012)

Mikroglial lisäksi myös astrozyttien ajatellaan aiheuttavan negatiivisia vaikutuksia beta-amyloidin puhdistukseen ja synaptisiin toimintoihin. Astrozytit mm. muuttavat neurotransmitterien ekstrasellulaarisia pitoisuuksia sisäänotollaan ja kierrättävät glutamaattia Na⁺- riippuvaisten glutamaatti- transportterien kautta. (Andersson ja Swanson 2000) Astrozyttien on havaittu atrofioituvan beta-amyloidien akkumuloituessa, johtuen puutteelliseen glutamanergiseen akkumulaatioon, joka taas voi johtaa eNMDAR ylistimulaatioon. (Olabarria et al. 2010) Lisäksi astrozytit osallistuvat beta-amyloidin proteolyttiseen poistamiseen (Medeiros ja Laferla 2013). Astrozyttien aktivoituessaan vapauttama APOE näyttäisi olevan välttämätöntä mikrogliaosolujen kyvyille poistaa säikeistä beta-amyloidia. (Terwel et al. 2011) Lisäksi altistuminen itse beta-amyloidille näyttäisi lisäävän astrozyttien beta-amyloidia hajottavien entsyymien tuotantoa. (Heppner et al. 2011) Toisaalta Alzheimerin taudin hiirimalleilla astrozyttien aktivoinnin inhiboinnin havaittiin parantaneen Alzheimerin tautiin liittyvää patologiaa. (Furman et al. 2012) Tämä ristiriitaisuus saattaa selittyä astrozyttien kahdella eri fenotyypillä, jotka määritellään reaktiivisuutensa mukaan reaktiivisuutensa mukaan joko A1- tai A2- astrozytteiksi. (Clarke et al. 2018). Mikroglial vapauttamat sytokiinit, kuten IL-1 α , TNF- α , C1q, indusoivat A1 astrozyttejä, joilta puuttuu normaaleilla astrozyteilla olevia toimintoja, kuten neuronien selviytymisen edistäminen, neuronien kasvu, synaptogeneesi ja fagosytoosi (Marttinen et al. 2018). A1 -astrozytit

aikaansaavat neuronien ja oligodendrosyyttien kuolemia. Näiden astrosyyttien lisääntyneitä määriä on kuvattu Alzheimerin taudissa, Huntingtonin taudissa, Parkinsonin taudissa, ALS:ssa, sekä MS-taudissa. A2 -astrosyytit taas on tutkimuksissa liitetty kasvaneisiin neurotrofisiin tekijöihin, mikä puoltaisi A2- astrosyyttien hermostoa suojelevaa roolia. (Liddel et al. 2017)

TREM2 -signaloivilla mikrogliailla erilaiset säätelykohtien mekanismit, kuten irrottautuminen verenkierrasta, liukoiset pidättäytymistekijät, solujen väliset vuorovaikutukset ja transkriptionaaliset säätelytekijät hillitsevät mikrogliaisolujen immuunivasteen aktiivisuutta niiden eliniän ajan, siten lisäten mikrogliaisolujen homeostaattista roolia keskushermostossa. (Deczkowska et al. 2018) Nämä säätelykohdat saattavat myös olla haitallisia rajoittaessaan mikrogliaisolujen toimintaa keskushermoston suojelussa silloin, kun voimakasta immuunivastetta tarvittaisiin (Marttinen et al. 2018). Keren-shaul ja kumppanit löysivät 2017 julkaistussa tutkimuksessaan uuden mikrogliaityypin; disease-associated microglia (DAM). DAM:aa säädellään kaksivaiheisen aktivaatiomekanismin kautta. Ensin TREM2 riippumattomassa vaiheessa tiettyjen geenien, kuten APOE ja DAP12/TYROBP, ilmentyminen kasvoi. Kuitenkin samanaikaisesti homeostaattisten mikroglia merkkiaineiden, kuten CX3CR1 ja P2RY12, ilmentyminen väheni. Toisessa vaiheessa TREM2-tilasta riippuvaiset LPL, CST7 ja CLEC7A, yhdessä TREM2 kanssa, ilmenivät voimakkaammin. Nämä DAM -geenit ovat läheisesti yhteydessä fagosytoosiin ja lipidimetaboliaan, ja DAM:n on havaittu paikantuvan beta-amyloidi plakkin välittömään läheisyyteen, sekä transgeenisillä hiirillä, että post-mortem Alzheimerin tautia sairastaneilla potilailla. DAM:n on havaittu toimivan fagosytoivina soluina lisäksi ALS:ssa sekä vanhenemisessa. (Keren-shaul et al. 2017) Samanaikaisesti Krasemann ja kumppanit havaitsivat TREM2-APOE -reitin ajavan mikrogliaisolujen transkriptionaalista fenotyyppiä pois homeostaasista kohti inflammaatiota ylläpitävää fenotyyppiä neurodegeneratiivisissa sairauksissa (Krasemann et al. 2017).

Perimänlaajuisissa assosiaatiotutkimuksissa on APOE:n ja TREM2:n lisäksi löydetty muitakin Alzheimerin tautiin liittyviä genejä; ABI3, CASS 4, CD33, CR1, HLA-DRB1/5, IL1RAP, MEF2C, MS4A1, MS4A4E, PLC γ 2, SHIP1, ja PU.1. Mikrogliaisolujen on havaittu ilmentävän näitä joko valikoiden tai suosien. (Marttinen et al. 2018) Moni näistä Alzheimerin taudin riskigeneistä kuuluu mikrogliaisolujen signaalintireitteihin, jotka säätelevät solun selviytymistä, liikkumista, fagosytoosia, kalsiumsignaalintia ja geenien ilmentymistä ainakin osittain TREM2- signaalinnin kautta. Lisäksi laajat verkostoperusteiset transkriptomi- ja proteomi- tutkimukset ovat tunnistaneet mikrogliaisolujen kuin myös immunologisten geenien ja -reittien hyvin vahvasti liittyvän Alzheimerin patofysiologiaan. (Marttinen et al. 2018)

5 TUTKIELMAN TARKOITUS

Kuten aiemmin totesin, on mikroglia soluilla ja sen aiheuttamalla inflammaatiolla merkittävä vaikutus Alzheimerin taudissa tapahtuvan neuroinflammaation syntyyn. Aiemmat yritykset farmakologisten hoitojen keinoin ovat jääneet hyvin vaatimattomiksi. Kliinisessä käytössä olevilla lääkkeillä pystytään parhaassakin tapauksessa vain hidastamaan Alzheimerin taudin etenemistä. Vaikuttaa siltä, ettemme vieläkään tunne tarpeeksi taudin patofysiologiaa, jotta pystyisimme kehittämään taudin etenemisen estävää hoitoa. Toiveet Alzheimerin taudin parantavista hoidoista, ovat myös tämän vuoksi liian ennenaikaisia.

Tässä tutkimuksessa pyrittiin tuomaan lisävaloa Alzheimerin taudin patofysiologialle tärkeiden mikroglion toiminnan säätelystä tutkimalla niiden mikroRNA:n ilmentymistä. Taudin patofysiologian ymmärtämisen lisäksi geenien säätelyn tutkimus voi tuoda esille aiemmin tuntemattomia mekanismeja ja kohteita, joihin tulevaisuudessa voidaan mahdollisesti kehittää uusia hoitokeinoja.

Tässä tutkimuksessa käytettiin myös vehikkelinä GW0742:sta. GW0742 on PPAR β/σ -agonisti. Se aktivoi tumareseptoreita heterodimeeristen tyypin II tumareseptorien aktivaatiolla, erityisesti PPAR γ :RXR, PPAR δ :RXR ja LXR:RXR. Myeloidi -soluilla tumareseptorit mahdollistavat erilaiset aktivaatiot, jotka voivat toimia mm. edistään inflammaatiota, kudosten korjausta tai fagosytoosia. Alzheimerin taudin hiirimalleilla tumareseptoriagonisti- hoitojen on havaittu vähentävän inflammaatiota, vähentävän amyloidien kertymistä ja parantavan kognitiota. (Savage et al. 2015)

GW0742 on osoitettu lisäävän geeni CPT1a:n ilmentymistä APP/PS1 -hiirimallissa ja parantavan jo muistiin syntyneitä vajauksia. Samaisessa tutkimuksessa se lisäsi hippokampusten neurogeneesiä ja vahvisti neuronien erilaistumista esisolusta. Lisäksi sen havaittiin estävän beta-amyloidia vahingoittamasta hermosolujen pitkäkestoista potentiaatiota. (Konttinen et al. 2019)

6 KOKEELLINEN OSUUS

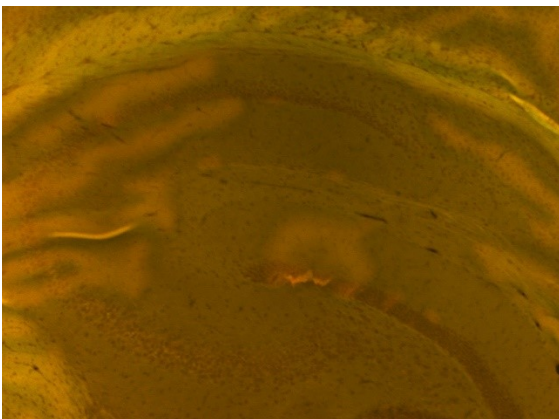
5XFAD-hiirimalli

5XFAD-hiirimallissa transgeeniset hiiret koekspressoivat yhteensä viittä FAD -mutaatiota. APP:tä yli-ilmentävät K670N/M671L (Swedish), 1716V (Florida) ja V717I (London) mutaatiot ja PS1 yli-ilmentävät M146L ja L286V). Nämä hiiret kehittävät aivoihin amyloidiplakkeja ja gliosin kahden kuukauden iässä, ja saavuttavat runsaan beta-amyloidi-42 kuorman. Lisäksi synaptiset merkkiaineet vähenevät niiden aivoissa, ne ilmentävät kasvaneita p25 tasoja, aivoissa tapahtuu neuronien tuhoutumista, sekä niillä on muistiongelmia Y- labyrintissa. (Oakley et al. 2006)

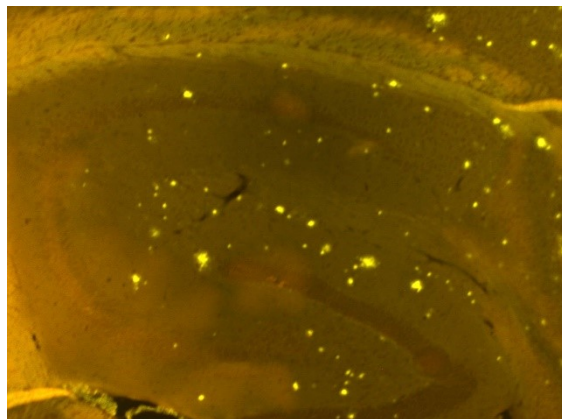
5XFAD hiiret saatiin lahjana tohtori Robert Vassarilta Northwestern Universitystä.

GW0742 oli GlaxoSmithKlinen tuotantoa. GW0742 annettiin DMSO:n toimiessa vehikkelinä oraalisesti 30mg/kg päivittäin vesiseoksena kahden viikon ajan. Annostelu aloitettiin hiirten ollessa 4,5 kuukauden ikäisiä. Pelkällä kuljettimella hoidetut hiiret saivat vain vettä. Hiiret lopetettiin hoitojakson päätteeksi 6 tuntia viimeisestä annoksesta.

1 A



1 B



Kuva 1A. Villityypin eli VT-hiiren aivokudosta tioflaviinivärjäyksessä.

Kuva 1B. 5XFAD- transgeenisen eli TG-hiiren aivokudosta tioflaviinivärjäyksessä.

Tioflaviinivärjäyksellä osoitettiin, että transgeenisten hiirten aivokudoksessa todella esiintyi amyloidiplakkeja. Kuvassa 1A on villityypin hiiren aivokudosta ilman plakkikertymiä, ja kuvassa 1B on leike transgeenisen hiiren amyloidiplakeista.

APDE9-hiirimalli

APDE9- hiirimallina käytettiin APP^{swe}/PSEN1^{dE9} hiiriä, jotka kantoivat ihmisten APP (K595N ja M596L) sekä PSEN1^{dE9} mutaatioita säilyttäen C57BL/6J taustansa.

Nämä hiiret satunnaistettiin pelkkää kuljetinta saaneeseen ryhmään ja GW0742 altistettuun ryhmään. 12 kuukauden iästä lähtien hiirille annosteltiin 30mg/kg GW0742 vesiliuoksessa tai pelkkää vettä samalla tilavuudella 24 tunnin välein 14 päivän ajan. Hiiret uhrattiin hoitajakson päätteeksi 12 tuntia viimeisestä annostelusta.

BV-2 Solumalli

BV2- solujen historia juontaa vuoteen 1990, jolloin Blasi ja kumppanit kehittivät tämän solulinjan infektoimalla mikroglia soluviljelmän v-raf/v-myc onkogeenin sisältävällä retroviruksella. (Blasi et al. 1990) Solulinja on kuolematon ja sitä on tämän jälkeen käytetty useissa tutkimuksissa korvaamaan primäärit mikroglia solut. Henn ja kumppanit tutkimuksessaan huomasivat LPS:llä käsiteltyjen BV2 solujen aktivoituneista geeneistä 90 % löytyvän myös primääri mikroglialta. Ja näistä noin 50 % myös hippokampuksen mikrogliaista LPS -injektoiduilla hiirillä. Kuitenkin samassa tutkimuksessa huomattiin primääri mikroglial reagoivan huomattavasti voimakkaammin LPS:ään ja täten myös noin kymmenkertaista määrää geenejä säädeltiin verrattuna BV-2 soluihin. (Henn et al. 2009) BV-2 solujen on myös havaittu fagosytoivan beta-amyloidia ja tuottavat sytokiineja kuten mikroglia, joskin tuotanto näyttäisi olevan pienempää verrattuna primaareihin mikroglioihin. (Stansley et al. 2012)

Primäärimikrogliaisolujen eristys hiirestä

2-3 vuorokauden ikäisiltä hiirenpoisilta siirrettiin aivot CMF- PBS +0,45% glukoosia sisältävälle 60 mm levyllä. Aivokudos puhdistettiin muusta aineksesta. Tämän jälkeen aivot hienonnettiin ja maljalle lisättiin 0,05% trypsiiniä ja EDTAa ja sen annettiin inkuboitua inkubaattorissa 37 celsiusasteessa 20 minuuttia. Saatua homogenaattia siirrettiin maljalta kartioputkiin, joissa valmiina solujen kasvatusmediaa täydennettynä 10% seerumilla. Näytteen annettiin laskeutua pohjalle, josta se imettiin pipetillä ja siirrettiin uuteen kasvatusmediaa sisältävään putkeen. Homogenaattia trituroitiin, kunnes kudos oli kokonaan homogeeninen. Näytteet jaettiin kasvatusmalljoille ja näytteiden annettiin inkuboitua 3 viikon ajan.

Hiiren primaarimikrogliaisolujen erottaminen sekaviljelmästä

Trypsiiniä laimennettiin kasvatusmediaan 1:3 suhteessa. Kasvatusmedia aspiroitiin maljalta ja jokainen malja pestiin PBS:ää käyttäen. Tämän jälkeen pesuliuos aspiroitiin ja tilalle lisättiin trypsiiniä. Astioita inkuboitiin 30 minuutin ajan 37 celsiusasteessa, 5% CO₂ -pitoisuudessa, tai kunnes astrocytytit kuoriutuivat astialta. Maljat pestiin 2-3 kertaa PBS:ää käyttäen, kunnes loputkin astrocytytit irtosivat maljalta. Maljoille lisättiin laimentamatonta 0,25% trypsiiniä ja niitä inkuboitiin 3-5 minuuttia huoneenlämmössä, irroittaen mikrogliaisolut maljoilta. Inkubointia jatkettiin tarpeen mukaan 1-20 pidempään. Maljoille lisättiin 5ml DMEM/f12 +10% FBS inhiboimaan trypsiini. Irronneet solut pipetoitiin kartioputkiin, joita sentrifugoitiin 200rpm nopeudella 5 minuutin ajan. Solut resuspensoitiin noin 5ml annoksella DMEM/f12 +10 FSB liuoksessa ja laskettiin hemosytometriassa.

Solujen jakaminen, siirto ja altistus

Kolmen viikon inkubaation jälkeen astrocytytit poistettiin sekaviljelmästä trypsiinin avulla, ja jäljelle jääneet mikrogliaisolut irrotettiin maljalta, laskettiin ja siirrettiin 48-kuoppalevyille solutiheydellä 125 000 solua/kuoppa. Sitten soluja hoidettiin GW0742:lla (loppukonsentraatio 10 uM) 24 tunnin ajan, minkä jälkeen ne altistettiin lipopolysakkaridilla (50 ng/ml, LPS E.Coli L 2630, O111:B4, Sigma) 3 tunnin ajan.

RNA:n eristäminen

RNAn eristäminen tehtiin käyttäen mirVANA™ miRNA Isolation protokollaa soluviljelmille.

Kuoppalevyille lisättiin mirVANA™- pakkauksesta hajottavaa ja sitovaa liuosta. Näyte kaavittiin kuoppien pohjalta kumispaattelilla ja saatu näyte pipetoitiin omiin Eppendorf -putkiinsa. Putket vorteksoitiin, jotta solut hajoaisivat täydellisesti ja saatiin homogeeninen lyyssaatti. MiRNA -homogenaatti lisäainetta lisättiin 1/10 lyyssatin tilavuuden määrästä ja sekoitettiin vorteksilla. Tämän jälkeen putkien annettiin olla jäiden päällä 10 minuuttia. Kloroformia lisättiin sama määrä kuin lyyssaattia oli ennen homogenaatti -lisäaineen lisäämistä. Putkia vorteksoitiin 30-60 sekuntia. Sen jälkeen putket sentrifugoitiin huoneenlämmössä viiden minuutin ajan 10 000 x G:ssä, jolloin saatiin erillinen akvaattinen ja orgaaninen faasi. Akvaattinen faasi erotettiin orgaanisesta ja siirrettiin uuteen Eppendorf -putkeen. Tilavuus mitattiin. Tähän lisättiin 1.25 kertainen tilavuus 100% EtOH:a. Näyteputkille tehtiin keräysputket joissa suodatinkasetit. Saatu Lyyssaatti/EtOH-seos pipetoitiin suodatinkasetin läpi keräysputkeen. Keräysputket sentrifugoitiin 15 sekunnin ajan 10 000 x G:ssä. Lävitse suodattunut neste heitettiin pois. Suodatinkasettien päälle lisättiin miRNA pesuliuos 1 ja se sentrifugoitiin 10 sekunnin ajan 10 000 x G:ssä. Lisättiin uusi pesuliuos 2. ja se ajettiin samoin kuin ensimmäinen. Suodatinkasetit laitettiin omiin keräysputkiin ja sentrifugoitiin 1 minuutin ajan 10 000 x G:ssä, ja residuaalinneste poistettiin suodatinkasetista. Suodatinkasetit siirrettiin uusiin keräysputkiin. Suodatinkasettien päälle lisättiin esilämmitettyä 95 celsiusasteista nukleaaasi-vapaata vettä. Putket sentrifugoitiin 30 sekunnin ajan 10 000 x G:ssä, jotta RNA saatiin kerättyä. Eluaattiputket varastoitiin -70 celsiusasteeseen.

RNA:n tunnistaminen

Tunnistamisessa käytettiin qPCR -menetelmää, jonka valmistelu protokolla perustuu: taqman small RNA assays -ohjeeseen, applied biosystemsiltä.

Reverse transkription -reaktio, eli RT-reaktio tehtiin seuraavalla menetelmällä.

Kaikki reagenssit sulatettiin aluksi jäiden päällä. Viisi mikrolitraa näytettä, joka sisälsi 10 ng RNA:ta, sekoitettiin seitsemän mikrolitran RT-reaktioliuoksen kanssa sekoittimessa. Tähän lisättiin kolme mikrolitraa 5 x RT-primeriä. Seos sekoitettiin ja näytteiden annettiin olla vähintään 5 minuutin ajan jäiden päällä. Tämän jälkeen näytteet kuumennettiin seuraavan ohjelman mukaisesti: 30 minuuttia +16 asteen lämmössä. Sitten 30 minuuttia 42 asteen lämmössä. Sitten 5 minuuttia +85 asteen lämmössä. Ja lämpö laskettiin +4 asteeseen. Lopuksi näytteet jäädytettiin -20 asteeseen odottamaan kvantitatiivista PCR:ää.

7 mikrolitraa RT-reaktioliuosta saatiin seuraavat ainesosat sekoittamalla:

- 4.16 mikrolitraa PCR:ää varten puhdistettua H₂O:ta
- 0.15 dNTP Seosta
- 1.50 RT Bufferia, kymmenkertaisena.
- 1.00 Käänteistä transkriptaasia
- 0.19 RNAasi inhibiittoria

Kvantitatiivinen PCR valmistelu

Kaikki käytetyt reagenssit sulatettiin aluksi jäiden päällä. Valmistettiin seos, jossa seosta 18,67 mikrolitraa siirrettiin jokaiseen 96-kuoppalevyn kuoppaan. Lisättiin 1.33 mikrolitraa RT-reaktioliuosta jokaiseen kuoppaan. Ainekset sekoitettiin ja näytteet kuumennettiin seuraavan ohjelman mukaisesti: Aloitus 2 minuuttia 50 asteessa ja 10 minuuttia 95 asteessa, minkä jälkeen seurasi 50 sykliä 15 sekuntia 95 asteen lämpötilassa ja minuutin ajan 60 asteen lämpötilassa. Tämän jälkeen tehtiin havainnot.

In Situ- hybridisaatio.

In Situ -tutkimus tehtiin Chaudhurin ja kumppanien 2013 julkaiseman tutkimuksen protokollan mukaisesti. Tutkimuksessa käytettiin Alzheimer malleissa käytettyjä transgeenisiiä hiiriä, sekä verrokkeina villityypin- hiiriä. Aivot leikattiin kolmelle lasille, siten että jokaiselle lasille tuli kaksi eri transgeenisen hiiren aivoleikettä, ja kaksi eri villityypin hiiren aivoleikettä.

1.päivä

Ennen työn aloittamista lasit otettiin pakkasesta ja annettiin kuivua huoneenlämmössä. Leikkeiden ympärille piirrettiin ImmEdge kynällä vaharajat. Tämä estää myöhemmin laitettavien liuoksien pakenemisen lasilta.

Lasien annettiin inkuboitua 90 asteisessa 0,01 M sitraattipuskurissa, jonka pH oli 6,4. Inkuboitumisaika 40 minuuttia. Tämän jälkeen lasit jäähdytettiin huoneenlämpöisessä sitraattibufferissa 20 minuutin ajan ja pestiin kolme kertaa kolmen minuutin ajan TBS:ssä.

EDC käsittely

Lasit inkuboitiin pesujen jälkeen samaisena aamuna tehdyssä metyyli-imidatsoli liuoksessa kaksi kertaa kymmenen minuutin ajan kosteuskammiossa. Kammiossa käytettiin SSC -liuosta. Tämän jälkeen laseja inkuboitiin tuoreella EDC -liuoksella samaisessa kammiossa yhden tunnin ajan. Inkuboinnin jälkeen laseja pestiin kerran viiden minuutin ajan TBS:llä, jossa glysiiniä 0,2 %, ja tämän jälkeen pesut kahdesti puhtaalla TBS:llä viisi minuuttia kerrallaan.

Prehybridisaatio

Lasit laitettiin kosteuskammioon ja niiden päälle pipetoitiin hybridisaatio puskuria. Lasit laitettiin tämän jälkeen inkuboitumaan kosteuskammioon tunniksi 37 asteen lämmössä.

Hybridisaatio

Digoxigeenileimattua LNA -koetinta lisättiin 65 asteeseen esilämmitettyyn hybridisaatiobufferiin, jonka jälkeen saadun liuoksen annettiin olla 65 asteessa vielä viiden minuutin ajan, jotta varmistettiin koetinten denaturoituminen.

Prehybridisaation loputtua lisättiin LNA -koettimen sisältävä hybridisaatio puskuri. Lisäksi lasien päälle laitettiin pala parafiinia estämään haihtumista. Lasit jätettiin hybridisoitumaan yön yli 37 asteeseen kosteuskammioon.

2. Päivä

Päivän aluksi lasien päältä otettiin parafilmit pois ja lasit pestiin esilämmitetyssä SSC -liuoksessa. Aluksi lasit pestiin kolme kertaa 20 minuutin ajan 2X SSC -liuoksessa, ja tämän jälkeen kaksi kertaa 20 minuuttia 0.2X SSC -liuoksessa. Pesujen jälkeen näytteisiin lisättiin Blocking bufferia noin 400 µl ja annettiin inkuboitua kosteuskammiossa yhden tunnin ajan. Yön ajaksi lisättiin primäärivasta-aineet.

3. Päivä

Lasit pestiin kaksi kertaa TBS -liuoksessa huoneenlämmössä. Tämän jälkeen valmisteltiin FISH-signaalin vahvistus.

Laimennettiin Cy5-TSa pakkauksesta saatu Cy5 -standardi laimennusbufferilla suhteella 1:100. Tämän jälkeen valmista liuosta lisättiin siten että näytteet peittyvät lasilla liuoksen alle. Tämän jälkeen lasien annettiin inkuboitua huonelämpötilassa 10 minuuttia. Lasit pestiin kolme kertaa viiden minuutin ajan TBST- liuoksessa (TBS- liuos, jossa 0,1 % Tween 20). Tämän jälkeen lasit pestiin kolme kertaa viiden minuutin ajan TBS-liuoksessa. Seuraavaksi lasit käytettiin hetkellisesti DEPC-käsitellyssä vedessä. Tämän jälkeen laseille tehtiin tioflaviinivärjäys. Ja tämän jälkeen lasit kiinnitettiin kahdella tipalla prolong gold anti-fade- reagenssia, jossa myös DAPI. Tämän jälkeen näytelasien päälle laitettiin peitinlasi. Ja tämän jälkeen lasit kiinnitettiin kahdella tipalla prolong gold anti-fade- reagenssia, jossa myös DAPI. Tämän jälkeen näytelasien päälle laitettiin peitinlasi.

4. Päivä.

Käsitellyt näytteet katsottiin lävitse fluoresenssimikroskoopilla ja ne kuvattiin. ja tarkasteltiin tulokset.

Tioflaviinivärjäys

Nestetyössä jäädytettyjen viipaleiden lohkot kiinnitettiin ja annettiin kuivua tunnin ajan. Kun lohkot olivat kuivuneet, ne upotettiin dH₂O:hon kahdesti viiden minuutin ajaksi. Tämä jälkeen näytteet upotettiin Tioflaviini-S liuokseen (1% vahvuus dH₂O:ssa) 20 minuutin ajaksi pimeässä tilassa, ja lopuksi pestiin kahdesti dH₂O:lla

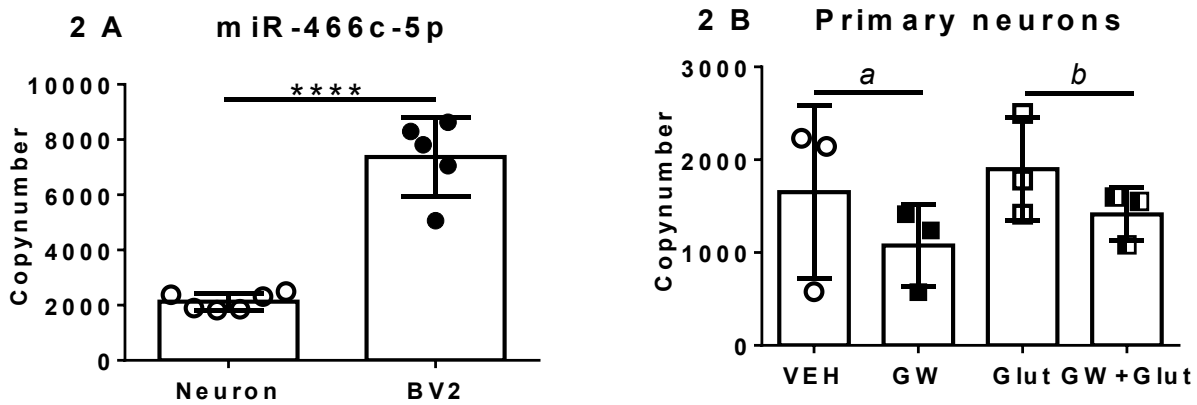
1. Kiinnitettiin superjäädytettyjen viipaleiden lohkoja ja annettiin niiden kuivua tunnin ajan
2. Kun lohkot kuivuneet, upotettiin ne dH₂O:hon kahdesti viiden minuutin ajaksi.
3. Edellisen käsittelyn jälkeen näytteet upotettiin Tioflaviini-S liuokseen (1% vahvuus dH₂O:ssa) 20 minuutin ajaksi pimeässä tilassa.
4. Pestiin kahdesti dH₂O:lla

Tioflaviini-S -liuos tehtiin lisäämällä 1g tioflaviini-S:ää (Sigma T-1892) 100 ml:aan dH₂O:ta.

7 TULOKSET

7.1 miRNA 466C-5p ilmentyminen

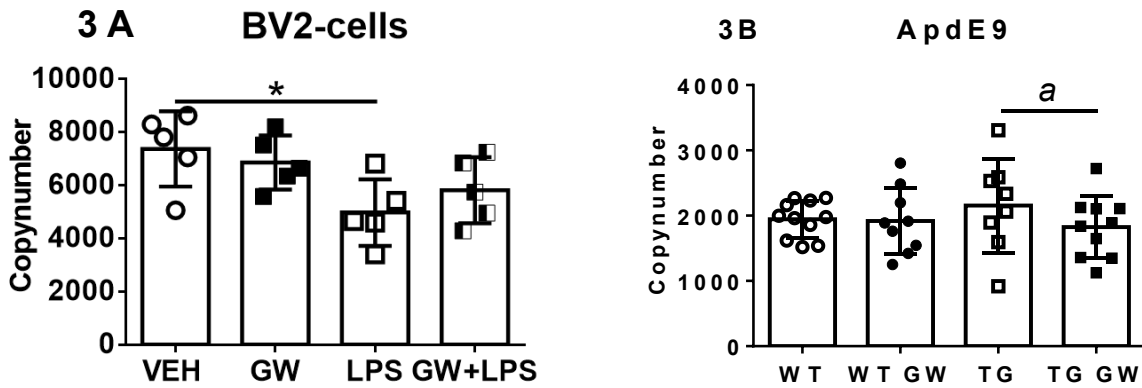
MIR 466C-5p



Kuva 2A. miR-466C-5p ilmentyminen primäärineuroneissa ja BV2 -soluissa, joita ei käsitelty kuinakaan. Kahden otoksen riippumaton t-testi, $t(9)=8.901$, **** $p < 0.0001$, $n=5-6$, mean \pm SD

Kuva 2B. miR-466C-5p ilmentyminen primäärineuroneissa vehikkelillä, GW0742:lla, glutamaatilla, sekä GW0742:lla ja glutamaatilla altistettuna. Kahden otoksen riippumaton t-testi, a $t(4) = 0.9689$ $p = 0.3875$, b $t(4) = 1.355$ $p = 0.2468$, $n=3$, mean \pm SD

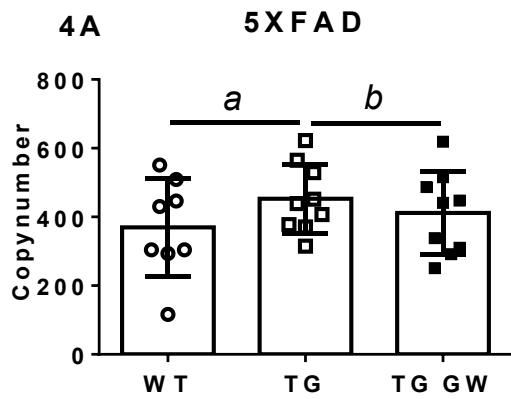
Kuvan 2A tulosten mukaan miR-466C-5p vaikuttaisi ilmentyvän enemmän BV2-soluissa kuin neuroneissa. Kuvassa 2B nähdään, ettei ilmentymisessä ollut merkitseviä eroja vehikkelillä (DMSO) tai glutamaatilla (Glut, 400 μ M) käsitellyillä primäärineuroneilla. GW0742 (GW, 10 μ M) hoidetuilla soluilla, sekä vehikkelillä että glutamaatilla altistetuilla neuroneilla nähtiin ilmentymistä laskeva trendi, mutta tämä trendi ei ollut tilastollisesti merkitsevä.



Kuva 3A. BV2 solujen miR-466C-5p:n ilmentyminen vehikkelillä, GW0742:lla, LPS:llä tai GW ja LPS käsitellyillä soluilla. Kahden otoksen riippumaton t-testi, $t(8)=2.827$, * $p = 0.0222$, $n=5$, mean \pm SD

Kuva 3B. miR-466C-5p:n ilmentyminen villityypin ja transgeenisten ApdE9- hiirien aivoissa. Osa soluista hoidettu GW0742:lla. Kahden otoksen riippumaton t-testi, a $t(16)=1.164$, $p = 0.2613$, $n=8-11$, mean \pm SD

Kuvassa 3A MiR-466C-5p ilmentymisen nähtiin alenevan merkitsevästi LPS altistetuilla BV2 -soluilla verrattuna vehikkeli hoidettuihin (VEH) soluihin. Pelkkä GW0742 -altistus (GW) ei muuttanut ilmentymistasoa, mutta yhtäaikaaisesti LPS:lle ja GW0742:lle altistetuissa (GW+LPS) soluissa havaittiin ilmentymisen hienoinen, joskaan ei merkitsevä nousu pelkällä LPS:lla altistettuihin soluihin verrattuna. Kuvassa 3B nähdään, ettei APDE9 -hiirillä ollut eroa MiR-466C-5p ilmentymisen suhteen villityypin ja transgeenisten hiirten välillä, eikä GW0742 käsittelyllä ollut merkitsevää vaikutusta kyseisen miRNA:n ilmentymiseen.

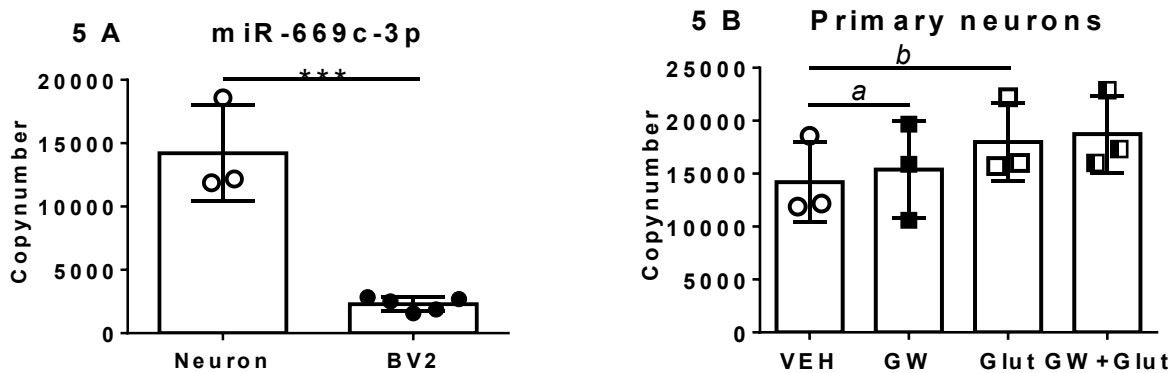


Kuva 4A. miR-466C-5p ilmentyminen 5XFAD -hiirten aivonäytteissä. Kahden otoksen riippumaton t-testi, a $t(15) = 1.417$ $p = 0.1769$, b $t(16) = 0.7933$ $p = 0.4392$, $n=8-9$, $\text{mean} \pm \text{SD}$

Tässä tutkimuksessa kuva 4A:n havainnollistamana miR-466C-5P:n ilmentymisellä ei ollut merkitsevää eroa villityypin, transgeenisten 5XFAD -hiirten ja GW0742:lla hoidettujen transgeenisten hiirten välillä.

7.2 miRNA 669C-3p ilmentyminen

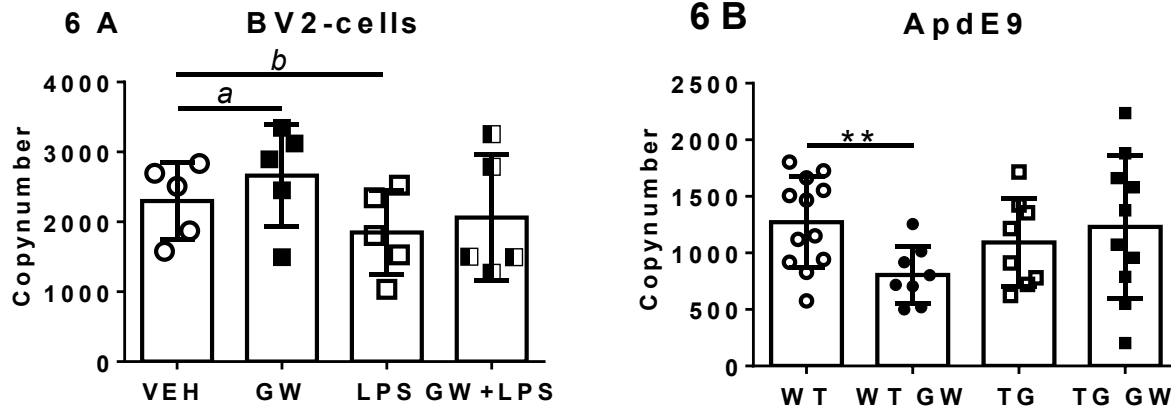
MIR 669-3p



Kuva 5A. miR-669c-3p ilmentyminen neuroneissa ja BV 2 soluissa, joita ei käsitelty kuinkaan. Kahden otoksen riippumaton t-testi, $t(6) = 7.318$, $***p = 0.0003$, $n=3-5$, $\text{mean} \pm \text{SD}$

Kuva 5B. miR-669c-3p ilmentyminen Vehikkelillä, GW0742:lla, glutamaatilla, sekä GW0742:lla ja glutamaatilla altistetuilla soluilla. Kahden otoksen riippumaton t-testi, a $t(4) = 0.3434$ $p = 0.7486$, b $t(4) = 1.243$ $p = 0.2817$, $n=3$, $\text{mean} \pm \text{SD}$

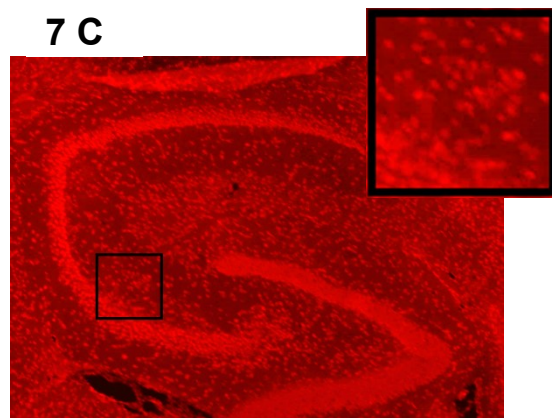
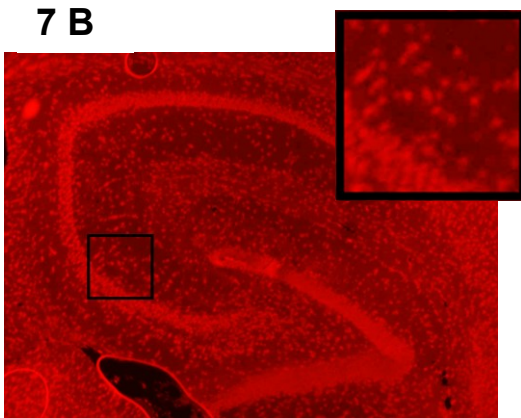
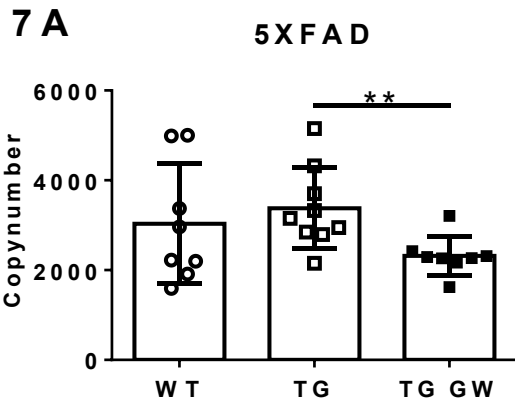
Kuvasta 5A havaitaan miR-669C-3p:n ilmentyvän voimakkaammin neuroneissa kuin BV2 -soluissa. Tämä siis päinvastainen ilmiö kuin miR-466C-5P tapauksessa. Kuten kuva 5B näyttää, miR-669C-3p:n ilmentymisessä ei havaittu tilastollisesti merkitseviä muutoksia neuronien välillä altistettaessa vehikkelille (VEH, DMSO) GW0742:lle (GW 10 μM), glutamaatille (Glut 400 μM) tai GW0742 ja glutamaatille yhdessä (10 μM + 400 μM).



Kuva 6A. BV2 solujen miR-669C-3p:n ilmentyminen vehikkelillä, GW0742:lla, LPS:llä tai GW ja LPS käsittelyn saaneilla soluilla. Kahden otoksen riippumaton t-testi, a $t(8) = 0.8908$ $p = 0.3990$, b $t(8) = 1.232$ $p = 0.2528$, $n = 5$, $\text{mean} \pm \text{SD}$

Kuva 6B. miR-669C-3p:n ilmentyminen villityypin ja transgeenisten ApdE9- hiirien aivoissa. Osa hiiristä hoidettu GW0742:lla. Kahden otoksen riippumaton t-testi, $t(18) = 2.917$, $** p = 0.0092$, $n = 8-12$, $\text{mean} \pm \text{SD}$

BV2 solujen miR-669C-3p:n ilmentymisessä ei havaittu merkitseviä eroja vehikkelillä, GW0742:lla, LPS:llä tai GW ja LPS käsitellyillä soluilla. MiR-669C-3p:n ilmentyminen ei eronnut villityypin (WT) ja transgeenisten (TG) hiirten välillä, mutta GW0742:lla hoidetuilla villityypin hiirillä (WT GW) nähtiin merkitsevä miR-669C-3p:n tason aleneminen verrattuna vehikkelillä hoidettuihin.



Kuva 7A. miR-669C-3p ilmentyminen 5XFAD hiirten aivoissa. Kahden otoksen riippumaton t-testi, $t(15) = 3.014$, $** p = 0.0087$, $n = 8-9$, $\text{mean} \pm \text{SD}$

Kuva 7B. WT-hiiren hippokampusalue.

Kuva 7C. TG-hiiren hippokampusalue.

Tutkimuksessa havaittiin Kuva 7A:n osoittamalla tavalla 5XFAD- hiirimallissa GW0742 hoidettujen miR-669C-3p:n ilmentymisen vähentyvän merkitsevästi verrattuna hoitamattomiin hiiriin. Samaisen kuvan mukaan miR-669C-3p -ilmentyminen voi mahdollisesti olla hieman suurempaa TG- kuin WT- solunäytteissä, vaikka merkitsevää eroa ei ollut havaittavissa. miR-669C-3p:n ilmentymisen hienoinen kasvu on myös todettavissa In Situ -kuvissa verrattaessa transgeenisia 5XFAD -hiiriä villityypin hiiriin kuten kuvat 7B ja 7C näyttäisivät osoittavan.

8 POHDINTA

Alzheimerin tauti on suurta inhimillistä kärsimystä aiheuttava sairaus, jolla on maailmanlaajuisesti hyvin suuria sosioekonomisia vaikutuksia. Tällä hetkellä tautiin ei ole taudin etenemistä pysäyttävää tai parantavaa lääkettä. Kuitenkin tutkimus aihepiirin ympärillä on vilkasta ja taudin patologiasta tiedetään jatkuvasti enemmän. Tässä syventävien tutkielmassa pyrittiin kokeellisesti havainnoimaan tiettyjen mikroRNA-juosteiden ilmentymisen muutoksia tiettyjen hiiri- ja solumallien biokemiallisella altistamisella.

Viljely ja altistuskokeiden tulosten mukaan miRNA-669c-3p pitoisuuksiin 5XFAD-transgeenisten hiirten aivoissa voidaan vaikuttaa tumareseptoriagonisti GW0742:llä kyseisen miRNA:n pitoisuutta alentavasti. Tätä tukee myös In Situ -kokeen samansuuntainen havainto kyseisen miRNA:n ilmentymisestä. Lisäksi havaittiin villityypin hiirillä GW0742 käsittelyn aiheuttavan samanlaisen ilmiö, mutta ApdE9-hiirillä tällaista muutosta ei kuitenkaan havaittu.

Koska miRNA:n tiedetään siis inhiboivan geenien toimintaa, voidaan lisääntyneen miRNA-pitoisuuden ajatella vähentävän yhden tai useamman geenin toimintaa. Madaltunut miRNA-pitoisuus taas todennäköisesti kertoo näiden geenien toiminnan vaikutusten tehostumisesta.

Tutkimustulosta voidaan pitää mielenkiintoisena. Jos miRNA-669c-3p toimisi elimistössä neuroinflammaatiota lisäävästi, voisi sen rajoittaminen mahdollisesti vähentää tulehdusreaktiota ja siten vaikuttaa mm. Alzheimerin tautia estävästi. GW0742 voi mahdollisesti myös hillitä neuroinflammaatiota muulla tavoin, jolloin sen vaikutus miRNA-669c:n pitoisuuteen on epäsuora. Ihmisillä kartoitettuja miRNA-669c-3p kokeita ei allekirjoitaneen tiedossa ole. Hiljattain havaittiin Kolosowskan ja kumppaneiden tutkimuksessa yli-ilmenevän MIRNA-669c-3p:n toimivan iskeemisen aivohalvauksen hiirimalleissa neuroprotektiivisesti, ja sen indusoituvan iskeemisissä aivohalvauksissa. (Kolosowska et al. 2020)

Aiemmissä tutkimuksissa miRNA-466 näyttäisi inhiboivan eturauhassyövän tuumorin kasvua ja luustometastaasien muodostumista, vaikuttamalla osteogeeniseen transkriptiotekijä RUNX2:een usean eri geenin kautta. Samassa tutkimuksessa endogeenisen miR-466 poistaminen indusoi premaligneja muutoksia eturauhasen soluissa. (Colden et al. 2017.) Lisäksi kyseisellä miRNA:lla saattaa olla myös osansa virusinfektioiden torjunnan tehostamisessa ainakin Cocksackie- ja adenovirusinfektioissa. (Lam et al. 2014) Kyseinen miRNA vaikuttaisi osallistuvan myös imusuonten muodostumiseen. (Yee et al. 2017)

Tässä tutkimuksessa LPS käsittely merkitsevästi alensi kyseisen miRNA:n ilmentymistä, verrattuna kontrolliin. Näin ollen voitaisiin ajatella neuroinflammaation mahdollisesti alentavan kyseisen miRNA:n ilmentymistä. Jatkotutkimuksissa olisi mielenkiintoista nähdä, pystyttäisiinkö miRNA 466-tuotantoa lisäämällä mahdollisesti vaikuttamaan neuroinflammaatiotasoon.

Tuloksia tarkastellessa on kuitenkin hyvä muistaa, ettei hiirten soluilla tehdyistä tuloksista voida vetää suoria johtopäätöksiä tulosten samankaltaisuuteen myös ihmisillä. Tutkimuksen suorituksen ja tulosten analysoinnin välillä ehti myös kulua varsin paljon aikaa, mikä voi vaikuttaa tutkimuksen kokonaisuuteen. Lisäksi tutkimuksen tekijän vähäinen kokemus laboratoriotyöskentelystä, voi vaikuttaa jolloin mm. työvälineiden käytössä voi syntyä suurempia ja useammin mittausvirheitä ja vääristymiä.

Tutkimusta tarvitaan kuitenkin lisää osoittamaan GW0742:n vaikutus miRNA:n ilmentymiseen ja mahdolliseen yhteyteen neuroinflammaation vähentämiseksi.

9 LÄHTEET

- Abramov E, Dolev I, Fogel H, Ciccotosto GD, Ruff E, Slutsky I. (2009). Amyloid-beta as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nature Neuroscience* 12:1567–1576.
- Anderson, C. M., and Swanson, R. A. (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32, 1–14.
- Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F. (1990). Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *Journal of Neuroimmunology*. 27(2-3):229-237.
- Britschgi M, Takeda-Uchimura Y, Rockenstein E, Johns H, Masliah E, Wyss-Coray T. (2012). Deficiency of terminal complement pathway inhibitor promotes neuronal tau pathology and degeneration in mice. *Journal of Neuroinflammation*. 9:220.
- Cao DD, Li L, Chan WY. (2016). MicroRNAs: Key regulators in the central nervous system and their implication in neurological diseases. *International Journal of Molecular Science* 28:17(6):842.
- Chaudhuri A, Yelamanchili S, Fox H. (2013). Combined Fluorescent in situ hybridization for detection of microRNAs and immunofluorescent labeling for cell-type markers. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7:160.
- Cirrito JR, Kang JE, Lee J, Stewart FR, Verges DK, Silverio LM, Bu G, Mennerick S, Holtzman DM. (2008). Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid-beta in vivo. *Neuron* 58:42–51.
- Clarke LE, Liddelow SA, Chakraborty C, Münch AE, Heiman M, Barres BA. (2018). Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *PNAS* 115(8):E1896–E1905.
- Coleman PD, Yao PJ. (2003). Synaptic slaughter in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 24,1023–1027.
- Colden M, Dar AA, Saini S, Dahiya PV, Shahryari V, Yamamura S, Tanaka Y, Stein G, Dahiya R, Majid S. (2017). microRNA-466 inhibits tumor growth and bone metastasis in prostate cancer by direct regulation of osteogenic transcription factor RUNX2. *Cell Death & Disease* 8:e2572.

- Danysz W, Parsons CG, Mobius HJ, Stoffler A, Quack G. (2000). Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease – a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. *Neurotoxicity Research* 2:85–97.
- Deczkowska A, Amit I, Schwartz M. (2018). Microglial immune checkpoint mechanisms. *Nature Neuroscience* 21:779–786.
- De Strooper B, Karran E. (2016). The cellular phase of Alzheimer's disease. *Cell* 164:603–615.
- Erny D, Hrabé de Angelis AL, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, Keren-Shaul H, Mahlakoiv T, Jakobshagen K, Buch T, Schwierzeck V, Utermohlen O, Chun E, Garrett WS, McCoy KD, Diefenbach A, Sacheli P, Stecher B, Amit I, Prinz M. (2015). Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nature Neuroscience* 18:965-977.
- Ferrera D, Mazzaro N, Canale C, Gasparini L. (2014). Resting microglia react to A β 42 fibrils but do not detect oligomers or oligomer-induced neuronal damage. *Neurobiology of Aging* 35(11):2444-2457.
- Franco R, Fernandez-Suarez D. (2015). Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Progress in Neurobiology* 131:65-86.
- Franscovich ML, De Seranno S, Rush T, Borel E, Elie A, Arnal I, Lanté F, Buisson A. (2014). Activity-dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to amyloid-beta oligomers. *Journal of Neuroscience* 34:6084–6097.
- Furman JL, Sama DM, Gant JC, Beckett TL, Murphy MP, Bachstetter AD, Van Eldik LJ, Norris CM. (2012). Targeting astrocytes ameliorates neurologic changes in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* 32:16129–16140.
- Geriatrics. Tilvis Reijo, Pitkälä Kaisu, Strandberg Timo, Sulkava Raimo, Viitanen Matti. Kustannus Oy Duodecim. 2016. E-versio, luettu 24.5.2020.
- Gosselin D, Link VM, Romanoski CE, Fonseca GJ, Eichenfield DZ, Spann NJ, Stender JD, Chun HB, Garner H, Geissmann F, Glass CK. (2014). Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell* 159:1327– 1340.
- Grubman A, Kanninen KM, Malm T. (2016) Multitasking mikroglia and Alzheimer's disease: Diversity, tools and therapeutics. *Journal of Molecular Neuroscience* 60:390–404

- Hardingham GE, Bading H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature Reviews. Neuroscience* 11:682–696.
- Henn A, Lund S, Hedtjörn M, Schrattenholz A, Pörzgen P, Leist M. (2009). The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX* 26(2):83-94.
- Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. (2015). Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nature Reviews. Neuroscience* 16:358–372.
- Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S, Merry KM, Shi Q, Rosenthal A, Barres BA, Lemere CA, Selkoe DJ, Stevens B. (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* 352:712–716.
- Ittner A, Chua SW, Bertz J, Volkerling A, van der Hoven J, Gladbach A, Przybyla M, Bi M, van Hummel A, Stevens CH, Ippati S, Suh LS, Macmillan A, Sutherland G, Kril JJ, Silva AP, Mackay JP, Poljak A, Delerue F, Ke YD, Ittner LM. (2016). Site-specific phosphorylation of tau inhibits amyloid- β toxicity in Alzheimer's mice. *Science* 354: 904–908.
- Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, Wölfing H, Chieng BC, Christie MJ, Napier IA, Eckert A, Staufenbiel M, Hardeman E, Götz J. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid- β toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142:387–397.
- Keren-shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, David E, Baruch K, Lara-Astaiso D, Toth B, Itzkovitz S, Colonna M, Schwartz M, Amit I. (2017). A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease. *Cell* 169: 1–15.
- Kolev MV, Ruseva MM, Harris CL, Morgan BP, Donev RM. (2009). Implication of complement system and its regulators in Alzheimer's disease. *Current Neuropharmacology* 7:1–8.
- Kolosowska N, Gotkiewicz M, Dhungana H, Giudice L, Giugno R, Box D, Huuskonen MT, Korhonen P, Scoyni F, Kanninen KM, Ylä-Herttua S, Turunen TA, Turunen MP, Koistinaho J, Malm T. (2020). Intracerebral overexpression of miR-669c is protective in mouse ischemic stroke model by targeting MyD88 and inducing alternative microglial/macrophage activation. *Journal of Neuroinflammation* 17:194
- Konttinen H, Gureviciene I, Oksanen M, Grubman A, Loppi S, Huuskonen M, Korhonen P, Lampinen R, Keuters M, Belaya I, Tanila H, Kanninen K, Goldsteins G, Landreth G, Koistinaho J,

- Malm T. (2019) PPAR β/δ -agonist GW0742 ameliorates dysfunction in fatty acid oxidation in PSEN1 Δ E9 astrocytes. *Glia* 67(1):146-159.
- Krasemann S, Madore C, Cialic R, Baufeld C, Calcagno N, El Fatimy R, Beckers L, O'Loughlin E, Xu Y, Fanek Z, Greco DJ, Smith ST, Tweet G, Humulock Z, Zrzavy T, Conde-Sanroman P, Gacias M, Weng Z, Chen H, Tjon E, Mazaheri F, Hartmann K, Madi A, Ulrich JD, Glatzel M, Worthmann A, Heeren J, Budnik B, Lemere C, Ikezu T, Heppner FL, Litvak V, Holtzman DM, Lassmann H, Weiner HL, Ochando J, Haass C, Butovsky O. (2017). The TREM2-APOE pathway drives the transcriptional phenotype of dysfunctional microglia in neurodegenerative diseases. *Immunity* 47:566– 581.
- Lage JM. (2006) 100 years of Alzheimer's disease (1906-2006). *Journal of Alzheimer's Disease* 9(3 Suppl):15–26.
- Lam WY, Cheung ACY, Tung CKC, Yeung ACM, Ngai KKL, Lui VWY, Chan PKS, Tsui SKW. (2015). miR-466 is putative negative regulator of Coxsackie virus and Adenovirus Receptor. *FEBS Letters* 589:246-254.
- Lazarevic V, Fienko S, Andres-Alonso M, Anni D, Ivanova D, Montenegro-Venegas C, Gundelfinger ED, Cousin MA, Fejtova A. (2017). Physiological concentrations of amyloid beta regulate recycling of synaptic vesicles via alpha7 acetylcholine receptor and CDK5/calcineurin signaling. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10:221
- Li S, Jin M, Koeglsperger T, Shepardson NE, Shankar GM, Selkoe DJ. (2011). Soluble A β oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience*. 31:6627–6638.
- Liao YF, Wang BJ, Cheng HT, Kuo LH, Wolfe MS. (2004) Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interferon-gamma stimulate gamma-secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein through a JNK-dependent MAPK pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 279(47):49523-49532.
- Lin WR, Wozniak MA, Cooper RJ, Wilcock GK, Itzhaki RF. (2002) Herpesviruses in brain and Alzheimer's disease. *The Journal of Pathology* 197:395–402.
- Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Münch AE, Chung WS, Peterson TC, Wilton DK, Frouin A, Napier BA, Panicker N, Kumar M, Buckwalter MS, Rowitch DH, Dawson VL, Dawson TM, Stevens B, Barres BA. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541:481–487.

Malm TM, Jay TR, Landreth GE. (2015). The evolving biology of microglia in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 12:81-93.

Marttinen M, Takalo M, Natunen T, Wittrahm R, Gabbouj S, Kemppainen S, Leinonen V, Tanila H, Haapasalo A and Hiltunen M (2018). Molecular mechanisms of synaptotoxicity and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience* 12:963.

Medeiros R, La Ferla FM. (2013). Astrocytes: conductors of the Alzheimer's disease neuroinflammatory symphony. *Experimental Neurology* 239:133–138.

Muistisairaudet. Erkinjuntti Timo, Remes, Anne, Rinne Juha, Soininen Hilikka. Kustannus Oy Duodecim. 2015. E-versio, luettu 24.5.2020

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314–1318.

Oakley H, Cole SL, Sreemathi L, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, Berry R, Vassar R. (2006) Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *The Journal of Neuroscience* 26(40):10129-10140

Olabarria M, Noristani HN, Verkhratsky A, Rodríguez, JJ. (2010). Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia* 58:831–838.

Pisa D, Alonso R, Rabano A, Rodal I, Carrasco L. (2015). Different brain regions are infected with fungi in Alzheimer's disease. *Scientific Reports* 5:15015.

Prince, M. Wimo A, Guerchet M, Ali GC, Wu YT, Prina, M. (2015) World Alzheimer Report 2015. The global impact of dementia: an analysis of prevalence, incidence, cost and trends. *Alzheimer's Disease International*.

Prince M, Comas-Herrera MA, Knapp M, Guerchet M, Karagiannidou MM. (2016). World Alzheimer Report 2016. Improving healthcare for people living with dementia coverage, quality and costs now and in the future. *Alzheimer's Disease International*.

Ransohoff RM, Stevens B. *Neuroscience*. (2011) How many cell types does it take to wire a brain? *Science* 333:1391–1392.

Rönicke R, Mikhaylova M, Rönicke S, Meinhardt J, Schröder UH, Fändrich M, Reiser G, Kreutz MR, Reymann KG. (2011). Early neuronal dysfunction by amyloid β oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors. *Neurobiology of Aging* 32:2219–2228.

Savage JC, Jay T, Goduni E, Quigley C, Mariani MM, Malm T, Ransohoff RM, Lamb BT, Landreth GE. (2015). Nuclear receptors license phagocytosis by trem2⁺ myeloid cells in mouse models of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience* 35(16):6532–6543.

Scheltens P, Blennow K, Breteler MMB, De Strooper, B, Frisoni GB, Salloway S, Van der Flier WM. (2016). Alzheimer's Disease. *The Lancet* 388(10043):505-517.

Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL. (2007). Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *The Journal of Neuroscience*. 27:2866–2875.

Shi Q, Chowdhury S, Ma R, Le KX, Hong S, Caldarone BJ, Stevens B, Lemere CA. (2017). Complement C3 deficiency protects against neurodegeneration in aged plaque rich APP/PS1 mice. *Science Translational Medicine*. 9:eaa6295.

Stansley B, Post J, Hensley K. (2012). A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*. 9:115.

Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, Van Gils JM, Deng J, Halle A, Rayner KJ, Boyer L, Zhong R, Frazier WA, Lacy-Hulbert A, El Khoury J, Golenbock DT, Moore KJ. (2010). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nature Immunology*. 11:155–161.

Terwel D, Steffensen KR, Verghese PB, Kummer MP, Gustafsson JA, Holtzman DM, Heneka MT. (2011). Critical role of astroglial apolipoprotein E and liver X receptor- expression for microglial A β phagocytosis. *The Journal of Neuroscience* 31:7049–7059.

Tremblay ME, Lavery RL, Majewska AK. (2010). Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biology* 8:e1000527.

Venegas C, Kumar S, Franklin BS, Dierkes T, Brinkschulte R, Tejera D, Vieira-Saecker A, Schwartz S, Santarelli F, Kummer MP, Griep A, Gelpi E, Beilharz M, Riedel D, Golenbock DT, Geyer M, Walter J, Latz E, Heneka MT. (2017). Microglia-derived ASC specks cross-seed amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature* 552: 355–361.

Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. (2009). Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *The Journal of Neuroscience* 29:3974-3980.

Winblad B, Amouyel P, Andrieu S, Ballard C, Brayne C, Brodaty H, Cedazo-Minguez A, Dubois B, Edvardsson D, Feldman H, Fratiglioni L, Frisoni GB, Gauthier S, Georges J, Graff C, Iqbal K, Jessen F, Johansson G, Jönsson L, Kivipelto M, Knapp M, Mangialasche F, Melis R, Nordberg A, Rikkert MO, Qiu C, Sakmar TP, Scheltens P, Schneider LS, Sperling R, Tjernberg LO, Waldemar G, Wimo A, Zetterberg H. (2016). Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. *The Lancet. Neurology* 15: 455–532.

Yee D, Coles MC, Lagos D. (2017). microRNAs in the lymphatic endothelium: master regulators of lineage plasticity and inflammation. *Frontiers in Immunology* 8:104.

Zhan Y, Paolicelli RC, Sforzini F, Weinhard L, Bolasco G, Pagani F, Vyssotski AL, Bifone A, Gozzi A, Ragozzino D, Gross CT. (2014). Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nature Neuroscience* 17:400-406.

Zhang Y, Thompson R, Zhang H, Xu H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular Brain* 4:3.