

Az anyai prefrontális cortex és hipotalamikus preoptikus terület proteomikai vizsgálata anyapatkányokban



VÖLGYI KATALIN

2015. 03. 25.

ELTE TTK

Biológiai Intézet

Molekuláris és Rendszer Neurobiológiai Kutatócsoport,

Proteomikai Csoport

Bevezető



- Az anyai magatartás legfőbb szabályozó területei közé tartozik a mediális prefrontális cortex (MPF) és a hipotalamusz preoptikus területe (POA).



MPF

- A kognitív feldolgozásban és számos pszichiátriai betegségben érintett terület
- Lézió → bizonyos anyai magatartásokat gátol (pl. kölyök visszahordás és tisztogatás), míg másokra nincs hatással (pl. fészeképítés)
(Afonso V M, 2007)
- Oxitocin (szupraoptikus és paraventriculáris magokban szintetizálódó neuropeptid) antagonistá injektálás az MPF-be csökkenti az anyai magatartást
(Sabihi S, 2014)

POA

- Elektromos vagy excitotoxikus lézió → gátolja az anyai magatartás kifejeződését
(Jacobson és mtsai 1980, Numan 1974, Numan és mtsai 1988, Numan és mtsai 1977)
- Ösztradiol és prolaktin injektálás a POA-ba → anyai viselkedés megjelenése még nem szült nőstényeknél
(Bridges és mtsai 1990, Numan és mtsai 1997)
→ A POA tehát egy olyan agyterület, ahol (az ott jelenlévő receptoraikon keresztül) az ösztradiol és a prolaktin hatni képes az anyai magatartás megjelenésére
(Numan és Insel 2003)

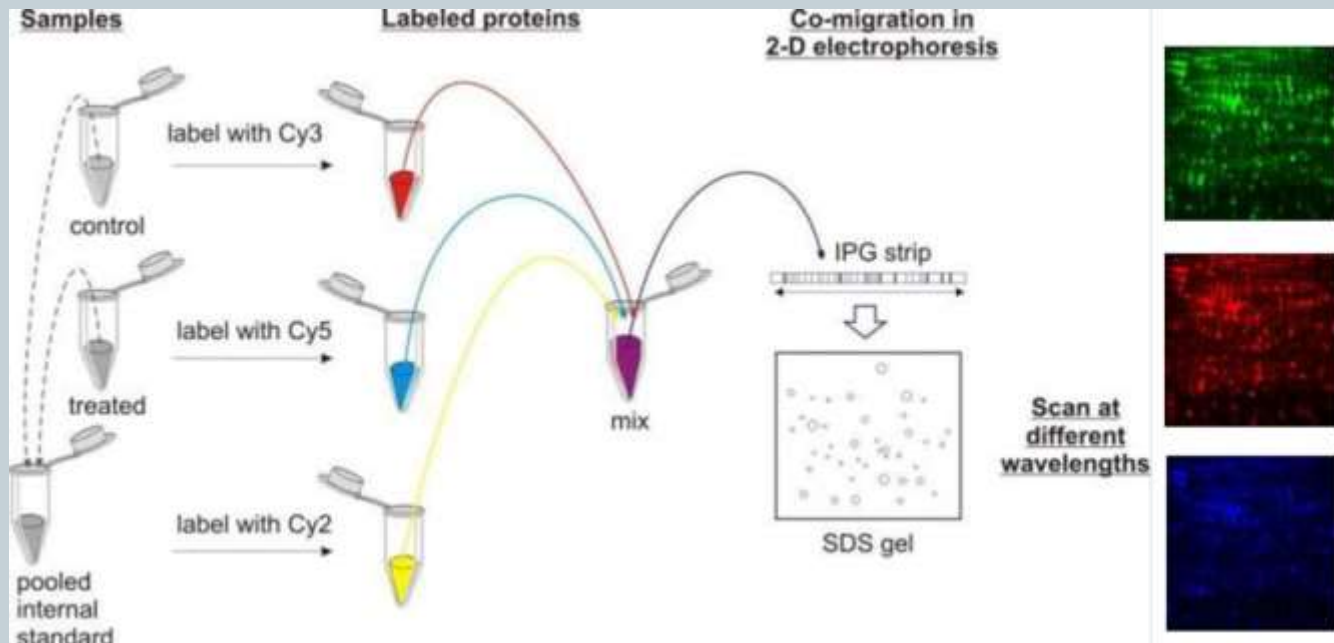
Célkitűzések



A mediális prefrontális cortex (MPF) és preoptikus terület (POA) proteomikai vizsgálata anyákban

- MPF és POA agyterületek disszekálása (n=6-6), homogenizálása, fehérjekészletének precipitálása acetonnal
- MPF és POA fehérjekészletének összehasonlítása anya és kontroll („utód-deprivált”) állatok között
- A kapott szignifikáns fehérjespot változások azonosítása
- A változások közötti összefüggések elemzése
- A legjelentősebb változások validálása

2D-DIGE Minimal dye jelölés



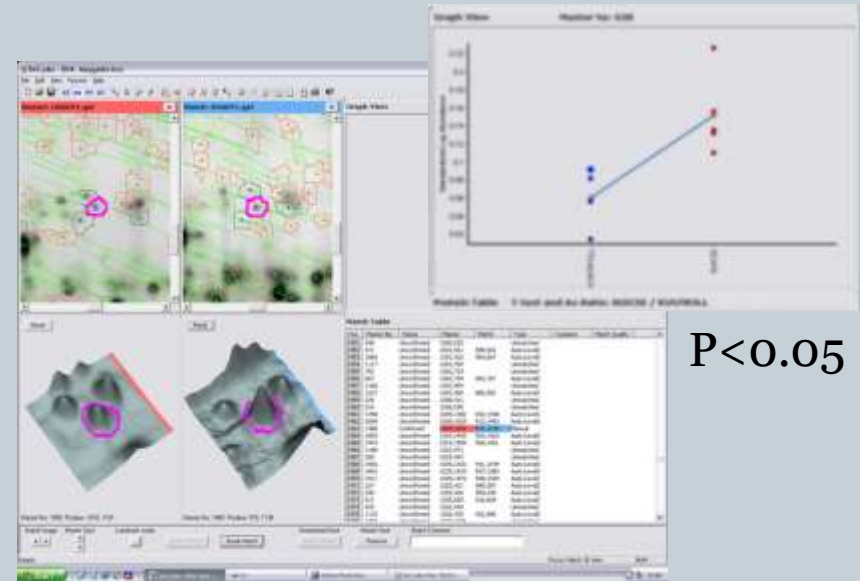
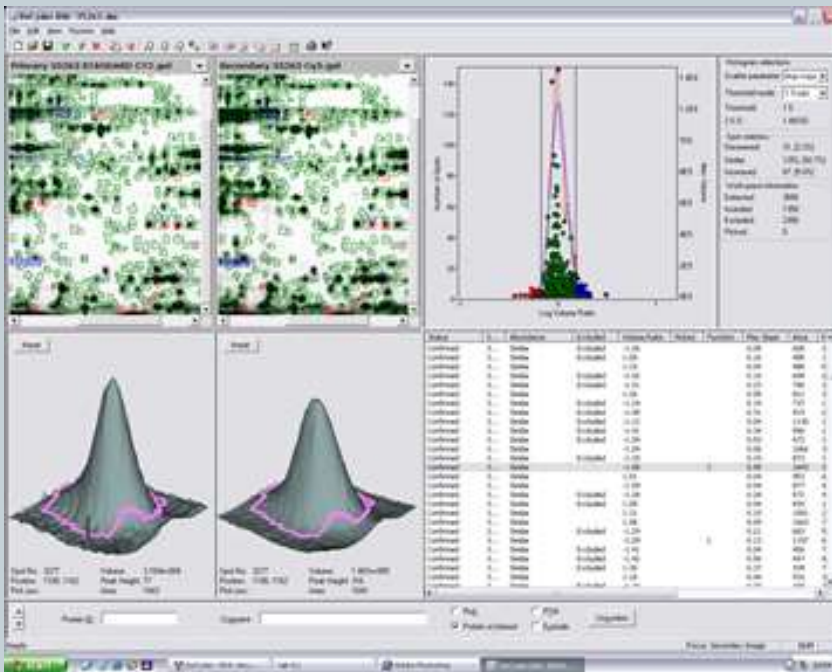
- Minimal dye jelölés: 50 ug fehérje, lysin ϵ -amino csoportjához köt
- 6-6 minta összehasonlítása
- 1 gélen 3 minta (anya, deprivált, „pool”)
- A Cy2, 3 és 5 festékek spektrálisan elkülönülnek; a méret és töltésük megegyezik

DeCyder™ 2D Differential Analysis Software



Differential In-gel Analysis = DIA

Biological Variaton Analysis = BVA

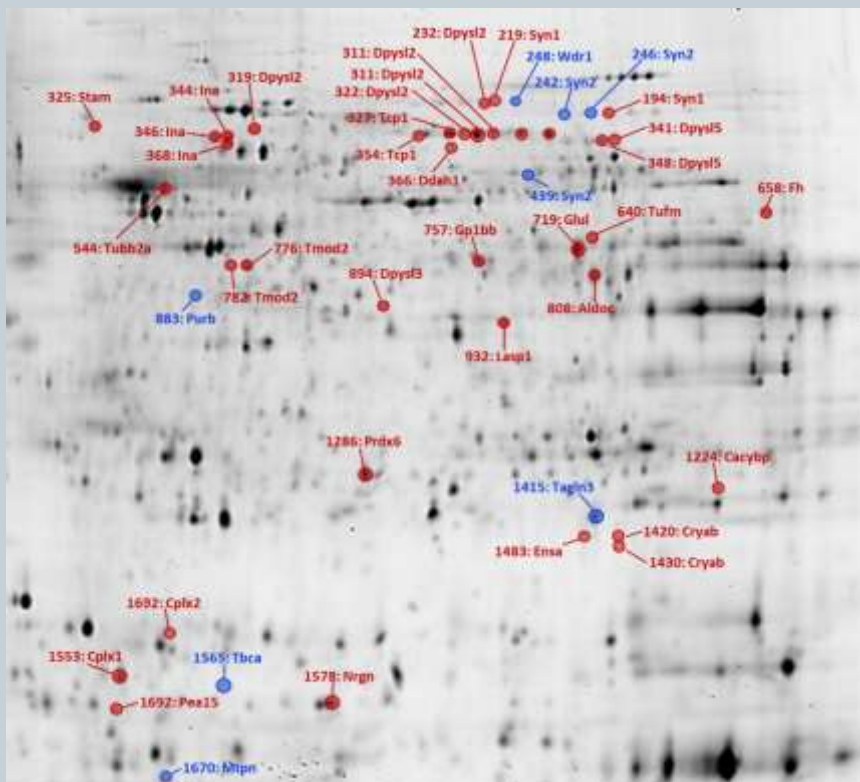


Preparatív gél (Coomassie brilliant blue): szignifikáns fehérjespot-ok kivágása, tripszines emésztése → fehérjék azonosítása LC/MS-MS technikával

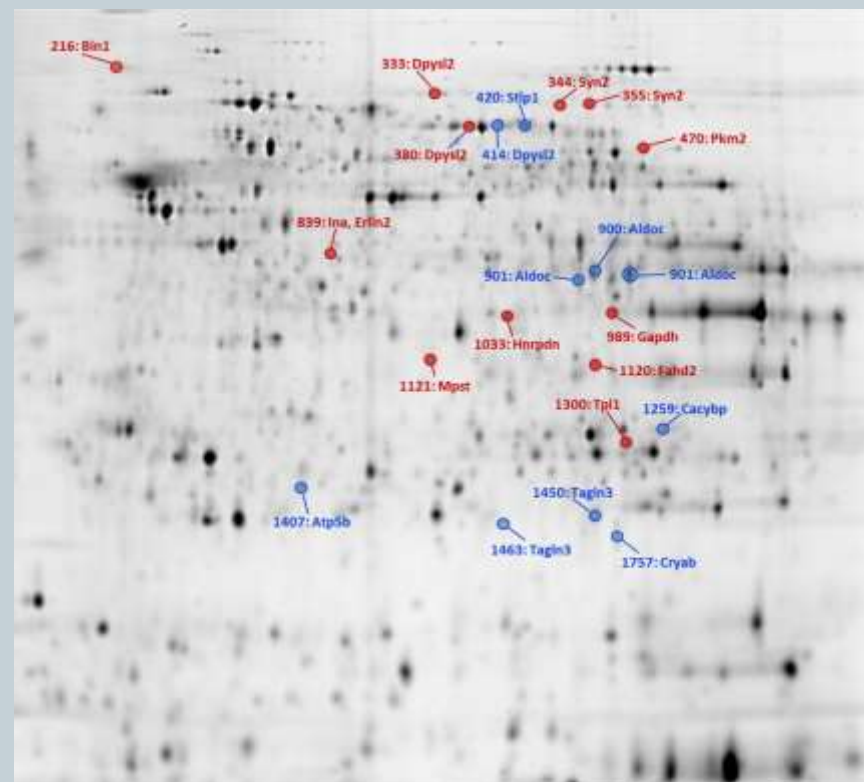
Az MPF és POA régiók proteomikai vizsgálata anyákban



MPF: 32 fehérjevaltozás (25 ↑, 7↓)



POA: 18 fehérjevaltozás (13 ↑, 5↓)



Az MPF-ben kapott szignifikáns fehérjeváltozások funkcionális csoportosítása (Uniprot, Gene Ontology)



protein synthesis and folding										
307	O35814	Stip1	Stress-induced-phosphoprotein 1	1,10	0,0020	15	36,6	62571	6,4	cytoplasm, nucleus
317				1,13	0,0095	28	48,3	62571	6,4	
354	P28480	Tcp1	T-complex protein 1 subunit alpha	1,20	0,0030	12	34,0	60360	5,9	cytoplasm
640	P85834	Tufm	Elongation factor Tu, mitochondrial	1,15	0,0066	8	23,9	49523	7,2	mitochondrion
response to oxidative stress, apoptosis										
1286	O35244	Prdx6	Peroxiredoxin-6	1,22	0,0065	18	78,6	24819	5,6	cytoplasm
1420	P23928	Cryab	Alpha-crystallin B chain	1,80	0,0002	7	34,3	20089	6,8	cytoplasm, nucleus
1430				1,86	0,0059	2	21,7	20089	6,8	
1596	Q5U318	Pea15	Astrocytic phosphoprotein PEA-15	1,47	0,0016	3	30,0	15040	4,9	cytoplasm
cytoskeleton organisation										
1565	Q6PEC1	Tbca	Tubulin-specific chaperone A	-1,60	0,0047	8	43,5	12744	5,4	cytoplasm
544	P85108	Tubb2a	Tubulin beta-2A chain	1,13	0,0281	32	67,0	49907	4,8	cytoplasm, nucleus
545	P69897	Tubb5	Tubulin beta-5 chain	1,15	0,0224	31	66,2	49671	4,8	cytoplasm, nucleus
cell cycle										
757	D3ZDH8	Gp1bb	Septin 5, isoform CRA_d	1,15	0,0354	17	47,4	43893	6,2	synapse, plasma membrane
1483	P60841	Ensa	Alpha-endosulfine	-1,26	0,0476	5	41,3	13335	6,6	cytoplasm
protein transport										
325	B5DF55	Stam	RCG55706	1,16	0,0065	14	30,3	59593	4,7	cytoplasm
transcription										
883	Q68A21	Purb	Transcriptional activator protein Pur-beta	-1,13	0,0240	6	45,7	33418	5,3	nucleus
ion transport										
932	Q99MZ8	Lasp1	LIM and SH3 domain protein 1	-1,06	0,0146	3	14,1	29971	6,6	cytoplasm
protein degradation										
1224	Q6AYK6	Cacybp	Calcyclin-binding protein	1,12	0,0001	8	48,5	26541	7,6	cytoplasm, nucleus

A POA-ben kapott szignifikáns fehérjeváltozások funkcionális csoportosítása (Uniprot, Gene Ontology)



hydrolase										
1120	B2RYW9	Fahd2	Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2	1,10	0,0146	6	25,2	34582	8,6	mitochondrion
ion transport										
1033	Q99MZ8	Lasp1	LIM and SH3 domain protein 1	1,06	0,0287	3	14,1	29971	6,6	cytoplasm
transcription										
1033	Q3SWU3	Hnrpdn	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	1,06	0,0287	3	11,5	35294	9,1	nucleus, cytoplasm
hydrogen sulfide biosynthetic process										
1121	P97532	Mpst	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	1,17	0,0139	8	39,1	32941	5,9	synapse, mitochondrion, cytoplasm
synaptic transmission										
344	Q63537	Syn2	Synapsin-2	1,11	0,008	16	41,1	63457	8,7	synapse
355				1,09	0,0037	14	41	63457	8,7	

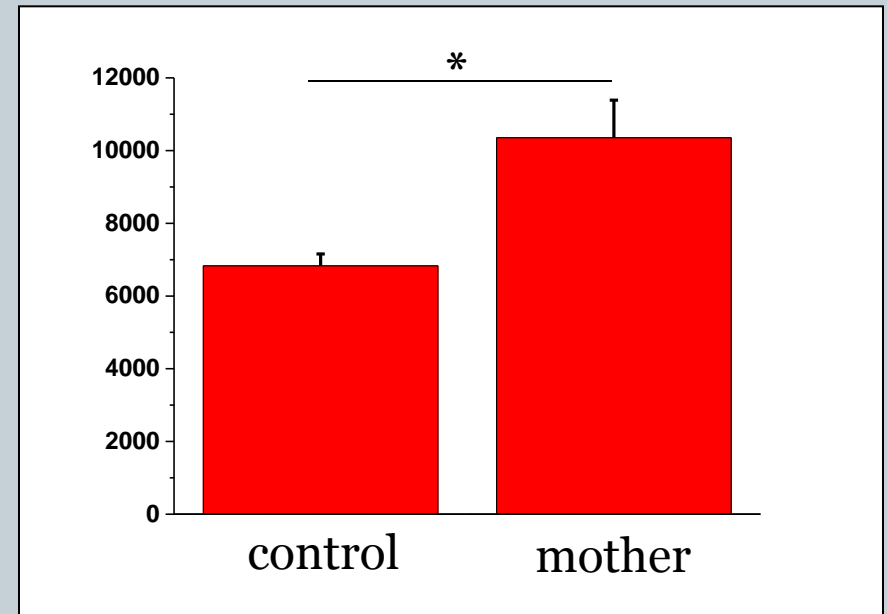
→ Legnagyobb változás: (-1.66 ↓)

A Hsp20 családba tartozó hősokk protein, mely az oxidatív stressz és apoptózis folyamatában is szerepet játszik. Emelkedett szintjét számos idegrendszeri betegségben leírták.

A legnagyobb szignifikáns változás megerősítése az MPF-ben – Western blotting



Jelölés: primer és ECL Plex CyDye conjugált anti-goat IgG secunder antitestek
Megjelenítés: Typhoon fluorescent laser scanner
Kvantálás: ImageQuant TL software



Az eloszlás vizsgálata az MPF-ben (IHC)



- **DAB-immunfestés**

- immunreaktív idegsejtek: a prelimbikus és infralimbikus cortex IV.-V. rétegében
- immunreaktivitás növekedett mértékű anyákban

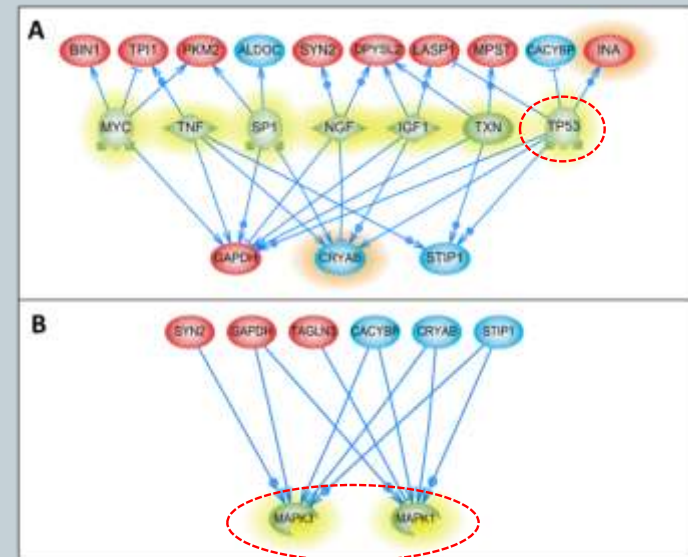
A kolokalizációjának vizsgálata parvalbumin illetve calbindin pozitív sejtekkel



- **Duplafestés**
- **Parvalbumin (GABAerg interneuronokban található kalcium kötő fehérje)**
- **Calbindin (kalcium kötő fehérje)**

→ kolokalizáció: parvalbumin pozitív sejtekkel

A megváltozott anyai fehérjék közös regulátor illetve target analízise (Pathway studio)



Kinases: SRC / proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src; MAPK3: Mitogen-activated protein kinase 3, MAPK1: Mitogen-activated protein kinase 1; AKT1: RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, CDK5: cyclin-dependent-like kinase 5

Growth factors: IGF1 / Insulin-like growth factor I; NGF / beta-nerve growth factor

Transcription factors: JUN / Transcription factor AP-1; SP1 / transcription factor Sp1; REST / RE1-silencing transcription factor; MYC / Myc proto-oncogene protein

Tumor suppressors: TP53: /cellular tumor antigen p53

Signaling molecules: IL1B/Interleukin-1 beta; TXN / Thioredoxin

Cytokines: TNF / Tumor necrosis factor,

Hormones: INS / Insulin; AGT / angiotensinogen

Developmental proteins: SEMA3A / semaphorin-3A

Konklúzió



- Az utódgondozás együtt jár az MPF és a POA agyrégiók proteomikai megváltozásával
- A megváltozott fehérjék többségének mennyisége emelkedett szintet mutatott anyákban
- Az anyai fehérjeváltozások többsége különböző növekedési faktorok és szignalizációs fehérjék szabályozó hatása alatt állnak, továbbá közös targetjei a MAPK1 és 3 jelátviteli fehérjék
- A legnagyobb mennyiségi változást mutató kis hősök fehérje a parvalbumin pozitív sejtekben expresszálódik. Szerepet játszik az apoptózisban és az idegsejtek fejlődésben, melyek nagy jelentőséggel bírhatnak a parvalbumin pozitív neuronok anyai adaptációjában.