

A Mitokondrium- Asszociált Membrán (MAM) szerepe az Alzheimer-kór patomechanizmusában

A MAM proteomikai vizsgálatának előkészületei

***Badics Kata
Proteomikai Labor***

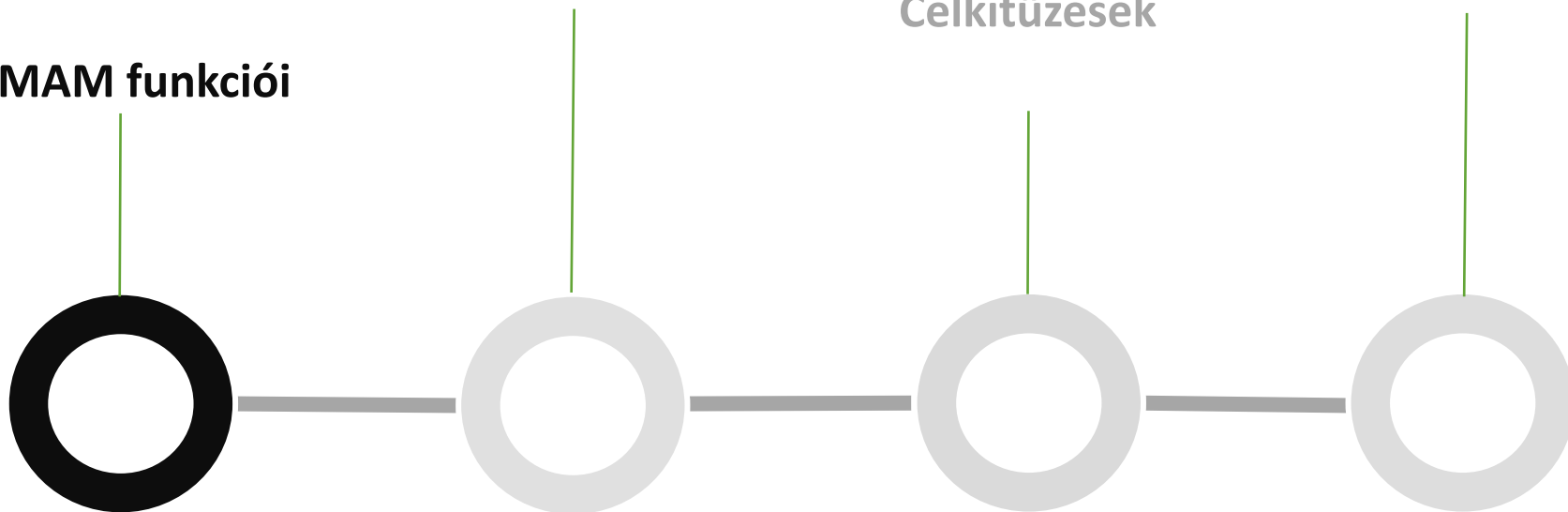
2015.04.16.

A MAM funkciói

A MAM szerepet az AD
patomechanizmusában

Célkitűzések

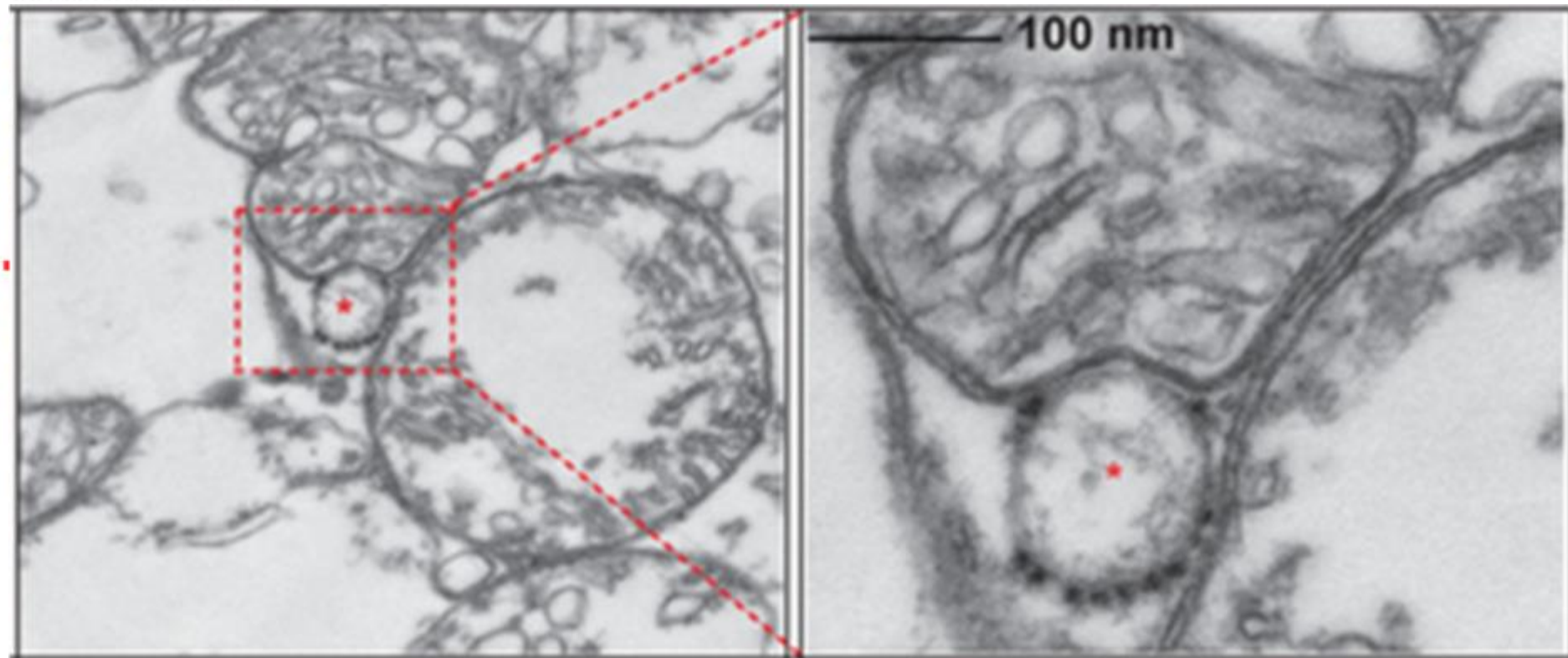
Eddigi
eredményeink



Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria.

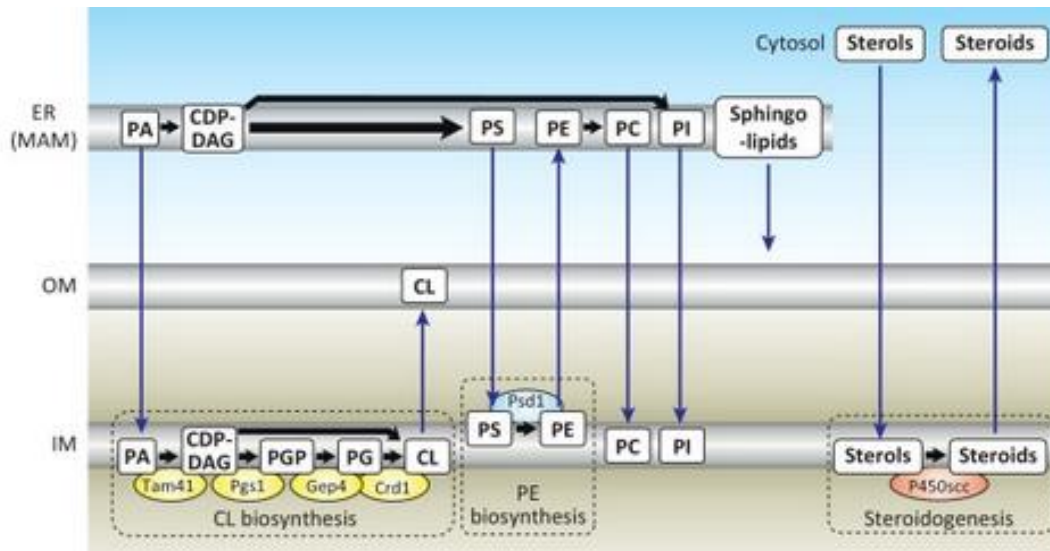
Vance JE¹.

⊕ Author information

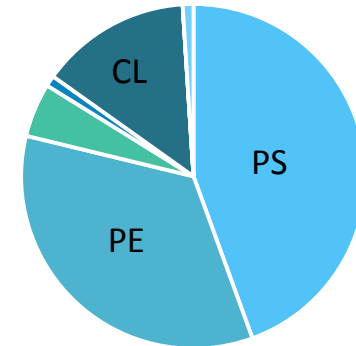


- A mitokondriumhoz-asszociált különleges felépítésű ER fragmentum -> MAM.
- Intracelluláris lipid-raft-szerű mikrodomén (detergens-rezisztens; legnagyobb részt PtdCho, de sok koleszterin, glikolipid és szfingolipid)
- Szerepe: Lipid- , Glükóz- , Koleszterin-metabolizmus , valamint Ca^{2+} homeosztázis szabályozása

A MAM szerepe a lipid-szintézisben és transzportban



A mitokondrium lipid-összetétele



MAM-ban lokalizált lipid-szintézisben résztvevő fehérjék:

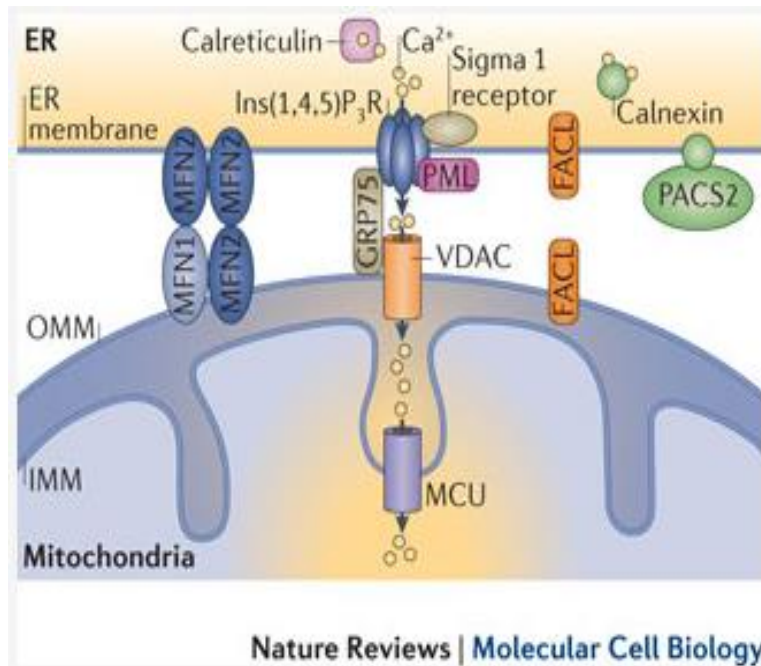
- **DGAT**(diacilglicerol-aciltranszferáz)
- **PSS**(foszfatidilszerin szintáz)
- **ACAT1**(acil-Coa koleszterol aciltranszferáz 1)
- **PEMT2**(foszfatidiletanolamin-N-metiltranszferáz)
- **FACL4** (Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4)

MAM-ban lokalizált lipid-traszportban résztvevő fehérjék:

- **ERMES: Mdm34,Mdm10,Mdm12,Mmm1** (Mitochondrial distribution and morphology protein 34,21,12 , Maintenance of mitochondrial morphology protein 1)
- **S100B**
- **apoE, apoB, apoC** (apolipoprotein E,B,C)
- **Sigma1R**

A MAM szerepe a Ca^{2+} homeosztázis szabályozásában

Rosario Rizzuto, Diego De Stefani, Anna Raffaello & Cristina Mammucari, 2012, Nature



MFN2 : Mitofusin 2
GRP75(Hspa9): glucose-regulated protein
VDAC1 : voltage-dependent anion selective channel protein 1
IP3R :inositol-1,4,5-trisphosphate receptor
FACL:Long-chain-fatty-acid--CoA ligase
PML 1 :RING finger protein 71
 ->inactivate Akt 1
PACS1 :Phosphofurin acidic cluster sorting protein 1

Normális reguláció esetén:

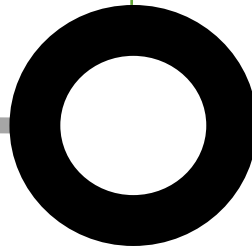
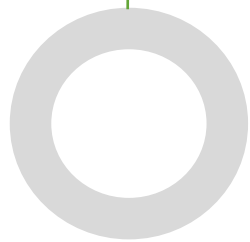
$(\text{IP3R})_{\text{open}} \rightarrow [\text{Ca}^{2+}]_{\text{m}} \uparrow \rightarrow (\text{IP3R})_{\text{close}}$

Abnormális reguláció esetén:

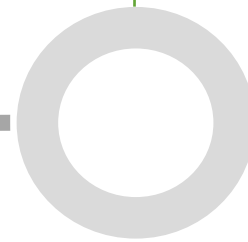
$(\text{IP3R})_{\text{open}} \rightarrow [\text{Ca}^{2+}]_{\text{m}} \uparrow \rightarrow (\text{IP3R})_{\text{open}} \rightarrow [\text{Ca}^{2+}]_{\text{m}} \uparrow\uparrow \rightarrow \text{mPTP}_{\text{open}} \rightarrow \text{APOPTÓZIS}$

A MAM szerepe az AD patomechanizmusában

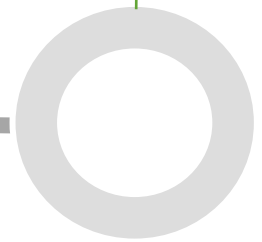
A MAM funkciói

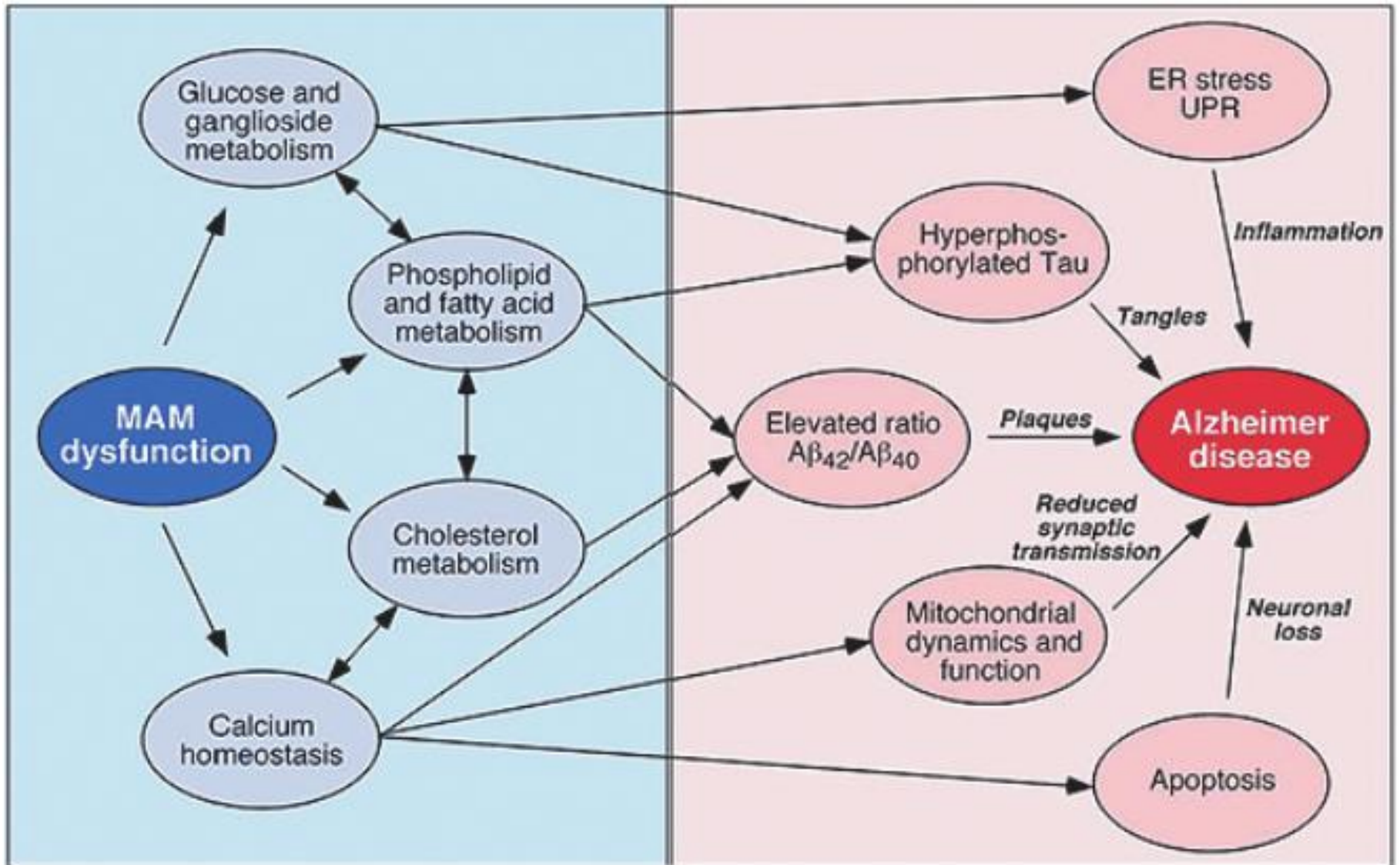


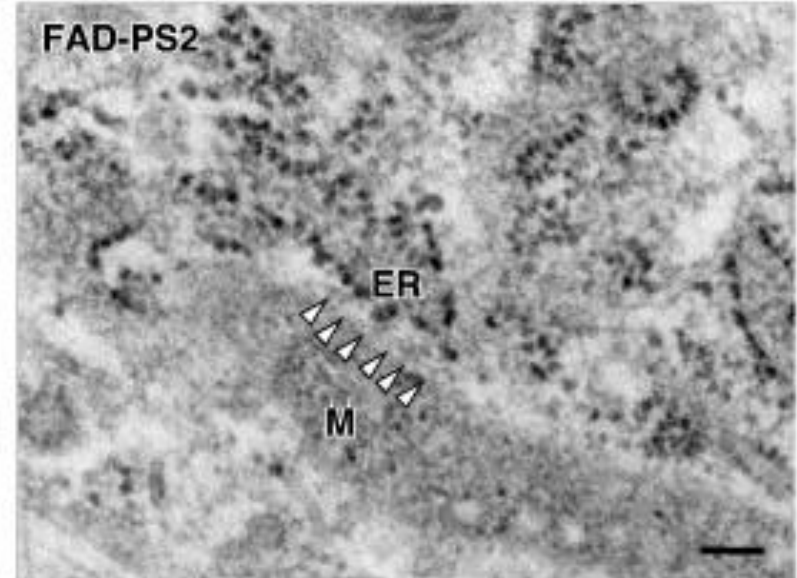
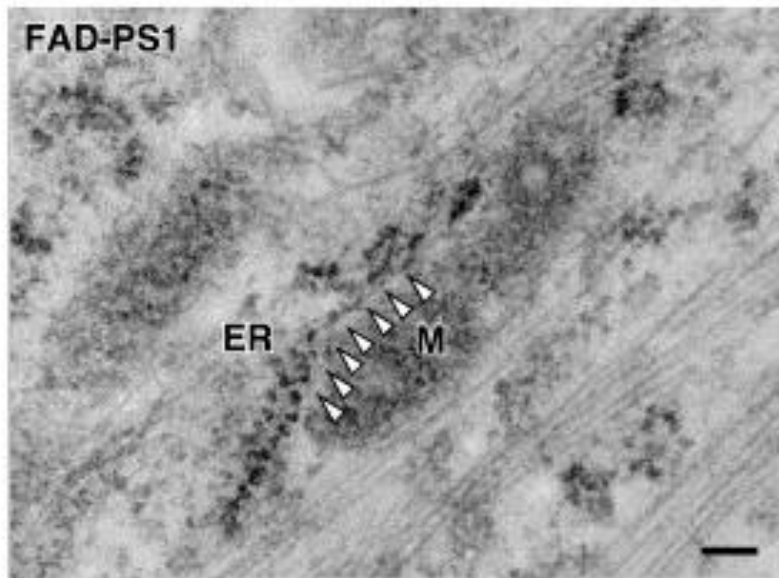
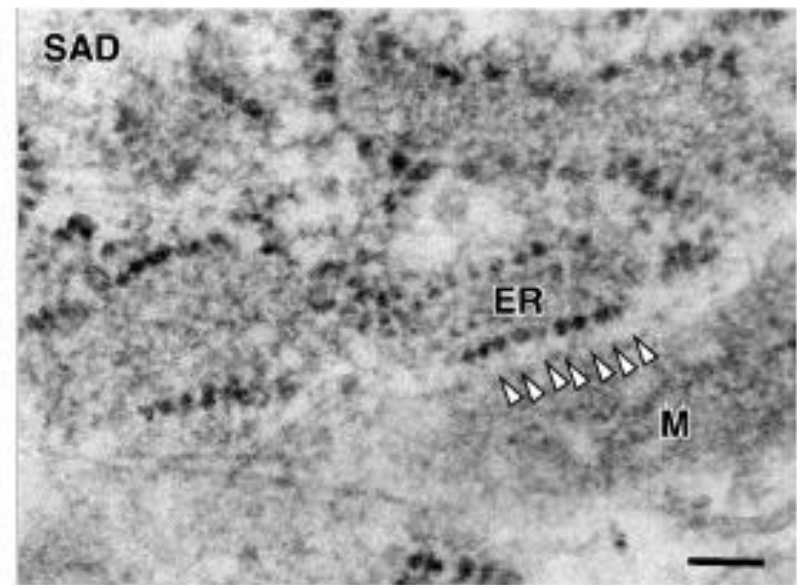
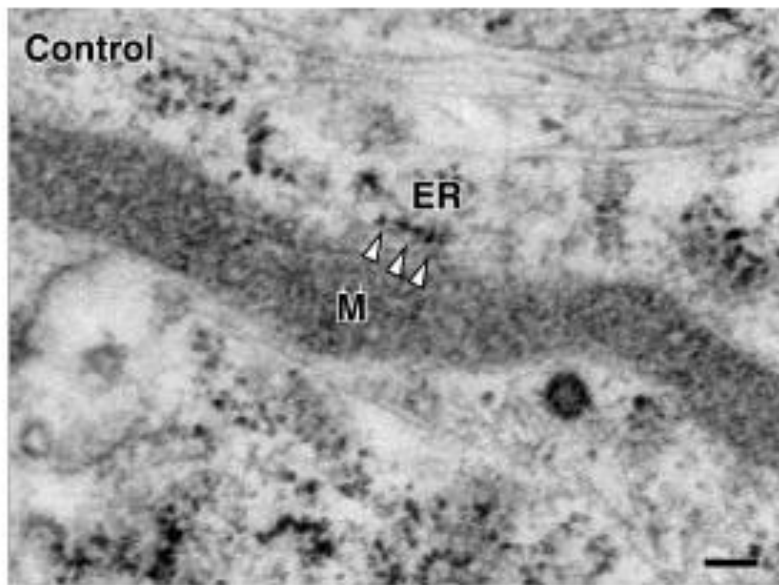
Célkitűzések



Eddigi eredményeink







Eric A. Schon and Estela Area-Gomez 2012

Review

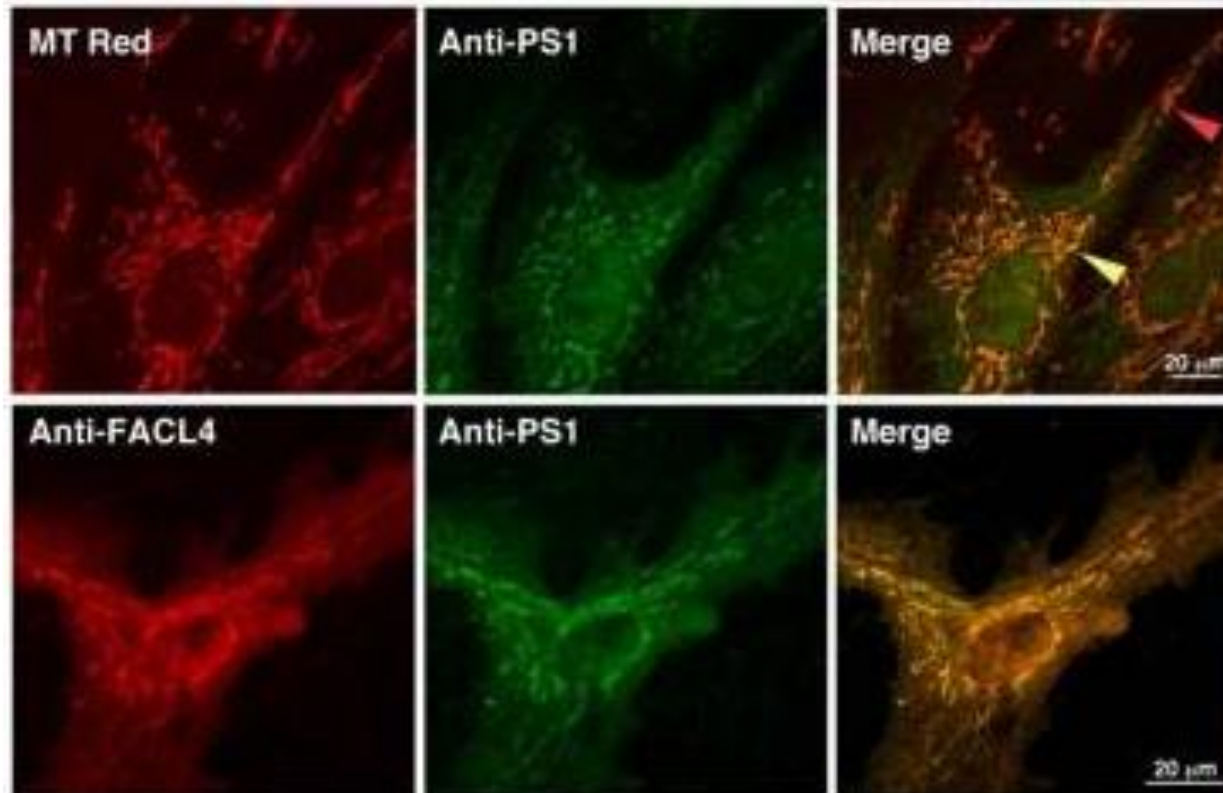
Is Alzheimer's Disease a Disorder of Mitochondria-Associated Membranes?

Eric A. Schon^{a,b,*} and Estela Area-Gomez^a

^a*Department of Neurology, Columbia University Medical Center, New York, NY, USA*

^b*Department of Genetics and Development, Columbia University Medical Center, New York, NY, USA*

Accepted 5 April 2010



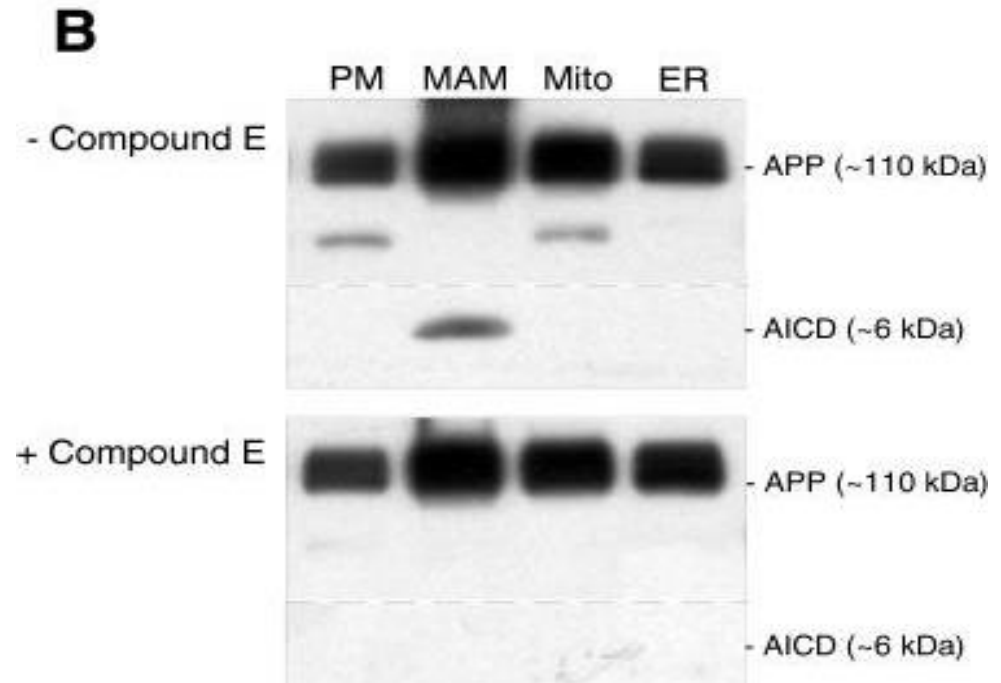
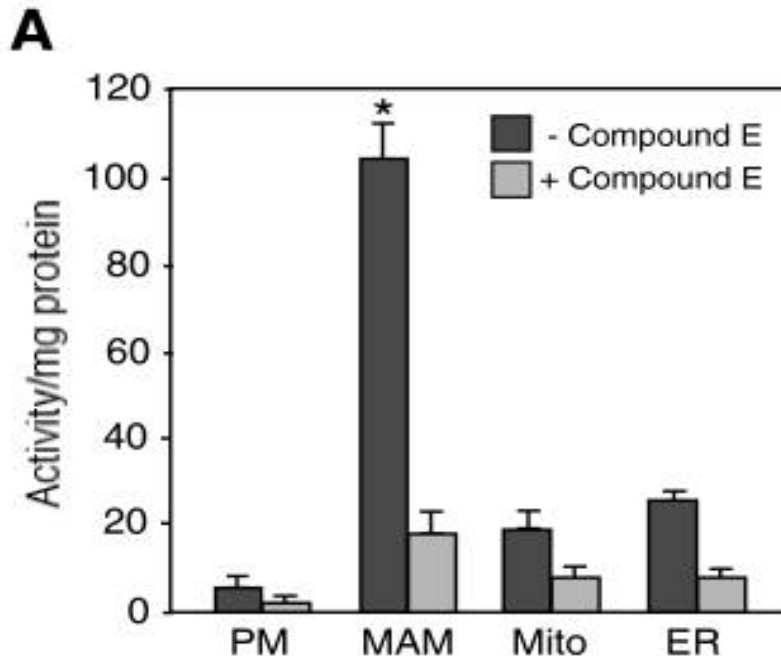
Review

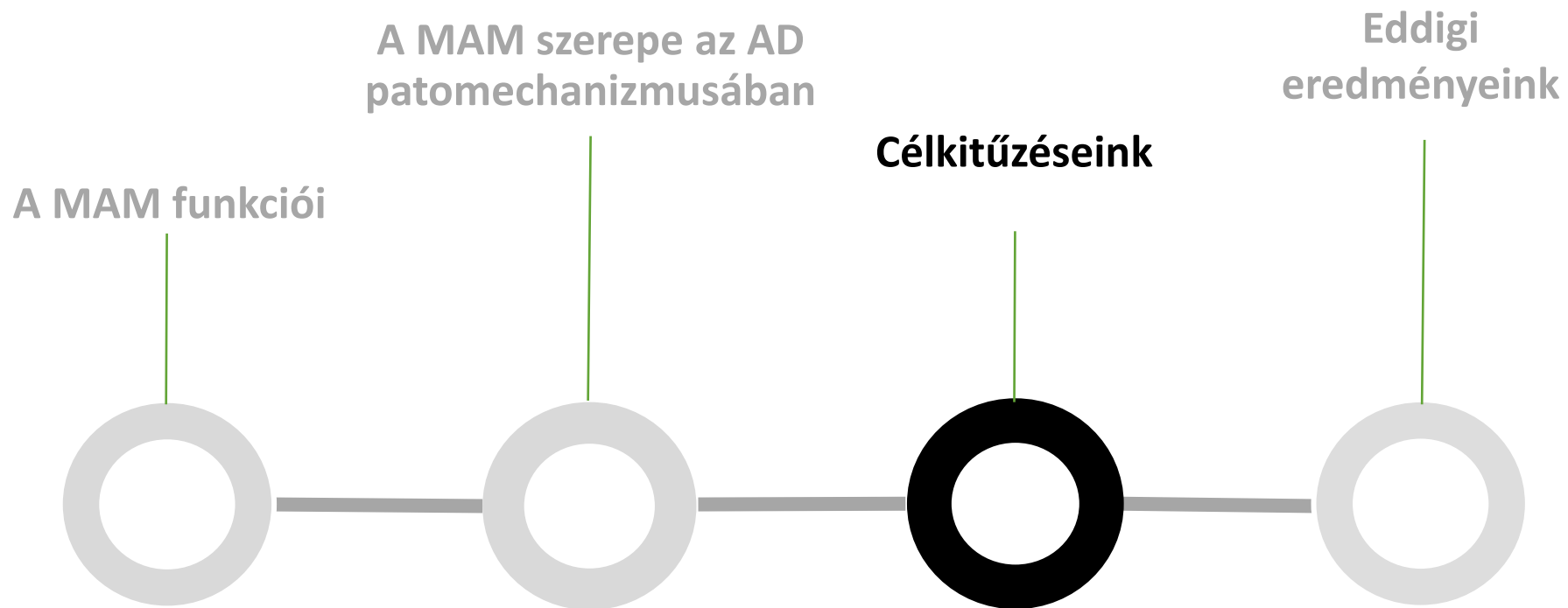
Is Alzheimer's Disease a Disorder of Mitochondria-Associated Membranes?

Eric A. Schon^{a,b,*} and Estela Area-Gomez^a

^aDepartment of Neurology, Columbia University Medical Center, New York, NY, USA

^bDepartment of Genetics and Development, Columbia University Medical Center, New York, NY, USA





Célkitűzések:

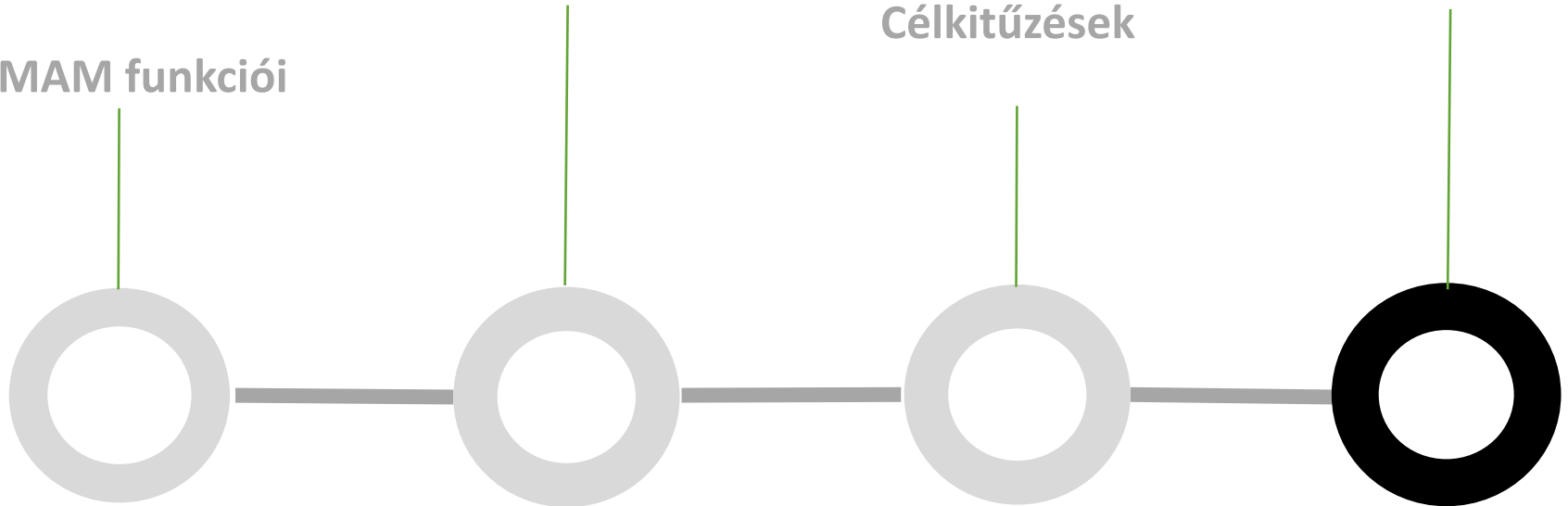
- 3 hónapos APP/PS1 amiloid overexpresszáló transzgén egérmódellemel MAM proteomjának elkészítése
- A fehérje-változások alapján korai biomarkerek keresése.

A MAM szerepe az AD patomechanizmusában

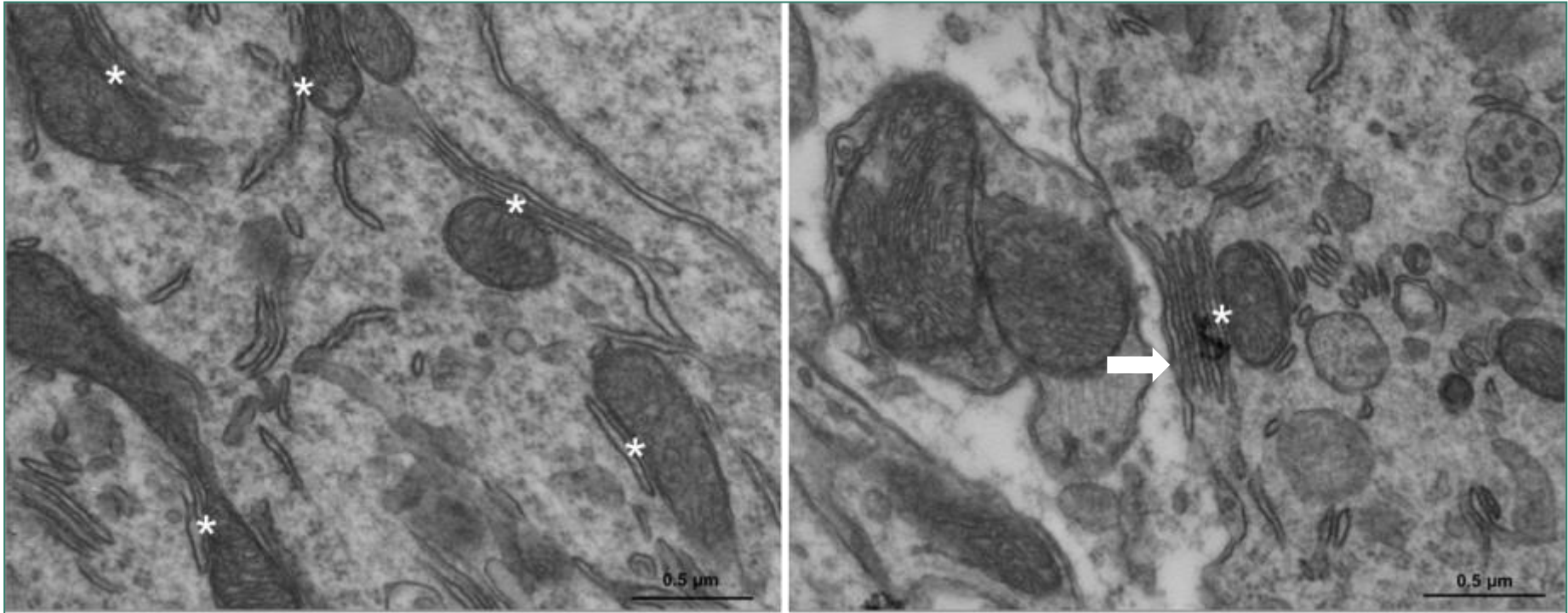
Eddigi eredményink

A MAM funkciói

Célkitűzések

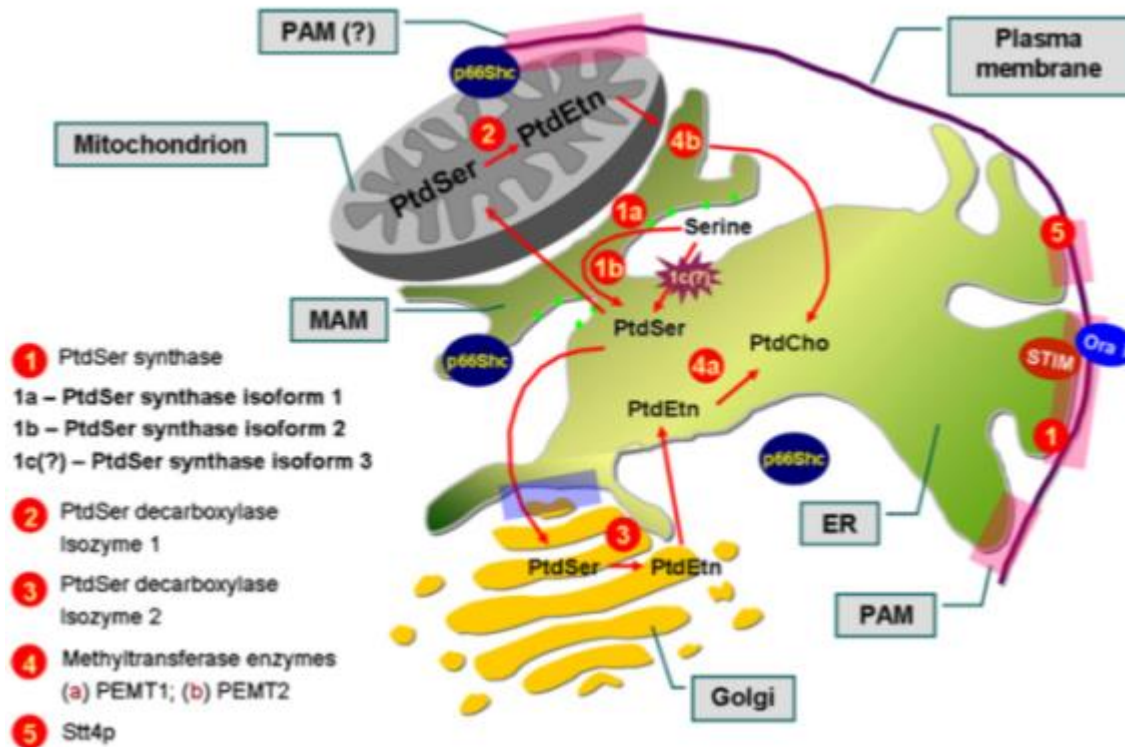


Elektronmikroszkópos kép a *MAM*, valamint *PAM* fragmentumokról



A csillagok a **MAM**-t , a nyíl a **PAM (Plazmamembrán-asszociált ER membrán)** fragmentumot jelöli (*Kis Viktor*)

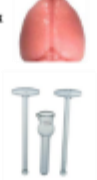
A Plazmamembrán-asszociált ER / Mitokondrium Membrán szerepe



Szerepe:

- Kapacitív Ca²⁺ beáramlás szabályozása
- Koleszterin szintézis / transzport
- IP3 szignalizáció
- p66Shc -> oxidatív stresszre adott sejtválasz regulálása

200 mg mouse cortex



Homogenization:
Loose-fitting glass homogenizer
8-10 strokes

Centrifugation:
740 g 5 min. 4°C

Supernatant
740 g 5 min. 4°C

Centrifugation
20 000g 30 min. 4°C
100 000g 60 min. 4°C

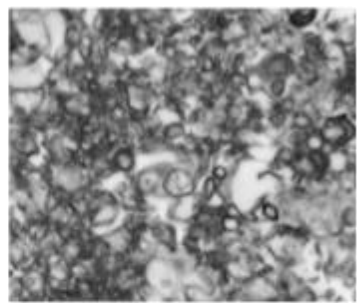


MAM

Pellet
9000 g 10 min. 4°C

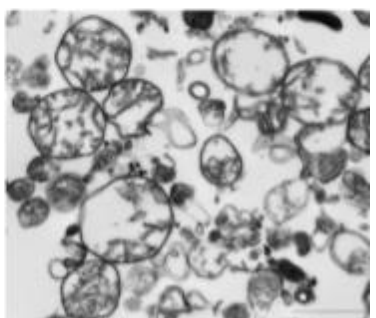


Layer suspension of crude mitochondria
pellet on top of Percoll medium
95 000 g 30 min. 4°C



Centrifugation
6 300g 10 min. 4°C
100 000 g 60 min. 4°C

Mitochondria



Centrifugation
6 300g 10 min. 4°C
100 000 g 60 min. 4°C

MAM



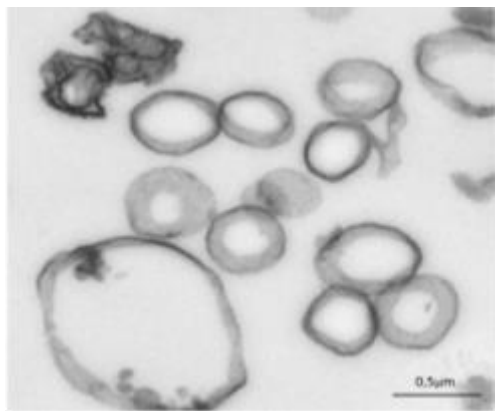
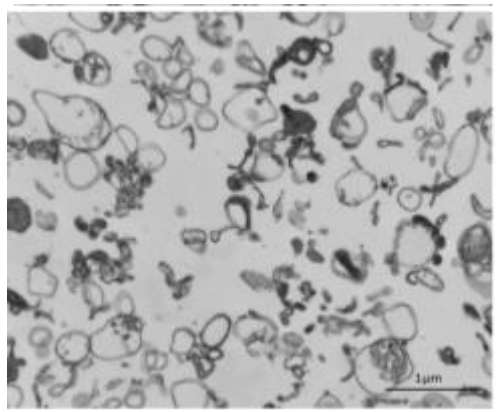
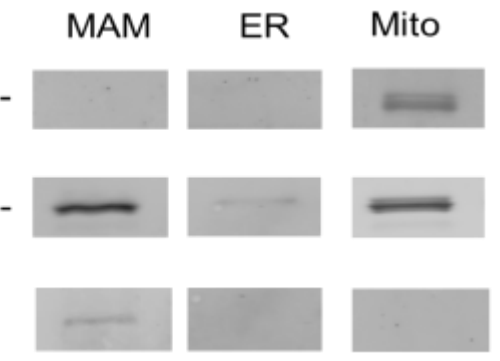
PAM

Supernatant 12.000 rpm 10 min 4C

Supernatant 70.1 Ti 19.000 rpm 20 min 4C

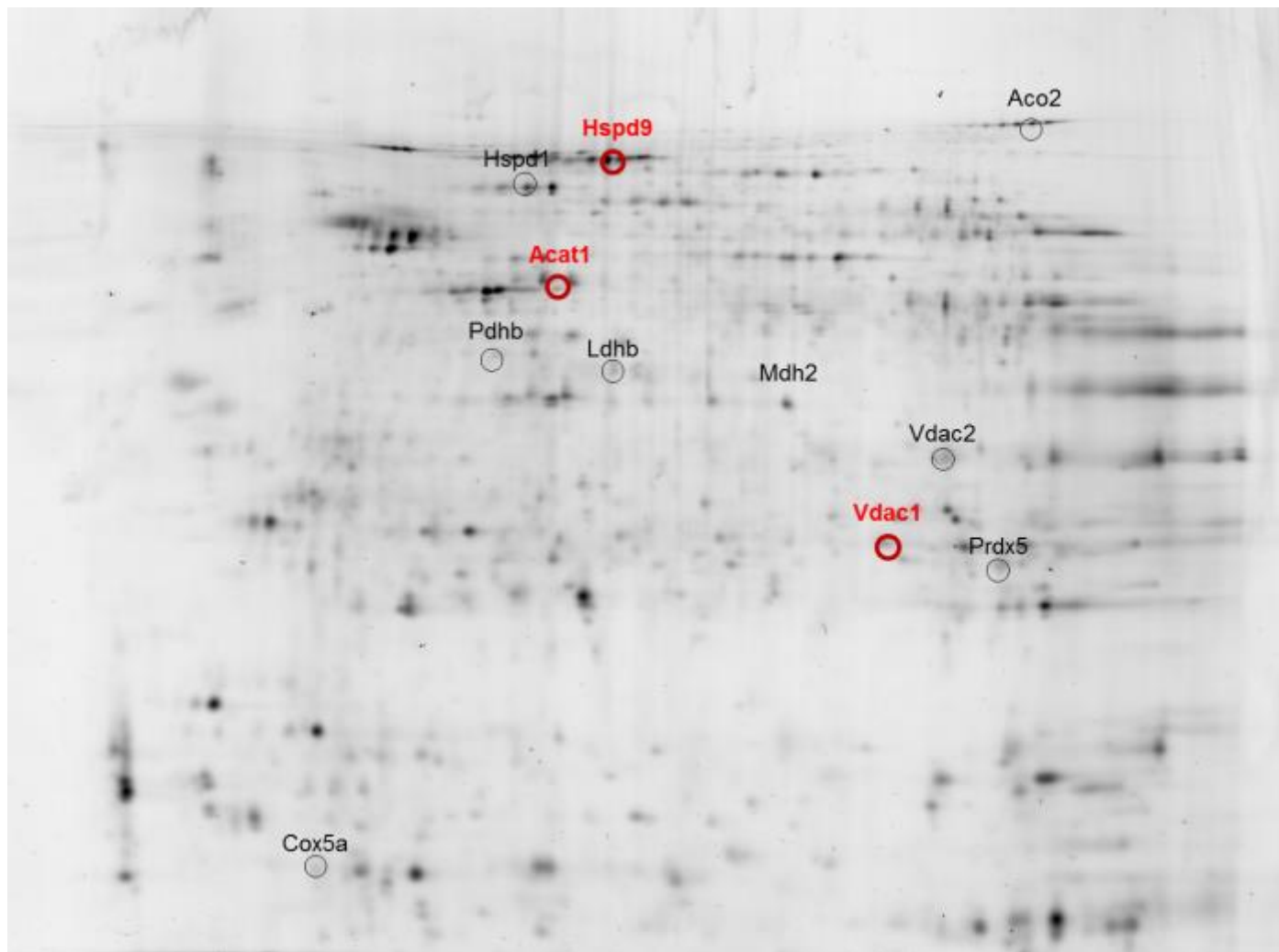
Pellet resuspend in 10 ml SB 70.1 Ti 19.000 rpm 20 min 4C

Pellet resuspend in PMBR (1,5ml) and layer on sucrose gradient SW40 28 000 rpm 150 min. 4C

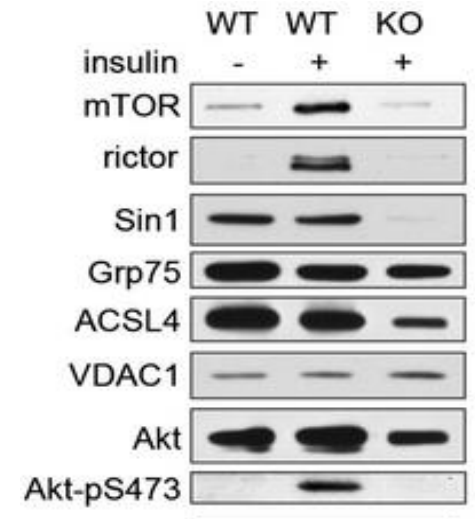
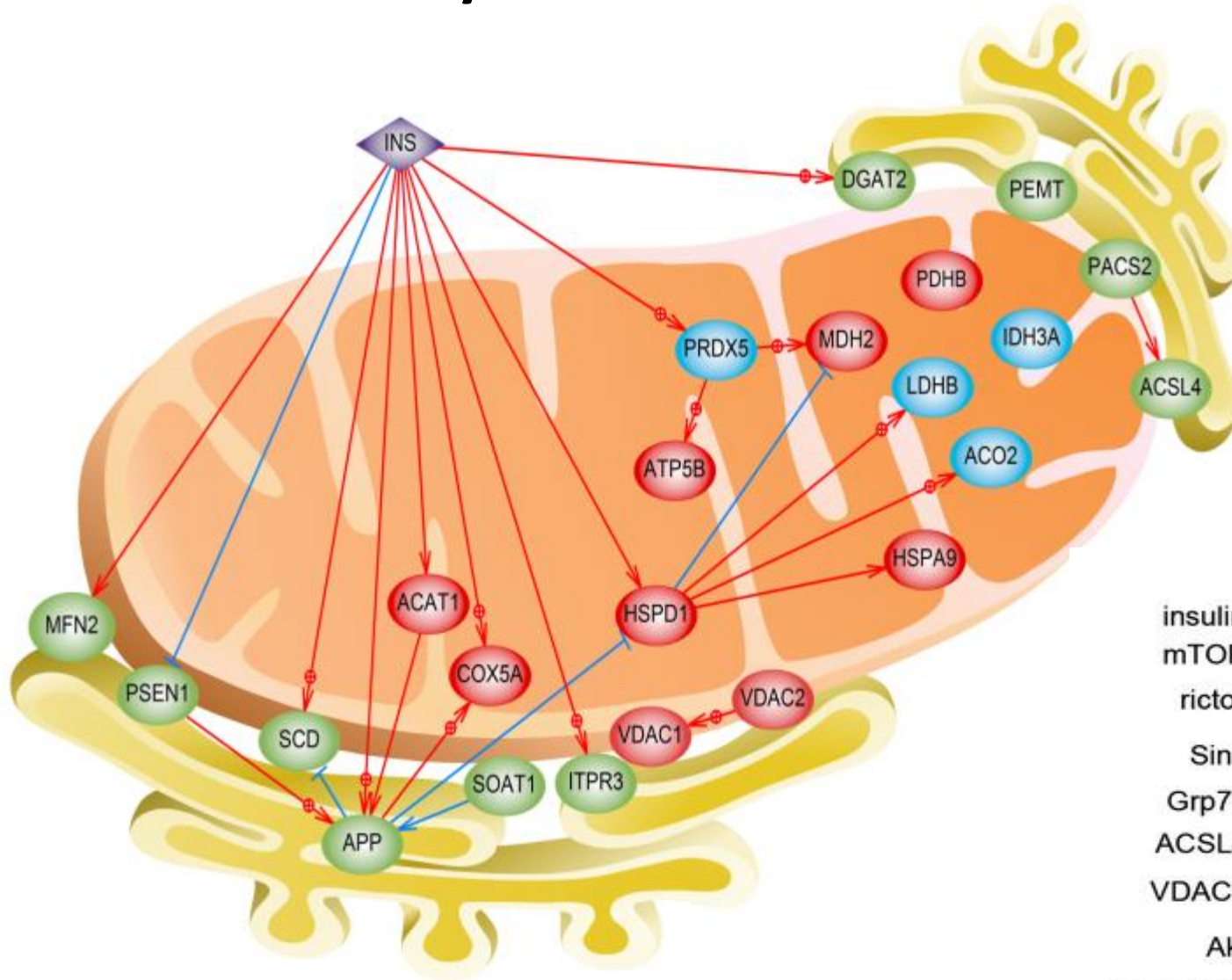


MR. Wieckowski (2009) és JM. Suski (2014) Nature

Reprezentatív gélkép a mitokondrium-associált membrán fragmentum fehérjekészletéről



Pathway Studio szoftveres analízis



MAM

Betz C. et al. 2013 Proc.Natl.Acad Sci USA

Köszönetnyilvánítás:

Völgyi Katalin

Juhász Gábor

Kis Viktor

Puska Gina

Szigeti Krisztián

Gulyássy Péter

Kékesi Adrienna Katalin