

Az Alzheimer-kór

kutatásának mitokondriális megközelítése:

Szinaptikus és nem-szinaptikus mitokondriumok proteomikai elemzése β -amyloid overexpresszáló APP/PS1 egerekben

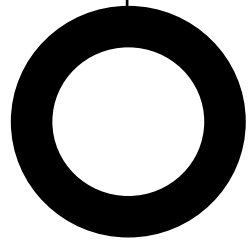
Völgyi Katalin

ELTE, Proteomikai Labor

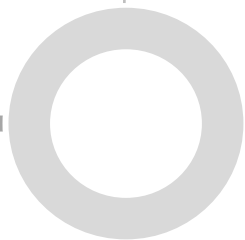
MTA-ELTE, Molekuláris és Rendszer Neurobiológiai Kutatócsoport

2015.04.16.

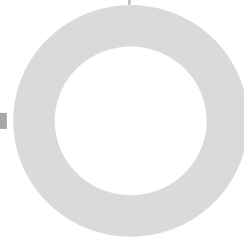
**Az Alzheimer-kór
patomechanizmusa**



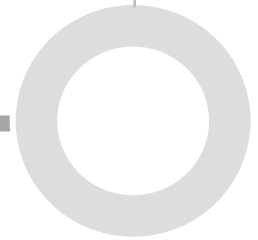
Célkitűzések



**Kísérleti
eredmények
bemutatása**



Konklúzió

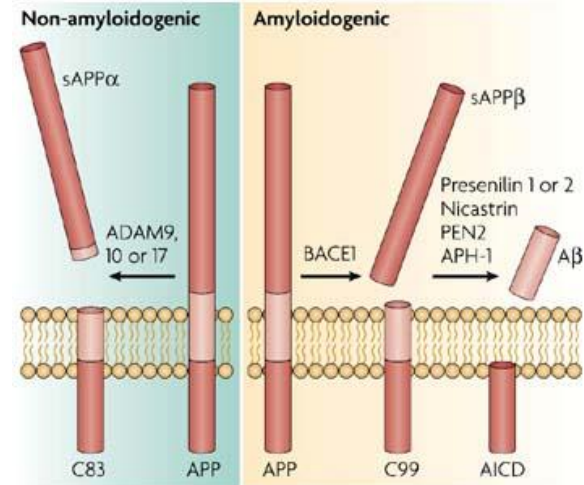
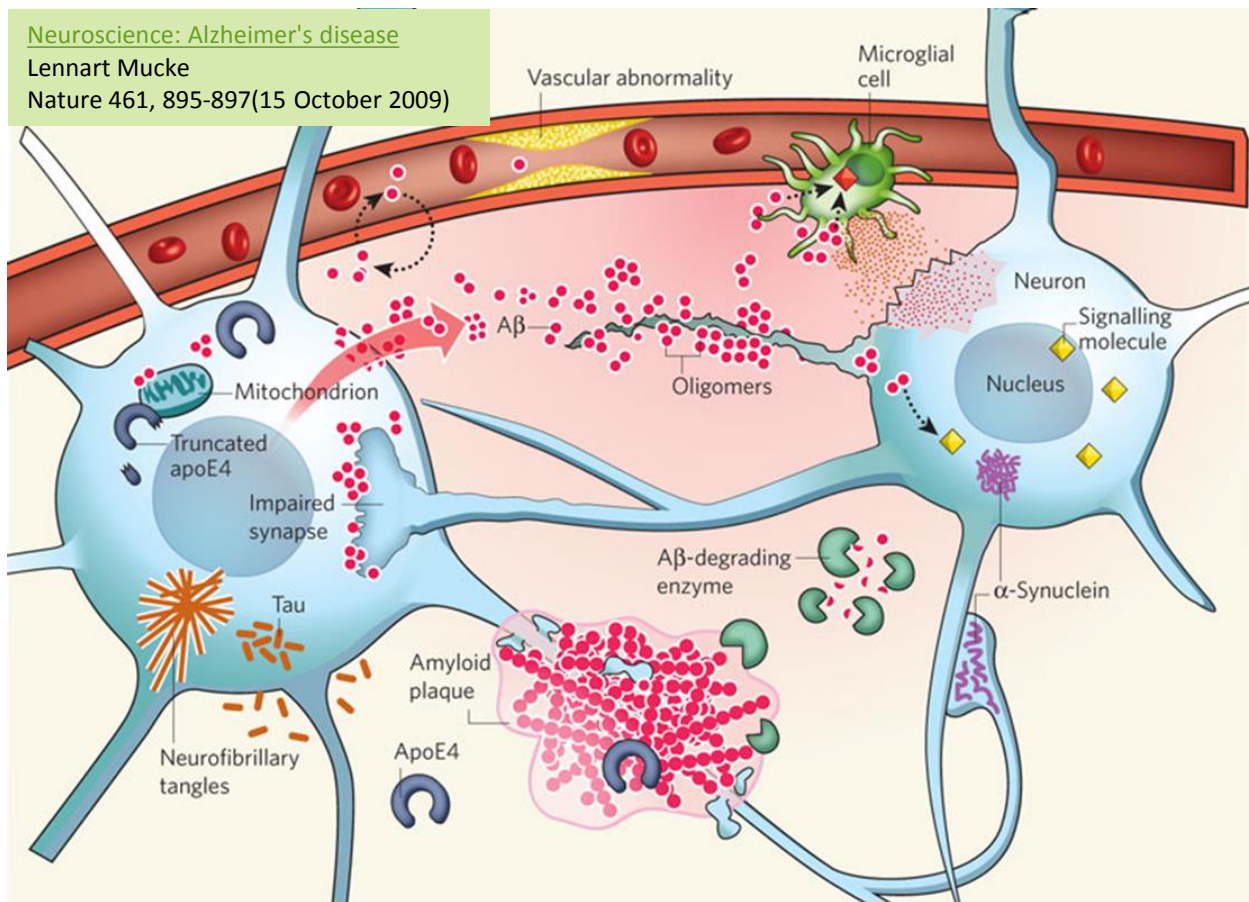


Az Alzheimer-kór kialakulásának lehetséges okai

Neuroscience: Alzheimer's disease

Lennart Mucke

Nature 461, 895-897(15 October 2009)



Nature Reviews | Neuroscience

Intracellular amyloid- in Alzheimer's disease

Frank M. LaFerla, Kim N. Green & Salvatore Oddo
Nature Reviews Neuroscience 8, 499-509 (July 2007)
doi:10.1038/nrn2168

➤ Multifaktoriális betegség

➤ **Aβ túltermelés** (plakk), tau hiperfoszforiláció (NFT)

➤ Kis, szolubilis Aβ oligomerek a leginkább toxikusak

➤ Koncentráció-függő Aβ

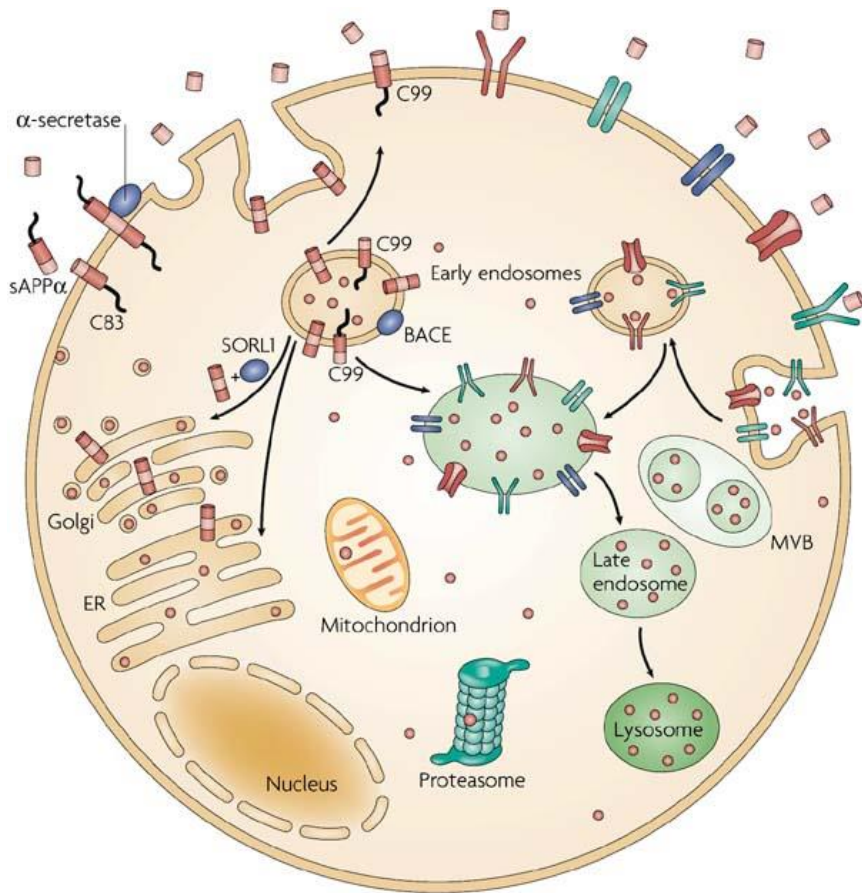
➤ Aggregációs fok függő Aβ

[Brain Res.](#) 2010 Oct 1;1354:227-35. doi: 10.1016/j.brainres.2010.07.061. Epub 2010 Jul 24.

Different electrophysiological actions of 24- and 72-hour aggregated amyloid-beta oligomers on hippocampal field population spike in both anesthetized and awake rats.

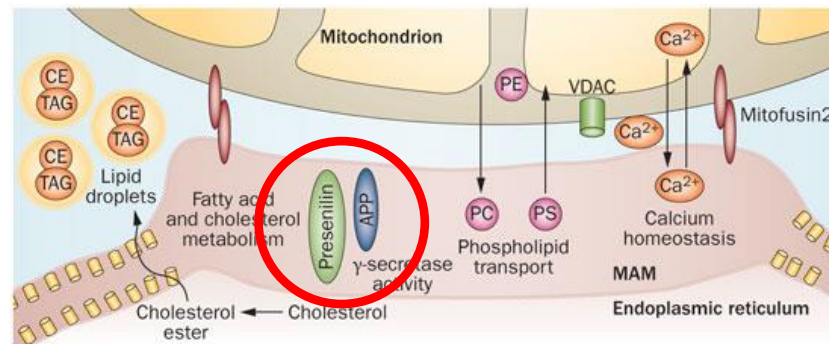
[Orbán G¹](#), [Völgyi K](#), [Juhász G](#), [Penke B](#), [Kékesi KA](#), [Kardos J](#), [Czurkó A](#).

Az intracelluláris APP



→ Jóval az extracelluláris amyloid megjelenése előtt kimutatható

→ APP (amyloid prekursor fehérje): megtalálható a különböző sejtorganellek membránjában is, nem csak a plazmamembránban



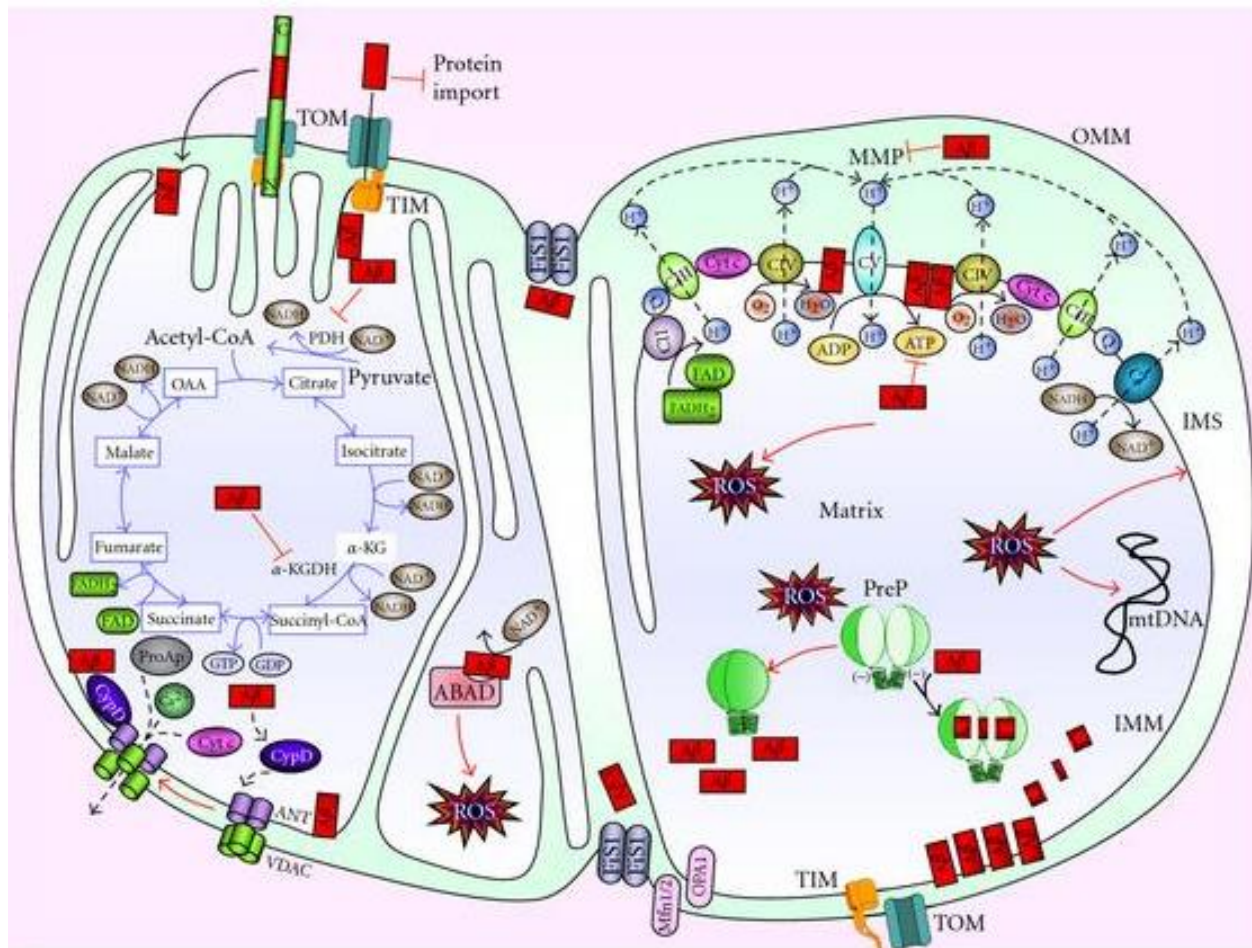
[The clinical maze of mitochondrial neurology](#)
Salvatore DiMauro, Eric A. Schon, Valerio Carelli & Michio Hirano
Nature Reviews Neurology 9, 429-444 (August 2013)
doi:10.1038/nrneurol.2013.126

→ APP: Mitokondrium asszociált ER membránban (MAM)

[Intracellular amyloid- in Alzheimer's disease](#)

Frank M. LaFerla, Kim N. Green & Salvatore Oddo
Nature Reviews Neuroscience 8, 499-509 (July 2007)
doi:10.1038/nrn2168

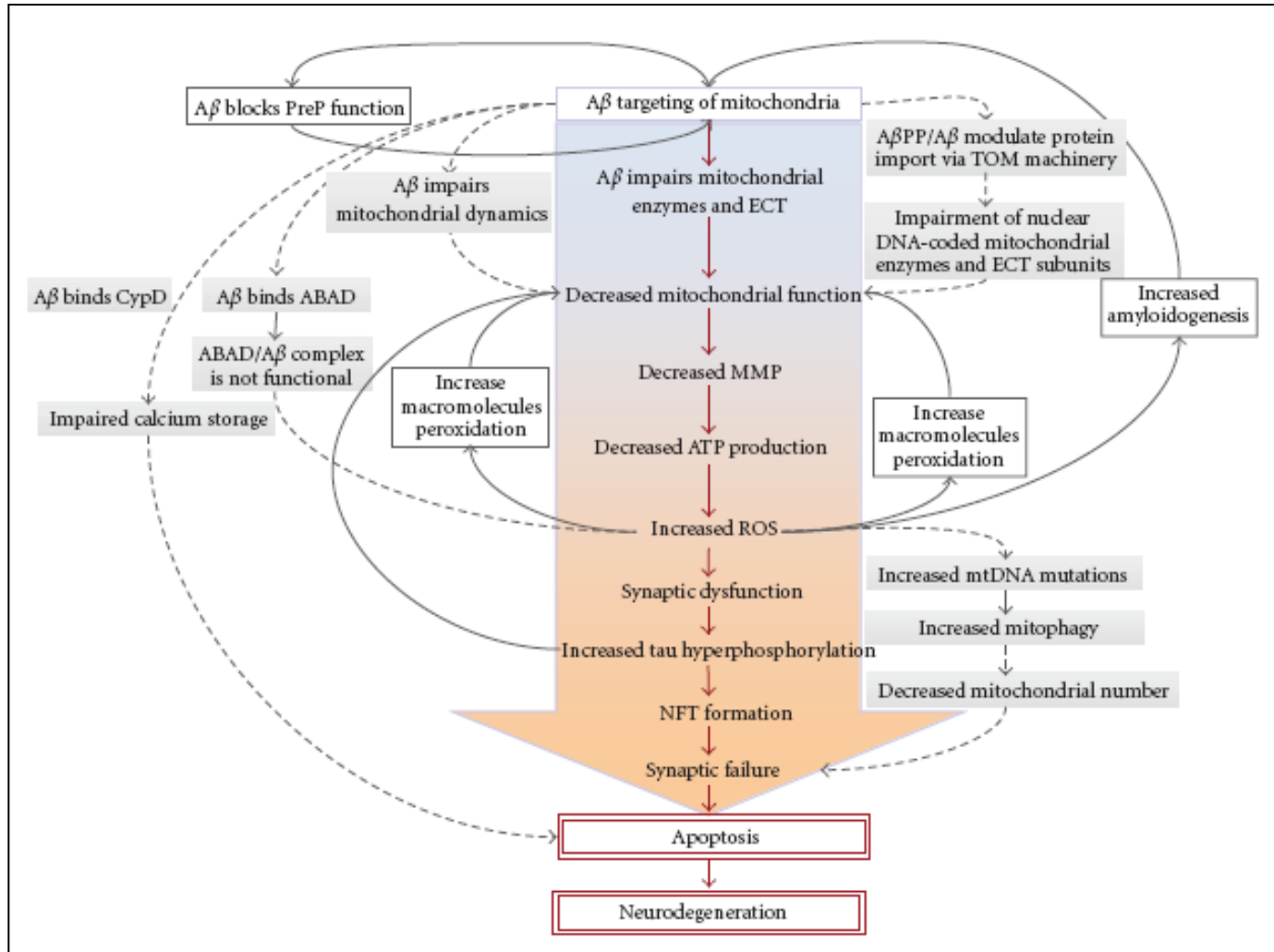
A β -amyloid mitokondriális lokalizációja és interakciói



Int J Alzheimers Dis. 2011 Mar 15;2011:925050. doi: 10.4061/2011/925050.
Amyloid-Beta interaction with mitochondria.
Pagani L¹, Eckert A.

→ **A β** : számos mitokondriális folyamatot befolyásol

Az Alzheimer-kór mitokondriális hipotézise

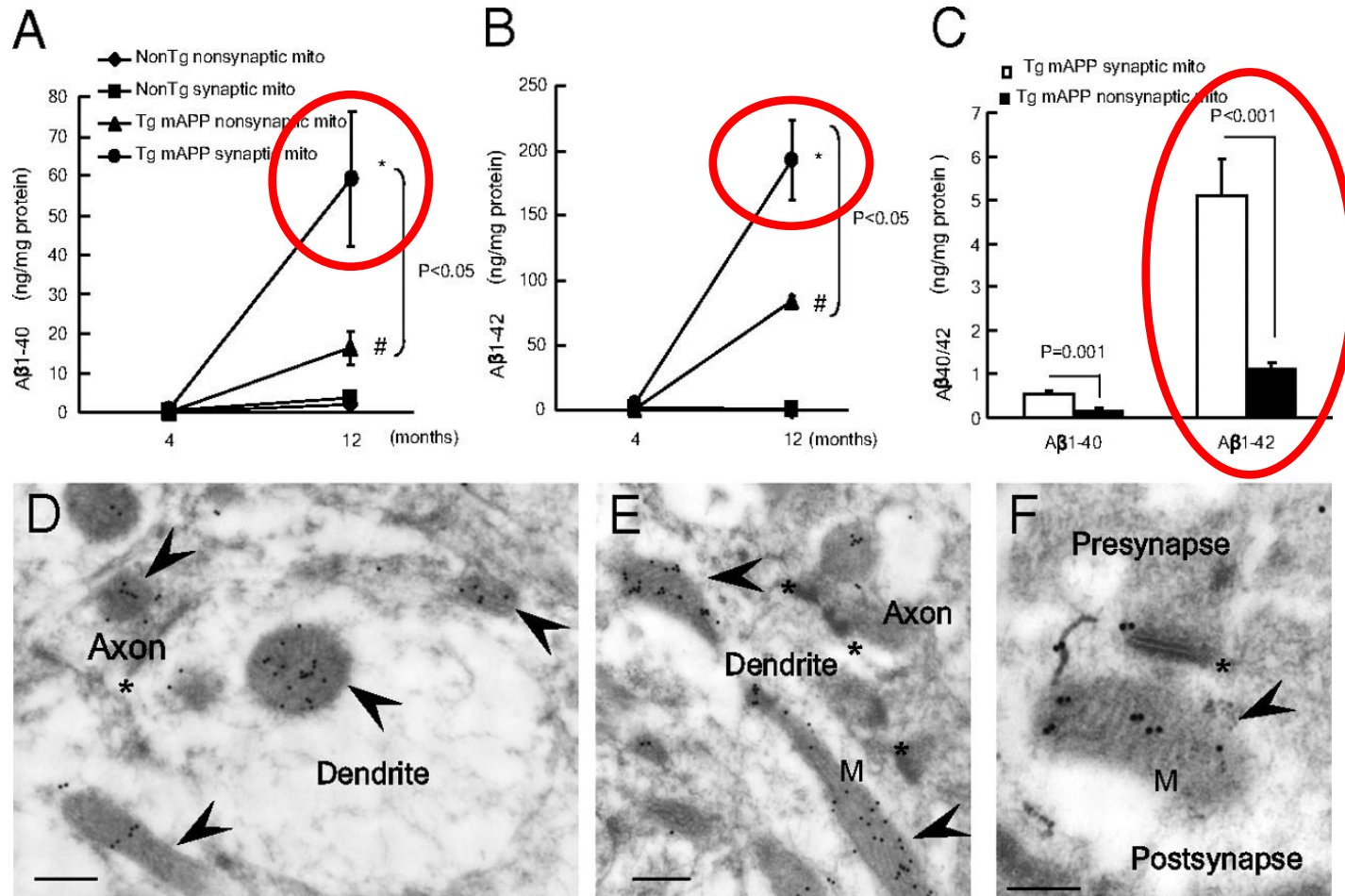


[Int J Alzheimers Dis.](#) 2011 Mar 15;2011:925050. doi: 10.4061/2011/925050.

Amyloid-Beta interaction with mitochondria.

Pagani L¹, Eckert A.

A β -amyloid korai megjelenése a szinaptikus mitokondiumokban



Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Oct 26;107(43):18670-5. doi: 10.1073/pnas.1006586107. Epub 2010 Oct 11.
 Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model.
 Du H¹, Guo L, Yan S, Sosunov AA, McKhann GM, Yan SS.

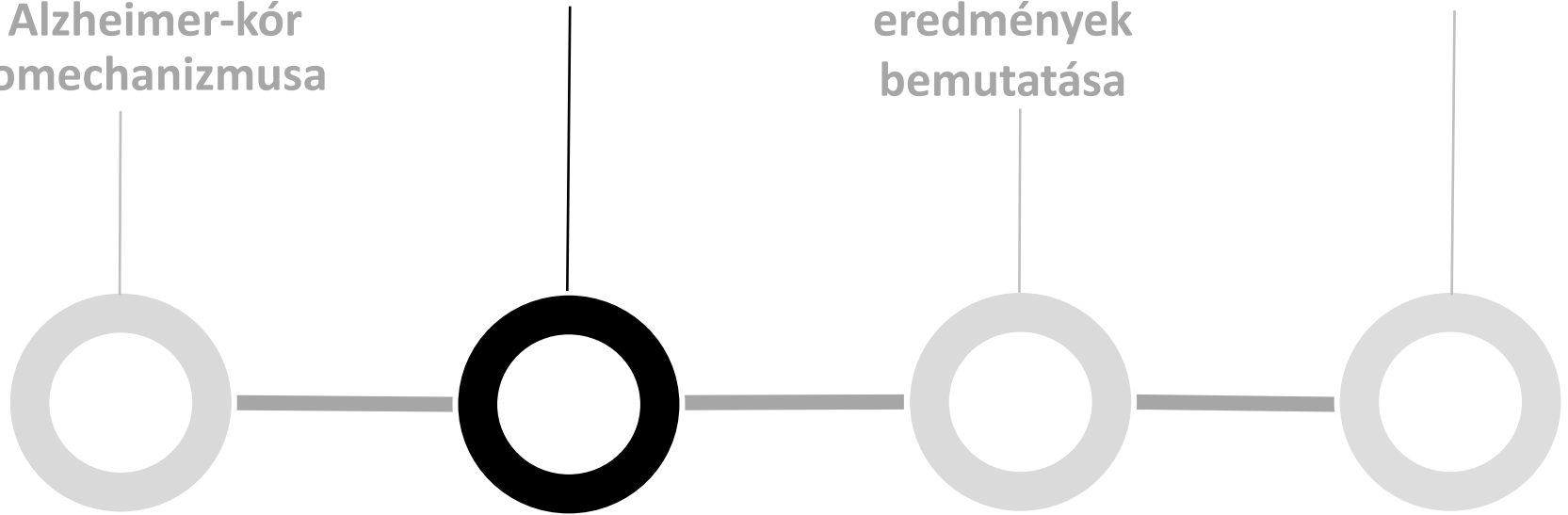
→ Aβ1-40 illetve 1-42 nagyobb mennyiségben található szinaptikus mitokondriumokban

Az Alzheimer-kór
patomechanizmusa

Célkitűzések

Kísérleti
eredmények
bemutatása

Konklúzió



CÉLKITŰZÉSEK

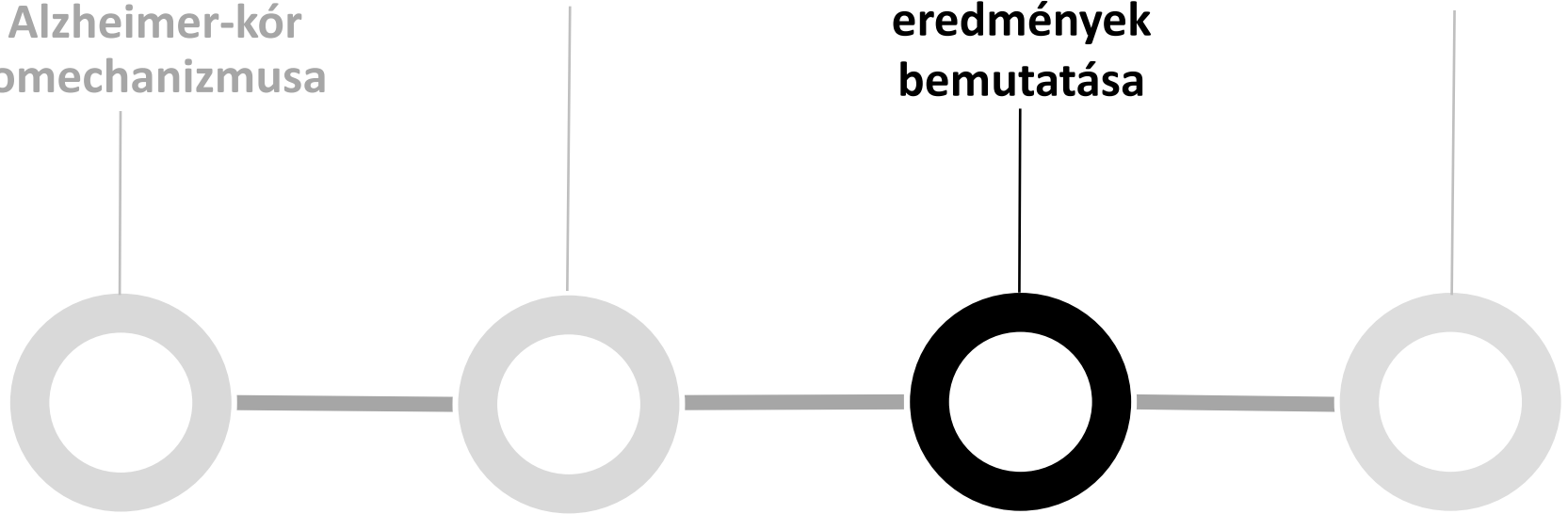
Az A β progresszió hatásának vizsgálata a szinaptikus és nem-szinaptikus mitokondriumok fehérjekészletére és oxidatív metabolizmusára APP/PS1 egerekben

Az Alzheimer-kór
patomechanizmusa

Célkitűzések

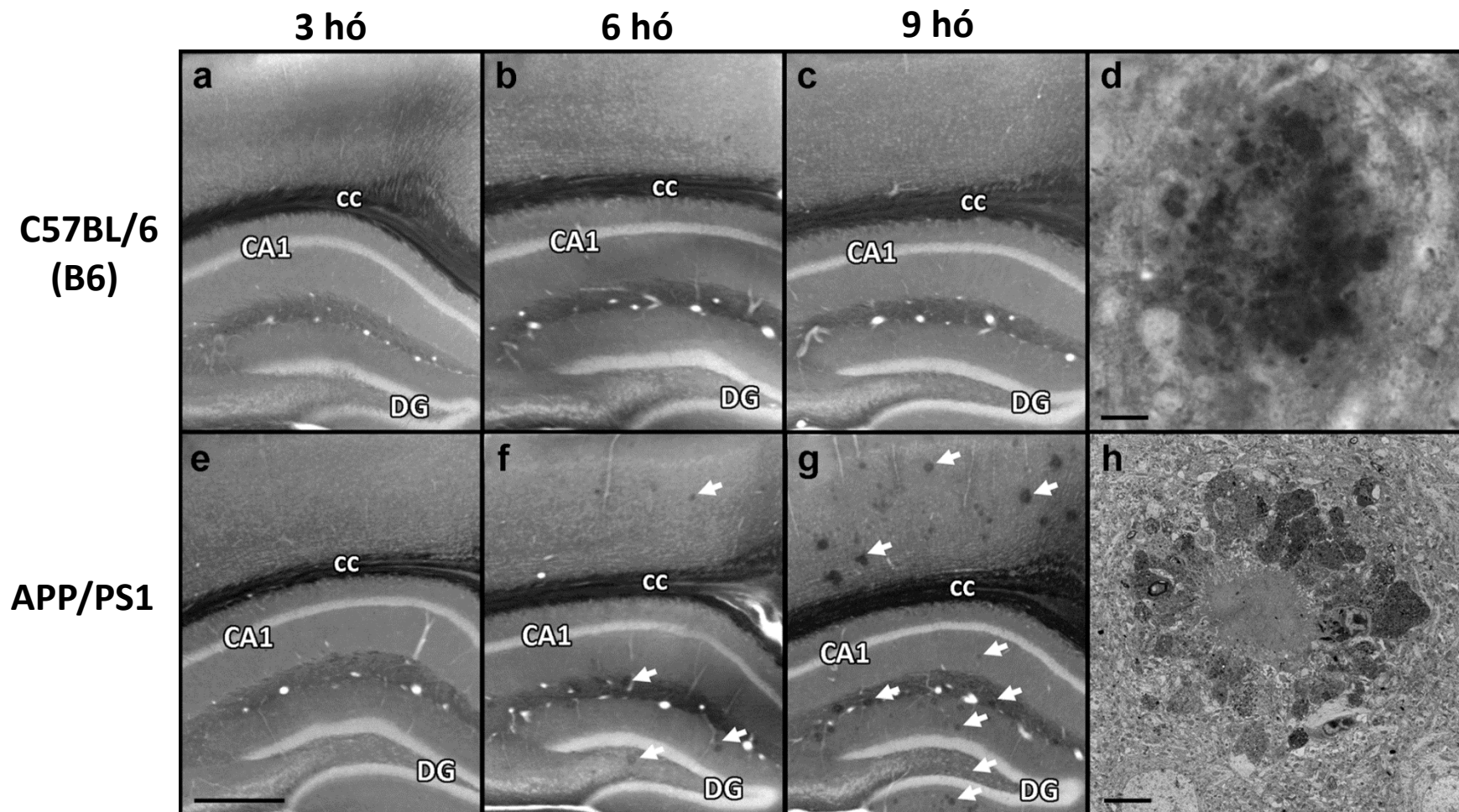
**Kísérleti
eredmények
bemutatása**

Konklúzió

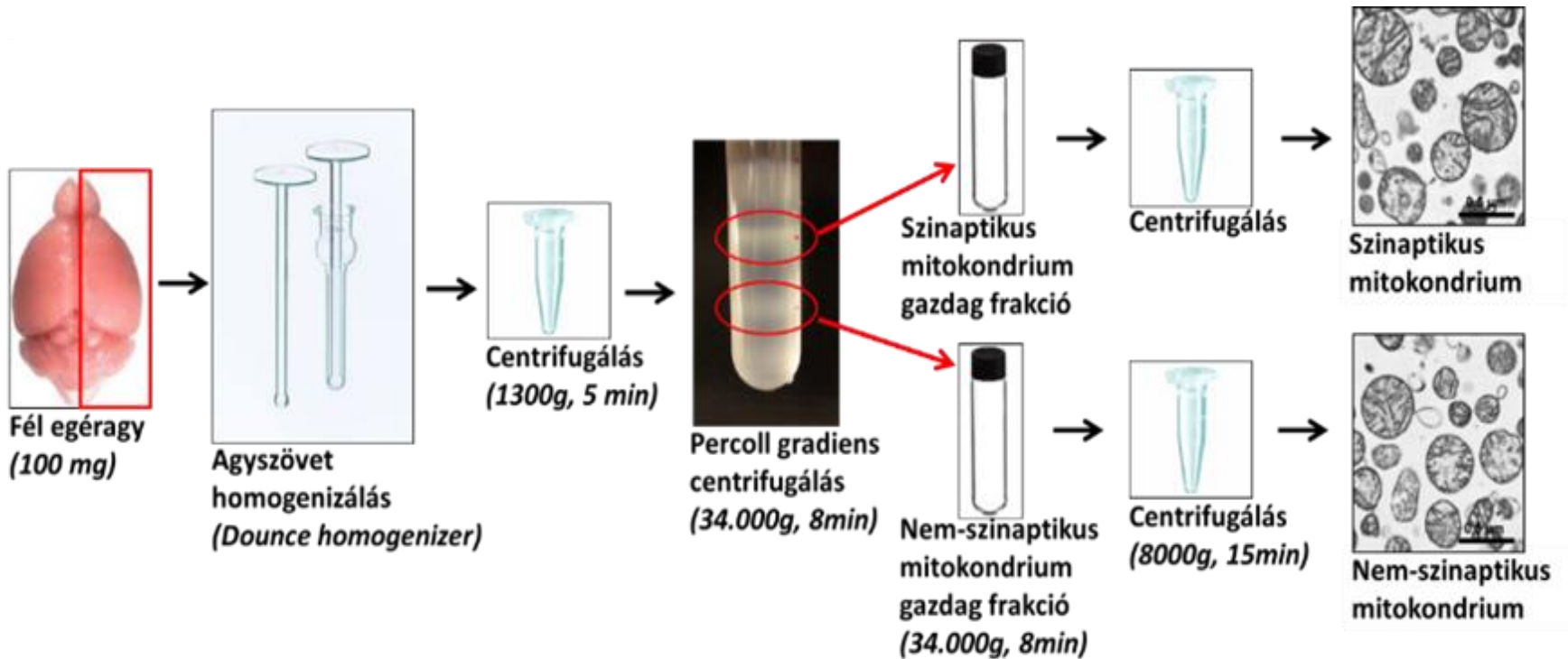


1. A β -amyloid progresszió szövettani igazolása APP/PS1 egérmodellben

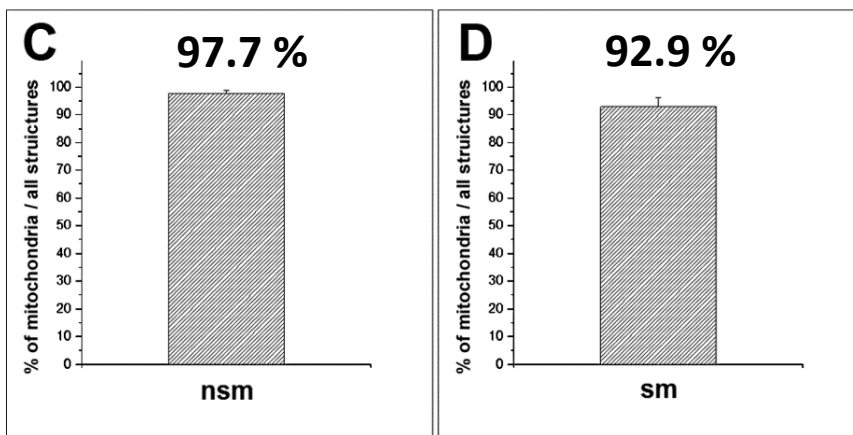
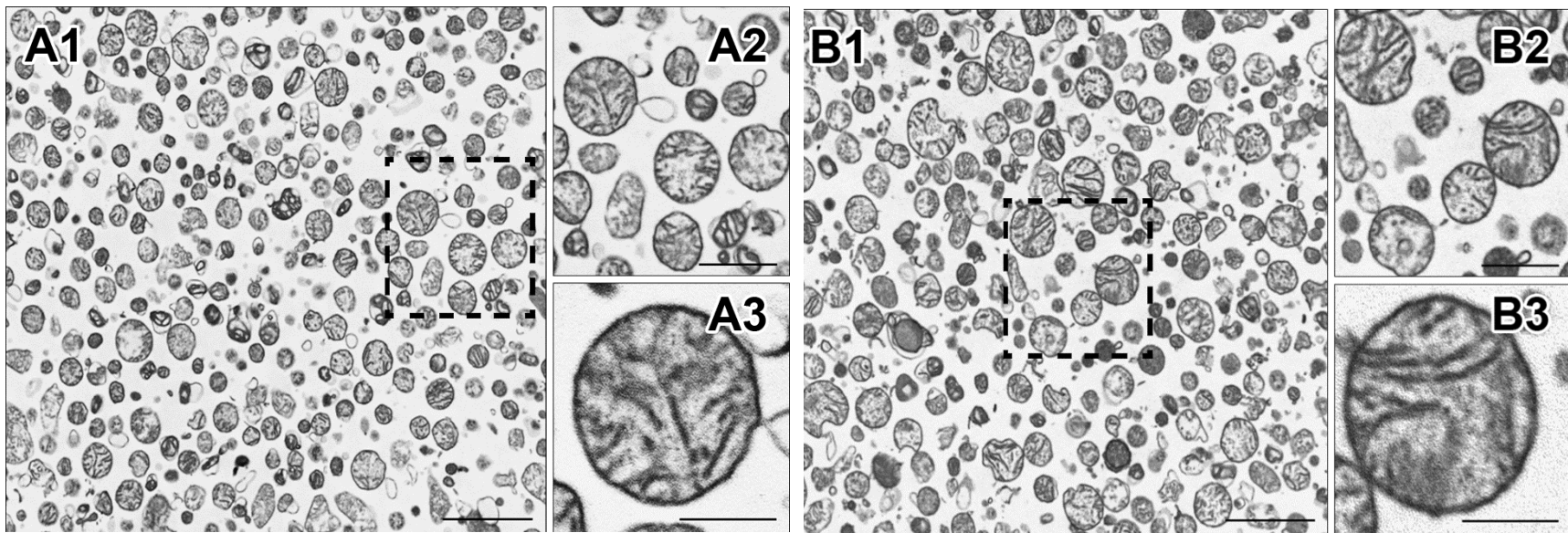
APP695swe és PS1-dE9 mutációk \rightarrow A β overexpresszió



2. Szinaptikus és nem-szinaptikus mitokondiumok izolálása Percoll gradiens centrifugálással



3/1. A szinaptikus és nem-szinaptikus mitokondrium preparátumok validálása elektronmikroszkópiával

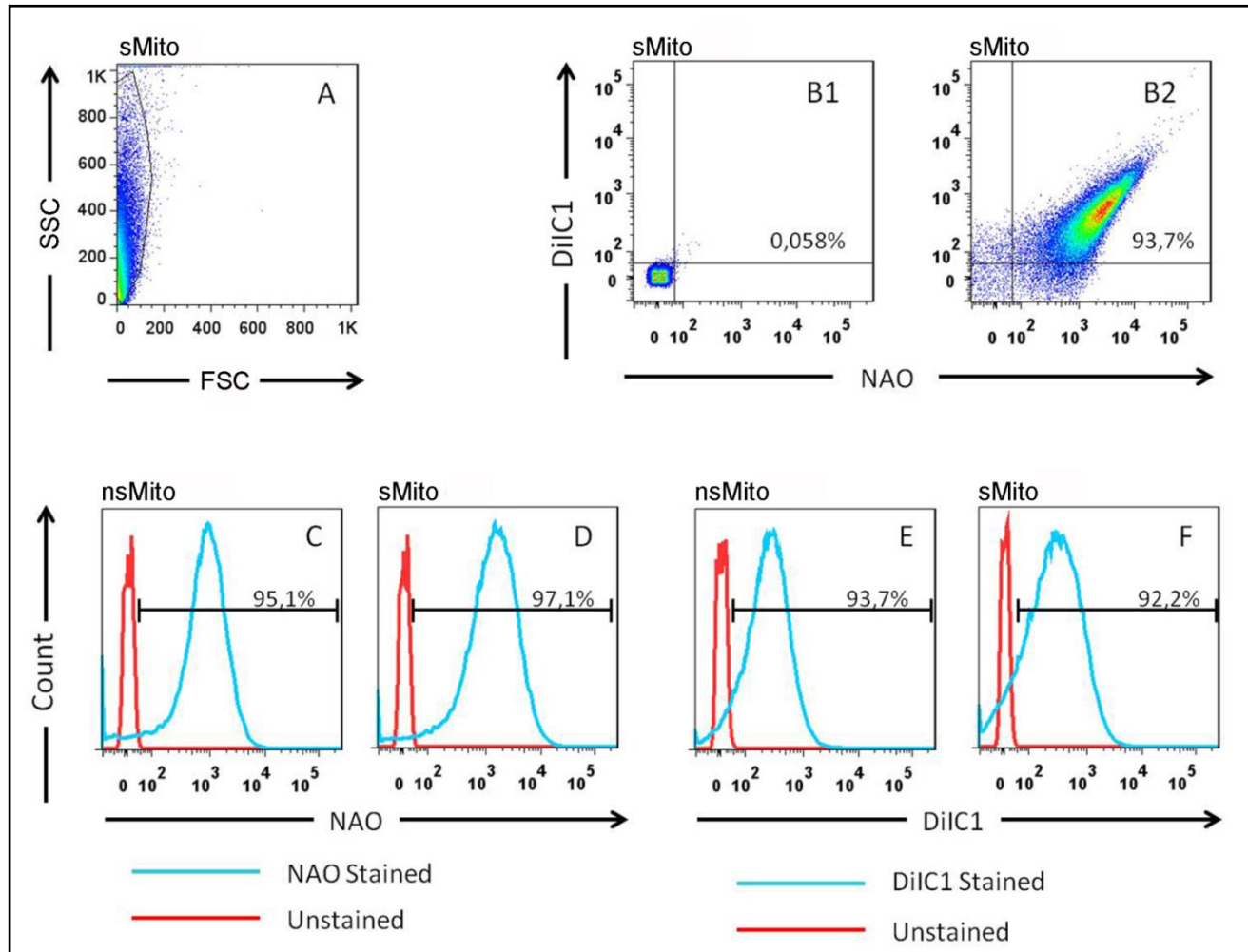


[J Proteomics](#). 2015 Mar 14;120:142-157. doi: 10.1016/j.jprot.2015.03.005.

Synaptic mitochondria: A brain mitochondria cluster with a specific proteome.

[Völgyi K](#)¹, [Gulyássy P](#)², [Háden K](#)³, [Kis V](#)⁴, [Badics K](#)³, [Kékesi KA](#)⁵, [Simor A](#)³, [Györffy B](#)³, [Tóth EA](#)⁶, [Lubec G](#)⁷, [Juhász G](#)², [Dobolyi A](#)⁸.

3/2. A szinaptikus és nem-szinaptikus mitokondrium preparátumok validálása Fluoreszcencia Aktivált Sejtválogatás és Analízissel (FACS)

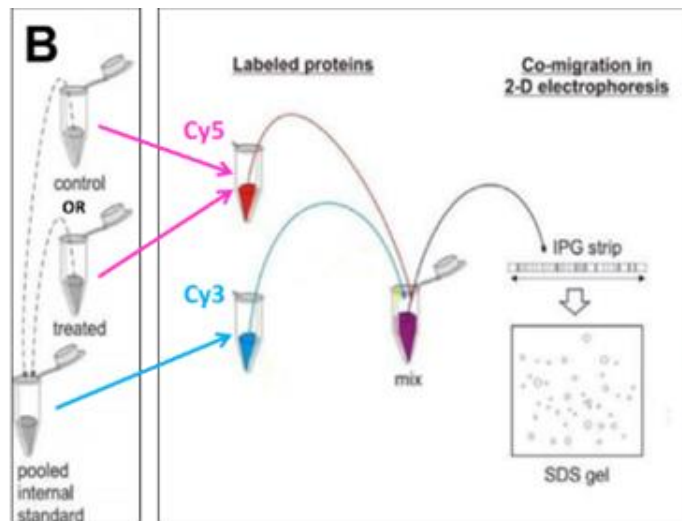


4. A β -amyloid progresszió proteomikai hatásának vizsgálata a szinaptikus illetve nem-szinaptikus mitokondriumok szintjén

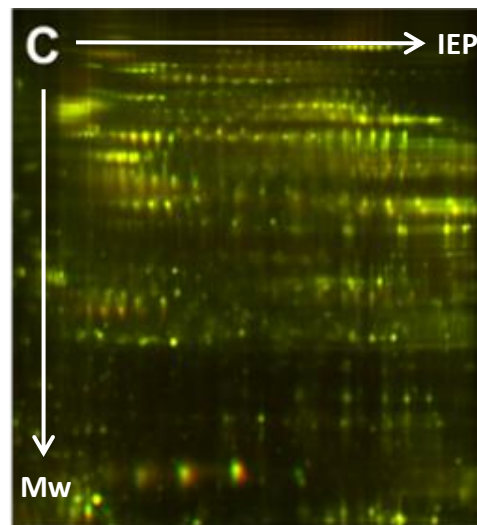
1.) APP/PS1 és B6 egerek mitokondriális proteomjának összehasonlítása 2D-differenciál gélelektroforézissel (2D-DIGE)

3, 6 illetve 9 hónapos korcsoportokban

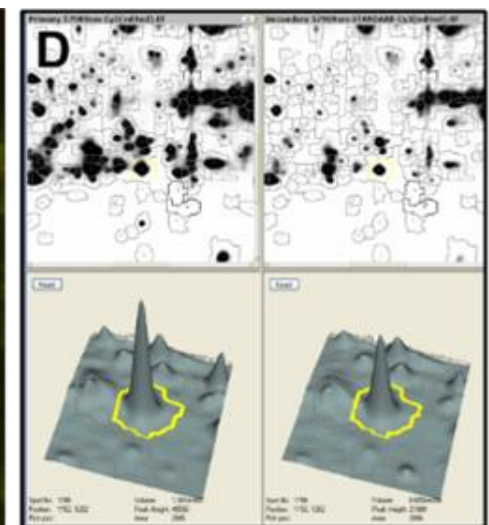
- I. Szinaptikus mitokondriumok szintjén
- II. Nem-szinaptikus mitokondriumok szintjén



- Full stain: 5 μ g fehérje
- 6-6 minta összehasonlítása
- 1 gélen 2 minta (Tg/Ctr; „pool”)



- 1.D: Izoelektromos fókuszálás
- 2.D: Molekulatömeg

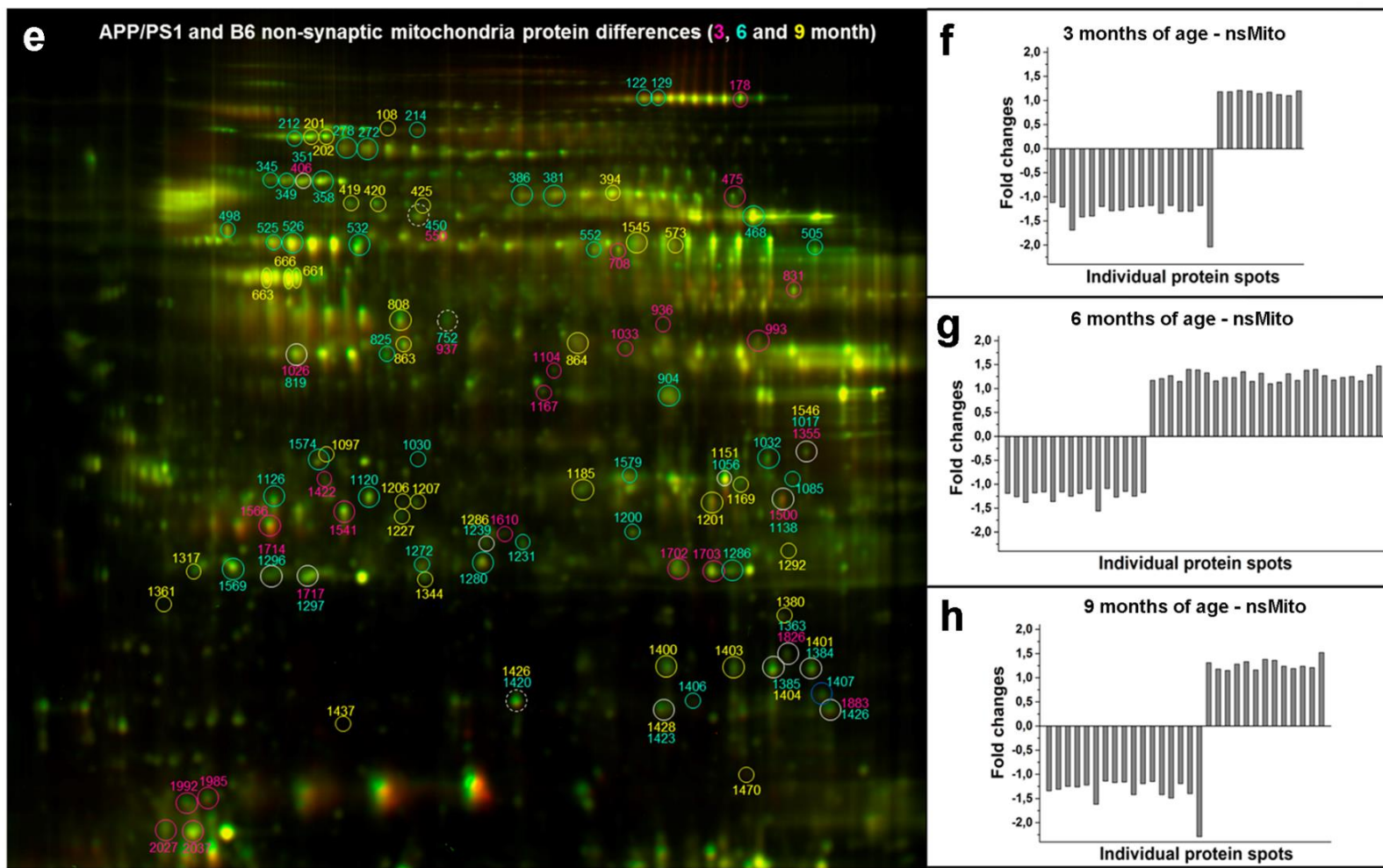


- DeCyder™ 2D Differential Analysis Software

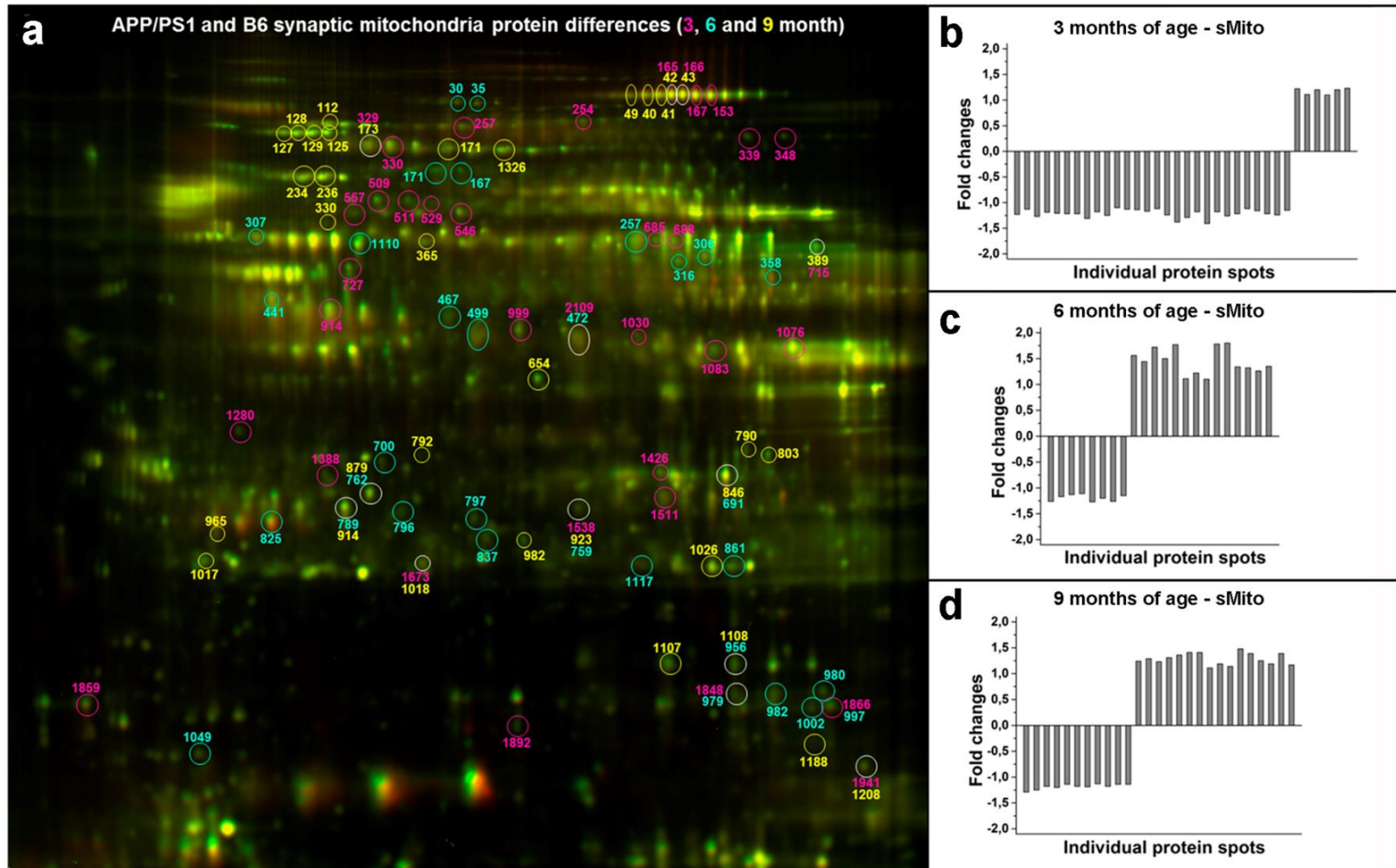


Preparatív gél (Coomassie brilliant blue): szignifikáns fehérjespottok kivágása, tripszines emésztése → fehérjék azonosítása nanoUHPLC-MS/MS technikával

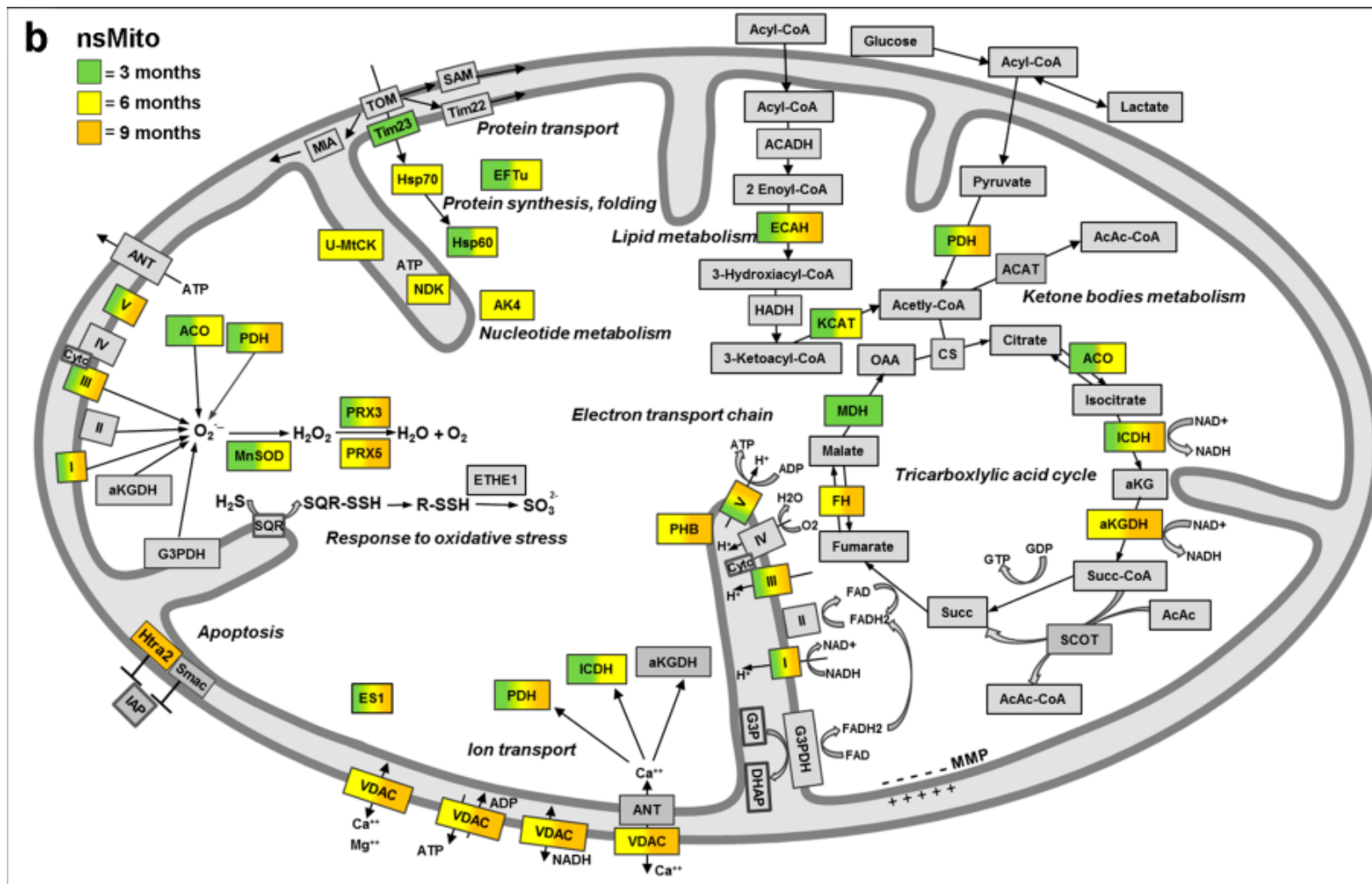
4/1. A β -amyloid progresszió hatására megváltozott nem-szinaptikus mitokondriális fehérje pottok és változásuk iránya



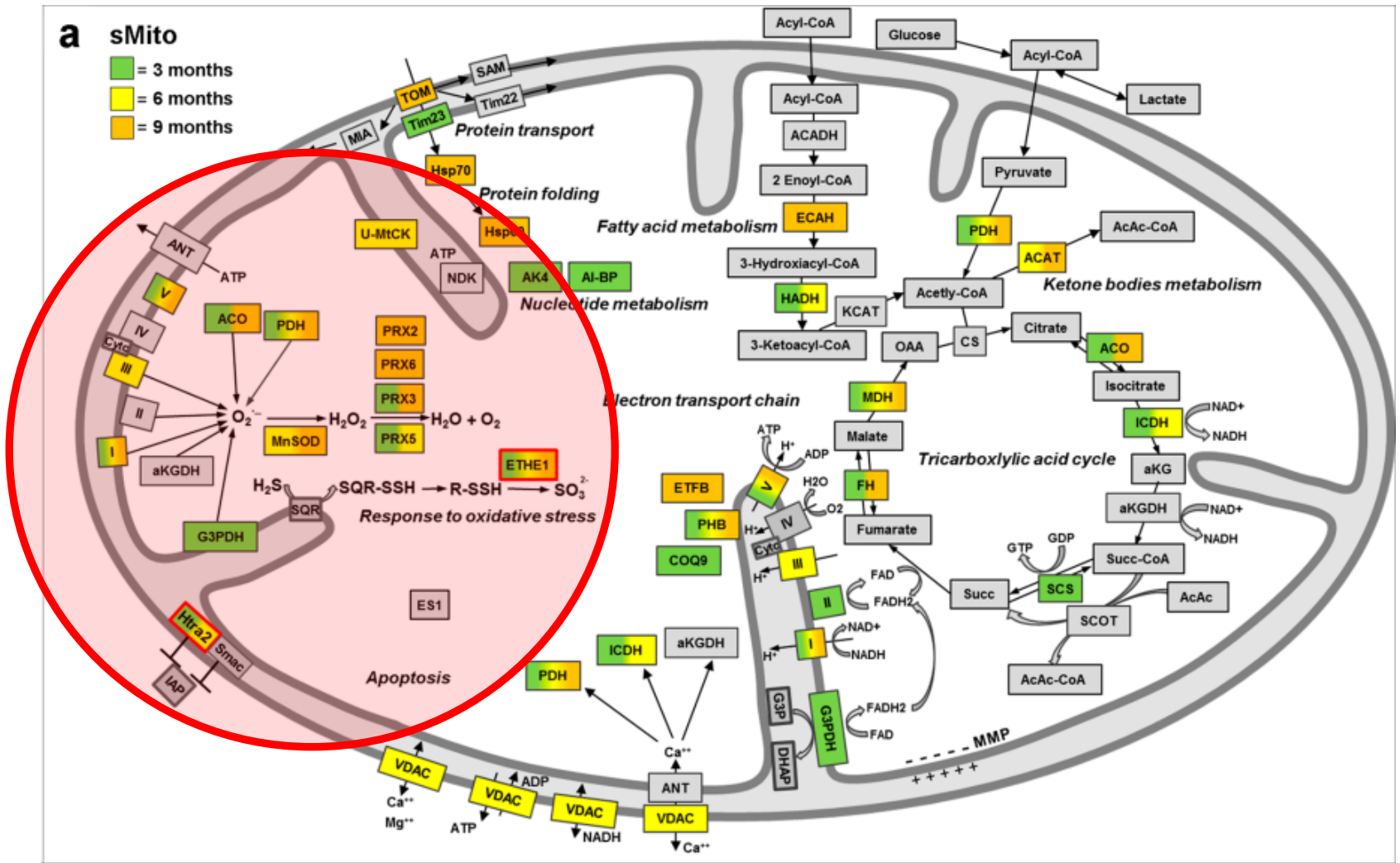
4/2. A β -amyloid progresszió hatására megváltozott szinaptikus mitokondriális fehérje spottok és változásuk iránya



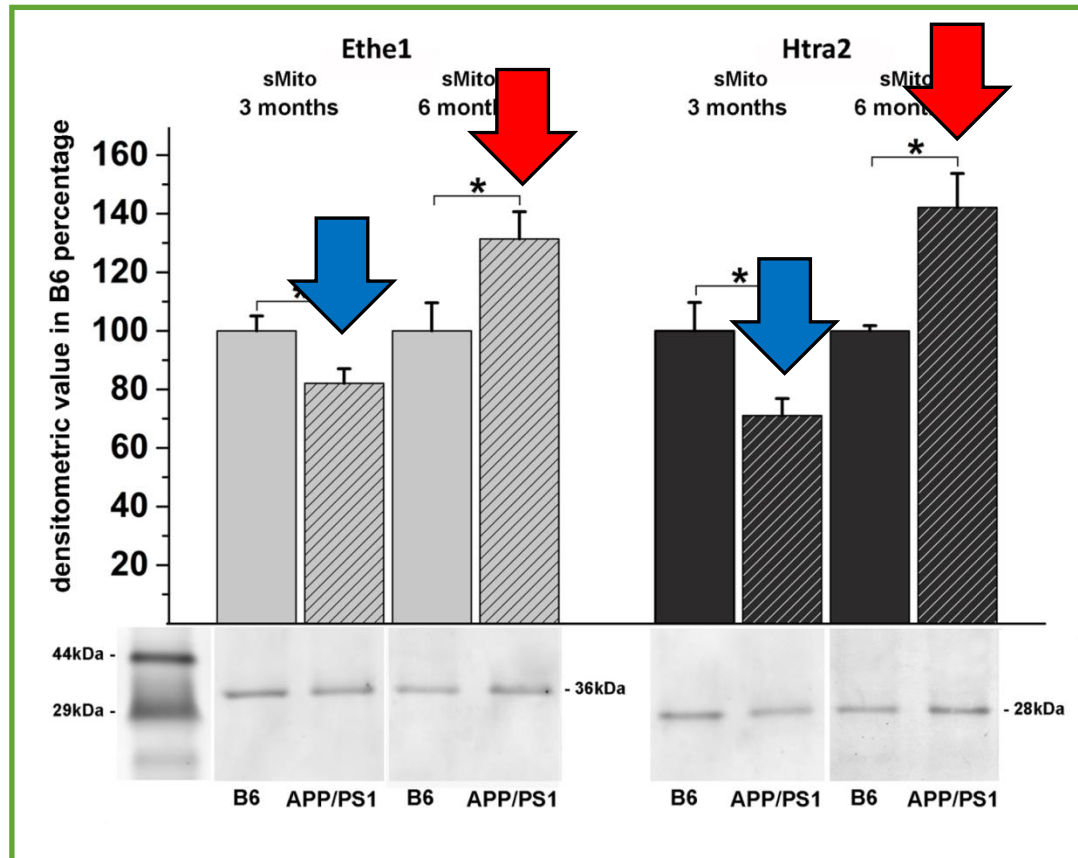
4/1. Az LC-MS/MS-sel azonosított szignifikánsan változó nem-szinaptikus mitokondriális fehérjék lokalizációja



4/2. Az LC-MS/MS-sel azonosított szignifikánsan változó szinaptikus mitokondriális fehérjék lokalizációja

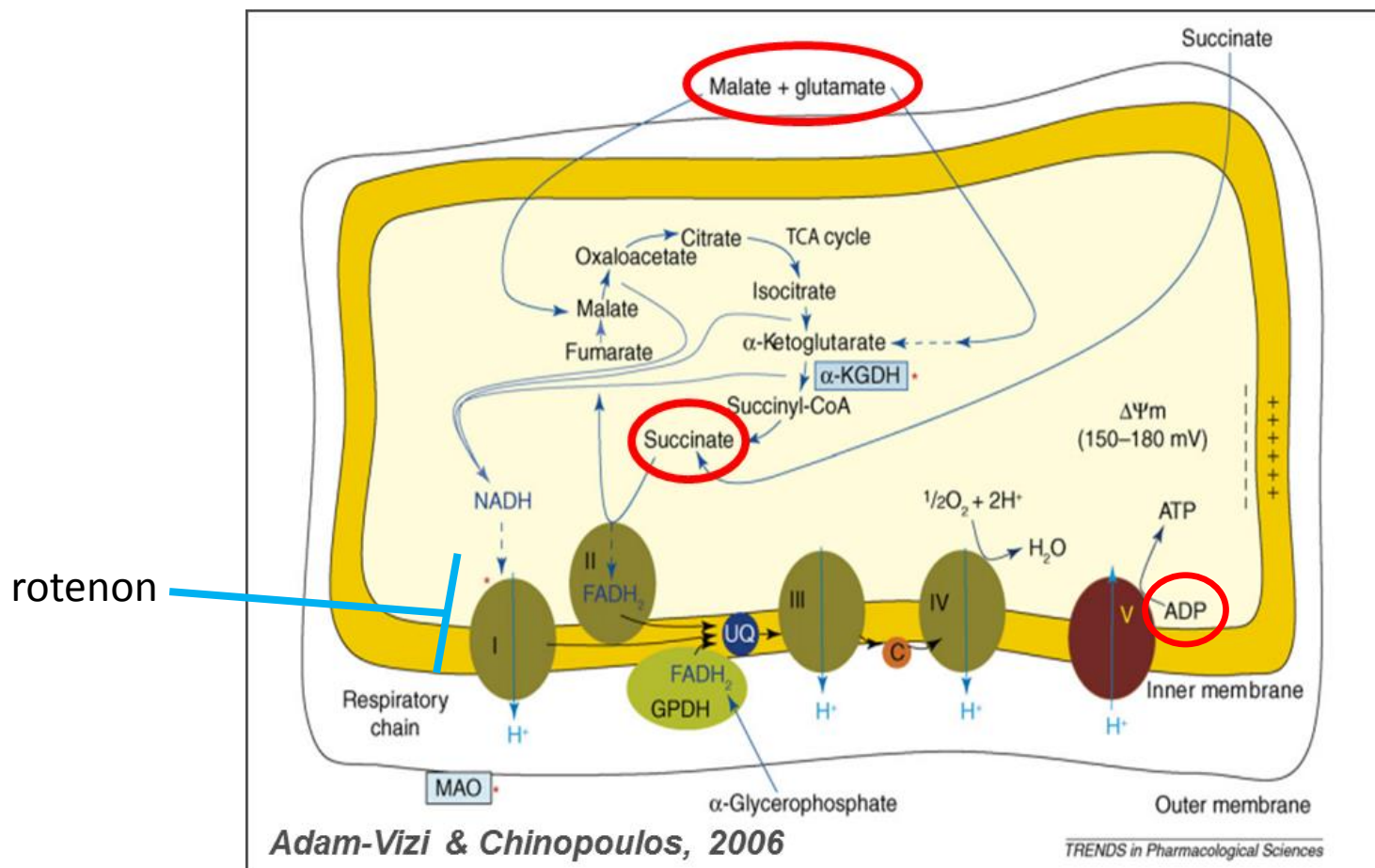


4/2. A Htra2 és Ethe1 szignifikánsan változó szinaptikus mitokondriális fehérjék validálása Western blottal



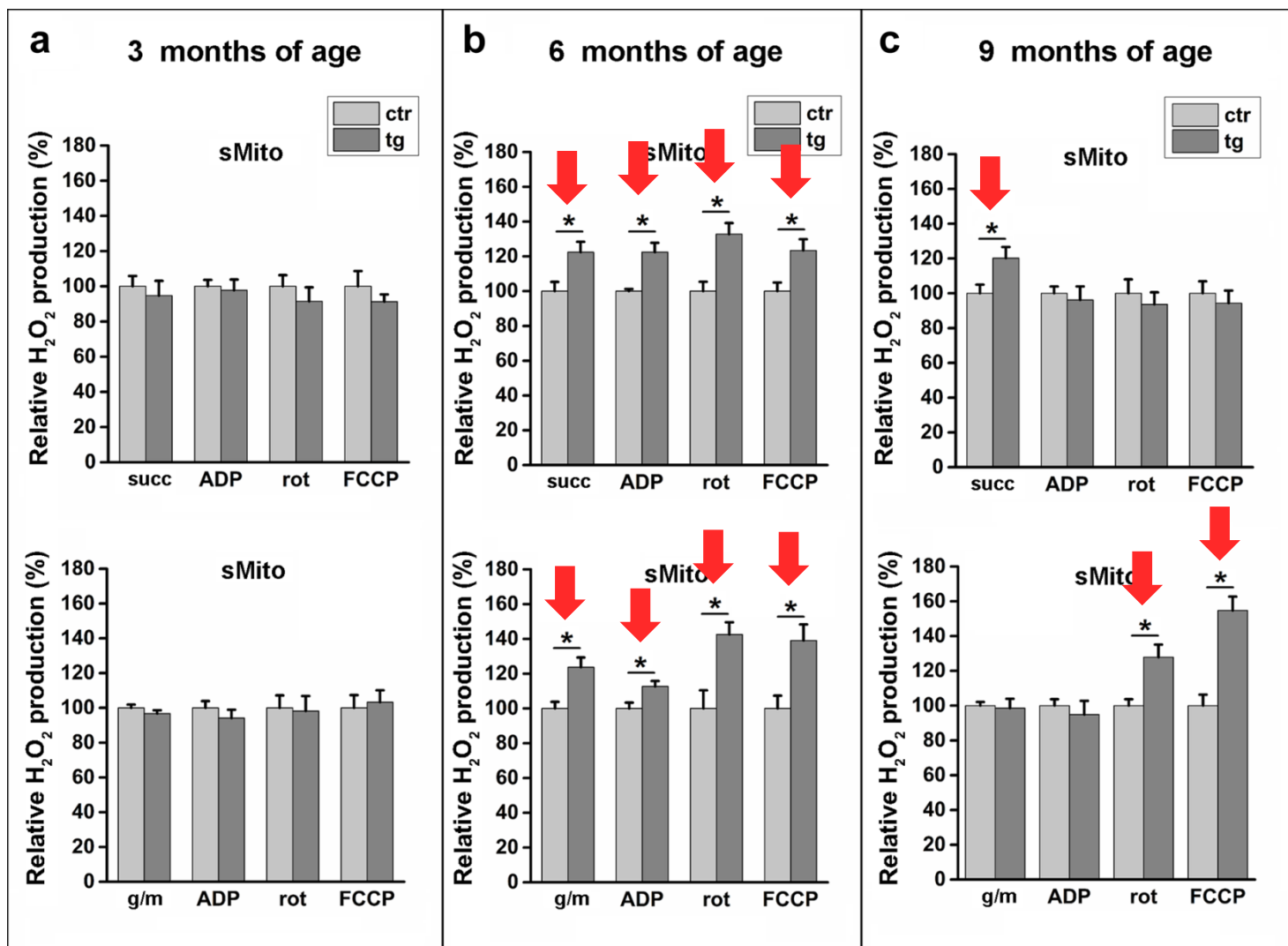
- Htra2 szerin proteáz {SM: **-1,38** (3hó); **+1.78** (6hó); **-1.13** (9hó)} → APP fiziológias hasítása, amyloidogén útvonal gátlása, Htra2 - A β interakció → proapoptotikus
- Perszulfid dioxigenáz Ethe1 {SM: **-1,38** (3hó); **+1.78** (6hó); **-1.13** (9hó)} → anti-apoptotikus

5. A β -amyloid progresszió hatásának vizsgálata a ROS képződésre a szinaptikus illetve nem-szinaptikus mitokondriumok szintjén



- ROS képzők: CI, II, III, V, α KGDH, PDH, ACO
- H₂O₂ detektálás: Amplex Red fluoreszcens festékkel (tormaperoxidáz jelenlétében H₂O₂ -dal fluoreszcens rezorufint eredményez) (Deltascan fluoreszcencia spektrofotométer)

5. A β -amyloid progresszió hatásának vizsgálata a ROS képződésre a szinaptikus illetve nem-szinaptikus mitokondriumok szintjén

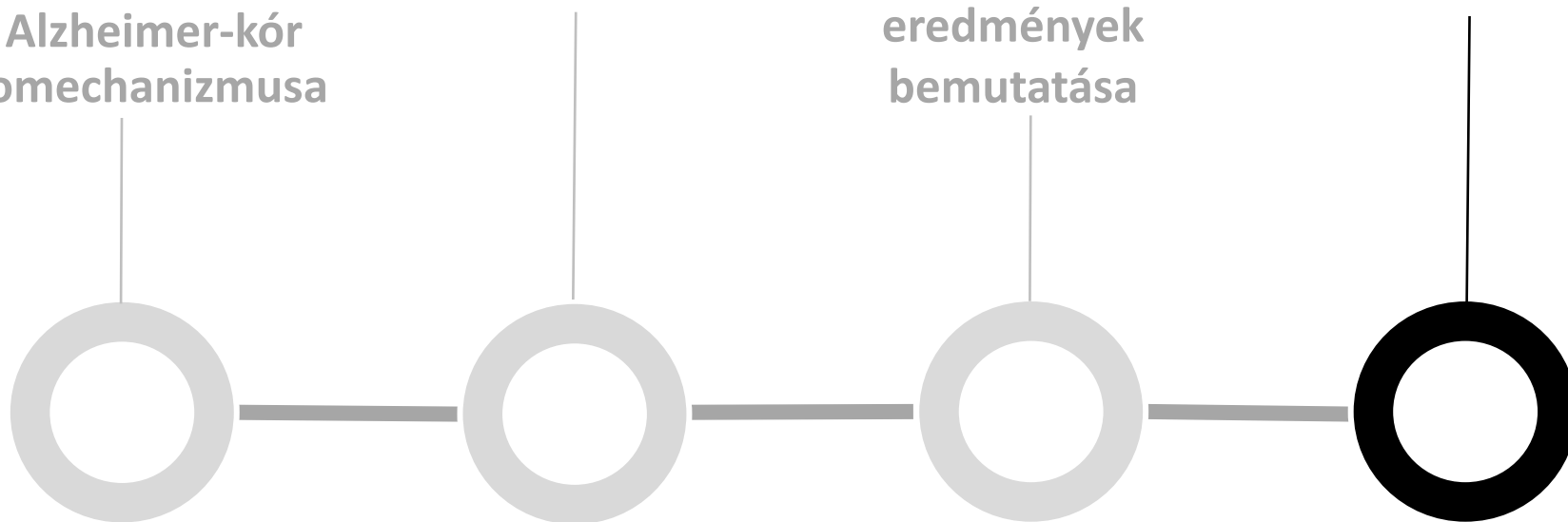


Az Alzheimer-kór
patomechanizmusa

Célkitűzések

Kísérleti
eredmények
bemutatása

Konklúzió



Konklúzió

1. Kiterjedt, funkcionálisan kompenzált mitokondriális fehérjekészlet változás detektálható már 3 hónapos korban, amikor a ROS termelésben még nem tapasztalható változás.
2. Az A β progresszió különböző módon hat a szinaptikus illetve nem-szinaptikus mitokondriumok proteomjára illetve oxidatív metabolizmusára.
3. A megváltozott fehérjék többsége az energiametabolizmus, oxidatív stressz és apoptózis folyamatában játszanak szerepet.
4. A Htra2 és Ethe1 apoptotikus fehérjék $\downarrow\uparrow\downarrow$ dinamikát mutatva, párhuzamosan változtak a szinaptikus mitokondriumokban \rightarrow lehetséges markerei az A β progresszió követésének
5. Közös regulátor analízis alapján \rightarrow apoptotikus faktorok, Tnf
6. Felmerül a Htra2, Ethe1 és Tnf korai, perifériás tesztelése humán mintákban

\rightarrow Lehetnek-e a magatartási tünetek előtt megjelenő markerek?

Köszönetnyilvánítás

**Juhász Gábor
Kékesi Katalin
Penke Botond
Dobolyi Árpád
Drahos László
Gulyássy Péter
Háden Krisztina
Badics Kata
Kis Viktor
Györffy Balázs
Simor Attila
Janáky Tamás
Szabó Zoltán
László Tretter**