

# Fehérjék megjelenése anyák hipotalamuszának idegvégződéseiben



**UDVARI EDINA BRIGITTA**

**TÉMAVEZETŐK: DR. DOBOLYI ÁRPÁD  
DR. KÉKESI ADRIENNA KATALIN**

**ELTE TTK**

**Biológiai Intézet**

**Molekuláris és Rendszer Neurobiológiai Kutatócsoport,**

**Proteomikai Csoport**

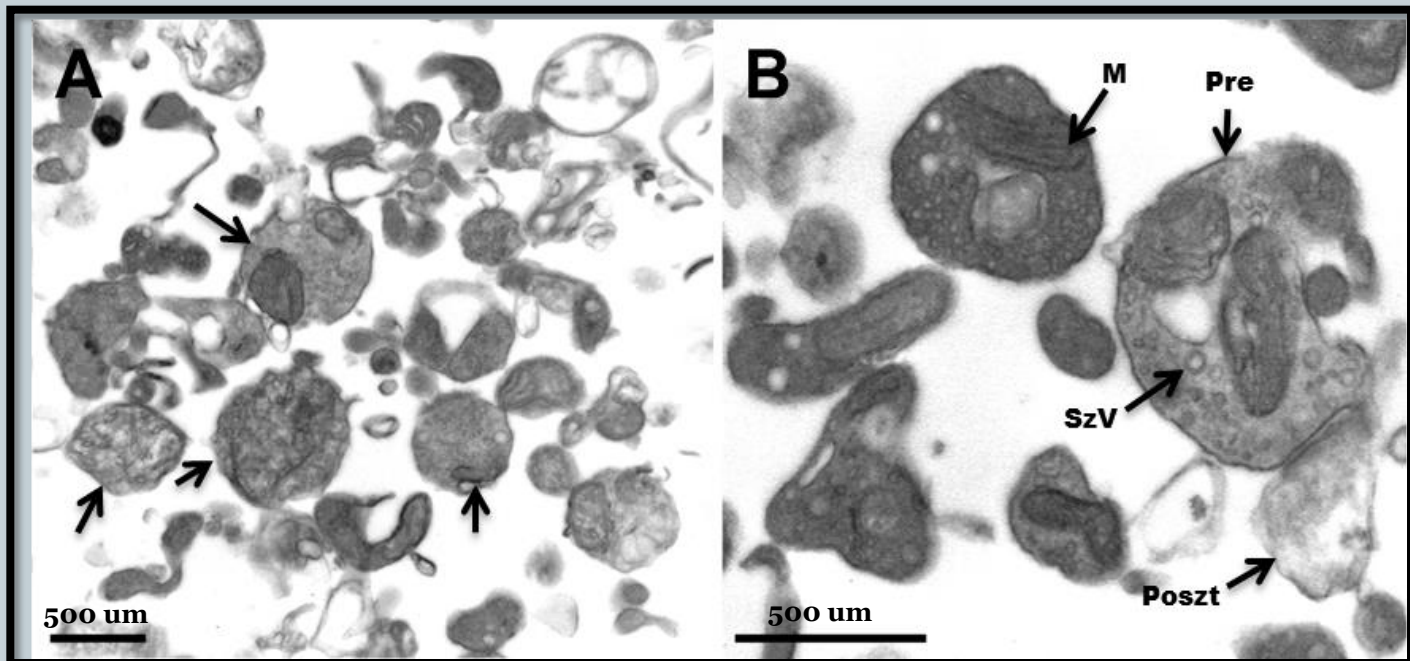
# Célkitűzések



- Az **anyai adaptációk** együtt járnak-e **proteom** szintű változásokkal a **szinapszis** szintjén?
- Az **utódgondozás** mechanizmusainak molekuláris hátterét vizsgálom **rendszerbiológiai megközelítéssel**
- A kapott adatok alapján **új munkahipotézisek** felállítása
- **Célkitűzések:**
  1. Hipotalamikus szinaptoszóma preparátum előállítása
  2. Fehérjék elválasztása 2D-DIGE-val
  3. Fehérjék azonosítása LC-MS/MS-sel
  4. Az azonosított fehérjeváltozások funkcionális csoportosítása (Uniprot adatbázis)
  5. Jelentős fehérjék validálása Western blot technikával és eloszlásuk vizsgálata immunhisztokémiával
  6. A megváltozott fehérjék vizsgálata Pathway studio szoftveres analízissel

# 1. Hipotalamikus szinaptoszóma preparátum előállítása és validálása

- 4 hónapos nőstény Wistar patkány anyák ↔ utódoktól születés után azonnal elválasztott anya patkányok (n=6+6)
- 9 nappal az ellés után agykivétel (**nincs** anyai viselkedés a kontrollnál)
- **Ficoll-szacharóz gradiens centrifugálás** → szinaptoszóma preparátum
- **Validálás:** elektronmikroszkópiával



Szinaptoszóma reprezentatív elektronmikroszkópos képe (Kis Viktor felvétele)

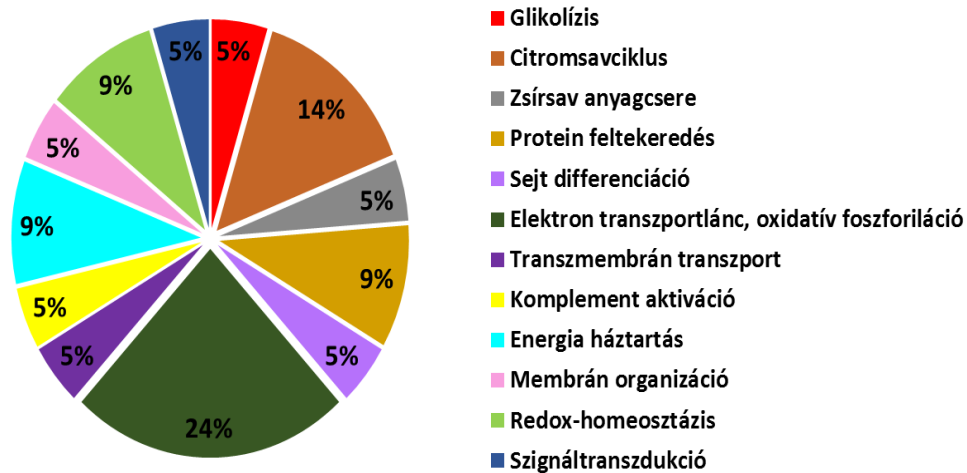


# 3. Fehérjevaltozások funkcionális csoportosítása

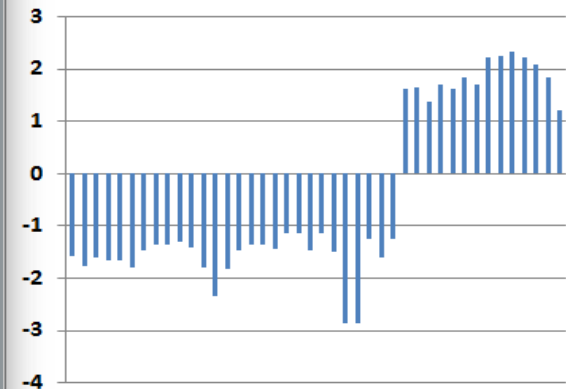


- **46** kivágott spot → **21** detektált fehérje (**14** csökkent, **7** megnőtt mennyiségű fehérje)
- **Uniprot** adatbázis alapján csoportosítás
- Fehérjék nagy része csökkenő mennyiséget mutat

A megváltozott fehérjék funkcionális megoszlása (n=21)



A meghatározott fehérjék relatív mennyiségének változása

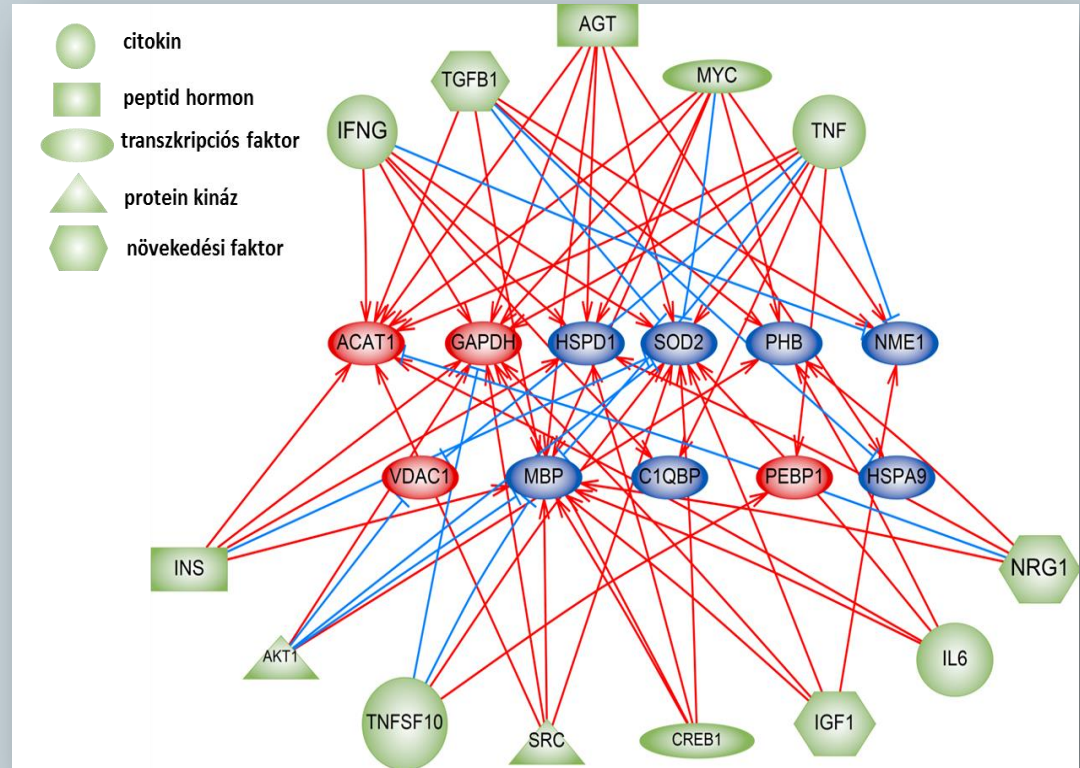


# 3. Fehérjevaltozások funkcionális csoportosítása



Spot szám	Fehérjenév	Génnév	Szekvencia lefedettség	AP	AR	P érték
<b>Elektron transzportlánc, oxidatív foszforiláció</b>						
262	ATP-szintáz alfa alegysége	Atp5a1	23,70%	11	-1,462	0,0008
291			32,00%	17	-1,360	0,0373
1242			40,70%	26	-1,354	0,0084
1014	ATP-szintáz delta alegysége	Atp5b	46,00%	9	-1,450	0,0580
1020			41,60%	7	-1,130	0,0650
1208			29,20%	4	-1,148	0,0328
380	Citokróm b-c1 komplex 2 alegysége	Uqcrc2	46,70%	19	2,224	0,0003
390			52,70%	22	2,087	0,0020
262	Citokróm c oxidáz 6a1 alegysége	Cox6a1	27,90%	4	-1,462	0,0008
1210	Prohibitin	Phb	46,30%	15	-1,149	0,0303
<b>Transzmembrán transzport</b>						
626	Feszültségfüggő anion-csatorna fehérje1	Vdac1	23%	5	1,827	0,0361
<b>Komplement aktiváció, apoptózis</b>						
844	Komplement komponens 1 q alegység-kötő fehérje	C1qbp	15,10%	4	-1,497	0,00091
<b>Energia háztartás</b>						
1082	Nukleozid difoszfát kináz A	Nme1	46,10%	6	-2,850	0,00002
1228	Kreatin-kináz U-típus	Ckmt1	26,60%	9	1,206	0,0743
<b>Membrán organizáció,mielinizáció</b>						
1082	Mielin bázikus protein	Mbp	28,20%	5	-2,850	0,00002
<b>Redox-homeosztázis, oxidatív stressz</b>						
242	Dihidrolipoil dehidrogenáz	Dld	15,70%	7	-1,246	0,0107
1102	Szuperoxid dizmutáz	Sod2	32,50%	4	-1,615	0,0281
<b>Szignáltranszdukció</b>						
1209	Foszfatidiletanolamin-kötő fehérje 1	Pebp1	30,50%	4	-1,253	0,0147

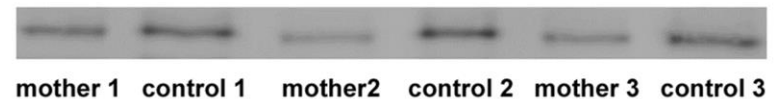
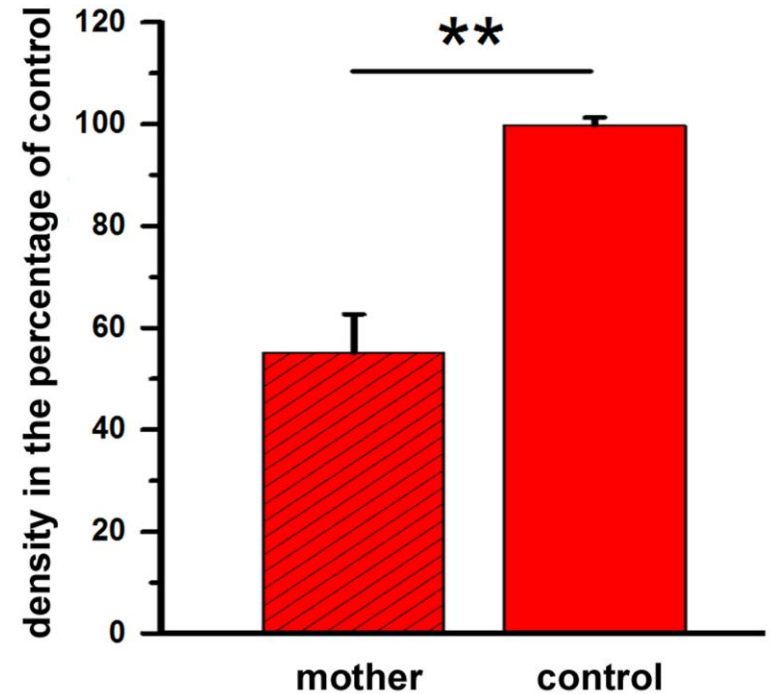
# 4. Az anyákban változást mutató fehérjék közös regulátorai



**Pathway Studio szoftveres analízis**

# 5. Fehérjevaltozás igazolása Western blot technikával

- **Kiterjedt szabályozó funkciójú fehérje**
- **Western blot technika:**
  - Primer antitest (1:200)
  - ECL Plex CyDye konjugált anti-nyúl IgG (1:2500)
  - Typhoon TRIO+ konfokális fluoreszcens szkennel
  - ImageQuant TL szoftver
- **Fehérjeszint csökkenés megerősítése**



# 6. Eloszlás vizsgálata immunhisztokémiával

- **DAB-immunfestés**

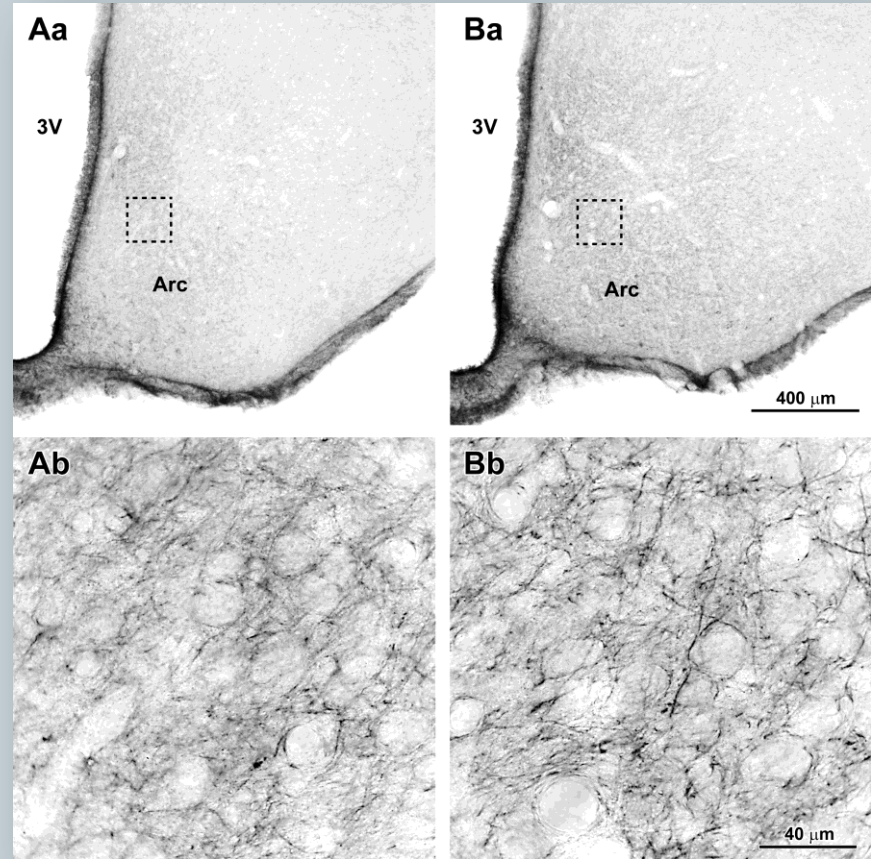
  - Primer: (1:50)

- Az immunreaktivitás megtalálható idegrostokban és terminálisokban, ami validálja a szinaptoszómában való jelenlétét
- Az immunoreaktív terminálisok a hipotalamuszban topográfiai eloszlást mutatnak, sűrűségük több helyen, például a mediobazális hipotalamuszban különösen magas
- Az immunreaktív **hálózat sűrűsége csökkent mértékű anyákban**



anya

control



# 6. A fehérje regulátorai és targetei

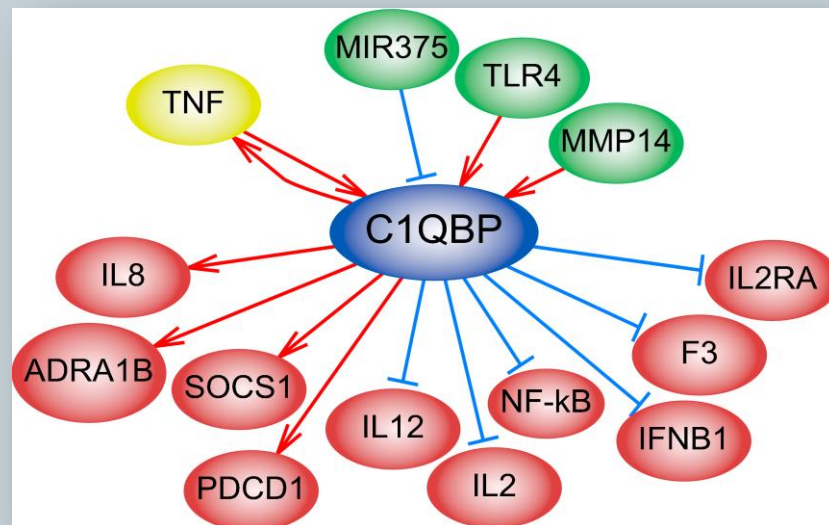


## Regulátorai :

- mikro-RNS molekula
- immunválaszt kialakító fehérje
  - extracelluláris mátrixt átalakító fehérje

## Targetei:

- nagyrészt citokinek, kemokinek
- NF-kB jelátviteli útvonalban résztvevő fehérjék
  - adrenerg receptor
  - programozott sejthalálban résztvevő fehérje
  - koagulációs faktor



**Pathway Studio szoftveres analízis**

# Összefoglalás, konklúzió



- **Az utódgondozás a hipotalamikus szinapszisok szintjén fehérje koncentráció változásokat eredményez, 21 változó fehérjét detektáltunk**
- **A megváltozott fehérjék egy csoportját közös regulátorok szabályozzák**
- **Immunhisztokémiai módszerrel is sikerült validálni a jelenlétét a szinapszisban**
- **A fehérje jelen van kolinerg és oxitocinerg sejtekben**

*További kérdéseink:*

*Hogyan szabályozódik a szintje citokinek, illetve növekedési faktorok által?*

*Mi a funkciója az érintett hipotalamikus neuronokban?*



**Köszönöm a figyelmet!**