

## **Bevezetés és célkitűzések**

A sejtekben egy adott időpillanatban expresszált fehérjék összessége a proteom. A kvantitatív proteomika célja a proteom, egy adott kezelés vagy stimulus hatására bekövetkező mennyiségi és minőségi változásainak detektálása. A napjainkban felhalmozott proteomikai eredmények jelentős része kvantitatív két-dimenziós gél-elektroforézis (2D-GE) kísérletekből származik. A 2D-GE a leggyakrabban használt és a legnagyobb felbontású technika, amely lehetővé teszi akár 1000-2000 fehérje egyidejű vizsgálatát.

A modern proteomikai módszerek elterjedése utat nyitott a neuroproteomika kialakulásának, amelynek célja az idegrendszer fehérjeszintű molekuláris biológiai és biokémiai vizsgálata. Napjainkban a különböző neurodegeneratív betegségek, úgymint az Alzheimer-kór (AK) nagyfokú elterjedésével a neuroproteomikai vizsgálatok még fontosabbá és időszerűbbé váltak. Az ilyen jellegű betegségek pathomechanizmusának molekuláris hátterét nehéz klinikai mintákon vizsgálni a bonyolult mintavételezés és a betegcsoportok heterogenitása miatt. Ezért, a különböző egér és patkány törzsek széles körben használt és elfogadott laboratóriumi modelljei a neurodegeneratív betegségeknek. A proteomikai vizsgálatok során használt 2D-GE technikában megjelenő variancia komponensek (technikai és biológiai) megismerése és kontrollálása nélkülözhetetlen. Ezért, az egér agy 2D-GE analízise során jelentkező variancia komponensek meghatározása hasznos, annak érdekében, hogy megismerjük az ilyen jellegű kísérletek lehetőségeit és korlátait.

Az állatmodellek mellett a különböző neuronális sejt kultúrák szintén gyakran használt eszközei a neurodegeneratív betegségek molekuláris hátterének megismerésére irányuló kísérleteknek. Általánosan elfogadott tény, hogy az AK során fellépő tünetek kialakulásában központi szerepet játszik az A $\beta$ 1-42 peptid extracelluláris felhalmozódása és aggregációja. Ezért, a neuronális sejt kultúrák A $\beta$ 1-42 kezelés hatására bekövetkező, fehérjeszintű változásainak vizsgálata segít a betegség során fellépő neuron pusztulás molekuláris hátterének megértésében.

Ezek alapján a következő célokat valósítottuk meg a Ph.D. munkám során:

1. Egér agy 2D-GE analízise során megjelenő variancia komponensek jellemzése:
  - 1.1. Meghatároztuk a biológiai és technikai variancia mértékét a totál varianciában.
  - 1.2. Reprodukálhatósági kísérletekkel vizsgáltuk a 2D-GE analízis kvantitatív korlátait.
  - 1.3. Vizsgáltuk a genetikai háttér varianciára gyakorolt hatását.

2. Oligomer A $\beta$ 1-42 SH-SY5Y sejtekre gyakorolt hatásának 2D-GE proteomikai vizsgálata:
  - 2.1. Számos, szignifikánsan változó fehérjét detektáltunk és azonosítottunk.
  - 2.2. Az azonosított fehérjék funkcionális csoportosítása segíthet az oligomer A $\beta$ 1-42 neuronokra gyakorolt hatásának megismerésében.

### **Anyakok és módszerek**

A Ph.D. dolgozatomban elvégzett kísérletek két fő téma köré csoportosulnak:

#### *1. Egér agy 2D-GE vizsgálata*

NMRI (kültenyésztett) és C3H/HEN (beltenyésztett) egerek 2D-GE agyi proteom profilját vizsgáltuk. A módszer technikai varianciájának meghatározásához két, random választott mintából készült technikai replika géleket használtunk (n=4). A totál variancia jellemzéséhez pedig hét biológiai replika gél sorozatot futtattunk: négy „testvér” NMRI és három „nem-testvér” NMRI csoport (n=4). A technikai és biológiai variancia, totál varianciára gyakorolt hatásának meghatározásához a géleket egyszerre analizáltuk. Emellett, a reprodukálhatóság vizsgálatának érdekében páros összehasonlításokat is végeztünk. Ezekben az elemzésekben összehasonlítottunk „testvér” és „nem-testvér” NMRI csoportokat, valamint külön vizsgáltuk a „testvér” és „nem-testvér” generációk közötti különbségeket. Végül, külön páros összehasonlításban analizáltunk egy „nem-testvér” NMRI és C3H/HEN egerek mintáiból készült gél sorozatot. A kísérletsorozatban összesen 40 gélt készítettünk és vizsgáltunk.

#### *2. Oligomer A $\beta$ 1-42 hatásának 2D-GE proteomikai vizsgálata*

Differenciált SH-SY5Y sejteken proteomikai módszerekkel vizsgáltuk az oligomer A $\beta$ 1-42 hatását. A kezelés során „iso-A $\beta$ 1-42” prekursor peptidből frissen előállított oligomer A $\beta$ 1-42-t használtunk. A sejtizátumok 2D-GE analízisét követően a szignifikánsan változó fehérjéket tömegspektrometriával azonosítottuk. Emellett, a két legnagyobb mértékben változott fehérjét (Hsp70 és EEF2) Western blot módszerrel is igazoltuk. Ez további megerősítése lehet a 2D-GE analízisből származó eredményeknek.

## **Eredmények és értékelésük**

### *1. Egér agy 2D-GE vizsgálata*

A vizsgált csoportok (technikai és biológia replikák) varianciáját minden esetben a variációs koefficienssel (CV%) jellemeztük. A technikai replikák a módszer technikai varianciáját, míg a biológiai replikák a totál varianciát jellemzik. A genetikai háttér nagy hatással lehet a proteom varianciájára. Feltételezésünk szerint az egy szülőpártól származó egyedek genomja hasonlabb. Ezért, a genetikai háttér proteom varianciájára gyakorolt hatását „testvér” és „nem-testvér” csoportok vizsgálatával végeztük. A technikai és biológiai replika csoportokban számolt variancia értékek eloszlásából egyértelműen látszik, hogy a technikai variancia kisebb volt, mind a „testvér”, mind pedig a „nem-testvér” csoportok esetében. Azonban a technikai és totál variancia nagysága azt is egyértelműen szemlélteti, hogy a totál varianciában a technikai variancia dominál. A kapott eredmények megfelelnek az irodalomban közölt variancia értékeknek. Sőt, a technikai variancia esetében kedvezőbb eredményt kaptunk, amely az általunk használt 2D-gél analízáló szoftverrel hozható kapcsolatba („Samespots” módszer). A „testvér” és „nem-testvér” csoportok variancia értékei között nem találtunk különbséget.

A variancia-analízis mellett „power”-analízist is végeztünk. Ezzel vizsgáltuk azt, hogy mekkora elemszámra van szükség ahhoz, hogy az általunk számolt varianciával és megadott szignifikancia értékkel ( $p \leq 0.05$ ) a statisztikai próba ereje elérje a 80%-ot. Ezek alapján, az általunk használt elemszámmal legfeljebb kétszeres mennyiségi változást tudtunk detektálni, ha a csoportok varianciáját a 95. percentilisben számolt standard deviációval jellemeztük. Ezért, a későbbiekben elvégzett páros összehasonlítások során elsősorban a legalább kétszeres változást mutató fehérjepontokat vettük figyelembe. Azonban, az irodalomban, a legalább másfélszeres expressziós változás a legszélesebb körben elfogadott. Ezért, a kétszeres változások mellett a legalább másfélszeres változásokat is vizsgáltuk.

A páros összehasonlítások során, a szignifikáns különbségek detektálásakor figyelembe vettük az úgynevezett többszörös összehasonlítás problémáját. Ennek kezelésére a „false discovery rate” (FDR) és „sequential goodness of fit” (SGoF) módszereket alkalmaztuk. A „testvér” és „nem-testvér” NMRI csoportok esetén végzett reprodukálhatósági vizsgálatok során nem találtunk szignifikáns különbségeket. Ez jellemzi a módszer jó ismételtetését. Ezzel szemben, a generációk összehasonlítása során a szignifikáns különbségek száma megnőtt, bár a fehérjefoltok többsége kétszeres változásnál kisebb

különbséget mutatott. Ez egyértelműen jelzi azt, hogy a 2D-GE proteomikai vizsgálatok során ajánlott a közel egy napon született állatok használata. Emellett, a gélek közötti variancia jelentősen csökkenthető azzal, ha az egy vizsgálatban résztvevő mintákat egymáshoz képest rövid időn belül dolgozzuk fel. A NMRI csoportokon végzett páros összehasonlítások során szintén nagyon hasonló variancia értékeket kaptunk a „testvér” és „nem-testvér” egerek esetén. A legtöbb, szignifikáns különbség az NMRI és C3H/HEN csoportok összehasonlítása során adódott, bár a csoportok varianciája ebben az esetben is hasonló volt. A „testvér” és „nem-testvér”, valamint a kültenyésztett és beltenyésztett populációk hasonló variancia értékei azt sugallják, hogy a genetikai háttérnek elhanyagolható hatása van az agyi proteom varianciájára. Azonban, figyelembe kell venni az elvégzett kísérletek korlátait. A „power”-analízis jelzi, hogy nagyobb esetszám esetén kisebb különbségek is detektálhatóak. Emellett, a vizsgálatban résztvevő proteinek a nagy kópiaszámú fehérjék csoportjába tartoznak, ezért az agyi proteom egy más szintjét vizsgálva, egyedek közötti eltérő varianciát tapasztalhatunk. Továbbá, más szervek vizsgálata során is eltérő varianciát kaphatunk.

Az elvégzett vizsgálatok bizonyítják, hogy kvantitatív 2D-GE analízis sikeresen elvégezhető „olcsó” kivitelben (házilag szintetizált RuBPs festék). A nagy biztonsággal detektálható mennyiségi különbségek mértéke limitált, azonban a variancia-tényezők figyelembevételével javítható.

## 2. *Oligomer A $\beta$ 1-42 hatásának 2D-GE proteomikai vizsgálata*

Napjainkig számos 2D-GE analízisen alapuló proteomikai vizsgálat született az AK kutatás területén. Azonban, az eddigi ismereteink ellenére az A $\beta$ 1-42 neuronokra gyakorolt pontos hatása nem ismert. Mára már széles körben elfogadott tény, hogy az A $\beta$ 1-42 aggregációs formái közül az oligomerek játszanak elsődleges szerepet a neurodegeneráció indukálásában.

Az általunk elvégzett kísérletek során differenciált SH-SY5Y neuronális sejteket „iso-A $\beta$ 1-42” perkurzor peptidből frissen előállított oligomer A $\beta$ 1-42-vel kezeltünk. A sejtlyátumok 2D-GE vizsgálata után számos szignifikánsan változó fehérjepontot detektáltunk. A statisztikai vizsgálatok során csak a legalább másfélszeres változásokat vettük figyelembe. Ezek alapján 52 szignifikánsan változó fehérjepontot találtunk, melyekből tömegspektrometriai analízis során 47 fehérjét sikerült azonosítanunk, ebből 22 csökkent, 25 pedig növekedett expressziós változást mutatott. Néhány esetben ugyanazt a fehérjét

azonosítottuk több fehérjepontból is. A két, legnagyobb mennyiségi különbséget mutató fehérjét (Hsp70 és EEF2) Western blot analízissel is igazoltuk.

Az azonosított fehérjék funkcionális csoportosításából egyértelműen látszik mely sejtélettani folyamatok érintettek az oligomer A $\beta$ 1-42 kezelés hatására. A csökkent expressziójú fehérjék között nagy számban azonosítottunk a fehérje bioszintézisben, citoszkeleton szerveződésben és metabolikus folyamatokban szerepet játszó proteineket. Míg, a megnövekedett mennyiségű fehérjék között elsősorban stressz-fehérjéket, proteolitikus fehérjéket, valamint metabolikus folyamatokban szerepet játszó proteineket találtunk. A stressz-fehérjék nagy száma egyértelműen jelzi az oligomer A $\beta$ 1-42 sejtekre gyakorolt hatását. A stressz-fehérjékben belül nagy számban azonosítottunk chaperone-funkciójú proteineket, melyek közül ki kell emelni az endoplazmás retikulum (ER) chaperone fehérjéket. Ez, oligomer A $\beta$ 1-42 által indukált ER-stresszre utal, amellyel összhangban van a fehérje bioszintézisben szerepet játszó fehérjék csökkent expressziója.

A vizsgálataink során azonosított fehérjék és azok funkcionális csoportjainak többségét már kapcsoltnak hozták AK során kialakuló neuronális sejtpusztulással. Az általunk azonosított ER chaperone fehérjék nagy száma arra utal, hogy az ER-stressz központi szerepet játszhat oligomer A $\beta$ 1-42 indukált sejthalálban. Ezért, az ehhez kapcsolódó molekuláris folyamatok további vizsgálata segíthet az AK során fellépő neuronpusztulás megértésében.