



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
MTA-SZBK Biokémiai Intézet

XXXI. OTDK BIOLÓGIA SEKCIÓ

**Hisztón-acetilációs változások
szorongó és nem-szorongó egértörzsben**

KÉSZÍTETTE:

Eszik Ildikó

Vegyész MSc szak

Témavezető: Dr. Szegedi Viktor, tudományos munkatárs

Belső konzulens: Dr. Gyurcsik Béla, egyetemi adjunktus

Szeged

2012

Rövidítések jegyzéke

5-HT	5-hidroxi-triptamin (szerotonin)
Ac-H4K12	H4 hiszton fehérje 12-es pozíciójában acetilált lizin oldallánc
<i>ad libitum</i>	szabadon, tetszés szerint
AX	Anxious (szorongó)
nAX	non-Anxious (nem-szorongó)
bp	bázispár
BUS	buspiron
EPM	Elevated Plus-Maze (emelt keresztpalló teszt)
dhipp	dorsális hippocampus
H1	hiszton 1 fehérje
H2A	hiszton 2A fehérje
H2B	hiszton 2B fehérje
H3	hiszton 3 fehérje
H4	hiszton 4 fehérje
H4K12	H4 hiszton fehérje 12-es pozíciója
HAT	hiszton acetiltranszferáz
HDAC	hiszton deacetiltranszferáz
HRP	horseradish peroxidase (tormaperoxidáz)
IgG	Immunoglobulin-G
i.p.	intraperitoneális, hasüregbe történő adagolás
n	elemszám
p	a null-hipotézis p szignifikancia-szintje
PBS	Phosphate Buffered Saline
pfc	prefrontális kéreg
PVDF	polivinilidén-difluorid
SEM	standard error of the mean (átlag szórása)
vhipp	ventrális hippocampus

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	1
1. Összefoglalás.....	3
2. Bevezetés / irodalmi áttekintés	4
2.1. Szorongás.....	4
2.2. Szorongó és nem-szorongó egértörzsek, mint az anxiétás modelljei	5
2.2.1. Emelt keresztpalló teszt (Elevated Plus Maze).....	6
2.2.2. Nyílt porond teszt (Open-field).....	7
2.2.3. Fény-sötét teszt (Light-dark teszt)	8
2.3. Epigenetikai módosítások: hiszton módosítások	10
3. Célkitűzés	15
4. Anyagok és módszerek.....	16
4.1. Kísérleti állatok és tartási körülményeik.....	16
4.2. A szorongásos állapot meghatározása	16
4.3. Buspiron.....	17
4.4. Hiszton extrakció	18
4.5. SDS-PAGE és Western-blot hibridizáció	18
5. Kísérleti eredmények	21
5.1. Kezelés nélküli szorongó és nem-szorongó egerek acetilációs szintje a H4K12 helyen	21
5.2. Szorongásoldóval történő kezelés hatása az acetilációs szintre szorongó és nem szorongó egerekben	23
6. Diskusszió	26
7. Köszönetnyilvánítás	27
8. Irodalomjegyzék.....	28
Nyilatkozat	31

1. Összefoglalás

A generalizált szorongásos kórkép kialakulásának oka lehet a félelmi rendszer rossz alkalmazkodása, mely során ártalmatlan ingerekhez kellemetlen asszociációk társulnak. A rosszul lezajlott tanulási folyamat háttérében epigenetikai változások állhatnak, melyek a DNS szekvencia módosítása nélkül okoznak hosszantartó génexpressziós változásokat. A legtöbbet kutatott epigenetikai változás a hiszton-fehérjék acetilációs szintjének módosulása.

Kísérletünkben a szorongással összefüggő hiszton-acetilációs szintet vizsgáltuk Western-blot analízissel két beltenyésztett egértörzsön, melyek eltérő szorongási szintet mutatnak egy sor, viselkedési teszten (AX és nAX törzs). A vizsgált agyterületek közül a szorongással összefüggő ventrális hippocampusban tapasztaltuk a legnagyobb különbséget a H4K12 acetilációs szintben, ahol az nAX törzsben szignifikánsan kevesebb acetilált hiszton volt. A klinikailag hatékony szorongásoldó, a buspiron a nAX törzsben a ventrális hippocampusbeli Ac-H4K12 szintet növelte, míg az AX törzs esetén a prefrontális kéregben okozott acetyl-szint növekedést.

Ezek az adatok alátámasztják az epigenetikai változások jelentőségét a pszichiátriai kórképek kialakulásában.

Kulcsszavak: egér modell, szorongás, hippocampus, prefrontális kéreg, hiszton-acetiláció, buspiron

2. Bevezetés / irodalmi áttekintés

2.1. Szorongás

Az élet minden területén találunk stresszhez vezető élményeket, melyek nemcsak akut, de krónikus stresszhez is vezethetnek, mély depressziót, vagy más pszichiátriai rendellenességet kiváltva. A környezeti tényezők épp úgy, mint a genetikai, epigenetikai és idegi folyamatok szabályozhatják a stresszhez való alkalmazkodást [1].

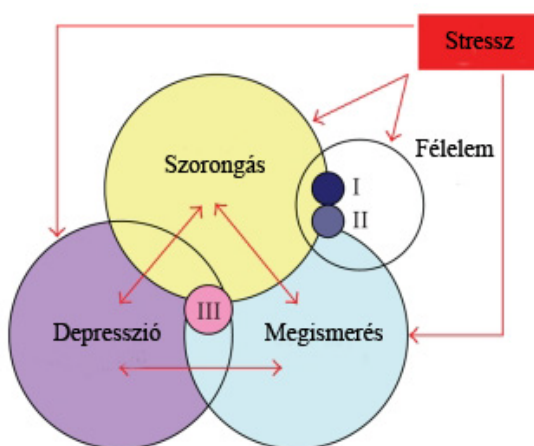
A szorongás az egyik alapvető érzelmi típusunk, azonban túlzott kifejeződése számos szorongásos kórképhez vezethet. A félelmi reakciókban kiemelt szerepet játszik a ventrális hippocampus → mediális prefrontális kéreg → amygdala kör, melyben a hippocampus közvetíti a kontextuális információt, míg a prefrontális kéreg határozza meg, hogy averzív-e a környezet (*gatekeeper*) [2].

A közelmúltban igazolták, hogy a ventrális hippocampus, és nem a dorsális hippocampus, felelős a normális mértékű szorongás-kapcsolatos magatartásért [3]. A dorsális hippocampus közvetíti a térbeli, míg a ventrális az emocionális információt.

A szorongásos kórképek okaként a rosszul rögzült félelmi tanulást (*maladaptive fear learning*) emelhetjük ki, melynek hatására ártalmatlan ingerek is félelmi reakciókat váltanak ki [4]. Az ilyen hosszantartó viselkedésbeli változások és memórianyomok legalább részben epigenetikailag szabályozottak. Az epigenetikai szabályzás egyik fő mechanizmusa a hiszton fehérjék acetilációs-szintjének szabályozása hiszton-acetiltranszferázokon (HAT) és hiszton deacetilázokon (HDAC) keresztül.

2.2. Szorongó és nem-szorongó egértörzsek, mint az anxiétás modelljei

A kognitív folyamatok fontos szerepet játszanak a stressz indukálta neuropszichiátriai zavarokban, azon belül olyan érzelmi zavarokban, mint a szorongás vagy a depresszió (1. ábra). Az állatkísérletes modellek az agyi rendellenesség feltérképezésében, ma már nélkülözhetetlenek a mindenkori orvosbiológiai kutatásokban [5].

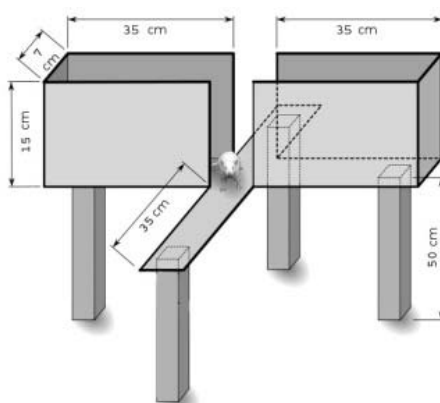


1. ábra: Kapcsolat a félelem, a szorongás (beleértve a poszttraumás stresszt (I) és a fóbiás betegségeket (II)), a depresszió (beleértve a negatív emlékekhez fűzhető visszatérő depressziót (III)) és a kognitív területek között a neuropszichiátriai zavarok kísérleti modelljeiben [5].

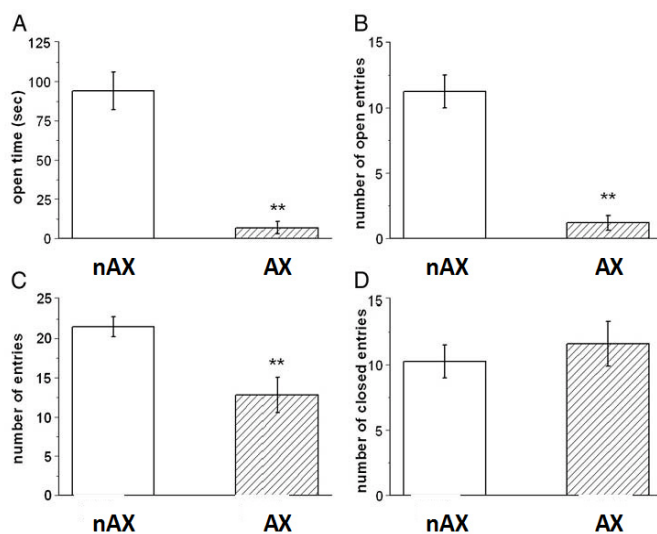
A kísérleti állatok szorongási szintjének vizsgálatára különböző tesztek léteznek. Ezek közül néhány, kutatócsoportunk által is használt módszert ismertetek az alábbi pontokban.

2.2.1. Emelt keresztpalló teszt (Elevated Plus Maze)

Az emelt keresztpalló teszt a rágcsálók veleszületett félelmi explorációs konfliktusmodellje. Az apparátus a földtől kb. 50-80 cm-re van megemelve, és a centrális zónából két magasított falú palló, illetve két nyitott kar ágazik el. A rágcsálók a zárt karban nagyobb biztonságban érzik magukat, mint a nyitott karban, de ha a szorongási szintjük normális, idővel megnő az explorációs kíváncsiságuk és több időt fognak eltölteni a nyílt térben (2. ábra) [6].



2. ábra: Az emelt keresztpalló apparátus sematikus ábrája: a centrális zónából két magasított falú palló, illetve két nyitott kar ágazik el. A rágcsálók a zárt karban nagyobb biztonságban érzik magukat, mint a nyitott karban. De, ha a szorongási szintjük normális, idővel megnő az explorációs kíváncsiságuk és több időt fognak eltölteni a nyílt térben [6].



3. ábra: Viselkedési paraméterek szorongó (AX) és nem-szorongó (nAX) egereknél emelt keresztpalló teszt esetén. A: Nyitott karban töltött idő; B: nyitott karba történő kilépések száma; C: az összes kilépések száma; D: zárt karba történő belépések száma. ** $p \leq 0,01$ [7].

A teszt során különböző változókat regisztrálnak (3. ábra), úgymint:

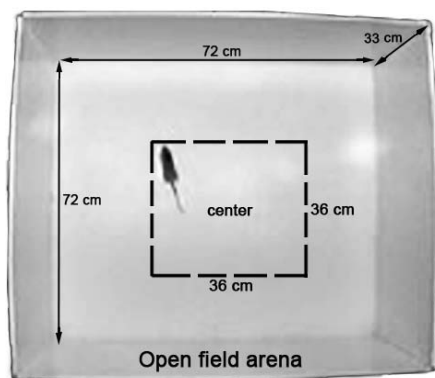
- a középre lépések számát,
- a zárt karba történő belépések számát,
- a nyílt karba történő kitekintések számát,
- milyen hosszú ideig tartózkodik az állat a zárt karban,
- milyen hosszú ideig tartózkodik a centrális zónában.

2.2.2. Nyílt porond teszt (Open-field)

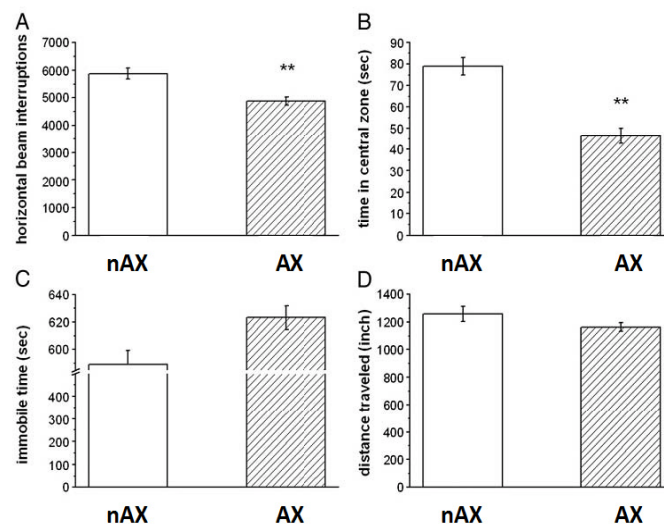
A nyílt porond tesztet a motoros aktivitás, az explorációs motiváltság mérésére, illetve a szorongás mértékének megállapítására alkalmazzák. A teszt során számítógéppel összekötött videokamerával rögzítik az állat spontán mozgásmintázatát, és a kapott adatokat értékelik. Az arénát több, négyzet alakú zónára osztják fel, melyeket vonalak jelölnek. A porond egyik legfontosabb pontja a középén található centrális zóna (4. ábra).

A szorongást előidéző faktor a nyílt porond teszt során maga a nyílt tér, mivel a rágcsálók természetes életkörülményeik között szűk járatokban élnek, éppen ezért elsősorban a falak mentén szeret az állat közlekedni. Minél kevésbé szorongó az állat, annál nagyobb az explorációs kedve, a kíváncsisága, így annál többször fog kitekinteni a nyílt térbe, a centrális zóna irányába [8].

A teszt során olyan paramétereket regisztrálnak, mint a rágcsáló által megtett összes út, az átlépett vonalak száma és annak gyakorisága, valamint a centrális zónába történő kitekintés számát és az ott eltöltött idő mennyiségét (5. ábra).



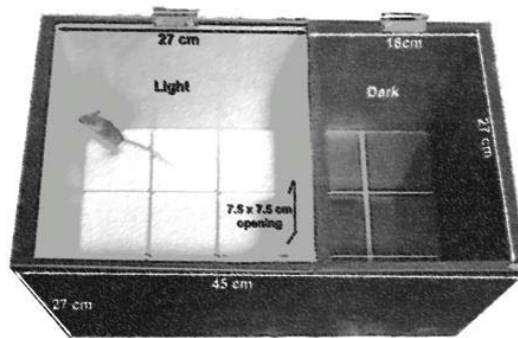
4. ábra: Nyílt porond tesztre használt apparátus. Az arénát több zónára felosztva figyelik és számítógépre rögzítik a rágcsáló mozgásmintázatát. A porond közepén található az ún. centrális zóna [8].



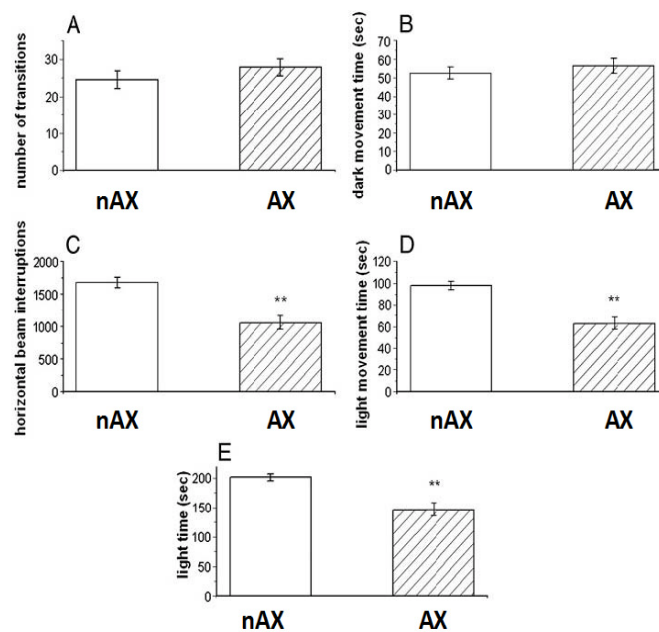
5. ábra: Viselkedési paraméterek szorongó (AX) és nem-szorongó (nAX) egereknél nyílt porond teszt esetén. A: horizontális infravörös sugár által mért mozgás; B: középpontban töltött idő; C: mozdulatlanul töltött idő; D: teljes megtett távolság. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ [7].

2.2.3. Fény-sötét teszt (Light-dark teszt)

A fény-sötét teszt apparátusa két térrészből áll: egy, a rágcsálók számára biztonságosabbnak tartott sötét részből és egy félelmet előidéző világos térrészből. A két, egymástól elválasztott térrész között egy nyílás található, amelyen keresztül az állatok szabadon átléphetnek az egyik térből a másikba (6. ábra). A szorongást előidéző faktor a fény-sötét teszt során a fénnel megvilágított világos térrész, hiszen a rágcsálók természetes életkörülményeik között szürkületkor és az éjszakai órák első felében aktívak. A teszt során egy sor, viselkedési paramétert figyelnek és regisztrálnak, úgymint az egyes térfeleken töltött időt, horizontális mozgást, az ágaskodások számát, valamint az egyik térfélből a másikba történő átlépések számát. A szorongás mértékére az egyes térfeleken eltöltött időből lehet következtetni, azaz minél több időt tölt el az állat a megvilágított térrészben, annál kevésbé szorongó (7. ábra) [9].



6. ábra: Fény-sötét teszthez használt apparátus. Két térrész különíthető el: egy sötét és egy fénnel megvilágított. A két rész közötti elválasztó falban van egy nyílás, amelyen keresztül a rágcsálók szabadon mozoghatnak a két tér között. A teszt során különböző viselkedési paramétereket és mozgásmintázatot regisztrálnak és értékelnek [9].



7. ábra: Viselkedési paraméterek szorongó (AX) és nem-szorongó (nAX) egereknél fény-sötét teszt esetén. A: a fényes/sötét kamrákba történő átmenet száma, B: mozgásidő a sötét rekeszben; C: horizontális infravörös sugár által mért mozgás, D: mozgásidő a megvilágított rekeszben, E: eltöltött idő a megvilágított rekeszben. ** $p \leq 0,01$ [7].

2.3. Epigenetikai módosítások: hiszton módosítások

A DNS a kromatinban helyezkedik el. A kromatin szerveződése több lépcsős folyamaton keresztül történik. Először a DNS két szála kettős hélix szerkezetet vesz fel, mely a hiszton fehérjékre tekeredve nukleoszóákat formál. A nukleoszóák füzérszerűen ismétlődnek szakaszonként, és szabályosan összetömörödve alkotják a kromatin szálát. A kromoszóma működésétől függően a kromatin szál feltekeredésével, hurkolódásával további kondenzálódás érhető el (8. ábra). Szerkezete dinamikusan változik az egyedfejlődés és differenciálódás alatt. Fontos szerepet tölt be a gének kifejeződésében, és a DNS megkettőződésében, a replikációban is [10].

Az úgynevezett eukromatinban a hiszton fehérjék nem kötődnek szorosan a DNS-hez, ez által biztosítva laza, nyitott szerkezetet, melyen sokféle molekula, fehérje hozzáférést nyerhet a DNS megfelelő (szabályozó, kódoló) régióihoz. A génexpresszió aktív, szinte folyamatos az mRNS átírás. Ezzel szemben a jobban kondenzálódott rendeződött, zárt szerkezetű heterokromatin inaktív. A DNS-t körülvevő hiszton fehérjék szoros kapcsolata miatt az RNS polimeráz (DNS-ről RNS átírást végző) enzim nem fér hozzá a DNS-hez. A gének expressziójának ezért fontos szabályozója a kromatinszerkezet, melynek megváltozása szükséges az expresszió hosszú távú változásához [10].

A hisztonok olyan kisméretű fehérjemolekulák, melyek jellegzetessége, hogy pozitív töltésű aminosavakban (arginin, hisztidin, lizin) gazdagok. A hiszton fehérjéknek 5 típusa ismert: H1; H2A; H2B; H3 és a H4 hisztonok, amelyek közül a H1-es hiszton kivételével mindegyik típus részt vesz a 147 bp hosszú DNS szerkezeti alapegységének, a nukleoszóának a kialakításában (9. ábra). Ezeket a nukleoszóális hisztonokat acetilálják, metilálják, (stb.) az epigenetikai módosító enzimek, melyek a DNS metilációval együtt alkotják az epigenetikai kód nagy részét [11]. Ez minden sejt esetében elvileg egyedi lehet, ami főleg az idegsejtek esetében válik érdekessé.

Az eltérő hiszton módosítások együttműködő, vagy ellentétes kölcsönhatást gyakorolnak a kromatinhoz kötődő fehérjékkel, amivel a transzkripcionálisan aktív vagy csendes állapotok közti dinamikus átmeneteket szabályozzák és szerepet játszanak a DNS megkettőződésében, a DNS hibák javításában és a mitózisban is [12]. A hisztonok pozitív töltésű lizin oldalláncai a DNS negatív töltésű foszfát csoportjaihoz szorosan kapcsolódnak. Az aktív géneknél vagy promótereiknél a hisztonok - főként a H3 és H4 - nagyon acetiláltak. Acetilációjuk során a nettó töltéseik semlegesítődnek, és a nukleoszóális „gyöngyfűzér” becsomagoltsága csökken, ily módon a DNS hozzáférhető

lesz a transzkripció faktorok számára. Ezáltal a hiszton acetiláció, mint a kromoszómákon található epigenetikai jel, a transzkripcióra való alkalmasságot jelöli. Deacetilációjukkal ellentétes folyamat játszódik le, a transzkripció gátlódik, és a kinyúló hiszton végek represszor fehérjéket kötnek meg [13]. Egyes esetekben a DNS metiláció és a hiszton deacetiláció egyidejűleg eredményezi a géncsendesítést [14].

A kromatin szerkezet dinamikus átmeneteit a kapcsolódó nem-hiszton típusú kromoszómális fehérjék biztosítják. Közülük kiemelkedő fontosságúak a „hiszton kódot” előállító és azt leolvasó fehérjék, mint például a hiszton acetiltransferáz (HAT) és a hiszton-deacetiláz (HDAC) enzimek, melyek közösen együttműködve határozzák meg az általános genom szintű hiszton acetiláltsági állapotot. Ezáltal a transzkripció állapotok közötti központi kapcsolóként működnek [15].

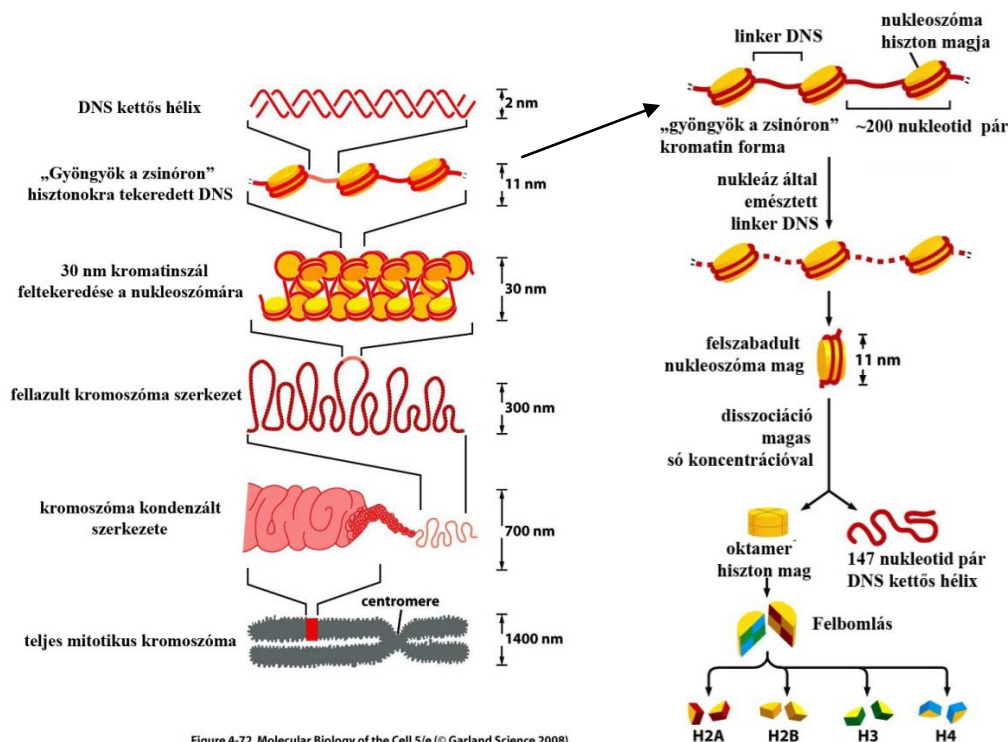
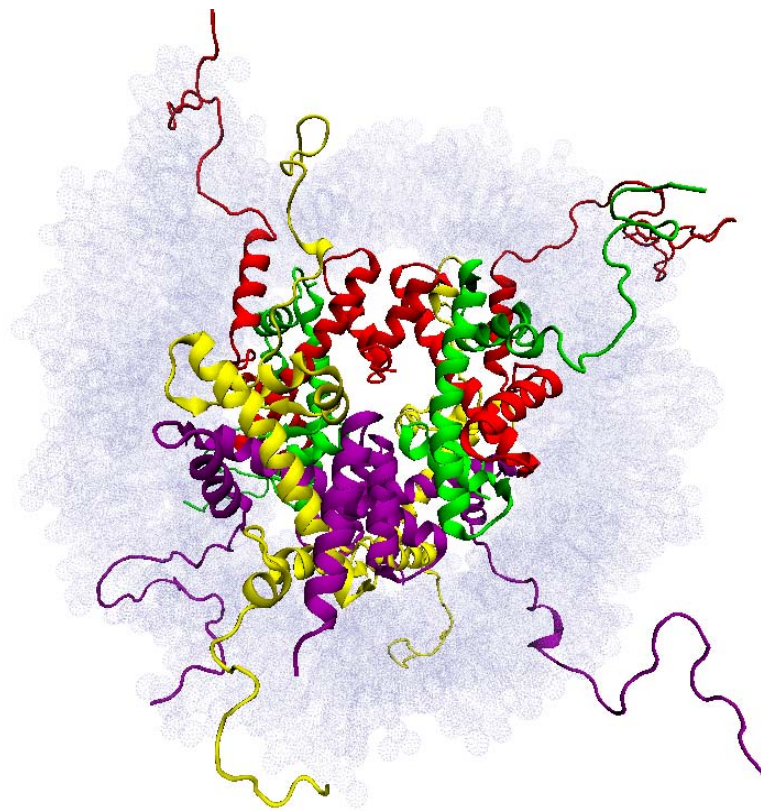


Figure 4-72 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Figure 4-23 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

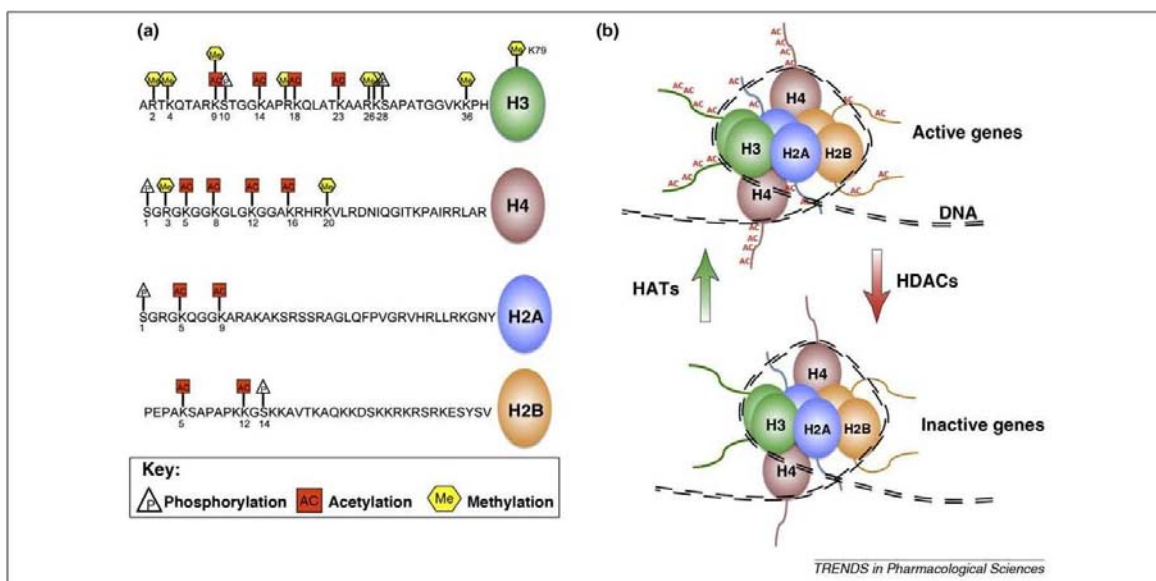
8. ábra: A kromatin szerveződése és a nukleoszóma szerkezeti felépítésének kialakulása. Első lépésben kialakul a DNS kettős hélix szerkezete, mely a hiszton fehérjékre tekeredve nukleoszómákat formál. A nukleoszómák fűzerszerűen ismétlődnek szakaszonként, és szabályosan összetömörödve alkotják a kromatin szálát. A kromoszóma működésétől függően a kromatin szál feltekeredésével, hurkolódásával további kondenzálódás érhető el. A hiszton fehérjéknek 5 típusa ismert: H1; H2A; H2B; H3 és a H4 hisztonok, amelyek közül a H1-es hiszton kivételével mindegyik típus részt vesz a 147 bp hosszú DNS szerkezeti alapegységének, a nukleoszómának a kialakításában [11].



9. ábra: A nukleosóma fő szerkezete a hisztonokkal, 1,9 Å felbontásban. H2A (sárga), H2B (lila), H3 (piros) és H4 (zöld), valamint a DNS kettős helix szerkezete a centrális hiszton oktamer körül (szürkés-kék). (forrás: PDB 1KX5).

Az agyban történő génexpresszió változás lehet a kulcs az öregedés és a neurodegeneratív folyamatok közötti kapcsolatban. A hiszton-acetiláció egy átmeneti epigenetikus módosulás, melyhez rendszerint aktív génexpresszió társul, ezáltal lehetővé téve a kromatin plaszticitást. Ez utóbbi kapcsolatban áll a tanulási folyamatokkal és a memóriával a felnőtt agyban.

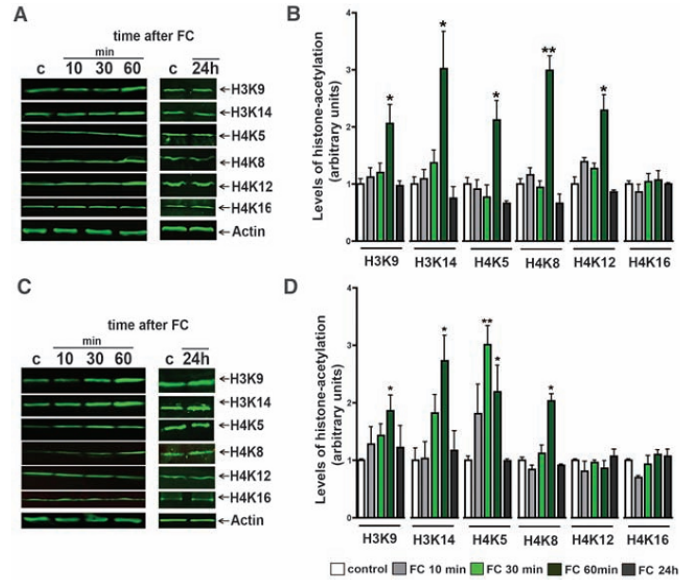
Ezek a folyamatok még nem teljesen feltérképezettek. Az epigenetikai mechanizmusok, mint a DNS metiláció és a hiszton acetiláció rendkívül fontosak az emlékezés folyamatában, mert hosszútávon megváltoztatja a génexpressziós mintázatot, külső ingerek hatására. (10. ábra). A megváltozott kromatinplaszticitás és hiszton-acetiláció a kognitív funkciók hanyatlásához, neurodegenerációhoz és neuropszichiátriai kórfolyamatokhoz vezethet [16].



10. ábra: A génexpresszióban résztvevő főbb, ismert hiszton modifikációk. (a) A hisztonfarkak különböző poszt-transzlációs módosításokat szenvednek el, mint például a foszforiláció, acetiláció és a metiláció. Ezek a módosítások eredményezik a különböző mintázatot, azaz a hiszton-kódot, ami a génexpresszióra kihatással van. (b) A hiszton-acetiláció a hiszton-acetiltranszferázok (HAT-ok) és a hiszton-deacetyltranszferázok (HDAC-ok) által szabályozott [16].

A szorongás genetikai hátterének megismeréséhez nAX és AX egerek prefrontális kérgében és hippocampusában, a molekuláris hálózatok feltérképezésével szerettek volna közelebb jutni. Transzkriptom vizsgálatával, párhuzamosan QPCR, és microarray módszerekkel, a vizsgált géneknek ~ 2%-a szignifikáns különbséget mutatott legalább az egyik agyrégióban [17].

Az öregedéssel a memória megromlik, azonban ennek pontos mikéntjére még nincs meg a magyarázat. Egyes kísérletek azt mutatják, hogy a megváltozott hippocampális kromatin plaszticitás összefüggésben állhat ezzel a problémával. Tanulás alatt az idősebb egerekben specifikus dereguláció mutatkozott a H4K12 acetilációs szintben. Ez azt sugallja, hogy a H4K12 acetiláció deregulálódása egy korai markere lehet az öregedést kísérő kognitív hanyatlásnak (11. ábra) [18].



11. ábra: Csökkent tanulási funkció és emlékezés figyelhető meg a 16 hónapos egereknél, ami korrelál a H4K12 acetilációs szint csökkenésével. (A) 3 hónapos egerek hiszton acetilációs szintjét reprezentáló immunoblot félelmi kondicionálást követően (fear conditioning, FC). A kontroll egerekkel (c) azonos módon bántak, de ezek nem kaptak láb-sokkolást. (B) Az (A) ábrán bemutatott Western-blot kiértékelése. (C) Az analízis a (A) pontban leírtakkal egyezik, de itt 16 hónapos egerek voltak az alanyok. (D) (C) ábrán bemutatott Western-blot kiértékelése. (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ a kontroll függvényében) [18].

3. Célkitűzés

A pályamunkám elkészítése során a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Van-e különbség az agyi H4K12 acetilációs szintben a szorongó illetve a nem szorongó egerek között?
2. Milyen hatással van a H4K12 acetilációs szintre a szorongásoldóval történő kezelés?

4. Anyagok és módszerek

4.1. Kísérleti állatok és tartási körülményeik

Az EGIS volt állatház vezetője, dr. Müller Géza által kitenyésztett hiperszorongó egerek jelentős szorongást mutatnak emelt-keresztpalló tesztben, nyílt porond tesztben, és fény-sötét kamra tesztben, jó modellként szolgálhatnak a generalizált szorongásos zavar (GAD) vizsgálatához.

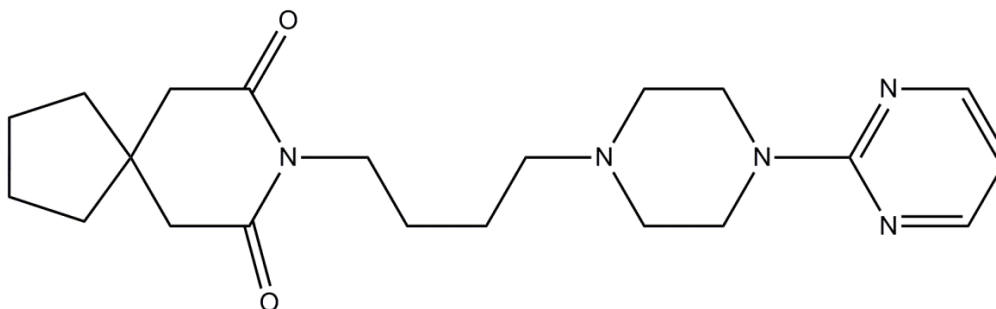
Kísérleteinkben 3 hónapos, beltenyésztett, hím egereket használtunk. Az állatok egy erre kialakított, klimatizált állatházban (a hőmérséklet 22 ± 1 °C, a relatív páratartalom 65-70 %-os) voltak, ahol külön ketrecekben helyeztük el az állatokat. A természetes napszaknak megfelelő mesterséges megvilágítást alkalmaztunk, 12 óra sötét és 12 óra világos periódust biztosítottunk. A világos periódus reggel 7 órakor kezdődött. Az állatok tápot és csapvizet *ad libitum* fogyaszthattak. Az állatok tartásánál és a kísérletek során az állatetikai kódex szabályait betartva jártunk el (European Community Council Directive - 1986. November 24. 86-609-EEC).

4.2. A szorongásos állapot meghatározása

Az emelt keresztpalló tesztrel megmutatható, hogy egyértelmű különbség van nAX és AX fenotípusok között. Az egerek explorációs viselkedését tanulmányozva regisztráltuk a nyitott karban, illetve a zárt karban eltöltött időket.

4.3. Buspiron

Jelen dolgozatban a buspiron szorongásoldó hatását tanulmányoztuk. A buspiron egy nem benzodiazepin, azaspirodekándion származék, melyet a humán klinikumban is használnak, a szorongásos zavarok kezelésére (12. ábra).



12. ábra: 8-[4-(4-pirimidin-2-ilpiperazin-1-il)butil]-8-azaspiro[4.5]dekán-7,9-dion

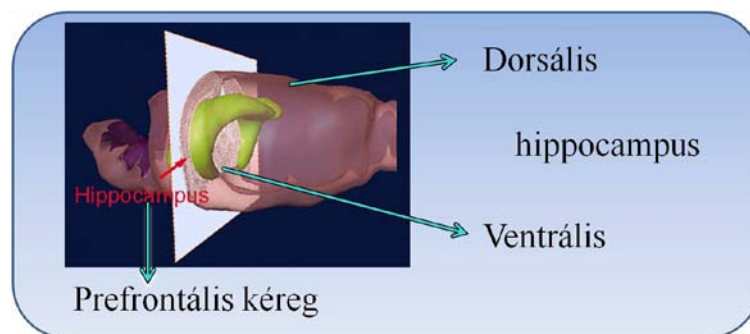
A buspiron az 5-HT-1_A receptorok parciális agonistája, szorongásoldó és antidepresszáns tulajdonságokkal rendelkezik. Anxiolitikus hatását főleg a szerotonerg rendszer modulálásával fejt ki. Elsősorban generalizált szorongásos állapotokban alkalmazzák, hatása lassan alakul ki, ezért nem alkalmas akut szorongásos rohamok kezelésére. Előnye a benzodiazepinekkel szemben, hogy nincs hipnotikus és izomrelaxáns hatása, nem okoz motoros és kognitív teljesítménycsökkenést. Alkalmazása során nem alakul ki tolerancia, sem dependencia, elhagyásakor nincsenek megvonási tünetek [19].

Az egereket 2 hónapos koruktól kezdve kezeltük 5-HT-1_A receptor parciális agonistával, azaz buspironnal 1 hónapon keresztül 2,5 mg/testtömeg kg koncentrációban, melyet minden nap intraperitoneális (i.p.) injekcióban kaptak meg.

4.4. Hiszton extrakció

A hiszton extrakciót agyszövetből készítettük. Az egereket dekapituláltuk, mikrodisszekciót végeztünk és a ventrális hippocampust, a dorsális hippocampust, illetve a prefrontális kérget külön választva azonnal lefagyasztottuk a mintákat (13. ábra).

Anatómiai lokalizáció:



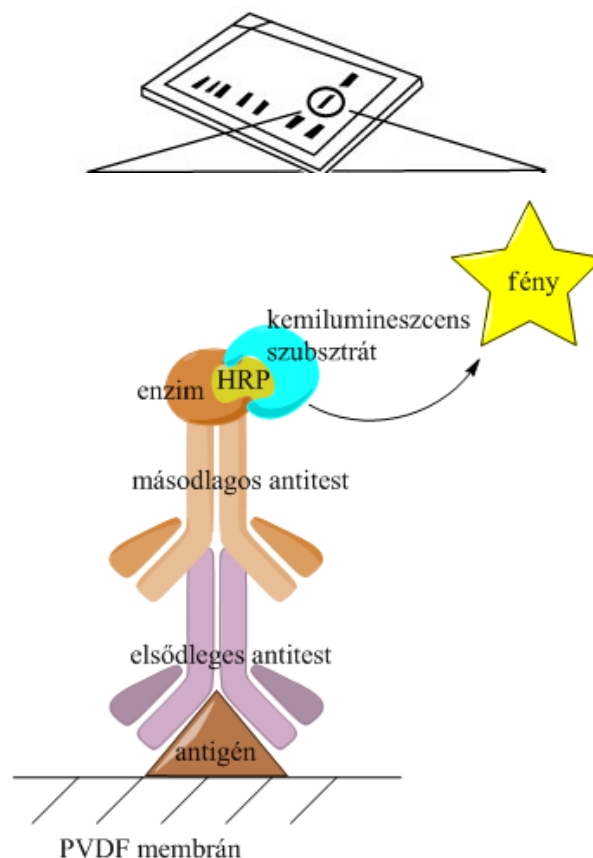
13. ábra: Az általunk vizsgált agyrégiók anatómiai elhelyezkedése.

Az immunoblothoz a lizátumokat a következőképpen preparáltuk:

Az agyszövetekből homogenizáló pufferrel izoláltuk a hisztonokat (50 mM Tris- HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % TritonX-100; PMSF; Na-Butirát), majd 4°C-on inkubáltuk, 15 percig centrifugálás előtt, mely 2,000 r.p.m. (400 g) fordulaton történt 10 percig. TX pufferben történő mosási fázis után a pelletet 0,2 M sósavban oldottuk fel, majd éjszakán át 4°C-on, rotátoron hagytuk inkubálódni. Másnap 10,000 r.p.m-en (9,300 g) centrifugáltuk a mintákat 10 percig. A felülúszót ezt követően egy új csőbe pipettáztuk, és -80 °C-on tároltuk felhasználásig.

4.5. SDS-PAGE és Western-blot hibridizáció

A Western-blot, vagy más néven immunoblot segítségével, specifikus elsődleges antitest felhasználásával detektálni tudjuk az általunk keresett fehérjéknek a különböző mintákban jelenlevő relatív mennyiségét (14. ábra).



14. ábra: A Western-blot hibridizáció során alkalmazott indirekt jelölés sematikus ábrája.

A Western-blot módszer röviden:

Az SDS-PAGE gél elektroforézis a legszélesebb körben elterjedt fehérje elválasztási technika. Az SDS egy anionos detergens, amely a fehérjék elsődleges szerkezetének megbontása nélkül képes komplexet alkotni bármilyen méretű és töltésű polipeptid láncsal. Az elektroforézis során a fehérjéket egy térhálós szerkezetű gélben, poliakrilamid gélben vándoroltatjuk elektromos áram segítségével, amely mint egy molekulaméret-szűrőként funkcionál. Ez a hatás a gél átlagos pórusméretétől függ.

A szétválasztott fehérjéket PVDF membránra transzferáljuk, ezt nevezzük „blottolásnak”. Legelterjedtebb az elektroforetikus transzfer, mely során elektromos áram segítségével a gélben lévő fehérjéket mobilizáljuk a gélből a membránra, amely nem specifikus hidrofób kötéssel megköti a fehérjéket. Mivel a membrán nagy hatékonysággal megköt minden fehérjét, ezért a mintában lévő fehérjék által szabadon hagyott membrán felületet le kell fednünk, hogy a későbbiekben ne kösse meg a kimutatáshoz használni kívánt fehérje természetű antitesteket, illetve hogy csökkentsük az egyéb aspecifikus kötődéseket. Ezt nevezzük blokkolásnak. Következő lépés a jelölés, mely indirekt antigén-antitest kötődési

reakción alapuló módszer, mivel nagy az érzékenysége és változatos jelölési megoldásokat tesz lehetővé. A detektálás során másodlagos antitesthez kötünk olyan enzimet, mely a szubsztrátjával reakcióba lépve kemilumineszcenciát eredményez [20].

A kísérlet menete:

A fehérje koncentrációkat NanoDrop ND-1000 UV-Vis spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies) mértük le. Kétszeres fehérje mintapuffert (végkoncentrációk: 250 mM Tris-HCl pH 6,8%; 4% SDS; 20% glicerol; 10% 2-merkaptoetanol; 0,04% brómfenolkék) adtunk mindegyik mintához. Mindegyik mintából 15 µg fehérjét vittünk fel és futtattunk meg az 5% akrilamid koncentráló gélen és 15% akrilamid szeparáló gélen. A fehérje gélét követően polivinilidén-difluorid (PVDF) membránra blottoltuk.

Hibridizálás, azaz a keresett fehérjék specifikus jelölése és detektálása:

A membránt tejpor 5%-os 1*PBS oldatával blokkoltuk szobahőmérsékleten 1 órán keresztül. Az általunk keresett fehérjéket specifikus antitestek felhasználásával jelöltük. Az Ac-H4K12 antitestet (Millipore, 1:5000) az acetiláltság mértékének megállapítására, a H3 antitestet (Abcam, 1:5000) pedig, mint viszonyítási paramétert alkalmaztuk, hogy normalizálhassuk, és ez által össze tudjuk hasonlítani az egyes mintákból származtatott értékeket. Mivel a H3 ugyanakkora arányban található a nukleoszómában, mint a H4, ezért használhatjuk fel ezeket, az egymáshoz képesti arány meghatározásához. A hibridizációt éjszakán át, 4 °C-on végeztük. A membránt ezt követően 1*PBS-T (0,1% Tween) oldattal mostuk háromszor 5 percig. Másodlagos antitestként 1:5000-es hígításban antimouse HRP enzimmal konjugált IgG-t alkalmaztunk, melyet tejpor 5%-os 1*PBS oldatában készítettünk el. A másodlagos ellenanyaggal való egy órás inkubálást követően a membránt háromszor mostuk. Immunoblot reagens (Lumi-Light Western Blotting Substrate, Roche) segítségével hívtuk elő a jeleket a membránunkról, „ChemiDoc™ XRS+ System with Image Lab™ Software”-t alkalmazva.

5. Kísérleti eredmények

5.1. Kezelés nélküli szorongó és nem-szorongó egerek acetilációs szintje a H4K12 helyen

Kísérleteink megkezdésekor először arra voltunk kíváncsiak, hogy alapvetően van-e különbség a szorongó és a nem-szorongó egértörzs között. Ennek felderítése érdekében első lépésként e két törzsből származó mintákat preparáltunk és vittünk fel a SDS poliakrilamid gélünkre. A Western-blot hibridizációt teljes H3 és Ac-H4K12 tartalmú tejpor 5%-os 1*PBS oldatával végeztük. A legmegfelelőbb koncentrációnak mindkét antitest esetén az 1:5000 arányú hígítás mutatkozott (15. ábra).



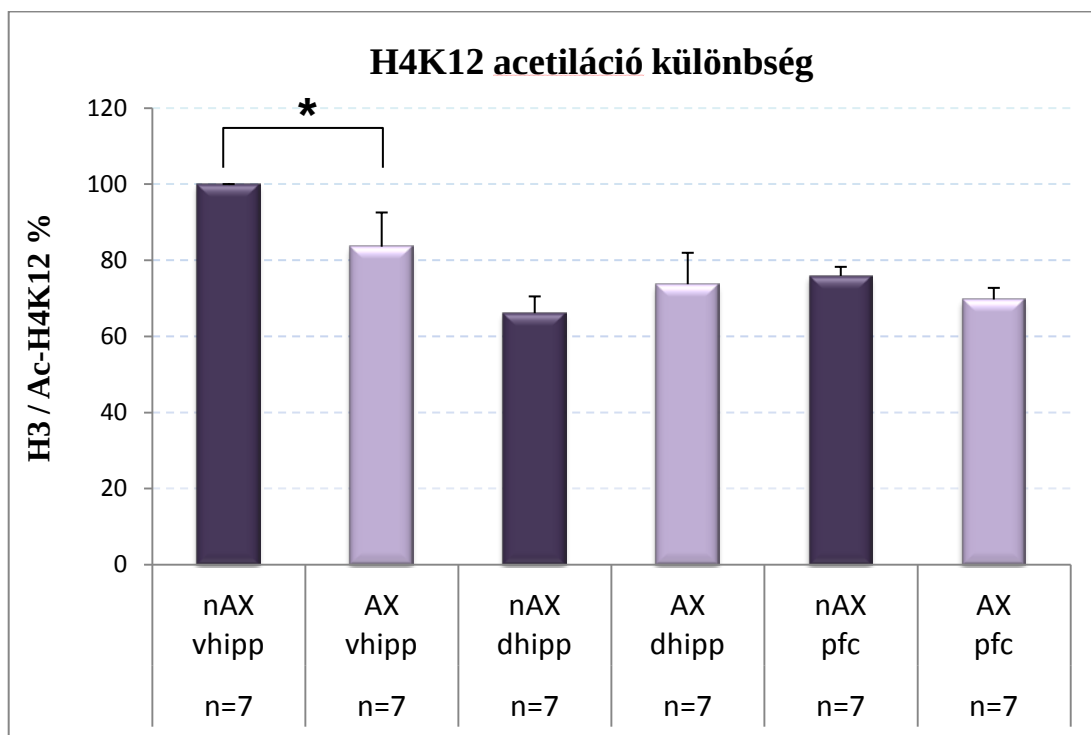
15. ábra: Reprezentatív Western-blot a nAX és AX egerek ventrális hippocampusában (vhipp), dorsális hippocampusában (dhipp) és prefrontális kérgében (pfc) a H4K12 acetilációs szint meghatározására, a teljes H3-hoz viszonyítva.

A membránunkon az egyes oszlopokban a sávok különböző területűek. Az egyes sávok területe arányos a sávot alkotó molekulák mennyiségével. A futtatás során fellépő torzulások korrekcióját R_f (relatív front) kalibrálással küszöbölhetjük ki. Az R_f -érték egy 0,0 és 1,0 közé eső valós szám, mely kifejezi a sáv által megtett távolságot a futtatás során. A gélek intenzitását kvantifikáltuk, és a relatív intenzitás adatokból meghatároztuk az egyes oszlopokban a kapott két sáv, a H3 és az Ac-H4K12 egymáshoz képesti arányát.

A nAX és AX törzsek ugyanazon agyrészeinek Ac-H4K12 szintjét tanulmányoztuk.

A kiértékelését követően azt kaptuk eredményül, hogy a három, általunk vizsgált agyrégió közül a ventrális hippocampus H4K12 acetilációs szintjében van nagyobb eltérés, az AX egerek acetilációs szintje magasabb. Ugyanakkor érdemes megjegyezni, a dorsális hippocampus és a prefrontális kéreg Ac-H4K12 szintje között nem találtunk jelentős különbséget.

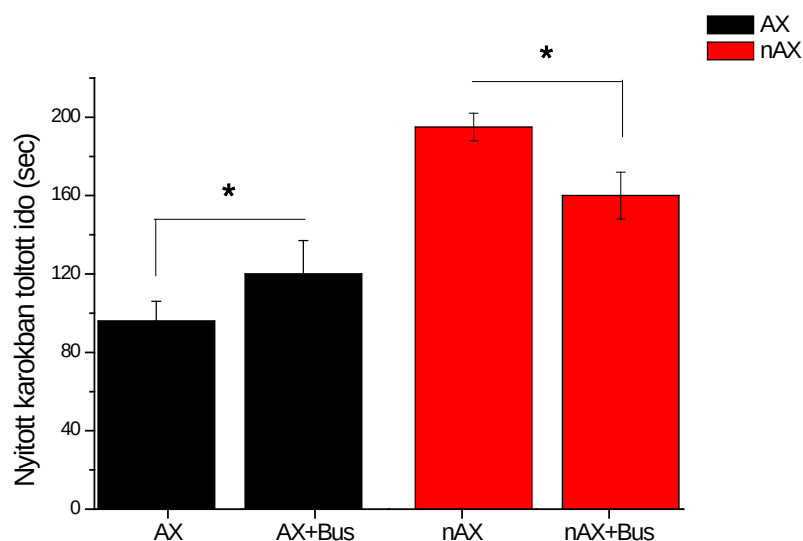
Az egyes Western-blot analízis eredményeit táblázatban összesítettük és statisztikai analízisnek vetettük alá. A 16. ábra az így kapott adatokat mutatja a szorongó és nem szorongó egértörzsben. Az értékelés során 100 %-nak vettük a nAX ventrális hippocampusban mért értékeket, és ehhez viszonyítottuk a többi agyrégió relatív Ac-H4K12 szintjeinek adatait.



16. ábra: AX (szorongó) és nAX (nem-szorongó) állatok hiszton-acetilációs vizsgálata (Ac-H4K12). Az értékelés során a nAX egyedek ventrális hippocampusában mért értékeket vettük 100 %-nak. Mivel jelen esetben a teljes H3 és az Ac-H4K12 arányáról van szó, ezért acetiláció-szint növekedés hatására az arányszám kisebb lesz. $p < 0,05$; Student t-teszt; n= elemszámok, hibasávok az átlag standardhibáját (SEM) jelzik.

5.2. Szorongásoldóval történő kezelés hatása az acetilációs szintre szorongó és nem szorongó egerekben

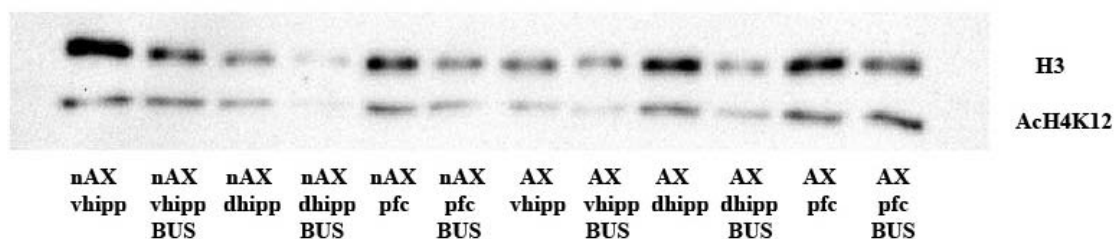
A klinikumban hatékony szorongáscsökkentő hatóanyagot, a buspironot alkalmaztuk a szorongás csökkentésére. A szorongásoldó hatásának vizsgálatára ebben az esetben is végeztünk emelt keresztpalló tesztet, valamint Western-blot analízist.



17. ábra: Szorongásoldó buspironnal (Bus) kezelt AX (szorongó) és nAX (nem-szorongó) egerek EPM vizsgálata. $n=10$, $p \leq 0,05$, Student t-teszt, a hibásávok az átlag standardhibáját (SEM) jelzik.

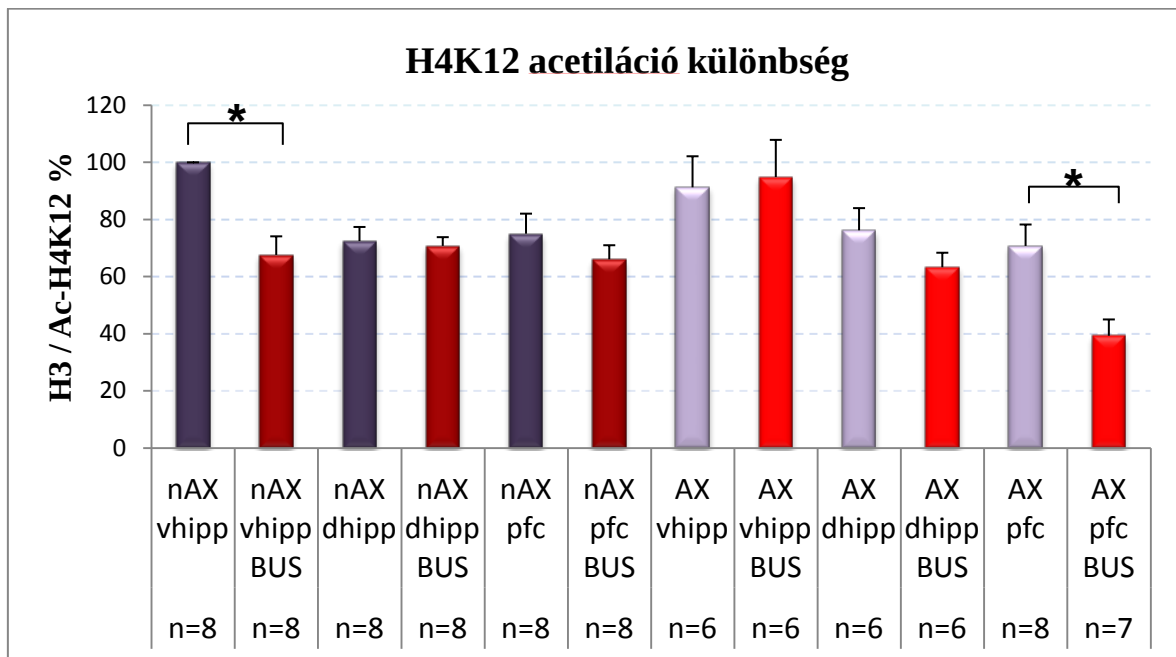
Az EPM-ben láthatóvá vált a buspiron szorongásoldó hatása az AX állatokban, de az eredetileg nAX egereknél szorongást idézett elő (17. ábra).

A emelt keresztpalló teszt után érdeklődéssel vártuk a Western-blot eredményét (18. ábra).



18. ábra: Reprezentatív Western-blot kép. AX (szorongó) és nAX (nem-szorongó) egyedek agyrégióinak H4K12 acetilációs szint vizsgálata kezeletlen kontroll és buspironnal (Bus) kezelt egerek esetén.

Az egyes sávok intenzitását hasonlóképpen kvantifikáltuk, mint ahogy azt az 5.1-es pontban ismertettem, azaz meghatároztuk az egyes oszlopokban a két fehérje-sáv, (H3 és az Ac-H4K12) egymáshoz képesti arányát. A kapott értékeket statisztikai analízisnek vetettük alá és az eredményeket diagramba foglaltuk. Az értékelés során a nAX egyedek ventrális hippocampusában mért értékeket vettük 100 %-nak, és ehhez viszonyítottuk a többi agyrégió relatív Ac-H4K12 szintjeinek adatait (19. ábra).



19. ábra: A Western-blot eredmények statisztikai kiértékelése. Megfigyelhető a buspiron (BUS) hatása a nAX törzs ventrális hippocampusára és az AX törzs prefrontális kéreg régiójára gyakorolt acetilációs szint növekedésben. Az értékelés során a nAX egyedek ventrális hippocampusában mért értékeket vettük 100 %-nak. Mivel jelen esetben a teljes H3 és az Ac-H4K12 arányáról van szó, ezért acetilációs szint növekedés hatására az arányszám kisebb lesz. $p < 0,05$; Student t-teszt; n= elemszámok, hibasávok az átlag standardhibáját (SEM) jelzik.

A krónikus kezelés hatására a buspiron a nAX egerekben a ventrális hippocampusban, míg AX egerekben a prefrontális kéregben növelte az acetilációs-szintet jelentős mértékben. Érdekes tény, hogy ez a hatás olyan helyen mutatkozott, amely a térbeli információk feldolgozásáért felelős régiókkal van összefüggésben.

A buspiron terápia nAx állatoknál a dorsális hippocampusban nem fejtett ki hatást a kontrollhoz képest, a prefrontális kéregben - a ventrális hippocampusnál tapasztaltakhoz képest - egy sokkal kisebb szintű acetilációs-szint növekedés figyelhető meg.

Szorongó egyedekben nem volt hatással a ventrális hippocampusra az anxiolítikum. A dorsális hippocampusban kismértékű acetilációs-szint növekedés észlelhető.

Ezeket az eredményeket figyelembe véve megállapítható, hogy a krónikus buspiron kezelés kihat a H4K12 acetilációs szint megváltozására.

Természetesen megjegyzendő, hogy a jelen dolgozatban bemutatott eredmények és hatások messze nem nyújtanak globális képet az epigenom változásáról, hiszen, mint arról bevezetőben is már szó esett, sokkal többféle lehetőség kínálkozik az epigenetikai mintázat „átprogramozására”.

6. Diszkusszió

Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy valóban jobban szorong az AX törzs, mint a nAX. A Western-blottos vizsgálataink megmutatták, hogy a H4K12 acetilációs szintje a ventrális hippocampusban tér el leginkább a két törzsben, mégpedig az AX szintje magasabb. Érdekes, hogy nem találtunk jelentős különbséget a dorsális hippocampus és a prefrontális kéreg Ac-H4K12 szintje között. Ezek az eredmények alátámasztják a ventrális hippocampus szerepét a szorongásos viselkedés kialakításában [2, 3].

A klinikailag hatékony szorongásoldó, a buspiron, krónikus kezelést követően csökkentette a szorongást az AX, míg növelte a nAX állatokban. A buspiron paradox hatása már ismert a szakirodalomból [19], és lehetséges magyarázatként felmerül a „floor effect”, miszerint a nAX állatokban a szerotonin szint éppen ideális, és egy 5-HT agonista szerotonin túlsúlyt idéz elő. A szerotonin rendszer túlzott működése agressziót és szorongást válthat ki [21]. Az AX állatokban viszont az alulműködő 5-HT rendszer idézi elő a szorongást, melyet mérsékel egy 5-HT agonista, jelen esetben a buspiron [22].

Eredményeink szerint a buspiron kettős hatása korrelál a szorongásért felelős agyi területek H4K12 acetilációs szintjének változásával. Az AX egerekben a buspiron a prefrontális kéregben növelte az Ac-szintet, míg a nAX állatokban a ventrális hippocampusban figyelhető meg Ac-szint növekedés. Természetesen a jelen eredmények messze nem nyújtanak teljes képet az epigenom változásáról, de mindenképpen említésre méltó, hogy a két, szorongással összefüggő agyi területben történt epigenetikai változás, míg a dorsális hippocampusban, mely inkább a térbeli információkat dolgozza fel, nem volt hatása a buspironnak.

Az epigenetikai változások hatásának vizsgálata a kognitív funkciókra és az öregedésre az utóbbi években a kutatások homlokterében áll. Az epigenetikai szabályzó faktorok közül a hiszton-acetiláció szabályzása áll egyértelműen a legszorosabb kapcsolatban a tanulás és memóriefunkciókkal [23].

7. Köszönetnyilvánítás

Az egyetlen dolog, amit az emberi természetről biztosan tudunk, az, hogy változik.

(Oscar Wilde)

Ezúton szeretném megragadni az alkalmat arra, hogy köszönetemet és tiszteletemet fejezzem ki mindenkinek, aki a pályamunkám elkészítéséhez nagyban hozzájárult.

E helyen köszönetemet kívánom kifejezni a BAYGEN, Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiái Intézetnek, elsősorban **Dr. Kondorosi Éva** professzor asszonynak, hogy számomra a pályamunkám elkészítését az egyetemen kívül, az intézetében engedélyezni szíveskedett.

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Szegedi Viktornak** az átadott tudásanyagért, a dolgozat írása során nyújtott rendkívüli segítőkészségéért, útmutatásáért és a temérdek építő jellegű információért!

Horváth János, PhD hallgatónak, aki a kísérletünkhöz a viselkedés tesztet készítette az egérállomány megfigyeléséről.

Kiemelt tisztelet illeti Dr. Müller Gézát, aki a kísérleti munkánkhoz az egérállományt biztosította.

Köszönettel tartozom továbbá **Dr. Gyurcsik Béla** tanár úrnak, hogy hozzájárult pályamunkám külső helyen történő elkészítéséhez és biztatásáért.

8. Irodalomjegyzék

1. Feder, A., E.J. Nestler, and D.S. Charney, *Psychobiology and molecular genetics of resilience*. Nat Rev Neurosci, 2009. **10**(6): p. 446-57.
2. Gordon, J.A. and R. Hen, *Genetic approaches to the study of anxiety*. Annu Rev Neurosci, 2004. **27**: p. 193-222.
3. Bannerman, D.M., et al., *Regional dissociations within the hippocampus - memory and anxiety*. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2004. **28**(3): p. 273-283.
4. Garakani, A., S.J. Mathew, and D.S. Charney, *Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment*. Mt Sinai J Med, 2006. **73**(7): p. 941-9.
5. Kalueff, A.V. and D.L. Murphy, *The importance of cognitive phenotypes in experimental modeling of animal anxiety and depression*. Neural Plast, 2007. **2007**: p. 52087.
6. Pellow, S., et al., *Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat*. J Neurosci Methods, 1985. **14**(3): p. 149-67.
7. Szego, E.M., et al., *A mouse model of anxiety molecularly characterized by altered protein networks in the brain proteome*. Eur Neuropsychopharmacol, 2010. **20**(2): p. 96-111.
8. Hall, C. and E.L. Ballachey, *A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology*. University of California Publications in Psychology, 1932. **6**: p. 1-12.
9. Crawley, J. and F.K. Goodwin, *Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines*. Pharmacol Biochem Behav, 1980. **13**(2): p. 167-70.

10. Dulac, C., *Brain function and chromatin plasticity*. Nature, 2010. **465**(7299): p. 728-35.
11. Alberts, B., J.H. Wilson, and T. Hunt, *Molecular biology of the cell*. 5th ed. 2008, New York: Garland Science. xxxiii, 1601, 90 p.
12. Peterson, C.L. and M.A. Laniel, *Histones and histone modifications*. Curr Biol, 2004. **14**(14): p. R546-51.
13. Grunstein, M., *Histone acetylation in chromatin structure and transcription*. Nature, 1997. **389**(6649): p. 349-52.
14. Santoro, R., J. Li, and I. Grummt, *The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription*. Nat Genet, 2002. **32**(3): p. 393-6.
15. Shi, W., V. Zakhartchenko, and E. Wolf, *Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer*. Differentiation, 2003. **71**(2): p. 91-113.
16. Fischer, A., et al., *Targeting the correct HDAC(s) to treat cognitive disorders*. Trends Pharmacol Sci, 2010. **31**(12): p. 605-17.
17. Virok, D.P., et al., *Functional changes in transcriptomes of the prefrontal cortex and hippocampus in a mouse model of anxiety*. Pharmacol Rep, 2011. **63**(2): p. 348-61.
18. Peleg, S., et al., *Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice*. Science, 2010. **328**(5979): p. 753-6.
19. Grabiec, M., K. Turlejski, and R.L. Djavadian, *The partial 5-HT_{1A} receptor agonist buspirone enhances neurogenesis in the opossum (Monodelphis domestica)*. Eur Neuropsychopharmacol, 2009. **19**(6): p. 431-9.

20. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
21. Montoya, E.R., et al., *Testosterone, cortisol, and serotonin as key regulators of social aggression: A review and theoretical perspective*. Motiv Emot, 2012. **36**(1): p. 65-73.
22. Baldwin, D.S. and C. Polkinghorn, *Evidence-based pharmacotherapy of Generalized Anxiety Disorder*. Int J Neuropsychopharmacol, 2005. **8**(2): p. 293-302.
23. Graff, J., et al., *An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain*. Nature, 2012. **483**(7388): p. 222-6.

Nyilatkozat

Alulírott **Eszik Ildikó, vegyész II. éves MSc** szakos hallgató, kijelentem, hogy a dolgozatban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel.

aláírás

Szeged, 2012. 04. 15.