

XXXII. OTDK
Biológia Szekció

TPPP/p25: EGY RENDEZETLEN FEHÉRJE KETTŐS ÉLETE

Készítette: **Szabó Adél**, MSc. II. évfolyam
BME VBK biomérnök hallgató

Témavezetők: **Dr. Ovádi Judit** professor emeritus
MTA TTK Enzimológiai Intézet
Sejtarchitektúra Kutatócsoport

Dr. Oláh Judit tudományos főmunkatárs
MTA TTK Enzimológiai Intézet
Sejtarchitektúra Kutatócsoport

A dolgozat elkészítésének helye:



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

és



Magyar Tudományos Akadémia
Természettudományi Kutatóközpont
Enzimológiai Intézet
Sejtarchitektúra Kutatócsoport



Tartalomjegyzék

Bevezetés.....	2
Irodalmi áttekintés	4
„Moonlighting” fehérjék	4
Konformációs betegségek (Parkinson-kór)	5
Alfa-szinuklein	6
TPPP/p25.....	8
<i>Az új agy-specifikus TPPP/p25 fehérje azonosítása.....</i>	8
<i>A TPPP/p25 rendezetlen fehérje</i>	9
<i>A TPPP/p25 a „neomorphic moonlighting” fehérjék prototípusa</i>	10
Célkitűzések	12
Anyagok és módszerek.....	13
Humán rekombináns TPPP/p25 formák expressziója és izolálása	13
P1-P4 és BF180-183 peptidek szintézise	14
Rekombináns alfa-szinuklein expressziója és izolálása	15
Tubulin preparálás.....	16
Fehérjekoncentráció meghatározása.....	16
SDS-PAGE.....	17
Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia	17
ANS fluoreszcencia.....	19
Tubulinpolimerizáció	20
ELISA („Enzyme-linked immunosorbent assay”)	20
Eredmények és megvitatásuk	22
I. A TPPP/p25 központi és terminális régióinak szerkezeti jellemzése.....	22
<i>I/1. CD spektroszkópia</i>	23
<i>I/2. ANS fluoreszcencia</i>	24
II. A TPPP/p25 fiziológias funkciója: kölcsönhatása tubulinnal.....	26
<i>II/1. A cink ion hatása a TPPP/p25-tubulin kölcsönhatásra</i>	26
<i>II/2. A TPPP/p25 különböző szegmenseinek szerepe a fiziológias kölcsönhatásban</i>	27
<i>II/3. A TPPP/p25 tubulin kötő szegmensének azonosítása</i>	28
III. A TPPP/p25 patológias funkciója: kölcsönhatása alfa-szinukleinnel	29
<i>III/1. ELISA – dupla csonkolt/teljes TPPP/p25 kölcsönhatása az alfa-szinukleinnel</i>	29
<i>III/2. Kompetitív ELISA szintetikus TPPP/p25 peptidekkel.....</i>	30
IV. Az in vitro eredmények összevetése élő-sejtes vizsgálatokkal	32
Összefoglalás.....	34

Bevezetés

A „moonlighting” fehérjék több, egymástól független funkciót töltenek be, amelyek nincsenek gén szinten kódolva, ezek a funkciók fehérje szinten nyilvánulnak meg [Jeffery, 1999]. Az eltérő funkciókért felelős lehet a fehérje eltérő sejten belüli lokalizációja, eltérő sejttypus, a fehérje oligomerizációs állapotának változása, különböző koncentrációjú szubsztrátok, kofaktorok, kölcsönható partnerek jelenléte. Nemrégiben definiálták a „moonlighting” fehérjék egy alosztályát, a „neomorphic moonlighting” fehérjéket, amelyek esetében konformációs változások és/vagy kölcsönhatások különböző (normál körülmények között nem jelenlévő) partnerekkel kölcsönöznek új, kóros funkciót a fehérjének [Jeffery, 2011].

A hagyományos nézet szerint egy fehérje funkciójának betöltéséhez elengedhetetlen feltétel a jól definiált 3D térszerkezet, azonban mintegy 15 évvel ezelőtt felismerték, hogy számos fehérje nem rendelkezik jól meghatározott 3D szerkezettel [Dunker, et al., 2000]. Ezek az eredendően rendezetlen fehérjék mégis alapvető funkciókat látnak el; meghatározó szerepük van például jelátviteli folyamatokban, a sejtciklus-szabályozásban, a génkifejeződésben és a dajkafehérje funkcióban, valamint fontos résztvevői egyes központi idegrendszeri betegségeknek, így gyakran a „neomorphic moonlighting” fehérjék közé sorolhatóak. A rendezetlen fehérjék biológiai jelentőségére utal, hogy bioinformatikai becslések szerint az eukarióta fehérjék körülbelül egyharmada rendelkezik legalább egy 50 aminosavból álló vagy annál hosszabb rendezetlen régióval [Dunker, et al., 2000].

Az Enzimológiai Intézet Sejtarchitektúra Kutatócsoportja izolált és azonosított egy ilyen agy-specifikus fehérjét, melyet fő funkciója és molekulatömege alapján neveztek el TPPP/p25-nek [Hlavanda, et al., 2002; Tirián, et al., 2003]. A „Tubulin Polymerization Promoting Protein” (TPPP/p25) egy eredendően rendezetlen fehérje, melynek rendezetlen N- és C-terminális szegmensei (45, ill. 44 aminosav) egy 130 aminosavból álló rendkívül flexibilis régiót fognak közre [Zotter, et al., 2011a]. A TPPP/p25 prototípusa a „neomorphic moonlighting” fehérjéknek, mivel kölcsönható partnertől függően eltérő fiziológiás és patológiás funkciót tölt be a fehérje génszintű változása nélkül [Ovádi, 2011; Tőkési, et al., 2014]. Fiziológiásan a fehérje elsősorban az oligodendrocitákban expresszálódik, nélkülözhetetlen ezek differenciációjához [Lehotzky, et al., 2010; Takahashi, et al., 1993]. A differenciált oligodendrociták alapvető szerepet játszanak az axonokat körülvevő mielinhüvely kialakulásában, ami elengedhetetlen az idegrendszer megfelelő működéséhez. A fehérje fő fiziológiás kölcsönható partnere a tubulin, melynek mikrotubulussá való

polimerizációját indukálja. A TPPP/p25 mikrotubulusokat keresztkötő és acetilációjukat fokozó aktivitása révén a mikrotubuláris rendszer stabilitását és dinamikáját szabályozza [Hlavanda, et al., 2007; Tőkési, et al., 2010]. A TPPP/p25 nem-fiziológiás kifejeződése különböző központi idegrendszeri betegségekhez kapcsolódik. Ilyenek például: a mielinhüvely károsodása következtében kialakuló sclerosis multiplex [Hoftberger, et al., 2010; Vincze, et al., 2011]; az oligodendroglióma, melyben a fehérje kifejeződése gátolt [Preusser, et al., 2007]; vagy egyes konformációs betegségek, pl. a Parkinson-kór és a multiszipisztémás atrofia, ahol a TPPP/p25 az alfa-szinukleinnel együtt halmozódik fel a neuronális és gliális zárványtestekben [Kovacs, et al., 2004].

A TPPP/p25 és kölcsönható partnerei, elsősorban a tubulin, mint fiziológiás partner, valamint az alfa-szinuklein, mint patológiás partner közötti kölcsönhatások minél pontosabb megismerése és molekuláris szintű jellemzése igen fontos feladat, mert ezek ismeretében lehetséges olyan gyógyszerjelölt molekulák kifejlesztése, melyek a kialakuló kölcsönhatásokat szelektíven befolyásolni tudják [Tőkési, et al., 2014]. Az ezzel kapcsolatos adatok részét képezik a munkacsoport egyik innovatív projektjének, mely a TPPP/p25-alfa-szinuklein patológiás komplex kialakulását gátló, illetve megszüntetését elősegítő specifikus anti-Parkinson ágens (*foldamer*) tervezése.

Irodalmi áttekintés

„Moonlighting” fehérjék

Körülbelül két évtizeddel ezelőtt ismerték fel, hogy léteznek olyan fehérjék, melyek több eltérő funkciót képesek ellátni gén szintű változás nélkül, és ezt a tulajdonságot nevezték el először „gene sharing”-nek, később „moonlighting”-nak [Jeffery, 1999; Piatigorsky and Wistow, 1989; Wistow and Piatigorsky, 1987]. Az angol „moonlighting” kifejezés a közhasználatban azt jelenti, hogy valaki másodállásban dolgozik (gyakran éjszaka) a teljes munkaidős (nappali) állása mellett [Oláh, et al., 2013]. Innen ered ez az elnevezés a fehérjék „kettős életére” vonatkozóan.

A „moonlighting” fehérjék több, egymástól független funkciót töltenek be, amelyek nincsenek gén szinten kódolva, az eltérő funkciók nem genetikai szintű eltérésekből (génfüzió, alternatív splicing vagy mutáció) erednek; ezek a funkciók fehérje szinten nyilvánulnak meg [Jeffery, 1999]. Az eltérő funkciókért felelős lehet a fehérje eltérő sejten belüli lokalizációja, különböző sejttypus, a fehérje megváltozott oligomerizációs és/vagy konformációs állapota, melyet szubsztrátok, kofaktorok, kölcsönható partnerek jelenléte befolyásol. A „moonlighting” funkciót meg kell különböztetni a fehérjék multifunkcionalitásától. A multifunkcionalitás esetében ugyanis a fehérje több alegységet tartalmaz, melyek mindegyike más funkció ellátására alkalmas [Piatigorsky and Wistow, 1989]. Nemrégiben definiálták a moonlighting fehérjék egy alosztályát, a „neomorphic moonlighting” fehérjéket, amelyek esetében konformációs változások és/vagy kölcsönhatások különböző (normál körülmények között nem jelenlévő) partnerekkel kölcsönöznek új, kóros funkciót a fehérjének [Jeffery, 2011; Ovádi, 2011]. A „neomorphic moonlighting” fehérjék fiziológiás illetve patológiás funkciója elsődlegesen eltérő partnerekkel való kölcsönhatások következtében alakul ki.

A „moonlighting” tulajdonság sok rendezetlen fehérjére jellemző, melyek nem rendelkeznek stabil, jól definiált 3D szerkezettel, így képesek alkalmazkodni, változtatni konformációjukat partnereikhez való kötődés során. A rendezetlen fehérjék meglehetősen gyakoriak az élő sejtekben és alapvető funkciókat látnak el, mint például a transzkripció és transzláció, vagy a celluláris jelátvitel szabályozása [Dunker, et al., 2008; Fink, 2005; Uversky, 2002]. Mindemellett a rendezetlen fehérjék szintén döntő szerepet játszanak a konformációs betegségek, mint például a Parkinson-kór és az Alzheimer-kór etiológiájában

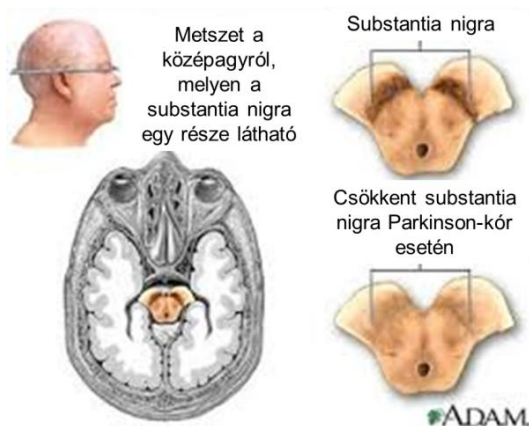
[Irvine, et al., 2008; Uversky, 2002], így gyakran a „neomorphic moonlighting” fehérjék közé tartoznak.

Konformációs betegségek (Parkinson-kór)

A társadalom elöregedésével a központi idegrendszert sújtó, az idegsejtek pusztulásával járó konformációs betegségek elterjedése súlyos egészségügyi, társadalmi és gazdasági problémát okoz. Ezen betegségek kialakulása többlépcsős folyamat, melynek kiinduló pontjai minden esetben ún. „unfolded/misfolded” fehérjék, azaz rendezetlen, vagy rosszul feltekeredett fehérjék, melyek aberráns kölcsönhatásokba lépve patológiás fehérje aggregátumokat hoznak létre az agy különböző területein, melyek végső soron az idegsejtek pusztulásához vezetnek [Ovadi, et al., 2005].

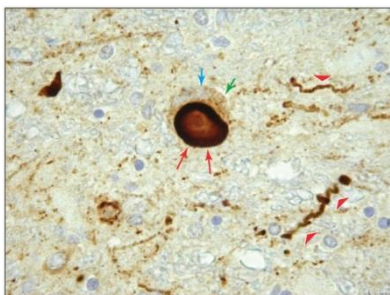
A konformációs betegségek egyik legismertebb és leggyakrabban előforduló típusa (az Alzheimer- és a Huntington-kór mellett), a Parkinson-kór, hozzávetőleg 6 millió embert érint világszerte. A betegség három fő tünettől jellemezhető, melyek a motoros funkciókat érintik: nyugalmi remegés (tremor), izommerevség (rigiditás), és a lassultság (bradikinézia). A legtöbb esetben 50 év feletti korban mutatkoznak meg az első tünetek, majd a kor előrehaladásával lassan erősödnek [Bellucci, et al., 2012].

A tüneteket az okozza, hogy a Parkinson-kór során elhalnak az agy ún. substantia nigra területének (1. ábra) dopaminerg idegsejtjei, amelyek a testmozgást, a testtartást és az egyensúlyozást szabályozzák, ezáltal csökken az ingerületátvivő anyag, a dopamin termelődése.



1. ábra: A substantia nigra helye az agyban. A kép forrása: <http://mikeclaffey.com/psyc2/notes-damage-disorders.html> (2014.11.15.)

A betegség legjellegzetesebb neuropatológiai jellemzői az ún. Lewy-testek és Lewy-neuritek. Mindkét intraneuronális zárványtest fő komponense a fibrilláris alfa-szinuklein aggregátum (2. ábra) [Spillantini, et al., 1998]. A fehérje lerakódása ezért a Parkinson-kór kialakulásának központi patológiás tényezőjeként tekinthető, mely az idegsejtek pusztulásához vezet.



2. ábra: „Lewy-test és Lewy-neurit Parkinson-kóros beteg középagyának substantia nigra magjában. A felvétel közepén jellegzetes (világosbarna központú és sötétbarna szélű) alfa-szinuklein pozitív intracelluláris aggregátum (Lewy-test) látható (piros nyilak), mellette jobbra két megvastagodott, szintén immunpozitív Lewy-neurit (piros nyílhegyek). A Lewy-testet tartalmazó sejt magjára világoskék, a citoplazmában felhalmozódó melanin pigment szemcsékre zöld nyíl mutat. (alfa-szinuklein immunhisztokémiai kimutatás).”

(Az ábra forrása: <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/onemesztes/ch03s08.html>) (2014.11.15.)

Bár a Parkinson-kór előfordulási gyakorisága az elmúlt évtizedek alapján drasztikusan nő, az elérhető terápiás eszközök a rendellenesség kezelésére még mindig igen korlátozottak [Bellucci, et al., 2012]. A jelenlegi gyógyszeres kezelések célja a dopamin pótlása, ami a dopamin előanyagának, a levodopának, illetve dopaminhatást kifejtő gyógyszereknek (dopaminagonistáknak) a szervezetbe juttatásával valósítható meg. Bizonyos esetekben műtéti kezelést (roncsolásos és stimulációs műtéteket) hajtanak végre, azonban a műtéti beavatkozás gyakran jár szövődeményekkel. Összességében elmondható, hogy bár tüneti kezeléssel, fizioterápiával a beteg állapota javítható, az idegsejtek pusztulásának megakadályozására sajnos a mai ismereteink szerint nincs mód.

Alfa-szinuklein

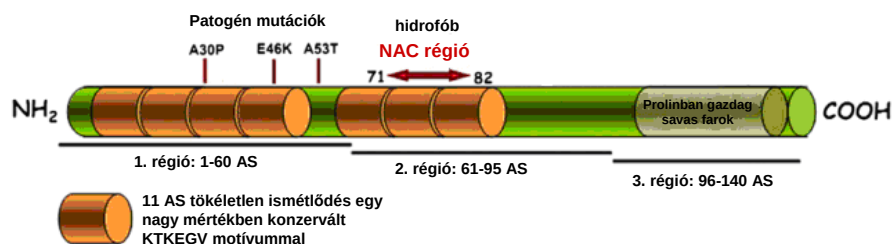
Az alfa-szinuklein normál agyban az idegszövet össz-fehérje tartalmának 1%-át is kiteheti [Iwai, et al., 1995]. Elsősorban a preszinaptikus terminálokra helyezkedik el, funkciója egyelőre még nem teljesen tisztázott, azonban aminosav szekvenciája és intracelluláris lokalizációja arra utal, hogy a fehérje lipid membránokkal való kölcsönhatásokban vehet részt [Tofaris and Spillantini, 2007]. Ezt a tulajdonságát megerősítve egy tanulmányban megmutatták, hogy az alfa-szinuklein inhibitora egy

plazmamembránban elhelyezkedő fehérjének, a foszfolipáz D2-nek, ami a foszfatidsav előállításában játszik szerepet [Jenco, et al., 1998]. Más kutatások szerint az alfa-szinuklein kulcsszerepet játszik membrán-asszociált folyamatokban. Azokban a kísérleti egerekben, melyekben mutációval az alfa-szinukleint kódoló gént inaktiválták, elektromos stimuláció hatására megnövekedett dopamin felszabadulást tapasztaltak az agy bizonyos területein, ami arra enged következtetni, hogy az alfa-szinuklein a szinaptikus (elsősorban dopaminerg) transzmisszió befolyásolásában játszhat szerepet [Abeliovich, et al., 2000].

Az SNCA gén által kódolt alfa-szinuklein patológiás esetben az ún. szinukleinopátiák összefoglaló néven nevezett konformációs betegségek résztvevője. Ilyen betegségek a Parkinson-kór, a diffúz Lewy-testes betegség és a multisisztémás atrófia. Ezen kórképek közös jellemzője, hogy a beteg glia sejtjeinek és neuronjainak citoplazmájában alfa-szinuklein tartalmú, szálas szerkezetű aggregátumok jelennek meg, melyek fontos szerepet játszanak a betegségek patomechanizmusában. Bár előfordulnak olyan genetikailag öröklődő kóresetek, melyek az SNCA gén mutációira, illetve multiplikációjára vezethetők vissza, azonban a szinukleinopátiák sporadikus formáira jellemző alfa-szinuklein aggregátumok kialakulására a mai napig nincs magyarázat. Mivel az orvostudomány jelen állása szerint gyógyíthatatlan, halálos folyamatról van szó, alapvető fontosságú a betegségek hátterében álló patológiás fehérje aggregáció kialakulásának megelőzésére, illetve a már kialakult aggregátumok megszüntetésére irányuló kutatás, azaz a folyamat molekuláris szintű jellemzése.

Az alfa-szinuklein az eredendően rendezetlen fehérjék családjába sorolható, ennek megfelelően rendkívül flexibilis, és számtalan konformációt képes felvenni a környezettől függően, a teljesen rendezetlentől a részlegesen feltekert amiloidogén szerkezeten keresztül a jelentős α -hélix vagy β -redő tartalmú szerkezetekig [Uversky, 2003]. A fehérje három régiót tartalmaz: egy amfipatikus N-terminális régiót (1-60 aminosav), egy ún. „non-amyloid- β component” (NAC) részt tartalmazó régiót (61-95 aminosav) és egy prolinban és savas aminosavakban gazdag C-terminális részt (96-140 aminosav) [Bellucci, et al., 2012] (3. ábra). Az N-terminális régió tartalmazza azokat a mutációs helyeket, amelyek a Parkinson-kór genetikailag öröklődő típusához köthetők, valamint tartalmaz egy 11 aminosavból álló, hétszer, nem teljesen konzerváltan megismétlődő motívumot, mely egy nagymértékben konzervált részt (KTKEGV) foglal magában. A fehérje leginkább hidrofób, és ennek következtében β -konformációba való rendeződésre hajlamos része a NAC régió, míg rendezetlen régiója a C-terminális rész [Bellucci, et al., 2012].

α -szinuklein



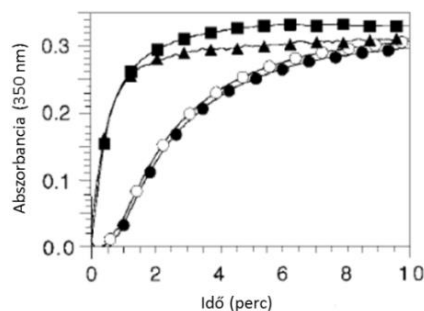
3. ábra: Az alfa-szinuklein szerkezete [Bellucci, et al., 2012] nyomán.

TPPP/p25

Az új agy-specifikus TPPP/p25 fehérje azonosítása

A TPPP/p25-öt, mint agy-specifikus fehérjét, először japán kutatók írták le, akik egy tau protein kináz tisztítása közben találtak rá [Takahashi, et al., 1991]. A fehérje elnevezése, valamint funkcióinak felderítése viszont már a Sejtarchitektúra Kutatócsoport nevéhez fűződik.

A tubulin alegységek polimerizációja mikrotubulussá turbiditásméréssel követhető, ugyanis a keletkezett részecskék 350 nm-es hullámhosszon fényszórást idéznek elő, mely a képződött részecskék nagyságával illetve koncentrációjával arányos. A tubulin polimerizációját vizsgálva a Sejtarchitektúra Kutatócsoport megállapította, hogy a mikrotubulushoz asszociált fehérjétől mentes (MAP-mentes) tubulin polimerizációját az agyi vagy neuroblasztóma-extraktumok hozzáadása jelentősen gyorsítja, azonban izomextraktum hozzáadása esetén nem tapasztalható változás a polimerizációban, ami a hatás specifikus voltára utal [Liliom, et al., 1999] (4. ábra).



4. ábra: Különböző sejtmentes extraktumok hatása a tubulin polimerizációjára: 10 μ M tubulin polimerizációja 350 nm-en követve önmagában (○), 2 mg/ml agyextraktum (■), 0,25 mg/ml neuroblasztóma-extraktum (▲), vagy 2 mg/ml izomextraktum (●) jelenlétében [Liliom, et al., 1999].

Ezekből az extraktumokból indult meg a hatásért ténylegesen felelős fehérje tisztítása, melyet aztán hosszas kutatómunka eredményeként a Sejtarchitektúra Kutatócsoport sikeresen azonosított [Hlavanda, et al., 2002]. A szarvasmarha agyból izolált fehérje tubulinpolimerizációt előidéző hatása és 25 kDa-os móltömege alapján a „Tubulin Polymerization Promoting Protein/p25” (TPPP/p25) nevet kapta. A TPPP/p25 azonosítását követően derült ki, hogy a fehérjét, mint p25-öt, egy japán kutatócsoport már izolálta. Mind a szarvasmarha, mind pedig az ember TPPP/p25-öt kódoló génjét azonosították klónozás segítségével, és kimutatták, hogy igen magas, 90%-os az azonosság a két géntermék között [Seki, et al., 1999; Shiratsuchi, et al., 1995] (5. ábra). Később az egerben található változatot is leírták, és itt is jelentős egyezés figyelhető meg mind az emberben, mind a marhában előforduló fehérjéhez képest (humán-egér: 93%-os, és marha-egér: 87%-os azonosság).

bovp25	1	MAD..SRPKPANKTPPKSPGEPKDKAAKRLSLEAEGAGEGAAAAGAELSALEEAFFRFA
hump25	1	MADKAKPAKAANRTTPPKSPGDPKDRRAAKRLSLESEGAGEG.AAASPELSALEEAFFRFA
bovp25	59	VHGDAARASGREMHGKNWSKLCRDQVIDGRSVTVTDVDIVFSKIKGKSCRTITFEQFKEA
hump25	60	VHGDAARATGREMHGKNWSKLCRDQVIDGRNVTVDVDIVFSKIKGKSCRTITFEQFQEA
bovp25	119	LEELAKKRFDKSAEEAVREVHRLIEGKAPIISGVTKAISSPTVSRLTDTSKFTGSHKER
hump25	120	LEELAKKRFDKSSSEAVREVHRLIEGKAPIISGVTKAISSPTVSRLTDTTKFTGSHKER
bovp25	179	FDPSGRGKGRAGRVDLVDESgyvPGYKHAGTYDQKVQGGK*
hump25	180	FDPSGRGKGRAGRVDLVDESgyvPGYKHAGTYDQKVQGGK*

5. ábra: A szarvasmarha (bovp25) és a humán (hump25) TPPP/p25 szekvenciák összehasonlítása. Az egyezések fekete háttérrel vannak kiemelve. [Seki, et al., 1999]

A TPPP/p25 fehérje aminosav szekvenciáját tekintve minden korábban ismert és jellemzett fehérjétől különbözik, viszont gén szinten szekvencia összehasonlításokat végezve a BLAST („Basic Local Alignment Search Tool”) program segítségével további 2 gén mutatható ki, melyek rövidebb, de hasonló hipotetikus fehérjéket kódolnak, ezek a TPPP/p18 és TPPP/p20 nevet kapták [Tirián, et al., 2003]. Ezen gének által kódolt fehérjéket a Sejtarchitektúra Kutatócsoport klónozte és a TPPP/p20-at szarvasmarha agyból izolálta. Az újonnan azonosított fehérjék nagyfokú homológiát mutatnak egymással, a szekvenciaazonosság mértéke 60%. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a kutatócsoport által leírt géntermékek egy új fehérjecsaládot (TPPP) alkotnak, melynek első, fehérje szinten izolált tagja a TPPP/p25 [Vincze, et al., 2006].

A TPPP/p25 rendezetlen fehérje

A TPPP/p25 egy 219 aminosavból álló, hőstabil fehérje. Izoelektromos fókuszálás során a fehérje izoelektromos pontja 9,9-nek adódott, ami igen bázikus karakterre utal

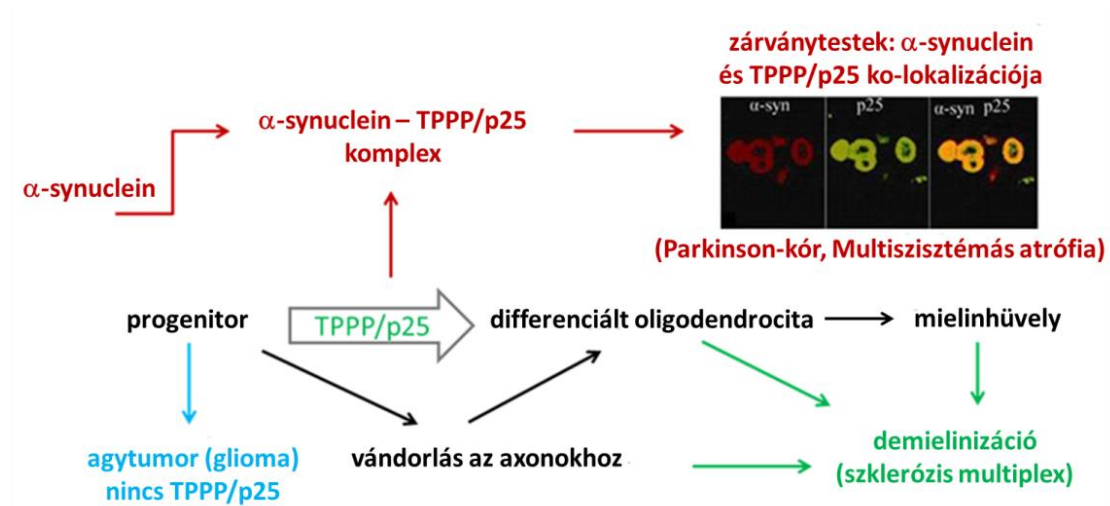
[Takahashi, et al., 1991]. A Sejtarchitektúra Kutatócsoport megmutatta, hogy a TPPP/p25 elméleti (jósolt) és a kísérletekkel alátámasztott másodlagos szerkezeti elemei között eltérés figyelhető meg. Míg a jósolt α -hélix tartalom az alkalmazott módszertől függően 30-43% között változott, addig a kísérletes (pl. cirkuláris dikroizmus mérésekkel kapott) adatok szerint ez az érték mindössze 4% [Hlavanda, et al., 2002; Ovádi et al., 2005]. Ennek oka, hogy az akkoriban alkalmazott predikciós algoritmusok globuláris fehérjék tulajdonságain alapulnak. Ma már léteznek ennél pontosabb in silico módszerek a fehérje szerkezetvizsgálatára (PONDR, IUPred, FOLDIndex), melyekkel a rendezetlenség megjósolható. A „Database of Protein Disorder” (<http://www.disprot.org/index.php>) meghatározása szerint rendezetlen fehérje az, ami legalább egy kísérletesen meghatározható (30-40 aminosav hosszúságú) rendezetlen régiót tartalmaz [Sickmeier, et al., 2007]. A csoport bizonyította az előbb említett elméleti, illetve számos fiziko-kémiai, biokémiai módszert alkalmazva, beleértve a multinukleáris NMR spektroszkópiát, hogy a TPPP/p25 egy eredendően rendezetlen fehérje, mely tartalmaz egy 45 és egy 44 aminosavból álló N- és C-terminális rendezetlen szegmenst, amelyek egy 130 aminosavból álló rendkívül flexibilis régiót fognak közre [Zotter, et al., 2011a].

A TPPP/p25 a „neomorphic moonlighting” fehérjék prototípusa

A TPPP/p25 prototípusa a „neomorphic moonlighting” fehérjéknek, mivel kölcsönható partnertől függően eltérő fiziológiás és patológias funkciókat tölt be a fehérje génszintű változása nélkül [Ovadi, 2011]. A fehérje fő fiziológiás kölcsönható partnere a tubulin, melynek mikrotubulussá való polimerizációját indukálja, a keletkezett mikrotubulusokat keresztköti, ezáltal a mikrotubuláris rendszer stabilitását és dinamikáját képes befolyásolni. A TPPP/p25 kölcsönhatásba lép a tubulin deacetiláz enzimmel (HDAC6) is, gátolja annak deacetiláz aktivitását, következésképpen növeli a mikrotubulusok acetilációs szintjét, melynek szintén szerepe van a mikrotubuláris rendszer dinamikájának szabályozásában [Tőkési, et al., 2014]. A közelmúltban igazolást nyert, hogy a TPPP/p25 GTP-t köt, és Mg^{2+} -függő módon katalizálja annak hidrolízisét [Zotter, et al., 2011a], valamint a fehérje specifikusan köti a bivalens cink kationt, ami szerkezetváltozást indukál a fehérjében [Zotter, et al., 2011b].

A TPPP/p25 fiziológiás körülmények között elsődlegesen az agyban, az idegszövetben lévő specializált gliasejtekben, oligodendrocitákban expresszálódik fehérje szinten. Az oligodendrociták feladata a neuronok axonjainak védelme és elektromos

szigetelése azáltal, hogy körük mielinhüvelyt képeznek, mely folyamatban a TPPP/p25 alapvető szerepet játszik [Lehotzky, et al., 2010]. A fehérje nélkülözhetetlen a progenitor sejtek differenciációjához, valószínűleg a mikrotubuláris rendszer nyúlványnövekedés során bekövetkező átrendeződésében van meghatározó szerepe. Tehát a TPPP/p25 kifejeződése az agyban elengedhetetlen az idegrendszer megfelelő működéséhez.



6. ábra: A TPPP/p25 fiziológias és patológias funkciói

A TPPP/p25 nem-fiziológias kifejeződése különböző központi idegrendszeri betegségek kialakulásához vezet, mint azt a 6. ábra szemlélteti. Ilyenek például:

- a mielinhüvely károsodása következtében kialakuló *sclerosis multiplex* (TPPP/p25 megváltozott expressziója az agyban és megnövekedett szintje a cerebrospinális folyadékban) [Hoftberger, et al., 2010; Vincze, et al., 2011],
- idegszövet eredetű daganat, az *oligodendroglióma* (TPPP/p25 hiánya) [Preusser, et al., 2007],
- egyes konformációs betegségek, pl. *Parkinson-kór* és *multiszipisztémás atrófia* (TPPP/p25 és alfa-szinuklein együttes felhalmozódása a neuronális és gliális zárványtestekben) [Kovacs, et al., 2004].

A konformációs betegségek kialakulása aberráns fehérje-fehérje kölcsönhatásokra vezethető vissza, melyek fehérje aggregációt és patológias zárványtestek kialakulását eredményezik. A közelmúltban igazolták, hogy a TPPP/p25 kölcsönhatásba lép a Parkinson- és az Alzheimer-kór ma már klasszikus biomarkereinek tekinthető alfa-szinukleinnel, ill. béta-amiloiddal, elősegítve ezen fehérjék aggregációját [Lindersson, et al., 2005; Oláh, et al., 2011].

Célkitűzések

A Sejtarchitektúra Kutatócsoport korábbi eredményei alapján megállapítható, hogy a rendezetlen TPPP/p25 biomarkere bizonyos központi idegrendszeri betegségeknek. Ezen betegségek patomechanizmusának megismerése napjainkban is intenzív kutatás tárgyát képezi. Ezért is kiemelt jelentőségű feladat a fehérje szerkezeti és funkcionális sajátosságainak molekuláris szintű jellemzése, ami a betegségek terápiás kezeléséhez szükséges nagy szelektivitású gyógyszermolekulák tervezését, szintézisét teszi lehetővé. A munkacsoport kutatásaiba 2012-ben kapcsolódtam be, azzal a céllal, hogy eleinte reprodukálva a csoport korábbi kísérleteit számos metodikát elsajátítsak, később pedig aktív részese lehessenek a munkacsoport kutatási projektjének.

Konkrét céljaim a következők voltak:

- Humán rekombináns fehérjék (teljes, illetve N- és/vagy C-terminális nélküli (csonkolt) TPPP/p25, valamint alfa-szinuklein) termeltetése és izolálása.
- A rendezetlen TPPP/p25 központi flexibilis („core”) régiójának (130 aminosav) szerkezeti és funkcionális jellemzése, mint pl. a cink ion specifikus hatásainak karakterizálása, mivel a fehérje cink-ujj motívumot tartalmaz a flexibilis régió belül.
- A TPPP/p25 és kölcsönható partnerei, elsősorban a tubulin, mint fiziológiás partner, valamint az alfa-szinuklein, mint patológiás partner közötti kölcsönhatások molekuláris szintű jellemzése, a kölcsönhatásokért felelős régiók azonosítása.

Anyagok és módszerek

Humán rekombináns TPPP/p25 formák expressziója és izolálása

A TPPP/p25 fehérjét először szarvasmarha agyból izolálták és azonosították [Hlavanda, et al., 2002]. Azóta sikerült az addig alkalmazott izolálási eljárást módosítani és nagyobb kitermelést elérni. Klónozással sikerült humán rekombináns fehérjét előállítani in vitro kísérletek céljaira. Nemcsak a vad típusú humán rekombináns TPPP/p25-öt (219 aminosav), hanem a terminális szegmenseket nem tartalmazó, mutáns humán fehérjét (dupla csonkolt: TPPP/p25 delta 3-43/delta 175-219), valamint a csak az N-, illetve a csak a C-terminálisától megfosztott fehérje formákat (N-csonkolt: TPPP/p25 delta 3-43 és C-csonkolt: TPPP/p25 delta 175-219) is klónozták. Valamennyi fehérje termeltetése és izolálása azonos módon történt, a következőekben leírtak szerint:

A humán rekombináns TPPP/p25-öt egy olyan vektorral juttatták be bakteriális expresszálo rendszerbe, amiben a kódoló szekvenciában a leendő fehérje C-terminálisán 6 hisztidin aminosav (6xHis tag) található, ami a fehérje fémaffinitás kromatográfiával történő tisztítását segíti. A vektoron ezen kívül egy lacI gén és egy T7 promoter található. A T7 promoter a lacI gén fehérjeterméke által szabályozott. A géntermék represszálja a promotert, megakadályozza az RNS polimeráz bekötődését, így nem indul meg a transzkripció. Egy kémiaiilag stabil laktóz analóg (izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid, IPTG) hatására a transzkripció gátlása kikapcsolódik, mert a laktóz-analóg allosztérikusán kapcsolódik a lacI géntermékéhez, ami konformációváltozást szenved. Megváltozott konformációjával pedig már nem tudja gátolni a promotert, aminek eredményeképpen megindul a humán TPPP/p25 expressziója. A konstrukt ezen kívül két antibiotikum (ampicillin és klóramfenikol) rezisztencia gént is tartalmaz, hogy szelektálható legyen a nem transzformált baktériumokkal szemben.

A rekombináns TPPP/p25-öt E.coli baktériumban termeltettem. 5 ml steril „Luria-Bertani Broth” (LB) tápoldatba 0,1 mg/ml ampicillint és 0,1 mg/ml klóramfenikolt tettem. Ehhez 25 μ l rekombináns TPPP/p25-öt termelő baktérium szuszpenziót adtam a -80 °C-on tárolt törzstenyészetből. Az indító tenyészetet egy éjszakán át 220 rpm-mel rázattam körkörös rázón 37°C-on. Másnap ebből a kultúrából 2 ml-t átoltottam 300 ml azonos tápoldatba, melyhez az átoltság előtt ampicillint és klóramfenikolt adtam, majd 600 nm-en követtem az abszorbanciát, azonos körülmények között 0,6-0,7 abszorbancia értékig, melynek alapján a

sejtszám növekedésére lehet következtetni. Ezután a fehérjetermelést a tenyészetben 1 mM IPTG-vel indukáltam 3 órán keresztül (37°C-on, 220 rpm-mel rázatva). A sejtszuspenziót 4 °C-on 2500 g-vel 15 percig centrifugáltam, majd leöntöttem a felülúszót, így izoláltam a TPPP/p25-öt expresszáló sejteket. A sejteket proteázgátlókat tartalmazó foszfát pufferben (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, pH=7,2, 1 mM benzamidin, 2 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin) szuszpendáltam, hogy a felnyíló sejtek endogén proteázait blokkoljam. A sejtek feltárása szonikálással történt, 6x10 mp-ig, 30 mp-es szünetekkel, jégben hűtve a mintát tartalmazó csövet, hogy a túlmelegedést megelőzzem. Ezután a mintát 4 °C-on 100000 g-vel 15 percig centrifugáltam, hogy a sejtek citoplazmatikus frakcióját megkapjam. A felülúszót fémaffinitás („Immobilized Metal Affinity Chromatography”, IMAC) kromatográfia során Talon™ (Clontech) Ni²⁺-fémkötő gyantán tisztítottam, ami a 6xHis tag-et tartalmazó rekombináns fehérjét szelektíven megköti. Az affinitás kapcsolás során a gyanta térfogata 1 ml volt. A gyártó által megadott 15 mg/ml-es kötőkapacitás (átlagosan 30 kDa fehérjeméret esetén) alapján 1 ml gyanta ~15 mg fehérjét képes megkötni. Az oszlopot foszfát pufferrel (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, pH=7,2) ekvilibráltam, majd körülbelül 8 ml minta (fehérjeoldat) felvitele és átesése (10-15 perc) után az ekvilibráláshoz is használt foszfát pufferrel mostam, hogy az aspecifikusan kötődő fehérjéket eltávolítsam. A TPPP/p25-öt az affinitás oszlopról acetát pufferrel eluáltam (50 mM CH₃COONa, 300 mM NaCl, pH=4,5). A fehérjén lévő 6xHis tag imidazoljai protonálódva már nem képesek kapcsolódni a nikkell ionokhoz, így a fehérje eluálható az oszlopról. Az elúció után a mintát Amicon cellában töményítettem, dupla csonkolt TPPP/p25 esetén 3000 Da, vad típusú, valamint N- és C-csonkolt TPPP/p25 esetén pedig 10000 Da áteresztőképességű membránon, folyamatosan jeges hűtést alkalmazva. A töményítéshez szükséges nyomást 2,5 bar nitrogén gáz adta. A betöményített mintát 16 órán keresztül 4°C-on 2 liter 50 mM ammónium-acetátban dializáltam, hogy liofilizálás után gyakorlatilag ionmentes fehérjét kapjak. A dializáló membrán pórusátmérője dupla csonkolt TPPP/p25 esetén 3000 Da, vad típusú, valamint N- és C-csonkolt TPPP/p25 esetén pedig 12000 Da volt. Végül a fehérjét liofilizáltam, felhasználásig -20°C-on tároltam.

P1-P4 és BF180-183 peptidek szintézise

A TPPP/p25 tubulinkötő motívumának meghatározásához 4 különböző, de egymással átfedő szekvenciájú peptidet tervezett a csoport (P1-P4), melyek a TPPP/p25 megfelelő részét

fedik le (163-187 aminosavak közötti részt). A szintetizált peptidek Cys-taggal rendelkeznek, ami lehetővé teszi ELISA módszerrel történő vizsgálatukat, mivel SH-csoportjukon keresztül immobilizálhatóak speciális ELISA lemezen.

A BF180-183 peptidekre a TPPP/p25 alfa-szinukleint kötő szegmensének azonosításához volt szükség, ezek a peptidek szintén a TPPP/p25 meghatározott, előzetes kísérletek alapján kiválasztott részét fedik le (142-166 aminosavak közötti tartományt).

A szintetikus peptidek előállítása az ELTE-n Dr. Magyar Anna kutatócsoportjában történt. A szintézis menete a [Tökési, et al., 2014] cikkben olvasható.

Rekombináns alfa-szinuklein expressziója és izolálása

A humán alfa-szinukleint kódoló gént pT7-7 vektorba Nde I és Hind III restrikciós enzimek hasító helyei közé illesztették be. A fehérjét ezek után E. coli BL21 DE3 sejtekben termeltettem, 100 µg/ml ampicillin jelenlétében, mivel így a transzformált, ampicillin rezisztencia gént is tartalmazó baktériumok szelektálhatóak a nem transzformált baktériumok mellől. A fehérje His tagot nem tartalmaz, fémaffinitás kromatográfiával nem tisztítható, ezért tisztítása során hőstabil tulajdonságát használtam ki. A sejtek növesztése és a fehérjetermelés indukálása ugyanúgy történt, ahogyan a rekombináns TPPP/p25 termeltetésénél. A sejtszuspenziót 4 °C-on 2500 g-vel 15 percig centrifugáltam, majd leöntöttem a felülúszót, így izoláltam az alfa-szinukleint expresszáló sejteket. A sejteket tartalmazó csapadékot felsuszpendáltam 20 mM Tris (tris-(hidroximetil)-aminometán)-HCl pH 7,5-es pufferben, amely 1 mM etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA-t), 50 mM NaCl-ot, 5 mM 2-merkaptóetanolt, 10 µM 4-(2-aminoetil)-benzénszulfonil-fluorid-hidrokloridot (AEBSF-et), 1 mM benzamidint, 1 µg/ml pepstatint és 1 µg/ml leupeptint tartalmazott. 6x10 mp szonikálást és 25 perc centrifugálást (4 °C, 32000 g) követően a felülúszót 90 °C-on tartottam 10 percig. Az alfa-szinuklein hőstabil, így oldatban maradt. A kicsapódott fehérjéket ismételt centrifugálással eltávolítottam (4 °C, 40000 g, 25 perc). A felülúszót 1 mM EDTA-t és 50 mM NaCl-ot tartalmazó 20 mM, pH 7,5-es Tris-HCl pufferrel ekvibrált DE52 gyantára vittem fel. A DE52 dietil-aminoetil-cellulóz anioncserélő gyanta, melynek pozitív töltésű dietil-aminoetil funkciós csoportjai képesek megkötni a hozzáadott fehérjeoldat anionjait. Mivel az oldatban lévő alfa-szinuklein izoelektromos pontja 4,67 (<http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=1058>), a gyanta pH-ja pedig az ekvibrálás után 7,5, az alfa-szinuklein az izoelektromos pontjánál nagyobb pH-jú közegben negatív töltéssel rendelkezik, így képes kikötődni a dietil-aminoetil-cellulóz gyantára. A nem kötődött

fehérjéket az ekvibráló pufferrel való mosással eltávolítottam, majd az alfa-szinukleint 1 mM EDTA-t és 150 mM NaCl-ot tartalmazó 20 mM, pH 7,5-es Tris–HCl pufferrel eluáltam. A fehérjeoldatot jéggel hűtve 3000 Da pórusátmérőjű membránon 2,5 bar nitrogén nyomással Amicon cellában töményítettem, majd a betöményített mintát 16 órán keresztül 4°C-on 2 liter 50 mM ammónium-acetátban dializáltam 3000 Da pórusátmérőjű membránnal. Végül a fehérjét liofilizáltam, majd felhasználásig -20°C-on tároltam.

Tubulin preparálás

A rendelkezésemre álló tubulint a csoport korábban marhaagyból izolálta Na és Timasheff módszere szerint [Na and Timasheff, 1986].

Fehérjekoncentráció meghatározása

A koncentrációmérést spektrofotometriás módszerrel végeztem Varian Cary 100 UV/Vis spektrofotométerrel a fehérje 280 nm-nél mért elnyelése alapján. A módszer elve, hogy az aromás aminosavak közül a triptofán, tirozin és fenilalanin az UV tartományban (280 nm környékén) jelentős abszorpciót mutat. A fehérje elsődleges szerkezete (aminosav szekvenciája), a benne található triptofán, tirozin és fenilalanin aminosavak száma alapján a fehérjére jellemző elméleti fajlagos extinkciós koefficiens is megállapítható (SIB Expasy szerver segítségével), amely az 1 mg/ml-es fehérjeoldat 280 nm-en mérhető elnyelését adja meg (1. táblázat). Ennek alapján a fehérjeoldat 280 nm-en mért, a puffer elnyelésével korrigált abszorbancia értékéből a fehérjekoncentráció közvetlenül számítható a Lambert-Beer törvény segítségével:

$$A_{280} = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

ahol: A_{280} = a 280 nm-en mért abszorpció

ε = a fajlagos extinkciós koefficiens

l = a fény úthossza a küvettában

c = a fehérje koncentrációja.

A koncentráció értékeket legalább 3 mérés átlagából számítottam ki.

1. táblázat: A különböző fehérjék elméleti fajlagos extinkciós koefficiensei:

fehérje	$\epsilon^{0,1\%}_{1\text{cm}, 280\text{ nm}}$
tubulin	1,06
alfa-szinuklein	0,41
TPPP/p25	0,42
dupla csonkolt TPPP/p25	0,38
N-csonkolt TPPP/p25	0,52
C-csonkolt TPPP/p25	0,29

SDS-PAGE

A preparátum tisztaságának, a fehérje alegységek molekulatömegének és az esetleges változásoknak a vizsgálatát tricines (nátrium-dodecil-szulfát)-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE-el) végeztem.

A tricines SDS-PAGE-t elsősorban 1-100 kDa mérettartományba eső fehérjék elválasztására használják. Előnye a többi elektroforézis fajtaival szemben az, hogy alacsonyabb akrilamid koncentrációt enged meg [Schägger and von Jagow, 1987]. Vizsgálataimat 10%-os SDS gélben, BioRad Mini-Protean II elektroforézis cellában végeztem. 10 vagy 15 helyes, 0,75, illetve 1 mm-es vastagságú géltre vittem fel a mintákat, amelyekhez 1/5 rész SDS mintafestéket adtam (1,2% SDS, 0,025% brómfenolkék, 40% glicerin). A gélre PAGEBlue (Fermentas) festékkel festettem meg. A gélelektroforézishez szükséges feszültség kezdetben 30 V volt, majd körülbelül 1 óra elteltével, miután a minta a töményítő (felső) gélből eljutott a szeparáló (alsó) gélbe, 100 V-ra növeltem a feszültséget és itt tartottam az elektroforézis végéig.

Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia

A CD spektroszkópia egyike azoknak a spektroszkópiai módszereknek, amelyek a polarizált fény és egy optikailag aktív anyag kölcsönhatásán alapulnak. Az élő szervezetek által szintetizált molekulák döntő többsége, így a fehérjék is optikailag aktívak, azaz az oldatukon keresztülbocsátott polarizált fény síkját elforgatják. Minden molekula optikailag aktív, amely tartalmaz aszimmetrikus szénatomot.

Ha két egyenlő amplitúdójú, egymásra merőleges síkban polarizált fényt adunk össze, amelyek egymáshoz képest 90° fáziskülönbséggel rendelkeznek, úgy egy cirkulárisan

polarizált fényt kapunk. A mérőműszer is ezen elv alapján állít elő cirkulárisan polarizált fényt. Két cirkulárisan polarizált fénysugár különböző mértékben nyelődik el az optikailag aktív közegben, így azon áthaladva az amplitúdójuk is különbözni fog (cirkuláris dikroizmus jelensége), ami elliptikus polarizációhoz vezet. Az ellipszis alakját egyértelműen jellemezhetjük az ellipticitással ($\theta = \arctan(b/a)$ ahol „a” az ellipszis nagy, míg „b” a kis tengelye).

A mintán áthaladó fény elnyelődésére érvényes a Lambert-Beer törvény. A balra és a jobbra cirkulárisan polarizált fény abszorpciós koefficienseinek különbségét ($\Delta\epsilon = \epsilon_{\text{bal}} - \epsilon_{\text{jobb}}$) mérve a hullámhossz függvényében kapjuk az optikailag aktív mintára jellemző CD spektrumot. Csak olyan hullámhosszúságú fényenél kaphatunk tehát CD jelet, ahol a mintának van „normál” elnyelése. Fehérjék esetén ez az UV tartomány. A CD jel ekvivalens az ellipticitással, egyes műszerek erre vannak kalibrálva. Egy CD spektrum vízszintes tengelyén mindig a hullámhossz, a függőlegesen pedig az $\Delta\epsilon$, vagy a moláris ellipticitás $[\theta]$ értékek vannak feltüntetve.

Tehát ahhoz, hogy a minta CD-jelet adjon, két tulajdonsággal kell, hogy rendelkezzen: 1. Legyen optikailag aktív (királis), 2. Legyen elnyelése (kromofór csoport kell legyen a molekulában). A CD spektrum a molekulában lévő kromofór csoportok egymáshoz képesti térbeli elrendeződéséről, vagyis a molekula térszerkezetéről ad információt.

A peptidok és fehérjék ismétlődő kromofórja az amidcsoport. A CD spektrum távoli UV tartománya (190-250 nm) közvetlen információt szolgáltat a királis környezetben lévő amid kromofórok – és így a peptidgerinc – térbeli elhelyezkedéséről. A fehérjék másodlagos szerkezeti elemei, mint pl. az α -hélix, a β -redő ill. a rendezetlen szerkezetek, a peptidkötések szerkezeti viszonyainak függvényében jellemző CD spektrumokat produkálnak, így ezek változásai a CD mérésekben jól megfigyelhetők [Hollósi, 2004].

A méréseket JASCO J-720 spektropolariméteren végeztem, 25 °C-on, 0,1 cm úthosszú küvetákban, 10 mM Na_2HPO_4 pufferben, pH 7,0-en. A TPPP/p25 formák koncentrációja 4 μM , a tubuliné 1 μM volt. Cinkes mérések esetén 4 μM TPPP/p25-öt inkubáltam 10 percig 200 μM cinkkel a mérés előtt. A spektrumokat 190-260 nm tartományban vettem fel. A főbb paraméterek: 0,5 nm-es felbontás, 50 nm/perc pásztázási sebesség, sáv szélesség 1 nm. Minden spektrum legalább 3 mérés átlaga. A standard hiba (SEM) $\pm 10\%$ ($n=3-5$). A spektrumok kiértékeléséhez a Spectra Manager SpectraAnalysis v1.53 programot használtam. A normalizált CD spektrumot az alábbi képlettel számítottam ki: normált érték = $\frac{\theta \text{ (mdeg)}}{10 \cdot n \cdot c \cdot l}$, ahol n az adott fehérje aminosavainak számát, c a mol/l-ben megadott koncentrációját, l pedig

a cm-ben megadott kűvetta úthosszt jelöli. A normalizált skála segítségével az egyes spektrumok könnyen összehasonlíthatóak.

ANS fluoreszcencia

Az ANS (8-anilino-1-naftalin-szulfonsav) egy hidrofób fluoreszcens festék, amelyet fehérjék felszíni tulajdonságainak jellemzésére, illetve feltekeredésük köztitermékeinek kimutatására használnak. A fehérje felszíni hidrofób felületeihez kötődik, ezáltal a „molten globule” (a feltekeredett és a teljesen rendezetlen közötti) állapotra jellemző jelentős hidrofób felülethez nagy affinitással kötődik, szemben a globuláris, illetve a „random coil”-szerű fehérjékkel. A kompakt harmadlagos szerkezettel rendelkező globuláris fehérjék hidrofób magja hidrophil felszín alá van temetve, ezért az ANS számára kevésbé elérhető. A „molten globule” állapotban a fehérje már csak fluktuáló harmadlagos szerkezettel jellemezhető, elveszíti hidrophil kölcsönhatásait, ugyanakkor határozott másodlagos szerkezettel bír, ekkor a legnagyobb az ANS számára elérhető hidrofób felület. A rendezetlen fehérjék pedig véletlen elrendeződésű láncként viselkednek, itt már a hidrofób kölcsönhatások is megszűnnek. Így az ANS fluoreszcencia intenzitás alapján megkülönböztethetők lehetnek az egyes szerkezeti állapotok [Leal and Gomes, 2007; Semisotnov, et al., 1991].

A fluoreszcencia spektroszkópia vizsgálatokat FluoroMax-3 spektrofluoriméteren (Jobin Yvon Horiba, Longjumeau, France), 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7,0), illetve 10 mM Tris (pH 7,2) pufferben végeztem 25 °C-on. A vizsgált minta fluoreszcencia jelét minden esetben korrigáltam a puffer jelével. Az adatok kiértékeléséhez a DataMax szoftvert használtam.

A fluorofórt 380 nm-en gerjesztettem, a fluoreszcencia emissziót 400-600 nm között detektáltam. A gerjesztési és emissziós résszélesség 2 nm volt. A mérés során az ANS koncentráció 50 µM, a fehérje koncentrációja 2,5 µM vagy fémionokkal végzett mérés esetén 5 µM volt. Cink, Ca²⁺, illetve Al³⁺ jelenlétében végezve a méréseket, a fémionok koncentrációja 20 µM volt. A standard hiba (SEM) ± 10% (n=3-5). A spektrum legalább 3 mérés átlaga.

Tubulinpolimerizáció

A tubulin mikrotubulussá való polimerizációját turbidimetriás méréssel követtem. 350 nm-en vizsgálva az oldat abszorbancia változását, figyelemmel kísérhető a tubulin mikrotubulusokká való polimerizációja, mivel ezen a hullámhosszon az oldatban lévő anyagok (tubulin, TPPP/p25, puffer) abszorpciója elhanyagolható, viszont a keletkező mikrotubulusokon szóródik a fény. Az oldatban megjelenő polimerek fényszórását követve az abszorbanciaváltozás arányos a keletkezett mikrotubulusok mennyiségével.

A méréseket Varian Cary 100 UV/Vis spektrofotométerrel végeztem 37 °C-on, polimerizáló pufferben (50 mM 2-(N-morfolino)-etánszulfonsav (MES), 50 mM KCl, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTE, pH 6,8), TPPP/p25 hozzáadásával indukálva. Az abszorbancia változást 350 nm-en követtem 6 percig. A TPPP/p25 formák koncentrációja 3 µM, a tubuliné 7 µM, cinkkel való inkubálás (10 perc mérés előtt) esetén a cink ion koncentrációja 100 µM volt. A standard hiba (SEM) ± 10% (n=3-5). A spektrum legalább 3 mérés átlaga.

ELISA („Enzyme-linked immunosorbent assay”)

Az ELISA egy sokoldalú vizsgálati módszer, amely alkalmas egy adott komponens jelenlétének kimutatására bizonyos mintából, illetve fehérje-fehérje kölcsönhatások (kötődési tulajdonságok) jellemzésére is.

Az általam végzett kísérletek célja a (teljes vagy dupla csonkolt) TPPP/p25 fehérjének alfa-szinukleinhez, illetve tubulinhoz való kötődésének vizsgálata volt. Ezeknél a kísérleteknél első lépésként a 96 lyukú ELISA lemezt 5 µg/ml-es TPPP/p25 oldattal inkubáltam (50 µl/lyuk) 1 éjszakán át 4 °C-on. Másnap a nem kötődött fehérjét tPBS pufferrel (tween tartalmú foszfát pufferelt fiziológiás sóoldat: 10 mM Na₂HPO₄, 140 mM NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,3) lemostam, majd 1 mg/ml szarvasmarha szérum albumint (BSA-t) tartalmazó tPBS oldattal (blokkoló puffer) inkubáltam 1 órán át a lemezt, szobahőmérsékleten. Ezzel blokkoltam az esetlegesen üresen maradt helyeket egy, a kölcsönhatásra semleges fehérjével (BSA). Ismételt mosás után a TPPP/p25 kölcsönható partnere, alfa-szinuklein vagy tubulin következett. Az alfa-szinuklein vagy tubulin oldatából hígítási sort készítettem, felező hígítással 5 vagy 10 µM-os fehérjeoldatból kiindulva. Így inkubáltam a lemezt 1 órán át, szobahőmérsékleten. Ezután anti-alfa-szinukleint/anti-tubulint (1:5000) tartalmazó, majd megfelelő, peroxidázzal konjugált másodlagos ellenanyagot

(1:5000) tartalmazó oldattal inkubáltam a lemezt. Mindkét inkubációs lépés előtt a lemezt tPBS pufferrel mostam, az inkubálás pedig 1 órán át, szobahőmérsékleten folyt. Az előhíváshoz 3,7 mM o-fenilén-diamint és 0,03% hidrogén-peroxidot tartalmazó foszfát-citrát puffert (pH 6,0) használtam. A reakcióban keletkezett termék színintenzitása arányos a lemezen kötődött fehérje mennyiségével. A reakciót 10 perc után 1 M H₂SO₄ hozzáadásával állítottam le. Az abszorbanciát 490 nm-en olvastam le, Wallace Victor 2 multiplate reader (Perkin Elmer) segítségével. Minden minta esetén 3 párhuzamos mérést végeztem.

A szintetikus P1-P4 peptidek (TPPP/p25 peptidek) vizsgálata esetén az ELISA lemezt 5 µg/ml-es TPPP/p25 oldattal vagy szintén 5 µg/ml P1/P2/P3/P4 peptid oldattal borítottam. Ehhez speciális ELISA lemezre volt szükség, melyen a kisméretű peptidek is immobilizálhatóak: „Sulphydryl-BIND™ (Maleimide) Modified Surface plate (Corning Incorporated)” segítségével a gyártó utasítása szerint a peptidek SH-csoportjukon keresztül kiköthetőek. A peptideket Cys-taggal szintetizálták, a TPPP/p25 pedig 3 ciszteint tartalmaz, ami lehetővé teszi ezzel a módszerrel történő vizsgálatukat. Ezután tubulint adtam a lemezhez és a peptid/fehérje-tubulin kötés létrejöttét tubulin elleni ellenanyaggal detektáltam az előzőekben leírtak szerint.

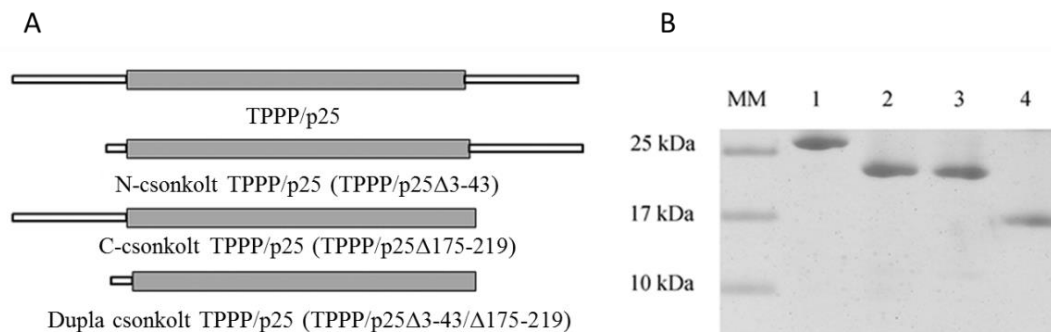
Kompetitív ELISA kísérletet is végeztem a BF180-BF183 peptidekkel: a TPPP/p25 peptidek (BF180-BF183) és alfa-szinuklein előinkubált elegyét adtam az ELISA lemezen immobilizált teljes hosszúságú/dupla csonkolt TPPP/p25-höz, majd specifikus alfa-szinuklein antitesttel és jelölt másodlagos ellenanyaggal detektáltam a kölcsönhatást. Az előinkubáláskor az alfa-szinuklein koncentrációja 500 nM, a peptideké 10, illetve 20 µM volt.

Eredmények és megvitatásuk

I. A TPPP/p25 központi és terminális régióinak szerkezeti jellemzése

A 219 aminosav hosszúságú humán TPPP/p25 szerkezet nélküli N- és C-terminális szegmensei egy 130 aminosavból álló flexibilis régiót vesznek körül [Zotter, et al., 2011a]. A fehérje központi és terminális szegmenseinek szerkezeti és funkcionális sajátosságainak megismerése alapvető jelentőségű a TPPP/p25 különböző funkcióinak jobb megértéséhez.

Vizsgálataimhoz vad típusú és mutáns humán rekombináns TPPP/p25 fehérjét használtam. A Sejtarchitektúra Kutatócsoport klónozte a humán rekombináns TPPP/p25 három mutáns (csonkolt) változatát, ami lehetővé tette számomra, hogy a mutáns fehérjéket megfelelő mennyiségben *E. coli*-ban termeltessem és izoláljam. A módosított fehérjék a következők: N-terminális nélküli, azaz N-csonkolt TPPP/p25 (TPPP/p25 delta 3-43), C-terminális nélküli, azaz C-csonkolt TPPP/p25 (TPPP/p25 delta 175-219) és dupla csonkolt TPPP/p25 (TPPP/p25 delta 3-43/delta 175-219), amely egyik terminális szakaszt sem tartalmazza (7. ábra).

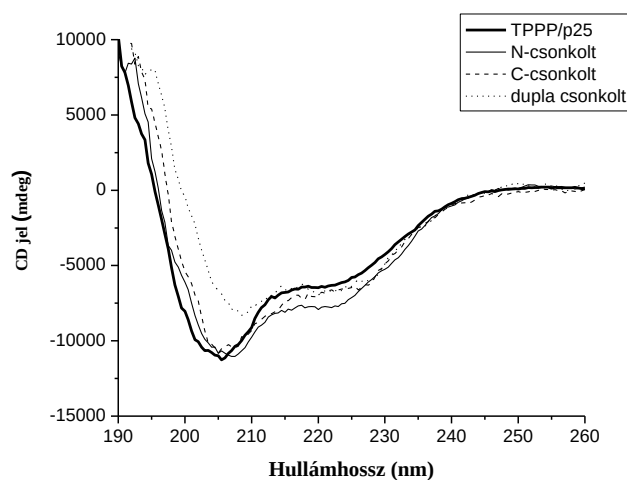


7. ábra: A) A különböző TPPP/p25 formák sémája. B) SDS/PAGE gélen a különböző TPPP/p25 formák: MM=molekulásúly marker, 1=TPPP/p25 (219 aminosav, 23690 g/mol, 25 kDa), 2=N-csonkolt TPPP/p25 (174 aminosav, 19220 g/mol, 20 kDa), 3=C-csonkolt TPPP/p25 (175 aminosav, 18970 g/mol, 20 kDa), 4=dupla csonkolt TPPP/p25 (130 aminosav, 14500 g/mol, 15 kDa).

A vad típusú fehérje szerkezetbeli jellegzetességeit hasonlítottam össze a mutáns változatokéval. Különböző módszerekkel azt vizsgáltam, hogy a rendezetlen N- és/vagy C-terminális eltávolítása milyen hatással van a fehérje szerkezetére.

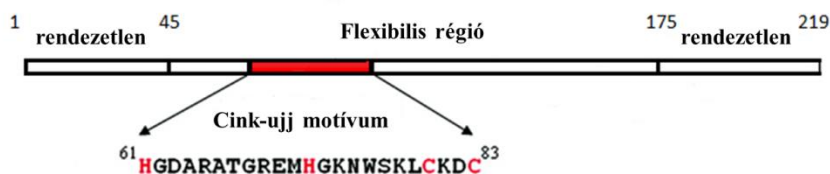
I/1. CD spektroszkópia

A TPPP/p25 jellegzetes, magas „random coil”-tartalmú, a rendezetlen fehérjékre jellemző szerkezettel bír, ami a CD spektrumában is megnyilvánul: a TPPP/p25 távoli-UV CD spektrumán egy nagyobb negatív sáv figyelhető meg 206-208 nm környékén, mely a fehérje rendezetlenségére utal. Ezt egy 220 nm körüli negatív váll követi, másodlagos szerkezetet (α -hélix, β -redő) jelezve [Hlavanda, et al., 2002]. Az N- és C-terminális szakaszokat nem tartalmazó dupla csonkolt TPPP/p25 forma CD spektruma azonban rendezettebb struktúrát mutat a nem-csonkolt fehérjéhez képest, ami a 206 és 222 nm-nél mért negatív ellipticitási értékek arányának csökkenésében jelentkezik (8. ábra). Az N- és C-csonkolt változatok spektrumai nem térnek el jelentősen a vad típusétól, tehát a terminális régiók nagymértékben hozzájárulnak a fehérje rendezetlenségéhez.



8. ábra: A különböző TPPP/p25 formák szerkezeti jellemzése távoli-UV CD spektroszkópiával. TPPP/p25 (vastag), N-terminális nélküli TPPP/p25 (vékony), C-terminális nélküli TPPP/p25 (szaggatott), dupla csonkolt TPPP/p25 (pontosított). Normalizált CD spektrum.

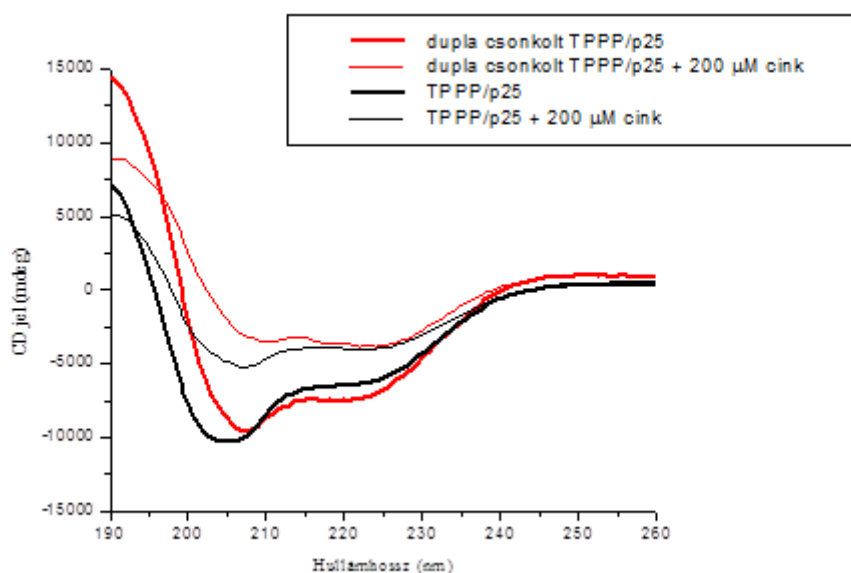
Az TPPP/p25 szekvencia vizsgálata megmutatta, hogy a fehérje középső flexibilis régiójában egymáshoz közel 2 His és 2 Cys található, ami cink-ujj motívumot alkot (9. ábra) [Zotter, et al., 2011b]:



9. ábra: A TPPP/p25 szerkezeti sémája: pirossal kiemelve a cink-ujj motívum.

Mivel az agy egész területére, valamint az oligodendrocita sejtekre, ahol a TPPP/p25 expresszálódik, jellemző a magas cink koncentráció, vizsgálni kezdtük a cink ion hatását a fehérje szerkezetére.

A fehérjék másodlagos szerkezetéről felvilágosítást adó távoli-UV cirkuláris dichroizmus spektroszkópia alapján megállapítható volt, hogy mind a dupla csonkolt TPPP/p25-höz, mind a vad típusú fehérjéhez cinket adva csökkent a rendezetlen régióra jellemző 206-208 nm körül jelentkező negatív csúcs, valamint megváltozott a 206-208 nm-nél és a 222 nm-nél lévő negatív csúcspár aránya, a másodlagos szerkezeti elemek megjelenésére utaló módon. Tehát a cink a TPPP/p25 szerkezetében másodlagos szerkezetváltozást indukál (10. ábra).

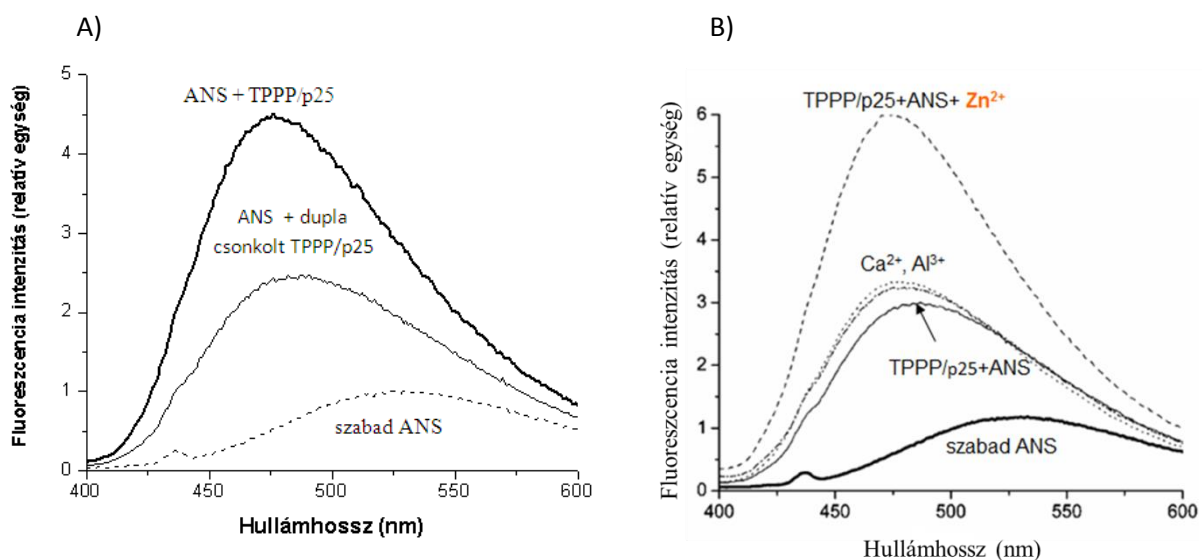


10. ábra: Távoli-UV CD spektrum: TPPP/p25 (vastag fekete), TPPP/p25 200 μ M cinkkel inkubálva 10 percig a mérést megelőzően (vékony fekete), dupla csonkolt TPPP/p25 (vastag piros), dupla csonkolt TPPP/p25 200 μ M cinkkel inkubálva 10 percig a mérést megelőzően (vékony piros). Normalizált CD spektrum.

I/2. ANS fluoreszcencia

Az ANS fluoreszcenciás próba a fehérjék hidrofób régióihoz kötődik, a kötődés „molten globule” állapot esetén sokkal nagyobb mértékű, mint a globuláris vagy rendezetlen fehérjék esetében, ezáltal a fluoreszcencia intenzitás utalhat a szerkezeti állapotra [Leal and Gomes, 2007; Semisotnov, et al., 1991]. Ezt a módszert alkalmaztam annak vizsgálatára, hogy a vad típusú, illetve a dupla csonkolt TPPP/p25 esetén képes-e kialakulni lokális konformációs struktúra a fehérjében.

Az 11. ábrán látható, hogy TPPP/p25 jelenlétében az ANS emissziós intenzitása megnő, ami azt mutatja, hogy az ANS számára elérhető hidrofób felületek találhatók a rendezetlen fehérje felszíni régióiban. Ugyanakkor a fehérje szerkezet nélküli terminális szegmenseinek eltávolítása sokkal kisebb fluoreszcenciaintenzitás növekedést és az emissziós spektrum maximumának kisebb mértékű, a rövidebb hullámhosszak irányában való (blue shift) eltolódását eredményezte, mint a teljes TPPP/p25 esetében. Ezek az eredmények a csonkolás következtében kialakuló konformációs változásra utalnak, melynek következtében kevesebb a felszíni hidrofób felület, amelyhez az ANS kötődni tud, ami összevetve a CD spektrum által nyújtott információkkal arra utal, hogy a dupla csonkolt TPPP/p25 határozott (másodlagos/harmadlagos) szerkezeti elemeket tartalmaz, ezáltal kompaktabb, kevésbé kitekeredett, mint a teljes hosszúságú fehérje.



11. ábra: A) ANS fluoreszcencia spektroszkópia. ANS emissziós spektrum (szaggatott vonal), ANS TPPP/p25-tel (vastag folytonos vonal) és ANS dupla csonkolt TPPP/p25-tel (vékony folytonos vonal). Az ANS koncentráció 50 μM , a fehérje koncentrációja 2,5 μM volt. **B) A cink hatása a TPPP/p25 ANS fluoreszcencia spektrumára:** szabad ANS (50 μM) emissziós spektruma (vastag), ANS spektrum 5 μM TPPP/p25 jelenlétében (folytonos vékony), ANS-TPPP/p25 20 μM cink (szaggatott), 20 μM Ca^{2+} (pontosított) és 20 μM Al^{3+} (szaggatott-pontosított) jelenlétében.

Cink jelenlétében elvégezve a kísérletet további intenzitásnövekedés látható, az ANS számára kiterjedbb hidrofób felület érhető el, jelezve, hogy a cink kötődése szerkezetváltozást indukál a fehérjében, nagy valószínűséggel „molten globule”-szerű állapot alakul ki. A hatás specifikus cinkre nézve, ugyanis azonos koncentrációjú Ca^{2+} és Al^{3+} ionok csak minimális intenzitásnövekedést okoznak (11. ábra). A cink az első és máig az egyetlen olyan ligandum, ami a TPPP/p25 szerkezeti átrendeződését, „molten globule” képződését indukálja.

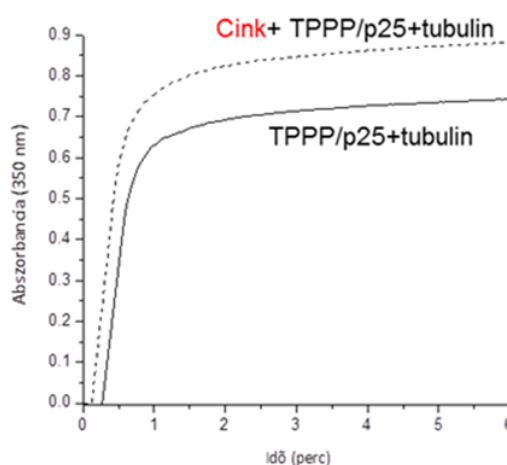
II. A TPPP/p25 fiziológiás funkciója: kölcsönhatása tubulinnal

A TPPP/p25 fő kölcsönható partnere a tubulin/mikrotubuláris rendszer, melynek stabilitását és dinamikáját szabályozza [Hlavanda, et al., 2007; Hlavanda, et al., 2002; Tőkési, et al., 2010]. Hogy közelebb kerüljünk e fiziológiás funkció minél pontosabb megértéséhez, megvizsgáltam a cink kötődése indukálta szerkezetváltozás, valamint a TPPP/p25 különböző régióinak szerepét a tubulinnal való kölcsönhatásban.

II/1. A cink ion hatása a TPPP/p25-tubulin kölcsönhatásra

A TPPP/p25 kölcsönhatása a tubulinnal a tubulin mikrotubulussá való polimerizációját indukálja. E folyamat vizsgálatára az egyik rutinszerűen alkalmazott módszer, ha a képződő oligomereket (részecskéket) spektroszkópiával olyan hullámhosszon (350 nm) vizsgáljuk, amelynél az oldatban lévő fehérjék (így a tubulin és a TPPP/p25) abszorpciója elhanyagolható, viszont a részecskéken (mikrotubulusokon) szóródik a fény. A polimerizáció tehát fényszórást idéz elő, az oldat „turbid” lesz és az abszorpcióváltozás arányos a keletkezett részecskék mennyiségével. Így figyelemmel kísérhető a tubulin polimerizációja az oldatban megjelenő polimerek fényszórásának követésével.

A mérés során a küvetában lévő TPPP/p25-höz tubulint adva indítottam el a polimerizációt, majd követtem a 350 nm-nél detektálható fényszórás változását.



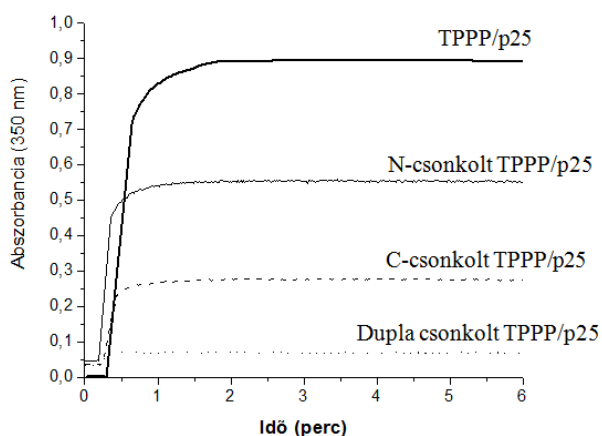
12. ábra: A cink hatása a TPPP/p25 tubulinpolimerizációt indukáló aktivitására (turbiditásmérés): 7 μ M tubulin 3 μ M TPPP/p25-tel (fekete folytonos), 7 μ M tubulin 3 μ M TPPP/p25-tel 100 μ M cink jelenlétében (fekete szaggatott).

A cink-kötés funkcionális hatását turbiditás mérésekkel vizsgálva kimutatható, hogy a cink kötődése által indukált szerkezetváltozás növeli a TPPP/p25 tubulinpolimerizációt indukáló képességét, azaz a fiziológias funkcióját.

II/2. A TPPP/p25 különböző szegmenseinek szerepe a fiziológias kölcsönhatásban

A fiziológias feladat ellátásában a fehérje különböző régiói eltérő mértékben vehetnek részt, ezért megvizsgáltam a TPPP/p25 különböző szegmenseinek szerepét a fehérje tubulinpolimerizációt indukáló aktivitásában.

Mint a 13. ábra mutatja, turbiditásméréssel követve a különböző TPPP/p25 formák eltérő polimerizációs potenciállal bírnak: a dupla csonkolt TPPP/p25 esetén gyakorlatilag nem keletkeztek 350 nm-nél detektálható (azaz annál hosszabb) formák. Ugyanakkor az N- és C-csonkolt forma, bár kisebb mértékben, mint a teljes hosszúságú TPPP/p25, képes polimerizációt indukálni. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy bár különböző mértékben, de a TPPP/p25 mindkét rendezetlen terminális szegmense hozzájárul a fehérje tubulinpolimerizációt indukáló aktivitásához, azaz ahhoz, hogy maximálisan kifejtse mikrotubulus képződését elősegítő aktivitását. A polimerizáció mértékének csökkenése a C-csonkolt TPPP/p25 esetén sokkal kifejezettebb, mint az N-csonkolt fehérjénél, ami arra utal, hogy leginkább a C-terminális rész szerepe a meghatározó a polimerizációs aktivitásban.

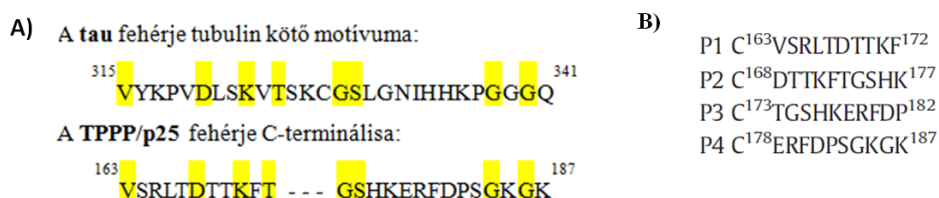


13. ábra: A TPPP/p25 különböző formáinak tubulinpolimerizációt indukáló potenciálja turbiditás méréssel követve. TPPP/p25 (vastag vonal), N-terminális nélküli TPPP/p25 (folytonos vonal), C-terminális nélküli TPPP/p25 (szaggatott vonal), dupla csonkolt TPPP/p25 (pontosított vonal). A TPPP/p25 formák koncentrációja 3 μ M, a tubuliné 7 μ M volt.

II/3. A TPPP/p25 tubulin kötő szegmensének azonosítása

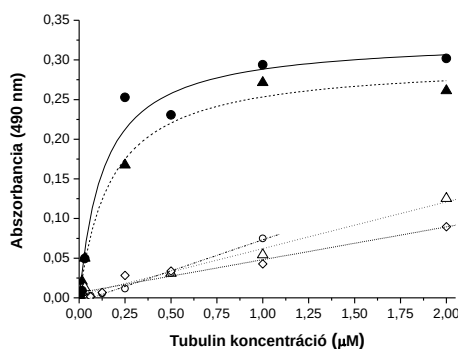
A fiziológias funkció betöltéséhez, azaz a tubulinpolimerizáció elősegítéséhez elengedhetetlenek a terminális régiók, ami azt mutatja, hogy a TPPP/p25 tubulin kötő szegmense valahol a rendezetlen végeken található. A turbiditásmérés eredménye alapján összehasonlítva az N-és C-csonkolt fehérjék tubulinpolimerizációt indukáló aktivitását, tovább szűkíthetjük a kötőhely lokalizációját a C-terminálisra, hiszen a C-csonkolt fehérje aktivitása láthatóan gyengébb, mint az N-csonkolté.

A kötőhely lokalizációjának pontosításához felhasználtuk még azt az információt, hogy a tau fehérje tubulin kötő motívuma és a TPPP/p25 C-terminálisa között bizonyos fokú szekvencia homológia található [Hlavanda, et al., 2007] (14. A) ábra). Ezen információk ismeretében 4 különböző, de egymással átfedő szekvenciájú peptidet tervezett a csoport (P1-P4), melyek a TPPP/p25 C-terminálisának ezen részét fedik le (14. B) ábra):



14. ábra: A) A tau fehérje tubulin kötő motívumának és a TPPP/p25 C-terminálisának összehasonlítása aminosav szekvencia alapján. B) A szintetikus P1-P4 peptidek aminosav szekvenciái [Tőkési, et al., 2014]

A szintetizált peptidek Cys-taggal rendelkeznek, ami lehetővé teszi ELISA módszerrel történő vizsgálatukat, mivel SH-csoportjukon keresztül immobilizálhatóak speciális ELISA lemezen, csakúgy mint a 3 ciszteint tartalmazó TPPP/p25. A peptidekkel vagy vad típusú TPPP/p25-tel borított ELISA lemezhez tubulint adtunk különböző koncentrációban, majd a peptid/fehérje-tubulin kötés létrejöttét tubulin elleni ellenanyaggal detektáltuk (15. ábra).



15. ábra: ELISA kísérlet: tubulin kölcsönhatása TPPP/p25-tel és a P1-P4 peptidekkel.
TPPPP/p25 (●), P1 (▲), P2 (○), P3 (◇) and P4 (▲).

Az eredmény azt mutatja, hogy a P4 peptid, amely a TPPP/p25 178-187-ig terjedő szakaszának felel meg, közel ugyanakkora affinitással kötődik a tubulinhoz, mint a teljes TPPP/p25. Ugyanakkor a másik 3 szintetikus peptid (P1-P3) csak kis mértékben hat kölcsön tubulinnal. Következésképpen a TPPP/p25 C-terminálisán elhelyezkedő ¹⁷⁸ERFDPSGKGK¹⁸⁷ motívum az a szakasz, amely kulcsszerepet játszik a TPPP/p25 tubulinnal való kölcsönhatásában.

III. A TPPP/p25 patológiás funkciója: kölcsönhatása alfa-szinukleinnel

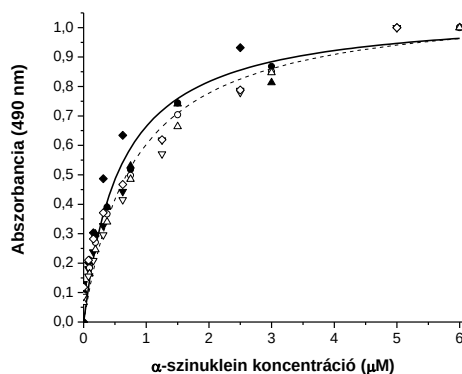
Miután a TPPP/p25 szerepe a Parkinson-kór és más szinukleinopátiák esetében bizonyított, így vizsgálataimban fontos szerepet kapott a fehérje alfa-szinukleinnel való kölcsönhatásának tanulmányozása, a TPPP/p25-alfa-szinuklein hetero-komplex kialakításában kulcs szerepet játszó TPPP/p25 szegmens azonosítása. Ezen vizsgálatok célja a TPPP/p25-alfa-szinuklein patológiás komplex kialakulását gátló, illetve megszüntetését elősegítő specifikus anti-Parkinson ágens tervezése.

Ezekhez a kísérletekhez a vad típusú és mutáns humán rekombináns TPPP/p25 formák mellett humán rekombináns alfa-szinukleinre is szükségem volt, melyet *E. coli*-ban termeltettem és izoláltam az anyagok és módszerekben leírtak szerint.

III/1. ELISA – dupla csonkolt/teljes TPPP/p25 kölcsönhatása az alfa-szinukleinnel

Az alfa-szinuklein kötőhely lokalizációját a TPPP/p25 felszínén specifikus ELISA kísérletekkel sikerült meghatározni.

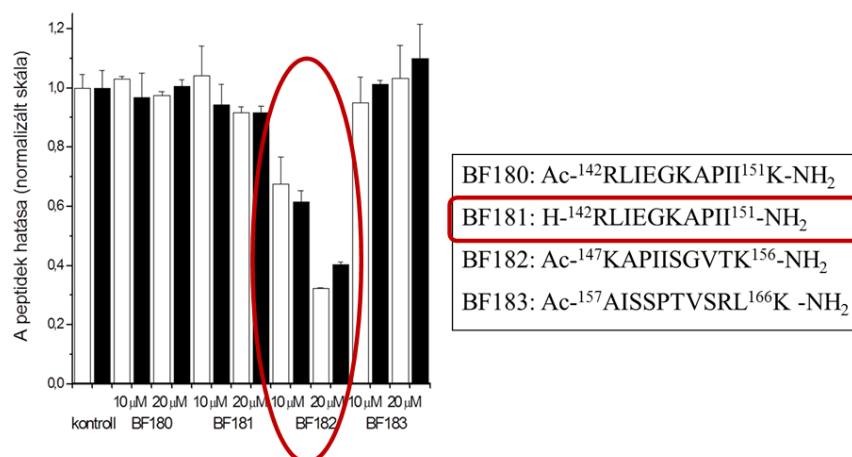
Első lépésként kimutattam, hogy mind a teljes hosszúságú (natív), mind a dupla csonkolt rekombináns TPPP/p25 kötődik az alfa-szinukleinhez (16. ábra), bizonyítva, hogy a kötőhely a TPPP/p25 középső régiójában helyezkedik el. Ez összhangban van a csoport korábbi, Pepscan analízissel kapott adataival, miszerint a TPPP/p25 147-166 aminosavak közötti szakasza valószínűsíthető, hogy felelős az alfa-szinukleinnel való kölcsönhatásért [Oláh, et al., 2011].



16. ábra: A teljes (vastag vonal) és a dupla csonkolt (szaggatott) TPPP/p25 kölcsönhatása alfa-szinukleinnel. ELISA kísérlet: A lemez a TPPP/p25 formákkal volt borítva, erre alfa-szinuklein került különböző koncentrációban, az előhívás anti-alfa-szinuklein ellenanyaggal történt. A különböző szimbólumok több, független mérést jelölnek.

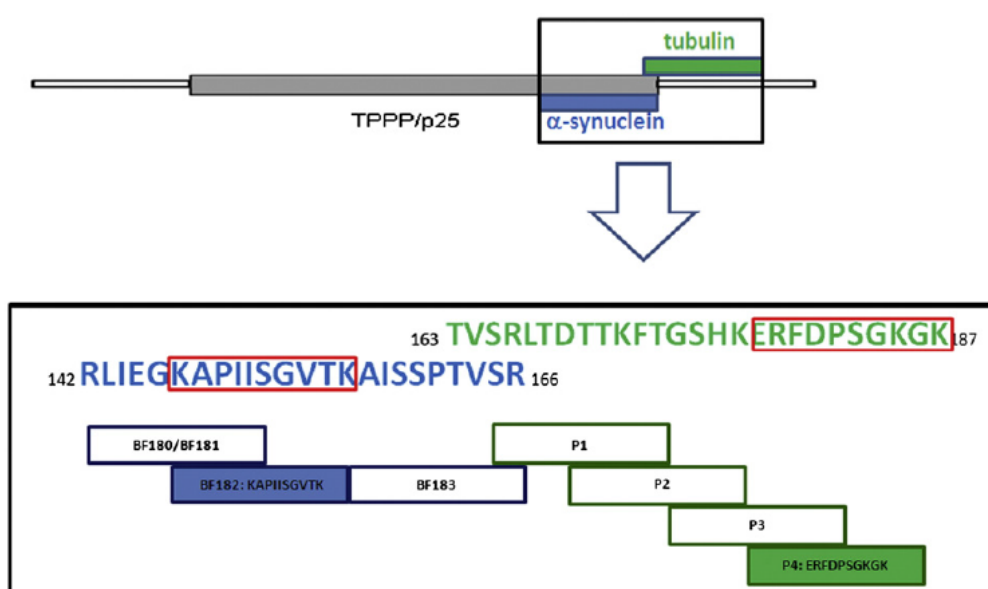
III/2. Kompetitív ELISA szintetikus TPPP/p25 peptidekkel

A kötőhely lokalizációjának pontosítása érdekében a TPPP/p25 középső, 142-166-ig terjedő szakaszát lefedő szintetikus TPPP/p25 peptidek segítségével kompetitív ELISA kísérletet végeztünk. A TPPP/p25 peptidek (142-151, 147-156, 157-166) és alfa-szinuklein előinkubált elegyét adtuk az ELISA lemezen immobilizált teljes hosszúságú/dupla csonkolt TPPP/p25-höz. Specifikus alfa-szinuklein antitesttel előhívva a lemezt, azt találtuk, hogy a TPPP/p25 147-156-ig terjedő szakaszát lefedő peptid gátolta az alfa-szinuklein ELISA lemezen lévő TPPP/p25-höz való kötődését, azaz a 147-156 peptid kompetált a teljes/dupla csonkolt TPPP/p25-tel (az alfa-szinuklein a peptidhez kötődött, még mielőtt az ELISA lemezre felvittük volna, így a lemezen lévő TPPP/p25-tel már csak kevésbé tudott kölcsönhatni) (17. ábra). A gátlás hasonló mértékű volt a teljes hosszúságú és a dupla csonkolt TPPP/p25 esetében. Mindezek alapján arra következtettünk, hogy a TPPP/p25 147-156-ig terjedő szakasza az, amely leginkább részt vesz az alfa-szinukleinnel való kölcsönhatásban.



17. ábra: Kompetitív ELISA - TPPP/p25 peptidek hatása a TPPP/p25- alfa-szinuklein kölcsönhatásra. A lemez a teljes (fehér oszlop) vagy a dupla csonkolt (fekete oszlop) TPPP/p25 formákkal volt borítva, majd alfa-szinuklein és a TPPP/p25 peptidek (BF180, BF181, BF182, BF183) előinkubált elegyét adtuk hozzá. A kölcsönhatást alfa-szinuklein elleni antitesttel detektáltuk. Az ábrán 3 független mérés átlaga és a szórás van feltüntetve.

A TPPP/p25 fiziológiás és patológiás kölcsönhatásaiért felelős kötő szegmensei tehát jól elkülöníthetők egymástól, ami különösen fontos abból a szempontból, hogy a kialakuló kölcsönhatásokat szelektíven befolyásolni lehessen (18. ábra). Azaz a patológiás folyamatot, az alfa-szinuklein kötődését gátolni lehessen anélkül, hogy ezzel akadályoznánk a fiziológiás funkciót, a tubulinnal való kölcsönhatást.

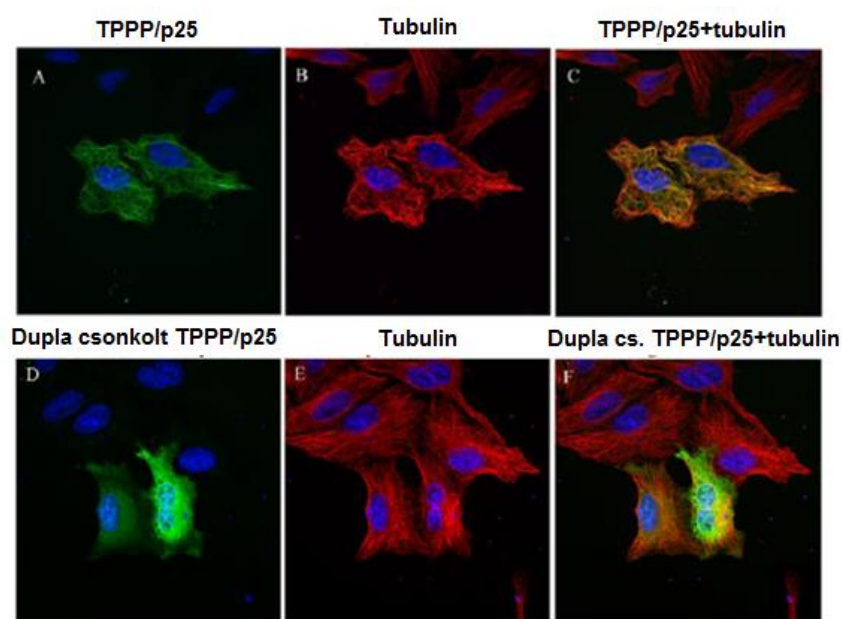


18. ábra: A TPPP/p25 tubulin és alfa-szinuklein kötő motívumai, valamint az ezek azonosításához felhasznált szintetikus TPPP/p25 peptidek. [Tőkési, et al., 2014]

IV. Az in vitro eredmények összevetése élő-sejtes vizsgálatokkal

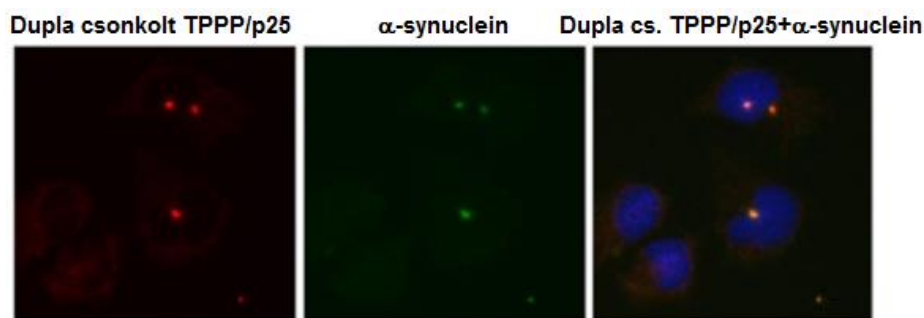
Kísérleteimet humán rekombináns vad típusú és mutáns TPPP/p25 fehérje formákkal, illetve humán rekombináns alfa-szinukleinnel végeztem. Felmerül a kérdés, hogy az így kapott eredmények mennyire relevánsak sejtes rendszerekben, in vivo. A Sejtarchitektúra Kutatócsoportban élő-sejtes kísérletek is zajlanak, különböző sejtípusokat használva, melyekben a TPPP/p25 gén transzfekcióját (HeLa) vagy doxiciklinnel való indukciót (CHO10) követően kifejeződik a fehérje.

Reprezentatív ábra mutatja az in vivo kísérletek eredményeit:



19. ábra: Különböző TPPP/p25 formák lokalizációja HeLa sejtekben. Tranziensen transzfektáltak HeLa sejtek pEGFP-TPPP/p25-tel (A-C, zöld) vagy pEGFP-dupla csonkolt TPPP/p25-tel (D-F, zöld) anti-tubulin ellenanyaggal (piros) festve és konfokális mikroszkóppal vizsgálva. Magfestés: DAPI (kék). Lépték: 10 μ m. [Tökési, et al., 2014]

HeLa sejteket tranziensen transzfektálva a teljes illetve a dupla csonkolt TPPP/p25 formákkal, immunfluoreszcenciás mikroszkópiával azt találták, hogy míg a teljes TPPP/p25 ko-lokalizál a mikrotubuláris hálózattal, a dupla csonkolt forma homogén citoplazmatikus eloszlást mutat, nem képes kötődni a mikrotubuláris hálózathoz (19. ábra).



20. ábra: Dupla csenkolt TPPP/p25 és az alfa-szinuklein intracelluláris lokalizációja CHO10 sejtekben immunfluoreszcens mikroszkópiával vizsgálva. CHO10 sejtek, a médiumhoz dupla csenkolt TPPP/p25 (piros) és alfa-szinuklein (zöld) előinkubált elegyét adva. Magfestés: DAPI (kék). Lépték: 2,50 μm . [Tökési, et al., 2014]

CHO10 sejtek esetén a médiumhoz dupla csenkolt TPPP/p25 alfa-szinukleinnel előinkubált elegyét adva azt tapasztalták, hogy a dupla csenkolt TPPP/p25 az alfa-szinukleinnel citoplazmikus aggregátumokat képez (20. ábra).

A dupla csenkolt TPPP/p25 tehát nem ko-lokalizál a mikrotubuláris hálózattal, míg alfa-szinuklein aggregációt képes indukálni, azaz a TPPP/p25 tubulin és alfa-szinuklein kötő motívumai jól elkülöníthetőek. A csoportban végzett sejtes kísérletek összhangban vannak az in vitro kapott adatokkal, igazolva eredményeim in vivo relevanciáját. Az ezzel kapcsolatos adatok részét képezik a munkacsoport egyik innovatív projektjének, mely a TPPP/p25-alfa-szinuklein patológiás komplex kialakulását gátló, illetve megszüntetését elősegítő specifikus anti-Parkinson ágens (*foldamer*) előállítására.

Összefoglalás

A központi idegrendszeri betegségek kialakulásában meghatározó szerepet játszanak a rendezetlen, stabil 3D szerkezettel nem rendelkező fehérjék. A Sejtarchitektúra Kutatócsoport azonosított egy ilyen agy-specifikus fehérjét, melyet funkciója és molekulatömege alapján Tubulin Polymerization Promoting Protein/p25-nek (TPPP/p25) nevezett el. A fehérje humán agyban az oligodendrocitákban fejeződik ki, fiziológiás célpontja a mikrotubuláris rendszer, melynek stabilitását és dinamikáját szabályozza. Parkinson-kór és más szinukleinopátiák esetén a TPPP/p25 a zárványtestekben halmozódik fel az alfa-szinukleinnel együtt. A TPPP/p25 a „neomorphic moonlighting” fehérjék prototípusa, mivel fiziológiás és patológias körülmények között különböző funkciókat lát el, a fehérje génszintű változása nélkül.

A munkacsoport kutatásaiba 2012-ben kapcsolódtam be, amikor a humán rekombináns TPPP/p25 számos strukturális és funkcionális sajátossága már ismert volt, pl. hogy rendezetlen N- és C-terminális szegmensei egy flexibilis régiót fognak közre. A terminális szegmensektől megfosztott mutáns fehérjét is klónozták, ami lehetővé tette, hogy mind a vad típusú, mind a mutáns fehérjét megfelelő mennyiségben *E. coli*-ban termeltessem és izoláljam, így biofizikai és biokémiai módszerekkel a különböző TPPP/p25 formák szerkezetét és kölcsönhatásait molekuláris szinten jellemezzem. Céloom a TPPP/p25 fiziológiás és patológias kölcsönhatásaiért felelős kötőhelyeinek azonosítása volt. Cirkuláris dikroizmus mérések megmutatták, hogy a vad típusú fehérjét random coil jellemzi, de a központi flexibilis szegmens („core”) képes másodlagos szerkezet kialakítására. Fluoreszcenciás mérésekkel sikerült azonosítani molten globula struktúrát a TPPP/p25 „core” régiójában. A „core” régió cink-ujj motívuma specifikusan köti a cink iont, ami szerkezetváltozást okozva fokozza a TPPP/p25 tubulin polimerizációt indukáló képességét. A különböző TPPP/p25 formák tubulinnal, ill. alfa-szinukleinnel, mint fiziológiás, ill. patológias partnerekkel való kölcsönhatását ELISA-val és turbiditásméréssel vizsgálva sikerült bizonyítani, hogy míg a TPPP/p25 fiziológiás szerepének betöltésében a C-terminális játszik meghatározó szerepet, addig a TPPP/p25-alfa-szinuklein patológias komplex kialakulásában a „core” régió van kulcsszerepe. Eredményeim *in vivo* relevanciáját a csoportban végzett élősejtes kísérletek is bizonyítják: a „core” régió nem kolokalizál a mikrotubuláris hálózattal, azonban koaggregál az alfa-szinukleinnel.