



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar

TPPP/p25: EGY RENDEZETLEN FEHÉRJE KETTŐS ÉLETE

Diplomamunka

Készítette: **Szabó Adél**

Témavezetők: **Dr. Ovádi Judit** professor emeritus

MTA TTK Enzimológiai Intézet

Sejtarchitektúra Kutatócsoport

Dr. Oláh Judit tudományos főmunkatárs

MTA TTK Enzimológiai Intézet

Sejtarchitektúra Kutatócsoport

Konzulens: **Dr. Vértessy G. Beáta** egyetemi tanár

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék



Budapest

2014



Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSJEJYZÉK	3
BEVEZETÉS	5
IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
„MOONLIGHTING” FEHÉRJÉK.....	7
A RENDEZETLEN FEHÉRJÉK.....	8
<i>Rendezetlen fehérjék szerepe a neurodegenerációs betegségekben</i>	<i>9</i>
<i>Alfa-szinuklein.....</i>	<i>10</i>
<i>Parkinson-kór</i>	<i>12</i>
TPPP/p25	14
<i>Az új agy-specifikus TPPP/p25 fehérje azonosítása</i>	<i>14</i>
<i>A TPPP/p25 rendezetlen fehérje</i>	<i>16</i>
<i>A TPPP/p25 fiziológiás célpontja: a mikrotubuláris rendszer</i>	<i>17</i>
<i>A TPPP/p25 patológias funkciója, szerepe a neurodegenerációban</i>	<i>21</i>
<i>A TPPP/p25 a „neomorphic moonlighting” fehérjék prototípusa</i>	<i>22</i>
CÉLKITŰZÉSEK	24
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	25
HUMÁN REKOMBINÁNS TPPP/p25 FORMÁK EXPRESSZIÓJA ÉS IZOLÁLÁSA	25
P1-P4 ÉS BF180-183 PEPTIDEK SZINTÉZISE.....	27
REKOMBINÁNS ALFA-SZINUKLEIN EXPRESSZIÓJA ÉS IZOLÁLÁSA.....	27
TUBULIN PREPARÁLÁS	28
FEHÉRJEKONCENTRÁCIÓ MEGHATÁROZÁSA.....	28
SDS-PAGE.....	29
CIRKULÁRIS DIKROIZMUS (CD) SPEKTROSKÓPIA	30
ANS FLUORESZCENCIA.....	32
TUBULINPOLIMERIZÁCIÓ	33
LIMITÁLT PROTEOLÍZIS.....	33
ELISA	34
PEPSCAN ANALÍZIS.....	35
WESTERN BLOT (DOT-BLOT).....	36
EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.....	38
I. A TPPP/p25 KÖZPONTI ÉS TERMINÁLIS RÉGIÓINAK SZERKEZETI JELLEMZÉSE.....	38
<i>I/1. CD spektroszkópia.....</i>	<i>39</i>
<i>I/2. ANS fluoreszcencia.....</i>	<i>40</i>
<i>I/3. Limitált proteolízis</i>	<i>41</i>
II. A CINK ION HATÁSA A TPPP/p25 RENDEZETLEN STRUKTÚRÁJÁRA.....	42

<i>II/1. CD spektroszkópia</i>	<i>42</i>
<i>II/2. ANS fluoreszcencia</i>	<i>43</i>
III. A TPPP/p25 FIZIOLÓGIÁS FUNKCIÓJA: KÖLCSÖNHATÁSA TUBULINNAL	44
<i>III/1. A cink ion hatása a TPPP/p25-tubulin kölcsönhatásra</i>	<i>44</i>
<i>III/2. A TPPP/p25 különböző szegmenseinek szerepe a fiziológias kölcsönhatásban</i>	<i>46</i>
<i>III/3. A TPPP/p25 tubulin kötő szegmensének azonosítása.....</i>	<i>48</i>
IV. A TPPP/p25 PATOLÓGIÁS FUNKCIÓJA: KÖLCSÖNHATÁSA ALFA-SZINUKLEINNEL	50
<i>IV/1. Alfa-szinuklein kötőhely meghatározása a TPPP/p25-ön.....</i>	<i>51</i>
<i>IV/2. Az alfa-szinuklein TPPP/p25-öt kötő szegmensének azonosítása.....</i>	<i>53</i>
V. AZ IN VITRO EREDMÉNYEK ÖSSZEVETÉSE ÉLŐ-SEJTES VIZSGÁLATOKKAL	59
ÖSSZEFOGLALÁS.....	61
SUMMARY	63
HIVATKOZÁSOK	65
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	73

Rövidítésjegyzék

AEBSF	4-(2-aminoetil)-benzénszulfonil-fluorid-hidroklorid
ANS	8-anilino-1-naftalin-szulfonsav
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool”
BSA	„bovine serum albumin” (szarvasmarha szérum albumin)
CD	cirkuláris dikroizmus
CHO	„chinese hamster ovary” (kínai hörcsög petefészek)
CLIP	„cytoplasmic linker protein”
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DTE	ditioeritrol
ECL	„enhanced chemiluminescence” (magnövelt kemilumineszcencia)
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGTA	etilén-glikol-bisz (b-aminoetil éter)-N, N, N', N'-tetraecetsav
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay”
FRAP	„fluorescence recovery after photobleaching”
GDP	guanozin-difoszfát
GTP	guanozin-trifoszfát
HDAC6	hiszton deacetiláz 6
HeLa	Henrietta Lacks méhnyak karcinómájából származó biopsziából kitenyésztett sejtvonal
IDP	„Intrinsically Disordered Protein” (eredendően rendezetlen fehérje)
IMAC	„immobilized metal affinity chromatography”
IPTG	izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid
ITC	izotermális titrációs mikroklorimetria
IUP	„Intrinsically Unstructured Protein” (eredendően szerkezet nélküli fehérje)
LB	„Luria-Bertani Broth”
L-DOPA	levodopa
MAP	Mikrotubulushoz Asszociált Protein
MES	2-(N-morfolino)-etánszulfonsav
MM	molekulasúly marker

NAC	non-amyloid- β component
NMR	„Nuclear Magnetic Resonance” (mágneses magrezonancia)
OLG	oligodendrocita
OPD	orto-fenilén-diamin
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PBS	„Phosphate Buffered Saline” (foszfát pufferelt fiziológias sóoldat)
pEGFP	emlős expressziós vektor, ami EGFP-vel („enhanced green fluorescent protein”) fuzionált fehérjét képes expresszálni
PMSF	fenilmetilszulfonil-fluorid
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SEM	„standard error of the mean” (standard hiba)
SNCA	synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)
tPBS	tween-tartalmú PBS
TPPP	„Tubulin Polymerization Promoting Protein”
Tricin	N-(trisz-(hidroximetil)-metil)-glicin
Tris	trisz-(hidroximetil)-aminometán

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 sejttípus, 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 mitegy 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-szabályozásában, a génkifejeződésben és a dajkafehérje funkcióban, valamint fontos résztvevői egyes neurodegeneratív 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 fiziológias kölcsönható partnere a tubulin, melynek mikrotubulussá való polimerizációját indukálja. A 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-fiziológias 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 fiziológias partner, valamint az alfa-szinuklein, mint patológias 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 patológias 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 funkció nem genetikai szintű eltérésekből (génfüzió, alternatív splicing vagy mutáció) ered; 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 patológias 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.

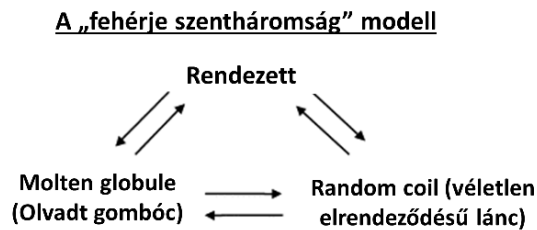
A rendezetlen fehérjék

Egyes fehérjék nem jellemezhetőek csupán egyetlen jól definiálható 3D szerkezettel, hanem a polipeptidlánc rendkívüli flexibilitása révén olyan dinamikus konformersokaságnak tekinthetőek, amelyekben a peptidgerinc nem egyensúlyi, hanem időben változó torziós szög értékekkel jellemezhető [Uversky and Dunker, 2010]. A szakirodalom ezeket a fehérjéket eredendően szerkezet nélküli („Intrinsically Unstructured Protein”, IUP) [Wright and Dyson, 1999] vagy eredendően rendezetlen fehérje („Intrinsically Disordered Protein”, IDP) [Dunker, et al., 2000] néven tartja számon. Elnevezésük arra a tulajdonságukra utal, hogy a rendezetlenség nem környezeti hatások következménye, hanem saját, funkcionális szempontból fontos jellemzőjük.

A rendezetlen fehérjék gyakran nem a teljes polipeptidlánc hosszúságában rendezetlenek, hanem reziduális szerkezettel rendelkeznek. 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 rendezetlen régiók a molekuláris felismerésben, más fehérjékkel (pl. kinázok, transzkripciós faktorok, transzlációs inhibitorok), illetve nukleinsavakkal (pl. DNS, mRNS, tRNS, rRNS) való heteroasszociációk kialakításában vehetnek részt [Dunker, et al., 2002; Tompa, 2002].

A klasszikus szekvencia→szerkezet→funkció paradigma szerint a fehérjék biológiai funkciójának betöltéséhez nélkülözhetetlen egy jól definiált háromdimenziós szerkezet. Azonban számos fehérje illetve fehérjedomén viselkedése nem felel meg ennek a hagyományos képnek, mivel natív, funkcionális állapotukban sem rendelkeznek stabil térszerkezettel [Daughdrill, et al., 1997]. Ezért Dunker és munkatársai a klasszikus szerkezet-funkció paradigmát kiterjesztették az

eredendően rendezetlen fehérjékre és felállították a „fehérje szentháromság” modellt. A modell értelmében a fehérjék natív körülmények között három fő szerkezeti formát: rendezett vagy globuláris, „molten globule” (olvadt gombóc) és „random coil” (véletlen elrendeződésű lánc) szerkezetet vehetnek fel. Funkciójuk a három termodinamikai állapotból, illetve azok közötti átmenetből egyaránt eredhet és a fehérje natív állapota bármelyik lehet ezek közül [Dunker, et al., 2001] (1. ábra).



1. ábra: A „fehérje szentháromság” modell. Az ábra Dunker nyomán készült [Dunker, 2001].

A „random coil”-szerű fehérjékből (csaknem) teljesen hiányoznak a stabil másodlagos szerkezeti elemek, ezzel szemben a „molten globule” állapotot natívszerű másodlagos szerkezettel (β -redős lemezek) és fluktuáló harmadlagos szerkezettel lehet jellemezni, amely viszonylag kompakt. A „molten globule” állapotú fehérjék nagy érzékenységgel kötődnek specifikus hidrofób fluoreszcens próbákhoz, mint pl. a 8-anilino-1-naftalin-szulfonsavhoz (ANS); hidrodinamikai sugaruk ~10-20%-kal nagyobb, mint a natív globuláris fehérjéé [Uversky, 2002].

Rendezetlen fehérjék szerepe a neurodegenerációs betegségekben

Neurodegenerációs betegségek gyűjtőnévvel a központi idegrendszert sújtó, az idegsejtek (neuronok) intenzív, regionális és többnyire szelektív pusztulásával járó kórképeket illetjük. Klinikai szempontból igen változatos, sokféle tünettel jellemezhető betegség tartozik ide, melyek közös vonása a neuronokra toxikus, patológiás fehérje aggregátumok megjelenése. Mivel az aggregáció minden esetben bizonyos fehérjék rendezetlen konformációjával hozható összefüggésbe, konformációs betegségeknek is nevezik ezeket a rendellenességeket.

A társadalom előregedésével a konformációs betegségek elterjedése súlyos egészségügyi, társadalmi és gazdasági problémát okoz. Ezen betegségek kialakulása

többlépcsős folyamat, melyet aberráns homológ és/vagy heterológ fehérjeasszociációk indukálnak [Ovadi, et al., 2005]. A betegségek 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 zárványtestek kialakulásában döntő szerepet játszó, ma már klasszikus biomarkernek tekinthető pl. az alfa-szinuklein (Parkinson-kór, multiszipisztémás atrófia) és a béta-amiloid (Alzheimer-kór).

Alfa-szinuklein

Az alfa-szinuklein a szinuklein fehérjecsalád tagja. Az agyban nagy mennyiségben fordul elő, 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].

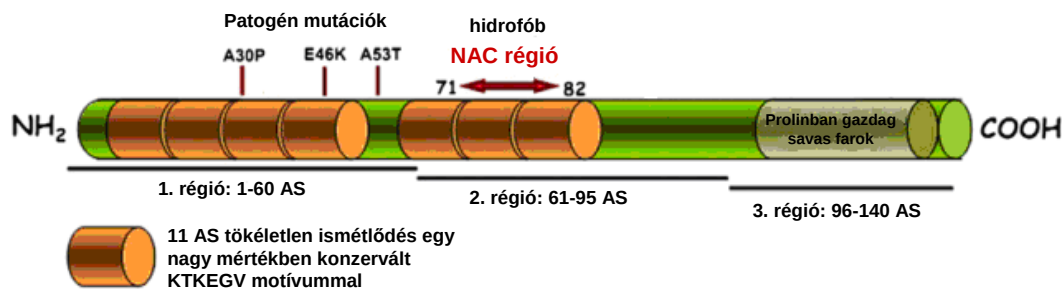
Kisméretű, az SNCA gén által kódolt fehérje, amely patológiás esetben az ún. szinukleinopátiák összefoglaló néven nevezett neurodegeneratív betegségek résztvevője. Ilyen betegségek a Parkinson-kór, a diffúz Lewy-testes betegség és a multiszipisztémás atrófia. Ezen kórképek esetén alfa-szinuklein tartalmú, szálas szerkezetű aggregátumok jelennek meg a különböző neuron- és glia sejtek citoplazmájában, melyek fontos szerepet játszanak a betegségek

patomechanizmusában. Bár előfordulnak olyan genetikailag öröklődő kóresetek, melyek az SNCA gén mutációira, illetve multiplikációjára vezethetők vissza, azonban a szinukleopátiák sporadikus formáira jellemző alfa-szinuklein aggregátumok kialakulására a mai napig nincs magyarázat. Mivel a rendellenességek mindegyikében lassú, halálos és az orvostudomány jelen állása szerint gyógyíthatatlan folyamatról van szó, alapvető fontosságú a betegségek hátterében álló patológias 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: 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] (2. 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

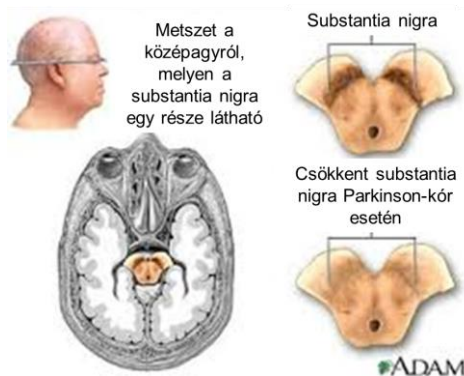


2. ábra: Az alfa-szinuklein szerkezete [Bellucci, et al., 2012] nyomán.

Parkinson-kór

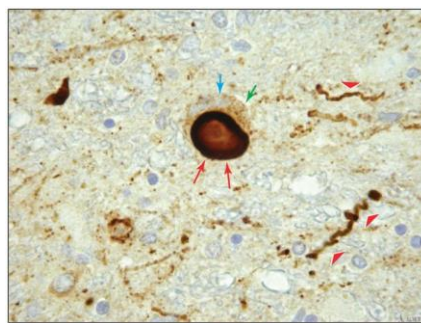
A konformációs betegségek egyik legismertebb és leggyakrabban előforduló típusa (az Alzheimer- és a Huntington-kór mellett), a Parkinson-kór, hozzávetőleg 6 millió embert érint világszerte. A betegség három fő tünettől jellemezhető, melyek a motoros funkciókat érintik: nyugalmi remegés (tremor), izommerevség (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 (3. ábra) dopaminerg idegsejtjei, amelyek a testmozgást, a testtartást és az egyensúlyozást szabályozzák, ezáltal csökken az ingerületátvivő anyag, a dopamin termelődése.



3. 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 (4. ábra) [Spillantini, et al., 1998]. A fehérje lerakódása ezért a Parkinson-kór kialakulásának központi patológiás tényezőjeként tekinthető, mely az idegsejtek pusztulásához vezet.



4. 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 (L-DOPA-nak), 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 szövődményekkel. A mély agyi stimuláció lényege, hogy az agy két oldalán (a megfelelő területre) egy-egy elektródot ültetnek be a koponyán ejtett kisebb fúrt lyukon keresztül, és ezek a fej és a nyak bőre alatt kapcsolódnak a mellkas/has bőre alá vagy a mellizmok közé elhelyezett impulzus generátorhoz (pacemakerhez). A hatást folyamatos, magas frekvenciájú elektromos impulzus váltja ki, melyet a generátor szolgáltat. A mély agyi stimuláció a gyógyszeres kezeléshez hasonlóan segíti az egyenletes mozgásteljesítmény elérését, hatására csökken a meglassult állapotban töltött ébrenléti órák száma, csökkennek az akaratlan túlmozgások, tehát segít az életminőség javításában. A műtét előnye, hogy csökkenti a szedett gyógyszerek mennyiségét, valamint a pacemaker éjszaka is működik, így javul az alvás minősége is, azonban a műtéti beavatkozás sem képes gyógyítani a Parkinson-kórt [Tamás, G., et al.]. Összességében elmondható, hogy bár

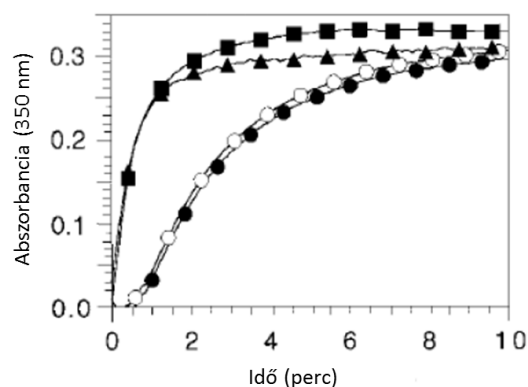
tüneti kezeléssel, fizioterápiával a beteg állapota javítható, az idegsejtek pusztulásának megakadályozására sajnos a mai ismereteink szerint nincs mód.

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 fényelnyelést 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] (5. ábra).



5. 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] (6. ábra). Később az egérben 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..SRPKPANKTPPKSPGEPAKDIAAKRLSLEAEGAGEGAAAAAGAELSALEEAFKFA
hump25	1	MADKAKPAKAAETPPKSPGDPKDRRAAKRLSLESEGAGEG.AAASPELSALEEAFKFA
bovp25	59	VHGDARASGREMHGKNWSKLCRDQVIDGRSVTVTDVDIVFSKIKGKSCRTITFEQFKEA
hump25	60	VHGDARATGREMHGKNWSKLCRDQVIDGRNVTVDVDIVFSKIKGKSCRTITFEQFKEA
bovp25	119	LEELAKKRFKDKSAEEAVREVHKLIEGKAPIISGVTKAISSPTVSRLTDTSKFTGSHKER
hump25	120	LEELAKKRFKDKSSEEAVERVHRLIEGKAPIISGVTKAISSPTVSRLTDTSKFTGSHKER
bovp25	179	FDPSSGRGKGRAGRVDLVDESGYVPGYKHAGTYDOKVOGGK*
hump25	180	FDPSSGKGKGRAGRVDLVDESGYVSGYKHAGTYDOKVOGGK*

6. 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 jósolható. A csoport bizonyította az előbb említett elméleti, illetve számos fizikokémiai, 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 rendezetlen fehérjék fiziológiás és patológias funkcióit gyakran oligomerizációs állapotuk és kölcsönhatásaik határozzák meg. A TPPP/p25 hajlamos az oligomerizációra: mind *in vitro*, mind *in vivo* rendszerekben a fehérje elsősorban dimerizál (bizonyos körülmények között nagyobb molekulatömegű oligomer formák is megjelennek), mely formát diszulfid kötések stabilizálnak [Oláh, et al., 2012]. A TPPP/p25 szekvenciája három ciszteint tartalmaz, melyek intra- és intermolekuláris diszulfid-hidak kialakításában vehetnek részt. Ezek a kötések tiol redukáló ágens, 2-merkaptotanol vagy ditioeritrol (DTE) hatására felszakadnak, az oligomer formák monomerré esnek szét, ami SDS (nátrium-dodecil-szulfát) tartalmú poliakrilamid gélen nyomon követhető. Analitikai gél-szűrés (méretkizárásos kromatográfia) alapján a humán rekombináns TPPP/p25 jellemzően monomer és dimer formában van jelen, amelyek eltérő szerkezettel és funkcióval jellemezhetőek [Zotter, et al., 2011b]. A monomer és a dimer forma látszólagos molekulatömegének aránya nem felel meg egy globuláris fehérje dimerizációjakor várható értéknek (1:2), ahol a

monomer és a dimer azonos konformációjú, ami arra utal, hogy a dimerizációt szerkezeti átrendeződés (folding) kíséri [Oláh, et al., 2012]. A dimer forma tubulinpolimerizáló képessége kiemelkedő, ami arra utal, hogy in vitro a dimer TPPP/p25 a funkcionálisan aktív forma [Oláh, et al., 2012].

A TPPP/p25 fiziológiás célpontja: a mikrotubuláris rendszer

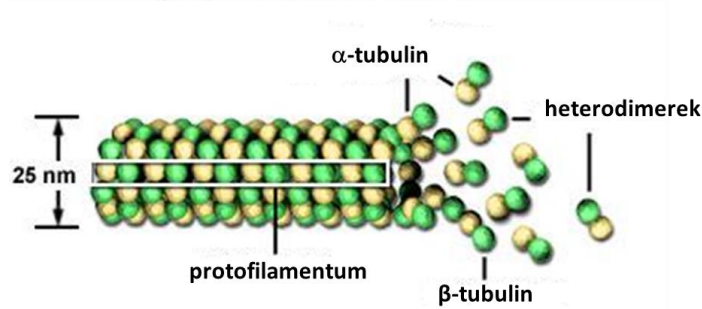
Az eukarióta sejtek és a szubcelluláris struktúrák mozgását, valamint a sejtek alakját egy komplex, citoplazmatikus fehérjehálózat határozza meg, amit citoszkeletonnak nevezünk. Az intracelluláris vázon belül 3 jellegzetes filament rendszert különböztetünk meg:

1. a 8 nm vastag aktin- vagy mikrofilamentumokat,
2. a 25 nm vastag mikrotubulusokat,
3. a 10 nm vastag intermedier filamentumokat.

Ezeknek részben átfedő, részben jellegzetes, egyedi funkciójuk van. Az intermedier filamentumok szerepe a mechanikai szilárdság biztosítása. Az aktinváz az alak-, és helyváltoztató mozgások kivitelezéséért, valamint a sejt alakjának fenntartásáért felelős. A mikrotubulusok tartják fenn a sejt belső rendezettségét, a sejtmag és az organellek jellegzetes elhelyezkedését. Ők teszik lehetővé a hozzájuk kapcsolódó motorfehérjék segítségével az egyes sejtszervek közötti szállítást, a kromoszómák szegregációját a sejtosztódás során, azaz általában a belső átrendeződést eredményező mozgásokat. A mikrotubulusok fő alkotóelemei az osztódási orsónak és a sejt mozgásszerveinek, a csillónak, valamint az ostoroknak.

A mikrotubulusok néhány mikron hosszúságú, 25 nm átmérőjű, üreges, csőszerű képletek, melyek falait egy globuláris fehérje dimer, az $\alpha\beta$ -tubulin alkotja [Wade, 2009]. Az α - és β -tubulin monomerek szekvenciában egymáshoz nagyon közel álló, hasonló struktúrájú, egyaránt körülbelül 55 kDa molekulatömegű polipeptidek, melyek polimerizáció során mikrotubulussá szerveződnek: fej-farok orientációban kapcsolódnak egymáshoz, kialakítva ezzel a fonálszerű protofilamentumokat. A mikrotubulus hengerszerű szerkezetét tipikusan 13 protofilamentum laterális egymáshoz illeszkedése biztosítja (7. ábra).

A mikrotubulus szerkezete



7. ábra: A mikrotubulus szerkezete

A kép forrása: <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/microtubules/microtubules.html> (2014.11.15.).

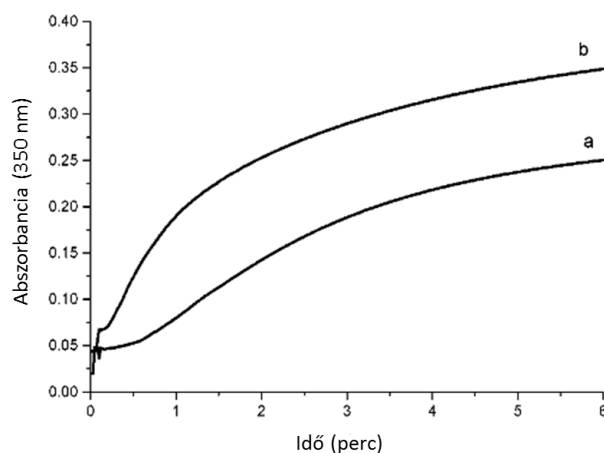
Polimerizáció során a csővégekre guanozin-trifoszfát (GTP) tartalmú heterodimerek épülnek be. Mind az α -, mind a β -tubulin képes egy-egy GTP molekulát megkötni, azonban a GTP csak a β -tubulinon hidrolizál guanozin-difoszfáttá (GDP-vé) és foszfáttá beépüléskor, az α -tubulinhoz kötött GTP stabil. A β -tubulin GTP-áz aktivitása azt eredményezi, hogy a csővek falában mindig GDP-tartalmú β -tubulin van. A beépüléskor lezajló hidrolízis csökkenti a tubulin dimerek közti kötés erősségét, így az disszociációra hajlamossá válik. Disszociáció után újabb GTP-kötött tubulin dimer képes beépülni a láncvégen. Ezt nevezik a mikrotubulusok dinamikus instabilitásának, amely során a polimereket felépítő GTP-t és GDP-t kötött dimerek állandóan cserélődnek, miközben a sejten belül az összpólimer (mikrotubulus) mennyisége változatlan [Galjart, 2010; Mitchison and Kirschner, 1984].

A mikrotubulus növekedési sebessége, azaz a tubulin heterodimerek mikrotubulushoz történő asszociációjának, illetve disszociációjának sebessége az oldat szabad tubulin (dimer) koncentrációjától függ in vitro. Ha ez meghaladja a polimerizációhoz szükséges kritikus koncentrációt, akkor a jelen lévő heterodimerek a cső végéhez kapcsolódnak, megnyújtva azt. Ellenkező esetben depolimerizáció történik, a heterodimerek disszociációja következtében a cső rövidülhet. Különböző természetes eredetű kémiai anyagok, kis molekulák képesek a tubulin polimerizációját befolyásolni, pl. ilyen, a mikrotubulus polimerizációját elősegítő anyag a taxol, amely egy, a tiszafa kérgéből kivonható alkaloid. A taxol úgy segíti

elő a tubulin polimerizációját, hogy csökkenti a kritikus koncentrációt és stabilizálja a keletkező mikrotubulusokat [Kumar, 1981].

A mikrotubulusok sokrétű feladatának ellátását és összehangolását a hozzájuk kapcsolódó fehérjék, azon belül is elsősorban a mikrotubulushoz asszociált fehérjék (MAP-ek) teszik lehetővé, melyek a következő csoportokra oszthatóak: strukturális MAP-ek (a mikrotubulus térbeli elrendeződésében és stabilitásának szabályozásában vesznek részt, pl. MAP1, MAP2, tau), motor MAP-ek (vezikuláris transzport megvalósításában fontosak, pl. kinezinek, dineinek), valamint a mikrotubulushoz lazán, dinamikusan kötődő citoszolikus fehérjék (ilyenek a glikolízisben vagy a transzlációban résztvevő bizonyos enzimek) [Morejohn, 1994].

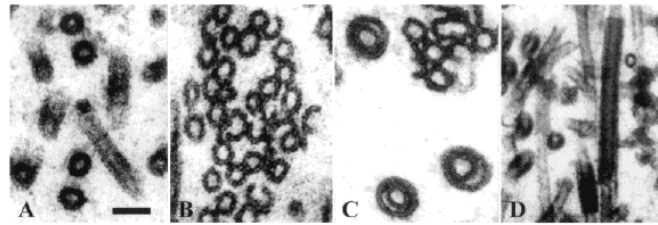
Ilyen citoszolikus MAP-szerű fehérjeként („MAP like protein”) azonosították a TPPP/p25-öt is, melynek fő célpontja *in vitro* és élő sejtben a tubulin/mikrotubuláris rendszer [Hlavanda, et al., 2002; Tirián, et al., 2003; Ovadi, et al., 2005]. Az izolált TPPP/p25 fehérje már szubsztóchiometrikus koncentrációban elősegíti a tubulin polimerizációját, mely folyamat turbiditásméréssel követhető [Hlavanda, et al., 2002]. A polimerizáció más lefutást mutat, ha TPPP/p25 és más, ha taxol hozzáadásával indukáljuk (8. ábra).



8. ábra: Tubulinpolimerizáció taxollal (a), illetve TPPP/p25-tel (b) indukálva [Hlavanda, et al., 2002].

Elektronmikroszkópos vizsgálatok azt mutatták, hogy a TPPP/p25 képes a tubulin intakt mikrotubulusokká való polimerizációját indukálni *in vitro*. Ugyanakkor

a taxollal ellentétben aberráns, kettős falú mikrotubulusokat is képez (9. ábra C, D). Továbbá a taxollal stabilizált mikrotubulus szálakat kötegekbe rendezi (9. ábra B) [Hlavanda, et al., 2002].

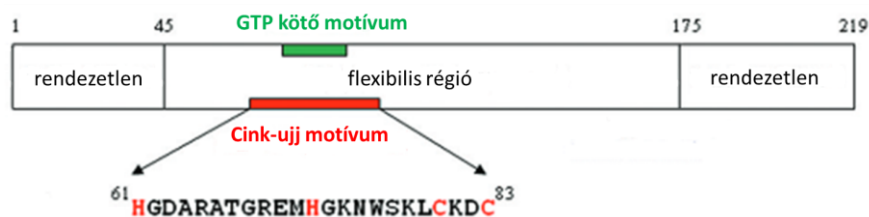


9. ábra: Elektronmikroszkópos felvételek: (A) A taxollal stabilizált, TPPP/p25 mentes laza összeszerelésű mikrotubulusok ; (B) a taxollal stabilizált mikrotubulushoz adott TPPP/p25 kötegelő a mikrotubulusokat ; (C és D) a tubulinhoz adott TPPP/p25 hatására aberráns, kettős falú mikrotubulusok alakulnak ki (különböző irányú metszetek) [Hlavanda, et al., 2002].

A Sejtarchitektúra Kutatócsoportban a TPPP/p25 működését az in vitro kísérletekkel párhuzamosan in vivo rendszerekben (eukarióta, humán sejtvonalakban) is vizsgálják. Élő sejtés kísérletekben megfigyelték, hogy a TPPP/p25 a mikrotubuláris hálózat mentén helyezkedik el, továbbá a fehérje mikrotubulusokat kötegelő aktivitása révén stabilizálja, ellenállóvá teszi a mikrotubulusokat depolimerizációs hatásokkal szemben. Ugyanakkor nem gátolja a mikrotubuláris rendszer átrendeződését [Lehotzky, et al., 2004]. Fluoreszcencia-kioltásos („fluorescence recovery after photobleaching”, FRAP) kísérletekkel bizonyították, hogy a TPPP/p25 és a mikrotubuláris rendszer kapcsolata dinamikus [Lehotzky, et al., 2004].

A TPPP/p25 kölcsönhatásba lép a tubulin deacetiláz enzimmel („hiszton deacetiláz 6”, 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 TPPP/p25 szekvencia vizsgálata során jól ismert ligand kötő motívumokat keresve, felismerték, hogy a fehérje középső flexibilis régióján belül egymással átfedő cink-ujj motívum és GTP konszenzus szekvencia található [Zotter, et al., 2011b] (10. ábra).

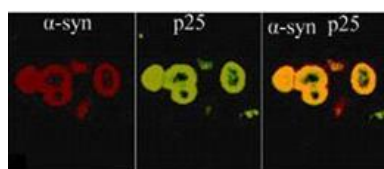


10.ábra: A TPPP/p25 szerkezete és kötő motívumai

A munkacsoportban kapott eredmények rámutattak arra is, hogy a GTP elsődlegesen a dimer TPPP/p25-höz kötődik, következésképpen eltolja a különböző fehérje formák közötti egyensúlyt a dimerizáció irányába; a fehérje továbbá Mg^{2+} -függő GTPáz aktivitást is mutat, azaz hidrolizálja a nukleotidot [Zotter, et al., 2011a; Oláh, et al., 2012].

A TPPP/p25 patológiás funkciója, szerepe a neurodegenerációban

A TPPP/p25 jelenlétét megvizsgálták különböző neurodegeneratív betegségek (Alzheimer-kór, Parkinson-kór, Huntington-kór, multiszipstémás atrofia, diffúz Lewy-testes betegség) esetén. In vivo immunhisztokémiai és konfokális mikroszkópos vizsgálatok azt mutatták, hogy szinukleopátiák (Parkinson-kór, diffúz Lewy-testes betegség és multiszipstémás atrofia) esetén a zárványtestekben az alfa-szinukleinnel együtt a TPPP/p25 is felhalmozódik mind a neuronokban, mind az oligodendrocitákban, annak ellenére, hogy normál agyszövetben az alfa-szinuklein a neuronokban, míg a TPPP/p25 az oligodendrocitákban fejeződik ki [Kovacs, et al., 2007] (11. ábra). A TPPP/p25 és az alfa-szinuklein ko-lokalizációja humán agyban jellemző tünete a Parkinson-kórnak és más szinukleinopátiáknak.



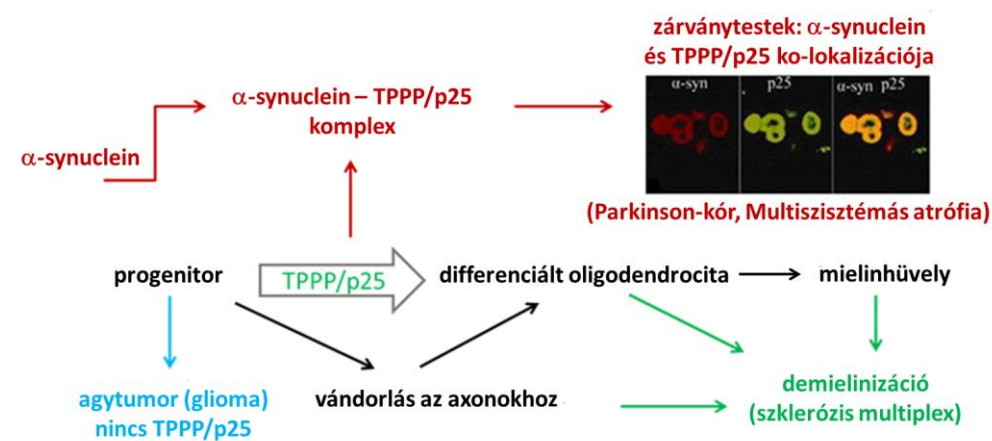
11. ábra: A TPPP/p25 lokalizációja patológiás agyszöveti mintákban (immunhisztokémia): A TPPP/p25 kolokalizációja az α -szinukleinnel a Parkinson-kór esetén kialakuló Lewy-zárványtestekben. [Kovacs, et al., 2004]

Huntington-kór esetén az extracelluláris struktúrákban a huntingtin fehérjével együttesen jelenik meg a TPPP/p25 [Kovacs, et al., 2004]. Kutatások igazolták a TPPP/p25 kölcsönhatását és agyi ko-lokalizációját béta-amiloiddal is, ami kevert típusú neurodegenerációs betegségek kialakulására és létezésére utalhat [Oláh, et al., 2011]. Ezzel ellentétben a TPPP/p25 nem mutat kolokalizációt a hiperfoszforilált tau fehérjével a tauopátiák családjába tartozó Alzheimer-kór esetén kialakuló neurofibrilláris kötegekben [Kovacs, et al., 2004].

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 [Tökési, 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 myelinhüvelyt 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.



12. ábra: A TPPP/p25 fiziológiás és patológiai funkciói

A TPPP/p25 nem-fiziológiás kifejeződése különböző központi idegrendszeri betegségek kialakulásához vezet, mint azt a 12. 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 patológiai 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 patológiás markere, valamint biomarkere bizonyos központi idegrendszeri megbetegedéseknek. Ezen betegségek keletkezési mechanizmusának megismerése napjainkban is intenzív kutatás tárgyát képezi. Ezért is kiemelt jelentőségű feladat a fehérje szerkezetének, illetve a funkcionális sajátosságainak jellemzése, hiszen ez által közelebb juthatunk a fiziológiás és patológiás folyamatokban betöltött szerepének megértéséhez, ami végül segítséget nyújthat a betegségek terápiájában használható gyógyszermolekulák fejlesztéséhez. A munkacsoport kutatásaiba 2012-ben kapcsolódtam be, azzal a céllal, hogy eleinte reprodukálva a csoport korábbi kísérleteit számos metodikát elsajátítsak, valamint később aktív részese lehessenek új kutatási eredményeknek.

Konkrét céljaim a következők voltak:

- Humán rekombináns fehérjék (teljes és mutáns TPPP/p25, valamint alfa-szinuklein) termeltetése és izolálása.
- A TPPP/p25 eredendően rendezetlen fehérje, melynek rendezetlen N- és C-terminálisai egy flexibilis régiót fognak közre. Céлом a fehérje központi és terminális szegmenseinek szerkezeti jellemzése.
- A TPPP/p25 szekvenciavizsgálata azt mutatta, hogy a fehérje cink-ujj motívumot tartalmaz a flexibilis régió belül, így célul tűztem ki a cink ion szerkezeti és funkcionális hatásának vizsgálatát a fehérjére.
- 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 jellemzése kulcsfontosságú feladat, így céлом ezen fehérjékben a kölcsönhatásért 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 átoltás 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 sejtszuszpenziót 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 (PMSF), 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 nikkel 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 porusátmérője 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 restriktációs 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 sejtszuszpenziót 4 °C-on 2500 g-vel 15 percig centrifugáltam, majd leöntöttem a felülúszót, így izoláltam az alfa-szinukleint expresszáló sejteket. A sejteket tartalmazó csapadékot felszuszpendáltam 20 mM Tris (trisz-(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 μ M 4-(2-aminoetil)-benzénszulfonil-fluorid-hidrokloridot (AEBSF-et), 1 mM benzamidint, 1 μ g/ml pepstatint és 1 μ g/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 fehérjét 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 kikötödni a dietil-aminoetil-cellulóz gyantára. A nem kötődött fehérjét 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 küvetában

c = a fehérje koncentrációja.

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

fehérje	$\varepsilon^{0,1\%}_{1\text{cm}, 280\text{ nm}}$
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
tripszin	1,44
kimotripszin	1,44
tripszin inhibitor	1,00

A koncentráció értékeket legalább 3 mérés átlagából számítottam ki.

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 fajtával 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% glicerín). A gélre PAGEBlue (Fermentas) festékekkel festettem meg. Redukálás esetén a mintafestékhez 10% 2-merkaptoetanolt vagy DTE-t tettem. A fehérjék háromdimenziós szerkezetét és a polipeptid alegységek kapcsolatát gyakran diszulfid hidak tartják fenn (pl. a TPPP/p25 esetén is). A redukáló körülmények között végzett SDS-PAGE analízis célja, hogy a diszulfid kötések redukálásával megbontsa ezt a szerkezetet.

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 poláros 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 fénynél 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 peptidek 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 küvettákban, 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, sávszélesség 1 nm. Minden spektrum legalább 3 mérés átlaga. A standard hiba (SEM) $\pm 10\%$ ($n=3-5$). A spektrumok kiértékeléséhez a Spectra Manager Spectra Analysis 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 küvetta 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 a fehérje feltekeredés 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 hidofil felszín alá van temetve, ezért az ANS számára kevésbé elérhető. A „molten globule” állapotban a fehérje már csak fluktuáló harmadlagos szerkezettel jellemezhető, elveszíti hidofil 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 különbséget tehetünk az egyes szerkezeti állapotok között [Leal and Gomes, 2007; Semisotnov, et al., 1991].

A fluoreszcencia spektroszkópia vizsgálatok FluoroMax-3 spektrofluoriméteren (Jobin Yvon Horiba, Longjumeau, France) 1 cm-es optikai úthosszú termosztálható küvetában, 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7,0), illetve 10 mM Tris (pH 7,2) pufferben 25 °C-on történtek. A vizsgált minta fluoreszcencia jelét minden esetben korrigáltam a puffer jelével. Az adatok kiértékeléséhez a DataMax szoftvert használtam.

Az ANS-oldat koncentrációját spektrofotométeren, 350 nm-en az abszorbancia alapján határoztam meg (ϵ_{350} : 4954 M⁻¹cm⁻¹), 10 mM-os ANS törzsoldattal dolgoztam. 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 μ M, a fehérje koncentrációja 2,5 μ M vagy fémionokkal végzett mérés esetén 5 μ M volt. Cink, Ca²⁺, illetve Al³⁺

jelenlétében végezve a méréseket, a fémionok koncentrációja 20 μM volt. A standard hiba (SEM) $\pm 10\%$ (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 MgCl_2 , 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) $\pm 10\%$ (n=3-5). A spektrum legalább 3 mérés átlaga.

Limitált proteolízis

A TPPP/p25 szerkezeti integritásában bekövetkező változások kimutatására a natív és a dupla csonkolt TPPP/p25-öt kimotripszinnel emésztettem limitált proteolízis során 0, 10, 20, 40 percig. 1 mg/ml TPPP/p25 formákat 0,01 mg/ml kimotripszinnel emésztettem, 50 mM Tris, 10 mM CaCl_2 pufferben, pH 8,0 szobahőmérsékleten. A kontroll mintában (0 perces) proteáz nem volt. A proteolízist 1 mM AEBSF-el állítottam le. Az SDS-PAGE kétrétegű tricines gélen futott, Coomassie Brilliant Blue R-250 festéssel, 2-merkaptóetanol és DTE biztosította redukáló közegben.

Az alfa-szinuklein TPPP/p25-öt kötő régiójának meghatározásához 2 mg/ml humán rekombináns alfa-szinukleint emésztettem tripszinnel ill. kimotripszinnel 40

mM pH 7,53 foszfát pufferben. A tripszin végkoncentrációja 2,5 µg/ml, a kimotriaebfspsziné 5 µg/ml volt. Az emésztést szobahőmérsékleten végeztem 60 percig, majd a tripszines reakciót 1 mM benzamidin, 0,01 mg/ml leupeptin, 15 µg/ml tripszin inhibitor és 1 mM AEBSF segítségével állítottam le, a kimotripszines emésztést pedig 2 mM PMSF-fel. A mintákat 2 rétegű tricines gélen futtattam, a mintafesték 1/10 rész 2-merkaptoetanolt tartalmazott.

ELISA

Az ELISA („Enzyme-linked immunosorbent assay”) 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 az (emésztett vagy natív) alfa-szinukleinnel, illetve a tubulinnal való kölcsönhatásának 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 fehérjéket 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 szérumból (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 (natív vagy emésztett)/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 (OPD) 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 H_2SO_4 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 $\mu\text{g/ml}$ -es TPPP/p25 oldattal vagy szintén 5 $\mu\text{g/ml}$ 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.

Pepscan analízis

Ezt a módszert eredetileg ellenanyagok epitóp meghatározására dolgozták ki, és a lényege, hogy polietilén „tűhegyek”-re kovalensen kötve egymással átfedő, kb. 10 tagú peptideket szintetizálnak úgy, hogy a kérdéses fehérje (antigén) teljes szekvenciáját lefedjék vele. Amelyik peptidszakasz az adott ellenanyag epitópja, ott kölcsönhat az IgG a tűhegyen lévő peptiddel, tehát a tűhegyhez kikötődik, és ez megfelelő másodlagos ellenanyaggal kimutatható [Geysen, et al., 1984].

Az általam végzett kísérlet célja az alfa-szinuklein TPPP/p25-kötő szegmensének azonosítása volt. A rendelkezésemre álló tűhegyekre az alfa-szinuklein C-terminálisának megfelelő 10 tagú, egymással 5 aminosavanként átfedő

peptidjeit (121-130, 125-134, 131-140) szintetizálták Dr. Magyar Anna kutatócsoportjában az ELTE-n. A peptidek C-terminálisát kovalensen polietilén tűhegyekhez kötötték, míg az N-terminálisukat acetilezték. (A teljes alfa-szinuklein szekvenciának megfelelő Pepscan jelenleg nem áll a Sejtarchitektúra csoport rendelkezésére.)

A kísérleteket 96 lyukú ELISA lemezekon végeztem. A tűhegyeket 1 éjszakára blokkoló pufferbe, azaz 20 mg/ml BSA-t tartalmazó tPBS oldatba merítettem, és 4 °C-on inkubáltam. Ezután az alfa-szinuklein felszínén lévő TPPP/p25 kötőhely lokalizációjának vizsgálatához a tűhegyeket 1,5 µM TPPP/p25-öt tartalmazó blokkoló pufferrel inkubáltam (1 óra, szobahőmérséklet), és 3x10 perc tPBS mosás után poliklonális, patkányban termeltetett anti-TPPP/p25 (1:5000) ellenanyaggal, ezt követően pedig peroxidázzal konjugált anti-patkány (1:5000) ellenanyaggal inkubáltam a tűhegyeket. Ismételt 3x10 perces tPBS mosás után előhívtam a lemezt, az ELISA módszernél ismertetett módon. Egy peptid reakcióját akkor tekintettem pozitívnak, ha a mért abszorbancia magasabb volt a limit értéknél, ami a lemez átlagos abszorbanciájának és az átlagos szórás kétszeresének összegével egyenlő.

Western Blot (dot-blot)

A Western blot egy adott fehérje jelenlétének detektálására, a mintából történő azonosítására alkalmas érzékeny módszer.

Az emésztett alfa-szinuklein fragmensek (és kontrollként a natív alfa-szinuklein) kimutatásához dot-blot kísérletet végeztem, ami a Western blot azon változata, amikor a fehérje oldatokat gélen történő méret szerinti elválasztás és membránra átranzferálás helyett közvetlenül a membránra vesszük fel.

3, ill. 1 µg fehérjét tartalmazó oldatot vittem fel az Immobilon P^{SQ} membránra, majd a membránokhoz tPBS-ben oldott zsírszegény tejporral való blokkolás után a megfelelő (poliklonális vagy monoklonális) elsődleges ellenanyagot adtam. Az antigén-antitest kölcsönhatás kialakulását anti-patkány, vagy anti-egér (minden esetben 1:5000 hígításban) peroxidázzal jelzett IgG-vel való inkubálás után

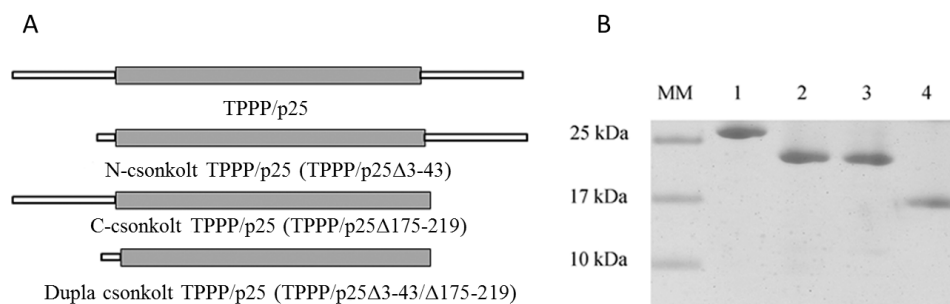
ECL (enhanced chemiluminescence) Western-blot előhívó reagenssel (Amersham)
Kodak X-Omat AR filmen (Sigma) tettem láthatóvá.

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. 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 TPPP/p25 fehérjét használtam. A Sejtarchitektúra Kutatócsoport klónoztta 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 (13. ábra).

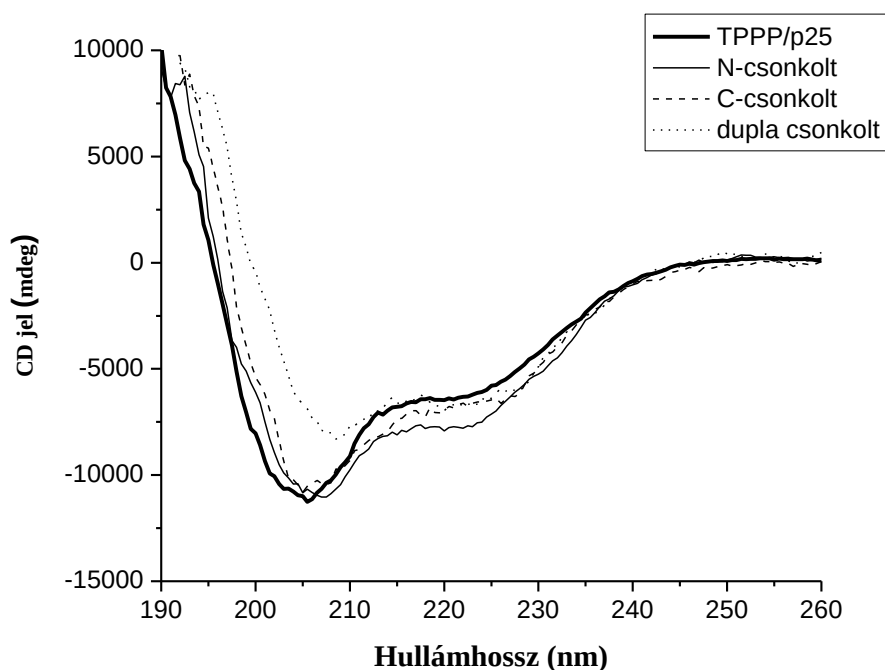


13. ábra: A) A különböző TPPP/p25 formák sémája. B) SDS/PAGE gélen a különböző TPPP/p25 formák: MM=molekulásúly marker, 1=TPPP/p25 (219 aminosav, 23690 g/mol, ~25 kDa), 2=N-csonkolt TPPP/p25 (174 aminosav, 19220 g/mol, ~20 kDa), 3=C-csonkolt TPPP/p25 (175 aminosav, 18970 g/mol, ~20 kDa), 4=dupla csonkolt 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 206-208 nm környékén a rendezetlen komponensre utaló intenzív negatív sáv figyelhető meg, amit 220 nm körül egy negatív váll kísér, 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 (14. ábra). Az N- és C-csonkolt változatok spektrumai nem térnek el jelentősen a vad típusétól, tehát a terminális régiók nagymértékben hozzájárulnak a fehérje rendezetlenségéhez.

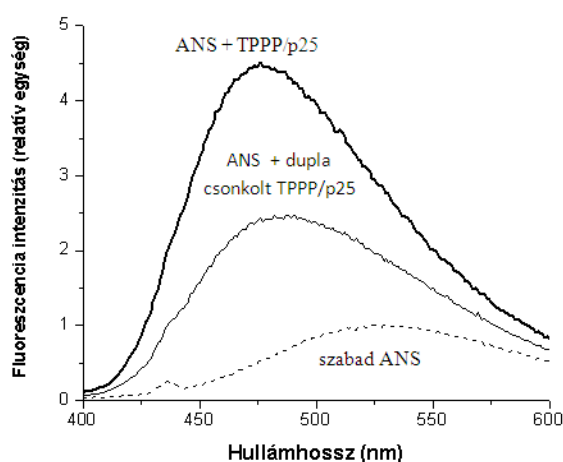


14. ábra: A különböző TPPP/p25 formák szerkezeti jellemzése távoli-UV CD spektroszkópiával. TPPP/p25 (vastag), N-terminális nélküli TPPP/p25 (vékony), C-terminális nélküli TPPP/p25 (szaggatott), dupla csonkolt TPPP/p25 (pontozott). Normalizált CD spektrum.

I/2. ANS fluoreszcencia

Az ANS fluoreszcenciás próba a fehérjék hidrofób régióihoz kötődik, a kötődés „molten globula” állapot esetén sokkal kifejezettebb, mint a globuláris vagy szerkezet nélküli fehérjék esetében, ezáltal a fluoreszcencia intenzitás alapján különbséget tehetünk az egyes szerkezeti állapotok között [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.

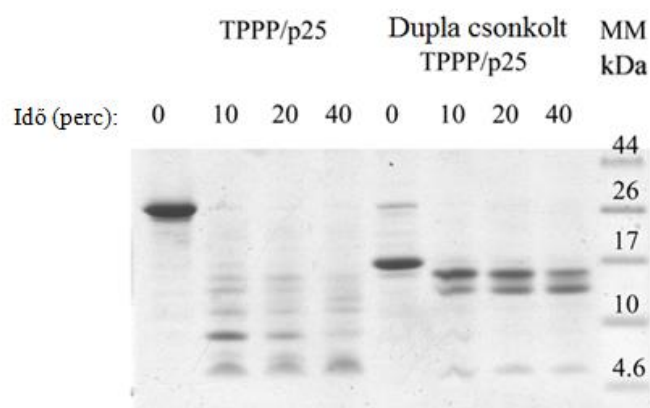
Az 15. ábrán látható, hogy TPPP/p25 jelenlétében az ANS emissziós intenzitása megnő, ami arra utal, hogy a rendezetlen fehérje felszíni régióiban az ANS számára elérhető hidrofób felületek találhatók. Ugyanakkor a fehérje szerkezet nélküli terminális szegmenseinek eltávolítása sokkal kisebb fluoreszcenciaintenzitás 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.



15. ábra: 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.

I/3. Limitált proteolízis

A limitált proteolízis egy jól ismert, érzékeny módszer a fehérjék szerkezeti integritásában bekövetkező változások kimutatására. Ezt az eljárást alkalmaztam: a TPPP/p25-öt és annak dupla csonkolt formáját emésztettem kimotripszinnel, majd az emésztés hatékonyságát SDS-PAGE segítségével analizáltam (16. ábra). A megfelelő proteáz kiválasztása előkísérleteket igényelt, hiszen a TPPP/p25 „szerkezet-nélkülisége” kizárta bizonyos proteázok alkalmazását, így pl. a tripszinét (miután az gyakorlatilag azonnal megemésztette a bázikus fehérjét, így a peptid-fragmensekre jellemző sávok a gélen nem voltak kimutathatóak).



16. ábra: A TPPP/p25 és a dupla csonkolt TPPP/p25 időfüggő limitált proteolízise
kimotripszinnel 0, 10, 20 és 40 percnél, SDS-PAGE kép.

A nagy specificitású kimotripszin csak az aromás aminosavak (Phe, Tyr, Trp) C-terminálisánál képes hasítani a fehérjéket, így kisebb métekben emészt a TPPP/p25-öt. Ezt az enzimet választottam. Az időfüggő proteolízis eredménye a 16. ábrán látható: míg a TPPP/p25 40 perc alatt teljesen degradálódott, addig a dupla csonkolt TPPP/p25 jelentősen kisebb érzékenységet mutatott a proteázzal szemben; még 40 perc után is két stabil sáv különült el, ami a két fehérje különböző rezisztenciáját mutatja.

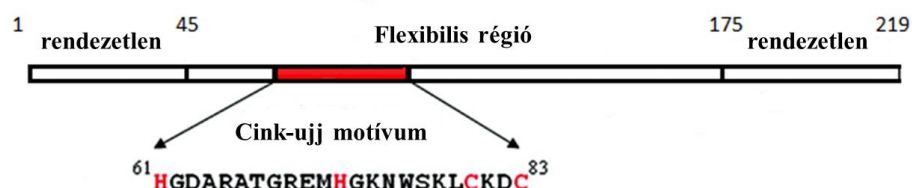
Ezek az adatok a spektroszkópia eredményekkel összhangban arra engednek következtetni, hogy a csonkolás jelentős szerkezeti változást eredményez a flexibilis központi részen, az sokkal kompaktabb, rendezettebb, mint a teljes hosszúságú

fehérje, ami arra utal, hogy a rendezetlen TPPP/p25, annak flexibilis központi szegmense képes bizonyos szerkezet kialakítására.

II. A cink ion hatása a TPPP/p25 rendezetlen struktúrájára

Az eukarióta sejtekre általánosan jellemző a magas (200 μ M körüli) cink koncentráció, ami a cink sokrétű biológiai funkciójára utal [Palmiter and Findley, 1995]. A cinknek esszenciális szerepe van egyes enzimek katalitikus funkciójának ellátásában; emellett stabilizálja, sőt indukálja egyes fehérjék/fehérje alegységek feltekeredését.

Az TPPP/p25 szekvencia vizsgálata azt mutatta, hogy a fehérje középső flexibilis régiójában egy His₂Cys₂-típusú cink-ujj motívum található (17. ábra): His⁶¹(X)10His⁷²(X)7Cys⁸⁰(X)2Cys⁸³.

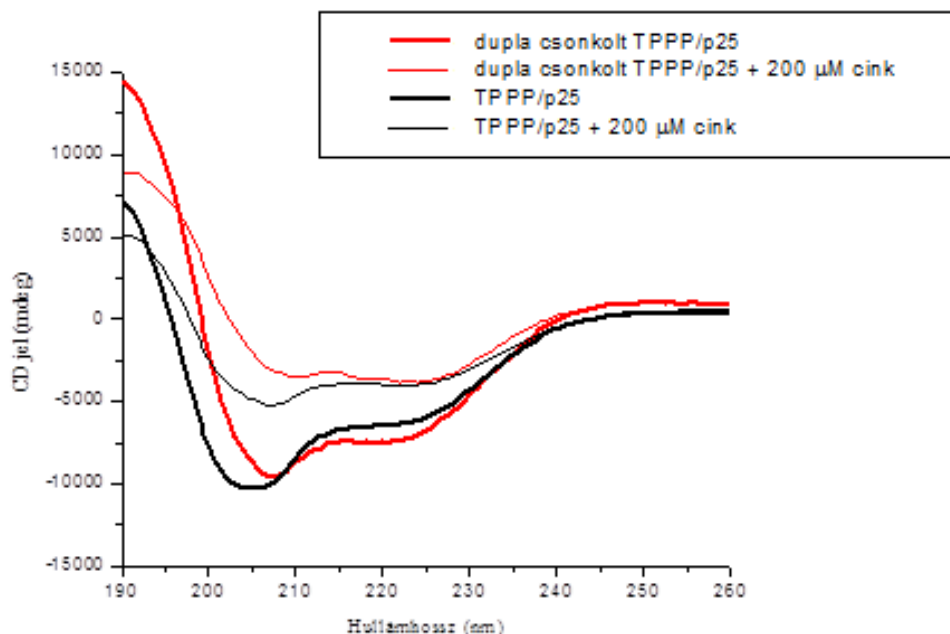


17. ábra: A TPPP/p25 szerkezeti sémája: pirossal kiemelve a cink-ujj motívum.

Tehát a TPPP/p25 megkötheti a cink iont, így ennek igazolására különböző kísérleteket végeztem, illetve reprodukáltam a csoport korábbi kísérleteit.

II/1. CD spektroszkópia

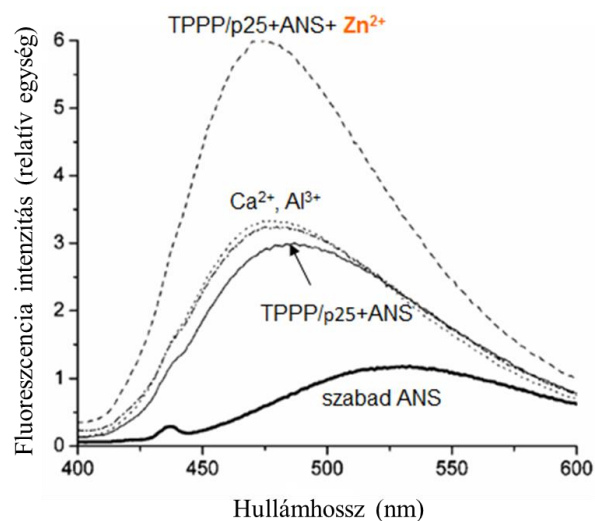
A fehérjék másodlagos szerkezetéről felvilágosítást adó távoli-UV cirkuláris dichroizmus spektroszkópia alapján megállapítható volt, hogy mind a dupla csonkolt TPPP/p25-höz, mind a vad típusú fehérjéhez cinket adva a rendezetlen régióra jellemző 206-208 nm-nél lévő negatív csúcs lecsökkent, a negatív csúcs-pár (206/222 nm) aránya a másodlagos szerkezeti elemek megjelenésére jellemző módon megváltozott. Tehát a cink a TPPP/p25 szerkezetében másodlagos szerkezetváltozást indukál (18. ábra).



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

II/2. ANS fluoreszcencia

ANS fluoreszcencia spektroszkópia segítségével pontosabb képet kaptam a cink indukálta szerkezeti változásról. Már az irodalmi áttekintésben is szerepelt, hogy az ANS a „molten globula” állapothoz a jelentős hidrofób felülete miatt nagy affinitással kötődik, szemben a globuláris, illetve a „random coil” szerű fehérjékkel [Leal and Gomes, 2007; Semisotnov, et al., 1991]. Korábbi eredmény mutatja, hogy TPPP/p25 jelenlétében megnő az ANS emissziós intenzitása (15. ábra). Cink jelenlétében elvégezve a kísérletet további intenzitásnövekedés látható, ami azt mutatja, hogy a cink kötődése során szerkezetváltozás történik, „molten globule”-szerű állapot alakul ki, ezáltal az ANS számára kiterjedtebb hidrofób felület érhető el. A hatás specifikus cinkre nézve, ugyanis azonos Ca²⁺ és Al³⁺ koncentrációk mellett csak minimális intenzitásnövekedés figyelhető meg (19. ábra). A cink az első és máig az egyetlen olyan ligandum, ami a TPPP/p25 szerkezeti átrendeződését, „molten globula” képződését indukálja.



19. ábra: 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.

III. A TPPP/p25 fiziológias funkciója: kölcsönhatása tubulinnal

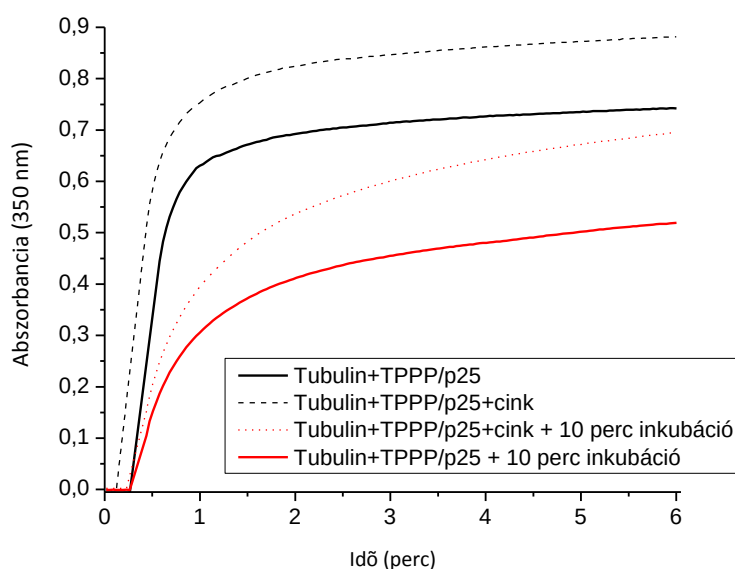
A TPPP/p25 fő kölcsönható partnere a tubulin/mikrotubuláris rendszer, melynek stabilitását és dinamikáját szabályozza [Hlavanda, et al., 2007; Hlavanda, et al., 2002; Tőkési, et al., 2010]. Hogy közelebb kerüljünk e fiziológias funkció minél pontosabb megértéséhez, megvizsgáltam a cink kötődése indukálta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

III/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 küvettában lévő TPPP/p25-höz tubulint adva indítottam el a polimerizációt, majd követtem a 350 nm-nél detektálható fényszórás változását.

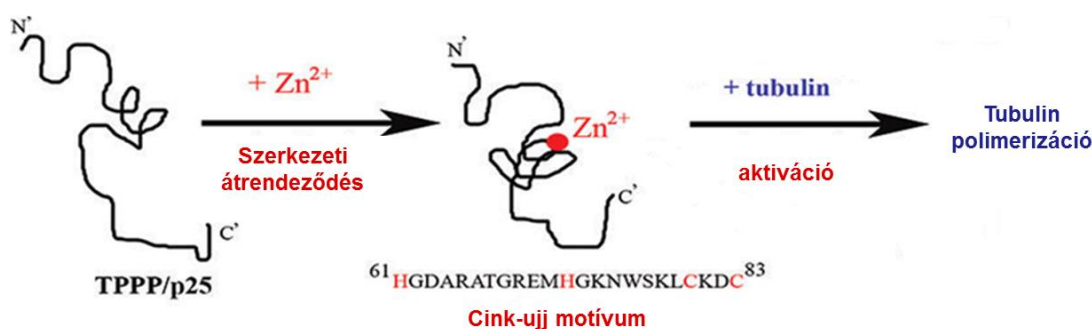


20. ábra: A cink hatása a TPPP/p25 tubulinpolimerizációt indukáló aktivitására

(turbiditásmérés): 7 μ M tubulin 3 μ M TPPP/p25-tel 10 perc indukálással (piros folytonos) vagy azonnal mérve (fekete folytonos), 7 μ M tubulin 3 μ M TPPP/p25-tel 10 percig inkubálva 100 μ M cink jelenlétében (piros pontozott), illetve ugyanez inkubáció nélkül (fekete szaggatott).

Abban az esetben, ha a TPPP/p25-öt inkubáltam a mérés (a tubulin hozzáadása) előtt 10 percig, a polimerizáció mértéke lényegesen lecsökkent (20. ábra). Ennek oka, hogy a redukálószer (DTE-t) tartalmazó polimerizáló pufferben a TPPP/p25 monomer-dimer egyensúlya eltolódik, a fehérje disszociál, és főként monomer formában van jelen. A csoport korábbi eredményei azt mutatták, hogy a TPPP/p25 dimer formájának tubulinpolimerizáló képessége kiemelkedő [Oláh, et al., 2012]. A 20. ábrán látható az inkubálás után és az anélkül mért polimerizációs görbék közötti differencia, amit a TPPP/p25 különböző dimerizációs állapotával lehet magyarázni, azaz a töményebb, még nem (teljesen) disszociált forma lényegesen aktívabb, mint az azonos koncentrációjú disszociált fehérje.

A cink-kötés funkcionális hatását turbiditás mérésekkel vizsgálva kimutatható, hogy a cink kötődése által indukált szerkezetváltozás növeli a TPPP/p25 tubulinpolimerizációt indukáló képességét. A cink minden esetben elősegíti a polimerizációt, attól függetlenül, hogy a TPPP/p25-cink elegyet inkubáltam-e a polimerizáció indítása, azaz a tubulin hozzáadása előtt. A cink kötődése által indukált szerkezetváltozás tehát szorosan összefügg a TPPP/p25 tubulinpolimerizációt indukáló képességével, azaz a fiziológiás funkciójával (21. ábra).



21. ábra: A cink ion hatása a TPPP/p25 szerkezetére és fiziológiás funkciójára

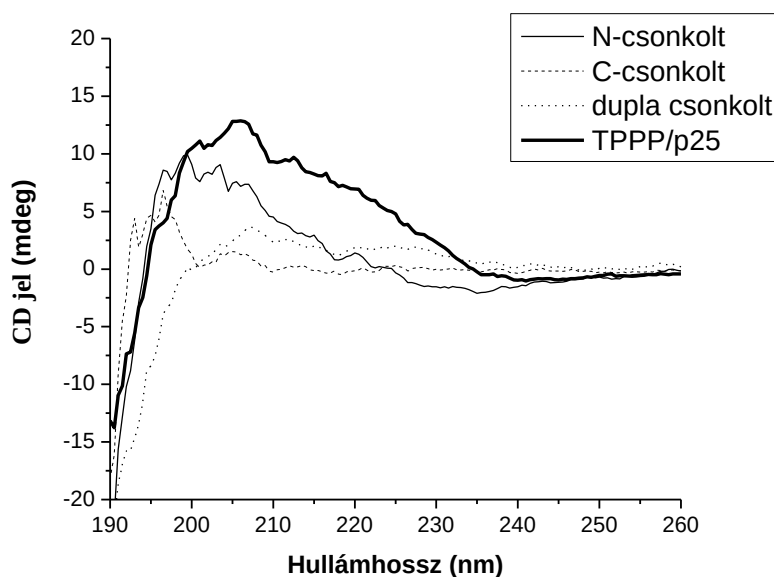
III/2. A TPPP/p25 különböző szegmenseinek szerepe a fiziológiás kölcsönhatásban

A fiziológiás feladat ellátásában a fehérje különböző régiói eltérő mértékben vehetnek részt, ezért megvizsgáltam a TPPP/p25 különböző szegmenseinek szerepét a fehérje tubulinnal való kölcsönhatásában és tubulinpolimerizációt indukáló aktivitásában.

A CD spektroszkópia jól alkalmazható fehérjék közötti kölcsönhatás vizsgálatára, ha a kötődés szerkezetváltozást okoz, ami nyomon követhető a fehérjekomplex spektrumának vizsgálatával: amennyiben a komplex spektruma a két fehérje spektrumának összege, a két fehérje kölcsönhatásakor nem következik be szerkezetváltozás. Ha azonban a komplex jeléből a fehérjék egyedi spektrumainak jelét kivonva eltérést tapasztalunk (differenciaspektrum), akkor a kölcsönhatás szerkezetváltozással jár. A differenciaspektrum jellemző a kölcsönhatásra.

A csoport korábban kimutatta, hogy a TPPP/p25 és a tubulin kölcsönhatását spektrális változás kíséri, a TPPP/p25 a tubulinhoz kötődve differenciajelet ad, tehát a két fehérje kapcsolódását szerkezetváltozás követi [Hlavanda, et al., 2002]. A differenciaspektrumok maximuma 207-208 nm-nél található, ami arra utal, hogy a rendezetlen régióban történik változás. Tekintve, hogy a tubulin jól definiált másodlagos és harmadlagos szerkezettel rendelkezik, valószínű, hogy a szerkezetváltozás a TPPP/p25 rendezetlen régiójában következik be, a tubulin hatására.

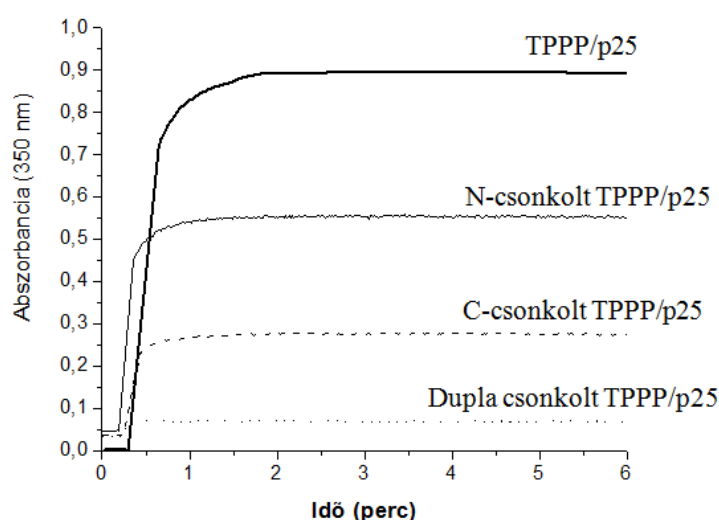
A módosított TPPP/p25 formák tubulinnal való kölcsönhatását vizsgálva látható, hogy mind az N-, mind a C-terminális hiánya különböző mértékben csökkenti a differenciaspektrum nagyságát, és ez a csökkenés a dupla csonkolt TPPP/p25 forma esetében a legszembetűnőbb (22. ábra). Valószínűsíthető tehát, hogy a rendezetlen terminális régiók szerkezetében következik be változás, ebből ered a tubulin-TPPP/p25 kölcsönhatásra jellemző differenciaspektrum.



22. ábra: A különböző TPPP/p25 (4 μ M) formák és a tubulin (1 μ M) differencia CD spektrumai:
 TPPP/p25 (vastag vonal), N-terminális nélküli TPPP/p25 (folytonos vonal), C-terminális nélküli TPPP/p25 (szaggatott vonal), dupla csonkolt TPPP/p25 (pontozott vonal).

A TPPP/p25 különböző formáinak tubulinpolimerizációt indukáló potenciálját turbidimetriás méréssel követtem. Mint a 23. ábra mutatja, 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 kifejthesse 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.

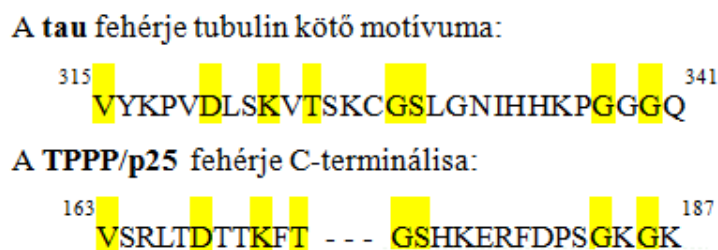


23. ábra: A TPPP/p25 különböző formáinak tubulinpolimerizációt indukáló potenciálja turbiditás méréssel követve. TPPP/p25 (vastag vonal), N-terminális nélküli TPPP/p25 (folytonos vonal), C-terminális nélküli TPPP/p25 (szaggatott vonal), dupla csonkolt TPPP/p25 (pontosított vonal).
A TPPP/p25 formák koncentrációja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

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

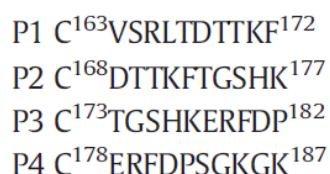
A fiziológias funkció betöltéséhez, azaz a tubulinpolimerizáció elősegítéséhez elengedhetetlenek a terminális régiók, ami azt mutatja, hogy a TPPP/p25 tubulin kötő szegmense valahol a rendezetlen végeken található. A turbiditásmérés eredménye alapján összehasonlítva az N- és C-csonkolt fehérjék tubulinpolimerizációt 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] (24. ábra):



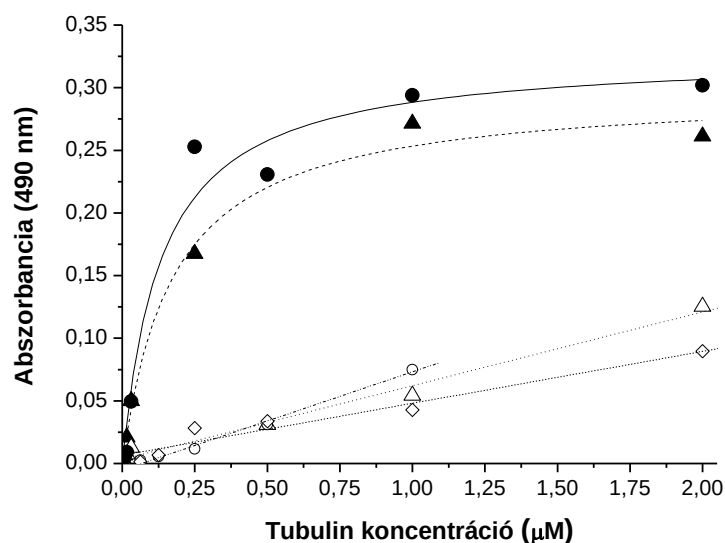
24. ábra: A tau fehérje tubulin kötő motívumának és a TPPP/p25 C-terminálisának összehasonlítása aminosav szekvencia alapján

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 (25. ábra):



25. ábra: A szintetikus P1-P4 peptidek aminosav szekvenciái.

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 (26. ábra).



26. ábra: ELISA kísérlet: tubulin kölcsönhatása TPPP/p25-tel és a P1-P4 peptidekkel. TPPP/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 $^{178}\text{ERFDPSGKGK}^{187}$ motívum az a szakasz, amely kulcsszerepet játszik a TPPP/p25 tubulinnal való kölcsönhatásában.

IV. 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 heterokomplex kialakításában kulcs szerepet játszó TPPP/p25, illetve alfa-szinuklein szegmensek 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 termeltem és izoláltam az anyagok és módszerekben leírtak szerint.

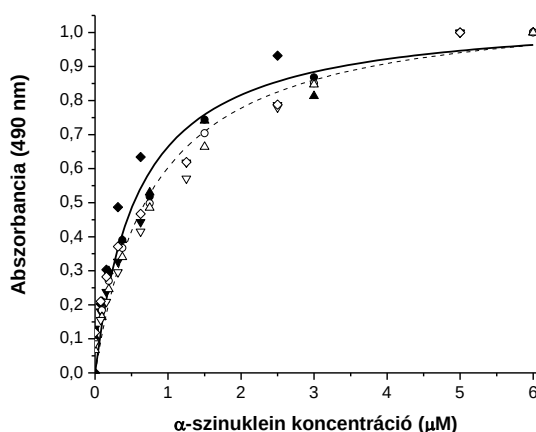
IV/1. Alfa-szinuklein kötőhely meghatározása a TPPP/p25-ön

Megvizsgáltam, hogy a TPPP/p25 mely szegmense játszik kulcs szerepet a fehérje alfa-szinukleinnel való kölcsönhatásában.

a) ELISA – dupla csonkolt/teljes TPPP/p25 kölcsönhatása az alfa-szinukleinnel

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

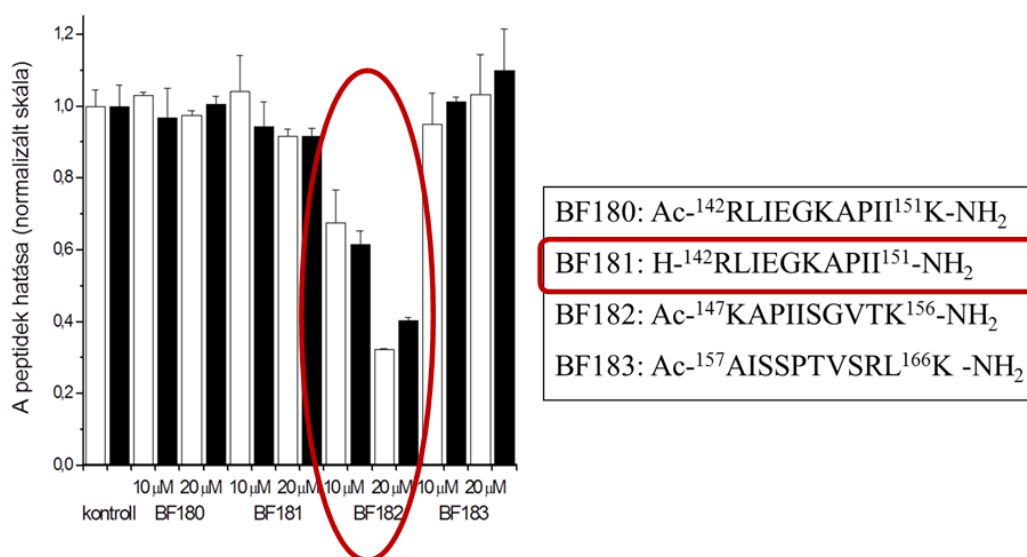
Első lépésként kimutattam, hogy mind a teljes hosszúságú (natív), mind a dupla csonkolt rekombináns TPPP/p25 kötődik az alfa-szinukleinhoz (27. ábra), bizonyítva, hogy a kötőhely a TPPP/p25 középső régiójában helyezkedik el. Ez összhangban van a csoport korábbi, Pepscan analízissel kapott adataival, miszerint a TPPP/p25 147-166 aminosavak közötti szakasza valószínűsíthető, hogy felelős az alfa-szinukleinnel való kölcsönhatásért [Oláh, et al., 2011].



27. 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.

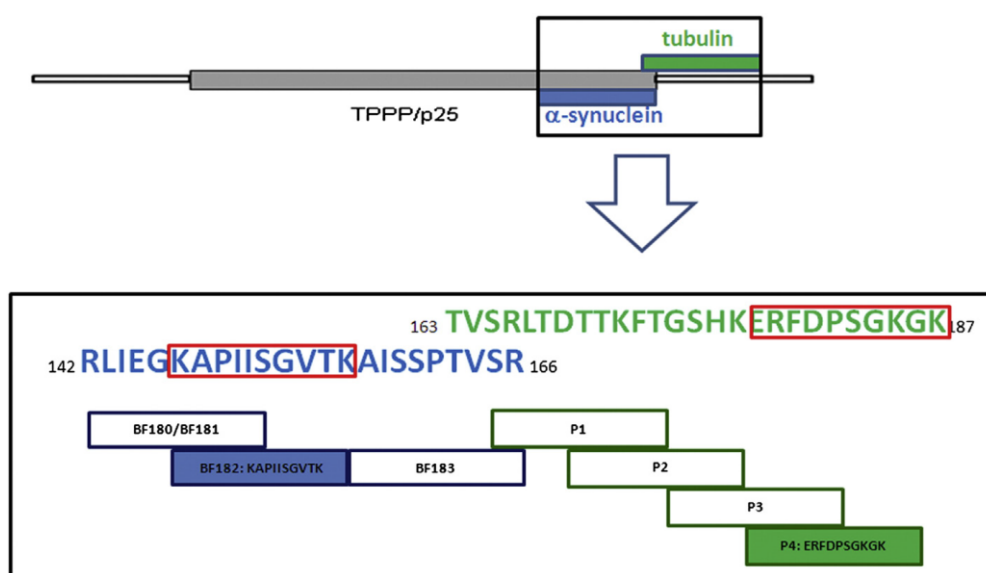
b) Kompetitív ELISA szintetikus TPPP/p25 peptidekkel

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) (28. 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.



28. 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 (29. ábra). Azaz a patológiás folyamatot, az alfa-szinuklein kötődését gátolni lehessen anélkül, hogy ezzel akadályoznánk a fiziológiás funkciót, a tubulinnal való kölcsönhatást.



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

IV/2. Az alfa-szinuklein TPPP/p25-öt kötő szegmensének azonosítása

Ahhoz, hogy a patológiás TPPP/p25-alfa-szinuklein komplex kialakulását megakadályozhassuk, fontos ismerni a kötőhely kialakításában részt vevő kötőmotívumot mindkét fehérjében. Az alfa-szinuklein TPPP/p25-öt kötő szegmensének azonosításához humán rekombináns alfa-szinukleint és annak különböző proteolitikus fragmenteit állítottam elő, majd ezen fragmentek kölcsönhatását vizsgáltam TPPP/p25-tel.

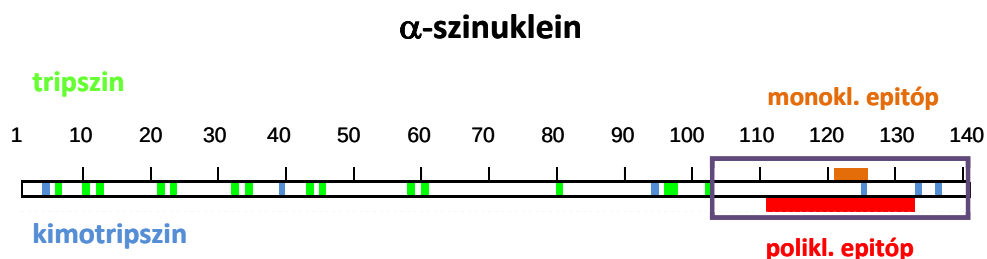
a) Limitált proteolízis

Az alfa-szinuklein TPPP/p25-öt kötő régiójának meghatározásához limitált proteolízis során humán rekombináns alfa-szinukleint emésztettem tripszinnel, illetve kimotripszinnel az anyagok és módszerek részben leírtak szerint.

A tripszin 15 helyen lehet képes az alfa-szinukleint hasítani az Arg és Lys oldallácoknál (6, 10, 12, 21, 23, 32, 34, 43, 45, 58, 60, 80, 96, 97, 102). A legutolsó lehetséges hasítási hely a 102-es aminosav után van. Azaz a fehérje utolsó, C-terminális, 38 aminosavból álló darabja (103-140) szükségképpen intakt marad a tripszines emésztés során (http://web.expasy.org/peptide_cutter/) (30. ábra).

Ezzel szemben a kimotripszin, ami csak aromás aminosavak (Phe, Tyr, Trp) C-terminálisánál vág, mindössze 6 helyen képes hasítani a fehérjét (4, 39, 94, 125, 133, 136). Az alfa-szinuklein N-terminális és középső szakaszán 3 hosszabb szakaszt is épen hagy a kimotripszin (4-39, 39-94, 94-125) (30. ábra).

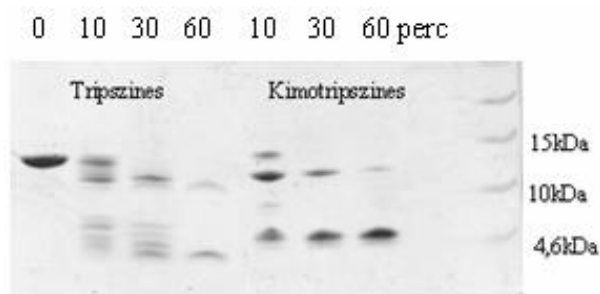
A két emésztés tehát különböző fragmenseket eredményezhet, melyek kölcsönhatását TPPP/p25-tel vizsgálva fontos információt nyerhetünk az alfa-szinuklein TPPP/p25-öt kötő régiójáról.



30. ábra: Hasító helyek és epitópok elhelyezkedése a humán alfa-szinuklein felszínén

Bár tricines-SDS-poliakrilamid gélt használtam, ami különösen a kis molsúlyú fehérjék/peptidek kimutatására alkalmas, a 31. ábrán látható, hogy a molekulásúly marker legkisebb egysége 4,6 kDa. Az ennél kisebb (1-2 kDa), emésztés során keletkezett peptidek kifuthattak a gélből, ezért nem láthatóak. Azonban az emésztett minta, melyet a további kísérletek során vizsgáltam, tartalmazza a legkisebb fragmenseket is, tehát a további kísérletekben ezek is

szerepet játszhatnak. A kiindulási (0 perc) és a 60 percig emésztett fehérje mennyiségét a gélképen összehasonlítva valószínűsíthető, hogy a tripszines emésztés során több ilyen kis peptid maradt vissza, amelyek azonban az enzim lehetséges hasító helyeit figyelembe véve mind az alfa-szinuklein 102. aminosava előtti részt képezik.



31. ábra: SDS-PAGE: Alfa-szinuklein limitált protolízise tripszinnel, ill. kimotripszinnel 0, 10, 30, 60 perc után leállítva a reakciót.

b) Western-blot (dot-blot)

Az emésztett alfa-szinuklein minták TPPP/p25-tel való kölcsönhatásának vizsgálatához feltétlenül szükség volt az emésztett fragmensek detektálhatóságára. Ehhez két különböző alfa-szinuklein elleni ellenanyag állt rendelkezésemre:

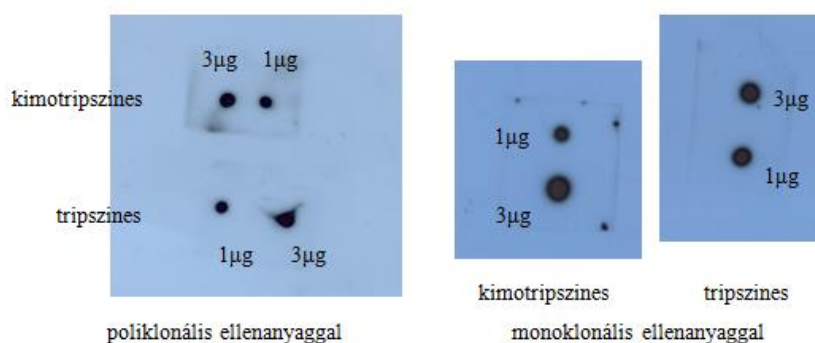
A poliklonális anti-alfa-szinukleint nyúlban termeltették, az alfa-szinuklein C-terminális 111-132 szakaszának megfelelő szintetikus peptid ellen. Az alfa-szinuklein szekvenciának ez a része nagymértékben konzervált az egérben és patkányban előforduló alfa-szinukleinre nézve, ugyanakkor nem mutat homológiát a szinuklein fehérjecsalád más tagjaival (béta- és gamma-szinukleinnel). A poliklonális anti-alfa-szinuklein specifikusan a humán és patkány alfa-szinuklein 111-132 szakaszának megfelelő epitópját ismeri fel.

A monoklonális anti-alfa-szinuklein a humán és a zebrahalban lévő alfa-szinukleinre specifikus, epitópja az alfa-szinuklein 121-125 szakaszával egyezik meg. A monoklonális ellenanyag nem alkalmas az egér, illetve a patkány alfa-szinuklein kimutatására.

Mivel humán rekombináns alfa-szinukleinnel, illetve ennek proteolitikus fragmenseivel dolgoztam, mindkét ellenanyag megfelelő volt számomra. Felmerült

azonban a kérdés, hogy az emésztett fehérjékben intakt marad-e a felismerésre szolgáló eptióp.

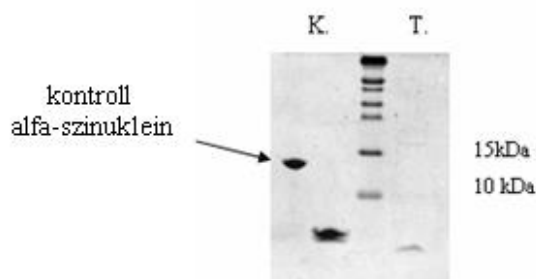
Ennek megválaszolásaként Western-blot (dot-blot) segítségével kimutattam, hogy mind a poliklonális (epitóp 111-132), mind a monoklonális (eptióp 121-125) alfa-szinuklein antitest felismer emésztett fragmenseket (32. ábra), ami azt bizonyítja, hogy ezek az alfa-szinuklein szakaszok épek maradnak az emésztések során, és az ellenanyagokkal kimutathatóak, aminek a további kísérletek során van jelentősége.



32. ábra: Western-blot (dot-blot) kísérlet különböző ellenanyagokkal az emésztett alfa-szinuklein fragmensek kimutatása céljából. Az alfa-szinuklein mennyisége 3, ill. 1 µg volt.

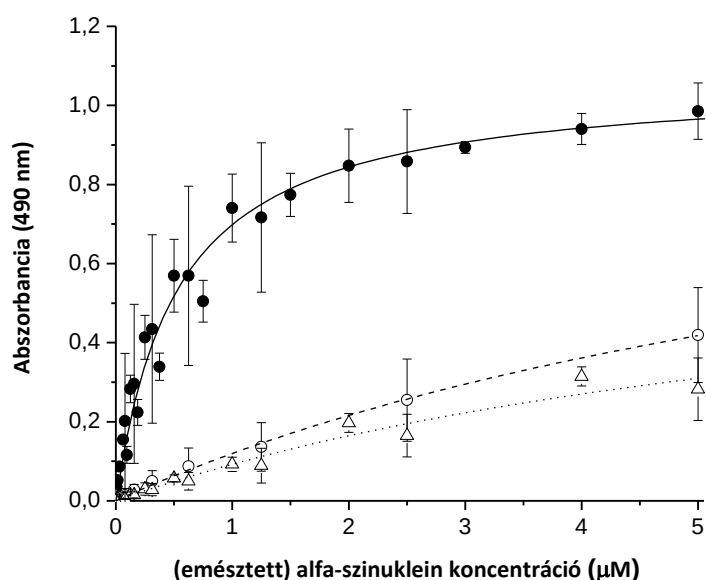
c) ELISA

Az emésztett fragmensek specifikus ellenanyaggal kimutathatóak, valamint az emésztés reprodukálhatónak bizonyult, SDS-gélen az emésztés végén (60 perc) a fehérjéből mindössze 1 domináns sáv látható (33. ábra):



33. ábra: SDS-PAGE: 2 mg/ml alfa-szinuklein emésztése 5 µg/ml kimotripsinnel (K.), ill. 2,5 µg/ml tripszinnel (T.), a leállítást 60 perc után végeztem. A középső oszlop a molekulatömeg markernek felel meg.

Így az emésztményekkel ELISA kísérletet végeztem, mely során az ELISA lemezt TPPP/p25-el borítottam, majd natív, ill. emésztett alfa-szinukleint adtam hozzá különböző koncentrációban (felező hígítási sor). Ezután a lemezt specifikus (poliklonális) anti-alfa-szinuklein-ellenanyaggal hívtam elő, mely az alfa-szinuklein 111-132-ig terjedő szakaszát ismeri fel. A kísérletből egyértelműen látszik, hogy a TPPP/p25 képes megkötni az emésztett alfa-szinukleint is (34. ábra). Mivel az ellenanyag az alfa-szinuklein C-terminális szakaszának egy részére specifikus, és 60 perc emésztés után intakt alfa-szinuklein már nincs jelen (33. ábra), ezért az alfa-szinuklein C-terminális, az antitest által felismert fragmentse bizonyítottan kötődik a TPPP/p25-höz.



34. ábra: A kontroll (folytonos, ●), és a tripszinnel (szaggatott, ○), ill. kimotripszinnel (pontozott, Δ) emésztett alfa-szinuklein kölcsönhatásának vizsgálata TPPP/p25-tel ELISA kísérlet segítségével.

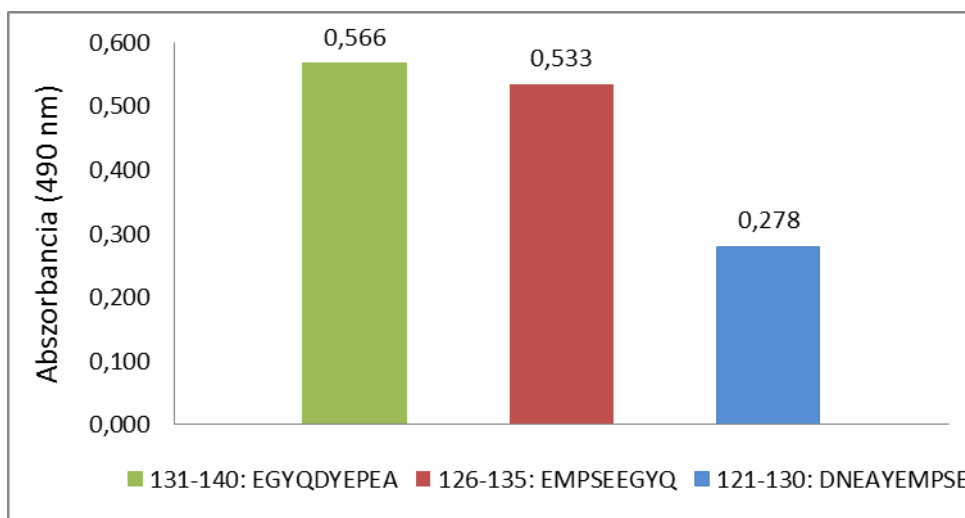
d) Pepscan

Az adatok további megerősítésére Pepscan-analízist végeztem. A tőhegyekre az alfa-szinuklein C-terminálisának (120-140 AS) megfelelő, egymással átfedő 10 tagú peptideket szintetizáltak Dr. Magyar Anna kutatócsoportjában, az ELTE-n. A

teljes alfa-szinukleinnek megfelelő Pepscan jelenleg még nem áll rendelkezésünkre, de tervezzük így is vizsgálni a TPPP/p25-alfa-szinuklein kölcsönhatást.

A Pepscan elrendezésben a tühegyekhez TPPP/p25-öt adva, p25-ellenanyaggal a kölcsönhatás az ELISA kísérletekhez hasonlóan detektálható. Az eredmény azt mutatja, hogy legnagyobb mértékben az alfa-szinuklein legutolsó, 131-140-ig terjedő szakaszának megfelelő peptid kötődött a TPPP/p25-höz (35. ábra). Az ezzel átfedő 126-136 peptid abszorbanciája ettől nem sokkal alacsonyabb, míg a 121-130 szakasz elnyelése jelentősen kisebb mindkettőnél.

A 126-135 és a 131-140 peptidek egymással átfedő elhelyezkedése és abszorbancia értékei megerősítik, hogy döntően az alfa-szinuklein utolsó, 131-140-ig terjedő szakasza játszik nagy valószínűséggel szerepet a TPPP/p25-tel való kölcsönhatásban.



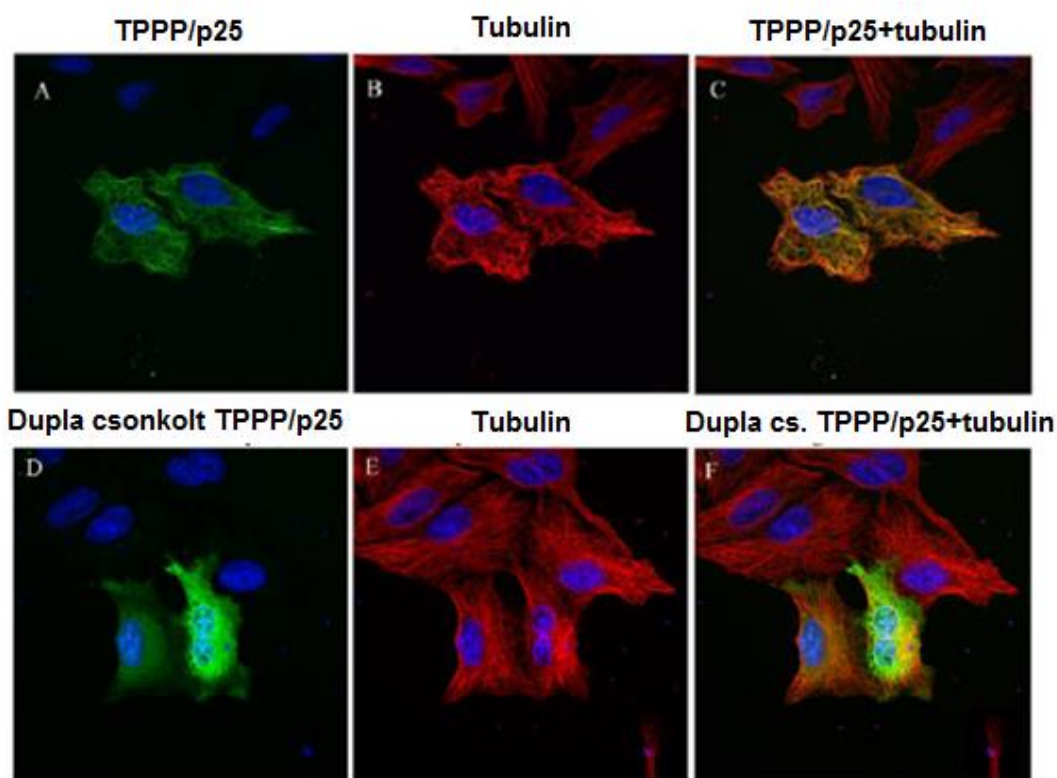
MDVFMKGLSK	AKEGVVAAAE	GTKQGVAEAA	GKTKEGVLYV	GSKTKEGVVH	50
GVATVAEKT	EQVTNVGGAV	VTGVTAVAQK	TVEGAGSIAA	ATGFVKKDQL	100
GKNEEGAPQE	GILEDMPVDP	DNEAYEMPSE	EGYQDYEPEA		140

35. ábra: Pepscan eredmény (a különböző peptidek abszorbanciája 490 nm-en mérve) oszlopdiaagrammon feltüntetve, valamint a humán alfa-szinuklein aminosav-szekvenciája, zölddel kiemelve a pepscan adat szerint a TPPP/p25 kötéséért valószínűleg felelős régió.

V. 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 sejttípusokat használva, melyekben a TPPP/p25 gén transzfekcióját (HeLa) vagy doxiciklinnel való indukciót (CHO10) követően kifejeződik a fehérje.

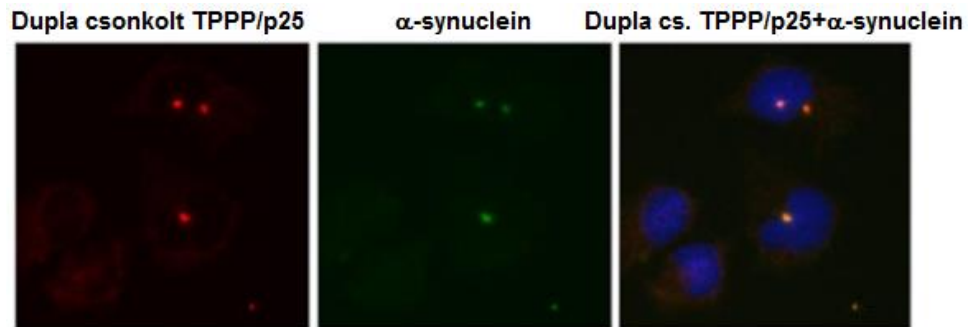
Reprezentatív ábra mutatja az in vivo kísérletek eredményeit:



36. ábra: Különböző TPPP/p25 formák lokalizációja HeLa sejtekben. Tranziensen transzfektált 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. [Tőkési, et al., 2014]

HeLa (Henrietta Lacks méhnyak karcinómájából származó biopsziából kitenyésztett sejtvonal) 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 (36. ábra).



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

CHO10 (kínai hörcsög petefészkek) sejtek esetén a médiumhoz dupla csonkolt TPPP/p25 alfa-szinukleinnel előinkubált elegyét adva azt tapasztalták, hogy a dupla csonkolt TPPP/p25 az alfa-szinukleinnel citoplazmikus aggregátumokat képez (37. ábra).

A dupla csonkolt 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, fiziológias célpontja a mikrotubuláris rendszer, melynek stabilitását és dinamikáját szabályozza. Parkinson-kór és más szinukleopátiák esetén a TPPP/p25 a zárványtestekben halmozódik fel az alfa-szinukleinnel együtt. A TPPP/p25 a „neomorphic moonlighting” fehérjék prototípusa, mivel fiziológias és patológias körülmények között különböző funkciókat lát el, a fehérje génszintű változása nélkül.

A munkacsoport kutatásaiba 2012-ben kapcsolódtam be, amikor már a humán rekombináns TPPP/p25 számos strukturális és funkcionális sajátossága ismert volt, így pl. az, hogy rendezetlen N- és C-terminális szegmensei egy 130 aminosavból álló flexibilis régiót fognak közre. A terminális szegmenseket nem tartalmazó mutáns fehérjét is klónozták, mely lehetővé tette, hogy mind a vad típusú, mind a mutáns fehérjét megfelelő mennyiségben *E. coli*-ban termeltessem és izoláljam, így biofizikai, valamint biokémiai módszerekkel a különböző TPPP/p25 formák szerkezetét és kölcsönhatásait molekuláris szinten jellemezzem. Célom a TPPP/p25 fiziológias és patológias kölcsönhatásaiért felelős kötőhelyeinek azonosítása volt. Cirkuláris dikroizmus mérések megmutatták, hogy míg a vad típusú fehérjét „random coil” jellemzi, addig a központi flexibilis szegmens („core”) képes másodlagos szerkezet kialakítására. Fluoreszcenciás mérésekkel (ANS titrálás) sikerült azonosítani „molten-globula” struktúrát a TPPP/p25 „core” régiójában. A „core” régió cink-ujj motívuma specifikusan köti a bivalens cink kationt. A cink-indukált szerkezetváltozás fokozza a TPPP/p25 tubulinpolimerizációt indukáló képességét, ami kulcs eleme a fehérje fiziológias funkciójának. A vad típusú és mutáns TPPP/p25 formák tubulinnal, valamint alfa-szinukleinnel, mint fiziológias és patológias partnerekkel való kölcsönhatását és a kölcsönhatások funkcionális következményeit ELISA-val, limitált proteolízissal és turbiditásméréssel vizsgáltam. Sikerült bizonyítani, hogy a TPPP/p25 fiziológias szerepének betöltésében, azaz a

tubulinnal való kölcsönhatásában, a C-terminális játszik meghatározó szerepet; a TPPP/p25-alfa-szinuklein patológiás komplex kialakulásában ugyanakkor a „core” régiónak van kulcs szerepe. Mindezen eredmények in vivo relevanciáját a csoportban végzett élő-sejtes kísérletek is bizonyították: a „core” régió nem kolokalizál a mikrotubuláris hálózattal, ugyanakkor ko-aggregál az alfa-szinukleinnel.

Summary

Disordered proteins without a well-defined 3D structure play crucial roles in the etiology of central nervous system diseases. The Cell Architecture Research Group of the Institute of Enzymology has identified such a disordered brain-specific protein, which was denoted Tubulin Polymerization Promoting Protein/p25 (TPPP/p25) on the basis of its function and molecular mass. In human brain TPPP/p25 is expressed predominantly in oligodendrocytes, at physiological condition it modulates the dynamics and stability of the microtubule system. In Parkinson's disease and other synucleinopathies TPPP/p25 is localized and co-enriched with alpha-synuclein in the inclusion bodies. TPPP/p25 is a prototype of "Neomorphic Moonlighting Proteins", because it performs distinct physiological and pathological functions, without alterations at gene level.

I joined the Cell Architecture Research Group in 2012 when several structural and functional features of the human recombinant TPPP/p25 were known, such as that the disordered N- and C-terminal segments of the protein are straddling a 130 amino acid length flexible region. The mutant protein without the terminal segments was cloned, which rendered me possible to isolate both the mutant and the wild-type TPPP/p25 species after expression in *E. coli*, so I could characterize the structure and interactions of the distinct TPPP/p25 forms with biophysical and biochemical techniques at molecular level. My aim was to identify the binding segments on TPPP/p25 involved in its physiological and pathological interactions. Circular dichroism experiments showed that while random coil is characteristic for the wild-type TPPP/p25, the middle flexible (core) region can form a secondary structure. Molten globule structure was identified in the core region of TPPP/p25 by fluorescent spectroscopy (ANS titration). The zinc-finger motif in the core region specifically binds the bivalent zinc ion, which induces structural rearrangement. This structural rearrangement enhances the tubulin polymerization promoting activity of TPPP/p25, which is a key element in its physiological function. I studied the interaction of the wild-type and mutant TPPP/p25 forms with tubulin and alpha-synuclein, its physiological and pathological partner respectively, and the functional consequences of these interactions by ELISA, limited proteolysis and turbidimetry. My results revealed that the C-terminal segment of TPPP/p25 plays a crucial role in

its physiological function (interaction with tubulin); however, the core region has a key role in the formation of TPPP/p25-alpha-synuclein pathological complex. In vivo relevance of these findings has been proved by experiments with living cells in the research group: the core region does not co-localize with the microtubule network, however, it co-aggregates with alpha-synuclein.

Hivatkozások

A dolgozat alapját képező publikációk:

Lehotzky, A., Oláh, J., Szunyogh, S., **Szabo, A.**, Berki, T., Ovádi, J. (2015) Zinc-induced structural changes of the disordered TPPP/p25 inhibits its degradation by the proteasome, *Biochim Biophys Acta*, 1852, 83-91.

Tőkési, N., Oláh, J., Hlavanda, E., Szunyogh, S., **Szabó, A.**, Babos, F., Magyar, A., Lehotzky, A., Vass, E. and Ovádi, J. (2014) Identification of motives mediating alternative functions of the neomorphic moonlighting TPPP/p25, *Biochim Biophys Acta*, 1842, 547-557.

További hivatkozások:

Abeliovich, A., Schmitz, Y., Farinas, I., Choi-Lundberg, D., Castillo, W.H. Ho, P.E., Shinsky, N. , Verdugo, J.M., Armanini, M., Ryan, A., Hynes, M., Phillips, H., Sulzer, D., Rosenthal, A. (2000) Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system, *Neuron*, 25, 239–252

Bellucci, A., Navarria, L., Zaltieri, M., Missale, C. and Spano, P. (2012) alpha-Synuclein synaptic pathology and its implications in the development of novel therapeutic approaches to cure Parkinson's disease, *Brain Res*, 1432, 95-113.

Daughdrill, G.W., Chadsey, M.S., Karlinsey, J.E., Hughes, K.T. and Dahlquist, F.W. (1997) The C-terminal half of the anti-sigma factor, FlgM, becomes structured when bound to its target, sigma 28, *Nat Struct Biol*, 4, 285-291.

Dunker, A.K., Brown, C.J., Lawson, J.D., Iakoucheva, L.M. and Obradovic, Z. (2002) Intrinsic disorder and protein function., *Biochemistry*, 41, 6573-6582.

Dunker, A.K., Lawson, J.D., Brown, C.J., Williams, R.M., Romero, P., Oh, J.S., Oldfield, C.J., Campen, A.M., Ratliff, C.M., Hipps, K.W., Ausio, J., Nissen, M.S., Reeves, R., Kang, C., Kissinger, C.R., Bailey, R.W., Griswold, M.D., Chiu, W., Garner, E.C. and Obradovic, Z. (2001) Intrinsically disordered protein, *J Mol Graph Model*, 19, 26-59.

Dunker, A.K., Obradovic, Z., Romero, P., Garner, E.C. and Brown, C.J. (2000) Intrinsic protein disorder in complete genomes, *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform*, 11, 161-171.

Dunker, A.K., Silman, I., Uversky, V.N. and Sussman, J.L. (2008) Function and structure of inherently disordered proteins, *Curr Opin Struct Biol*, 18, 756-764.

Fink, A.L. (2005) Natively unfolded proteins, *Curr Opin Struct Biol*, 15, 35-41.

Geysen, H.M., Meloen, R.H., et al. (1984) Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid, *Proc Natl Acad Sci USA*, 81 (13), 3998-4002.

Hlavanda, E., Klement, E., Kokai, E., Kovacs, J., Vincze, O., Tokesi, N., Orosz, F., Medzihradszky, K.F., Dombradi, V. and Ovadi, J. (2007) Phosphorylation blocks the activity of tubulin polymerization-promoting protein (TPPP): identification of sites targeted by different kinases, *J Biol Chem*, 282, 29531-29539.

Hlavanda, E., Kovacs, J., Olah, J., Orosz, F., Medzihradszky, K.F. and Ovadi, J. (2002) Brain-specific p25 protein binds to tubulin and microtubules and induces aberrant microtubule assemblies at substoichiometric concentrations, *Biochemistry*, 41, 8657-8664.

Hoftberger, R., Fink, S., Aboul-Enein, F., Botond, G., Olah, J., Berki, T., Ovadi, J., Lassmann, H., Budka, H. and Kovacs, G.G. (2010) Tubulin polymerization promoting protein (TPPP/p25) as a marker for oligodendroglial changes in multiple sclerosis, *Glia*, 58, 1847-1857.

Hollósi, M., Laczkó, I., Majer, Zs. (2004) A sztereokémia és kiroptikai spektroszkópia alapjai. In. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 168-195.

Irvine, G.B., El-Agnaf, O.M., Shankar, G.M. and Walsh, D.M. (2008) Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases, *Mol Med*, 14, 451-464.

Iwai, A., Masliah, E., Yoshimoto, M., Ge, N., Flanagan, L., de Silva, H.A., Kittel, A. and Saitoh, T. (1995) The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's

disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system, *Neuron*, 14, 467-475.

Jeffery, C.J. (1999) Moonlighting proteins, *Trends Biochem Sci*, 24, 8-11.

Jeffery, C.J. (2011) Proteins with neomorphic moonlighting functions in disease, *IUBMB Life*, 63, 489-494.

Jenco, J. M., Rawlingson, A., Daniels, B., Morris, A. J. (1998) Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins, *Biochemistry*, 37, 4901-4909.

Kovacs, G.G., Gelpi, E., Lehotzky, A., Hoftberger, R., Erdei, A., Budka, H. and Ovadi, J. (2007) The brain-specific protein TPPP/p25 in pathological protein deposits of neurodegenerative diseases, *Acta Neuropathol*, 113, 153-161.

Kovacs, G.G., Laszlo, L., Kovacs, J., Jensen, P.H., Lindersson, E., Botond, G., Molnar, T., Perczel, A., Hudecz, F., Mezo, G., Erdei, A., Tirian, L., Lehotzky, A., Gelpi, E., Budka, H., Ovadi J. (2004) Natively unfolded tubulin polymerization promoting protein TPPP/p25 is a common marker of alpha-synucleinopathies, *Neurobiol Dis.*, 17, 155-162.

Kumar, N. (1981) Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action, *J Biol Chem*, 256, 10435-10441.

Leal, S.S. and Gomes, C.M. (2007) Studies of the molten globule state of ferredoxin: structural characterization and implications on protein folding and iron-sulfur center assembly, *Proteins*, 68, 606-616.

Lehotzky, A., Lau, P., Tokesi, N., Muja, N., Hudson, L.D. and Ovadi, J. (2010) Tubulin polymerization-promoting protein (TPPP/p25) is critical for oligodendrocyte differentiation, *Glia*, 58, 157-168.

Lehotzky, A., Tirián, L., Tőkési, N., Lénárt, P., Szabó, B., Kovács, J. and Ovádi, J. (2004) Dynamic targeting of microtubules by TPPP/p25 affects cell survival., *J Cell Sci*, 117, 6249-6259.

Liliom, K., Wágner, G., Kovács, J., Comin, B., Cascante, M., Orosz, F. and Ovádi, J. (1999) Combined enhancement of microtubule assembly and glucose metabolism in neuronal systems *in vitro*. Decreased sensitivity to copper toxicity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 264, 605-610.

Lindersson, E., Lundvig, D., Petersen, C., Madsen, P., Nyengaard, J.R., Hojrup, P., Moos, T., Otzen, D., Gai, W.P., Blumbergs, P.C. and Jensen, P.H. (2005) p25 α Stimulates alpha-synuclein aggregation and is co-localized with aggregated alpha-synuclein in alpha-synucleinopathies, *J Biol Chem*, 280, 5703-5715.

Mitchison, T., Kirschner, M. (1984) Dynamic instability of microtubule growth, *Nature*, 312, 237-242.

Morejohn (1994) Microtubule binding proteins are not necessarily Microtubule-Associated Proteins, *Plant Cell*, 6, 1696-1699.

Na, C.N. and Timasheff, S.N. (1986) Interaction of vinblastine with calf brain tubulin: multiple equilibria, *Biochemistry*, 25, 6214-6222.

Oláh, J., Tokesi, N., Lehotzky, A., Orosz, F., Ovádi, J. (2013) Moonlighting microtubule-associated proteins: Regulatory functions by day and pathological functions at night, *Cytoskeleton (Hoboken)*, 70(11), 677-85.

Oláh, J., Vincze, O., Virok, D., Simon, D., Bozso, Z., Tokesi, N., Horvath, I., Hlavanda, E., Kovacs, J., Magyar, A., Szucs, M., Orosz, F., Penke, B. and Ovadi, J. (2011) Interactions of pathological hallmark proteins: tubulin polymerization promoting protein/p25, beta-amyloid, and alpha-synuclein, *J Biol Chem*, 286, 34088-34100.

Oláh J., Zotter A., Hlavanda E., Szunyogh S., Orosz F., Szigeti K., Fidy J. and Ovádi J. (2012) Microtubule assembly-derived by dimerization of TPPP/p25. Evaluation of thermodynamic parameters for multiple equilibrium system from ITC data, *Biochim Biophys Acta* 1820, 785-94.

Orosz, F., G. G. Kovács, et al. (2004) TPPP/p25: from unfolded protein to misfolding disease: prediction and experiments, *Biol. Cell* , 96 (9), 701-711.

Ovádi, J. (2011) Moonlighting proteins in neurological disorders, *IUBMB Life*, 63, 453-456.

Ovádi, J., Orosz, F. and Lehotzky, A. (2005) What is the biological significance of the brain-specific tubulin-polymerization promoting protein (TPPP/p25)?, *IUBMB Life*, 57, 765-768.

Palmiter, R. D. and Findley, S. D. (1995) Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc, *Embo J*, 14, 639-649.

Piatigorsky, J. and Wistow, G.J. (1989) Enzyme/crystallins: gene sharing as an evolutionary strategy, *Cell*, 57, 197-199.

Preusser, M., Lehotzky, A., Budka, H., Ovadi, J. and Kovacs, G.G. (2007) TPPP/p25 in brain tumours: expression in non-neoplastic oligodendrocytes but not in oligodendroglioma cells, *Acta Neuropathol*, 113, 213-215.

Schägger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal. Biochem.*, 166, 368.

Seki, N., Hattori, A., Sugano, S., Suzuki, Y., Nakagawara, A., Muramatsu, M., Hori, T. and Saito, T. (1999) A novel human gene whose product shares significant homology with the bovine brain-specific protein p25 on chromosome 5p15.3, *J. Hum. Genet.*, 44, 121-122.

Semisotnov, G.V., Rodionova, N.A., Razgulyaev, O.I., Uversky, V.N., Gripas, A.F. and Gilmanshin, R.I. (1991) Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe, *Biopolymers*, 31, 119-128.

Shiratsuchi, A., Sato, S., Oomori, A., Ishiguro, K., Uchida, T. and Imahori, K. (1995) cDNA cloning of a novel brain-specific protein p25, *Biochem. Biophys. Acta*, 1251, 66-68.

Sickmeier, M., Hamilton, J.A., LeGall, T., Vacic, V., Cortese, M.S., Tantos, A., Szabo, B., Tompa, P., Chen, J., Uversky, V.N., Obradovic, Z. and Dunker, A.K.

(2007) DisProt: the Database of Disordered Proteins, *Nucleic Acids Res*, 35, D786-793.

Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M. and Goedert, M. (1998) alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6469-6473.

Takahashi, M., Tomizawa, K., Fujita, S. C., Sato, K., Uchida, T. and Imahori, K. (1993) A brain-specific protein p25 is localized and associated with oligodendrocytes, neuropil, and fiber-like structures of the CA3 hippocampal region in the rat brain, *J Neurochem* 60, 228-35.

Takahashi, M., Tomizawa, K., Ishiguro, K., Sato, K., Omori, A., Sato, S., Shiratsuchi, A., Uchida, T. and Imahori, K. (1991) A novel brain-specific 25 kDa protein (p25) is phosphorylated by a Ser/Thr-Pro kinase (TPK II) from tau protein kinase fractions, *FEBS Lettr.*, 289, 37-43.

Tamás, G., Erőss, L. Mély agyi stimuláció az előrehaladott Parkinson-kór kezelésében, Semmelweis Egyetem, Neurológiai Klinika, Országos Idegtudományi Intézet, http://www.parkinsontarsasag.hu/upload/parkinson/document/mely_agyi_stimulacio.pdf

Tirián, L., Hlavanda, E., Oláh, J., Horváth, I., Orosz, F., Szabó, B., Kovács, J., Szabad, J. and Ovádi, J. (2003) TPPP/p25 promotes tubulin assemblies and blocks mitotic spindle formation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13976-13981.

Tofaris, G. K., Spillantini, M. G. (2007) Physiological and pathological properties of alpha-synuclein, *Cell. Mol. Life Sci.*, 64, 2194-2201

Tőkesi, N., Lehotzky, A., Horváth, I., Szabó, B., Oláh, J., Lau, P., Ovádi, J. (2010) TPPP/p25 promotes tubulin acetylation by inhibiting histone deacetylase 6, *J Biol Chem.*, 285(23):17896-906.

Tőkési, N., Oláh, J., Hlavanda, E., Szunyogh, S., Szabó, A., Babos, F., Magyar, A., Lehotzky, A., Vass, E. and Ovádi, J. (2014) Identification of motives mediating alternative functions of the neomorphic moonlighting TPPP/p25, *Biochim Biophys Acta*, 1842, 547-557.

Tompa, P. (2002) Intrinsically unstructured proteins, *Trends Biochem Sci*, 27, 527-533.

Uversky, V.N. (2002) Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics, *Protein Sci*, 11, 739-756.

Uversky, V.N. (2002) What does it mean to be natively unfolded?, *Eur. J Biochem.* , 2– 12., 269, 2– 12.

Uversky, V.N. (2003) A protein-chameleon: conformational plasticity of alpha-synuclein, a disordered protein involved in neurodegenerative disorders, *J Biomol Struct Dyn*, 21, 211-234.

Uversky, V.N. and Dunker, A.K. (2010) Understanding protein non-folding, *Biochim Biophys Acta*, 1804, 1231-1264.

Vincze, O., Olah, J., Zadori, D., Klivenyi, P., Vecsei, L. and Ovadi, J. (2011) A new myelin protein, TPPP/p25, reduced in demyelinated lesions is enriched in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis, *Biochem Biophys Res Commun*, 409, 137-141.

Vincze, O., Tőkési, N., Oláh, J., Hlavanda, E., Zotter, Á., Horváth, I., Lehotzky, A., Tirián, L., Medzihradszky, K.F., Kovács, J., Orosz, F. and Ovádi, J. (2006) Tubulin polymerization promoting proteins (TPPPs): members of a new family with distinct structures and functions, *Biochemistry*, 45, 13818-13826.

Wade, R.H. (2009) On and around microtubules: an overview, *Mol Biotechnol*, 43, 177-191.

Wistow, G. and Piatigorsky, J. (1987) Recruitment of enzymes as lens structural proteins, *Science*, 236, 1554-1556.

Wright, P.E. and Dyson, H.J. (1999) Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm, *J. Mol. Biol.*, 293, 321-331.

Zotter, A., Bodor, A., Olah, J., Hlavanda, E., Orosz, F., Perczel, A. and Ovadi, J. (2011a) Disordered TPPP/p25 binds GTP and displays Mg(2+)-dependent GTPase activity, *FEBS Lett*, 585, 803-808.

Zotter, A., Olah, J., Hlavanda, E., Bodor, A., Perczel, A., Szigeti, K., Fidy, J. and Ovadi, J. (2011b) Zn(2)+-induced rearrangement of the disordered TPPP/p25 affects its microtubule assembly and GTPase activity, *Biochemistry*, 50, 9568-9578.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindenekelőtt témavezetőimnek: Dr. Ovádi Juditnak, aki lehetővé tette, hogy munkacsoportjában dolgozhassak és szakdolgozatomat az általa vezetett laborban készítsem el, valamint irányította munkámat, és sok hasznos információval és útmutatással látott el, valamint Dr. Oláh Juditnak, aki mindig türelemmel, figyelemmel kísérte munkámat. Sok mérési technika, laboratóriumi vizsgálati módszer elsajátítását neki köszönhetem.

Köszönettel tartozom a csoport további tagjainak: Szunyogh Sándornak, Lehotzky Attilának és Orosz Ferencnek, hogy kérdéseimre mindig készségesen válaszoltak, problémáim megoldásában segítettek.

Hozzájárulásuk nélkül nem sikerült volna elkészítenem munkámat.