



BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR
OLÁH GYÖRGY DOKTORI ISKOLA

A multifunkcionális mikrotubuláris rendszer szerveződésében szerepet játszó TPPP/p25 fiziológias és patológias kölcsönhatásai

Tézisfüzet

Szabó Adél

okleveles biomérnök

Témavezető: Dr. Oláh Judit

Konzulens: Dr. Grolmuszné Prof. Dr. Vértessy Beáta

Magyar Tudományos Akadémia
Természettudományi Kutatóközpont
Enzimológiai Intézet
Sejtarchitektúra Kutatócsoport



Budapest, 2019

Bevezetés és irodalmi háttér

Doktori értekezésem témája a multifunkcionális mikrotubuláris rendszer ultrastrukturális szerveződésében szerepet játszó „Tubulin Polymerization Promoting Protein/p25” (TPPP/p25) fiziológias és patológias kölcsönhatásainak molekuláris szintű jellemzése. A citoskeletális mikrotubuláris hálózat sokrétű funkciót lát el az eukarióta sejtekben mind fiziológias, mind patológias körülmények között, melyekben meghatározó szerepe van a poszttranszlációs módosulásoknak, valamint különböző partnerekkel való kölcsönhatásoknak¹. Különös jelentősége van a mikrotubuláris hálózatnak az agyban, ahol aktívan részt vesz a neuronok strukturális polaritásának fenntartásában, ami létfontosságú a fiziológias funkcióik betöltéséhez¹. A neuronok hosszú, vékony axonjait oligodendrociták fedik le, melyek feladata az axonok védelme és elektromos szigetelése azáltal, hogy körük mielinhüvelyt képeznek. E folyamatban a mikrotubuláris rendszer átrendeződésének, valamint a mikrotubulus asszociált fehérjéknek (MAP-eknek) alapvető szerepük van². Ilyen fehérje a Sejtarchitektúra Kutatócsoport által azonosított, elsősorban az oligodendrocitákban kifejeződő TPPP/p25, melynek tubulinpolimerizációt indukáló aktivitását és 25 kDa-os mőtömegét jelzi elnevezése³. Bizonyították, hogy a 3D szerkezettel nem bíró TPPP/p25 a „Neomorphic Moonlighting” fehérjék prototípusa, mivel kölcsönható partnertől függően eltérő fiziológias és patológias funkciót tölt be a fehérje génszintű változása nélkül^{4,5}.

A Zn²⁺-kötő TPPP/p25 elsődleges kölcsönható partnere a tubulin, melynek mikrotubulussá való polimerizációját indukálja, továbbá a mikrotubulusokat kötegelő³ és acetilációjukat fokozó⁶ aktivitásai révén a mikrotubuláris rendszer dinamikáját és stabilitását szabályozza. Ezen funkcióit a dimerizációs potenciálja⁷, valamint a tubulin dezacetiláz enzimekkel (SIRT2⁸ és HDAC6⁶) való kölcsönhatásai révén éri el: specifikusan gátolja aktivitásukat, következésképpen növeli a mikrotubulusok acetilációs szintjét^{6,8}. Az acetiláció-vezérelt mikrotubuláris dinamika fontos fiziológias szerepet játszik a sejtosztódásban, a mitotikus orsó kialakításában/lebontásában, a nyúlványnövekedés szabályozásában a differenciáció során, illetve patológias szerepet a védekező mechanizmusként működő aggreszóma képződésben⁹, következésképpen a tubulin dezacetilázok potenciális gyógyszercélpontok. A Prof. Manfred Jung által vezetett freiburgi kutatócsoport nemrég új mechanizmussal működő, nagy hatékonyságú, izotípus szelektív SIRT2 gátlószereket állított elő, melyeket „Sirtuin Rearranging Ligands” (SirReal) névvel publikáltak¹⁰. A SirReal inhibitorok egyedülállóan nagy affinitása és specificitása a SIRT2 enzim aktív centrumának a ligandum (az inhibitor) által kiváltott szerkezeti átrendeződésén alapul¹⁰. A csoport emellett kifejlesztett egy proteolízist célzó kimérát, „Proteolysis Targeting Chimera” (PROTAC), amely a SIRT2 szelektív proteaszomális degradációját képes indukálni azáltal, hogy a bifunkcionális molekula egyik fele

¹ Conde C, Caceres A (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* 10: 319-332.

² Bauer NG, Richter-Landsberg C, Ffrench-Constant C (2009) Role of the oligodendroglial cytoskeleton in differentiation and myelination. *Glia* 57: 1691-1705.

³ Hlavanda E, Kovács J, Oláh J, Orosz F, Medzihradsky KF et al. (2002) Brain-specific p25 protein binds to tubulin and microtubules and induces aberrant microtubule assemblies at substoichiometric concentrations. *Biochemistry* 41: 8657-8664.

⁴ Jeffery CJ (2011) Proteins with neomorphic moonlighting functions in disease. *IUBMB Life* 63: 489-494.

⁵ Ovádi J (2011) Moonlighting proteins in neurological disorders. *IUBMB Life* 63: 453-456.

⁶ Tökési N, Lehotzky A, Horvath I, Szabó B, Oláh J et al. (2010) TPPP/p25 promotes tubulin acetylation by inhibiting histone deacetylase 6. *J Biol Chem* 285: 17896-17906.

⁷ Oláh J, Zotter A, Hlavanda E, Szunyogh S, Orosz F et al. (2012) Microtubule assembly-derived by dimerization of TPPP/p25. Evaluation of thermodynamic parameters for multiple equilibrium system from ITC data. *Biochim Biophys Acta* 1820: 785-794.

⁸ Mangas-Sanjuan V, Oláh J, Gonzalez-Alvarez I, Lehotzky A, Tökési N et al. (2015) Tubulin acetylation promoting potency and absorption efficacy of deacetylase inhibitors. *Br J Pharmacol* 172: 829-840.

⁹ Kopito RR (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* 10: 524-530.

¹⁰ Rumpf T, Schiedel M, Karaman B, Roessler C, North BJ et al. (2015) Selective Sirt2 inhibition by ligand-induced rearrangement of the active site. *Nat Commun* 6: 6263.

specifikusan köti a SIRT2-t, a másik fele pedig egy E3 ubikvitin ligáz komplexet¹¹. Ezáltal a PROTAC kémiai indukálja a SIRT2 izotípus specifikus poliubikvitinációját, majd lebomlását a proteaszómán keresztül¹¹. Az EU COST EPICHEM program révén kialakult sikeres kooperáció keretén belül lehetőségünk nyílt a SirReal inhibitorok és a PROTAC származék jellemzésére.

A TPPP/p25 nem-fiziológiás kifejeződése különböző központi idegrendszeri betegségek kialakulásához kapcsolódik. Ilyenek például: a mielinhüvely károsodásával járó szklerózis multiplex (megváltozott TPPP/p25 szint)¹²; idegszövet eredetű daganat, az oligodendroglioma (TPPP/p25 hiánya)¹³; valamint egyes konformációs betegségek, pl. a Parkinson-kór és a multisztémás atrófia (TPPP/p25 és α -szinuklein együttes felhalmozódása a neuronális és gliális zárványtestekben)^{14,15}. A TPPP/p25 az α -szinuklein mellett ezen betegségek marker fehérjeje¹⁴. Mivel mindkét fehérje rendezetlen és rendelkezik fiziológiás funkciókkal is, melyek elengedhetetlenek a normális agyműködéshez, gyógyszercélpontként való alkalmazásuk jelentős kihívást jelent, hiszen egyik fehérje sem támadható önmagában, nem vehető el fiziológiás funkcióját. Kutatócsoportunk ezért a Parkinson-kór kezelésére egy új, innovatív stratégiát dolgozott ki, amely a patológiás, aggregációra hajlamos fehérje-komplex (TPPP/p25- α -szinuklein) kontaktfelületét javasolja gyógyszercélpontként, abban az esetben, ha az különbözik a TPPP/p25 tubulinnal alkotott fiziológiás komplexének kontaktfelületétől¹⁶. Ezáltal megőrződik a TPPP/p25 fiziológiás funkciója, azaz a mikrotubuláris rendszer dinamikájára gyakorolt szabályozó hatása¹⁶. Tehát a feladat a TPPP/p25 fiziológiás és patológiás kölcsönhatásaiban résztvevő (elsősorban a tubulint és az α -szinukleint kötő) fehérjeszegmenseinek azonosítása, mivel ezáltal lehetővé válik specifikus gyógyszercélpont azonosítása és nagy hatékonyságú, szelektív anti-Parkinson ágens fejlesztése.

PhD munkám megkezdése előtt a Sejtarchitektúra Kutatócsoportban a vad típusú, és az egyik vagy mindkét terminális szegmensétől megfosztott, ún. „csonkolt” humán rekombináns TPPP/p25 fehérjével, valamint célzottan szintetizált TPPP/p25 peptidekkel végzett vizsgálatok megmutatták, hogy a TPPP/p25 rendezetlen terminálisai, elsődlegesen a C-terminális (178-187 aminosavak) játszik meghatározó szerepet a fehérje fiziológiás funkciójának betöltésében, azaz a tubulinnal való kölcsönhatásban¹⁶. Ugyanakkor a TPPP/p25 α -szinukleinnel való asszociációjában, valamint az α -szinuklein aggregációt indukáló aktivitásában a TPPP/p25 középső „core” régiójának (147-156 aminosavak) van meghatározó szerepe¹⁶. Ez a szakasz különbözik a C-terminálison található tubulin kötő szegmenstől, ami különösen fontos abból a szempontból, hogy a kialakuló (fiziológiás/patológiás) kölcsönhatásokat szelektíven befolyásolni lehessen. Ezen *in vitro* kísérleti eredményeket támasztják alá a csoport élő-sejtes eredményei, nevezetesen az, hogy a „core” TPPP/p25 és vad típusú α -szinuklein kölcsönhatása CHO10 sejtekben a két fehérje ko-aggregációját eredményezi¹⁶. E kutatási projektbe kapcsolódtam be a kötőfelület lokalizációjának pontosítása, valamint további potenciális kötőhelyek feltérképezése (nemcsak a TPPP/p25-ön, hanem az α -szinukleinen is) céljából, ami a doktori dolgozatom jelentős részét képezi.

¹¹ Schiedel M, Herp D, Hammelmann S, Swyer S, Lehotzky A et al. (2018) Chemically Induced Degradation of Sirtuin 2 (Sirt2) by a Proteolysis Targeting Chimera (PROTAC) Based on Sirtuin Rearranging Ligands (SirReals). *J Med Chem* 61: 482-491.

¹² Höftberger R, Fink S, Aboul-Enein F, Botond G, Oláh J et al. (2010) Tubulin polymerization promoting protein (TPPP/p25) as a marker for oligodendroglial changes in multiple sclerosis. *Glia* 58: 1847-1857.

¹³ Preusser M, Lehotzky A, Budka H, Ovádi J, Kovács GG (2007) TPPP/p25 in brain tumours: expression in non-neoplastic oligodendrocytes but not in oligodendroglioma cells, *Acta Neuropathol.* 113: 213-215.

¹⁴ Kovacs GG, Laszlo L, Kovács J, Jensen PH, Lindersson E et al. (2004) Natively unfolded tubulin polymerization promoting protein TPPP/p25 is a common marker of alpha-synucleinopathies, *Neurobiol. Dis.* 17: 155-162.

¹⁵ Lindersson E, Lundvig D, Petersen C, Madsen P, Nyengaard JR et al. (2005) p25alpha Stimulates alpha-synuclein aggregation and is co-localized with aggregated alpha-synuclein in alpha-synucleinopathies, *J Biol Chem*, 280: 5703-5715.

¹⁶ Tökési N, Oláh J, Hlavanda E, Szunyogh S, Szabó A et al. (2014): Identification of motives mediating alternative functions of the neomorphic moonlighting TPPP/p25, *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*, 1842: 547-557.

Célkitűzések

Doktoranduszi munkám megkezdésekor, döntően a Sejtarchitektúra Kutatócsoport eredményei alapján, ismert volt, hogy a rendezetlen TPPP/p25 jelentős szerepet tölt be a mikrotubuláris rendszer stabilitásának és dinamikájának szabályozásában a mikrotubulusokat kötegelő³ és az acetilációjukat elősegítő⁶ aktivitásai révén. Ez utóbbi hatást részben a tubulin dezacetiláz enzimekkel (HDAC6, SIRT2) való kölcsönhatásai révén éri el. Mivel a HDAC6-TPPP/p25 kölcsönhatást csoportunk korábban részletesen tanulmányozta, kutatómunkám a kevésbé ismert SIRT2-TPPP/p25 interakció megismerésére és jellemzésére irányult.

Kimutatták, hogy a TPPP/p25 biomarkere bizonyos központi idegrendszeri megbetegedéseknek¹⁴, melyet számos irodalmi adat támasztott alá. Bizonyították, hogy a TPPP/p25 α -szinukleinnel való kölcsönhatása toxikus aggregátumok képződéséhez vezet; a két fehérje a Parkinson-kór és más szinukleinpátiákra jellemző agyi zárványtestekben halmozódik fel. Minthogy a gyógyíthatatlan idegrendszeri megbetegedések komoly szociális és gazdasági problémát jelentenek, következésképpen intenzív nemzetközi kutatás zajlik ezen a területen. A Parkinson-kór és más szinukleinpátiák patomechanizmusának megismerése alapvető jelentőségű olyan gyógyszercélpont azonosításához, ami elvezet a betegségek terápiájában használható specifikus gyógyszer-molekulák fejlesztéséhez. Mivel a betegségek kialakulása a marker fehérjék kölcsönhatásának és patológiás szintű felhalmozódásának eredménye, a marker fehérjék minél pontosabb megismerése, kölcsönhatásuk jellemzése elengedhetetlen a patomechanizmus megértéséhez. Doktori munkám másik, szintén jelentős része ehhez járul hozzá.

Céljaim a következők voltak:

- Humán rekombináns fehérjék (vad típusú és mutáns TPPP/p25, α -szinuklein és SIRT2) termeltetése és izolálása után a különböző fehérjeformák, elsősorban a TPPP/p25 „csenkolt” és *deléciós* mutánsainak szerkezeti jellemzése, különös tekintettel arra, hogy a mutációk milyen hatással vannak a TPPP/p25 rendezetlenségére, a cink-indukált szerkezetváltozásra és a fehérje dimerizációs képességére.
- A központi és terminális TPPP/p25 régiók szerepének vizsgálata a fehérje tubulinnal való kölcsönhatásában és a mikrotubulusok stabilizálásában, kötegelésében.
- A tubulin-TPPP/p25-SIRT2 fehérjék közötti kölcsönhatások molekuláris szintű jellemzése, a kölcsönhatások funkcionális következményeinek vizsgálata a TPPP/p25-indukált tubulin polimerizációra, illetve a SIRT2 katalizált tubulin/mikrotubulus dezacetilációra.
- Új, specifikus SIRT2 inhibitorok (SirReal és PROTAC) hatásainak, specifitásaiknak tesztelése a humán rekombináns SIRT2 dezacetiláz aktivitására különböző szubsztrátok esetén (tubulin, mikrotubulus és szintetikus fluoreszcens peptid).
- A TPPP/p25 és az α -szinuklein, mint patológiás partnerek közötti kölcsönhatások molekuláris szintű jellemzése. A patológiás kölcsönhatásért felelős régiók azonosítása, gyógyszercélpont validálása.

Kísérleti módszerek

- **Fehérjék előállítása:** Az alkalmazott vad típusú és mutáns TPPP/p25, α -szinuklein és SIRT2 fehérjéket rekombináns DNS technológia segítségével *E. coli* expressziós rendszerben állítottuk elő. A rendelkezésemre álló tubulint a csoport marhaagyból izolálta.
- **Fehérjék tisztítása:** Az előállított fehérjéket affinitás vagy ioncserés kromatográfia segítségével izoláltuk, majd a fehérje preparátum tisztaságát nátrium-dodecil-szulfát tartalmú poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE), koncentrációját pedig spektrofotometriás módszerrel ellenőriztük.
- **Szerkezeti vizsgálatok:** A különböző fehérjeformák szerkezetének összehasonlítására, illetve az esetleges változások (dimerizáció, feltekeredés) követésére cirkuláris dikroizmus (CD) és fluoreszcencia spektroszkópiás (8-anilino-1-naftalin-szulfonsav (ANS) hidrofób fluoreszcens próba hozzáadásával) méréseket, valamint enzimhez kötött ellenanyag vizsgálatokat (ELISA) végeztünk.
- **Kölcsönhatás vizsgálatok:** A vizsgált fehérjék között potenciálisan kialakuló heteroasszociációkat CD spektroszkópia, affinitás kromatográfia, Pepscan, ELISA, valamint a tubulint is tartalmazó minták esetén szedimentációs kísérletekkel (pelleting) határoztuk meg. A kölcsönhatásban részt vevő fehérje szegmensek meghatározásához felhasználtuk a fehérjék deléciós és „csonkolt” vagy limitált proteolízissel létrehozott formáit, illetve szintetikus peptidjeit is.
- **Tubulinpolimerizáció követése és a keletkezett mikrotubuláris ultrastruktúrák vizsgálata:** A TPPP/p25 mutációk, vagy a SIRT2-TPPP/p25 kölcsönhatás funkcionális következményeit a TPPP/p25-re nézve turbiditásméréssel vizsgáltuk, mivel 350 nm-en követve az oldat abszorbanciaváltozását, figyelemmel kísérhető a tubulin mikrotubulusokká való polimerizációja. A TPPP/p25 formák által indukált tubulinpolimerizációt pelleting kísérlettel is teszteltük, továbbá a keletkezett mikrotubuláris ultrastruktúrákat bizonyos esetekben elektronmikroszkóppal is vizualizáltuk.
- **Enzimaktivitás mérés:** A SIRT2 deacetiláz aktivitását teszteltem egyrészt tubulinon (vagy mikrotubuluson), mint természetes szubsztráton, Western blottal, acetilált- α -tubulin (K40) elleni ellenanyagot alkalmazva. Másrészt, a SIRT2 aktivitást szintetikus fluoreszcens szubsztráton, egy kereskedelmi forgalomban kapható kit (BPS Bioscience, 50087) segítségével is mértem. E módszerekkel nemzetközi együttműködés keretében megvizsgáltuk a fent említett új, specifikus SIRT2 inhibitorok (SirReal) és egy eredendően új mechanizmussal ható SIRT2-t kötő molekula (PROTAC) hatását is a fehérje deacetiláz aktivitására.

Eredmények és alkalmazási lehetőségek

A 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 közre¹⁷. A terminális régiók eltávolításával és a korábban javasolt tubulin/ α -szinuklein kötőhelyek¹⁶ kivágásával előállított csonkolt és/vagy deléciós mutáns TPPP/p25 formákat termeltem *E. coli*-ban, majd izolálás után jellemeztem a szerkezetüket CD spektroszkópiával. CD és ANS fluoreszcencia spektroszkópia (ami a fehérje hidrofób felszínének, de nem az „*unfolded*”, illetve „*folded*” szegmenseknek a kimutatását teszi lehetővé) módszerekkel kimutattam, hogy a TPPP/p25 cink-ujj motívumát tartalmazó fehérje formák képesek a bivalens kation kötésére (3). A cink-kötés a TPPP/p25 esetében kiemelt jelentőséggel bír, ugyanis a differenciált, mielinizáló oligodendrocitákban, ahol a TPPP/p25 endogén módon fejeződik ki, az intracelluláris cink koncentráció különösen magas (50 μ M) (7). A cink által indukált szerkezetváltozás a csoport korábbi eredményei alapján növeli a fehérje dimerizációs képességét, ezáltal elősegítve a fiziológiás funkció betöltését. A TPPP/p25 hajlamos az oligomerizációra^{7, 18}: mind *in vitro*, mind *in vivo* rendszerekben a fehérje elsősorban dimerizál (bizonyos körülmények között nagyobb molekulatömegű oligomer formák is megjelennek), amit diszulfid kötések stabilizálhatnak⁷ (2). Szendvics ELISA segítségével igazoltam, hogy a deléciós/csonkolt mutánsok (a rekombináns fragmensek kivételével) képesek a dimerizációra.

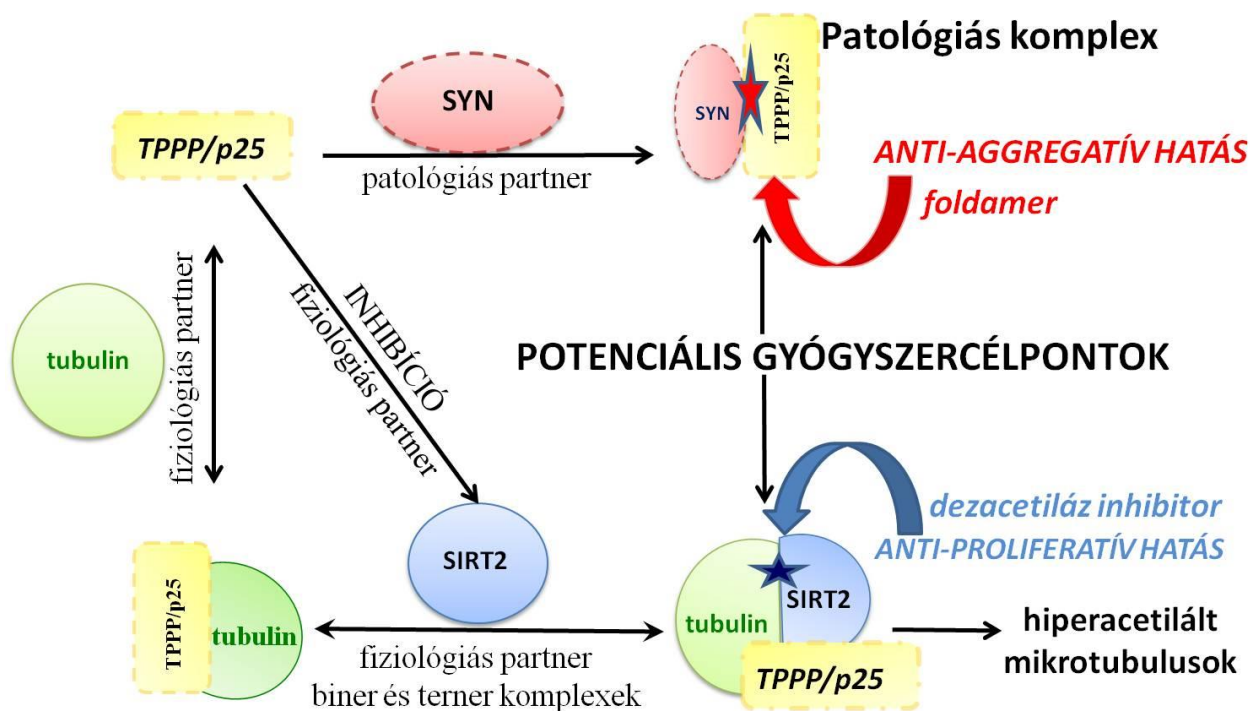
A TPPP/p25 fontos fiziológiás partnere a tubulin/mikrotubuláris rendszer³. A mutáns TPPP/p25 fehérjék tubulinnal való kölcsönhatását vizsgálva ELISA és szedimentációs kísérletek segítségével megmutattam, hogy a TPPP/p25 rendezetlen terminális szegmenseinek kulcsszerepe van nemcsak a fehérje tubulinnal való kölcsönhatásában, hanem a mikrotubulusok stabilizálásában, kötegelésében is (2). A TPPP/p25 kötődését a tubulinhoz és a tubulin dezacetiláz SIRT2 enzimhez, (mint potenciális tumorelleses gyógyszer-célponthoz) a fent említett biofizikai, biokémiai módszerekkel igazoltam, humán rekombináns fehérjékkel. A CD spektrumok rámutattak a fehérjék szerkezetbeli különbségeire is: a TPPP/p25 rendezetlen, a SIRT2 azonban a tubulinhoz hasonlóan globuláris fehérje (1). A differenciaspektrumok szerkezetváltozásra utalnak a TPPP/p25 tubulinnal és SIRT2-vel való kölcsönhatásai során (1). A kialakuló biner és terner komplexek kölcsönhatásait kvantitatív módon jellemeztem (1).

Jellemeztem a SIRT2 funkcionális hatásait is; bizonyítottam, hogy a TPPP/p25 jelenléte növeli a tubulin acetilációs szintjét, melynek oka a SIRT2 dezacetiláz aktivitásának gátlása. Turbidimetriás mérések megmutatták, hogy a SIRT2 dezacetiláz aktivitásától független módon csökkenti a TPPP/p25 tubulinpolimerizációt indukáló potenciálját, azonban a hatás függ a tubulin ultrastrukturális állapotától: a TPPP/p25-indukált mikrotubulusok rezisztensek a SIRT2 depolimerizáló és dezacetiláz aktivitásával szemben, ami arra utal, hogy bizonyos acetilációs helyek nem hozzáférhetőek a SIRT2 számára (1).

Megvizsgáltam és jellemeztem az együttműködő partnereink által szintetizált új SIRT2 inhibitorok (SirReal)¹⁰ hatékonyságát és specificitását. Az eredmények megmutatták, hogy a kémiai inhibitorok és a TPPP/p25 gátló hatása összemérhető és additív: a fehérje és a szintetikus gátlószer kombinációjával a tubulin hiperacetilációja érhető el, mely a kontrollálatlan sejtosztódás ellen hat (1) (1. ábra). Vizsgálataink kiterjedtek egy eredendően új mechanizmussal ható SIRT2-t kötő molekulára is (PROTAC)¹¹, amely oly módon gátolja a tubulin dezacetilációját, hogy indukálja a SIRT2 proteolitikus lebontódását. Ennek előnye a nagyfokú specificitás mellett, hogy csökkenti a nem kívánt mellékhatásokat, így a PROTAC struktúrák alapján szintetizált molekulák különösen alkalmasak lehetnek rákellenes molekulának¹¹.

¹⁷ Zotter A, Bodor A, Oláh J, Hlavanda E, Orosz F et al. (2011) Disordered TPPP/p25 binds GTP and displays Mg(2+)-dependent GTPase activity. FEBS Lett 585: 803-808.

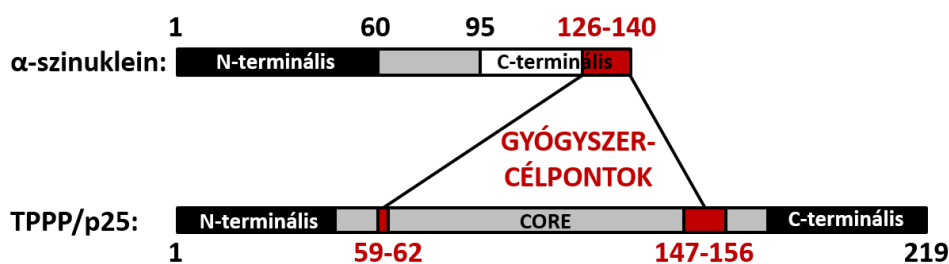
¹⁸ DeBonis S, Neumann E, Skoufias DA (2015) Self protein-protein interactions are involved in TPPP/p25 mediated microtubule bundling. Sci Rep 5: 13242.



1. ábra: A TPPP/p25 különböző kölcsönhatásai és ezek terápiás alkalmazási lehetőségei.

Kutatásaim további része a kutatócsoport azon innovatív terápiás stratégiájának kidolgozásához kapcsolódik, melynek célja olyan gyógyszercélpont azonosítása, ami révén lehetővé válhat specifikus *anti-Parkinson* ágensek tervezése és szintézise. A stratégia kiinduló pontja a következő pilléreken alapult: i) mindkét marker fehérje, az α -szinuklein és a TPPP/p25 is rendelkezik fiziológias funkcióval is, így gátlásuk önmagában nem jelenthet megoldást; ii) patológiás komplexük kialakulása aggregációhoz, majd zárványtestek kialakulásához vezet; iii) normál agyban az α -szinuklein a neuronokban, míg a TPPP/p25 az oligodendrocitákban fejeződik ki, azonban a Parkinson-kór és a multiszipstémás atrófia esetén az agyi zárványtestekben mindkét fehérje felhalmozódik és ko-lokalizálódik. Következésképpen a támadásnak a patológiás komplexre kell irányulnia, mégpedig annak kontakt felszínére, így meggátolhatjuk a két fehérje asszociációját azon patológiás körülmények között, mikor neuronokban és/vagy oligodendrocitákban találkoznak (1. ábra). Ezért fontos feladat a TPPP/p25 fiziológias és patológiás kölcsönhatásaiban résztvevő szegmenseinek azonosítása, hiszen ezek ismeretében lehetséges a patológiás folyamatra specifikus, hatékony gyógyszercélpont validálása (1. ábra).

A fent említett biokémiai, biofizikai és immunológiai módszerekkel (kiegészítve a „dupla csonkolt” TPPP/p25 és az α -szinuklein kölcsönhatásának a csoportban végzett NMR vizsgálatával), deléciós mutáns humán rekombináns TPPP/p25 és α -szinuklein fehérjéket alkalmazva, azonosítottam a patológiás kölcsönhatásban résztvevő domináns kötőfelszíneket mind a TPPP/p25, (59-62, 147-156), mind az α -szinuklein (126-140) esetén, melyek gyógyszercélpontként funkcionálhatnak. Azonban a kötőhelyek specificitását tesztelve az a meglepő tény derült ki, hogy a TPPP/p25 deléciós mutánsainak többsége, bár eltérő mértékben, de képes kötődni az α -szinukleinhez; a kötőhelyek hiánya esetén szerepüket a flexibilis fehérje más szakasza képes átvenni. Ezt a jelenséget „neomorphic chameleon” funkciónak neveztük el, jelezve, hogy a TPPP/p25 génszintű változása (deléció) nem eredményezett funkcióváltást (3). Ugyanakkor ez nem történt meg az α -szinuklein mutációja során; ott egyértelművé vált a C-terminális (126-140 szegmens) domináns, nem helyettesíthető szerepe a patológiás komplex kialakulásában (2. ábra).



2. ábra: Az azonosított gyógyszer-célpontok: a TPPP/p25 – SYN komplex kontaktfelszíne.

A kötőszegmensek lehetséges kiindulási molekulaként szolgálhatnak foldamer típusú gyógyszerek (peptidomimetikumok) fejlesztéséhez. A peptidomimetikumok alkalmazása egy új, sikerrel alkalmazott módszer fehérje-fehérje kölcsönhatások specifikus gátlására, mivel nagyfokú szelektivitással és hatékonysággal, alacsony toxicitással, jó toleranciával, alacsony mértékű szöveti felhalmozódással, magas kémiai és biológiai sokféleséggel jellemezhetőek; továbbá szintetizálás útján hozzáférhetőek, így tervezhető, fejleszthető az aktivitásuk, a proteolitikus stabilitásuk (módosított peptidek) és előnyösnek bizonyulnak a vér-agy gát permeabilitása szempontjából is^{19,20}.

¹⁹ Goyal D, Shuaib S, Mann S, Goyal B (2017) Rationally Designed Peptides and Peptidomimetics as Inhibitors of Amyloid- β (A β) Aggregation: Potential Therapeutics of Alzheimer's Disease. ACS Comb Sci 19: 55–80.

²⁰ Vagner J, Qu H, Hruby V (2008) Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery. Curr Opin Chem Biol 12: 292–296.

Tézisek

1. Különböző csonkolt és/vagy deléciós mutáns TPPP/p25 formákat termeltettem *E. coli*-ban, majd izolálás után jellemeztem a szerkezetüket CD spektroszkópia alapján. CD és ANS fluoreszcencia spektroszkópia módszerekkel kimutattam, hogy a TPPP/p25 cink-ujj motívumát tartalmazó fehérjeformák képesek a bivalens kation kötésére, ami a fehérje részleges feltekeredését, „molten globula” szerkezet kialakulását indukálja (3). Szendvics ELISA segítségével igazoltam, hogy a rekombináns fragmensek kivételével minden mutáns TPPP/p25 képes a mikrotubulusoktól független dimerizációra, ami fontos eleme a fehérje fiziológiás funkciójának (2).
2. ELISA és szedimentációs kísérletek segítségével megmutattam, hogy a TPPP/p25 rendezetlen terminális szegmenseinek kulcsszerepe van nemcsak a fehérje tubulinnal való kölcsönhatásában, hanem a mikrotubulusok stabilizálásában, kötegelésében is (2).
3. CD spektroszkópia, affinitás kromatográfia és ELISA módszerekkel meghatároztam és jellemeztem a tubulin-TPPP/p25-SIRT2 fehérjék között kialakuló heteroasszociációkat, mely kölcsönhatások során biner és terner komplexek alakulhatnak ki (1).
4. Western blottal acetil-tubulin ellenanyagot alkalmazva bizonyítottam, hogy a TPPP/p25 jelenléte növeli a tubulin acetilációs szintjét, melynek oka a SIRT2 dezacetiláz aktivitásának gátlása (1). Továbbá turbidimetriás mérésekből kiderült, hogy a SIRT2 dezacetiláz aktivitásától független módon csökkenti a TPPP/p25 tubulinpolimerizációt indukáló potenciálját, azonban a TPPP/p25 által létrehozott mikrotubulusok rezisztensek az utólag hozzáadott SIRT2 depolimerizáló és dezacetiláz aktivitásával szemben (1).
5. Nemzetközi együttműködés keretében új, specifikus SIRT2 inhibitorok (SirReal) hatását teszteltem a fehérje deacetiláz aktivitására tubulinnon, mint természetes szubsztráton, az általam kidolgozott Western blot módszerrel (1). Vizsgálataim kiterjedtek egy eredendően új mechanizmussal ható SIRT2-t kötő molekulára is („PROteolysis TArgeting Chimera: PROTAC”), amely oly módon gátolja a tubulin dezacetilációját, hogy indukálja a SIRT2 proteolitikus lebontódását. Eredményeim megmutatták, hogy a kémiai SirReal inhibitorok vagy a PROTAC és a TPPP/p25 gátló hatása összemérhető és additív: a fehérje és a szintetikus gátlószerek kombinációjával a tubulin hiperacetilációja érhető el, mely a kontrollálatlan sejtosztódás ellen hat (1).
6. A korábban valószínűsített (8) és az újonnan azonosított (3) α -szinuklein kötőhelyek deléciójával létrehozott TPPP/p25 mutánsok segítségével végzett kötődési kísérletekkel rámutattam a TPPP/p25 fehérje „Neomorphic Chameleon” tulajdonságára. Igazoltam, hogy a vad típusú TPPP/p25 esetében az α -szinukleinhez való kötődést tekintve az 59-62 és 147-156 aminosavszegmensek a relevánsak (3).
7. ELISA és affinitás kromatográfia segítségével bizonyítottam, hogy az α -szinuklein esetében a C-terminális eltávolításának hatására megszűnik a TPPP/p25-höz való kötődés, tehát e régióknak kulcsszerepe van a kölcsönhatásban, ezen belül azonosításra került a 126-140 aminosavszegmens, mint a kötődés szempontjából kulcsfontosságú szakasz (4). Kísérleteim eredményeit a csoportban végzett élő sejt kísérletek alátámasztották, következésképpen a gyógyszer-célpont validálása molekuláris és sejt szinten megtörtént, mely kiindulási pontként szolgálhat *foldamer* típusú gyógyszer-molekulák fejlesztéséhez (3-4).

Közlemények listája

I. A doktori értekezés témájához kapcsolódó originális közlemények

- (1) **Szabó A**, Oláh J, Szunyogh S, Lehotzky A, Szénási T, Csaplár M, Schiedel M, Lów P, Jung M, Ovádi J (2017) Modulation of microtubule acetylation by the interplay of TPPP/p25, SIRT2 and new anticancer agents with anti-SIRT2 potency. *SCIENTIFIC REPORTS* 7: 17070. IF: 4,259; Független idézettség: 2; Részesezés: 80%
- (2) Oláh J, Szénási T, Szunyogh S, **Szabó A**, Lehotzky A, Ovádi J (2017) Further evidence for microtubule-independent dimerization of TPPP/p25. *SCIENTIFIC REPORTS* 7: 40594. IF: 4,259; Független idézettség: 1; Részesezés: 70%
- (3) Szénási T, Oláh J, **Szabó A**, Szunyogh S, Láng A, Perczel A, Lehotzky A, Uversky VN, Ovádi J (2017) Challenging drug target for Parkinson's disease: Pathological complex of the chameleon TPPP/p25 and alpha-synuclein proteins. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-MOLECULAR BASIS OF DISEASE* 1863: 310-323. IF: 5,476; Független idézettség: 3; Részesezés: 70%
- (4) Szunyogh S, Oláh J, Szénási T, **Szabó A**, Ovádi J (2015) Targeting the interface of the pathological complex of α -synuclein and TPPP/p25. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-MOLECULAR BASIS OF DISEASE* 1852: 2653-2661. IF: 5,158; Független idézettség: 3; Részesezés: 40%
- (5) **Szabó A** (2018) Új stratégia a Parkinson-kór kutatásában – Reményt adó fehérjék? *ÉLET ÉS TUDOMÁNY* LXXIII. évfolyam 5. szám 137-139. oldal. Részesezés: 100%

II. További közlemények

- (6) Oláh J, Szénási T, **Szabó A**, Kovács K, Lów P, Stifanic M, Orosz F (2017) Tubulin binding and polymerization promoting properties of TPPP proteins are evolutionarily conserved. *BIOCHEMISTRY* 56: 1017-1024. IF: 2,938; Független idézettség: 2; Részesezés: 80%
- (7) Lehotzky A, Oláh J, Szunyogh S, **Szabó A**, Berki T, Ovádi J (2015) Zinc-induced structural changes of the disordered TPPP/p25 inhibits its degradation by the proteasome. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-MOLECULAR BASIS OF DISEASE* 1852: 83-91. IF: 5,158; Független idézettség: 0; Részesezés: 50%
- (8) Tőkési N, Oláh J, Hlavanda E, Szunyogh S, **Szabó A**, Babos F, Magyar A, Lehotzky A, Vass E, Ovádi J (2014) Identification of motives mediating alternative functions of the neomorphic moonlighting TPPP/p25. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-MOLECULAR BASIS OF DISEASE* 1842: 547-557. IF: 4,882; Független idézettség: 2; Részesezés: 50%

III. Konferencia előadások

III/1. Szóbeli előadások (előadó neve aláhúzva)

Szabó A. Oláh J, Szunyogh S, Lehotzky A, Szénási T, Ovádi J
Double life of the multifunctional disordered TPPP/p25: physiological function
2017. 09. 22-24. EpiChemBio and MuTaLig COST actions joint meeting (Porto, Portugália)

Szabó A. Oláh J, Szunyogh S, Lehotzky A, Szénási T, Ovádi J
A többfunkciós TPPP/p25 fehérje fiziológiás és patológias kölcsönhatásai: Út specifikus anti-Parkinson molekulák fejlesztéséhez
2017. 02. 02. Oláh György Doktori Iskola XIV. Doktoráns Konferencia (Budapest)

Szabó A. Oláh J, Szunyogh S, Lehotzky A, Szénási T, Ovádi J
A rendezetlen TPPP/p25 fehérje fiziológiás és patológias kölcsönhatásainak jellemzése: Út anti-Parkinson molekulák fejlesztéséhez
2016. 04. 15-17. Tavasz Szél Konferencia (Budapest)

Szabó A. Oláh J, Szunyogh S, Lehotzky A, Szénási T, Ovádi J
TPPP/p25, egy új agy-specifikus fehérje moonlighting funkciói
2014. 04. 04 – 05. VIII. Szent-Györgyi Albert Konferencia - Orvosi biotechnológia (Budapest)

III/2. Poszter prezentációk (prezentáló neve aláhúzva)

Szunyogh S. Szénási T, Oláh J, **Szabó A.**, Lehotzky A, Ovádi J
Double life of the multifunctional disordered TPPP/p25: pathological function
EpiChemBio and MuTaLig COST actions joint meeting, Porto, Portugália, 2017. 09. 22-24.

Oláh J. Szénási T, **Szabó A.**, Szunyogh S, Lehotzky A, Ovádi J
A new innovative strategy to validate drug target for Parkinson's disease
13th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases, Bécs, Ausztria, 2017. 03. 28. – 2017. 04. 02.

Oláh J. Tőkési N, Szunyogh S, **Szabó A.**, Lehotzky A, Ovádi J
Tubulin Polymerization Promoting Protein is a prototype of neomorphic moonlighting proteins
The Biological and Biomedical Consequences of Protein Moonlighting, Charles Darwin House, London, UK, 2014. 07. 29-30.