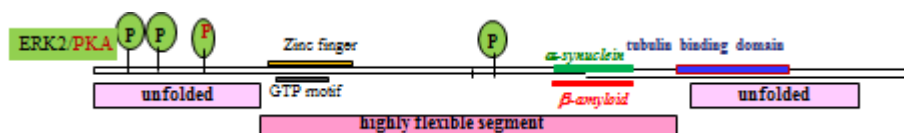


Az eukarióta sejtek érzékelő, integráló és koordináló képességét a citoskeletális hálózat komplex rendszere biztosítja, mely az aktin, a mikrotubuláris (MT) és az intermedier filament rendszerekből épül fel. Ezek a rendszerek igen dinamikusak, állandó és gyors átrendeződésekre képesek sokrétű funkcióik ellátása során. A MT rendszer különös jelentőséggel bír az agyban, számos fiziológiás és patológiás folyamatban vesz részt, melyeket kölcsönhatásai és másodlagos módosulásai határoznak meg.

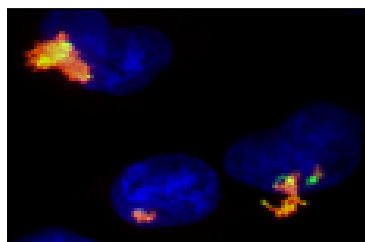
A **Tubulin Polymerization Promoting Protein** (TPPP/p25) egy agy-specifikus fehérje, mely a MT hálózat dinamikáját és stabilitását modulálja egyrészt a MT-okat keresztkötő (*bundling*), másrészt acetilációját fokozó aktivitásai révén. A fehérje szerkezet nélküli (N- és C-terminális) és flexibilis (CORE) régióit meghatároztuk, azonosítottuk foszforilációs helyeit, kötő doménjait és kölcsönható partnereit részben a korábbi OTKA projektek keretében. Bizonyítottuk a bivalens cink kation specifikus kötődését a cink kötő motívumhoz, a kötődés által indukált szerkezetváltozás (*részlege foldingot*), mely a fehérje dimerizációját, a



tubulin polimerizációs potenciáljának növelését, valamint proteozómális lebontásának csökkenését idézte elő. Bizonyítottuk,

hogy a TPPP/p25 **Neomorphic Moonlighting Protein** (multifunkcionális, ami nem génszintű változásból ered), mely fiziológiás és patológiás funkciók ellátására képes; funkcióit a kötő partner, az adott környezet határozza meg. Expressziója fiziológiás körülmények között precízen szabályozott; humán agyban elsődlegesen oligodendrocitákban fordul elő, a progenitor sejtek differenciációjában kulcs szerepet játszik; a differenciált oligodendrociták fő alkotóelemei az axonokat körülvevő mielin hüvelynek. E folyamatban bekövetkező zavar (*demyelinizáció*) a szklerózis multiplex kialakulásához vezet.

A rendezetlen fehérjék többfunkciós, többek között aggregatív jellegüknél fogva igen gyakran aktív résztvevői idegrendszeri betegségeknek, mely betegségek kialakulásában e fehérjék oldható, kisméretű asszociált formái játszanak meghatározó szerepet; a patológiás aggregátumuk felhalmozódása a betegség későbbi szakaszában jellemző kórképként jelenik meg. A kutatócsoport által felfedezett mikrotubulus asszociált (MAP) fehérje, a TPPP/p25, nem rendelkezik 3D szerkezettel, a szintén szerkezet nélküli α -



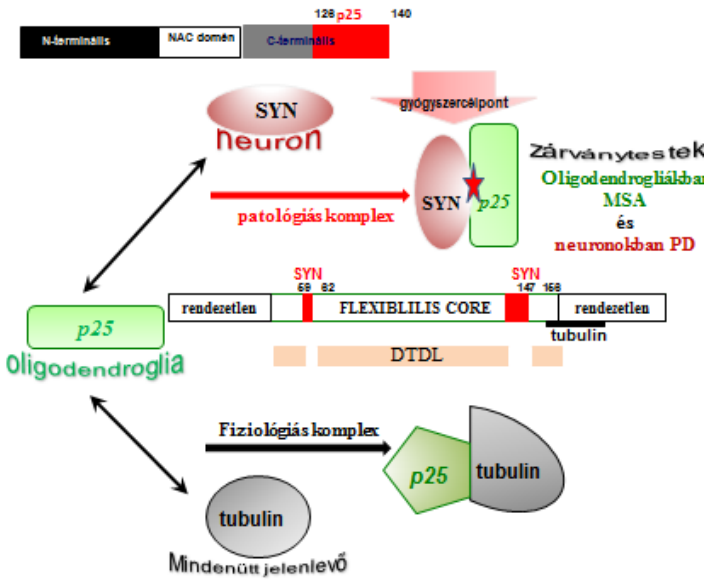
szinukleinnel (SYN) patológiás komplexet alkot, mely aggregátumok, végső soron zárványtestek képződéséhez vezet, ami jellemző kórképe a Parkinson-kórnak (PD) és a multisisztémás atrofianak (MSA), attól függően, hogy a zárványtestek a neuronokban illetve az oligodendrocitákban alakulnak ki. Ezek a rendezetlen többfunkciós fehérjék (*hallmark*) azonban nem tekinthetők ideális gyógyszer-célpontnak, miután mind fiziológiás, mind patológiás funkcióval rendelkeznek, amit a kölcsönható partnereik

határoznak meg (**Neomorphic Moonlighting Proteins**). Következésképpen, arra a felismerésre jutottunk, hogy specifikus gyógyszer-célpont a patológiás (TPPP/p25-SYN) komplex kontaktfelszíne (*interface*) lehet, abban az esetben, amennyiben az különbözik az adott célfehérje fiziológiás partnerével alkotott komplexének kontaktfelszínétől.

Az általunk javasolt innovatív stratégia molekuláris és sejtszintű alkalmazhatóságát, specifikus gyógyszer-célpont azonosítását a PD-ra jellemző esettanulmányban bizonyítottuk. Elsődleges feladatként a TPPP/p25 tubulinnal, mint fiziológiás, valamint SYN-nel, mint patológiás partnereivel alkotott komplexeinek kötőszegmensét azonosítottuk. A kötőfelszínek feltérképezése céljából mind a TPPP/p25-nek, mind a SYN-nek számos csonkolt formáját állítottuk elő és jellemeztük kölcsönhatásaik természetét, valamint a fehérje funkcióiban bekövetkezett változásokat. Vizsgálataink bizonyították, hogy a TPPP/p25 N- és/vagy C-terminális szegmensének (45 illetve 44 aa) eltávolításával a tubulinnal való kölcsönhatás gyakorlatilag megszűnik, míg a SYN-nel való kölcsönhatás megmarad, azaz a központi, flexibilis (CORE)

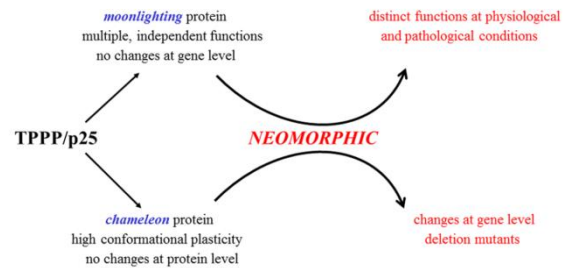
szegmens (130 aa) felelős a patológiás kölcsönhatás bizonyították, hogy a TPPP/p25 különböző szegmensei

kialakításáért. Ezen eredmények egyértelműen vesznek részt a fiziológiai illetve a patológiás komplex kialakulásában. Élő sejtvonalakon (HeLa és CHO) végzett vizsgálatunk igazolták, hogy a két hallmark fehérje ko-lokalizál és intracelluláris aggregátumot hoz létre. Az aggregáció kifejezettebb a duplacsonkolt (N- és C-terminálisától megfosztott), mint a kontrol TPPP/p25 esetén, aminek az oka abban rejlik, hogy a csonkolt fehérje nem tud asszociálni a mikrotubuláris hálózathoz, (a C-terminális szegmens felelős a tubulinhoz való kötődésért), ami elősegíti a patológiás komplex kialakulását.



További célunk volt annak bizonyítása, hogy a TPPP/p25 azonosított szekvencia szakaszai, és kizárólag ezek a szakaszok azok, melyek a tubulin illetve a SYN megkötéséért felelősek. Az N- és C-terminálisok csonkolásán

túlmenően számos deléciós mutánst, valamint rekombináns TPPP/p25 fragmenst állítottunk elő, és a korábbiakhoz hasonló in vitro szerkezeti és kölcsönhatási vizsgálatokat végeztünk el. Ezek a kísérletek arra a meglepő eredményre vezettek, hogy az azonosított TPPP/p25 szegmensek illetve bizonyos (további) szegmensek eltávolítása sem szüntette meg a SYN-nel való kölcsönhatást, kivételt képezett a fehérje központi szakaszának, a CORE régióknak, dupla deléciós mutánsa (DTDL). Ezen eredmények azt mutatták, hogy a TPPP/p25 kaméleon fehérje.

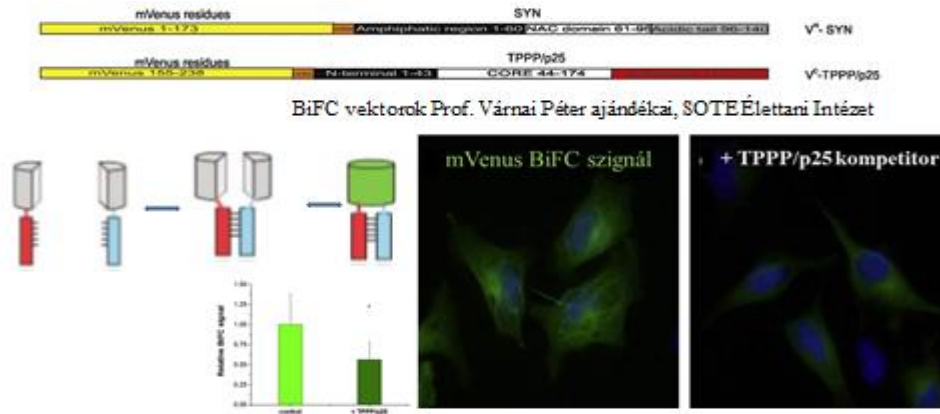


A kaméleon fehérjék nagy konformációs plaszticitással rendelkeznek, következésképpen képesek több funkciót ellátni. A TPPP/p25 speciális kaméleonként definiáltuk, miután génszintű változásként képes azonos funkciót ellátni, azaz **Neomorphic Chameleon Protein**.

A fentiek alapján bizonyításra került, hogy a TPPP/p25 speciális kaméleon tulajdonsággal rendelkezik, számos szegmensének eltávolítása esetén a rendezetlen fehérje más szegmensei képesek kölcsönhatásba lépni a SYN-nel, átveszik a vad típusú forma kötőfelszínének szerepét, még ha csökkent aktivitást fejtenek is ki. Felmerül tehát a kérdés, AZONOSÍTHATÓ-E EGYÁLTALÁN GYÓGYSZERCÉLPONT KAMÉLEON FEHÉRJÉK ESETÉN. IGEN, gyógyszercélpontként a patológiás körülmények között kialakult komplex kontakt felszíne a mérvadó, azonosítandó! Természetesen figyelembe veendő, hogy patológiás körülmények között történik-e mutáció illetve poszt-transzlációs módosulás, ami befolyásolja a módosítandó kötőfelszínt.

További stratégiát is kidolgoztunk a TPPP/p25-SYN kölcsönhatás szelektív befolyásolására. A rendezetlen SYN fehérjének a C-terminális szegmense (95-140 aa) nem rendelkezik meghatározott szerkezettel; bizonyítottuk különböző deléciós és csonkolt formáinak előállításával, hogy a 95-140 C-terminális rész igen, míg az 1-126 aa régió nem vesz részt a TPPP/p25-tel való patológiás komplex kialakulásában; a szintetikus formában előállított 126-140 aa fragmens szintén pozitív eredményt mutatott. Következésképpen ez a SYN szegmens validált célpontként volt azonosítható.

A jelen OTKA pályázat meghosszabbított szakaszában kerülhetett sor a **Bimolekuláris Fluoreszcens Komplementáció** (BiFC) technológia bevezetésére laboratóriumomba, melynek révén lehetőség nyílt a TPPP/p25 homológ és heterológ kölcsönhatásainak vizualizálására. A módszer elvét és a rendszert, melyben sikerrel alkalmaztuk a séma szemlélteti. A két partner fehérje a fluoreszcens Vénus (zöld) fehérje N- illetve C-terminális feléhez fúziós formában expresszálódnak, és a két fehérje kölcsönhatásakor az mVenus



fragmensek közel kerülve egymáshoz komplementálódnak és gerjesztés hatására a teljes mVenusnak megfelelő szignált bocsátják ki. Az immunfluoreszcens mikroszkópiás képek bizonyítják, hogy a kölcsönhatás kialakul (zöld), valamint azt is,

hogy a TPPP/p25-SYN komplex a mikrotubulus hálózaton lokalizálódik. Jelöletlen TPPP/p25 expresszió, mint kompetitor csökkenti a BiFC jelet, bizonyítva, hogy a rendszer alkalmas potenciális anti-Parkinson molekulák tesztelésére.

E módszerrel sikerült bizonyítani a TPPP/p25 mikrotubuláris stabilizáló hatásának mechanizmusát, megcáfolva Skoufias és munkatársai által a NATURE Scientific Reports-ban közölt cikket. Ennek megfelelően, a TPPP/p25 dimerizációja oly módon stabilizálja, keresztköti a MT-okat, hogy a CORE régiók kölcsönhatnak, és a rendezetlen terminálisaik asszociálnak egy-egy MT-hoz; így stabilizálják a MT hálózatot a TPPP/p25 dimer molekulák, amelyek egyébként kompaktabbak, mint monomer formáik.