

Irodalmi háttér

A társadalom előregedésével a súlyosan idült neurodegeneratív betegségek egyre komolyabb egészségügyi és társadalmi problémát jelentenek. A neurodegeneratív, ezen belül is az ún. konformációs betegségek kialakulása többlépcsős folyamat, melynek kiindulópontja egy vagy néhány specifikus fehérjevariáns, melyek aberráns kölcsönhatásokat alakítanak ki, fokozott aggregációs készséget mutatnak, ami az agy adott területein zárványtestek kialakulásához és végül sejtpusztuláshoz vezet (Taylor et al. 2002). Ilyen konformációs betegségek jellemző fehérjéi például a béta-amyloid és a hiperfoszforilált tau (Alzheimer-kór (AD)), a mutáns huntingtin (Huntington-kór (HD)), az alfa-synuclein (Parkinson-kór (PD)) (Johnson et al. 1998). Közös vonásuk, hogy szerkezet nélküli („unfolded”) vagy megváltozott szerkezetű („misfolded”) fehérjék.

A Tubulin Polymerization Promoting Protein, TPPP/p25 egy új, agy-specifikus, szerkezet nélküli fehérje, melyet munkacsoportunkban azonosítottunk (Hlavanda et al. 2002). A TPPP/p25 elsődleges célpontja a tubulin/mikrotubuláris rendszer. Két jellegzetessége a konformációs betegségek vonatkozásában a következő: egyrészt eredendően szerkezet nélküli; másrészt humán patológiás agyszövetben a neuronális és gliális zárványtestekben halmozódik fel synucleinopátiák (pl. PD) esetében (Orosz et al. 2004; Kovacs et al. 2004). A TPPP/p25 szerkezeti-funkcionális jellemzése és kölcsönható partnereinek azonosítása alapvető szerepet játszik a fehérje fiziológiai és patológiás szerepének megismerésében, gyógyszercélpontként való azonosításában.

A neurodegeneratív betegségek patomechanizmusának vizsgálata napjainkban intenzív kutatás tárgyát képezi, különböző mechanizmusokat javasoltak, pl. oxidatív stressz, mitokondriális diszfunkció, az intracelluláris transzportfolyamatok és a szinaptikus ingerület átvitel zavara (Beal, 2000; Perez-De La Cruz and Santamaria, 2006; Landles and Bates, 2004), melyeket a betegség kialakulásával hoznak összefüggésbe.

Keveset tudunk azonban a szerkezet nélküli/megváltozott szerkezetű fehérjéknek az energiametabolizmussal kapcsolatos hatásairól. Az agy fő energiaforrása a glükóz, amely a glikolízisen és a terminális oxidáción keresztül metabolizálódik, melynek során a sejtek funkcióihoz szükséges ATP termelődik. Ismert volt, hogy néhány glikolitikus enzim kölcsönhat a neurodegeneráció marker fehérjéivel (Ovádi et al. 2004), továbbá mitokondriális diszfunkcióról is beszámoltak (Gandhi and Wood, 2005; Gu et al. 1996). Arra a kérdésre kerestünk választ az elmúlt években, hogy a neurodegeneráció kialakulásáért elsődlegesen felelős fehérjék befolyásolják-e közvetlenül az energiametabolizmust illetve ha igen, milyen molekuláris mechanizmusok révén. Azért, hogy választ kapjunk a fenti kérdésre stratégiát dolgoztunk ki, melynek lényeg a következő: i) meghatározzuk az egyedi enzimek kinetikai paramétereit (V_{max} és K_M), ii) melyek, valamint az egyes enzimek ismert sebességi egyenletinek felhasználásával „szimuláljuk” a metabolizmus adott szakaszának fluxusát, iii) majd összevetjük a kísérletesen, az adott körülmények között meghatározott fluxussal. Ezt a stratégiát a glikolízis rendszer szintű leírására, valamint a mutációk vagy egyéb tényezők által indukált hatások jellemzésére alkalmaztuk.

Az energiametabolizmus és a Huntington-kór kapcsolata

A mutáns huntingtin miatt kialakuló zárványtestek és az energiametabolizmus kapcsolatát (glikolízis és mitokondriális komplexek) vizsgáltuk lokális és rendszer szinten mutáns huntingtint expresszáló transzgenikus egerekben (2,12). Eredményeink azt mutatják, hogy a mutáció - mely eredményeképpen a huntingtin fehérje N-terminális szakasza (171 aminosav) expresszálódik egy rendezetlen, hosszú poliglutamin szakasszal - a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) aktivitás csökkenését, míg a hexokináz (HK), az enoláz és a piruvát-kináz (PK) aktivitása növekedését idézte elő. A lokális változások összessége rendszer szinten a glikolitikus fluxus aktiválódásához és magasabb ATP-szinthez vezetett; magasabb szinthez, mint azt az egyedi enzimek aktivitásaiban bekövetkezett változások alapján várható lenne. Ugyanakkor a kontroll állatok esetében a modell által számolt és a kísérletesen mért fluxus megegyezett. A kísérleti adatokon alapuló modellezési technikával lehetővé vált egy ún. „metabolit channeling” mechanizmus azonosítása a glikolízis egyik elágazó pontjánál, nevezetesen, hogy a mutáns huntingtin fehérje poliglutamin része koordinálni képes a GAPDH-aldoláz komplexet, melynek révén a gliceraldehid-3-foszfát intermedier közvetlen átadódhat az aldoláz aktív centrumáról a GAPDH-ra, ezáltal irányítva, hatékonyabbá téve az intermedier átalakulását a glikolízis irányába. A modellezés révén összevetettük a kontrol és HD egerek glikolitikus metabolit szintjeit, ami magyarázatul szolgálhat más, kapcsolódó metabolikus és jelátviteli folyamatokban bekövetkező változások értelmezésére.

Meglepő módon a mitokondriális komplexek aktivitása nem mutatott csökkenést a mutáns huntingtin fehérjét expresszáló transzgenikus egereknél. Ugyanakkor a 3-nitropropionsavval kezelt egereknél, mely egy elfogadott modellje a HD-nek, a transzgenikus egerekkel ellentétben a mitokondriális komplex II aktivitás drasztikusan csökkent, a HK aktivitás nőtt, míg a GAPDH és a PK aktivitása csökkent. Adataink alapján azt javasoltuk, hogy a neurotoxinnal kezelt egerek csak fenntartással alkalmazhatóak, mint a HD állatmodelljei (2).

Az energiametabolizmus és a Parkinson-kór kapcsolata

Georg Auburger Professzor (Department of Neurology, Goethe University Medical School, Frankfurt am Main, Germany) ezen OTKA pályázat keretében készült, a HD egérmodelljeivel foglalkozó cikk kapcsán kereste meg csoportunkat, így lehetővé vált, hogy kollaborációban alfa-synuclein knock-out egereket is vizsgáljunk. Az alfa-synuclein és az energiametabolizmus kapcsolatát a fentiekben ismertetett stratégiát követve vizsgáltuk PD transzgenikus egerekben. Vizsgálataink szerint az alfa-synucleint overexpresszáló egerek esetén a betegség korai fázisában a HK aktivitása enyhén nőtt, míg a többi glikolitikus enzim aktivitása illetve az ATP-szint jelentősen nem változott. A mitokondriális Complex II aktivitása csökkent.

PD transzgenikus egerek agyszöveti mintáit tanulmányozva lehetőségünk nyílt, hogy az alfa-synuclein mellett a TPPP/p25 kifejeződését is meghatározzuk. Humán PD patológiás agyszöveti mintákban a két fehérje együttes, fokozott kifejeződését („co-enrichment”) detektáltuk (Kovacs et al. 2004). Várakozásunknak megfelelően a knock-out egerekben az alfa-synuclein nem volt kimutatható, míg a TPPP/p25 szintje szignifikánsan csökkent a kontroll egerekben mérhető értékhez képest, ami alátámasztja a

két fehérje expressziójának kölcsönkapcsolatát. A glikolízis metabolikus vizsgálata azt mutatta, hogy a glikolitikus enzimek aktivitása nem csökkent a knock-out egerekben a kontrollhoz képest, a HK aktivitás viszont kismértékben nőtt, ezzel összhangban rendszer szinten a glikolitikus fluxus enyhe növekedése volt megfigyelhető. A mitokondriális Complex I aktivitása és az ATP-szint csökkent a kontrollhoz képest.

Az eddigi adatok alapján megállapítható, hogy az alfa-synuclein expressziója/hiánya nem gátolja a glikolízist, inkább mitokondriális diszfunkciót okoz, ezen kívül ezek a változások már betegség korai szakaszában is megfigyelhetők.

A triózfoszfát-izomeráz (TPI) deficiencia

Korábbi munkám egy ritka neurodegenerációs betegség molekuláris alapjainak kutatásával kapcsolatos. A TPI deficiencia az egyetlen glikolitikus enzimdeficiencia, melyhez neurodegeneráció társul. Sokáig metabolikus betegségnek tartották. Azonban adataink alapján, bár az enzim aktivitása a mutáció hatására drasztikusan csökken, kompenzációs mechanizmusok révén a glikolitikus fluxus és az ATP-szint nem csökken. A megváltozott szerkezetű mutáns enzim aberráns kölcsönhatásokat hoz létre, fokozott asszociációt mutat. Ezért azt javasoltuk, hogy a TPI deficiencia nem a metabolikus betegségek csoportjába, hanem pathomechanizmusa alapján is a konformációs betegségek közé sorolható (3,5).

A TPPP/p25 fiziológiai szerepe



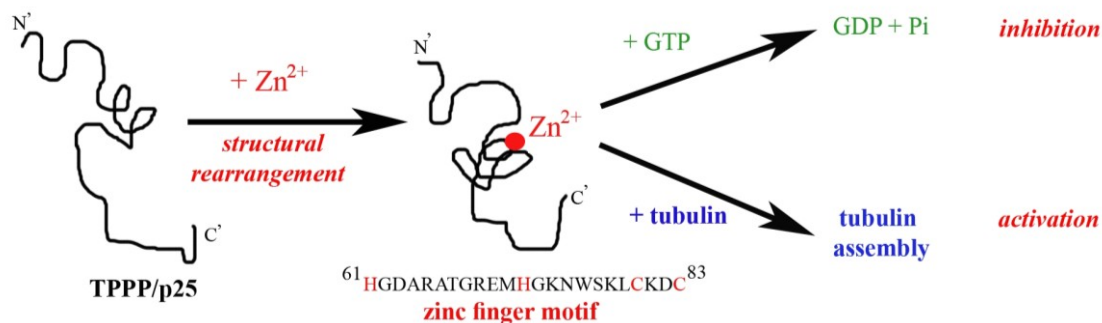
A TPPP/p25, egy, a csoportunk által azonosított, eredendően rendezetlen fehérje melynek fiziológiai funkciója a mikrotubuláris rendszer stabilizálásának és dinamikájának szabályozása (1,11). Közelmúltban közöltük, hogy a TPPP/p25 45 és 44 aminosavból álló rendezetlen N- és C-terminális szegmensei egy 130 aminosavból álló rendkívül flexibilis régiót fognak közre (7). Mint egy új, fiziológiai szempontból jelentős kölcsönható partnert, a hiszton deacetiláz 6 (HDAC6) fehérjét azonosítottuk, mely a mikrotubuláris rendszer deacetilációjáért felelős. A TPPP/p25 az enzim aktivitását gátolja, ezáltal modulálja a mikrotubulusok acetilációs szintjét (4). Ez a poszttranszlációs módosítás szabályozza a polarizált mikrotubulus alapú transzportfolyamatokat.

A TPPP/p25 egymással átfedő GTP-kötő és „zinc-finger” motívumot tartalmaz a középső, flexibilis régió belül. Nemcsak köti a nukleotidot, hanem igen meglepő módon Mg^{2+} -függő GTPáz aktivitással is bír, annak ellenére, hogy a nukleotid kötődése nem okoz globális konformáció változást (7). GTPáz aktivitása összevethető más kis G fehérjék intrinszik aktivitásával.

A TPPP/p25 egymással átfedő GTP-kötő és „zinc-finger” motívumot tartalmaz a középső, flexibilis régió belül. Nemcsak köti a nukleotidot, hanem igen meglepő módon Mg^{2+} -függő GTPáz aktivitással is bír, annak ellenére, hogy a nukleotid kötődése nem okoz globális konformáció változást (7). GTPáz aktivitása összevethető más kis G fehérjék intrinszik aktivitásával.

A Zn^{2+} az első olyan ligandum, ami a TPPP/p25 szerkezeti átrendeződését, „molten globula” képződését indukálja (10). A Zn^{2+} kötődése a fehérjéhez funkcionális következményekkel jár, aktiválja a TPPP/p25-indukált tubulin polimerizációt, míg a GTPáz aktivitást gátolja (10). Normál agyszövetben a TPPP/p25 a magas Zn^{2+} -tartalmú oligodendrocita sejtekben expresszálódik, nélkülözhetetlen a

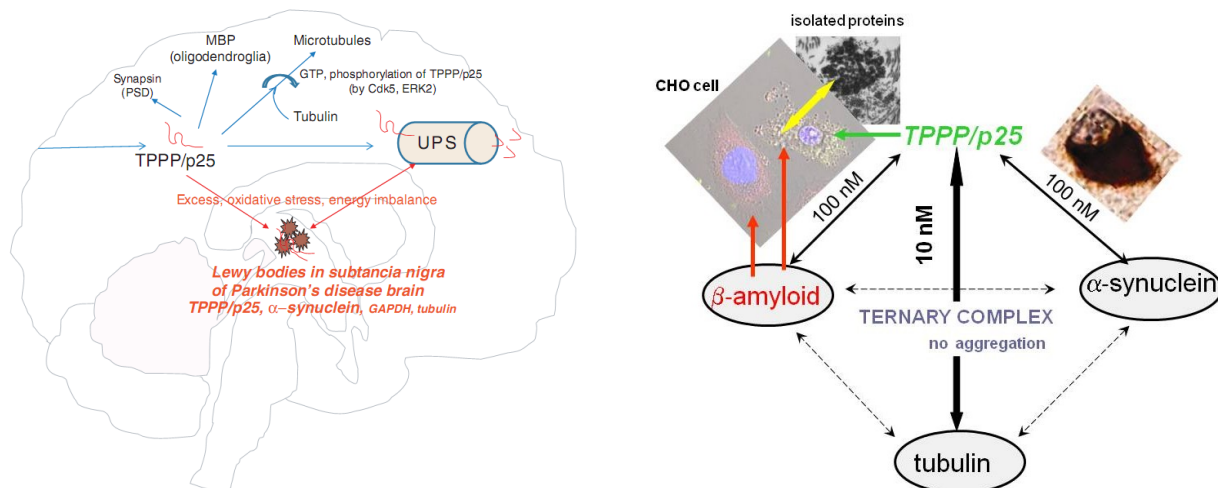
differentiációjukhoz, ami a mikrotubuláris rendszer átrendeződésével jár. A differenciált oligodendrociták alapvető építőkövei az axonokat körülvevő mielinhüvelynek, ami az ingerület átvitelben játszik szerepet. Így a Zn^{2+} TPPP/p25-höz való kötődésének vizsgálata hozzájárul a fehérje fiziológiás szerepének jobb megértéséhez.



A TPPP/p25 patológiás szerepe

A sclerosis multiplex (SM) egy autoimmun betegség, a központi idegrendszer gyulladós megbetegedése. Az SM-ben a rosszul működő immunrendszer a myelinhüvelyt támadja meg. SM-ben szenvedő betegek agyi lézióiban a TPPP/p25-pozitív oligodendrociták mennyisége csökkent (6); míg a cerebrospinális folyadékban Western-blottal kimutattuk, hogy a TPPP/p25 szintje átlagosan magasabb, mint a nem SM-ben szenvedő betegek mintájában (8). Eredményeink alapján azt javasoljuk, hogy a TPPP/p25 a SM egy potenciális diagnosztikai markere (6,8).

A TPPP/p25 humán patológiás agyszövetben a neuronális és gliális zárványtestekben halmozódik fel a PD és a multisisztémás atrophia esetében (Orosz et al. 2004; Kovacs et al. 2004). Nemrég kimutattuk, hogy a TPPP/p25 nemcsak a synucleinopátikra jellemző alfa-synucleinnel, hanem a béta-amyloiddal is kölcsönhat (9). Jellemeztük ezen fehérjék kölcsönhatását, és valószínűsítettük a kölcsönhatásért felelős TPPP/p25 szekvencia szakaszt. A TPPP/p25 és a béta-amyloid kölcsönhatása gátolja a fiziológiásan releváns TPPP/p25-indukált tubulin polimerizációt; aggregációt okoz, ami kevert típusú neurodegenerációs betegség kialakulásában játszhat szerepet (9), ami mind diagnosztikai, mint gyógyszer-célpont azonosítása szempontjából jelentős.



Publikációk a pályázat keretében

Könyvfejezet

1. Orosz, F., Lehotzky, A., Oláh, J. and Ovádi, J. *TPPP/p25: A New Unstructured Protein Hallmarking Synucleinopathies. Protein Folding and Misfolding: Neurodegenerative Diseases.* (Editors: Ovádi, J., Orosz, F.) 2009. pp. 225-250.

Cikk

2. Oláh, J., Klivényi, P., Gardián, G., Vécsei, L., Orosz, F., Kovacs, G.G., Westerhoff, H.V., and Ovádi, J. *Increased glucose metabolism and ATP level in brain tissue of Huntington's disease transgenic mice.* FEBS J., 2008. **275**, 4740-4755.

3. Orosz, F., Oláh, J., and Ovádi, J. *Triosephosphate isomerase deficiency: new insights into an enigmatic disease.* BBA-Molecular basis of disease, 2009. **1792**, 1168-1174.

4. Tőkési, N., Lehotzky, A., Horváth, I., Szabó, B., Oláh, J., Lau, P., and Ovádi, J. *TPPP/p25 promotes tubulin acetylation by inhibiting histone deacetylase 6.* J. Biol. Chem., 2010. **285**, 17896-17906.

5. Orosz, F., Oláh, J., and Ovádi, J. *Reappraisal of triosephosphate isomerase deficiency.* Eur. J. Haematol., 2010. **86**, 265-267.

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

7. Zotter, A., Bodor, A., Oláh, J., Hlavanda, E., Orosz, F., Perczel, A., and Ovádi, J. *Disordered TPPP/p25 binds GTP and displays Mg²⁺-dependent GTPase activity.* FEBS Lett., 2011. **585**, 803-808.

8. Vincze, O., Oláh, J., Zádori, D., Klivényi, P., Vécsei, L., and Ovádi, J. *A new myelin protein, TPPP/p25, reduced in demyelinated lesions is enriched in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 2011. **409**, 137-141.

9. Oláh, J., Vincze, O., Virok, D., Simon, D., Bozsó, Z., Tőkési, N., Horváth, I., Hlavanda, E., Kovács, J., Magyar, A., Szűcs, M., Orosz, F., Penke, B., and Ovádi, J. *Interactions of pathological hallmark proteins: Tubulin polymerization promoting protein/p25, {beta}-amyloid and {alpha}-synuclein.* J. Biol. Chem., 2011. **286**, 34088-34100.

10. Zotter, A., Oláh, J., Hlavanda, E., Bodor, A., Perczel, A., Szigeti, K., Fidy, J., and Ovádi, J. *Zn²⁺-Induced Rearrangement Of The Disordered Tppp/P25 Affects Its Microtubule Assembly And Gtpase Activity.* Biochemistry, 2011. **50**, 9568-9578.

11. Tőkési, N., Lehotzky, A., Oláh, J., Zotter, Á. and Ovádi, J. *Moonlighting functions of TPPP/p25.* Eur. Biophys. J. Biophys. Lett. 2011. **40**, 165.

Előadás

12. Oláh, J., Orosz, F., and Ovádi, J. *Energetics of Conformational Diseases*. 5th Biosim Conference, Copenhagen, Denmark, 2009, August 25-29.

Referencia

- Beal, M.F. *Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases*. Trends Neurosci., 2000. **23**, 298-304.
- Browne, S.E., Bowling, A.C., MacGarvey, U., Baik, M.J., Berger, S.C., Muqit, M.M., Bird, E.D. and Beal, M.F. *Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia*. Ann. Neurol., 1997. **41**, 646-653.
- Gandhi, S. and Wood, N.W. *Molecular pathogenesis of Parkinson's disease*. Hum. Mol. Genet., 2005. **14**, 2749-55.
- Gu, M., Gash, M.T., Mann, V.M., Javoy-Agid, F., Cooper, J.M. and Schapira, A.H. *Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus*. Ann. Neurol., 1996. **39**, 385-389.
- Hlavanda, E., Kovács, J., Oláh, J., Orosz, F., Medzihradsky, K.F., and Ovádi J. *Brain-specific p25 protein binds to tubulin and microtubules and induces aberrant microtubule assemblies at substoichiometric concentrations*. Biochemistry, 2002. **41**, 8657-8664.
- Johnson, A.J., L.C. Ward, and R.R. Kopito, *Aggresomes: A cellular response to misfolded proteins*. J. Cell Biol., 1998. **143**, 1883-1898.
- Kovács, G.G., László, L., Kovács, J., Jensen, P. H., Lindersson, E., A., Hudecz, F., Mező, G., Erdei, A., Molnár, T., Botond, G., Tirián, L., Lehotzky A., Gelpi, E., Budka, H., and Ovádi, J. *Novel unfolded brain-specific Tubulin Polymerization Promoting Protein,TPPP/p25 is common marker of α -synucleinopathies*. Neurobiol. Dis., 2004. **17**, 155-162.
- Landles, C. and Bates, G.P. *Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series*. EMBO Rep., 2004. **5**, 958-963.
- Orosz, F., Kovács, G.G., Lehotzky, A., Oláh, J., Vincze, O., and Ovádi, J. *TPPP/p25: from unfolded protein to misfolding disease: prediction and experiments*. Biol. Cell, 2004. **96**, 701-711.
- Ovádi, J., Orosz, F. and Hollán, S. *Functional aspects of cellular microcompartmentation in the development of neurodegeneration: mutation induced aberrant protein-protein associations*. Mol. Cell. Biochem., 2004. **256–257**, 83–93.
- Perez-De La Cruz, V. and Santamaria, A. *Integrative hypothesis for Huntington's disease: A brief review on experimental evidence*. Physiol. Res., 2007. **56**, 513-526.
- Taylor, J.P., J. Hardy, and K.H. Fischbeck, *Toxic proteins in neurodegenerative disease*. Science, 2002. **296**, 1991-1995.