

*A rendezetlen TPPP/p25 szerkezeti sokfélesége
és funkciói*

Doktori (Ph.D) értekezés tézisei

Zotter Ágnes

Okleveles vegyész

Témavezető: **Prof. Ovádi Judit,**

az MTA doktora, tudományos tanácsadó

ELTE TTK Biológia Doktori Iskola

Iskolavezető: **Prof. Erdei Anna,**

az MTA rendes tagja, tanszékvezető egyetemi tanár

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

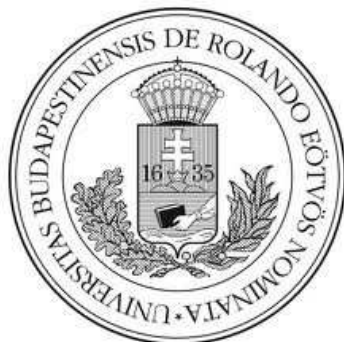
Programvezető: **Prof. Nyitrai László,**

az MTA doktora, tanszékvezető egyetemi tanár

Készült: a Magyar Tudományos Akadémia

Természettudományi Kutatóközpontjának

Enzimológiai Intézetében



Budapest, 2012.



Bevezetés

A neurodegeneratív betegségek világszerte jelentős gazdasági és társadalmi terhet jelentenek, kialakulásukban az ún. *eredendően rendezetlen* fehérjék (pl. α -szinuklein) vagy hibásan feltekeredett fehérjék meghatározó szerepet játszanak. A betegségek patomechanizmusa azonban máig nem tisztázott, ami alapvető jelentőséggel bír hatékony és specifikus gyógyszermolekulák tervezésében/előállításában. A kutatások fontos részét képezi „új szereplők” azonosítása, azok szerkezeti és funkcionális sajátosságainak valamint kölcsönhatásainak vizsgálata.

A kutatócsoportunk azonosított egy agy-specifikus fehérjét, a *Tubulin Polymerization Promoting Protein/p25-öt* (TPPP/p25) és bizonyította, hogy a fehérje nem rendelkezik jól meghatározott harmadlagos szerkezettel, a rendezetlen fehérjék közé sorolható, továbbá a Parkinson-kór illetve más szinukleinopátiák esetén az α -szinukleinnel együtt felhalmozódik az agyszöveti zárványtestekben. A fehérje patológiás kifejeződése arra utal, hogy szerepet játszhat bizonyos idegrendszeri betegségek kialakulásában. A TPPP/p25-ről csoportunk megmutatta, hogy MAP-szerű fehérje, *in vivo* kölcsönható partnere a mikrotubuláris rendszer, amelynek stabilitását és dinamikáját szabályozza kötegelő aktivitása révén. A TPPP/p25 normál agyszövetben elsősorban az oligodendroglia sejtekben fordul elő, melyek az axonokat körülvevő mielinhüvely kialakításáért felelősek. *Drosophila* embriókon végzett kísérletek azt mutatták, hogy a TPPP/p25-nek sejtosztódást gátló hatása van, amit a GTP képes felfüggeszteni, valószínűleg a TPPP/p25 és a tubulin kölcsönhatásának befolyásolása révén.

A TPPP/p25 elsődleges szerkezetét tekintve minden korábban ismert fehérjétől különbözik, a TPPP fehérjecsalád elsőként azonosított tagja. A humán genomban azonosították a TPPP/25-öt kódoló gén két paralógját, amelyek a TPPP/p25-tel homológ fehérjéket kódolnak. Ezt a két fehérjét kutatócsoportunk TPPP3/p20-nak, illetve TPPP2/p18-nak nevezte el.

Az elmúlt időszak konformációs betegségek területén végzett kutatásai főként a kisebb, oligomer fehérjeformák vizsgálatára irányultak, amelyek erősen neurotoxikus hatásúak. A TPPP/p25 rendezetlensége és az a tény, hogy szinukleinopátiákban az α -szinukleinnel együtt halmozódik fel, szükségessé teszi az egyes kölcsönhatásokban megjelenő fehérjeformák szerkezetének és funkcionális sajátosságainak vizsgálatát.

Célkitűzések

Kutatócsoportunk célja kezdetektől a TPPP/p25 fiziológias és patológias folyamatokban betöltött szerepének felderítése volt. Csoportunk eredményei arra utaltak, hogy a TPPP/p25 egyes, központi idegrendszert érintő betegségek kialakulásában egy „új szereplő” lehet. Doktori munkám során azt vizsgáltam, hogy a rendezetlen TPPP/p25 milyen kölcsönhatások révén hozza létre az(oka)t a struktúra(ka)t, amely specifikus funkciók ellátásához szükséges a patológias és/vagy a fiziológias folyamatokban.

Konkrét céljaim a következők voltak:

- ❖ Céлом volt i) hogy a TPPP/p25 szerkezetét különböző *in silico* és kísérletes szerkezetvizsgáló módszerekkel jellemezzem, ii) hogy összehasonlító vizsgálatokat végezzek a TPPP/p25-tel egy fehérjecsaldába tartozó homológ fehérjékkel, a TPPP3/p20-szal és a TPPP2/p18-cal, iii) hogy megvizsgáljam azt, hogy a szerkezeti tulajdonságok miként nyilvánulnak meg a TPPP fehérjék tubulinnal való kölcsönhatásában.
- ❖ Céлом volt i) olyan kismolekulák azonosítása, amelyek kölcsönhatnak a TPPP/p25-tel, ii) hogy a kölcsönhatás során bekövetkező szerkezetváltozást és azok funkcionális következményeit jellemezzem, különös tekintettel a TPPP/p25 tubulinpolimerizáló potenciáljának molekuláris szintű jellemzésére.
- ❖ Csoportunk korábbi kísérletei arra utaltak, hogy a TPPP/p25 többféle formában fordulhat elő (monomer, dimer, oligomer), így fontos kérdésnek tekintetem i) az egyes fehérjeformák szerkezeti illetve funkcionális sajátosságainak vizsgálatát, ii) a specifikus funkció(k) ellátásáért felelős specieszek azonosítását.

VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

Fehérje preparálás

A tubulint szarvasmarha agyból izoláltam Na és Timasheff módszere alapján. A TPPP/p25-öt, TPPP/p20-at és a TPPP/p18 fehérjét rekombináns technikával fehérje túltermeltető rendszerben állítottam elő. Az NMR mérésekhez izotópjelölt ^{15}N -, illetve ^{13}C -, ^{15}N - jelzett TPPP/p25-öt állítottunk elő M9 minimál táptalajon, prokarióta rekombináns technikával.

In silico fehérjeszerkezet-analízis

A szerkezetjósoló módszerek közül az ingyenesen hozzáférhető PONDR[®] VL-XT, IUPred és FoldIndex[©] programokat, továbbá a PONDR szerveren elérhető töltés-hidrofóbicitás összefüggést használtam.

Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

Közeli- és távoli-UV CD méréseket végeztem. A távoli-UV tartományban (190-260 nm) a fehérjék konformációját és a ligandumkötés során fellépő szerkezetváltozásokat tanulmányoztam, míg a közeli-UV tartományban (250-330 nm) a harmadlagos szerkezetet érintő változásokat detektáltam.

Fluoreszcencia spektroszkópia

A TPPP/p25 egy-triptofános (Trp⁷⁶) fehérje. Mivel a Trp fluoreszcenciája specifikusan detektálható, az emissziós spektrum változásai alapján a fluorofór környezetében bekövetkező szerkezetváltozásokra következtethetünk. A Trp fluoreszcencia mérést felhasználtam a Zn^{2+} - és a GTP-kötés tanulmányozásában. A külső fluorofór ANS festéket a TPPP/p25 felszíni tulajdonságainak jellemzésére, továbbá a fehérje egyetlen Trp-ján keresztül energiatranszfer segítségével a szerkezetvizsgálatban használtam.

NMR spektroszkópia

A Perczel csoporttal együttműködésben végzett multinukleáris NMR spektroszkópiával a TPPP/p25 szerkezetét, továbbá a Zn^{2+} - és a GTP-kötés szerkezeti vonatkozásait tanulmányoztuk.

Analitikai gélszűrés

A TPPP/p25 szerkezetének és hidrodinamikai tulajdonságainak tanulmányozására Superose 12 oszlopon analitikai gélszűrést végeztem. A gélszűrést felhasználtam a kémiai és az enzimátikus keresztkötés, valamint a GTP-kötés vizsgálatában, továbbá az egyes TPPP/p25 fehérjeformák izolálására. Az izolált fehérjefrakciók további funkcionális vizsgálatok tárgyát képezték (ld. turbiditásmérés).

Kémiai és enzimátikus keresztkötés

A dimer formák stabilizálásához egyrészt kémiai keresztkötést végeztünk az N,N-(1,3-fenilén)dimalimid (PDM) homobifunkciós reagenssel, másrészt a keresztkötést enzimátikus úton bakteriális transzglutaminázzal is elvégeztük. A PDM-del kezelt TPPP/p25 esetén a fehérje szerkezeti sajátosságait tanulmányoztuk, míg a funkcionális vizsgálatokat az enzimátikusan keresztkötött TPPP/p25-tel végeztük.

Izotermális titrációs mikrokalorimetria

A kísérletek során a TPPP/p25 és a Zn^{2+} , valamint a GTP kölcsönhatásakor keletkező hőváltozást detektáltuk. A kötődési izoterma alapján a Zn^{2+} -kötés termodinamikai paramétereit tudtuk meghatározni, míg a TPPP/p25 GTP-kötését, egy, a csoportunkban felállított modellel tudtuk leírni.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Az ELISA módszert a TPPP/p25-tubulin kölcsönhatás kvantitatív jellemzésére és a Zn^{2+} hatásának vizsgálatára használtuk.

Turbiditásmérés, a tubulinpolimerizáció vizsgálata

A tubulin heterodimerek mikrotubulussá történő polimerizációját 350 nm-en turbiditásméréssel követtem, a módszer a polimerek okozta zavarosság mérésen alapul. A TPPP/p25 tubulinpolimerizáló aktivitásának vizsgálatában alkalmazzuk ezt a jól bevált módszert.

Enzimaktivitásmérés

Két független módszert alkalmaztunk a TPPP/p25 GTPáz aktivitásának vizsgálatában. Egyik esetben egy kolorimetriás módszert, a malachitzöld reagenst használtam, másik esetben együttműködésben végzett ^{31}P -NMR mérést alkalmaztunk. Mindkét módszer az enzimátikusan felszabadított inorganikus foszfát tartalom meghatározását tette lehetővé.

Immobilizált γ -aminohexil-GTP-szefaróz affinitásoszlop

A GTP-szefaróz affinitásoszlop a gyantához immobilizált GTP segítségével lehetővé tette a TPPP/p25 GTP-kötésének igazolását.

TPPP/p25 affinitáskromatográfia

Humán rekombináns TPPP/p25-öt brómcíánnal aktivált szefaróz 4B gyantához kötöttem és az oszlopra citoszolikus marhaagy extraktumot vittem fel GTP és GDP jelenlétében. Az adott rendszerben a TPPP/p25-höz kötődött fehérjéket SDS gélen történő elválasztás után tömegspektroszkópia segítségével azonosítottuk.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- ❖ *In silico* szerkezetjósoló programok alapján megmutattam, hogy a TPPP/p25 nagymértékben rendezetlen, egyértelműen rendezetlennek jósolt régió a fehérje N-terminális része. A vizsgálatok rámutattak, hogy a fehérje szerkezeti rendezetlensége speciális aminosav-összetételével magyarázható. Egyszeresen (N^{15} -) és kétszeresen jelzett (C^{13} - N^{15} -) TPPP/p25-tel végzett multinukleáris NMR vizsgálatokkal elsőként bizonyítottuk, hogy a fehérje N- és C-terminális szegmense (45 és 44 as) rendezetlen, amelyek közrefognak egy rendkívül flexibilis régiót (130 as).
- ❖ Összehasonlító spektroszkópai vizsgálatok alapján a homológ TPPP fehérjék szerkezete jelentős különbségeket mutatott: a TPPP/p25 nagymértékben rendezetlen, a TPPP/p20 csak kisebb mértékben, viszont a TPPP/p18 esetén a globuláris fehérjékre jellemző szerkezet alakul ki. A TPPP fehérjék elsődleges szerkezetében mutatkozó hasonlóság sem a szerkezeti tulajdonságokban, sem a tubulinnal szemben mutatott affinitásban nem jelentkezik. Megállapítottam, hogy valamennyi fehérje kötődik a tubulinhoz, azonban a TPPP/p25 a legszorosabban, a kötése erősség a TPPP/p25 > TPPP/p20 > TPPP/p18 irányban csökkent, egy nagyságrendnyi különbséget mutatva a TPPP/p25 és a TPPP/p18 között. Mindez összhangban van csoportunk megfigyeléseivel, miszerint a TPPP/p18 a másik két fehérjétől eltérően homogéne oszlik el a citoszolban és nem lokalizálódik a mikrotubuláris vázon.
- ❖ Szekvencia-analízis vizsgálatok azt mutatták, hogy a fehérje GTP-kötő konzervált szekvencia elemeket, továbbá egy Cis_2Hys_2 -típusú cink-ujj motívumot tartalmaz, amelyeknek vélhetően fontos szerepe van a fehérje funkciójában. Kísérletesen igazoltam a TPPP/p25 és a GTP direkt kölcsönhatását, valamint azt, hogy a GTP-kötésben a fehérje középső, Trp⁷⁶ körüli régiója érintett.
- ❖ A TPPP/p25 a GTP kötésen kívül Mg^{2+} -függő GTPáz aktivitást mutat, amit két független módszerrel sikerült bizonyítani. A megfelelő szabályozó fehérjék azonosítása céljából *in vivo* körülményeket modellezve TPPP/p25 affinitáskromatográfiát végeztem; a kísérlet során számos kölcsönható partnert azonosítottam, ezek egy részét GTP illetve GDP jelenlétében, ami a nukleotidok specifikus szerepét jelzi a TPPP/p25-fehérje kölcsönhatások kialakításában.

- ❖ Bivalens fémionok hatását vizsgálva kimutattam, hogy a Zn^{2+} specifikusan kötődik a TPPP/p25-höz a Trp⁷⁶ környezetében, a kölcsönhatás szerkezeti átrendeződéssel jár, a fémkötés során ún. *molten globule* („olvadt gombóc”) szerkezet alakul ki. A Zn^{2+} kötődése funkcionális következményekkel jár, egyrészt aktiválja a TPPP/p25 tubulinpolimerizációs potenciálját, másrészt gátolja a TPPP/p25 GTPáz aktivitását. Mindezek alapján arra következtetünk, hogy a fehérje középső flexibilis régiója - ahol az *in silico* azonosított átfedő Zn^{2+} - és GTP-kötőhelyek találhatóak - aktívan részt vesz mind a Zn^{2+} , mind a GTP megkötésében. A Zn^{2+} szerkezetalakító hatása a TPPP/p20 és TPPP/p18 esetében nem volt megfigyelhető, ami a fehérjék eltérő szerkezetével magyarázható. A TPPP/p20 és a TPPP/p18 szekvenciájában a teljes His₂Cys₂ motívum nem található meg (HisCys₂ illetve Cys₂).
- ❖ Analitikai gélszűréssel megmutattam, hogy a TPPP/p25 jellemzően monomer és dimer formában van jelen. A látszólagos Stokes-sugarak alapján a két forma eltérő konformációval jellemezhető: a monomer kiterjedt szerkezettel, míg a dimer kompaktabb, a monomernél rendezettebb szerkezettel rendelkezik, mely diszulfid hidakon keresztül stabilizálódik. Eredményeim azt mutatják, hogy a dimerizáció koncentrációtól függő folyamat, amit szerkezeti átrendeződés kísér.
- ❖ Gélszűréssel igazoltam, hogy a GTP megkötése befolyásolja a monomer-dimer egyensúlyt; mind a monomer, mind a dimer TPPP/p25 GTP-t köt, azonban a dimerhez nagyobb affinitással kötődik a GTP, ezáltal a monomer-dimer egyensúly a magasabb molekulatömegű fehérjeformák felé tolódik el. A TPPP/p25-GTP többszörös egyensúlyi rendszert leíró matematikai modell lehetővé tette ebben a komplex biológiai rendszer a kvantitatív jellemzését. Megállapítottuk, hogy a dimer forma egy nagyságrenddel szorosabban köti a nukleotidot, mint a monomer forma. Az enzimatis funkció betöltésében a GTP-indukált dimerizáció során bekövetkező szerkezetváltozásnak fontos szerepe lehet.
- ❖ A TPPP/p25 tubulinpolimerizáló aktivitása a fehérje oligomerizációs állapotától függ, amit a fehérje koncentrációja és a GTP jelenléte is befolyásol. Enzimatis keresztkötéssel sikerült a fehérje homodimer és oligomer formáit stabilizálni illetve az egyes formákat gélszűréssel izolálni. Kimutattam, hogy a monomer, dimer, oligomer formák *in vitro* tubulinpolimerizáló aktivitásukban különböznek: a monomer nem mutat

tubulinpolimerizáló aktivitást, az oligomer csak kismértékben, szemben a dimerrel, ami igazoltan a funkcionálisan aktív forma.

KONKLÚZIÓ

A TPPP/p25 fiziológias körülmények között rendezetlen, azonban az újonnan azonosított kölcsönható partnerek, a Zn^{2+} és a GTP hatására szerkezetváltozást mutat. A TPPP/p25 középső régiója flexibilitása révén különböző átalakuláson mehet keresztül miközben a fehérje a ligandumokhoz kötődik: Zn^{2+} hatására ún. *molten globule* szerkezet alakul ki; a GTP-kötés a dimer forma stabilizálódását okozza, ami a monomerhez képest kompaktabb szerkezettel rendelkezik. A különböző komplexek eltérő funkcionális sajátosságokat mutatnak. A Zn^{2+} gátolja a GTPáz aktivitást, a ligandumok az átfedő kötőhelyekért vetélkedve a TPPP/p25 funkcióját *in vivo* is szabályozhatják. Az oligodendrociták mielinmembránjában, ahol a Zn^{2+} -nek strukturális szerepe van, a fehérje Zn^{2+} -kötése kerülhet előtérbe, míg neuronokban a szinaptoszómákban a TPPP/p25 GTPáz aktivitása érvényesülhet. Mind a Zn^{2+} , mind a GTP-t kötött forma segíti a fehérje tubulinpolimerizáló potenciálját, GTP esetében a dimerizáció következtében. A rendezetlen fehérjék a különböző partnerekhez való kötődésük során több, egymástól eltérő funkció ellátására képesek, ami az ún. *moonlighting* tulajdonságuk. A TPPP/p25 ezen tulajdonsága alapján valószínűsítjük, hogy a dimer a funkcionálisan aktív, tubulinpolimerizációt indukálni képes forma, amely a fiziológias folyamatokban vesz részt. A monomer forma nem mutat polimerizációs aktivitást, megjelenése valószínűleg a patológias folyamatokban játszik szerepet. A rendezetlen TPPP/p25 GTPáz aktivitásának kimutatása - ami eredményeim alapján a dimerizáció következménye - több szempontból jelentős eredmény. Azonosítottam egy új GTP-kötő és GTPáz aktivitással rendelkező fehérjét, ami azt bizonyítja, hogy egy rendezetlen fehérje a szerkezeti sokfélesége révén enzimatis funkció betöltésére is alkalmas. Eredményeim hozzájárulhatnak a TPPP/p25 kölcsönhatásainak molekuláris szintű megértéséhez, a kölcsönhatásokat befolyásoló ligandumok szerepének felderítéséhez és utat mutathatnak egyes neurodegeneratív betegségek patomechanizmusának feltárásához.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk:

Vincze, O., Tökési, N., Oláh, J., Hlavanda, E., **Zotter, Á.**, Horváth, I., Lehotzky, A., Tirián, L., Medzihradzky, F. K., Kovács, J., Orosz, F., Ovádi, J. (2006): TPPP proteins: members of a new family with distinct structures and functions. *Biochemistry* 45(46): 13818-26.

Zotter, Á., Bodor, A., Oláh, J., Hlavanda, E., Orosz, F., Perczel, A., Ovádi, J. (2011): Disordered TPPP/p25 binds GTP and displays Mg^{2+} -dependent GTPase activity. *FEBS Lett.* 585(5): 803-08.

Zotter, Á., Oláh, J., Hlavanda, E., Bodor, A., Perczel, A., Szigeti, K., Fidy, J., Ovádi, J. (2011): Zn^{2+} -induced rearrangement of the disordered TPPP/p25 affects its microtubule assembly and GTPase activity. *Biochemistry* 50(44): 9568-78.

Oláh, J., **Zotter, Á.**, Hlavanda, E., Szunyogh, S., Orosz, F., Szigeti, K., Fidy, J., 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(7):785-94.